



Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 7298

**Biochemische, physiologische
und klimatische Einflüsse
auf die Isoprenoidemission
der Graupappel (*Populus x
canescens* (Aiton) Sm.) und der
Steineiche (*Quercus ilex* L.)**

S. Mayrhofer

Institut für Meteorologie und Klimaforschung

Mai 2007

Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 7298

**Biochemische, physiologische und klimatische Einflüsse
auf die Isoprenoidemission der
Graupappel (*Populus x canescens* (Aiton) Sm.)
und der Steineiche (*Quercus ilex* L.)**

Sabine Mayrhofer

Institut für Meteorologie und Klimaforschung

von der Fakultät für Forst- und Umweltwissenschaften der Albert-
Ludwigs-Universität Freiburg genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe
2007

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:0005-072983

**Biochemische, physiologische und klimatische Einflüsse
auf die Isoprenoidemission der
Graupappel (*Populus x canescens* (Aiton) Sm.)
und der Steineiche (*Quercus ilex* L.)**



Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der
Fakultät für Forst- und Umweltwissenschaften der
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Brsg.

vorgelegt von

Sabine Mayrhofer

Freiburg im Breisgau

2006

Dekan der Fakultät für Forst- und Umweltwissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg: Prof. Dr. Heinz Rennenberg

Betreuer an der Fakultät und Referent: Prof. Dr. Heinz Rennenberg

Gutachter und Prüfer: Prof. Dr. Helmut Mayer

3. Prüfer: Prof. Dr. Heinrich Spiecker

Betreuer der praktischen Arbeit am FZK, IMK-IFU in Garmisch-Partenkirchen: PD Dr. Jörg-Peter Schnitzler

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2007

Zusammenfassung

Die Bedeutung von flüchtigen Isoprenoiden für die Atmosphärenchemie erfordert genaue Abschätzungen der globalen täglichen und saisonalen Emissionsraten der Vegetation. Dazu ist die detaillierte Kenntnis der biochemischen und physiologischen Vorgänge in der Pflanze unerlässlich. Experimentell charakterisierte Parameter können dabei die nötigen Informationen für prozessbasierte Vorhersagemodelle liefern. Zentrales Ziel dieser Arbeit war daher, Basiswissen über die Regulation der Isoprenoidemission durch verschiedene Umweltfaktoren auf transkriptionaler, translationaler und physiologischer Ebene zu verbessern. Die Untersuchungen wurden an der Graupappel, als Vertreter eines starken Isopren-Emitters und an der Steineiche, einer Monoterpen emittierenden Art, durchgeführt. Des Weiteren wurde in der Arbeit die Hypothese, Isopren könne als antioxidativer Schutz gegen oxidativen Stress wirken, überprüft.

1. Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden konnte die *DXR* der Graupappel (*PcDXR*) aus einer cDNA-Genbank isoliert und anschließend heterolog exprimiert werden. Die gesamte *PcDXR*-Sequenz besteht aus 1724 bp und codiert für eine Proteinsequenz aus 472 Aminosäuren. Das Molekulargewicht des Enzyms beträgt ca. 51,3 kDa. Im Vergleich zu 15 bekannten pflanzlichen Sequenzen konnte die höchste Ähnlichkeit der *PcDXR* zur *DXR* der *A. thaliana* mit einer Homologie von 86,23% festgestellt werden. Mit Hilfe der photometrisch gemessenen Umsetzung von NADPH durch die *PcDXR* konnte die Enzymaktivität des heterolog exprimierten Proteins bestimmt werden. Durch die spezifische Hemmung der Enzymaktivität mittels Fosmidomycin wurde die Funktionalität der *PcDXR* eindeutig nachgewiesen.

2. Die tageszeitliche Variation der physiologischen und biochemischen Kenngrößen der Isoprenemission bei der Graupappel wurde in 2 Jahren an zweimal 2 aufeinander folgenden Tagen an insgesamt 8 repräsentativen Bäumen ermittelt. Der photosynthetische Gaswechsel der Pflanzen (Netto-Assimilation, C_i , Transpiration und die Stomatäre Leitfähigkeit), DMADP-Gehalt der Blätter und die Isoprenemission folgten dem tageszeitlichen Verlauf von Licht und Temperatur. Hingegen zeigte die *in vitro* ISPS-Aktivität keine signifikante Veränderung während der Tagesgang-Messungen. Höchsten Einfluss auf die Isoprenemission wies die Blatttemperatur auf. Die Stomatäre Leitfähigkeit hatte keinen Einfluss auf die Isoprenemission.

3. Mittels quantitativer RT-PCR konnte in den gleichen Blattproben gezeigt werden, dass die relativen Transkriptmengen der *PcISPS* klare diurnale Verläufe mit Maxima am Vormittag aufwiesen, während im Gegensatz dazu bei den Transkriptkonzentrationen der *PcDXR* kein Tagesgang festzustellen war. Des Weiteren konnte kein kurzfristiger Einfluss der Lichtintensität und der Blatttemperatur auf die Expression von *PcDXR* oder *PcISPS* nachgewiesen werden.

4. Wie bei der Graupappel wurde die tageszeitliche Variation der physiologischen und biochemischen Kenngrößen der Monoterpenemission bei der Steineiche an zweimal 2 aufeinander folgenden Tagen ermittelt. Als Hauptkomponenten der Monoterpenemission der Steineichenblätter wurden α -Pinen, β -Pinen/Sabinen, Myrcen, Camphen, Limonen, p-Cymol und Δ -3-Caren gemessen. Isopren wurde ebenfalls in der Emission nachgewiesen. Der photosynthetische Gaswechsel der Steineichen (Netto-Assimilation, C_i , Transpiration und die Stomatäre Leitfähigkeit), und die Monoterpenemission folgten dem tageszeitlichen Verlauf von Licht und Temperatur. Weder für die DMADP-Gehalte der Steineichenblätter noch für die Summe der Mono-TPS Aktivitäten konnte ein diurnaler Verlauf nachgewiesen werden. Höchsten Einfluss auf die Monoterpenemission wies die Blatttemperatur auf. Im Gegensatz zur Graupappel war bei der Steineiche ein regulierender Einfluss der Stomatären Leitfähigkeit auf die Monoterpenemission zu beobachten. Eine schwache negative, aber signifikante Korrelation bestand zwischen DMADP und Monoterpenemissionsrate, obwohl der DMADP-Gehalt der Blätter nicht mit den Lichtintensitäten und den Blatttemperaturen korreliert war. Der DMADP-Gehalt der Steineichenblätter und die *in vitro* Mono-TPS-Aktivität zeigten einen signifikanten, negativen Zusammenhang.

5. Die Licht- und Temperaturabhängigkeit der Isoprenoidemission konnte für beide Pflanzenarten bestimmt und mit Hilfe des Guenther Algorithmus (1997) charakterisiert werden. Die Blätter der Graupappel wiesen ein Maximum der Isoprenemission bei einer Blatttemperatur von 42°C und einer Lichtintensität von ca. 300 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf. Die Monoterpenemissionsrate der Steineichenblätter war bei ca. 35°C Blatttemperatur maximal und befand sich bereits bei etwa 250 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ im Bereich der Sättigung.

6. Um den Einfluss von Isopren im bzw. in unmittelbarer Umgebung des Blattes auf die Superoxidanionenradikal- ($\text{O}_2^{\cdot-}$) Konzentration im Blatt

feststellen zu können, wurden mit Hilfe von Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) die $O_2^{\cdot-}$ -Radikale im Blatt sichtbar gemacht. Die Isoprenkonzentration in der Umgebung der Blätter wurde durch Begasung erhöht. Unter diesen Bedingungen konnte, verglichen zur Kontrollbehandlung, ein signifikanter Effekt auf die $O_2^{\cdot-}$ -Konzentrationen im Blatt nachgewiesen werden. Die spezifische Hemmung der Isoprenbiosynthese von Isopren-emittierenden Pappelblättern mit Fosmidomycin konnte diesen Effekt jedoch nicht bestätigen. Eine Isoprenbegasung von Fosmidomycin-behandelten Blättern zeigte keinen eindeutigen positiven Effekt. Ergänzende Versuche, bei denen die endogene Isoprenkonzentration gemessen wurde, zeigten ebenfalls keine eindeutige Reduktion der $O_2^{\cdot-}$ -Radikale bei erhöhten, blattinternen Isoprenkonzentrationen. Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen sind daher bezüglich einer möglichen schützenden Wirkung von Isopren gegen oxidativen Stress widersprüchlich und können keine klare Antwort auf diese Frage geben.

Biochemical, Physiological and Climatic Influence on the Emission of Isoprenoides from Gray Poplar (*Populus x canescens* (Aiton) Sm.) and Holm Oak (*Quercus ilex* L.)

Summary

Because of their important role for the atmospheric chemistry, global daily and seasonal emission rates of isoprene and monoterpenes have to be estimated with accuracy. Therefore, detailed knowledge of biochemical and physiological processes within the plant metabolism has to be gathered. Afterwards the gained cognitions are used as information for process-based model calculations. The major scope of the work was therefore to enlarge basic knowledge of the regulation of isoprenoid emission, which is known to be dependent on several environmental factors, especially light and temperature. Measurements of diurnal isoprene emission have been performed in parallel on physiological, translational and transcriptional level on leaves of Grey Poplar (*Populus x canescens*), a strong isoprene emitting species. Additionally, examinations of diurnal monoterpene emission in connection to physiologic and enzymatic processes was conducted in leaves of Holm Oak (*Quercus ilex*), which emits a large spectrum of monoterpenes. Furthermore a hypothesis was tested, whether isoprene emission may serve the plant as antioxidative protection mechanism in order to overcome oxidative stress. In main parts, the following results have been reached:

1. In the first part of this work, isolation of *PcDXR* (*DXR* of Grey Poplar) from a cDNA-Genbank and heterologous expression of the isolated gene was accomplished. The whole *PcDXR*-sequence consists of 1724 bp and encodes for a proteine sequence of 472 aminoacids. The molecular weight was approximately 51,3 kDa. Comparing the *PcDXR* sequence with the *DXR* sequences from 15 different plants, highest similarity to the *DXR* of *A. thaliana* (86,23%) has been found. With help of the photometrical measurement of the NADPH implementation mediated through the *PcDXR*, its enzyme activity has been determined. Specific inhibition of the enzyme by Fosmidomycin and thus decreased NADPH implementation rate demonstrated functionality of the isolated *PcDXR* enzyme.

2. Daytime variation of physiological and biochemical parameters of the isoprene emission of Grey Poplar was measured twice on 2 following days in

2 years. All together, measurements have been performed on 8 representative plants. Photosynthetic gas exchange (netto-assimilation, C_i , transpiration and stomatal conductance), DMADP content and Isoprene emission of the leaves followed the diurnal course of light and temperature. *In vitro* ISPS activity showed no significant diurnal changes. Strongest influence on the Isoprene emission was shown by leaf temperature. Stomatal conductance had no influence on the Isoprene emission.

3. Quantitative RT-PCR elucidated the gene expression pattern of *PcDXR* and *PcISPS* in parallel to diurnal gas exchange measurements. Gene expression of *PcISPS* showed distinct diurnal courses with maximum values on the late morning, whereas *PcDXR* transcript levels stayed consistent over the day. No short-term influence of PPFD and leaf temperature has been observed on the expression rates of *PcDXR* or *PcISPS*.

4. Daytime variation of physiological and biochemical parameters of the monoterpene emission of Holm Oak was measured the same way as for Grey Poplar. Main components of the monoterpene emission were α -pinene, β -pinene/sabinene, myrcene, camphene, limonene, p-cymol and Δ -3-carene and also isoprene was detected. The photosynthetic gas exchange of the plants (netto-assimilation, C_i , transpiration and stomatal conductance) as well as monoterpene emission followed the diurnal course of light and temperature. For leaf DMADP content and for the sum of Mono-TPS activities no diurnal changes have been detected. The leaf temperature showed strongest influence on monoterpene emission. In contrast to the measurements on Grey Poplar, a regulating influence of the stomatal conductance on the monoterpene emission could have been observed. A weak negative correlation has been detected for DMADP contents and the rate of monoterpene emission, although DMADP-content of the leaves showed no correlations to leaf temperatures and light intensity. DMADP content and *in vitro* Mono-TPS-activity of the Holm Oak leaves were correlated negatively to each other.

5. Light and temperature dependency of the isoprenoide emission was characterised for both plant species according to the Guenther algorithm (1997). Maximum isoprene emission rate of Grey Poplar was reached at leaf temperatures of 42°C and light intensities of approximately 300 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Monoterpene emission rate of the Holm Oak leaves was reaching the maximum values at a leaf temperature of 35°C and light intensities of 250 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

6. In order to test the influence of isoprene within or in the nearest surrounding of poplar leaves on the concentrations of superoxideanionradicals ($O_2^{\cdot-}$) Nitrobluetetrazoliumchloride (NBT) was used to make them visible. Isoprene concentration was raised in the near surrounding of the leaf by isoprene fumigation. Distinct influence of isoprene on the $O_2^{\cdot-}$ -concentrations compared to non fumigated leaves has been demonstrated under the chosen conditions. Specific inhibition of the isoprene synthesis and emission by Fosmidomycin showed no further confirmation of these results and also isoprene fumigation of the inhibited leaves showed no distinct effect. Considering the influence of the endogenous isoprene content, again no distinct effect of increased endogenous isoprene concentrations on the $O_2^{\cdot-}$ -concentration could have been determined. The results concerning a possible protection effect against oxidative stress are inconsistent and can not clarify this question.

Zusammenfassung	I
Summary	IV
Inhaltsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Biogene flüchtige organische Verbindungen (BVOC)	1
1.1.1 Isoprenoide	1
1.1.2 Die Bedeutung der BVOCs für die Atmosphäre	3
1.1.3 Die Bedeutung der Isoprenoide für die Pflanze	4
1.2 Isoprenoidbiosynthese: der DOXP-Stoffwechselweg und seine regulierenden Schlüsselenzyme	5
1.2.1 Der Desoxyxylulosephosphat- (DOXP-) Biosyntheseweg	6
1.2.2 Die 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat-Synthase (DXS)	8
1.2.3 Die 1-Desoxyxylulose-5-Phosphat-Reduktoisomerase (DXR)	9
1.2.4 Die Isoprensynthese und Monoterpensynthesen	9
1.3 Regulationsfaktoren der Isoprenoidemission	11
1.3.1 PPFD und Blatttemperatur	12
1.3.2 Substratverfügbarkeit	12
1.3.3 Klimawandel: Erhöhte CO ₂ -Konzentration	13
1.3.4 Stomatäre Leitfähigkeit	14
1.4 Quantitative Vorhersage der Isoprenoidemission: Erweiterung und Validierung des prozess-basierten Modells SIM-BIM	14
1.5 Die Graupappel (<i>Populus x canescens</i> (Aiton) Sm.)	15
1.6 Die Steineiche (<i>Quercus ilex</i> L.)	16
1.7 Ziele der Arbeit	18
2 Material und Methoden	20
2.1 Pflanzenmaterial und Anzucht	20
2.1.1 <i>Populus x canescens</i> (Aiton) Sm.	20
2.1.2 <i>Quercus ilex</i> L.	21
2.2 Die Isolierung des Desoxyxylulose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gens aus einer cDNA Genbank der Graupappel	22
2.2.1 Primerdesign	22
2.2.2 Extraktion der Gesamt RNA aus Graupappelblättern	23
2.2.2.1 Extraktion der RNA nach der Tri-Reagent Methode	23
2.2.2.2 Extraktion der RNA mittels Qiagen-RNeasy Minikit	24

2.2.3	Photometrische Bestimmung der Quantität und Reinheit von Nukleinsäuren	24
2.2.4	Reverse Transkription	25
2.2.4.1	Reverse Transkription für die Erzeugung der PcDXR-Sonde	25
2.2.4.2	Reverse Transkription für die Genexpressionsanalyse	25
2.2.5	Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	25
2.2.5.1	PCR der Gensonde	26
2.2.5.2	PCR für die Insertion der PcDXR in das Gateway-System	26
2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	27
2.2.7	Klonieren und Transformieren	28
2.2.7.1	TOPO Klonierung in den Vektor pCRII-TOPO	28
2.2.7.2	Klonierung über Ligase	29
2.2.7.3	Das Gateway System	29
2.2.7.3.1	Die BP-Rekombinationsreaktion (attB x attP → attL)	30
2.2.7.3.2	Die LR-Rekombinationsreaktion (attL x attR → attB)	30
2.2.8	DNA Isolierung von Plasmiden	31
2.2.8.1	DNA Isolierung von Plasmiden nach Birnboim & Doly	31
2.2.8.2	DNA Isolierung von Plasmiden mittels Qiagen Spin Minikit	32
2.2.9	Restriktion	33
2.2.10	Sequenzierung	33
2.2.10.1	Cycle sequencing	33
2.2.10.2	Ethanol-Präzipitation	34
2.2.10.3	Wartung und Einstellungen des Analysegerätes	34
2.2.10.4	Sequenzanalyse	35
2.2.11	Hybridisierung der PcDXR-Gensonde mit der λ-Phagen-Genbank	
2.2.11.1	Digoxigenin-Markierung der Gensonde	36
2.2.11.2	Anzucht der λ-Phagen	36
2.2.11.3	Transfer der Phagenplaques auf Nitrozellulosefilter	37
2.2.11.4	Hybridisierung	38
2.2.11.5	<i>In vivo</i> Excision des pBluescript SK(-)-Phagemids	39
2.3	Bestimmung der Genexpression von PcDXR und PcISPS	40
2.3.1	Quantitative Reverse Transkriptase (RT-) PCR	40
2.3.1.1	Berechnung der Plasmidkonzentrationen für die Eichgerade	42
2.3.1.2	Datenverarbeitung	43
2.4	Heterologe Expression der PcDXR und Proteinreinigung	43

Inhaltsverzeichnis

2.4.1	Anzucht und Aufschluss der Bakterien	43
2.4.2	Proteinreinigung mittels Affinitäts-Säulenchromatographie unter nativen Bedingungen	44
2.4.3	Colorimetrische Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford	44
2.4.4	Denaturierende SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	45
2.5	Nachweis der Funktionalität der gereinigten PcDXR	46
2.5.1	Herstellung des Substrates Desoxyxylulose-5-Phosphat (DOXP)	47
2.5.2	Photometrische Bestimmung der NADPH-Umsetzung durch die DXR	48
2.6	Bestimmung von DMADP-Gehalt und ISPS- bzw. Monoterpensynthase- (Mono-TPS-) Aktivität in Blättern	48
2.6.1	Bestimmung des DMADP-Gehaltes in Blättern	48
2.6.1.1	Hydrolyse von DMADP	48
2.6.1.2	Gaschromatographische Analyse von Isopren	49
2.6.1.3	Berechnung der DMADP-Wiederfindungsrate	50
2.6.2	Bestimmung der ISPS-Aktivität in Pappelblättern	52
2.6.2.1	Herstellung von Pappelblattextrakten	52
2.6.2.2	Der Enzymtest und die Berechnung der ISPS-Aktivität	53
2.6.3	Bestimmung der Mono-TPS-Aktivität in <i>Q. ilex</i> Blättern	53
2.6.3.1	Herstellung von Blattextrakten der Steineiche	53
2.6.3.2	Der Enzymtest	54
2.6.3.3	Gaschromatographische Analyse	54
2.6.3.4	Quantifizierung der Monoterpene und Berechnung der Enzymaktivität	55
2.7	Messung des photosynthetischen Gaswechsels und der Isoprenoid-emission	56
2.7.1	Die Messanlage	56
2.7.2	Klimadatenaufzeichnung	58
2.7.3	Das Küvettensystem	59
2.7.4	Messung und Kalibration von Netto-Assimilation, Respiration und Transpiration	60
2.7.5	Stomatäre Leitfähigkeit und Blatt interne CO ₂ -Konzentration	64
2.7.6	Messung der Isoprenkonzentration	64
2.7.7	Messung der Monoterpenemission	66
2.7.8	Messung und Kalibrierung der versuchsbegleitenden Parameter	68

Inhaltsverzeichnis

2.7.8.1	Thermosensoren der Küvette	68
2.7.8.2	Quantensensoren der Küvette	69
2.7.8.3	Absolut-BINOS	69
2.7.9	Versuchsaufbau und Ablauf der Messungen von Tagesgängen	69
2.7.9.1	Tagesgangexperimente mit Graupappel	70
2.7.9.2	Tagesgangexperimente mit Steineiche	70
2.7.10	Messung der Lichtabhängigkeit	71
2.7.11	Messung der Temperaturabhängigkeit	71
2.7.12	Ermittlung der spezifischen Licht- und Temperaturfaktoren für den Algorithmus nach Guenther (1997)	72
2.8	Datenerfassung und -verarbeitung	72
2.9	Einfluss von Isopren auf die Superoxidanionenradikalkonzentration im Blatt	72
2.9.1	Isoprenbegasung	72
2.9.1.1	Hemmung der Isoprensynthese und -emission durch die Zugabe von Fosmidomycin	73
2.9.2	NBT-Färbung	74
2.9.3	Blattinterne Isoprenkonzentration und Superoxidanionenradikale	
2.9.3.1	Versuchsaufbau und Ablauf	75
2.9.3.2	Test zur Bestimmung des Einflusses der Abscisinsäure auf Superoxidanionenradikale	76
2.9.4	Messung und Berechnung des blattinternen Isoprengehaltes	76
2.10	Statistik	77
2.11	Herkunft verwendeter Kits, Bioreagenzien, Chemikalien und sonstiger Verbrauchsmaterialien	77
2.12	Verwendete Puffer und Nährlösungen	78
3	Ergebnisse	81
3.1	Isolierung der PcDXR aus einer cDNA-Genbank der Graupappel und Überprüfung der Funktionalität des heterolog exprimierten Enzyms	81
3.1.1	Herstellung der Gensonde	81
3.1.2	Hybridisierung und Isolierung positiver Klone	82
3.1.3	Sequenzierung und Sequenzvergleich	82
3.1.4	Heterologe Expression und Nachweis der Funktionalität	91
3.1.4.1	Indirekter Nachweis der Expression mittels SDS-PAGE	91

3.1.4.2	Indirekter Funktionalitätsnachweis der DXR-Enzymaktivität durch die spektralphotometrische Messung der NADPH-Umsetzung	92
3.2	Diurnaler Verlauf von Genexpression, Aktivität und Gehalt von Schlüsselmetaboliten des DOXP-Stoffwechselweges, des photosynthetischen Gaswechsels und der Isoprenemission bei der Graupappel	94
3.2.1	Tagesverlauf der physiologischen und biochemischen Parameter im Jahr 2001	95
3.2.2	Tagesverlauf der physiologischen und biochemischen Parameter im Jahr 2002	98
3.2.3	Expression von PcDXR und PcISPS im diurnalen Verlauf	100
3.2.4	Zusammenhänge der gemessenen Parameter	101
3.2.5	Licht- und Temperaturabhängigkeit	104
3.2.5.1	Temperaturabhängigkeit von PcISPS-Aktivität und DMADP-Gehalt in Graupappelblättern	106
3.3	Photosynthetischer Gaswechsel und Monoterpenemission bei der Steineiche	107
3.3.1	Gaswechsel und Monoterpenemission im Tagesverlauf	107
3.3.2	Licht- und Temperaturabhängigkeit	116
3.4	Einfluss von Isopren auf die Superoxidanionenradikalkonzentration im Blatt	118
3.4.1	Auswirkung von Isoprenbegasung auf die Konzentration von Superoxidanionradikalen im Blatt	119
3.4.2	Einfluss von Fosmidomycin auf die Isoprensynthese und damit auf die O ₂ ⁻ -Konzentration	121
3.4.3	Blattinterne Isoprenkonzentration und Superoxidanionenradikale	124
4	Diskussion	127
4.1	Isolierung und heterologe Expression der PcDXR	127
4.2	Genexpressionsanalyse: Regulation auf Transkriptionsebene	129
4.3	Regulation der Isoprenoidbiosynthese und -emission durch Umweltfaktoren	131
4.3.1	Regulation bei der Graupappel	131

4.3.2	Regulation bei der Steineiche	135
4.4	Die Funktion der Isoprenoidemission für die Pflanze	137
4.5	Feedback-Regulation der Isoprenemission?	143
4.6	Ausblick	145
5	Literatur	147
6	Anhang	163
6.1	Molekularbiologie	163
6.1.1	DNA-Größenstandards	163
6.1.2	Der genetische Code	164
6.2	Photosynthetischer Gaswechsel und Isoprenoidemission	165
6.2.1	Flussdiagramm der Gaswechsellmessanlage	165
6.2.2	Tagesgangmessungen der Graupappel und der Steineiche	165
6.2.3	Berechnung des photosynthetischen Gaswechsels und der Isoprenemission	170
6.2.4	Klimadaten der Sommermonate von 2001 bis 2003	175
6.3	Abkürzungen	179

1 Einleitung

1.1 Biogene flüchtige organische Verbindungen (BVOC)

Ein kleiner Anteil vom CO₂, das von Pflanzen assimiliert wird, wird als biogene flüchtige organische Verbindungen („*biogenic volatile organic compounds*“, BVOC) wieder in die Atmosphäre abgegeben. Den größten Teil dieser Emissionen machen Isopren, Terpene und einige oxygenierte Verbindungen, vor allem Carbonyle und Alkohole, aus (GUENTHER *et al.*, 1995). VOCs sind durch ihre chemischen Eigenschaften definiert mit einem Siedepunkt unter 240°C bei 1013 mbar und einem Dampfdruck von $\geq 0,1$ mbar bei 20°C (DOTT *et al.*, 2004).

1.1.1 Isoprenoide

Isopren, i.e. 2-Methyl-1,3-Butadien (C₅H₈), ist die kleinste Einheit der Isoprenoide und kommt ubiquitär in allen Organismen vor. Durch Kopf-Schwanz-Addition von Isopentenylidiphosphat, der aktivierten Form von Isopren und Dimethylallyldiphosphat, der direkten Isopren Vorstufe und weiterer Kondensationen entstehen Moleküle von bis zu 40 Kohlenstoffatomen. Bisher sind mehr als 25000 Isoprenoide bekannt (SACCHETTINI & POULTER, 1997), die ein breites Spektrum an wichtigen biologischen Funktionen im Primärstoffwechsel als Pigmente, Membranbestandteile, Elektronentransportüberträger, Vitamine oder als Hormone (z. Bsp. Carotinoide, Seitenkette des Chlorophylls, Chinone, Sterole) erfüllen. Im Sekundärstoffwechsel dienen vor allem die Mono-, Sesqui-, Di-, Tri-, Tetra- oder Polyterpene als Kommunikationsmittel zwischen Pflanzen in allelopathischen Wechselwirkungen oder zwischen Pflanzen und Tieren beispielsweise zur Anlockung von Bestäubern und zur Abwehr von Schadinsekten (LANGENHEIM, 1994). Es sind mehr als 1000 verschiedene Monoterpenmoleküle bekannt (GERSHENZON UND CROTEAU, 1991), die als offenkettige, mono-, bi- oder trizyklische C₁₀-Verbindungen in vielen verschiedenen Pflanzenfamilien nachgewiesen werden konnten (KESSELMEIER UND STAUDT, 1999). In Tabelle 1.1 sind die chemischen Eigenschaften von Isopren, der Monoterpene und von p-Cymol aus dem Emissionsspektrum der Steineiche angeführt.

Die Emission von Isopren wurde erstmals von SANADZE (SANADZE, 1957 in SANADZE, 1991) entdeckt. Seither wurden mehrere hundert Isopren emittierende Pflanzenarten beschrieben. Auch Algen (MOORE *et al.*, 1994), Moose (HANSON *et al.*, 1999), Farne und krautige Pflanzen (TINGEY *et al.*, 1987) emittieren Isopren.

Vor allem aber bei Bäumen gibt es Arten, die Isopren in bedeutenden Mengen emittieren (HARLEY *et al.*, 1999).

Tab. 1.1 Chemische Eigenschaften und Strukturformeln von Isopren und Monoterpenen aus dem Emissionsspektrum der Steineiche.

Isoprenoide	Summenformel	Beschreibung	MG [g mol ⁻¹]	Dichte bei 25°C [g/ml]	Schmelzpt. [°C]	Siedepkt. [°C]	Flammpkt [°F]	Struktur
Isopren (2-Methyl-1,3-butadien)	C ₅ H ₈	Farblose Flüssigkeit	68,12	0,68	-146	34		
Camphen	C ₁₀ H ₁₆	weißer, wachsartiger Feststoff	136,24	0,84	-50	160	98	
Δ-3-Caren	C ₁₀ H ₁₆	Farblose Flüssigkeit	136,24	0,87		169	115	
p-Cymol (1-Methyl-4-isopropylbenzol)	C ₁₀ H ₁₄	Farblose Flüssigkeit	134,24	0,86	-68	177	119	
Limonen (1-Methyl-4-Isopropenyl-1-Cyclohexen)	C ₁₀ H ₁₆	Farblose Flüssigkeit	136,24	0,84	-76	175	48°C?	
Myrcen (7-Methyl-3-Methyl-1,6-Oktadien)	C ₁₀ H ₁₆	Farblose Flüssigkeit	136,24	0,79		167	103	
α-Pinen	C ₁₀ H ₁₆	Farblose Flüssigkeit	136,24	0,86	-62	155	90	
β-Pinen	C ₁₀ H ₁₆	Farblose Flüssigkeit	136,24	0,86	-61	165	91	
Sabinen	C ₁₀ H ₁₆	Farblose Flüssigkeit	136,24	0,84	-60	164		

Isoprenoide können über 2 unterschiedliche Stoffwechselwege synthetisiert werden. Während bei Menschen, Tieren und Pilzen alle benötigten Isoprenoide über den cytosolischen Acetat-Mevalonat-Biosyntheseweg synthetisiert werden, existiert bei Pflanzen zusätzlich der Desoxyxylulose-5-Phosphat- (DOXP-) Stoffwechselweg in den Chloroplasten (LICHTENTHALER, 1999). Die Isoprenbiosynthese durch den DOXP-Stoffwechselweg, wie sie im Weiteren beschrieben wird, findet bei Pflanzen in den Chloroplasten statt. In Cyanobakterien wurde der DOXP-Stoffwechselweg mehrfach nachgewiesen, und bestätigt damit die Endosymbiontentheorie. Danach stammen die Chloroplasten ursprünglich von Cyanobakterien ab (LICHTENTHALER, 1999). Die Isoprenbildung wurde auch für viele Gram-positive Bakterien und Actinomyceten nachgewiesen (ROHMER *et al.*,

1993; KUZMA, 1995; WILKINS, 1996). CARRAU *et al.* (2005) haben kürzlich einen 3. Syntheseweg (Methylcrotonyl-CoA (MCC)-Stoffwechselweg) beschrieben, der den Leucin-Katabolismus mit der Isoprenoidbiosynthese verbindet. Der verbindende enzymatische Schritt wird von einer 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase katalysiert. Dieses Enzym wurde in einigen Bakterien und in den Mitochondrien von Säugetieren und Pflanzen gefunden. CARRAU *et al.* (2005) fanden in dieser Studie widersprüchliche Ergebnisse für die Synthese von Monoterpenen und Sesquiterpenen bei der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und postulieren aufgrund von DNA-Sequenz-vergleichen eine in Mitochondrien stattfindende Isoprenoidbiosynthese in *S. cerevisiae*.

1.1.2 Die Bedeutung der BVOCs für die Atmosphäre

Die meisten BVOCs reagieren mit Hydroxylradikalen, NO₃-Radikalen und Ozon in ähnlicher Weise wie die meisten VOCs anthropogenen Ursprungs (ATKINSON und AREY, 1998). Quantitativ überragt die globale Emission der BVOCs die der anthropogenen VOCs jedoch um ein Mehrfaches (GUENTHER *et al.*, 1995; STEINBRECHER UND ZIEGLER, 1997). Die weltweit geschätzte jährliche Emission von Isopren und Monoterpenen beträgt je ca. 200-500 Mt Kohlenstoff, etwa dieselbe Größenordnung wie die jährliche globale Methanemission (GUENTHER *et al.*, 1995). Isopren ist aufgrund seiner beiden ungesättigten Doppelbindungen hoch reaktiv und verringert dadurch die OH⁻-Konzentration der unteren Troposphäre entscheidend, was zu verlangsamten Abbauraten von wichtigen Treibhausgasen, wie z. Bsp. Methan (BELL *et al.*, 2003) führt. Reagiert Isopren direkt mit Ozon, wird es vorwiegend zu Methylvinylketon, Methacrolein und Formaldehyd abgebaut. Zusätzlich entstehen dadurch erhebliche Mengen an Hydrogenperoxid und andere oxidative Moleküle (FUENTES *et al.*, 2000). In Gegenwart einer ausreichenden Konzentration von NO_x können die BVOCs direkt zur Bildung von Ozon (FUENTES *et al.*, 2000) und sekundären organischen Aerosolen (HOFFMAN *et al.*, 1997, GRIFFIN *et al.*, 1999) in der Troposphäre führen. POISSON *et al.* (2000) haben berechnet, dass durch gegenwärtige Emissionsraten nicht-methanogener Kohlenwasserstoffe, großteils Isopren und Monoterpene, die Oberflächenkonzentration von Ozon um bis zu 60% und die atmosphärische Lebensdauer von Methan um ca. 14% erhöht wird.

1.1.3 Die Bedeutung der Isoprenoide für die Pflanze

Viele Pflanzen, die Isoprenoide synthetisieren, besitzen dafür spezifische Speicherorgane. Monoterpene erfüllen in Pflanzen wichtige ökologische Funktionen, wie zum Beispiel Abwehr von Herbivoren und Pathogenen, allelopathische Wechselwirkungen, Anlockung von Bestäubern oder Wundheilung (LANGENHEIM, 1994). Die Bedeutung der Isoprenoidemission von Pflanzen, die keine spezifischen Speicherorgane für die Terpene besitzen, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht aufgeklärt. Die Isoprenoide, die von der Pflanze emittiert werden, werden durch den komplexen DOXP-Stoffwechselweg synthetisiert und sowohl auf Transkriptionsebene, translational und auch auf enzymatischer Ebene reguliert. Ihre Emission hängt stark von den Licht- und Temperaturverhältnissen, die auf das Blatt einwirken, ab (GUENTHER *et al.*, 1995). Die ursprüngliche Hypothese, dass durch die Emission möglicherweise überschüssige Energie- oder Kohlenstoffreserven abgebaut werden (LOGAN *et al.*, 2000) wurde durch den Mechanismus, der auch in Bakterien vermutet wird (FALL UND COPLEY, 2000), erklärt und von ROSENSTIEL *et al.* (2006) wieder aufgegriffen. Die Emission der Isoprenoide könnte als eine Art Ventil überschüssige Reduktionsäquivalente entfernen, die bei erhöhter Photosyntheseaktivität bei hohen Lichtintensitäten akkumuliert werden und dabei das Photosystem schädigen können. Die aufwendige Synthese und Regulation dieses Stoffwechselweges scheint jedoch eine weitere Klärung für eine andere bedeutsame Funktion der Emission zu erfordern. Verschiedene Experimente haben zu der Hypothese geführt, dass blattinterne Isoprenoidkonzentrationen zu erhöhter Thermotoleranz der emittierenden Pflanzen führen können (SHARKEY UND SINGSAAS, 1995; LORETO *et al.*, 1998a; SINGSAAS UND SHARKEY, 1998; DELFINE *et al.*, 2000; SHARKEY UND YEH, 2001; PEÑUELAS *et al.*, 2005) oder Isopren und Monoterpene als antioxidativer Schutz vor reaktiven Sauerstoffverbindungen wie z. Bsp. Singulett-Sauerstoff, Wasserstoffperoxid (LORETO UND VELIKOVA, 2001; AFFEK UND YAKIR, 2002; PEÑUELAS *et al.*, 2005) und Ozon (LORETO *et al.*, 2001a) wirken können. Die Mechanismen dieser Schutzfunktionen sind jedoch unklar. Die lipophile Eigenschaft des Isoprens könnte bewirken, dass es, ähnlich wie Zeaxanthin, in die Phospholipidmembranen der Zellen eingebaut werden kann und so die Fluidität der Membranen positiv beeinflusst. SHARKEY UND SINGSAAS (1995) erklären auf diese Weise eine erhöhte Thermotoleranz der Blätter durch Membranstabilisierung.

1.2 Isoprenoidbiosynthese: der DOXP-Stoffwechselweg und seine regulierenden Schlüsselenzyme

Alle Isoprenoide werden aus 2 C₅-Vorläufer Molekülen gebildet: aus Isopentenyl-diphosphat (IDP) und Dimethylallyldiphosphat (DMADP), die entweder über den Acetat-Mevalonat- oder den DOXP-Stoffwechsel synthetisiert werden. In Abbildung 1.1 ist die Isoprenoidbiosynthese in der Pflanzenzelle vereinfacht dargestellt. Im Cytoplasma der Pflanzenzelle läuft der Acetat-Mevalonat-Biosyntheseweg für Sesqui-, Di-, Polyterpene und Phytosterole ab.

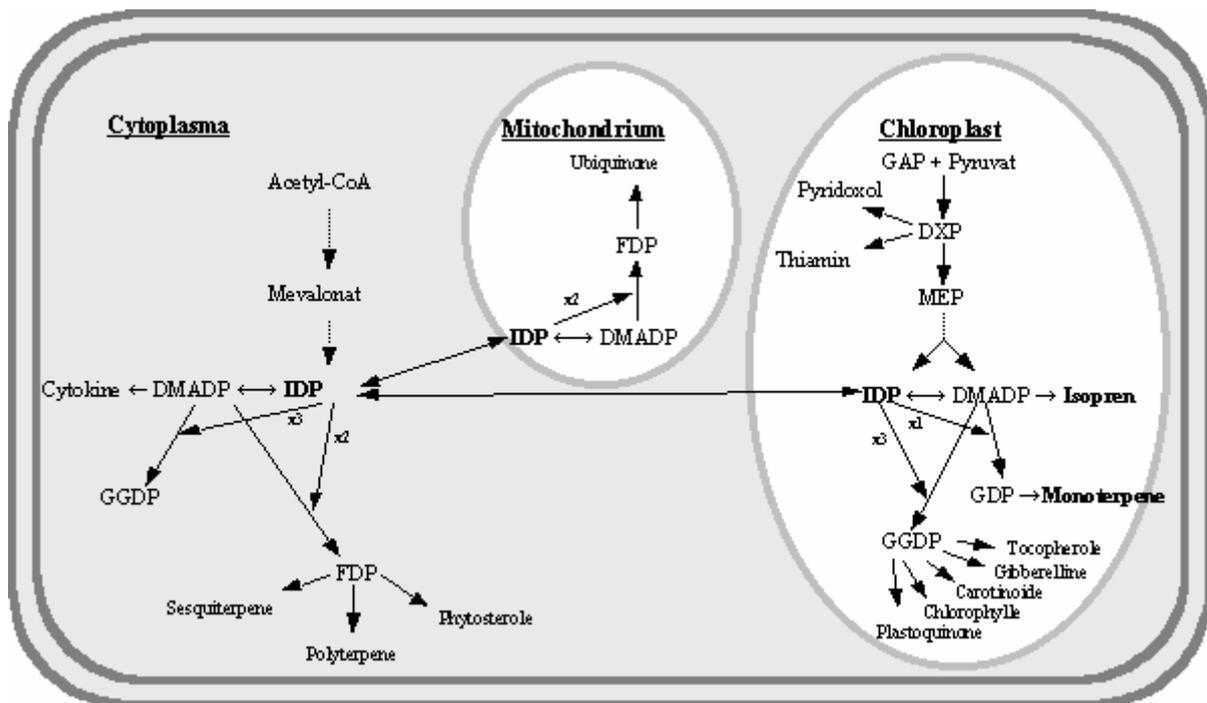


Abb.1.1 Isoprenoidbiosynthese in Pflanzenzellen. Abbildung leicht verändert nach RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN UND BORONAT (2002). DMADP: Dimethylallyldiphosphat, GGDP: Geranylgeranyldiphosphat, FDP: Farnesyldiphosphat, GDP: Geranyldiphosphat, GAP: Glycerinaldehyd-3-Phosphat, DOXP: Desoxyxylulose-5-Phosphat und MEP: Methylerythritol-4-Phosphat.

Der DOXP-Biosyntheseweg konnte erstmals in Bakterien nachgewiesen werden (ROHMER *et al.*, 1993). Bis zum Jahr 2002 konnten alle Stufen des Stoffwechselweges vollständig aufgeklärt werden (ADAM *et al.*, 2002). Im plastidären Stoffwechselweg wird aus Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Pyruvat über mehrere Schritte DMADP bzw. IDP synthetisiert und aus DMADP schließlich Isopren gebildet. Zur Synthese der Monoterpene wird aus IDP und DMADP Geranyldiphosphat (GDP) gebildet. In weiterer Folge durch mehrfaches Anhängen von IDP-Einheiten an das GDP werden schließlich höhere Isoprenoide, wie Chlorophylle, Carotinoide, Gibberelline, Tocopherole und Plastoquinone synthetisiert. Im cytoplasmatischen Acetat-Mevalonat-Stoffwechselweg wird das

DMADP bzw. IDP aus Acetyl-CoA über Mevalonat synthetisiert, aus DMADP und den verknüpften IDP-Einheiten werden über Farnesyldiphosphat Sesquiterpene, Sterole und Polyterpene gebildet (LICHTENTHALER, 1999). Im Chloroplasten geschieht die Isoprenoidbiosynthese durch den DOXP-Stoffwechselweg. Ubiquinone werden in den Mitochondrien aus Isopentenylidiphosphat (IDP), das aus dem Cytoplasma stammt, synthetisiert. Es besteht ein gewisser Austausch von IDP zwischen den Kompartimenten (LICHTENTHALER, 1999). Der Acetat-Mevalonat-Biosyntheseweg kann durch Mevinolin gehemmt werden, während der DOXP-Stoffwechselweg spezifisch durch Fosmidomycin inhibiert wird.

1.2.1 Der Desoxyxylulosephosphat (DOXP)-Biosyntheseweg

In Abbildung 1.2 ist der chemische Ablauf des DOXP-Biosyntheseweges dargestellt, wie er in den Plastiden stattfindet. Der 1. Schritt des Stoffwechselweges ist die Kondensation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) und Pyruvat zu Desoxyxylulose-5-Phosphat (DOXP) und CO_2 . Dieser Schritt wird von der Desoxyxylulose-5-Phosphat-Synthase (DXS) katalysiert (SPRENGER *et al.*, 1997). Die 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat-Reduktoisomerase (DXR) fungiert als Katalysator für den nötigen Skeletumbau des DOXP und die Reduktion zu 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat (MEP). Dabei wird das Coenzym NADPH zu NADP^+ und H^+ oxidiert (TAKAHASHI *et al.*, 1998).

Durch eine Sequenz von 3 Reaktionsschritten, die durch die Enzyme CDP-ME-Synthase (CMS), CDP-ME-Kinase (CMK) und ME-cPP-Synthase (MCS) katalysiert werden, wird MEP über 4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-Erythritol (CDP-ME) und seinem Dihosphat (CDP-MEP) zu 2-C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphat (ME-cPP) umgewandelt (RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN und BORONAT, 2002). Diese werden durch die Gene *ispD*, *ispE* und *ispF* codiert (ADAM *et al.*, 2002). Die folgende reduzierende Ringöffnung wird durch eine HMBPP-Synthase (HDS), die durch das Gen *ispG* codiert wird (ADAM *et al.*, 2002), katalysiert und führt zu 1-Hydroxy-2-Methyl-2-(E)-Butenyl-4-Diphosphat (HMBPP, HECHT *et al.*, 2001).

Einleitung

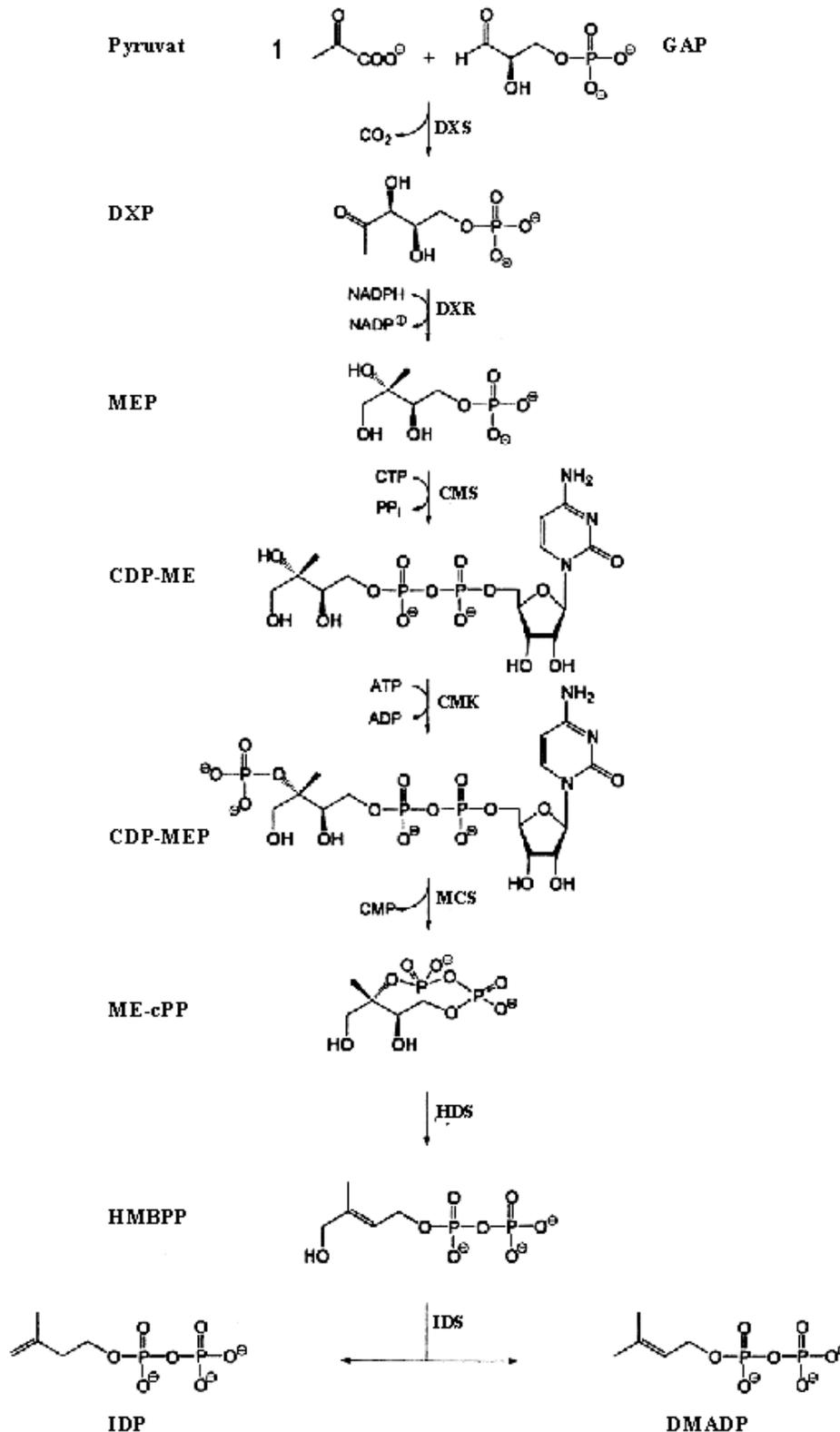


Abb. 1.2 Der chloroplastidäre DOXP-Stoffwechselweg. Abbildung aus ADAM *et al.* (2002). GAP: Glycerinaldehyd-3-Phosphat, DOXP: Desoxyxylulose-5-Phosphat, DXS: Desoxyxylulose-5-Phosphat-Synthase, DXR: Desoxyxylulose-5-Phosphat-Reduktoisomerase, MEP: 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat, CMS: CDP-ME-Synthase, CDP-ME: 4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-Erythritol, CMK: CDP-ME-Kinase, CDP-MEP: 4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-Erythritoldiphosphat, MCS: ME-cPP-Synthase, ME-cPP: 2-C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphat, HMBPP: 1-Hydroxy-2-Methyl-2-(E)-Butenyl-4-Diphosphat, IDP: Iso-pentenylidiphosphat, DMADP: Dimethylallyldiphosphat, IDS: IDP/DMADP-Synthase.

Die Umwandlung zu Isopentenylidiphosphat (IDP) und Dimethylallyldiphosphat (DMADP) erfolgt durch die IDP/DMADP-Synthase (IDS). Sie wird vom Gen *ispH* codiert (ROHDICH *et al.*, 2002). Alle Enzyme im DOXP-Stoffwechselweg, außer möglicherweise der DXS werden nur von jeweils einem Gen codiert. Alle Gene besitzen eine Transitpeptidsequenz zum Transport der Proteine in den Chloroplasten (RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN UND BORONAT, 2000).

1.2.2 Die 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat-Synthase (DXS)

Das Gen für das 1. Enzym im DOXP-Stoffwechsel konnte von SPRENGER *et al.* (1997) identifiziert werden. Die DXS katalysiert eine Kondensationsreaktion von GAP mit Pyruvat mit anschließender Decarboxylierung von Pyruvat. Während GAP aus dem im Chloroplasten ablaufenden Calvinzyklus stammt, ist die Herkunft des Pyruvates unklar. ROSENSTIEL *et al.* (2006) postulieren, dass cytosolisches Pyruvat als Phosphoenolpyruvat über ein Translokatorprotein (FLÜGGE, 1999) in den Chloroplasten transportiert wird. Untersuchungen mit *Arabidopsis* Mutanten, die eine defekte DXS aufwiesen, haben ergeben, dass entweder ein effektiver Import an cytosolischen Isoprenoid-Vorläufermolekülen in die Chloroplasten stattfinden muss, oder die DXS durch mehrere Gene codiert wird und somit mehr als 1 DXS-Enzym vorhanden ist (ARAKI *et al.*, 2000; ESTEVÉZ *et al.*, 2001). Es konnten darüber hinaus 2 weitere DXS ähnliche Gene isoliert werden, die beide eine Transitpeptidsequenz zum Transport in die Chloroplasten aufweisen, längere Sequenzen fehlen jedoch im Vergleich zur DXR und die genaue Funktion der Enzyme konnte noch nicht festgestellt werden (LOIS *et al.*, 2000; QUEROL *et al.*, 2001). Nur wenig ist über die katalytischen Eigenschaften von Pflanzenenzymen des DOXP-Stoffwechsels bekannt (RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN UND BORONAT, 2002). Die limitierende Funktion der DXS in der Isoprenoidbiosynthese bei Pflanzen und Bakterien konnte hingegen mehrfach nachgewiesen werden (ESTÉVEZ *et al.*, 2001; LOIS *et al.*, 2000; MILLER *et al.*, 1999 und 2000). Neben der regulatorischen Rolle von DXS und DXR (RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN UND BORONAT, 2002), erfüllen auch die ISPS bzw. die Mono-TPS eine bedeutende kurz- und langfristige Regulationsfunktion in der Isoprenoidbiosynthese bzw. -emission (MONSON *et al.*, 1992, LEHNING *et al.*, 1999, SCHNITZLER *et al.*, 1997, FISCHBACH, 2001).

1.2.3 Die 1-Desoxyxylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase (DXR)

ROHMER *et al.* (1996) vermuteten, dass ein intramolekulares Rearrangement des DOXP mit nachfolgender Reduktion zum MEP führen könnte. 1998 konnte das Gen *dxr* sowie das Enzym selbst aus Bakterien isoliert und dessen Funktion bestätigt werden (KUZUYAMA *et al.*, 1998; TAKAHASHI *et al.*, 1998). Die Ermittlung der Kristallstruktur der *dxr* aus *E. coli* erfolgte im Jahr 2002. Die Kristallisierung zeigte, dass die *dxr* in ihrer Quartärstruktur aus einem Homodimer besteht (REUTER *et al.*, 2002; YAJIMA *et al.*, 2002). Die Rolle der DXR in der Regulation des DOXP-Stoffwechsels ist nicht ganz geklärt. Widersprüchliche Ergebnisse verschiedener Untersuchungen (MILLER *et al.*, 2000; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN *et al.*, 2001; MAHMOUD UND CROTEAU 2001) scheinen die generelle Rolle der DXS in der Regulation des metabolischen Flusses zu bestätigen, während der DXR eher eine limitierende oder eine von der Pflanzenart, dem Organ und/oder dem Entwicklungsstadium unabhängige Regulationsfunktion zugeschrieben wird (RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN UND BORONAT, 2002). Die spezifische Hemmung des DOXP-Stoffwechselweges durch Fosmidomycin basiert auf der kompetitiven Bindung dieses DOXP-Struktur analogons (SCHWENDER *et al.*, 1999, KUZUYAMA *et al.*, 1998).

1.2.4 Die Isoprensynthase und Monoterpensynthesen

Die Isoprensynthase (ISPS) katalysiert die Umwandlung von DMADP zu Isopren unter Abspaltung eines Diphosphatrestes (Abb. 1.3). 1991 wurde sie erstmals in *Populus deltoides* Bartr. ex Marsh. nachgewiesen (SILVER UND FALL, 1995). Die ISPS kommt in Chloroplasten vermutlich in gelöster Form im Stroma (KUZMA UND FALL, 1993; SILVER UND FALL, 1995; LEHNING *et al.*, 1999) aber auch in einer an Thylakoidmembranen gebundenen Form vor (WILDERMUTH UND FALL, 1998, SCHNITZLER *et al.*, 2005). MILLER (2001) konnte das Gen für die ISPS aus der Graupappel (*Populus x canescens* Ait. (Sm.)) isolieren und konnte im Homologievergleich große Ähnlichkeit zu bekannten Monoterpensynthase (Mono-TPS) Sequenzen feststellen. Die Charakterisierung der heterolog exprimierten Graupappel ISPS ergab ein Temperaturoptimum von 40°C, ein pH-Optimum von pH 7-8.5 und einen apparenten K_m -Wert für DMADP im millimolaren Bereich (Bachl, 2004). Die ISPS Aktivität ist abhängig von der Blattentwicklung und weist saisonal bedingte Variationen mit einem Maximum im Hochsommer auf (LEHNING *et al.*, 2001).

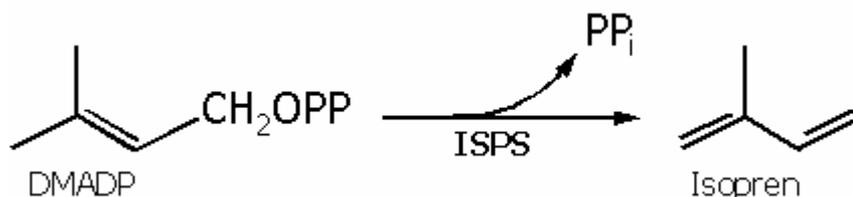


Abb. 1.3 Katalytische Umsetzung von DMADP zu Isopren durch die ISPS unter Abspaltung eines Diphosphatrestes.

Die Synthese von Monoterpenen wird von Mono-TPSn katalysiert. Eine Mono-TPS kann die Bildung eines Monoterpens oder mehrerer Monoterpene katalysieren (KREUZWIESER *et al.*, 1999; FISCHBACH, 2001). Vermutlich gibt es für die Synthese von α -Pinen, β -Pinen und Sabinen nur ein Enzym, die Pinensynthase (LEWINSOHN *et al.*, 1992), während die Bildung von Myrcen von einer seltenen, sehr produktspezifischen Synthase katalysiert wird (STAUDT *et al.*, 2001; FISCHBACH *et al.*, 2001). Die Limonensynthase aus der Minze kann neben Limonen auch geringe Mengen an α -Pinen, β -Pinen und Myrcen synthetisieren (ALONSO *et al.*, 1992). Die Pinensynthase der Riesentanne (*Abies grandis* (Douglas ex D. Don) Lindl.) synthetisiert zu etwa gleichen Teilen α - und β -Pinen (LEWINSOHN *et al.*, 1992).

In Abbildung 1.4 ist das Beispiel eines chemischen Reaktionsschemas der Biosynthese verschiedener Monoterpene dargestellt. Geranyldiphosphat (GDP) wird von einer Mono-TPS zu Linalyldiphosphat (LDP) ionisiert und isomerisiert. Im nächsten Schritt erfolgt die Zyklisierung des Linalyldiphosphates zum α -Terpenyl-Kation. Aus diesem Zwischenprodukt werden schließlich stereospezifisch die verschiedenen Monoterpenstrukturen gebildet. Alle Zwischenprodukte bleiben während der Reaktion an das Enzym gebunden (ALONSO UND CROTEAU, 1993). Das Temperaturoptimum der Mono-TPS zur enzymatischen Bildung von α -Pinen, Sabinen, β -Pinen und Limonen in der Steineiche liegt bei ca. 40°C, das pH-Optimum bei 6.7. Die Enzymreaktion ist abhängig von Mg^{2+} Ionen und weist einen apparenten K_m -Wert von ca. 60-100 μM für das Substrat GDP auf. Das Molekulargewicht dieser Mono-TPS (ca. 600 bp) beträgt ca. 48 kDa, was auf eine monomere Struktur hinweist. Die Aktivität ist abhängig von der Blattentwicklung und weist eine saisonal bedingte Variation mit maximaler Aktivität vom Frühjahr bis zum Spätherbst und kaum messbarer Enzymaktivität im Winter auf (FISCHBACH, 2001).

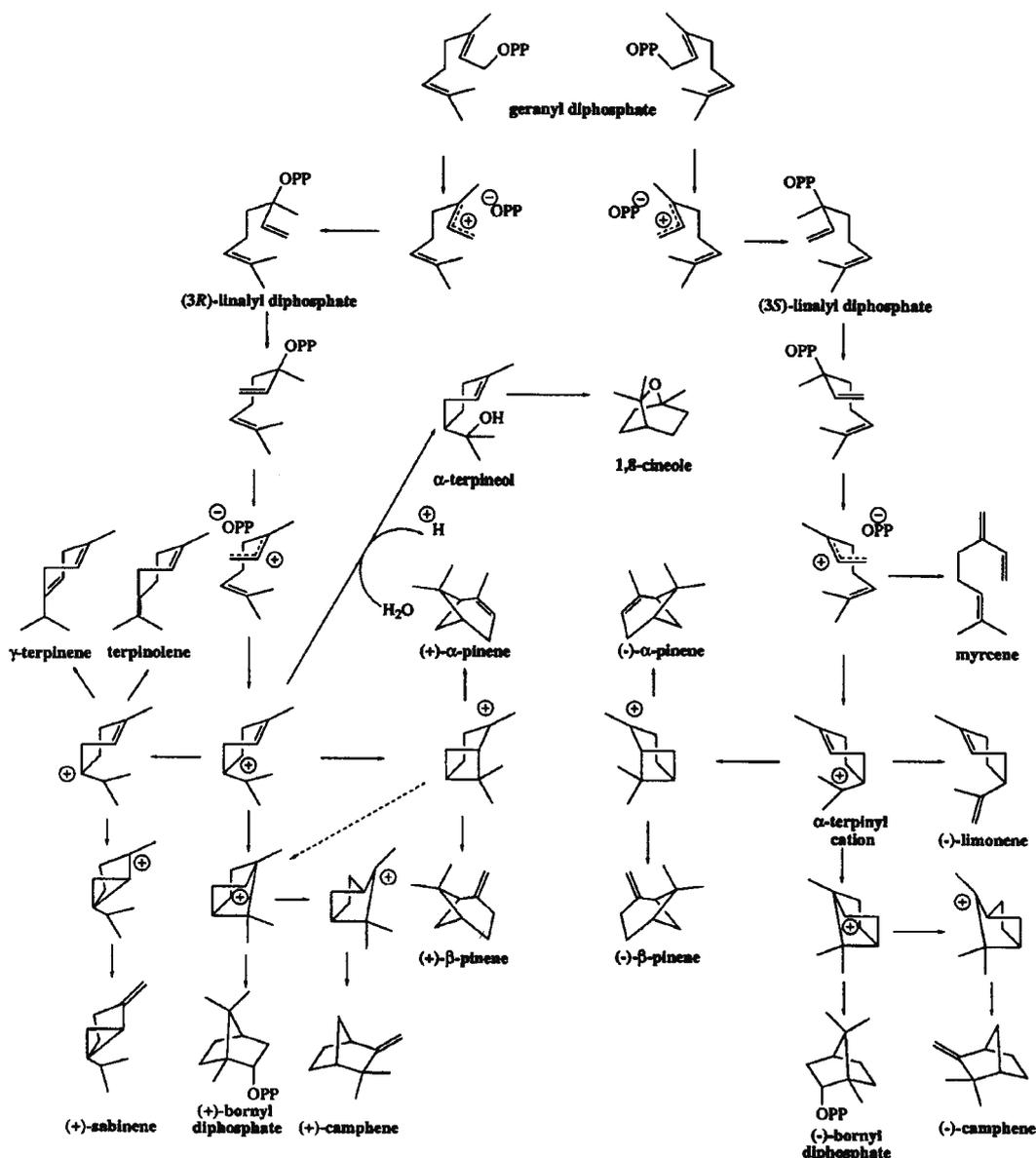


Abb. 1.4 Beispiel einer Mono-TPS Reaktionsfolge zur Biosynthese von Monoterpenen in Salbei (aus WISE *et al.*, 1998). Mono- und bicyclische Produkte werden durch Isomerisierung von Geranyldiphosphat (GDP) zu Linalyldiphosphat (LDP) umgewandelt. Azyklische Produkte können entweder direkt aus GDP oder auch aus LDP gebildet werden.

1.3 Regulationsfaktoren der Isoprenoidemission

Der genaue Regulationsmechanismus der Isoprenoidbiosynthese und -emission ist weitgehend ungeklärt. Die wichtigsten Regulationsfaktoren, die auf physiologischer und biochemischer Ebene wirken sind jedoch bekannt. Diese sind die photosynthetische Photonenflussdichte (PPFD) sowie die Blattemperatur (GUENTHER *et al.*, 1995), die Kohlenstoffverfügbarkeit, Adenylierungs- bzw. Redox-Status sowie die Enzymaktivierung der regulierenden Schlüsselenzyme (WOLFERTZ *et al.*, 2003).

1.3.1 PPF and Blatttemperatur

Die Abhängigkeit der Isoprenoidemission ist stark licht- und temperaturabhängig. Da die Isoprenoide zum größten Teil aus zuvor assimiliertem Kohlenstoff synthetisiert werden (s. 1.3.2), ist die Lichtabhängigkeit durch eine indirekte Regulation über die Verfügbarkeit an Assimilaten erklärbar. Die Temperaturabhängigkeit der Isoprenemission wird hingegen durch die Aktivierung der ISPS erklärt (MONSON *et al.*, 1992). Die Monoterpenemission wird wahrscheinlich in ähnlicher Weise über Mono-TPS reguliert (LORETO *et al.*, 1998a). Die Licht- und Temperaturabhängigkeit wurde für viele Pflanzenarten experimentell ermittelt und entsprechend dem Guenther-Algorithmus (GUENTHER *et al.*, 1995) berechnet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die spezifischen Parameter der Licht- und Temperaturabhängigkeit für Graupappel- und Steineichenblätter bestimmt.

1.3.2 Substratverfügbarkeit

Die Isoprenoidbiosynthese ist eng an die Photosynthese gekoppelt. Fütterungsversuche mit ^{13}C markiertem CO_2 zeigten innerhalb weniger Minuten eine zu ca. 80% ^{13}C Markierung des emittierten Isoprens (SHARKEY *et al.*, 1991; KARL *et al.*, 2002; KREUZWIESER *et al.*, 2002). Der Verlust an assimiliertem Kohlenstoff durch die Isoprenemission beträgt im moderaten Temperaturbereich 0,5-2% (MONSON UND FALL, 1989; LORETO UND SHARKEY, 1990; BRÜGGEMANN, 2002) kann aber bei hohen Temperaturen und stark verminderter Photosynthese auf ca. 20% (BRÜGGEMANN UND SCHNITZLER, 2002; PEÑUELAS UND LLUSÀ, 2003) bzw. sogar auf bis zu ca. 50% (SHARKEY UND LORETO, 1993; LERDAU UND KELLER, 1997; PEGORARO, 2004) ansteigen. Auch bei der Steineiche wurden Verluste des assimilierten Kohlenstoffs über die Monoterpenemission zwischen 0,1 und 20% beobachtet (STAUDT UND BERTIN, 1998).

In Versuchen, emittierte Monoterpene von *Q. ilex* mit ^{13}C zu markieren, ermittelten LORETO *et al.* (1996) auf Grund der schnellen und fast vollständigen Markierung, dass wahrscheinlich fast der gesamte Kohlenstoff aus vorhergehender Photosynthese stammte. Höchstens 10% des emittierten Kohlenstoffs stammt möglicherweise aus einer 2. endogenen Quelle. Viele weitere Untersuchungen kamen ebenfalls zum Ergebnis, dass 70-90% des Kohlenstoffs im Isopren bei ungestressten Blättern aus der unmittelbar vorangehenden Photosynthese stammten (DELWICHE UND SHARKEY, 1993; KARL *et al.*, 2002; FUNK *et al.*, 2004; SCHNITZLER *et al.*, 2004a). Unter starker Limitierung

der Photosyntheseleistung durch Hitze- bzw. Wasserstress hingegen, nimmt der Anteil des Kohlenstoffs aus alternativen Quellen auf ca. 30-40% zu (FUNK *et al.*, 2004).

1.3.3 Klimawandel: Erhöhte CO₂-Konzentration

Die Konsequenzen des vorhergesagten Klimawandels werden komplexe Auswirkungen auf die globale Isoprenoidemission haben. Da die ambiente CO₂-Konzentration gegenwärtig limitierend für die Photosynthese ist, ist bei erhöhter CO₂-Konzentration ein Zuwachs an Blattbiomasse und damit der Isoprenemittierenden Fläche zu erwarten. Klimaerwärmung, länger anhaltende Dürre, verlängerte Vegetationsperioden und begünstigtes Wachstum Isoprenemittierender Pflanzenarten (KELLOMÄKI *et al.*, 2001) könnten eine Zunahme der globalen Isoprenoidemissionen und dadurch bedeutende Veränderungen in der Atmosphärenchemie und dem globalen Kohlenstoffzyklus bewirken (PEGORARO, 2004). Wenige Studien haben ergeben, dass der Einfluss erhöhter CO₂-Konzentration auf die Isoprenoidemission stimulierend zu wirken scheint. Für *Quercus pubescens* (TOGNETTI *et al.*, 1998) und *Q. rubra* (SHARKEY *et al.*, 1991) konnten erhöhte Isoprenemissionsraten bei Pflanzen, die bei erhöhten CO₂-Konzentrationen angezogen wurden, festgestellt werden. LORETO *et al.* (1996a) stellten fest, dass die α -Pinenemission der Steineiche stark abhängig von der Verfügbarkeit photosynthetischen Kohlenstoffs ist. Versuche mit erhöhtem CO₂ zeigten eine erhöhte Assimilationsrate und eine reduzierte Transpiration, die α -Pinenemission blieb hingegen unbeeinflusst. Wurden Steineichenblätter unter nicht-photorespiratorischen Bedingungen gehalten, erfolgte eine Stimulation der Monoterpenemission ähnlich wie bei der Photosynthese. Einige neuere Studien belegen jedoch eher die Hypothese, dass es durch erhöhte CO₂-Konzentrationen in der Atmosphäre zu einer Reduktion der Isoprenoidemission (LORETO *et al.*, 2001a; ROSENSTIEL *et al.*, 2003; SCHOLEFIELD *et al.*, 2004; CENTRITTO *et al.* 2004; PEGORARO, 2004) kommt. SCHOLEFIELD *et al.* (2004) haben eine Reduktion der ISPS-Aktivität verbunden mit einer Reduktion der Isoprenemission beobachtet und vermuten, dass die Expression von Isoprenoidsynthese-Genen durch erhöhtes CO₂ gehemmt wird. Trockenheit und hohe Dampfdruckdefizite zwischen Blattoberfläche und Umgebungsluft erwiesen sich hingegen als komplementäre Faktoren, die den hemmenden Effekt der erhöhten CO₂-Konzentration auf die Isoprenemission zum Teil aufheben können. Ebenso wird die zwar geringe, aber signifikante Kapazität des Bodens atmosphärisches Isopren aufnehmen zu

können durch Trockenheit stark gemindert. Dadurch ist es wahrscheinlich, dass der prognostizierte Klimawandel zu einer erhöhten globalen Isoprenemission führen wird (PEGORARO, 2004).

1.3.4 Stomatäre Leitfähigkeit

Die Stomatäre Leitfähigkeit wird durch mehrere Umwelteinflüsse reguliert: Lichtintensität, Luftfeuchte, Blatttemperatur und CO₂-Partialdruck sind die wichtigsten Faktoren. Die Emission der Isoprenoide geschieht vor allem durch die Stomata, trotzdem hat die Stomatäre Leitfähigkeit nur begrenzt Einfluss auf die Emissionsrate (FALL UND MONSON, 1992; LORETO *et al.*, 1996a). Isoprenoide können jedoch nicht durch die Cuticula diffundieren. Diese hoch volatilen Verbindungen mit einer Henry-Konstante von $H \geq 10^3$ haben Halbwertszeiten im Gas- und Flüssigkeitspool von wenigen Sekunden und können deshalb nicht von den Stomata kontrolliert werden. Eine Abnahme der Stomatären Leitfähigkeit führt zur sofortigen Erhöhung im Partialdruck der Gasphase und des Partialdruckgradienten zwischen interzellularem Gasraum und der Atmosphäre. Der Diffusionsfluss kann so, bei gleichbleibender Isoprenoidsyntheserate, unverändert aufrechterhalten werden (NIINEMETS UND REICHSTEIN, 2003). Monoterpene, die von außen auf das Blatt einwirken, können von *Q. ilex* Blättern aufgenommen werden. Diese Aufnahme geschieht wahrscheinlich durch die Stomata der Blätter (PEÑUELAS UND LLUSÀ, 2002).

1.4 Quantitative Vorhersage der Isoprenoidemission: Erweiterung und Validierung des prozess-basierten Modells SIM-BIM

Die besondere Bedeutung von Isopren und Monoterpenen für die Atmosphärenchemie erfordert die genaue Abschätzung der globalen täglichen und saisonalen Emissionsraten der Vegetation. Dazu sind detaillierte Kenntnisse über die biochemischen und physiologischen Vorgänge in den Pflanzen unerlässlich. Nur prozess-basierte Vorhersagemodelle, welche biochemische Prozesse wie auch den physiologischen und phänologischen Zustand der Pflanzen miteinbeziehen, können dynamische Veränderungen der Emissionsraten, bedingt durch Änderungen der Umwelt, wie zum Beispiel erhöhte Lufttemperatur und erhöhte CO₂-Konzentrationen der Luft, realistisch simulieren. Das saisonale Isoprenoid-Synthese-Modell gekoppelt mit dem Biochemischen Isoprenoid-Biosynthese-Modell SIM-BIM wurde als prozess-basiertes Modell zur Vorhersage der Isoprenemission für *Quercus robur* L. in Zentraleuropa entwickelt (ZIMMER *et al.*,

2000; LEHNING *et al.*, 2001) und für *Q. patraea* Mattuschka (Liebl.) erfolgreich validiert (ZIMMER *et al.*, 2003). Einen besonderen Vorteil bietet dieses Modell durch die prozess-basierte Berechnung der ISPS Aktivität der Blätter und die Berechnung gebildeten Isoprens aus photosynthetisch assimiliertem Kohlenstoff. Andere Modelle, wie zum Beispiel der Isoprenoidemissionsalgorithmus ISO97 (GUENTHER, 1997), basieren auf der Licht- und Temperaturabhängigkeit der Isoprenoidemission und können mittlere Emissionsraten für viele Pflanzenarten vorhersagen, scheitern jedoch an der Abschätzung genauer Emissionsraten bei dynamischen Adaptierungsvorgängen der Pflanze unter sich ändernden Umweltbedingungen. Die Weiterentwicklung des Vorhersagemodells SIM-BIM2 (GROTE *et al.*, 2006) ermöglicht prozess-basierte Vorhersagen der Monoterpenemission von *Q. ilex* L. basierend auf experimentellen Daten der Mono-TPS Aktivität, die zum Teil im Laufe dieser Arbeit ermittelt werden konnten.

1.5 Die Graupappel (*Populus x canescens* (AITON) SMITH)

Populus x canescens (AITON) SMITH ist eine Kreuzung von *P. alba x tremula* und wird auch als Graupappel bezeichnet (Abb. 1.5). Sie gehört zur Familie der *Salicaceae*.

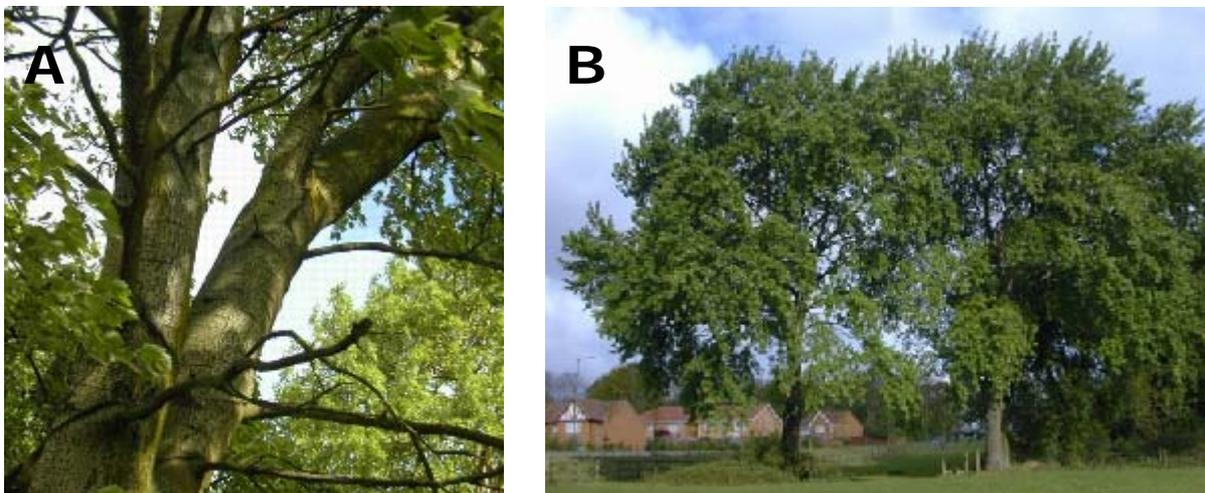


Abb.1.5 *Populus x canescens*. A und B zeigen die Graupappel in ihrer natürlichen Wuchsform (Fotos <http://www.bioimages.org.uk/HTML/R152292.HTM>)

Im Erscheinungsbild kann *P. x canescens* wie *P. alba* L. oder *P. tremula* L. auftreten. Die flach wurzelnden, bis zu 30 m hohen Bäume benötigen gut durchlüftete, leicht zu bewurzelnde Böden, Sommerwärme sowie > 300 mm NS in der Vegetationszeit (HOFMANN, 2003). Die Pappeln zählen, neben den Eichen zu den Pflanzenarten mit den höchsten Emissionsraten (KESSELMEIER UND STAUDT, 1999). Wegen der hohen Wachstumsgeschwindigkeit und dem schnell nutzbaren

Leichtholz mit geringem Ligningehalt, das vor allem zu Papier, Zahnstochern, Streichhölzern und Sperrholzplatten verarbeitet wird, werden immer mehr Pappeln flächendeckend angebaut (HOFMANN, 2002). Die Pappel wird auch als Versuchspflanze zur Entgiftung von schwermetallhaltigen Böden eingesetzt (PUSCHENREITER, 2005; <http://www.ctp.uni-freiburg.de/site.php?action=category&value=4&lang=1>). Die weite Verbreitung der stark Isopren emittierenden Pflanzen entlang der großen Flüsse in Mitteleuropa, Westasien, Nordafrika sowie im Osten der USA (FRANKE, 1992; <http://www.biologie.de/biowiki/Pappeln>) hat somit einen bedeutsamen Einfluss auf die globale Emissionsrate.

1.6 Die Steineiche (*Quercus ilex* L.)

In der Familie der Buchengewächse (*Fagaceae*) finden sich Arten, die Monoterpene emittieren, wie die Buche (*Fagus sylvatica*) oder starke Isopren-Emitter wie zum Beispiel *Quercus robur* L. die Stieleiche. Es gibt jedoch auch in der Gattung *Quercus*-Arten die gar keine Isoprenoide emittieren, wie zum Beispiel *Q. cerris*. Die Steineiche (Abb. 1.6) ist auch ein Vertreter der Monoterpen-emittierenden Arten dieser Familie (LORETO *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu den meisten Pflanzen, die Monoterpene produzieren, weist die Steineiche keine speziellen Strukturen zur Speicherung der Monoterpene auf. Monoterpene werden hingegen, ähnlich wie bei Isopren emittierenden Pflanzen, sofort nach der Synthese an die Umwelt abgegeben. Die Emissionsrate ist ebenfalls Licht- und Temperaturabhängig und eng an die Verfügbarkeit photosynthetischer Metabolite gekoppelt (STAUDT UND SEUFERT, 1995; LORETO *et al.*, 1996b).

Obwohl geschätzt wird, dass Monoterpen-Emitter nur ca. 0,4% des assimilierten Kohlenstoffs in Form von Monoterpenen wieder an die Umwelt abgeben (TINGEY *et al.*, 1991) ergaben Feldstudien, dass die Abgabe im Baumbestand in temperaten Klimaregionen, die Emissionsrate von Isopren erreichen kann (FEHSENFELD *et al.*, 1992). Die Steineiche ist immergrün und tief wurzelnd. Ihr hauptsächliches Verbreitungsgebiet ist der Mittelmeerraum, vor allem im Norden Spaniens und im Nordwesten Frankreichs (ZANDER, 1984) bis zu einer Seehöhe von 1400 m ü.N.N (PEÑUELAS *et al.*, 1998).

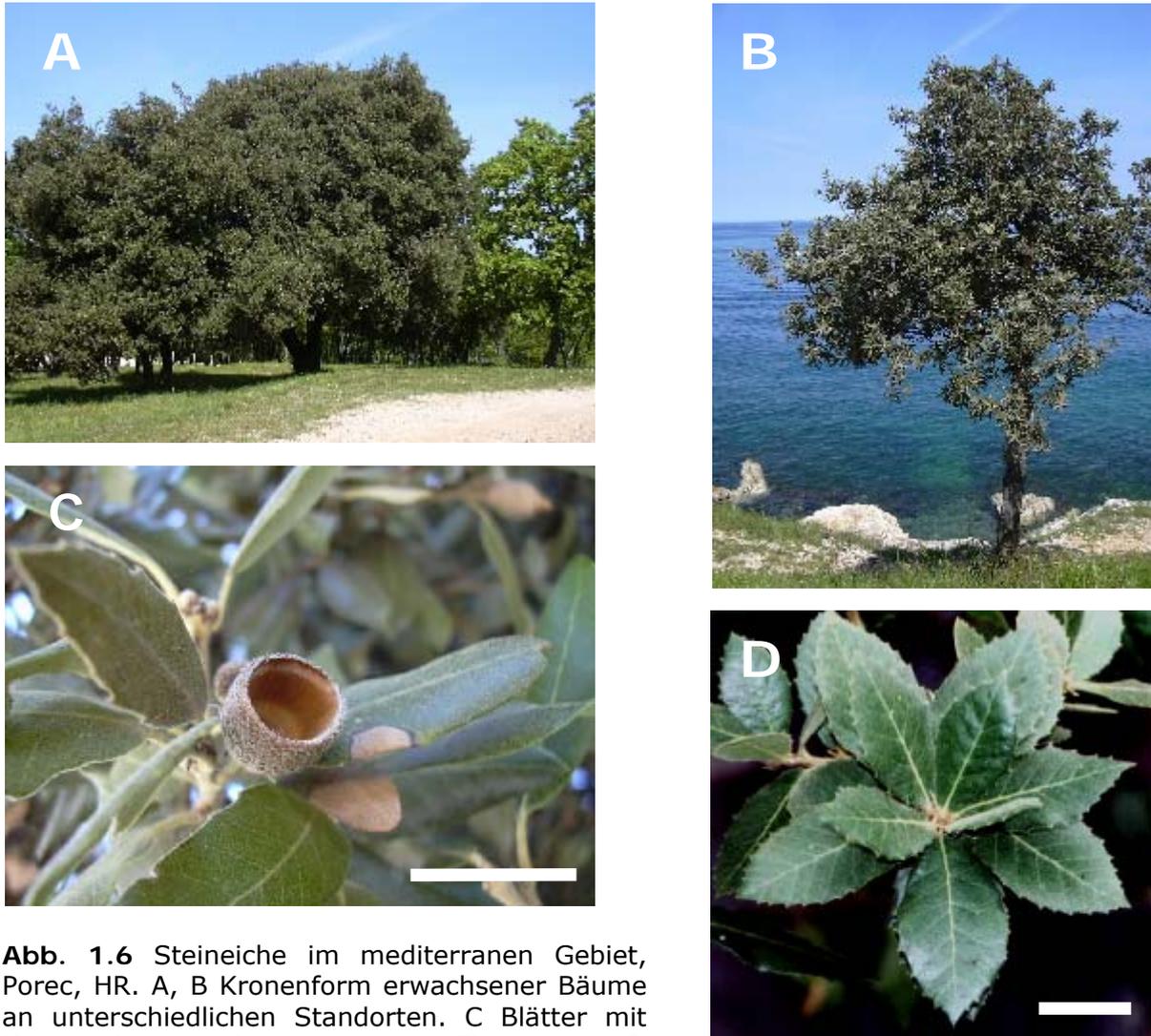


Abb. 1.6 Steineiche im mediterranen Gebiet, Porec, HR. A, B Kronenform erwachsener Bäume an unterschiedlichen Standorten. C Blätter mit Kapsel einer bereits abgefallenen Eichelfrucht. D Die typische wirtelige Blattstellung. Maßstab ist ca. 5 cm. (Fotos Mayrhofer).

Das Emissionsspektrum der Steineiche (Tab 1.1) umfasst die Monoterpene α -Pinen, β -Pinen, Limonen, Sabinen, Myrcen, Camphen sowie Δ -3-Caren (PEÑUELAS UND LLUSIÀ, 1999) und in sehr geringen Mengen auch Isopren (STREET *et al.*, 1997; LORETO, 1996b). Das Verhältnis der spezifischen Monoterpenemission folgt einer saisonalen Variation (FISCHBACH, 2001) und ist genetisch festgelegt. STAUDT *et al.* (2001) beschreiben verschiedene Emitter-Typen bei *Q. ilex* in Südfrankreich. Alle getesteten Bäume emittierten vor allem α -Pinen, β -Pinen, Sabinen, Myrcen und Limonen, in unterschiedlichen Verhältnissen. Ca. 70% aller getesteten Bäume waren vorwiegend Pinen-Emitter, gefolgt von ca. 20% Limonen-Emittern und ca. 10% Myrcen-Emitter. Die Verhältnisse der emittierten Monoterpene sind genetisch festgelegt und in jeder Pflanze konstant und unabhängig von Umwelteinflüssen, Entwicklungsstadium oder Jahreszeit. Eine

Studie von CSIKY UND SEUFERT (1999) erforscht die Verwendung der interspezifischen Emissionsmuster zur taxonomischen Klassifizierung von Eichen. Einer Kreuzung der Arten *Q. robur* und *Q. ilex* brachte eine Art hervor (*Q. x turneri*), die sowohl Isopren in großen Mengen als auch Monoterpene mit dem gleichen Spektrum wie *Q. ilex* emittiert (SCHNITZLER *et al.*, 2004b).

1.7 Ziele der Arbeit

Für die Abschätzungen der globalen Emissionsraten von Isopren und Monoterpenen der Vegetation ist die Kenntnis der biochemischen und physiologischen Vorgänge in den Pflanzen unerlässlich. Daher war das zentrale Ziel dieser Arbeit die Zusammenhänge transkriptionaler, translationaler und physiologischer Kenngrößen der Isoprenoidemission und deren Regulation durch verschiedene Umweltfaktoren zu untersuchen.

Die Regulation auf Transkriptionsebene, sollte anhand der Schlüsselenzyme des DOXP-Stoffwechselweges, DXR und ISPS, näher betrachtet werden. Die Gegenüberstellung der Enzymaktivitäten von ISPS und Mono-TPS mit den DMADP-Blattgehalten sollten Erkenntnisse über die enzymatischen Vorgänge liefern und mit den physiologischen Zusammenhängen speziell von Netto-Assimilation und Isoprenoidemission im diurnalen Verlauf weitere Aufschlüsse über die Regulation der Emission bringen. Darüber hinaus sollten die besonderen Einflussgrößen Lichtintensität und Blatttemperatur auf die Isoprenoidemission beleuchtet werden.

Die Bedeutung der Isoprenoidemission von Pflanzen, die keine spezifischen Speicherorgane für Terpene besitzen, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht aufgeklärt. Eine der Hypothesen (s. 1.1.3), Isopren könne als antioxidativer Schutz gegen oxidativen Stress wirken, sollte in einem weiteren Ziel der Arbeit untersucht werden.

Um auf experimentellem Weg das Erreichen der Ziele zu ermöglichen, wurden folgende, wesentliche Arbeitsziele geplant.

Die Untersuchungen sollten an 2 Pflanzenarten, welche hohe Isoprenoidemissionsraten aufweisen und gleichzeitig wegen ihrer weiten Verbreitung im europäischen Raum bedeutenden Einfluss auf die Atmosphäre besitzen, durchgeführt werden. Dazu wurden die Graupappel als bedeutender Isopren-Emitter und die Steineiche, als Vertreter eines Monoterpen-Emitters ausgewählt. Mit der Isolierung des Gens für die PcDXR aus der Graupappel, dessen heterologe Expression in *E. coli* und die Überprüfung der enzymatischen

Funktionalität des exprimierten Enzyms im ersten Abschnitt der Arbeit, sollte ein molekulares Werkzeug zur weiteren Erforschung regulativer, transkriptionaler Vorgänge geschaffen werden.

Die simultane Messung von PcDXR- und PcISPS-Expressionsraten, Enzymaktivität der PcISPS, DMADP-Gehalten im Blatt und Isoprenemission sowie photosynthetischem Gaswechsel im diurnalen Verlauf der Graupappel sollten die biochemischen und physiologischen Zusammenhänge der Isoprenemission beleuchten.

Durch diurnale Messungen der Monoterpenemission und des photosynthetischen Gaswechsels der Steineiche, ergänzt durch Messungen der Enzymaktivität der Mono-TPS und des DMADP-Gehaltes in den Blättern sollten diese Zusammenhänge für die Monoterpenemission näher betrachtet werden.

Weiters sollten unter Standardbedingungen die spezifischen Parameter der Licht- und Temperaturabhängigkeit für beide Arten bestimmt werden.

Die ermittelten Daten all dieser Messungen würden in weiterer Folge zur Validierung bzw. Weiterentwicklung der prozess-orientierten Modelle SIM-BIM für Isopren und SIM-BIM2 für Monoterpene eingesetzt werden.

Im 3. Abschnitt der Arbeit sollte durch Isoprenbegasung und Anfärbung der Superoxidanionenradikale (O_2^-) von gestressten Graupappelblättern der mögliche Einfluss von Isopren in und in der unmittelbaren Umgebung der Blätter auf die O_2^- -Konzentration in den Blättern ermittelt werden.

2 Material und Methoden

Alle angeführten Nährlösungen (NL) und Pufferlösungen (P) wurden im Text in Klammer mit Nummern bezeichnet. In Abschnitt 2.12 ist die genaue Zusammensetzung der jeweiligen Lösung angeführt. Die Herkünfte der verwendeten Kits und Chemkalien (mit hochgestellten Zahlen markiert) sind im Abschnitten 2.11 angeführt.

2.1 Pflanzenmaterial und Anzucht

2.1.1 *Populus x canescens* (AITON) SM.

Populus x canescens ist eine Kreuzung zwischen *P. alba* und *P. tremula*. Alle Pflanzen der Messkampagne sowie aller weiterer Versuche wurden im Institut für Baumphysiologie der Universität Freiburg unter sterilen Bedingungen durch Mikrostecklinge vermehrt (LEPLÉ *et al.*, 1992) und nach STROHM *et al.* (1995) unter folgenden Bedingungen angezogen und kultiviert. Die Stecklinge wurden über 4 Wochen in Nähragarröhrchen (Sigma, Deisenhofen, D; NL 1) unter definierten Lichtverhältnissen ($100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 14/10 stündiger Licht-/Dunkelrhythmus) und $25 \pm 2^\circ\text{C}$ angezogen. Die mindestens 1 Zentimeter hohen Pflänzchen mit 3-4 Blättern und Wurzel wurden in Kunststofftöpfen (12 x 10 x 10 cm) auf einer Substratmischung aus 50% Perlit¹, 25% Quarzsand und 25% autoklavierter Anzucherde (Floradur[®] Typ 1)² angezogen. Die Pflanzen wurden täglich mit Leitungswasser gegossen und alle 2 Wochen mit 200 ml Düngerlösung (Hakaphos blau)³ (3 g l^{-1}) pro Pflanze gedüngt. Nach etwa 3 Monaten wurden die Jungpflanzen einige Wochen vor den Versuchen nach Garmisch-Partenkirchen transportiert und dort im Gewächshaus täglich mit Leitungswasser gegossen. Mindestens 1 Woche vor den Experimenten wurden die Graupappeln zur Akklimatisierung auf den Wank (1780 m ü.N.N., s. 2.7.1) transportiert und dort in den Solardomen untergebracht. Um Schäden und Anthocyanbildung (s. Abb. 2.1 C) der Blätter durch die hohe Strahlungsbelastung zu vermeiden, wurden während der Adaptierungsphase grüne Kunststoffnetze⁴ zur Abschattung angebracht. Die Netze bewirkten eine Verringerung von PPFD um ca. 50%. Die gleichaltrigen Pflanzen waren in ihrem Erscheinungsbild sehr homogen. Die mittlere Höhe betrug im Jahr 2002 ca. 1,2 m, die projizierten Blattflächen pro geerntetem Baum betragen im Mittel $1020 \pm 160 \text{ cm}^2$ ($\pm \text{SD}$; $n = 80$) und das Frischgewicht betrug im Mittel pro Blatt $1,6 \pm 0,30 \text{ g}$ ($\pm \text{SD}$; $n = 80$). Aus den gemessenen Daten ergab

sich ein Blattflächen/ Frischgewicht Index von $93,5 \pm 6,1 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ ($\pm \text{SD}$; $n = 80$).

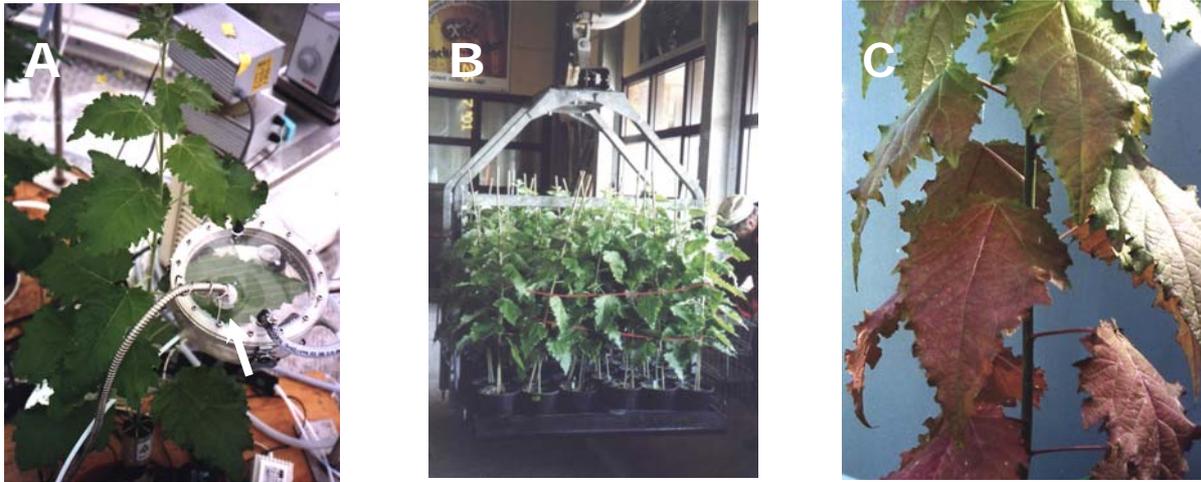


Abb. 2.1 Blatt einer jungen Graupappelpflanze, das in die Küvette eingespannt wurde. Der Pfeil bezeichnet den Chlorophyllfluoreszenzsensor, der in den Deckel der Küvette eingesetzt wurde (A). Jeweils 50 Versuchsbäume wurden mit einer speziellen Transportgondel für die Messkampagnen auf den Wank gebracht (B). Bei unbeschatteten Bäumen erfolgte eine Anthocyanbildung (Rotfärbung) im unteren Bereich der Pflanzen (C).

2.1.2 *Quercus ilex* L.

Im Januar 2002 wurden ca. 100 3-jährige Jungpflanzen (s. Abb. 2.2 A und C) von der Baumschule Vannucci Piante (Pistoia, I) und ebenso viele einjährige (s. Abb. 2.2 B) von einem Forschungszentrum bei Rom (CNR-IREV, Rom, Italien) nach Garmisch-Partenkirchen ins Gewächshaus gebracht. Die älteren Pflanzen wurden für die Versuche im kommenden Sommer eingesetzt und wurden deshalb im ursprünglichen Substrat (Sandgemisch) und Töpfen belassen. Durch den Transport beschädigte und vertrocknete Zweige wurden abgeschnitten und zu dicht gewachsene Bäume gelichtet. Die Bäume bestanden meist aus 3-4 Trieben von ca. 1 m Höhe. Im Frühjahr wurde den Pflanzen 1x Langzeitdünger (Baumfit)⁵ zugesetzt. Die einjährigen Bäumchen (jeweils 2 Triebe pro Topf) wurden in Plastikröhren (40 cm hoch, Durchmesser 7 cm) in ein Bodensubstrat, bestehend aus 50% Rindentorf⁶-Quarzsand- (0,1 bis 1,2 mm)⁷ Gemisch (50:50), 30% Blumenerde (Composana)⁸ und 20% Vermiculit¹ mit Langzeitdünger (Baumfit)⁵ umgetopft. Alle Pflanzen wurden nach Bedarf mit Leitungswasser gegossen.

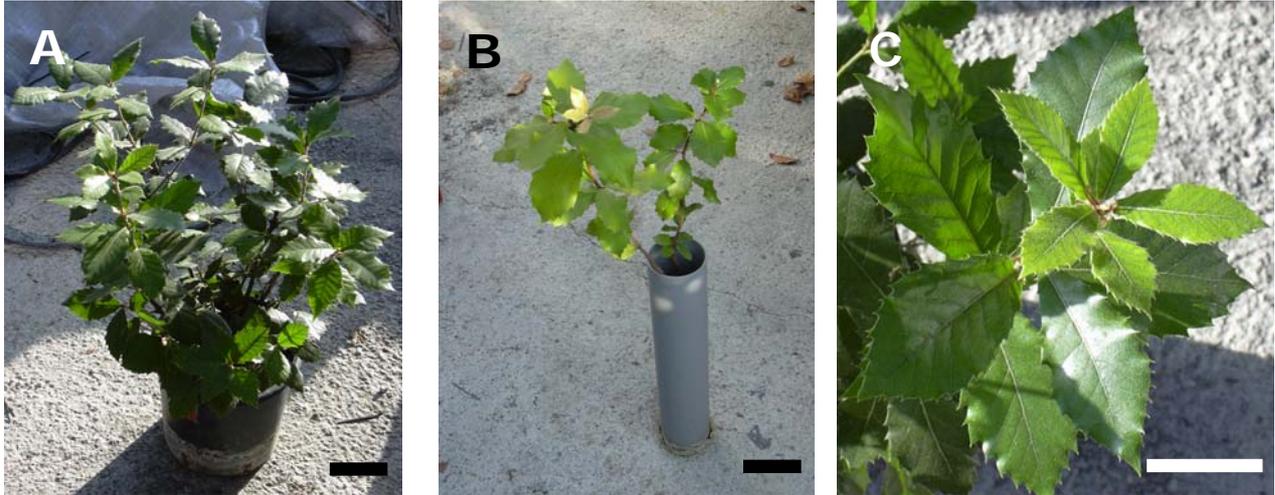


Abb. 2.2 Dreijährige (A, C) und 1-jährige (B) Steineichen, die für die Messkampagnen 2002 und 2003 eingesetzt wurden. Maßstab ist ca. 10 cm.

2.2 Die Isolierung des Desoxyxylulose-5-Phosphat-Reduktisomerase Gens aus einer cDNA Genbank der Graupappel

Um das Desoxyxylulose-5-Phosphat-Reduktisomerase-Gen aus der cDNA-Genbank der Graupappel (*PcDXR*; MILLER, 2001) isolieren zu können, mussten geeignete Primer für die Herstellung einer Gensonde gewählt werden. Durch Hybridisierung der Sonde mit der Genbank konnte schließlich das gesuchte Gen isoliert werden. Die genaue Vorgehensweise ist im folgenden Abschnitt beschrieben. Es wurden ausschließlich durch Autoklavieren (Vapoklav 500, H+P Labortechnik, Oberschleißheim) sterilisierte Gefäße und Geräte verwendet. Die Anzucht von Bakterien erfolgte unter der Sterilbank (LaminAir[®]TL 2448 Haraeus, Hanau, D). Alle Pipettierschritte erfolgten mit geeichten Kolbenhubpipetten (Gilson, Abimed, Düsseldorf, D) für 20, 200 und 1000 µl.

2.2.1 Primerdesign

Zu Beginn der Arbeit waren die Gensequenzen der Desoxyxylulose-5-Phosphat-Reduktisomerase (*DXR*) für *Oryza*, *Zea*, *Arabidopsis*, *Lycopersicon* und *Mentha* bereits bekannt und in der EMBL-Datenbank (European Molecular Biology Laboratory, <http://www.ebi.ac.uk>) veröffentlicht. Ein Sequenzvergleich der Proteinsequenzen der *DXR* von den oben genannten Organismen machte hoch konservierte homologe Bereiche erkennbar. Zwei geeignet erscheinende Bereiche wurden für das Design der Oligonukleotid⁹- (Primer-) Sequenzen ausgewählt:

Oligonukleotid *dxr_for1* (in 5'→3' Richtung der Sequenz):

5'-GAC ATC GTC GCN GAR AAY CCN G-3'

Oligonukleotid *dxr_rev1* (für den Komplementärstrang):

5'-GCT ATG TCC TTC CCN GCY TCD ATN GC-3'

(N = A,G,C oder T; D = A, G oder T; Y = T oder C; R = A oder G)

Abb. 2.3 Primerpaar das für die Herstellung der *PcDXR*-Gensonde sowie alle PCR-Läufe, in denen überprüft wurde, ob die *PcDXR* in der Probe enthalten war, verwendet wurde.

2.2.2 Extraktion der Gesamt RNA aus Graupappelblättern

Für die Isolierung und weitere Verwendung von RNA wurden alle Gefäße, Mörser, Stempel und Spatel vor Gebrauch mit Diethylpyrocarbonat⁹- (DEPC-) Wasser (0,1%) gespült sowie Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße mit Handschuhen gesteckt, doppelt autoklaviert und nur mit Handschuhen weiter verwendet.

2.2.2.1 Extraktion der RNA nach der Tri-Reagent[®] Methode

Die RNA Extraktion frischer Pappelblätter erfolgte mittels Tri-Reagent[®]-Methode. Frische Blätter wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und in flüssigem Stickstoff gemörsert. 75 mg Blattpulver wurden dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß eingewogen und sofort mit 1 ml Tri-Reagent^{®16} versetzt. Die Lösung wurde mittels Reagenzglasschüttler (Reax 2000, Heidolph, Kelheim, D) gut gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden Zellwände, Membranen, Polysaccharide und hochmolekulare DNA bei 20000 g und 4°C 10 min in einer Tischzentrifuge (Sigma 3K15, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode, D) abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl Chloroform⁹ versetzt. Nach 15 s heftigem Schütteln, 3-minütiger Inkubation bei RT und weiteren 15 min Zentrifugieren bei oben genannten Bedingungen wurde die wässrige Phase des Überstandes, die die RNA enthielt, in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol⁹ versetzt und nach sanftem Invertieren 10 min bei RT inkubiert. Nach weiterer 10-minütiger Zentrifugation bei gleichen Bedingungen wurde das Sediment mit 1 ml 75% Ethanol⁹/DEPC⁹-Wasser gewaschen (mittels Reagenzglasschüttler schütteln und 5 min bei 16000 g und 4°C zentrifugieren). Das Sediment wurde anschließend 10 min luftgetrocknet und dann in 25 µl DEPC⁹-Wasser mit der Pipette resuspendiert, 10 min bei 55°C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

2.2.2.2 Extraktion der RNA mittels Qiagen-RNeasy Minikit

Die RNA Extraktion aus den länger als 1 Jahr gelagerten Proben war mit der Tri-Reagent[®]-Methode nicht erfolgreich. Deshalb wurde für diese Proben die Isolierung der Gesamt RNA mit dem Qiagen RNeasy Minikit¹⁰ durchgeführt. Die bei -80°C gelagerten Blattproben wurden wie oben (2.2.2.1) beschrieben gemörsert. Je 80 mg Blattpulver wurden in Reaktionsgefäße eingewogen und mit 450 µl Puffer RLT, der vorher mit 4,5 µl β-Mercaptoethanol (β-ME)¹⁹ versetzt wurde, mehrere s geschüttelt. Das Lysat wurde in ein QIA-Shredder Reaktionsgefäß überführt und 2 min bei 20000 g und RT zentrifugiert (Sigma 3K15, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode, D). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert, ohne das Sediment aus Zelltrümmern aufzuwirbeln. Nach Zugabe von 0,5 Volumen reinem Ethanol⁹ zum klaren Lysat und guter Durchmischung mittels Pipette wurde die Lösung in ein RNeasy Minispin Säulchen überführt und 15 s bei 16000 g (bei RT) zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 700 µl Puffer RW1 auf das Säulchen pipettiert und wiederum 15 s bei 16000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit dem Sammelgefäß verworfen und das Spin Säulchen in ein neues 2 ml Sammelgefäß gegeben. Nach Zugabe von 500 µl RPE, der vorher vorschriftsgemäß mit Ethanol⁹ versetzt wurde, wurde erneut 15 s bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, 500 µl RPE-Puffer auf das Säulchen pipettiert und 2 min bei 20000 g zentrifugiert. Danach wurde das Säulchen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 30 µl RNase freies Wasser direkt auf die Membran des Säulchens pipettiert und zur Elution 1 min bei 16000 g zentrifugiert.

2.2.3 Photometrische Bestimmung der Quantität und Reinheit von Nukleinsäuren

Mittels Extinktionsmessung bei 260 nm kann der Gehalt einer Lösung an Nukleinsäuren quantitativ bestimmt werden. Die Berechnung der jeweiligen Nukleinsäurekonzentration erfolgte nach Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors über spezifische Absorptionsquotienten (SAMBROOK *et al.*, 1989). Die Optische Dichte (OD) 1 bei 260 nm entspricht 33 µg einzelsträngiger DNA bzw. 50 µg doppelsträngiger DNA oder 40 µg RNA pro ml Lösung. Die Verdünnungen für die Nukleinsäuremessungen wurden immer 1:100 mit H₂O *bideest* bzw. DEPC⁹-Wasser, im Fall von RNA, angesetzt.

Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm gilt als Maß

für die Reinheit der Nucleinsäurelösung. Werte zwischen 1,6 und 2,0 bedeuten gute Reinheit, während Werte unter 1,6 auf Verunreinigung durch Proteine oder Phenole hinweisen.

2.2.4 Reverse Transkription

2.2.4.1 Reverse Transkription für die Erzeugung der PcDXR-Sonde

Für das Umschreiben zu cDNA wurden zu 2 µg RNA jeweils 10 µl 10x Puffer¹¹, 22 µl MgCl₂¹¹ (50 mM), 20 µl DNTP-Mix (10 mM, dATP, dTTP, dGTP, dCTP)¹¹, 5 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer¹¹, 38,5 µl DEPC⁹-Wasser abzüglich des RNA Volumens, 2 µl RNase-Inhibitor¹¹ sowie 2 µl SuperScript II Reverse Transkriptase¹¹ (400 U) pipettiert und nach folgendem Programm im Thermocycler (Biometra Trio-Thermoblock™, Göttingen, D) inkubiert. Die Primerbindung erfolgte bei 25°C über 10 min, in den folgenden 30 min erfolgte die Reverse Transkription bei 48°C und dann eine abschließende 5-minütige Denaturierung bei 95°C. Die so erzeugte cDNA diente als Template für 10 PCR Ansätze. Die Verwendung von Oligo(dT)-Primern¹¹ diente zur ausschließlichen Umschreibung von mRNA.

2.2.4.2 Reverse Transkription für die Genexpressionsanalyse

Für die Reverse Transkription der gelagerten Tagesgangproben (TG1 2001 und TG2 2002) wurden 3 µg Template RNA pro Ansatz eingesetzt. Nachdem die jeweilige Konzentration der RNA photometrisch bestimmt wurde (s. 2.2.3), wurde das benötigte Volumen mit DEPC⁹-Wasser auf 11 µl aufgefüllt und mit 1 ml Oligo(dT)¹¹-Lösung versetzt, 5 min auf 70°C erhitzt und 3 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 4 µl 5x Puffer¹¹, 1 µl DNTP's¹¹, 2 µl Dithiothreitol (DTT)⁹, 0,5 µl Rnase-Inhibitor¹¹ und 0,5 µl SuperScript II Reverse Transcriptase¹¹ (400 U) erfolgte eine Inkubation im Thermocycler (Biometra Trio-Thermoblock™) über 50 min bei 42°C und anschließend über 15 min bei 70°C.

2.2.5 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) ist eine Technik mit der spezifische Abschnitte eines Gens amplifiziert werden, um eine ausreichende Konzentration der gesuchten DNA für weitere Untersuchungen zur Verfügung zu haben. Die klassische PCR besteht aus einem Denaturierungsschritt bei 94°C um die doppelsträngige DNA in Einzelstränge zu trennen, die dann als Vorlage (Template) für die Polymerase dienen können. Durch Abkühlung der

Lösung auf eine spezifische Temperatur wird die optimale Bindung der Primer (Annealing) an das Template ermöglicht. Von den gebundenen Primern ausgehend kann im folgenden Schritt die Polymerase eine komplementäre Kopie des DNA Template Stranges erzeugen. Dieser Zyklus wird ca. 40-mal wiederholt. Dadurch wird theoretisch eine Amplifikation des Templates um 2^{40} Kopien erreicht.

2.2.5.1 PCR der Gensonde

Mit den in Punkt 2.2.1 ausgewählten Primern⁹ und der in Punkt 2.2.4.1 hergestellten cDNA konnte nun eine PCR durchgeführt werden, um eine Gensonde für die Hybridisierung mit der λ -Phagen-cDNA Genbank der Graupappel (MILLER, 2001) in ausreichender Konzentration herstellen zu können. Für einen Ansatz wurden 31 μ l H₂O *bidest*, 5 μ l PCR 10x Puffer¹², 1 μ l DNTP-Mix¹¹ (10 mM), 10 μ l cDNA (ca. 200 ng) und 1 μ l Advantage Taq Polymerase¹² (Mix plus MgCl₂), 1 μ l *dxr_for1* und 1 μ l *dxr_rev1* pipettiert. Die optimalen Bedingungen für die PCR mit den ausgewählten Primern⁹ wurde durch Auswahl der Annealing Temperatur nach der Schmelztemperatur der Primer⁹ (GC-Regel) und einigen Versuchen mit leichten Variationen der Temperaturen und Inkubationszeiten ermittelt.

Im Falle von *dxr_for1* und *dxr_rev1* (s. 2.2.1) stellte es sich als nützlich heraus, 2 Zyklen mit niedrigeren Annealing Temperaturen (48°C, je 30 s) vor der eigentlichen Amplifikation durchzuführen. Niedrige Temperaturen führen zu unspezifischen Bindungen und erleichterten die Bindung der beiden Oligonukleotide. Die Gefahr einer Amplifizierung von unspezifischen Fragmenten wurde durch die geringe Anzahl der voran gehenden Zyklen mit niedriger Temperatur vermindert. Die folgenden 40 Zyklen wurden mit einer Annealing Temperatur von 52°C (30 s) durchgeführt. Der Start des Programmes erfolgte bei 95°C über 30 s zur Aktivierung der Polymerase¹². Die einzelnen Zyklen wurden jeweils mit Denaturierung bei 94°C, je 30 s, Annealing (s. oben) und anschließender Polymerisierung bei 72°C, je 30 s, gefahren.

2.2.5.2 PCR für die Insertion der PcDXR in das Gateway-System

Um die PcDXR vollständig, aber ohne Polyadenylierungssignal und andere Anhänge vor dem Startcodon in einen Expressionsvektor von Gateway™ (Invitrogen) überführen zu können, mussten geeignete Primer⁹ konstruiert werden. Die Primer⁹ wurden so gewählt, dass sie einerseits ca. 20 Basen der DXR am 5'-Ende (*attB1_dxr_for*) und am 3'-Ende (*attB1_dxr_rev*), die für die Klonierung benötigten attB-Sequenzen („*attachment sites*“) sowie jeweils 4

Guaninreste am 5'-Ende der Primer enthielten. Im Forward Primer wurden zusätzlich 2 Nukleotide (T, G) hinter der *attB*-Sequenz eingebaut, im Reverse Primer 1 Base (T), um das korrekte Leseraster der *PcDXR* zu erhalten.

```
AttB1_dxr_for: 5'-G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTG ATG GCA  
CTT AAT ATT CTA TCT CCA G-3'
```

```
AttB1_dxr_rev: 5'-GG GGA CCA CTT TGT ACA AGA AAG CTG GGT TCA AGC AAA  
AAC AGG ACT TGG-3'
```

Abb. 2.4 Primersequenzen für die Einführung der *PcDXR* in den Gateway-Eingangsvektor DONR 221¹¹. Am 5'-Ende jeweils die benötigten 4 Guanidine und die *attB*-Sequenzen. Unterstrichene Basen wurden zusätzlich eingefügt, um einen Open Reading Frame (ORF) zu erhalten. Mit dem dunkelgrau hinterlegten Codon (Startcodon Methionin im *AttB1_dxr_for*, Stopcodon im *AttB1_dxr_rev*) beginnt jeweils der *PcDXR*-Sequenzbereich.

Die Herstellung der Primer⁹ erfolgte durch die Firma Carl Roth (Karlsruhe, D). Sie wurden nicht, wie bei Primern dieser Größe üblich, zusätzlich gereinigt. Die Konzentration wurde auf 50 pmol verdünnt. Der PCR Ansatz wurde wie in 2.2.5.1 pipettiert. Statt der Advantage Taq Polymerase¹² wurde eine Polymerase mit Lesefehler Korrekturfunktion, die Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity¹¹, eingesetzt. Zusätzlich mussten deshalb 2 µl 50 mM MgCl₂¹¹ zugesetzt werden. Als Template wurde 1 µl der Minipräparation des pB SK(-)¹³ mit *PcDXR* Insert bzw. 10 µl der 2:3 verdünnten cDNA (s. 2.3 RT-PCR) der Probe 10C von Tagesgang 2 2002 eingesetzt. Mit 3 min bei 96°C wurde die PCR gestartet. Denaturiert wurde jeweils 45 s lang mit 96°C, Annealing Temperatur war für 4 Zyklen 55°C und für 19 Zyklen 65°C ebenfalls 45 s mit dem pB SK(-)¹³ Template. Mit der cDNA als Template musste die Annealing Temperatur bei den ersten 4 Zyklen auf 48°C verringert werden. Danach wurden 24 Zyklen mit 60°C gefahren. Die Polymerisierung erfolgte über 2 min bei 72°C.

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente zur Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten nach ihrer Größe. Dazu wurde Agarose¹¹ 0,6% für Fragmente, die größer als 1 kb waren, 0,8% für mittelgroße Fragmente und 1,2% für Fragmente, die kleiner als 300 bp waren, durch Aufkochen in 80 ml TAE-Puffer (P8) gelöst und nach Zugabe von 4 µl Ethidiumbromid¹⁶ (10 mg ml⁻¹) in die Plexiglasform (15 x 11 cm) gegossen. Innerhalb von 45 min war die Agarose¹¹ vollständig polymerisiert und der Kamm für die Probenaschen (15 Taschen à 20 µl Volumen) konnte

entfernt werden. Das Gel wurde anschließend in die Gelkammer transferiert und vollständig mit TAE-Puffer (P8) überdeckt. Im Falle von PCR-Proben wurden 10 µl DNA mit 2 µl Bromphenolblau⁹ (P9) versetzt, während bei Restriktionsansätzen (s. 2.2.9) der gesamte 20 µl Ansatz mit 4 µl Bromphenolblau⁹ (P9) versetzt und neben einem DNA-Größenstandard¹¹ (1 kb oder 100 bp, s. Abb. 6.1 A und B) aufgetragen wurde. Nach einer Laufzeit von ca. 45 min bei 120 V (Elektrophoresis Power Supply PS3002, Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, D) waren die DNA-Fragmente durch ihre negative Ladung vom Minus- zum Pluspol gelaufen und durch die poröse Struktur der polymerisierten Agarose ihrer Größe nach aufgetrennt worden. Ethidiumbromid¹⁶ interkaliert zwischen den Basen der DNA und die entstandenen Komplexe werden unter UV-Licht sichtbar. Das Gel wurde unter einer UV-Lampe betrachtet und mittels Geldokumentationsanlage (Intas, Göttingen, D) fotografisch festgehalten. Das Bild wurde anschließend auf Thermopapier (K65HM, Mitsubishi Electric Corporation, Japan) gedruckt und als Datei abgespeichert.

2.2.7 Klonieren und Transformieren

2.2.7.1 TOPO Klonierung in den Vektor pCR[®]II-TOPO

Das in Punkt 2.2.5.1 erhaltene PCR-Produkt wurde mittels TOPO-TA Cloning Kit¹¹ in den *E. coli* Stamm Top 10F⁺ (chemisch kompetente Zellen)¹¹ kloniert. Ein µl vom PCR-Produkt wurde mit 3 µl H₂O *bidest*, 1 µl Salzlösung¹¹ (NaCl (1,2 M) und MgCl₂ (0,06 M)) und 1 µl vom pCR[®]II-TOPO Vektor¹¹ (10 ng µl⁻¹ Plasmid-DNA) 30 min lang bei RT inkubiert. Von dieser Lösung wurden 2 µl auf die auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen pipettiert und sanft durchmischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock 30 s lang bei 42°C. Die sofortige Zugabe von 250 µl SOC-Medium (NL2) und die anschließende einstündige Inkubation bei 37°C ermöglichte die vollständige Regeneration und das Wachstum der Zellen. Danach erfolgte das Ausplattieren der Bakterien-suspension von 10 und 100 µl sowie der restlichen 140 µl auf LB-Nähragarplatten (25 ml LB pro Platte, NL4) mit je 62,5 µl Kanamycin¹⁴, 40 µl X-Gal¹¹ (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-galactopyranosid) und 20 µl 1 M IPTG¹¹ (Isopropyl-β-D-thiogalactosid) pro Platte und eine Inkubation bei 37°C über Nacht.

Der pCR[®]II-TOPO-Vektor¹¹ enthält Antibiotika-Resistenz für Ampicillin¹⁴ und Kanamycin¹⁴ zur Selektion der Klone, die den Vektor enthalten. Zusätzlich gibt es die Möglichkeit einer Blau-Weiß-Selektion positiver Klone, die das Insert im Vektor

enthalten. Durch die Insertion eines Gen-Fragmentes in den Vektor wird das LacZ'-Gen unterbrochen, welches für das N-terminale Fragment der β -Galactosidase kodiert, das keine β -Galactosidase-Aktivität besitzt, diese jedoch gemeinsam mit dem inaktiven ω -Fragment entwickeln kann. Wird das LacZ'-Gen durch das Insert zerstört, bleiben die Kolonien nach Zugabe von X-Gal¹¹ und IPTG¹¹ weiß, während Kolonien ohne Insert eine Blaufärbung (Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo) aufweisen (MÜLHARDT, 2003). Nachdem die über Nacht inkubierten Platten 1-2 h im Kühlschrank gelagert wurden, war die Farbunterscheidung leichter möglich. Zur weiteren Überprüfung des Inserts mussten nun positive Klone vermehrt werden, um eine Isolierung der Plasmid-DNA in größerer Menge machen zu können. 24 weiße Kolonien wurden mit einer geringen Menge des Agars ausgestochen und in je 5 ml LB-Flüssigmedium (NL3) überimpft. Zur Gegenselektion wurde Ampicillin¹⁴ (Endkonzentration 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) zugesetzt. Die 24 Röhrchen wurden mit Kappen versehen und über Nacht bei 37°C mit 200 rpm (Certomat[®]BS-T B. Braun Biotech International, Melsungen, D) geschüttelt.

2.2.7.2 Klonierung über Ligase

Für die Klonierung von sehr kleinen Fragmenten wurde eine Ligase-Reaktion über Nacht angesetzt. Der Ligase-Ansatz mit 1 μl Vektor, 1 μl Ligase¹¹, 0,5 μl 10x Ligase-Puffer¹¹, 1 μl DNA (aus der PCR) und 1,5 μl H₂O *bide*st wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Die niedrige Temperatur verringert die Molekularbewegung und erhöht zusätzlich zur Ligase die Bindungswahrscheinlichkeit vom Insert in den Vektor. Vom Ligase-Ansatz wurden am nächsten Tag 2 μl auf die auf Eis aufgetauten kompetenten Top 10F' Zellen¹¹, die mit 0,5 M β -ME^c versetzt wurden, pipettiert und sanft untergemischt. Danach wurde gleich verfahren wie bei der TOPO-Klonierung (s. 2.2.7.1).

2.2.7.3 Das Gateway™ System

Das Gateway™ System basiert auf Rekombination durch den Bakteriophagen Lambda. Zur besseren Selektion positiver Klone enthalten die Donor- und Destinationsvektoren das *ccdB*-Gen zur negativen Selektion und ein Chloramphenicolresistenz-Gen zur Gegenselektion. Bei der BP- oder LR-Reaktion wird die Kasette mit diesen Genen gegen das gewünschte Gen ausgetauscht. Das *ccdB*-Protein erzeugt in den meisten *E. coli*-Stämmen eine Wechselwirkung mit der DNA-Gyrase und verhindert damit das Wachstum der Zellen. Bei erfolgreicher

Rekombination wird das *ccdB*-Gen ersetzt und die Zellen können wachsen (MÜLHARDT, 2003).

2.2.7.3.1 Die BP-Rekombinationsreaktion (*attB* x *attP* → *attL*)

Über PCR wurden die *attB*-Sequenzen an die *PcDXR* angehängt (s. 2.2.5.2). Diese ermöglichen dann über Rekombination mit den *attP*-Sequenzen des DONR 221 Vektors¹¹, der als Eingangsvektor gewählt wurde, die Insertion der *PcDXR* (BP-Rekombinations-Reaktion). 2,5 µl der über Minipräparation (s. 2.2.8.1) gereinigten Plasmid-DNA von Klon 18 (1:100 verdünnt; Endkonzentration im Ansatz 125 ng µl⁻¹) wurden mit 2 µl DONR 221 Vektor¹¹ (150 ng µl⁻¹), 4 µl 5x Puffer und 7,5 µl TE-Puffer (P10) bei RT vermischt. Die BP-Clonase¹¹ wurde 2 min auf Eis aufgetaut, 2-mal kurz geschüttelt (Reax 2000, Heidolph) und 4 µl davon zum Ansatz pipettiert. Zweimal wurde der Ansatz kurz gemixt und über 1 h bei 25°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 2 µl Proteinase K¹⁴. Der Reaktionsansatz wurde 10 min bei 37°C inkubiert und konnte dann, wenn nicht sofort verwendet, mindestens 1 Woche bei -20°C aufbewahrt werden. Ein µl der BP-Reaktion wurde sanft unter 50 µl kompetente *E. coli* Top 10-Zellen¹¹ gemischt, 30 min auf Eis inkubiert und nach 30 s Hitzeschock bei 42°C und sofortiger Lagerung auf Eis mit 450 µl SOC-Medium (NL2) versetzt. Danach wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C und 200 rpm waagrecht geschüttelt (Certomat®BS-T B. Braun Biotech International). Je 20, 100 und die restlichen 380 µl wurden auf LB-Agarplatten (NL4) mit Kanamycin¹⁴ ausplattiert. TOP10F⁻ Zellen¹¹ sind nicht für die Transformation geeignet, da sie das *ccdA*-Gen enthalten und den Selektionsmechanismus über das *ccdB*-Gen verhindern würden. Nach erfolgter Transformation wurde die Plasmid-DNA der Klone mittels Qiagen Minikit¹⁰ (s. 2.2.8.2) gereinigt, über PCR ihr Insert überprüft und in die LR-Reaktion eingesetzt.

2.2.7.3.2 Die LR-Rekombinationsreaktion (*attL* x *attR* → *attB*)

Um die *PcDXR* in *E. coli* exprimieren zu können, musste das Gen, das nun *attL*-Sequenzen enthielt, durch Rekombination in einen Expressionsvektor gebracht werden. Um später das exprimierte Enzym über eine His-tag spezifische Affinitätschromatografie (s. 2.4.2) reinigen zu können, wurde als Expressionsvektor der pDEST17¹¹ mit 6 N-terminalen Histidinresten gewählt. 1,5 µl vom mittels Qiagen Plasmid Minikit¹⁰ gereinigten Eingangsvektor (1:10 verdünnt, 187 ng µl⁻¹) wurden mit 2 µl des Destinationsvektors¹¹ (150 ng µl⁻¹), 4 µl 5x LR-Clonase-Reaktionspuffer¹¹ mit TE-Puffer auf 16 µl aufgefüllt und bei RT gemischt.

Zugabe von 4 μl LR-Clonase-Enzymmix¹¹ und alle weiteren Schritte bis zur Transformation erfolgten gleich wie bei Zugabe der BP-Clonase¹¹.

Da Expressionsstämme den integrierten Vektor nach einiger Zeit wieder verlieren, wurde die LR-Reaktion zuerst in Library Efficiency[®]DH5 α [™]-Zellen¹¹ transformiert, um das Insert dauerhaft in *E. coli* erhalten zu können. Dazu wurde 1 μl der LR-Reaktion auf ein 50 μl Aliquot der DH5 α -Zellen¹¹ gegeben und sanft durchmischt. Die weiteren Schritte erfolgten wie in 2.2.7.3.1. Da der Destinationsvektor in diesem Fall ein Ampicillinresistenz-Gen besitzt wurde dem LB-Agar (NL4) Ampicillin¹⁴ (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) zugesetzt. Die Plasmid-DNA der Kolonien wurde über Qiagen Minikit¹⁰-Reinigung (s. 2.2.8.2) extrahiert und mittels PCR auf ihr Insert untersucht. Um das Gen in großen Mengen exprimieren zu können, musste der Vektor in einen Expressionsstamm von *E. coli* gebracht werden. Es wurde der Stamm BL21-Star (DE3)¹¹ gewählt. Dieser Stamm enthält ein T7 Polymerase-Gen, das durch einen IPTG¹¹ induzierbaren lacUV5-Promotor kontrolliert wird. Ein μl vom 1:10 (Endkonzentration 9 ng μl^{-1}) verdünnten, gereinigten pDEST17¹¹ wurde sanft unter die kompetenten Zellen gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 30 s Hitzeschock bei 42°C wurden die Zellen sofort wieder auf Eis gestellt, 250 μl SOC-Medium zugesetzt und 1 h bei 225 rpm waagrecht (Certomat[®]BS-T B. Braun Biotech International) geschüttelt. Danach wurden je 20, 100 und 180 μl auf LB-Agarplatten (NL4) mit Ampicillin¹⁴ (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.8 DNA Isolierung von Plasmiden

2.2.8.1 DNA Isolierung von Plasmiden nach BIRNBOIM & DOLY

Die Plasmid-DNA Isolierung erfolgte mit Hilfe der Minipräparations-Methode nach Birnboim & Doly (1979). Je 1,5 ml der über Nacht kultivierten Flüssigkulturen wurden in Reaktionsgefäße (1,5 ml, Eppendorf, Hamburg, D) gefüllt und 3 min bei 20000 g (4°C) zentrifugiert (Sigma 3K15, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode, D). Der Überstand wurde dekantiert und möglichst vollständig mit einer Pipette abgesaugt. Jedes Sediment wurde durch auf- und abpipettieren in 100 μl BD1 (P11) resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Mit der Zugabe von BD2 (P12) erfolgte der weitere Aufschluss der Zellen. Die Lösung wurde durch invertieren durchmischt und 5 min auf Eis inkubiert. Das Fällern von Salzen erfolgte durch Zugabe von 150 μl 3 M Natriumacetat¹⁶ (BD3, P13), Invertieren und 5-minütiger Inkubation auf Eis. Die nun trüb gewordene Lösung wurde 10

min zentrifugiert (20000 g, 4°C). Der Überstand wurde ohne das weiße Proteinsediment in eine aus 250 µl Phenol und 250 µl Chloroform⁹/Isoamylalkohol⁹ (24:1) bestehende Lösung überführt, invertiert und 10 min bei RT inkubiert. Durch die anschließende, 15-minütige Zentrifugation erfolgte eine Phasentrennung der Lösungen, wobei die in der oberen Phase enthaltene DNA vorsichtig in 1 ml 100% Ethanol⁹ überführt wurde. Durch 10-minütige Inkubation auf Eis erfolgte die Fällung der DNA, die durch anschließende Zentrifugation (15000 g, 4°C) sedimentiert wurde. Der Überstand wurde dekantiert, vollständig abgesaugt und das DNA Sediment mit 0,5 ml 75% Ethanol⁹ gewaschen (Zentrifugieren 5 min, 20000 g, 4°C). Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment 10 min im Rotationsexsikkator (Speedvac, Eppendorf, Hamburg, D) bei 45°C mit offenem Deckel der Reaktionsgefäße getrocknet. Das Sediment wurde abschließend in 50 µl H₂O *bideest* resuspendiert. Wenn nötig, wurde die Konzentration der DNA-Lösung bestimmt (s. 2.2.3), bei sofortiger Verwendung auf Eis gehalten oder für längere Lagerung bei -20°C eingefroren.

2.2.8.2 DNA Isolierung von Plasmiden mittels Qiagen Spin Minikit

Wenn eine besonders reine DNA für bestimmte Anwendungen erforderlich war, wie zum Beispiel bei der Sequenzierung der gesamten *PcDXR*, wurde die Plasmid DNA mittels Qiagen Spin Minikit¹⁰ isoliert. Dazu wurden wie in 2.2.8.1 beschrieben, 1,5 ml einer Übernachtskultur abgefüllt und zentrifugiert (Sigma 3K15, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode, D). Nach Resuspension des Bakteriensedimentes in 250 µl Lysispuffer P1 wurde die Lösung durch Zugabe von 250 µl Puffer P2, 3-maliges Invertieren, Zugabe von 350 µl Puffer N3, Invertieren und anschließendes Zentrifugieren (20000 g, 4°C, 10 min) von Zelltrümmern befreit. Anschließend wurde der Überstand ohne das weiße Präzipitat in ein Qiagen Minispin Säulchen überführt und 1 min (20000 g, 4°C) zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Nach Zugabe von 750 µl PE-Puffer und 1-minütiger Zentrifugation, wurde das Säulchen in ein neues 2 ml Sammelgefäß überführt und 1 min zentrifugiert, um die Ethanolreste des Waschpuffers vollständig zu entfernen. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde mit 50 µl EB-Puffer durch je 1-minütige Inkubation und Zentrifugieren in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß eluiert. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten oder bei -20°C eingefroren.

2.2.9 Restriktion

Vektoren besitzen neben den Antibiotikaresistenzen und dem LacZ' Gen zur Selektion eine sogenannte „multiple cloning site“ in die das DNA-Fragment bei der Klonierung inseriert werden kann. Dieser Bereich besteht aus einer Abfolge von Erkennungssequenzen für verschiedene Restriktionsenzyme, die dort den DNA-Strang schneiden können. Diese Sequenzen befinden sich vor und hinter dem Insert, sodass das eingebaute Fragment mit Hilfe der Restriktionsenzyme auch wieder aus dem Vektor herausgeschnitten werden kann. Ist die Sequenz des Inserts bekannt, kann durch gezielte Auswahl geeigneter Enzyme verhindert werden, dass das Zielfragment ebenfalls geschnitten wird. Im Falle des in Punkt 2.2.7 klonierten PCR-Fragmentes wurde das Restriktionsenzym EcoRI gewählt, um durch Überprüfung der zu erwartenden Größe mittels Gelelektrophorese (s. 2.2.6) Klone mit dem richtigen Insert selektieren zu können. Ein Restriktionsansatz bestand aus 0,2 µl Restriktionsenzym¹¹, 2 µl 10x Puffer¹¹, spezifisch für jedes Restriktionsenzym, 0,2 µl RNase¹¹ 100x, 15,6 µl H₂O *bidest* sowie 2 µl DNA-Lösung aus der Minipräparation (s.2.2.8.1). Dieser Ansatz wurde 1-2 h bei 37°C im Trockenschrank (Heraeus ST5042 Heraeus, Hanau, D) inkubiert.

2.2.10 Sequenzierung

Die Agarose-Gelelektrophorese kann nur einen indirekten Nachweis über die Größe von DNA-Fragmenten liefern. Der direkte Nachweis der Größe des Inserts kann nur über Sequenzierung der DNA erfolgen. Die Sequenzierung wurde mit einem Sequenzierkit (BigDye RR Terminator Cycle Sequencing Kit)¹⁵ und einem Sequenziergerät (ABI PRISM 310 Genetic Analyser, PE Applied Biosystems, Weiterstadt, D) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Power Macintosh G3 Computer und dem Softwareprogramm ABI PRISM 310 Collection (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, D).

2.2.10.1 Cycle sequencing

Zuerst musste die DNA (gereinigt über Minipräparation bzw. Qiagen-Spin Minikit¹⁰) mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden, die während der Elektrophorese von einem Laser angeregt und gemessen werden konnten. Dazu wurde eine PCR mit jeweils einem Sequenzprimer, einem Forward und einem Reverse, je 3,5 µl (M13 (-20) Sequenzierprimer⁹, 2,8 pmol), bzw. einem für die PcDXR spezifischen Sequenzierprimer⁹ (Tab. 2.1) sowie 4 µl vom Terminator-Premix¹⁵, das fluoreszenzmarkierte (BigDye) Didesoxynukleotide, dNTP's,

thermostabile Diphosphatase und *AmpliTag* DNA-Polymerase FS enthält, 2 µl Puffer, 9,5 µl H₂O *bideest* und 1 µl Plasmid DNA durchgeführt. Die markierten ddNTP's werden in der Polymerisierungsphase zufällig eingebaut und führen dadurch zu einem Abbruch der Reaktion. Die unterschiedlich langen Fragmente werden dann während der Flüssiggelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Im Thermoblock wurde mit oben genanntem Ansatz folgende Reaktion durchgeführt. Einmal 1 min bei 96°C zum Aktivieren der Polymerase, dann in 25 Zyklen 30 s Denaturierung bei 96°C, 15 s Primer-Annealing bei 50°C und 4 min Polymerisierung bei 60°C.

Tab. 2.1 Spezifische Primer⁹, die zum Sequenzieren der *PcDXR* eingesetzt wurden.

Primersequenz 3' → 5'	Bezeichnung
¹ GAC ATT GTA GCG GAG AAT CCA G	<i>dxr_1_for</i>
² GCT CTT CTT GCA GAC CAG GTG	<i>dxr_3_for</i>
³ GGA ATA GTA GGT TG	<i>dxr_4_for</i>
⁴ GCA ATA GAA GCT GGA AAA GAC ATA TGC	<i>dxr_2_rev</i>
⁵ GAC TCA TCT GTT ATC GCA CAG	<i>dxr_5_for</i>
⁶ CAC CAG GCA GAG TTA GTG	<i>S-dxr_rev</i>

2.2.10.2 Ethanol-Präzipitation

Nach dem Cycle Sequencing erfolgte eine Reinigung der DNA-Fragmente von den Komponenten der vorangegangenen Reaktion. Der gesamte PCR-Ansatz wurde mit 2 µl Natriumacetat¹⁶ (3 M) und 60 µl 70% Ethanol⁹ versetzt und 20 min bei RT inkubiert. Durch 30-minütige Zentrifugation (20000 g, 4°C) wurde die DNA sedimentiert. Das Sediment wurde 2-mal mit 250 µl 70% Ethanol zum waschen 10 min lang zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das reine DNA-Sediment wurde im Rotationsexsikkator (Speedvac, Eppendorf, Hamburg, D) bei 45°C getrocknet. Anschließend wurde es in 25 µl Template Supression Reagent (TSR)¹⁵ resuspendiert, 2 min bei 90°C im Thermocycler (Biometra Trio-Thermoblock™) denaturiert, 2-3 min auf Eis gehalten und in Reaktionsgefäße¹⁵ (Genetic Analyzer Sample Tubes; 0,5 ml mit Septa) überführt. Die Proben waren 3 Tage bei RT haltbar.

2.2.10.3 Wartung und Einstellungen des Analysegerätes

Zumindest alle 2 Wochen und nach jedem längeren Stillstand des Analysegerätes musste die Kapillare ausgebaut und das Fenster für den Laser mit 70% Ethanol⁹

gereinigt werden, der Gelbehälter mit warmem Leitungswasser von getrockneten Gelresten befreit, mit H₂O *bideest* gespült und sorgsam getrocknet werden. Die Pufferbehälter mussten neu mit frischem Puffer¹⁵ (Genetic Analyzer Puffer) gefüllt werden. Gelbehälter und Kapillare wurden mittels Glasspritze mit frischem Performance Optimized Polymer 6 (POP 6)¹⁵ gefüllt. Die Proben wurden während 50 s bei 2 kV Spannung elektrokinetisch auf das Gel aufgetragen. Die 2 h dauernde Elektrophorese lief bei einer Spannung von 12 kV und 5 µA bei einer Temperatur von 50°C. Das Analysegerät war so eingestellt, dass BigDye-Terminatoren¹⁵ hochauflösend detektiert werden konnten und eine Auflösung der Signale um genau eine Base erfolgte. Diese Fluoreszenzsignale wurden anschließend in elektrische Signale umgewandelt und automatisch vom Analysenprogramm (Sequencing Analysis, PE Applied Biosystems) ausgewertet. Das nach dem Abziehen der Hintergrundfluoreszenz erhaltene Elektropherogramm stellte die Basenabfolge in verschiedenfarbigen Peaks dar. Adenin in grüner Farbe, Thymin rot, Cytosin blau und Guanin in schwarz. Für den Rechner unleserliche Bereiche konnten manchmal manuell korrigiert werden. Das Programm lieferte die Sequenzfolge auch im Textformat. Unter Optimalen Bedingungen konnten Sequenzen von mehr als 500 Basen aufgelöst werden. Gene mit einer Länge von 1000 Basenpaaren konnten also mit den beiden universalen M13-Primern⁹ in nur 2 Elektrophoreseläufen vollständig sequenziert werden, während für längere Gene weitere sequenzspezifische Primer⁹ (*dxr_for1*, *dxr_rev1*) im mittleren Bereich der Sequenz gewählt werden mussten und weitere Sequenzierungen nötig waren.

2.2.10.4 Sequenzanalyse

Zuerst mussten Anfang und Ende sowie zweifelhafte Stellen über das Elektropherogramm manuell in der ausgegebenen Textdatei der Sequenz korrigiert werden. Die korrekte Basenabfolge konnte dann durch Einlesen in das Softwareprogramm DNA Strider 2.1 (Centre d'Etudes Nucleaires de Saclay, Gif-sur-Yvette, F) in die Komplementärsequenz oder in die Proteinsequenz übersetzt werden. Ferner konnten Restriktionskarten und Sequenzvergleiche erstellt, sowie offene Leseraster ermittelt werden. Die gesamte Länge eines Gens wurde durch überlappende Sequenzen ermittelt. Homologievergleiche der Basen- bzw. Aminosäurenabfolge mit den Gensequenzen anderer Organismen konnten durch Einlesen der ausgegebenen Textdateien in die Datenbank von EMBL (Heidelberg, D) mit speziellen Suchprogrammen durchgeführt werden. Die vollständige

Gensequenz der PcDXR wurde zur offiziellen Registrierung in der EMBL-Datenbank unter der Registrierungsnummer AJ 574852 hinterlegt.

2.2.11 Hybridisierung der PcDXR-Gensonde mit der λ -Phagen-Genbank

2.2.11.1 Digoxigenin-Markierung der Gensonde

Um das in 2.2.5.1 erzeugte PCR-Fragment als Hybridisierungssonde für das Screening der cDNA-Genbank nutzen zu können, musste es durch Digoxigenin (DIG DNA Labeling and Detection Kit)¹⁴ markiert werden. Der Hybridisierungsnachweis erfolgt durch einen spezifischen Antikörper gegen DIG, an den eine Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt ist. Die Antikörperbindung kann durch die enzymatische Reaktion der AP mit 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und dem Farbstoff Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) nachgewiesen werden.

Die Restriktion der Minipräparation für die Herstellung der Sonde erfolgte 1 h mit EcoRI¹¹, nachdem überprüft wurde, dass sich keine EcoRI- Schnittstelle im Fragment befand, und wurde abschließend 10 min bei 70°C inkubiert, um das Restriktionsenzym in der Lösung zu inaktivieren. Die Markierung erfolgte mittels PCR. Im Ansatz für die DIG-Markierung wurden 1 μ l des 1:10000 verdünnten Fragmentes aus der Restriktion als Template mit 5 μ l 10x PCR-Puffer¹², 1 μ l Taq Advantage Polymerase¹², 1 μ l dNTP's¹¹ (10 ng μ l⁻¹; 10 mM 1:10 verdünnt), 2,5 μ l dNTP-Labeling-Mix¹⁴ (DIG 10x, = 10 mM), 1 μ l *dxr_for1*, 1 μ l *dxr_rev1* und 39,5 μ l H₂O *bideest* versetzt und im gleichen Temperaturprogramm wie für die PCR in 2.2.5.1 gefahren. Als Kontrolle wurde gleichzeitig eine PCR ohne markierte dNTP's durchgeführt. Das Ergebnis der PCR wurde in einer Agarose¹¹-Gelelektrophorese (1,5%; 5 μ l Probe und 2 μ l Bromphenolblau⁹ neben der 100 bp Leiter¹¹ aufgetragen) kontrolliert. Das markierte Fragment sollte im Gel langsamer laufen als die Kontrolle (s. 3.3). Die restlichen 45 μ l wurden zu je 6 μ l portioniert und bei -20°C gelagert.

2.2.11.2 Anzucht der λ -Phagen

In einer 5 ml LB-Übernachtskultur (NL3) wurde zuerst der zu infizierende *E. coli* Stamm XL1-Blue MRF¹³ angezogen. Am nächsten Tag wurde die Kultur 1:1 mit frischem LB-Medium, das vorher mit je 100 μ l sterilfiltriertem 20%igem D-Maltose-Monohydrat⁹ und autoklaviertem 1 M MgSO₄ 7xH₂O¹⁷ komplementiert wurde, verdünnt und weitere 30 min bei 37°C geschüttelt. In der Zwischenzeit

wurden 6 Rechteckplatten mit je 70 ml LB-Agar (NL4) gegossen. Die Platten durften nicht vollständig austrocknen, um die Bindung mit der Top-Agarose¹¹ zu verbessern. 6 Reagenzgläser wurden mit je 8 ml Top-Agarose¹¹ (NL5), versetzt mit je 160 µl Maltose⁹ und MgSO₄¹⁷ (s.o.), gefüllt und in einem 48°C warmen Wasserbad gehalten.

Die λ-Phagen cDNA Genbank der Graupappel (MILLER, 2001) stand in Form einer Phagensuspension in SM-Puffer (P15) und 0,3% Chlorophorm⁹ mit einem Titer von $3 \cdot 10^5$ PFU (Plaque forming unit) ml⁻¹ zur Verfügung. Je 500 µl Phagensuspension wurden mit je 500 µl XL1-Blue-Kultur¹³ gemischt und davon je 100 µl einzeln in jedes Top-Agarose¹¹-Röhrchen zugegeben. Da 48°C zu heiß für die Bakterien ist, musste die flüssige Agarose kurz und heftig geschüttelt und sofort auf die Rechteckplatte ausgegossen werden. Ein kurzes Abflammen der Oberfläche löste die entstandenen Luftblasen auf und erzeugte eine glatte Oberfläche. Die Platten wurden 15 min offen trocknen gelassen und wurden dann verkehrt genau 11 h bei 37°C inkubiert. Nach 11 h war eine Plaquedichte von ca. 10000 pro Platte erreicht, was bei einer Anzahl von 6 Platten gewährleistete, dass das gesamte Genom für die Hybridisierung zur Verfügung stand. Die Bakterien waren schon sehr stark lysiert, sodass die Plaques bereits miteinander zu verschmelzen begannen. Anschließend wurden die Platten 15 min auf RT abgekühlt, mit Parafilm M[®] (Structure Probe, Inc., West Chester, USA) verschlossen und bei 4°C gelagert.

2.2.11.3 Transfer der Phagenplaques auf Nitrozellulosefilter

Alle Schalen und Geräte wurden mit 70% Ethanol gespült, die Lösungen autoklaviert und alle Vorgänge ausschließlich mit Handschuhen durchgeführt. Alle Zeitangaben wurden unter Verwendung einer Stoppuhr strikt eingehalten.

Die Nitrozellulosefilter (Hybond-C pure, Hybond™ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D) wurden auf eine Größe von 10 x 10 cm zugeschnitten und am linken oberen Eck mit blauem Kugelschreiber markiert. Drei Rechteckschalen wurden mit je 3 Schichten Filterpapier (Whatman International Ltd., Maidstone, GBR, 11,5 x 11,5 cm) ausgelegt mit je 30 ml Denaturierungspuffer, Neutralisierungspuffer und Waschpuffer I gefüllt. Die Phagenplatten wurden solange wie möglich im Kühlschrank gehalten, um ein Ablösen der Top-Agarose¹¹ mit dem Filter zu vermeiden. Je 1 Filter wurde vorsichtig mit 2 Pinzetten an den gegenüberliegenden Ecken auf die Phagenplatte gelegt und 30 s liegen gelassen. Währenddessen wurden die Ecken und die Beschriftung des Filters auf der

Unterseite der Petrischale angezeichnet, um später die exakte Lage und Orientierung des Filters rekonstruieren zu können. Der Filter saugte sich sofort auf der feuchten Oberfläche an und durfte nicht mehr verschoben werden, um die Abdrücke der einzelnen Plaques nicht zu verwischen. Nach vorsichtigem Ablösen wurde der Filter mit der Phagenfläche nach oben 5 min in den Denaturierungspuffer gelegt, danach 5 min im Neutralisierungspuffer belassen und abschließend 5 min in den Waschpuffer I gelegt. Das Filterpapier sollte gewährleisten, dass die Nitrozellulosefilter nicht in der Lösung schwammen sondern nur gerade vom Puffer bedeckt wurden. Die Nitrozellulosefilter wurden bei RT auf Filterpapier getrocknet und dann 2 h bei 80°C im Trockenschrank (Heraeus ST5042 Heraeus, Hanau, D) inkubiert. Später wurden die Filter bis zur eigentlichen Hybridisierung zwischen Filterpapier trocken und dunkel aufbewahrt.

2.2.11.4 Hybridisierung

Die Prähybridisierung erfolgte in Plastikschaalen (22 x 12 cm), jeweils 4 Filter pro Schale, wobei die Phagenflächen nicht aufeinander liegen durften. Die Filter wurden im Hybridisierungspuffer (P20) im Wasserbad (Julabo SW-20C, Julabo Labortechnik, Seelbach, D) bei 65°C 1 h sanft geschüttelt, um verbleibende freie Bindungsstellen auf dem Filter abzusättigen. Die 6 µl DIG markierte Sonde wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 100 µl TE-Puffer (P10) gemischt und, nachdem mittels Kanüle ein Loch in den Deckel gestochen wurde, 10 min im kochenden Wasserbad inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt. Der Puffer für die Prähybridisierung wurde abgegossen, die Sonde untergemischt und wieder zu den Filtern gegossen. Die Hybridisierung erfolgte mindestens 7 h bei 65°C im schüttelnden Wasserbad. Danach erfolgten mehrere Waschschrte um unspezifische Bindungen zu entfernen. Alle Waschschrte erfolgten in Plastikschaalen (s.o.) mit jeweils ca. 100 ml Lösung. Die Filter wurden aus der Hybridisierungslösung genommen, 30 s im 65°C warmen Waschpuffer I (P18, außerhalb des Wasserbades!) geschwenkt und danach 30 s im Waschpuffer I bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Filter 1 min bei RT in Puffer I (P21) inkubiert und dann in Puffer II (P22, RT) transferiert. Nach 30 min wurden 16 µl der Anti-DIG-AP-Lösung hinzugefügt. Die Filter wurden weitere 30 min sanft in dieser Lösung geschwenkt (Duomax 1030, Heidolph). Danach wurden die Filter 2-mal 15 min jeweils in frischer Puffer I Lösung (RT) stark geschüttelt und anschließend in die kleineren Rechtheckschaalen zu maximal 2 Filtern in 50 ml Puffer III (P23) mit 500 µl NBT/BCIP Stammlösung überführt und im Dunkeln über Nacht

sanft geschwenkt. Die gefärbten Filter mit positiven Signalen wurden dann 10 min in Puffer I geschwenkt, in frischen Puffer I transferiert, weitere 2 h geschwenkt und anschließend zwischen Filterpapier getrocknet. Da die Signale im feuchten Zustand besser zu erkennen waren, wurde der zugehörige Bereich auf den Phagenplatten mit Hilfe der Eckenmarkierungen sofort ermittelt und markiert. Die getrockneten Nitrozellulosefilter wurden zwischen Filterpapier im Dunkeln bei RT gelagert.

Die als positiv identifizierten Bereiche auf den Phagenplatten wurden ausgestochen und in je 1 ml SM-Puffer (P15) mit 10 µl Chlorophorm⁹ gelöst und bei 4°C aufbewahrt. Da die Plaquedichte der ersten Platten zu hoch war, musste die Hybridisierung mit dem ausgewählten Bereich erneut durchgeführt werden. Dazu wurde von den ausgestochenen und gelösten Phagen eine Verdünnungsreihe erstellt. 450 µl einer frisch angezogenen XL1-Blue-Kultur¹³ wurden mit 450 µl SM-Puffer Lösung verdünnt und mit 100 µl der Phagenlösung versetzt (10^{-1}) und vermischt. Aus dieser Stammlösung wurden 100 µl entnommen und wieder mit 900 µl XL1-Blue-SM-Lösung verdünnt (10^{-2}). Es wurde weiterhin so verfahren bis zur 10^{-5} Verdünnung. Alle Lösungen wurden dann 10 min bei 37°C inkubiert. Je 100 µl jeder Verdünnungsstufe wurde dann in die Top-Agarose¹¹ (NL5) gemischt und ausplattiert wie in 2.2.11.2 beschrieben. Nachdem die Filter erfolgreich hybridisiert wurden, konnten die vereinzelt Plaques aus dem Agar ausgestochen werden.

2.2.11.5 *In vivo* Excision des pBluescript SK(-) Phagemids

Um die cDNA aus dem Phagen zu isolieren, wurden zunächst Übernacht Kulturen von *E. coli* SOLR¹³ und XL1-Blue¹³ herangezogen. 50 µl des isolierten Phagen wurden in SM-Puffer gelöst und mit 100 µl XL1 Blue-Suspension¹¹ sowie 0,5 µl der Helferphagen-Lösung¹³ vermischt und 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1,5 ml 2xYT-Medium (NL6) wurde die Lösung 2 h bei 37°C im Wasserbad (Julabo SW-20C) geschüttelt, danach 20 min auf 70°C erhitzt (Trockenschrank Heraeus ST5042 Heraeus, Hanau, D) und anschließend 15 min bei 8000 g zentrifugiert (Sigma 3K15, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode, D). Der Überstand, der das Phagemid enthielt, wurde in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C gelagert (1-2 Monate möglich). Von dieser Phagemidlösung wurden jeweils 1 µl und 50 µl mit 200 µl *E. coli* (SOLR) Suspension vermischt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Davon wurden je 100 µl auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 µl ml⁻¹) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Um zu

überprüfen, welcher Klon das richtige Insert besaß, wurde jeweils mittels Impföse die Hälfte einer Kolonie in 200 µl TE-Puffer gelöst und die andere Hälfte in 4 ml LB-Medium mit Ampicillin über Nacht angezogen. Zu den 200 µl der Bakterien Suspension wurden 200 µl puffergesättigtes Phenol¹¹ zugesetzt, geschüttelt (Reax 2000, Heidolph) und 10 min bei 65°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform⁹ bei RT. Die Lösung wurde geschüttelt und 5 min bei 16000 g zentrifugiert. Ein µl des Überstandes konnte als Template in die PCR eingesetzt werden. Bei Proben mit positiver PCR wurde aus der Flüssigkultur mittels Qiagen Spin Minikit¹⁰ Reinigung die Plasmid- (Phagemid) DNA isoliert, durch Restriktion überprüft und anschließend sequenziert.

2.3 Bestimmung der Genexpression von PcDXR und PcISPS

2.3.1 Quantitative Reverse Transkriptase (RT-) PCR

Die RNA der Tagesgang Proben wurde in cDNA (s. 2.2.4.2) umgeschrieben und als Template in der quantitativen RT-PCR verwendet. Bei der RT-PCR wird ein Fluoreszenzfarbstoff (Sybr[®]Green¹⁵) unspezifisch in doppelsträngige DNA eingebaut. Die Stärke des detektierbaren Signals ist direkt proportional zur Menge an DNA, die in jedem PCR-Zyklus neu gebildet wird. Zur Quantifizierung der Produkte wird die Kinetik der PCR herangezogen. In den frühen PCR-Zyklen findet die Amplifikation der Fragmente exponentiell statt. Später verlangsamt sich die Reaktion durch Anhäufung von Produkten oder Limitierung von Substrat zu linearem Verlauf und kommt schließlich zum Stillstand. Als Richtwert wird jene Zykluszeit (C_T -Wert, „Threshold Cycle“) verwendet, in der die Amplifikation noch exponentiell verläuft und in der sich das Signal deutlich vom Hintergrund abhebt (MÜLHARDT, 2003). Je geringer die ursprüngliche Menge an DNA in der Probe ist, desto später erreicht das Signal (in der exponentiellen Phase) den Schwellenwert, desto höher ist also der C_T -Wert. Über Eichstandards definierter Plasmidmenge kann von der Zykluszeit auf die DNA-Menge geschlossen werden. Die Messungen wurden mit einem RT-PCR Gerät (Sequence Detection System 5700, Applied Biosystems) durchgeführt und mit Hilfe des Software-Programms GeneAmp 5700 SDS 1.3 der gleichen Firma ausgewertet. Nach jedem Zyklus wurde die Fluoreszenz aller Proben mittels CCD-Kamera („charge-coupled device“) gemessen. Durch einen Vergleich mit den Kontrollproben „no template control“, einem Probenansatz ohne DNA Vorlage und „no amplification control“, einem Probenansatz ohne Primer wurde der Schwellenwert ermittelt, der die Signale

unterhalb als Hintergrundrauschen und somit als Null definiert (C_T -Wert). Je mehr Kopien des DNA-Templates in der Probe vorhanden sind, desto früher wird das Schwellenwertsignal detektiert. Das Verhältnis C_T -Wert zu Kopienanzahl wurde über die Plasmidkonzentrationen, der in jedem PCR-Lauf mitgeführten Eichreihe (100, 1000, 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 und 10^8 Plasmidkopien in je 2 Parallelansätzen) ermittelt. Alle Untersuchungen wurden in Dreifachansätzen in 96-well Platten (Applied Biosystems) in 25 μ l Probenvolumen durchgeführt. Pro Ansatz wurden je 12,5 μ l Sybr®Green Mastermix¹⁵, 7,5 μ l Primerlösung (1 pM μ l⁻¹ in H₂O *bide*st) und 5 μ l der Probe pipettiert. Für die Probe wurde der 20 μ l cDNA-Ansatz (2.2.4.2) 1:2,5 mit H₂O *bide*st verdünnt. Dadurch konnten für jede Probe je 3 Ansätze zur Expressionsanalyse für β -Tubulin (*Pc β -TUB*), Isoprensynthase (*PcISPS*) und *PcDXR* derselben cDNA eingesetzt werden. Um Unterschiede in den PCR-Läufen miteinbeziehen zu können, wurde als interner Standard eine bekannte Plasmidkonzentration als Probe auf jeder zu vergleichenden Platte mitgeführt (10^5 oder 10^6 Kopien).

Als Bezugsgröße der Expression der beiden zu untersuchenden Gene *PcDXR* und *PcISPS* wurde die Expression von *Pc β -TUB* („housekeeping gene“) gemessen. Bei diesem Gen wurde eine gleich bleibende Expressionsrate im Tagesverlauf, unabhängig von Umweltfaktoren, angenommen. Dadurch können etwaige Schwankungen durch Pipettierungenauigkeiten oder unterschiedliche DNA Mengen in den Proben, zum Beispiel durch unvollständige reverse Transkription der mRNA oder geringeren mRNA-Gehalten in den Proben durch die Dauer der Lagerung, einberechnet werden. Nach Beendigung des PCR-Laufs wurde eine Schmelzpunktanalyse (Dissoziationskurve) der amplifizierten Fragmente durchgeführt, um unspezifisch vervielfältigte von spezifisch amplifizierten Proben besser unterscheiden zu können. Besondere Bedeutung kommt bei der Auswertung der „no template control“ zu, da unspezifisch gebundene Primerdimere in den vorliegenden Proben ein Signal, ungefähr vergleichbar dem Signal der 100-1000 Kopien der Eichkonzentration, verursachten. In manchen Fällen konnte eine Unterscheidung durch die Schmelzpunkt-Kurve gemacht werden. Die Etablierung des PCR-Systems für *Pc β -TUB*, *PcISPS* und *PcDXR* erfolgte analog zur Vorgehensweise bei HEUSER (2003).

Pc β -TUB:	<i>tub_150_for</i>	5'-GAT TTG TCC CTC GCG CTG T-3'
	<i>tub_150_rev</i>	5'-TCG GTA TAA TGA CCC TTG GCC-3'
Pc/SPS:	<i>is_for_spez</i>	5'-TTT GCC TAC TTT GCC GTG GTT CAA AAC-3'
	<i>is_rev_spez</i>	5'-TCC TCA GAA ATG CCT TTT GTA CGC ATG-3'
PcDXR:	<i>dxr-2_rev</i>	5'-GCA TAT GTC TTT TCC AGC TTC TAT TGC-3'
	<i>dxr-4_for</i>	5'-GGA ATA GTA GGT TGC GCA GGC-3'

Abb. 2.5 Primer die für die Genexpressionsanalyse der Tagesgangproben für das Housekeeping Gen Pc β -TUB und die zu untersuchenden Gene der Pc/SPS (MILLER, 2001) und der PcDXR eingesetzt wurden. Die verwendeten Primer führten zur Amplifikation von Fragmenten in der Länge von 65 (PcDXR), 150 (Pc β -TUB) und 197 (Pc/SPS) Basen.

Die RT-PCR wurde mit folgendem Temperatur-Programm gefahren:

1. Start der PCR	2 min	50°C
2. Denaturierung	10 min	95°C
3. Denaturierung	15 s	95°C
4. Annealing und Polymerisierung	1 min	60°C

Die Schritte 1. und 2. dienten zur Aktivierung der AmpliTaq Gold Polymerase¹⁵. Schritt 3. und 4. wurden in 45 Zyklen durchgeführt. Die Aufnahme der Dissoziationskurve erfolgte bei 60°C.

2.3.1.1 Berechnung der Plasmidkonzentrationen für die Eichgerade

Um die Menge der RT-PCR Amplifikate auf die vorhandene Menge an mRNA (cDNA) in der Probe zurückrechnen zu können, wurden von den Genen, die in Vektoren einkloniert vorlagen, Lösungen definierter Konzentrationen hergestellt. Dazu wurden die Plasmide mittels Qiagen Spin Minikit¹⁰ aus *E. coli* Übernachtskulturen gereinigt und ihre Konzentration photometrisch bestimmt. Mit Hilfe der Basenzahl des Vektors und des bekannten Inserts (Pc β -TUB: 416 bp im Vektor pCR 2.1: 3906 bp; Pc/SPS 1649 bp im Vektor pQE50: 3932 bp; PcDXR 1736 bp im Vektor pBSK(-): 3054 bp) wurde über das mittlere Molekulargewicht der Basen die Anzahl der Plasmide bestimmt:

$$N_{\text{Plasmid}} = \frac{M \cdot C_{\text{Plasmid}}}{N_{\text{Basen}} \cdot \overline{MG}_{\text{Basen}}} \quad (\text{Gl. 1})$$

N_{Plasmid}	Anzahl der Plasmide ml ⁻¹
M	Molmasse = 6,023 · 10 ²³ Teilchen mol ⁻¹
C_{Plasmid}	Konzentration des Plasmids [µg ml ⁻¹]
N_{Basen}	Anzahl der Basen im Plasmid
$\overline{MG}_{\text{Basen}}$	mittleres Molekulargewicht der Basen [308,95 g mol ⁻¹]

Die Plasmidlösung wurde auf 10^8 Plasmide pro $5 \mu\text{l}$ (Probenvolumen) eingestellt und in 10er Schritten bis 10^2 Plasmide verdünnt. Die Eichgerade von *Pc β -TUB* wurde für die Auswertung aus der 10^3 -bis zur 10^8 -Konzentration berechnet, da die „non template control“-Probe Signale in der Höhe des C_T -Wertes der 1000 Kopien-Konzentration aufwies. Die C_T -Werte der Proben lagen weit über diesen Werten, sodass eine Einbeziehung der 10^3 -Konzentration auch nicht notwendig war. Die Eichgeraden der *PcISPS* und der *PcDXR* wurden aus den Plasmidkonzentrationen 10^2 bis 10^8 berechnet (Abb. 2.6).

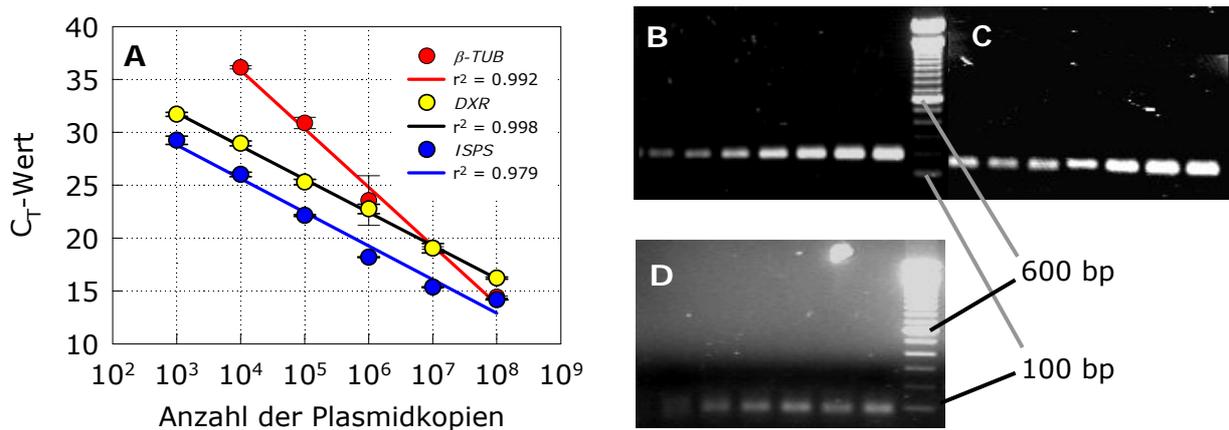


Abb. 2.6 Beispiel einer Eichgerade der Tagesgangproben (A), *Pc β -TUB* (●), *PcISPS* (●) und *PcDXR* (●). B, C und D: Fotos der Agarosegelelektrophorese (2%) der in der RT-PCR amplifizierten Eichreihe. In B und C sind die Eichreihen von *PcISPS* (B) und *Pc β -TUB* (C) mit von links (10^2) nach rechts (10^8) zunehmenden Plasmidkonzentrationen dargestellt. Das Amplifikat der 1000 Plasmidkopien der *PcDXR* (D) war im Gel aufgrund der kleinen Größe des *PcDXR*-Fragmentes nicht zu sehen. Im Vergleich zum 100 bp Eichstandard (zwischen Bund C und in D rechts) befinden sich die Banden wie erwartet bei ca. 200 bp (B, *PcISPS*), 150 bp (C, *Pc β -TUB*) und bei 65 bp (D, *PcDXR*).

2.3.1.2 Datenverarbeitung

Die vom Software Programm GeneAmp 5700 SDS 1.3 (Applied Biosystems) aus den Eichgeraden berechneten Kopienzahlen der *PcISPS* und *PcDXR* Proben wurden durch die Kopienzahlen der *Pc β -TUB* Proben dividiert und als relative Transkription ausgedrückt. Die Einberechnung der internen Plattenstandards war nicht notwendig, da die C_T -Werte dieser Proben in der erwarteten Größenordnung lagen und die PCR Läufe als gleichwertig angesehen werden konnten.

2.4 Heterologe Expression der *PcDXR* und Proteinreinigung

2.4.1 Anzucht und Aufschluss der Bakterien

Die BL21-Star (DE3) Kolonien (s. 2.2.7.3.2) wurden mittels PCR auf ihr Insert überprüft. Ein positiver Klon wurde ausgewählt und in 25 ml LB-Flüssigmedium

(NL3) mit Ampicillin¹⁴ (100 $\mu\text{l ml}^{-1}$) über Nacht bei 37°C geschüttelt (Certomat[®]BS-T B. Braun Biotech International, Melsungen, D). Nachdem eine OD von ca. 0,6 bis 1,0 erreicht worden war, wurde die Kultur 1:20 mit frischem LB-Nährmedium (ohne Ampicillin) verdünnt und weitere 2-3 h bei 37°C geschüttelt (OD ca. 0,4). Durch Zugabe von 0,5 mM IPTG¹¹ wurde die Expression induziert. Die Kultur wurde weitere 1-2 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen 20 min bei 4000 g und 4°C abzentrifugiert (Rotor JA 14, Beckmann Zentrifuge). Der Überstand wurde dekantiert und 1 g Zellen auf Eis gehalten und sofort verwendet, oder in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Eingefrorene Zellen wurden 10 min auf Eis aufgetaut. Alle Bakterien- und Proteinlösungen wurden im Folgenden immer auf Eis gehalten. Die frischen bzw. aufgetauten Bakterien wurden mit 5 ml Lysispuffer (P25) versetzt und mittels Pipette resuspendiert. Danach erfolgte ein 2-maliger Aufschluss der Zellen mittels hydraulischer Hochdruckpresse (French pressure cell press, SLM Instruments Inc., Urbana, USA). Dabei wird die Bakterienlösung mit sehr hohem Druck (1000 bar) durch eine winzige Öffnung gedrückt, wobei die Zellen platzen. Danach wurden die Zelltrümmer während 20-minütiger Zentrifugation bei 4000 g (Rotor JA 20, Beckmann Zentrifuge) sedimentiert.

2.4.2 Proteinreinigung mittels Affinitäts-Säulenchromatographie unter nativen Bedingungen

Die 5 ml Überstand wurden mit 1ml einer Ni-NTA-Agarose¹⁰ versetzt und während 1 h auf Eis sanft geschüttelt. Die Lösung wurde dann auf eine Plexiglassäule (für 1 ml Ni-NTA Agarose¹⁰, Qiagen, Hilden, D) transferiert; der Durchfluss (Probe D) wurde aufgefangen. Anschließend wurde die Säule 2-mal mit je 4 ml Waschpuffer (P26, Probe W1 und W2) gewaschen, die Lösungen wurden getrennt aufgefangen. Die Elution erfolgte mit 2 ml Elutionspuffer (P27). In der Zwischenzeit wurde ein PD-10 Gelfiltrationssäulchen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D) mit 25 ml RB-Puffer (P28) equilibriert. Die 2 ml Eluat wurden auf das PD-10 Säulchen aufgetragen und mit 3,5 ml RB-Puffer eluiert (Probe E). Die umgepufferte Proteinlösung wurde portioniert, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.4.3 Colorimetrische Bestimmung des Proteingehaltes nach BRADFORD

Die Bestimmung des Proteingehaltes in den Lösungen erfolgte mittels colorimetrischer Bestimmung bei 595 nm im Bradford-Test (BRADFORD, 1976).

Durch die Komplexbildung der Proteine mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue verschiebt sich ihr Absorptionsmaximum von der Wellenlänge 465 zu 595 nm. Die Reaktion dauert 15 min; danach verhält sich die Absorption der Proteine bei 595 nm weitere 15 min proportional zu ihrer Konzentration. 10 µl Probe wurden mit 2 ml der Coomassie Färbelösung¹⁹ (P29) vermischt und 15 min bei RT in Halbmikroküvetten inkubiert. Als Referenz diente RB-Puffer und als Eichstandard wurden die BSA¹⁹ (Albumin Bovine Fraction V, pH7, Standard grade, lyophil.) Konzentrationen 0,25, 0,5, 0,75 und 1 mg ml⁻¹ eingesetzt. Die Eichstandards und die Proben wurden jeweils in 3 Parallelen gemessen. Die umgepufferte Probe wurde für die colorimetrische Bestimmung 1:10 verdünnt. Von den Messwerten wurden Mittelwerte gebildet. Über die BSA-Eichkurve wurde die jeweilige Proteinkonzentration der Lösung berechnet.

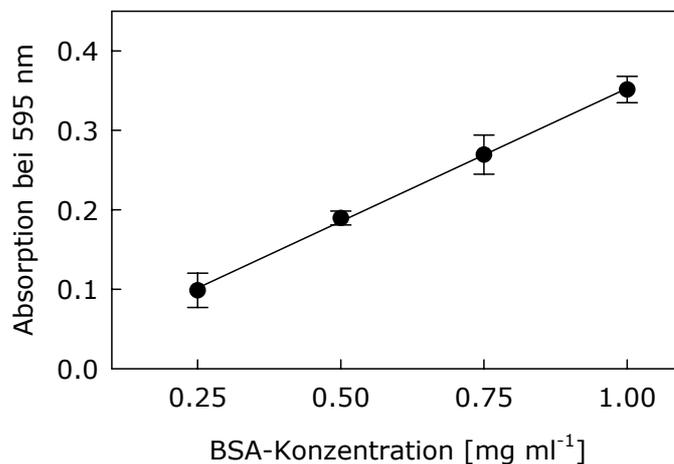


Abb. 2.7 Beispiel einer Protein-Eichkurve. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration im Test wurden als Referenz bekannte BSA-Konzentrationen in den Bradford Test eingesetzt. Mit Hilfe der Geradengleichung aus der linearen Regression (Mittelwerte \pm SD für $n = 3$; $r^2 = 0,999$, $p < 0,001$) wurden die unbekannt Proteinkonzentrationen berechnet.

2.4.4 Denaturierende SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

In der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese werden Proteine der Größe nach aufgetrennt. Mit Hilfe von Größenstandards können die Proteine nach ihrem Molekulargewicht identifiziert werden.

Die Konzentration der Proben für die Elektrophorese wurde im Fall der dxr und der Desoxyxylulose-5-Phosphat-Synthase (dxs) aus *S. leopoliensis* prozentual aus der höchsten Proteinkonzentration (Probe D) berechnet. Für die PcDXR-Proben wurden die Proben D, W1 und W2 ebenfalls prozentual aufgetragen, für die PcDXR (53 µg ml⁻¹) selbst und auch bei der zum Vergleich aufgetragenen dxr aus *S. leopoliensis* (63 µg ml⁻¹) wurden 10 µl Probe eingesetzt. Alle Proben

wurden mit RB-Puffer auf 10 µl aufgefüllt und mit 10 µl 2x Probenpuffer (Tris Glycine SDS Sample Buffer 2x, Novex, Invitrogen) versetzt. Danach erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei 85 °C. Zur Auftrennung der Proteine wurde im Fall von dxr und dxs ein 4-20%iges Tris-Glycin Gradientengel verwendet, zur Auftrennung der PcDXR ein 12%iges Tris-Glycin Gel (beide, 1,0 mm x 10 well, Novex, Invitrogen). Die Proteine wurden vom Minus zum Pluspol mit 120 V Spannung über 90 min in einer Xcell II Mini-Cell (Novex) aufgetrennt. Nachdem der Klebestreifen von der unteren Öffnung zum Gel entfernt wurde, wurde das Gel in die Kammer eingesetzt und der Kamm entfernt. Der denaturierende Elektrophoresepuffer (Tris Glycine SDS Running Buffer 10x, Novex) wurde in die beiden Kammerteile gefüllt, sodass die Geltaschen gut und die untere Öffnung zum Gel gerade knapp bedeckt wurde. Es wurden jeweils 20 µl Probe und 10 µl Größenstandard (Multimark, Multi-Colored Standard, Novex) in die Geltaschen geladen. Nach dem Lauf wurde das Gel aus der Plastikverschalung heraus gebrochen und 20 min bei RT in der Fixierlösung geschwenkt. Danach folgte die Färbung der Proteinbanden in einer kolloidalen Coomassie-Färbelösung¹⁹ (P30) bei RT über Nacht (Duomax 1030, Heidolph). Ungebundene Farbpartikel wurden mit deionisiertem Wasser abgewaschen. Das Gel wurde mit dem Tischscanner eingescannt (HP Scan Jet 4c, Hewlett Packard). Die Strecke y , von den Taschen zur Laufmittelfront, und die Strecke x , von den Geltaschen zu den einzelnen Proteinbanden, wurden mit dem Lineal vermessen und daraus der Rf-Wert berechnet ($Rf = x/y$). Die Molekulargewichte (in kDa) des Größenstandards wurden grafisch gegen den Rf-Wert aufgetragen und mit Hilfe einer polynomischen Kurvenanpassung 4. Ordnung wurde die Größe der PcDXR sowie der unbekanntenen Proteinbanden geschätzt.

2.5 Nachweis der Funktionalität der gereinigten PcDXR

Um die Funktionalität der isolierten PcDXR bestimmen zu können, wurde das indirekte Nachweisverfahren über die photometrische Messung des NADPH Verbrauchs bei der Umsetzung des Desoxyxylulose-5-Phosphats (DOXP) zu Methylerythritol-4-Phosphat (MEP) angewendet (TAKAHASHI *et al.*, 1998; GROLLE, 2000). Bei diesem Verfahren wird zuerst das nicht käufliche Substrat DOXP enzymatisch hergestellt, welches dann von der DXR unter Verbrauch von NADPH umgesetzt wird. Der Verbrauch von NADPH kann als Abnahme der Extinktion bei 340 nm im Photometer gemessen werden. Die dxs und die dxr aus *S. leopoliensis* standen in *E. coli* im Vektor pQE 30 (MILLER, 2001) in Form einer 1:1

Glycerinkultur zur Verfügung. Die Bakterien wurden kultiviert, die dxr und dxs jeweils getrennt exprimiert und über die Ni-NTA-Affinitätschromatographie isoliert (s. 2.4.2).

2.5.1 Herstellung des Substrates Desoxyxylulose-5-Phosphat (DOXP)

Die Herstellung des DOXP erfolgte enzymatisch durch die Reaktion der DXS, die Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) und Pyruvat¹⁴ zu DOXP umsetzt. Da GAP bei RT nicht stabil ist und zerfällt, musste während der Reaktion das GAP kontinuierlich durch die Reaktionen der Fructose-Aldolase¹⁴ und der Triosephosphat-Isomerase¹⁴ aus Fructose-1,6-Bisphosphat¹⁴ synthetisiert werden. Zur Herstellung dieser reaktiven Lösung wurden 50 µl dxs (aus *S. leopoliensis*, 820 µg ml⁻¹) in RB-Puffer (P28) mit 500 µl 660 mM Pyruvat¹⁴ in RB, 500 µl 330 mM Fructose-1,6-Bisphosphat in RB, 50 µl Fructose-Aldolase¹⁴ (0,09 U µl⁻¹), 25 µl Triosephosphat-Isomerase¹⁴ (10 U µl⁻¹) und 3875 µl RB mit 50 mM β-ME¹⁹ gemischt und 20 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Um das gebildete DOXP aufzureinigen wurde eine BaCl₂-Fällung (GROLLE, 2000) durchgeführt. Neun Aliquots des oben genannten Ansatzes wurden mit 1 Aliquot einer 1 M BaCl₂⁹-Lösung vermischt. Es bildete sich ein weißer Niederschlag der durch 5-minütiges Zentrifugieren (6000 g, 4°C, Rotor JA 20, Beckmann Zentrifuge) sedimentiert wurde. Im Sediment waren wasserunlösliche Bariumsalze, die mit Fructose-1,6-Bisphosphat, Dihydroxyacetonphosphat und Triosepyrophosphat gebildet wurden, enthalten. Das Sediment wurde 3-mal mit H₂O *bideest* gewaschen (resuspendiert und erneut zentrifugiert) und die Überstände wurden mit dem ersten Überstand vereinigt. Drei Volumen von eisgekühltem, reinem Ethanol⁹ wurden zum Überstand gemischt und 30 min bei -80°C inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 6000 g und 4°C.

Wasserlösliche, aber alkoholunlösliche Bariumverbindungen, wie zum Beispiel DOXP, wurden bei diesem Vorgang gefällt. Pyruvat verblieb als wasser- und alkohollösliches Salz im Überstand. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 70%igem Ethanol⁹ gewaschen. Durch 4-faches Waschen des Sediments mit H₂O *bideest* konnte es fast vollständig wieder in Lösung gebracht werden. Die Lösung wurde in einer Glasschale über Nacht gefriergetrocknet (Gefriertrocknung Alpha I-5, Christ, Osterode, D). Das weiße Pulver wurde gewogen und bei -20 °C gelagert. Um ungefähr die Konzentration von DOXP ermitteln zu können, wurde angenommen, dass die weiße Substanz zu gleichen Teilen aus DOXP und GAP bestand. Das Molekulargewicht für das DOXP-Barium-

Salz beträgt $573,3 \text{ g mol}^{-1}$. Für den Funktionstest wurde eine ca. 50 mM Lösung in H_2O *bideest* hergestellt. Die Lösung musste 5 min im Ultraschallbad (Sonorex RK 100, Bandelin, Berlin, D) inkubiert und unlösliche Reste 1 min bei 20000 g (Sigma 3K15, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode, D) abzentrifugiert werden.

2.5.2 Photometrische Bestimmung der NADPH-Umsetzung durch die DXR

Die Durchführung des Funktionstests erfolgte in 0,5 ml Quarzküvetten mittels Perkin-Elmer Lambda 2 UV/VIS Spectrometer (Beaconsfield, GBR) mit beheizbarem Küvettenschlitten bei 340 nm und 30°C über 25 min. Im Ansatz wurden 335 μl RB-Puffer (mit 5 mM $\beta\text{-ME}^{19}$) mit 5 μl 100 mM MnCl_2^{17} , 25 μl 3 mM NADPH²⁰ und 50 μl gereinigter PcDXR ($53 \mu\text{g ml}^{-1}$) in RB-Puffer vermischt. Durch Zugabe von 30 μl 50 mM DOXP wurde die Reaktion gestartet und während 25 min in 1-min-Auflösung aufgezeichnet. Als Positivkontrolle wurde ein Ansatz mit gereinigter dxr ($6,3 \mu\text{g ml}^{-1}$, ursprünglich aus *S. leopoliensis*) durchgeführt. Um zu überprüfen, ob es sich tatsächlich um eine Reaktion der DXR handelte, wurde die Reaktion spezifisch durch Zugabe von Fosmidomycin¹⁸ (Endkonzentration 1 mM) gehemmt. Als weitere Kontrollen dienten Ansätze einerseits ohne bzw. mit sehr geringer Enzymmenge (Probe 0) und andererseits ohne Substrat. Die Kontrolle ohne Substrat wurde in 5-minütiger Auflösung aufgezeichnet. Alle Experimente wurden in 3 Wiederholungen durchgeführt und statistisch ausgewertet. Dazu wurde mit Hilfe des Software Programms SPSS für Windows 8.0.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) eine einfaktorielle ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur durchgeführt.

2.6 Bestimmung von DMADP-Gehalt und ISPS- bzw. Monoterpensynthase-(Mono-TPS-) Aktivität in Blättern

2.6.1 Bestimmung des DMADP-Gehaltes in Blättern

2.6.1.1 Hydrolyse von DMADP

Die Bestimmung des DMADP-Gehaltes erfolgte nach BRÜGGEMANN (2002). Durch niedrige pH-Werte und hohe Temperaturen wird das Reaktionsgleichgewicht in der Endreaktion der Isoprensynthese im DOXP-Stoffwechselweg verschoben. Unter diesen Bedingungen wird bevorzugt die Phosphatgruppe abgespalten und die Bildung von Isopren gefördert. Isopren geht wegen seines niedrigen Siedepunktes

sofort in die Gasphase über und kann mittels Gaschromatograph gemessen werden. Die bei -80°C gelagerten Proben wurden in flüssigem Stickstoff gemörstert und gefriergetrocknet (Gefriertrocknung Alpha I-5, Christ, Osterode, D). Etwa 10 mg des lyophilisierten Materials wurden in 2 ml Reaktionsgefäße aus Glas (Supelco, Bellefonte, PA, USA) eingewogen und nach Zugabe von 200 μl 8,5%iger ortho-Phosphorsäure⁹ mit einem Teflon beschichteten Aluminiumdeckel mit Gummiseptum (Supelco, Bellefonte, PA, USA) gasdicht verschlossen. Die Gläschen wurden vorsichtig auf einem Reagenzglasschüttler (Reax 2000, Heidolph) geschüttelt und im Wasserbad (6A, U3, Julabo) 90 min bei 70°C inkubiert und 3 min auf Eis abgekühlt. Zum Stoppen der Reaktion durch Neutralisierung wurden 100 μl 9,2 N NaOH¹⁷ zugefügt. Das gebildete Isopren wurde gaschromatographisch analysiert.

2.6.1.2 Gaschromatographische Analyse von Isopren

Die Quantifizierung des gebildeten Isoprens erfolgte mit dem Gaschromatographen (GC) Varian Star 3400 (Varian, Darmstadt, D) über einen Flammenionisationsdetektor (FID). Der GC war mit einem Multi-Purpose-Sampler (MPS, Gerstel, Mülheim/ Ruhr, D) und einem temperaturprogrammierten Kaltaufgabesystem KAS 3 (Gerstel, Mülheim/Ruhr, D) ausgestattet. Die Trennung erfolgte in 2 aufeinander folgenden Säulen. Jeweils 500 μl der Gasphase wurden aus den Gläschen vom „Multi-Purpose-Autosampler“ (MPS) zur Analyse aufgetragen. Das Gerät wurde mit folgenden Parametereinstellungen genützt:

Säule 1:	25 m $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{KCl}$ Durchmesser 0,53 mm Filmdicke 10 μm (beide Chrompack, Frankfurt, D)	Säule 2:	25 m CP-SIL 13 CB Durchmesser 0,53 mm Filmdicke 2 μm
----------	---	----------	---

FID-Temperatur: 250°C

FID-Gase: Make-up Gas N_2 (5,0) und H_2 (5,0): Flüsse 30 ml min^{-1}
Synthetische Luft: Fluss 300 ml min^{-1}

Temperaturprogramm für das KAS:

Aufgabetemperatur:	-100°C
Heizrate:	$10^{\circ}\text{C min}^{-1}$
Endtemperatur:	240°C

Temperaturprogramm für den GC:

Starttemperatur:	140°C
Haltezeit 1:	0,5 min
Heizrate:	$6^{\circ}\text{C min}^{-1}$
Endtemperatur:	200°C
Haltezeit 2:	2 min

Durch Co-Chromatographie mit einem Isopren Standard²¹ (10 ppm Isopren in N₂ (5,0)) und Vergleich der Retentionszeiten, konnte das Isopren identifiziert werden. Die injizierte Isoprenmenge wurde nach folgenden Gleichungen quantifiziert:

$$n_{\text{Std}} = \frac{V_{\text{inj}}}{V_{\text{inj}} + V_{\text{vial}}} \cdot \frac{c_{\text{Std}} \cdot V_{\text{vial}}}{V_{\text{mol}}} \quad (\text{Gl. 2}) \quad \text{und} \quad n_{\text{inj}} = n_{\text{Std}} \cdot \frac{FE_{\text{inj}}}{FE_{\text{Std}}} \quad (\text{Gl. 3})$$

n_{Std}	injizierte Isoprenmenge des Isoprenstandards [nmol]
V_{inj}	injizierte Probenvolumen [ml]
V_{vial}	Volumen eines GC Reaktionsgefäßes [ml]
c_{Std}	Konzentration des Isoprenstandards [ppmv]
V_{mol}	Molvolumen eines idealen Gases unter Standardbedingungen [l mol ⁻¹]
n_{inj}	injizierte Isoprenmenge der Probe [nmol]
FE_{inj}	Flächeneinheiten des Isoprenpeaks der analysierten Probe [μV·s]
FE_{Std}	Flächeneinheiten des Isoprenpeaks des analysierten Standards [μV·s]

Die Auswertung der Tagesgangproben erfolgte nach obenstehender Gleichung 3 unter Einbeziehung der Wiederfindungsraten (s. 2.6.1.3) für die jeweilige Baumart.

2.6.1.3 Berechnung der DMADP-Wiederfindungsrate

Um von der im Test gebildeten Isoprenmenge auf den ursprünglichen DMADP-Gehalt in den Blättern schließen zu können und eine Unterschätzung der Ergebnisse aufgrund unvollständiger Hydrolyse sowie Überschätzung durch eine chemische Reaktion minimieren zu können, mussten die Daten mit Hilfe der Wiederfindungsrate korrigiert werden. Um die Wiederfindungsrate zu ermitteln, wurde eine Eichreihe bekannter DMADP-Konzentrationen (je 190 μl 8,95%ige o-Phosphorsäure⁹ wurden mit je 10 μl 0, 25, 50, 100, 250 und 500 μM DMADP-Stammlösung versetzt) einmal mit ca. 10 mg lyophilisiertem Blattmaterial und einmal ohne Blattmaterial im Test (s. 2.6.1) hydrolysiert. Um den DMADP-Gehalt des Blattpulvers zu berücksichtigen, erfolgte eine Normierung der Null-Proben (Konzentration des eingesetzten DMADP ist null) auf 10 mg Blattmaterial (Gl. 4). Anschließend wurden die Flächen der Proben mit Blattmaterial mit Hilfe der Gleichung Gl. 5 korrigiert.

$$FE_{0, norm} = \frac{FE_0 \cdot 10}{EW_0} \quad (\text{Gl. 4}) \quad FE_{korr} = FE_{Probe} - \frac{F\bar{E}_{0, norm} \cdot EW}{10} + F\bar{E}_{0, norm} \quad (\text{Gl. 5})$$

$FE_{0, norm}$	Flächeneinheit der Null-Probe, normiert auf 10 mg Blattpulver [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]
FE_0	Flächeneinheit der Null-Probe [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]
10	Normgewicht 10 [mg] des Blattpulvers
EW_0	Einwaage der Null-Probe [mg]
FE_{korr}	Flächeneinheit der Probe, normiert auf 10 mg Blattpulver, korrigiert durch Einbeziehung von $F\bar{E}_{0, norm}$ [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]
FE_{Probe}	injizierte Isoprenmenge der Probe [nmol]
$F\bar{E}_{0, norm}$	Mittelwert der Null-Proben Flächeneinheiten ($n = 6$) [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]
EW	Einwaage der Probe [mg]

Die Berechnung der im Test gebildeten Isoprenmenge erfolgte durch die Gleichung:

$$n_{iso} = \frac{C_{Std} \cdot V_{Vial} \cdot FE_{korr}}{V_{mol} \cdot FE_{Std}} \quad (\text{Gl. 6})$$

n_{iso}	die gebildete Isoprenmenge [nmol]
C_{Std}	Konzentration des Isoprenstandards [ppmv]
V_{vial}	Volumen eines GC Reaktionsgefäßes [ml]
FE_{korr}	Flächeneinheit der Probe, normiert und korrigiert [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]
V_{mol}	Molvolumen eines idealen Gases unter Standardbedingungen [l mol^{-1}]
FE_{Std}	Flächeneinheit des analysierten Isoprenstandards [$\mu\text{V} \cdot \text{s}$]

Die Flächeneinheiten der Proben ohne Blattmaterial wurden unkorrigiert eingesetzt. Die Beeinträchtigung der Hydrolyse durch das Blattpulver wurde aus der Differenz der beiden Regressionsgeraden ermittelt (Abb. 2.8). Dabei ergab sich für die Hydrolyse mit Pappelblattpulver eine Rate von 75% im Vergleich zur Reaktion ohne Blattpulver und für die Hydrolyse mit Steineicheblattpulver eine Rate von 67,4%. Die Steigung der linearen Regression aus der Hydrolyse mit Blattpulver entspricht der gesamten Wiederfindungsrate. Bei der Graupappel wurden im Test 8,3% des DMADPs zu Isopren umgesetzt, für die Wiederfindungsrate bei der Steineiche wurde ein Wert von 12,2% ermittelt. Die Proben der Tagesgangexperimente wurden wie oben beschrieben ausgewertet und anschließend mit Hilfe der Wiederfindungsrate auf 100% DMADP-Gehalt in den Blättern hochgerechnet.

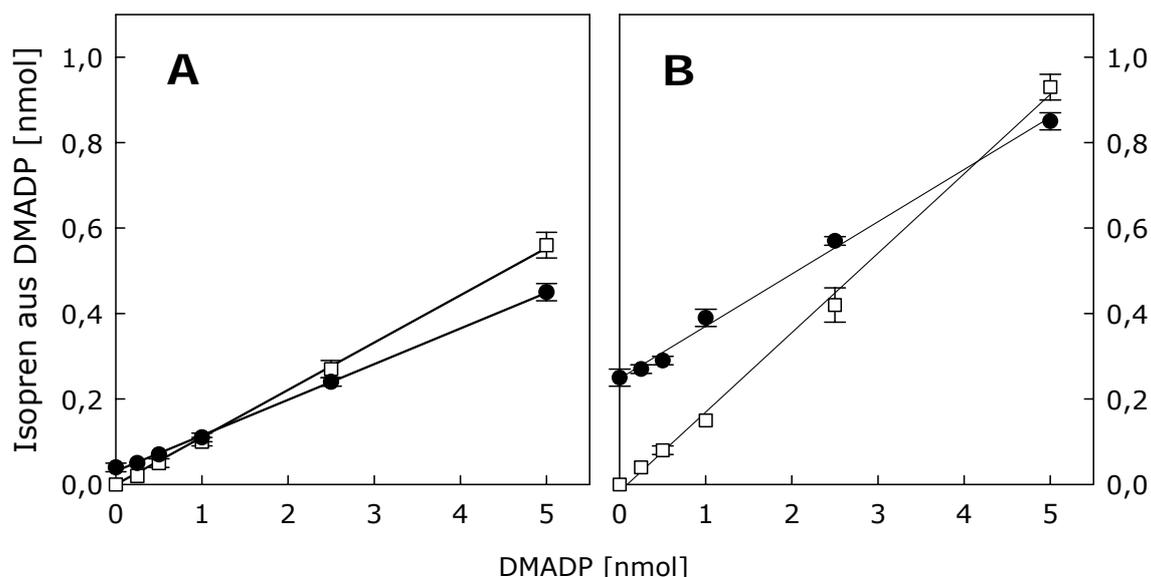


Abb. 2.8 Eichkurven zur Ermittlung der Wiederfindungsrate des Isoprens aus dem im Blatt enthaltenen DMADP. Eine Eichreihe bekannter DMADP-Konzentrationen (0, 0,25, 0,5, 1, 2,5 und 5 nmol) wurde, einmal mit lyophilisiertem Blattmaterial (●) und einmal ohne Blattmaterial (□), im Test (s. 2.6.1) hydrolysiert. A zeigt die beiden Kalibriergeraden für Pappelblätter, in B sind die Kalibriergeraden für die Steineiche dargestellt. Die Hydrolyseeffizienz wird durch die Anwesenheit von Blattpulver im Testansatz beeinträchtigt. Bei der Graupappel läuft die Umsetzung des DMADPs zu Isopren bei den Proben mit Blattpulver zu 75% ab, bei der Steineiche zu 67,4%. Die Steigung der linearen Regression aus der Hydrolyse mit Blattpulver entspricht der gesamten Wiederfindungsrate. Bei der Graupappel wurden im Test 8,3% ($r^2 = 0,999$, $p < 0,001$, $n = 6$) des DMADPs zu Isopren umgesetzt, für die Wiederfindungsrate bei der Steineiche wurde ein Wert von 12,2% ($r^2 = 0,996$, $p = 0,004$, $n = 6$) ermittelt.

2.6.2 Bestimmung der ISPS-Aktivität in Pappelblättern

2.6.2.1 Herstellung von Pappelblattextrakten

Die Herstellung der Blattextrakte bei der Graupappel erfolgte nach BRÜGGEMANN (2002). Um Enzyme im Blatt messen zu können, mussten die Zellen aufgeschlossen und die Proteine von den Zellwänden und groben Zellkompartimenten getrennt werden. Dafür wurde 250 mg Polyvinylpyrrolidon²⁰ (PVPP) in einem Zentrifugenröhrchen eingewogen und in 5 ml PEB für Graupappel (P4) und 50 μ l 2 M DTT⁹ 30 min auf Eis zum Vorquellen inkubiert. Ein frisches Pappelblatt wurde in flüssigem N₂ schockgefroren und unter flüssigem N₂ gemörsert. 250 mg des Blattpulvers wurden zur obengenannten Lösung gegeben und 15 min auf Eis gerührt. Danach erfolgte eine Zentrifugation 20 min bei 20000 g und 4°C (Kühlzentrifuge J2-21, Beckmann, München, D). Um das im Enzymtest störende Detergenz zu entfernen, musste der Extrakt in einen geeigneten Reaktionspuffer umgepuffert werden. Dazu wurden PD-10 Gelfiltrationssäulchen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D) mit je 25 ml ISB-

(Isoprensynthasepuffer, P5) Puffer equilibriert. Je 2,5 ml des hellgrünen Überstandes wurden auf das PD-10 Säulchen aufgetragen und mit 3,5 ml ISB-Puffer eluiert.

2.6.2.2 Der Enzymtest und die Berechnung der ISPS-Aktivität

Für den Isoprensynthase-Test nach LEHNING *et al.* (1999) wurden 88 µl des Enzymextraktes mit 2 µl MgCl₂¹⁷ und 10 µl 100 mM DMADP (im Labor des IFU synthetisiert nach KELLER und THOMPSON, 1993) in ISB in gasdicht verschlossenen 2 ml Glasreaktionsgefäßen mit Gummisepten (Supelco, Bellefonte, PA, USA) mittels Reagenzglasschüttler (Reax 2000, Heidolph) geschüttelt und im Wasserbad (6A, U3, Julabo) 60 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Abziehen der Lösung und Spülen mit 100 µl H₂O *bidest* mittels gasdichter Spritze (Hamilton, Bonaduz, CH) gestoppt. Der Nachweis des gebildeten Isoprens erfolgte im Gaschromatographen wie in 2.6.1.2 beschrieben. Die ISPS-Aktivität wurde nach folgender Formel, bezogen auf die Gesamtblattfläche (Ober- und Unterseite des Blattes), berechnet. Die Variable Gbf_{test} wurde aus den Tagesgangproben für die Blätter jeder Baumart aus dem Verhältnis Frischgewicht [g] zu Blattfläche [m²] ermittelt:

$$ISA_{Gbf} = \frac{n_{iso} \cdot V_{Elu} \cdot V_{Extr}}{Gbf_{test} \cdot t_{test} \cdot V_{Test} \cdot V_{PD10}} \quad (\text{Gl. 7})$$

ISA_{Gbf}	ISPS-Aktivität bezogen auf die Gesamtblattfläche [nmol m ⁻² s ⁻¹]
n _{iso}	die gebildete Isoprenmenge [nmol]
V _{Elu}	Volumen, mit dem die PD-10 Säule eluiert wurde [ml]
V _{Extr}	Volumen, in das das Blattpulver eingewogen wurde [ml]
Gbf _{test}	der Einwaage entsprechende Gesamtblattfläche [m ²]
t _{test}	Dauer des Enzymtests [s]
V _{test}	Volumen, das in den Enzymtest eingesetzt wurde [ml]
V _{PD10}	Volumen, das auf die PD-10 Säule aufgetragen wurde [ml]

2.6.3 Bestimmung der Mono-TPS-Aktivität in *Q. ilex* Blättern

2.6.3.1 Herstellung von Blattextrakten der Steineiche

Die Herstellung der Steineichenblattextrakte erfolgte nach FISCHBACH (2001). Die in flüssigem N₂ schockgefrorenen Steineichenblätter wurden in flüssigem N₂ mit Mörser und Pistil homogenisiert. 250 mg des Blattpulvers wurden in 6 ml Extraktionspuffer (P6) 20 min auf Eis gerührt. Nach 20-minütiger Zentrifugation (10000 g, 4°C) wurden 2,5 ml des klaren Überstandes über ein PD-10 Säulchen in

3 ml KP_i -Puffer (P7) umgepuffert (s. 2.6.2.1).

2.6.3.2 Der Enzymtest

Der Enzymtest wurde in braunen 2 ml Reaktionsgefäßen (Supelco, Bellefonte, PA, USA) nach den Angaben in FISCHBACH (2001) durchgeführt. Pro Ansatz wurden je 50 μ l Proteinextrakt, 43 μ l KP_i -Puffer (P7), 2 μ l $MgCl_2^{17}$ und 5 μ l 5mM GDP^{20} in KP_i -Puffer in den gasdicht verschlossenen Gefäßen kräftig mit Hilfe des Reagenzglasschüttlers (Reax 2000, Heidolph) geschüttelt und 1 h bei 40°C im Wasserbad (6A, U3, Julabo) inkubiert. Durch Abziehen der Flüssigphase mit einer gasdichten Spritze (Hamilton, Bonaduz, CH) und Spülen des Gläschens mit 150 μ l KP_i -Puffer wurde die Reaktion gestoppt. Die während der Reaktion gebildeten Monoterpene wurden gaschromatographisch analysiert.

2.6.3.3 Gaschromatographische Analyse

Für die gaschromatographische Bestimmung der Monoterpene wurde ein Gaschromatograph CP-9000 (Chrompack, Frankfurt, D) verwendet, der mit einem Multi-Purpose-Sampler (Gerstel, Mülheim/ Ruhr, D) und einem temperaturprogrammierten Kaltaufgabesystem KAS 3 (Gerstel) ausgestattet war. Jeweils 1 ml der Gasphase wurde aus den Gläsern zur Analyse aufgetragen. Das Gerät wurde mit folgenden Parametereinstellungen betrieben:

FID-Temperatur: 275°C

Trärgas: Helium (5,0): Fluss 1,5 ml min⁻¹

FID-Gase: Make-up Gas Helium (5,0) und Wasserstoff (5,0): Flüsse 30 ml min⁻¹
Synthetische Luft: Fluss 250 ml min⁻¹
Split: 30 ml min⁻¹
Splitloszeit 1,0 min

Temperaturprogramm für das KAS:

Starttemperatur:	27°C
Heizrate 1 und 2:	12°C s ⁻¹
Plateautemperatur 1 und 2:	240°C
Haltezeit 1:	10 min
Haltezeit 2:	5 min

Temperaturprogramm für den GC:

Starttemperatur:	35°C
Haltezeit:	0,5 min
Heizrate 1:	30°C min ⁻¹
Plateautemperatur 1:	78°C
Haltezeit 1:	4 min
Heizrate 2:	9°C min ⁻¹
Plateautemperatur 2:	160°C
Heizrate 3:	35°C min ⁻¹
Plateautemperatur 3:	250°C
Haltezeit 3:	3,4 min

2.6.3.4 Quantifizierung der Monoterpene und Berechnung der Enzymaktivität

Über Cochromatographie mit Standardsubstanzen⁹ und Vergleich der jeweiligen Retentionszeiten erfolgte die Identifizierung der gebildeten Monoterpene. Zur Quantifizierung von α -Pinen, Camphen, Sabinen, β -Pinen, Myrcen und Limonen wurden 10^{-4} M Monoterpen Stammlösungen in Pentan⁹ hergestellt und davon jeweils 1 (n = 10) und 2 μ l (n = 5) in ein Reaktionsgefäß pipettiert und gasdicht verschlossen. Eine ausführliche 5-Punkt-Eichung der Substanzen erfolgt in der Arbeit von FISCHBACH (2001). Zur Kontrolle wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine 2-Punkt-Eichung durchgeführt. Anschließend erfolgte eine gaschromatographische Analyse der Proben (s. 2.6.3.3).

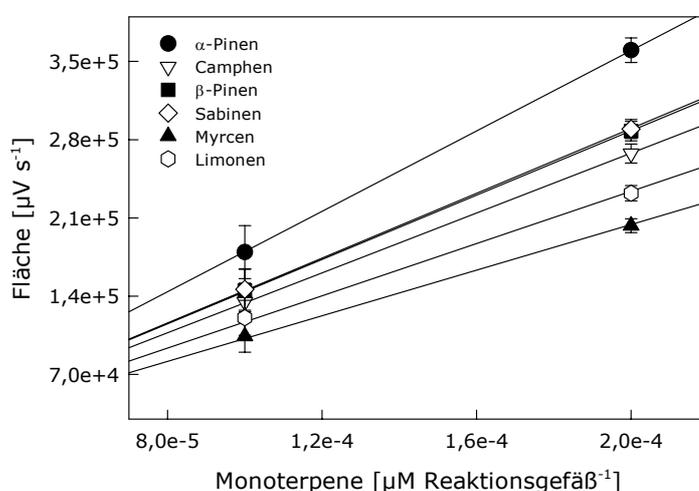


Abb. 2.9 Zwei-Punkt-Eichung zur Quantifizierung der Monoterpene (α -Pinen, Camphen, Sabinen, β -Pinen, Myrcen und Limonen; 10^{-4} M) mittels GC. Die Gasphase von jeweils 1 (n = 10) und 2 μ l (n = 5) wurden gaschromatographisch analysiert. Die Flächeneinheiten wurden gemittelt (\pm SD) und gegen die $1 \cdot 10^{-4}$ und die $2 \cdot 10^{-4}$ M Monoterpenkonzentrationen aufgetragen. Die Geraden verlaufen durch den 0-Punkt.

Die Berechnung der spezifischen Enzymaktivitäten bezogen auf die Proteinmenge bzw. die Enzymaktivitäten pro Blattfläche erfolgte nach den folgenden Formeln:

$$\text{MonoA}_{\text{spez}} = \frac{FE_{\text{MT}}}{KF_{\text{std}} \cdot IZ \cdot PV \cdot PC} \quad (\text{Gl. 8})$$

- MonoA_{spez}** Spezifische Mono-TPS-Aktivität [μ kat] auf die Proteinmenge bezogen
- FE_{MT}** Flächeneinheit aus der Gaschromatographie [μ V s⁻¹]
- KF_{std}** Steigung der Eichgeraden bezogen auf die Monoterpenmenge [pmol] pro Probengefäß
- IZ** Inkubationszeit [s]
- PV** Volumen des eingesetzten Proteinextraktes [ml]
- PC** Proteinkonzentration im Extrakt [mg ml^{-1}]

$$\text{MonoA}_{\text{Gbf}} = \frac{FE_{\text{MT}} \cdot \text{Vol} \cdot 3,5}{KF_{\text{Std}} \cdot \text{IZ} \cdot \text{Gbf} \cdot \text{PV} \cdot E \cdot 2,5} \quad (\text{Gl. 9})$$

MonoA_{Gbf}	Mono-TPS-Aktivität bezogen auf die Gesamtblattfläche [pmol m ⁻² s ⁻¹]
Vol	Volumen des Enzymextraktes nach Zentrifugation [ml]
3,5	Endvolumen des Enzymextraktes nach dem Umpuffern [ml]
Gbf	Gesamtblattfläche der eingesetzten Blattmischprobe [m ⁻² g FG ⁻¹]
E	Gewicht der homogenisierten Blattmischprobe [g]
2,5	Volumensanteil des Enzymextraktes, das zum Umpuffern eingesetzt wurde [ml]

2.7 Messung des photosynthetischen Gaswechsels und der Isoprenoidemission

Aufbau der Gaswechselanlage, Küvettenmessung und Messtechnik sind in BRÜGGEMANN (2002) ausführlich beschrieben. Wenn nicht anders angeführt, wurde die Anlage unter gleichen Bedingungen betrieben. Bei Anpassungen an Graupappel bzw. Steineiche und in Fällen anderweitiger Nutzung, wie im Falle der externen Isoprenbegasung oder Messung von Monoterpenemissionen, folgt eine genaue Beschreibung des Versuchsaufbaus. Als wichtigste Kenngrößen des photosynthetischen Gaswechsels wurden die CO₂-Aufnahme (Assimilation) und die CO₂-Abgabe (Respiration) sowie die H₂O-Abgabe (Transpiration) des Blattes gemessen. Mit Hilfe dieser Daten konnten der Wasserdampfleitwert der Spaltöffnungen im Blatt (Stomatäre Leitfähigkeit, gH₂O) und die CO₂-Konzentration im Blattinneren (C_i) berechnet werden. Bei der Graupappel wurde die Isoprenemission gemessen während bei der Steineiche neben den geringen Isoprenemissionen vor allem die Emission der Monoterpene aufgezeichnet wurde.

2.7.1 Die Messanlage

Die Messungen des photosynthetischen Gaswechsels sowie der Isoprenoidemissionsraten wurden in Pflanzenanzuchtkammern, im Folgenden Solardome (Abb. 2.10) genannt, auf dem Berg Wank (1780 m ü.N.N.) durchgeführt. Die Versuchspflanzen wurden im Solardom 2 gehalten, während die Küvettenmessungen im Solardom 1 durchgeführt wurden. Die Heizung in den Kammern verhinderte ein Abfallen der nächtlichen Temperaturen unter 5°C, während die ständige Belüftung der Solardome untertags vor Überhitzung durch starke Sonneneinstrahlung schützte. Für die Gaswechsel- und Isoprenoidmessungen wurde Reinluft definierter Feuchte benötigt. Dazu wurde Außenluft von einem

Kompressor (SF-1, Atlas Copco, Wilrijk, B, 2001 und 2002; 2003: KCTM 401-100, mit integriertem Kältetrockner und Aktivkohlefilter, Kaeser Kompressoren GmbH, Coburg, D) angesaugt, in einem Kältetrockner (FD-7, Atlas Copco, Wilrijk, B, 2001 und 2002) getrocknet und über eine Aktivkohlepatrone (Edelstahl, IFU-Eigenbau) gereinigt. Über eine 35 m lange, unterirdisch verlaufende ½"-PTFE-Leitung (IFK, Isofluor, Neuss, D) wurde die Luft zum regulierbaren Befeuchter (Edelstahlpatrone, IFU-Eigenbau) und von dort aus über ¼"-PTFE-Leitungen über 5 Abzweigungen weitergeleitet. Eine Blindleitung diente als Ablass überschüssiger Luft und wurde aus der Hütte ins Freie geleitet.



Abb. 2.10 Solardom mit geöffneter Tür (A). Die Solardome (Durchmesser 3,5 m, Höhe 2,8 m) sind fest mit dem Untergrund verankert. Das Grundgerüst besteht aus Aluminiumverstreben. Die äußere Hülle besteht aus UV-B durchlässigem Polymethyl-methacrylat (Plexiglas GS 2458, 4 mm, Röhm, Darmstadt, D) und einer ebenfalls UV-B durchlässigen PTFE-Folie (25 µm, Nowoflon ET6235, Nowofol, Siegsdorf, D) und dazwischenliegendem klimatisiertem Raum. Die Lüfter zur Klimatisierung des Innenraums und dieser Hülle befinden sich, wie die Rohdatenerfassungseinheiten, im Sockel der Solardome unter einer Bodenplatte aus rostfreiem Stahl. In einem Leitungsschacht, in der Mitte des Sockels, verlaufen die Mess- und Versorgungsleitungen von den Sensoren bzw. Küvetten zur Messhütte. (B) Messgeräte zum Erfassen von Global- und UV-Strahlung sowie der PPFd, die in den Solardomen auf Höhe der Pflanzen (ca. 120 cm) positioniert sind.

Zur parallelen Messung von CO₂- und H₂O-Aufnahme bzw. Abgabe der Blätter 2er Bäume dienten 2 Infrarotabsorptionsdifferenz-Analysatoren (Differenz-BINOS 4b, Fisher-Rosemount, Hanau, D). Jeweils 800 ml min⁻¹ der Reinluft wurden mittels Pumpe über Durchflussregler als Referenzgas (VG) für die Küvetteneingangsluft in den Vergleichsgaskanal von 2 Differenz-BINOS geleitet. Bei Schaltung der Dreiwegeventile (Typ 330, 24 V DC, Bürkert, Ingelfingen, D) wurde auch der Messgaskanal mit Reinluft gespült, um einen Nullpunkt-Abgleich der Messanlage durchzuführen. Diese Schaltung erfolgte alle 2 h 20 min. Die Luft aus dem Vergleichsgas-Ausgang des BINOS 1 wurde zur Bestimmung der Luftfeuchte durch einen Taupunktspiegel (TS-2, Walz, Effeltrich, D) geleitet. Der Taupunkt der Zuluft

wurde für die Messungen der Steineiche zwischen 0 und -5°C gehalten während er bei den Messungen an Graupappeln unter -5°C gehalten werden musste, um ein Beschlagen der Küvettendeckel aufgrund der hohen Transpirationsraten der Graupappel zu verhindern. Zur Bestimmung des absoluten CO_2 -Gehaltes der Zuluft wurde die Luft aus dem Vergleichsgas-Ausgang von BINOS 2 durch ein Absolut-BINOS geleitet. Durch die 4. und 5. Verzweigung wurde die Luft über zwei 12 m lange, wärmeisolierte, unterirdische $\frac{1}{4}$ "-PTFE-Leitungen in die beiden Küvetten im Solardom 2 und über 2 weitere Leitungen wieder zurück gepumpt. Die Einstellung der Flüsse erfolgte mittels Gasflussregler (Mfc, Mass flow controller, 5000 sccm, MKS, München, D) auf ca. 3 l min^{-1} bei den Graupappeln, ebenfalls um ein Beschlagen der Küvettendeckel zu verhindern und auf ca. 2 l min^{-1} bei den Steineichen. Im normalen Messverlauf wurde der Messgaskanal der beiden Differenz-BINOS mit 800 ml min^{-1} der über Ventile geschalteten Abluft (MG) aus den beiden Küvetten gespült. Bei den Messungen an Graupappeln wurde die Küvettenabluft (ebenfalls 800 ml min^{-1}) über 2 Ventile alternierend alle Viertelstunden auf einen Isoprendetektor (Fast Isoprene Sensor, FIS, Hills Scientific, Boulder, CO, USA) geleitet. Zur Adsorption der Monoterpene wurde die Küvettenabluft statt zum FIS über Adsorberröhrchen, die mit speziellem Absorptionsmaterial (s. 2.7.7) gefüllt wurden, geleitet. Bei den Isoprenbegasungsversuchen musste in die Zuluftleitung N_2 als Referenz bzw. ein Isopren/ N_2 -Gemisch²¹ zugeleitet werden (s. 2.9.1). Überall wo es notwendig war, wurden Blindleitungen zur Ableitung überschüssiger Luft gelegt. Alle Verknüpfungen zwischen den PTFE-Leitungen, Abzweigungen und Verbindungen zu Geräten bestanden aus Edelstahl (Swagelok, B.E.S.T., Neufahrn, D).

2.7.2 Klimadatenaufzeichnung

Während der Sommermonate wurden versuchsbegleitend durchgehend Lufttemperatur, Luftfeuchte und CO_2 -Gehalt der Luft in den Kammern, Globalstrahlung (280-1000 nm, Pyranometer CM11, Kipp & Zonen, Hamburg, D) in mW m^{-2} , UVB-Strahlung (250-400 nm, 501 UV-Biometer, Solar Light, Philadelphia, PA, USA) in MED h^{-1} sowie die Photosynthetische Photonendichte (PPFD, s. Abb. 2.10 B) in und außerhalb der Kammern erfasst und als $\frac{1}{2}$ -h-Mittelwerte aufgezeichnet. Die PPFD wurde, wie auch in den Küvetten, mit Hilfe von Quantensensoren (LI-190 SA, Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA) erfasst. Die Freilandsensoren befanden sich auf dem Dach der Messhütte. Fünf kombinierte Sensoren (HMP 143, Vaisala, Helsinki, FIN) detektierten Lufttemperatur- und

Feuchte. Die Bestimmung der CO₂-Konzentration der Luft in den Kammern wurde mit einem Absolut-BINOS (BINOS 1001, Fisher Rosemount, Hanau, D) durchgeführt. Etwa 800 ml Luft wurden pro Minute über eine unterirdische ¼"-PTFE-Leitung mittels Pumpe vom Solardom in die Messhütte gesaugt und durch das Absolut-BINOS geleitet. Datenerfassung, Visualisierung und Auswertung wurde wie in Kapitel 2.8 beschrieben durchgeführt.

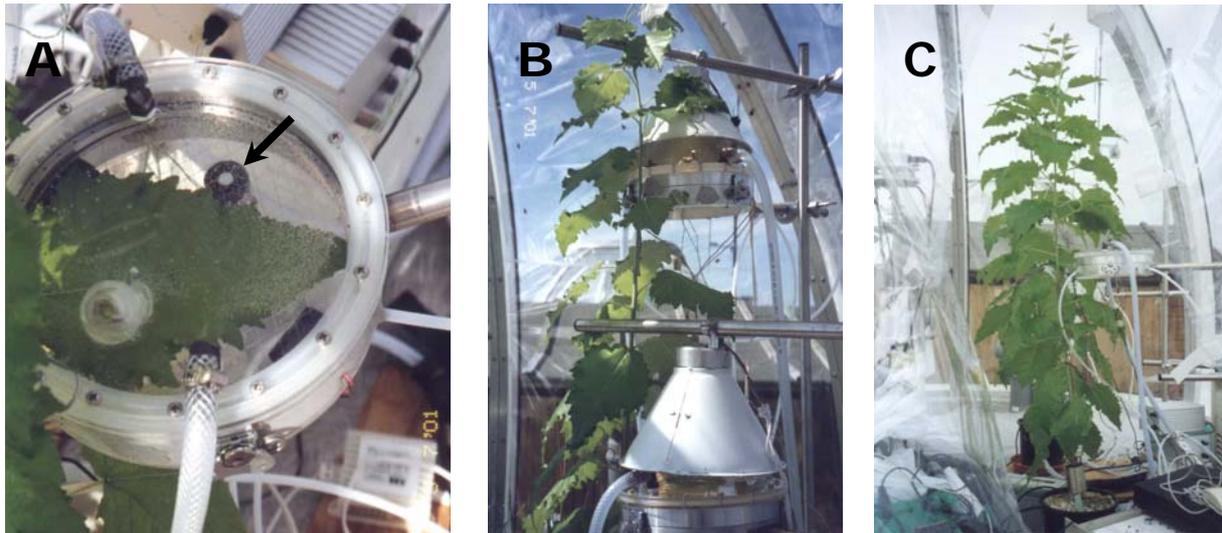


Abb. 2.11 Küvette mit eingespanntem Pappelblatt (A), der Pfeil bezeichnet den Quantensensor zur Messung der PPFd in der Küvette. (B) Die beiden Küvetten mit aufgesetztem Lichtaufsatz. Zwei Versuchspflanzen (*P. x canescens*) der Messkampagne im Juli 2001 mit eingespannten Blättern (C).

2.7.3 Das Küvettensystem

Für alle Gaswechselfmessungen wurden 2 Blattküvetten (IFU-Eigenkonstruktion, Innenraum 5 x 18 cm, 1,27 l) aus einer Plexiglas/ Aluminiumkonstruktion (s. Abb. 2.10 A) zur parallelen Messung von 2 Bäumen eingesetzt. Die Küvetten wurden auf einer Halterung in Höhe des ausgewählten Blattes montiert. Die Küvetten bestehen aus 2 Teilen. Der Boden besteht aus einer einfachen Plexiglasschicht und Aluminiumrand und beinhaltet die Zuluftleitung, Einlassöffnung für die Thermolemente und 2 Ventilatoren (12 V DC, Micronel Ltd., Tagelswangen, CH). Eine Aussparung für den Blattstiel dient auch dazu, die Leitung für den Quantensensor in die Küvette zu legen. Der Quantensensor wurde am Plexiglasboden neben dem eingespannten Blatt positioniert (Abb. 2.11 A, Pfeil). In den Rand wurde ein Ring mit parallel gespannten Nylonfäden eingelegt. Darauf wurde das Pappelblatt oder 3-4 sich nicht überdeckende Steineichenblätter gelegt und von einem weiteren bespannten Ring, um 90° gedreht, bedeckt. Beide Bespannungen ergaben ein Netz mit ca. 1 cm Maschenweite. Die Fäden waren so

dünn, dass sie keine Beeinflussung durch Abdecken bewirken konnten. Vorher mussten noch die Thermoelemente zum Messen der Blatttemperatur (NiCr-Ni-Thermoelemente, GNTP, Greisinger Electronic, Regenstauf, D) so positioniert werden, dass sie gleichmäßig über die Blattfläche verteilt, gerade die Blattunterseite mit den blanken Enden berührten. Danach wurde der Deckel mit doppelter Plexiglasschicht aufgesetzt. Die Zuluftleitung musste in den Deckelteil verlegt werden, um auch für die zum Teil beinahe flächendeckenden Pappelblätter eine optimale Durchmischung der Küvettenluft gewährleisten zu können. Zur Thermoregulierung der Küvette wurde der doppelte Deckel mit Hilfe eines Wasserbades (Julabo F25-E, Julabo) entweder mit kaltem oder mit warmem Wasser gespült. Die Abdichtung der Küvette war durch einen eingebauten Silikonring, PTFE-Dichtband (Ludwig Meister, München, D) und durch einen festen Flügelschraubverschluss gewährleistet und wurde durch zusätzliches Verschließen aller undichten Stellen, wie die Öffnungen für die Luftleitungen und Thermoelemente und die Öffnung für den Blattstiel bzw. die Quantensensorleitung, mit einer Dichtmasse (Terostat IX, Teroson, Heidelberg, D) unterstützt. Für die Tagesgang Experimente (2.7.9) existierte im Deckel der Küvette 1 eine Öffnung zum Einsetzen des Chlorophyllfluoreszenzensors (Abb. 2.1 A). Diese musste für andere Experimente mit Hilfe von Styropor abgedichtet werden. Um die Lichtabhängigkeit (2.7.10) der Emission bzw. des Gaswechsels bestimmen oder Messungen unter Standardbedingungen ($1000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; 30°C) durchführen zu können musste die PPFD regulierbar sein. Dazu wurde ein Lichtaufsatz (IFU-Eigenkonstruktion) bestehend aus einer Niedervolt-Halogenlampe (OSRAM TITAN, 12 V, 65 W, 60° Öffnungswinkel, OSRAM, München, D) und einem Blechtrichter (20 cm Durchmesser an der weitesten Stelle, Höhe 12 cm) konstruiert. Diese Lampe wurde so auf die Küvette aufgesetzt, dass der Trichter gerade die Wasserbadzuleitung im Deckel berührte, um eine mittlere PPFD von ca. $1000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ zu erreichen.

2.7.4 Messung und Kalibration von Netto-Assimilation, Respiration und Transpiration

Die Messung des CO_2 -Austauschs und der Transpiration erfolgte über die Messung der Infrarotabsorptionsdifferenz zwischen Küvetteneingangs- und Ausgangsluft mit Hilfe eines Differenz-BINOS. Die Zu- und Abluft wird im BINOS in 2 getrennten Kanälen photometrisch gemessen und verglichen. Die H_2O - und CO_2 -Kanäle für das Vergleichsgas (VG) waren hintereinander, parallel zu den Kanälen

für das Messgas (MG), geschaltet. Die Daten wurden als 1-min Mittelwerte aufgezeichnet. Die Kalibrierung der H₂O- und CO₂-Kanäle wurde jeweils im Frühjahr vor den Messungen auf folgende Art und Weise durchgeführt.

CO₂-Kanal: zur Kalibrierung wurden 5 verschiedene CO₂-VG-Konzentrationen (200, 250, 300, 350 und 400 ppmv CO₂) und zu jedem Konzentrationsniveau wiederum 4-5 Konzentrationsstufen des MG etwa 20 bis 90 ppmv unter der jeweiligen VG-Konzentration eingestellt. Die verschiedenen CO₂-Konzentrationen wurden durch Mischen von N₂ (5,0²¹) mit einem CO₂-Prüfgas²¹ der Konzentration 2543 (\pm 2%) über eine Schaltung, bestehend aus 2 Mischkugeln, 4 Gasflussreglern und ¼"-PTFE-Leitungen erzeugt. Das CO₂-Gemisch des VG wurde direkt in die Messanlage anstelle von befeuchteter Reinluft eingeleitet, während die MG-Mischungen über den Anschluss der Küvettenabluft in die Messanlage geleitet wurde. Mit Hilfe 2er kalibrierter und abgeglicherer Absolut-BINOS Geräte wurde die genaue CO₂-Konzentration abgelesen. Zur Berechnung der CO₂-Konzentrationen aus den Spannungssignalen wurden die Differenzen der verschiedenen VG-Niveaus und der MG-Konzentrationen gegen die Spannungsdifferenzen am Signalausgang der Differenz-BINOS Geräte aufgetragen (s. Tab. 2.2). Die Steigung der Geraden (Abb. 2.12 A) wurden dann gegen die CO₂-Konzentrationen der VG-Stufen aufgetragen (Abb. 2.12 B). Die Gleichung aus der linearen Regression dieser Daten wurde zur Umrechnung der Spannungssignale eingesetzt.

Tab. 2.2 Differenz (Δ ppmv CO₂) der Vergleichsgas- (VG) und Messgas- (MG) Konzentrationen und Änderung der Spannungssignale (ΔV) aus der Kalibrierung der CO₂-Kanäle, am Beispiel der Kalibrierung des Differenz-BINOS 1, 2001.

VG	Δ ppmv· ΔV 1 ⁻¹		Δ ppmv· ΔV 2 ⁻¹		Δ ppmv· ΔV 3 ⁻¹		Δ ppmv ΔV 4 ⁻¹		Δ ppmv· ΔV 5 ⁻¹		Δ ppmv· ΔV 0 ⁻¹	
199	69,5	-1,16	46,2	-0,76	30,3	-0,48	12,8	-0,20	-	-	0,00	0,00
246	91,3	-1,43	64,1	-1,01	36,3	-0,56	18,1	-0,28	8,14	-0,13	0,00	0,00
301	89,3	-1,31	62,8	-0,93	43,8	-0,65	18,1	-0,29	7,8	-0,12	0,00	0,00
362	100,6	-1,41	65,9	-0,91	46,0	-0,64	28,6	-0,36	13,7	-0,20	0,00	0,00
411	109,4	-1,49	79,7	-1,12	49,2	-0,69	22,5	-0,30	10,8	-0,14	0,00	0,00

Zur Kalibrierung der H₂O-Kanäle wurden analog zur Kalibration der CO₂-Kanäle 4 verschiedene VG-Niveaus (ca. -3, 0, 3 und 6°C Taupunkt) und dazu 5 verschiedene MG-Konzentrationen um eine etwa 3 – 15°C höhere Temperatur als beim VG erzeugt, da durch die Transpiration der Blätter der Wasserdampfgehalt in der Luft zunimmt.

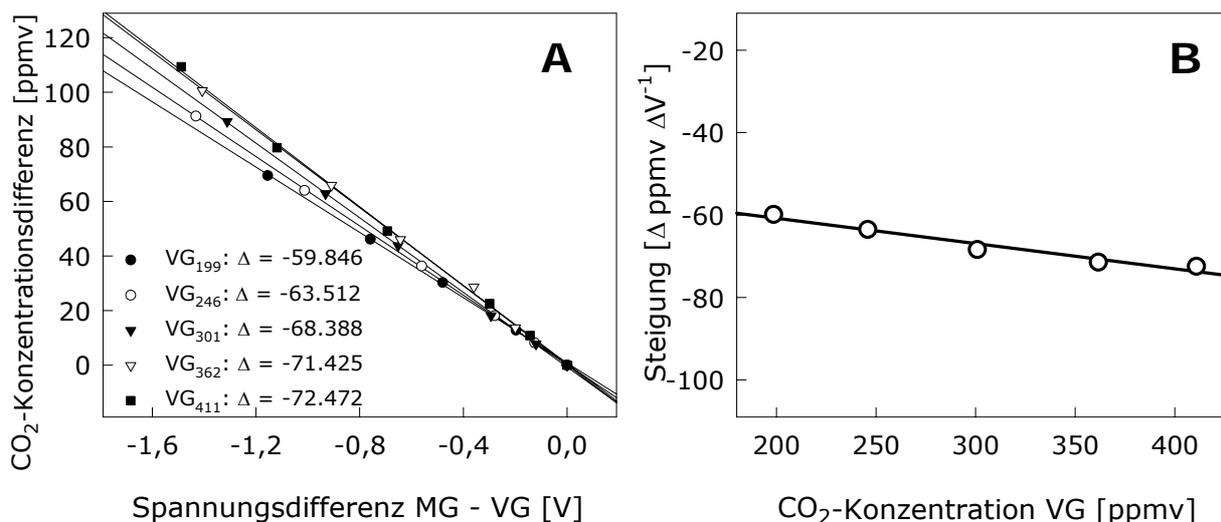


Abb. 2.12 Beispiel für die Kalibrierung der CO₂-Kanäle von Differenz-BINOS 1, 2001. Fünf verschiedene CO₂-Konzentrationsstufen vom VG wurden mit jeweils 5 Konzentrationsdifferenzen zum MG kalibriert (A). Die Steigungen der linearen Regressionen (alle Geraden, $r^2 = 0,999$, $p < 0,001$) in A wurden gegen die CO₂-Grundlevel aufgetragen (B). Die daraus resultierende Geradengleichung ($r^2 = 0,958$, $p = 0,024$) diente zur Umrechnung der Spannungssignale.

Die Messgas- und Vergleichsgastemperaturen wurden über je 2 hintereinander geschaltete Messgaskühler (MGK-4/G, Walz, Effeltrich, D) eingestellt. Die Messung der absoluten Luftfeuchte wurde mit 2 kalibrierten und abgeglichenen Taupunktspiegeln (TS-MK1 und TS-MK2, Walz, Effeltrich, D) durchgeführt. Die Zuleitung der Luft in die Messgeräte und Umrechnung der Spannungssignale erfolgte wie bei der oben beschriebenen Auswertung für die CO₂-Kanäle.

Tab. 2.3 Differenz (Δ ppmv H₂O) der Vergleichsgas- (VG) und Messgas- (MG) Konzentrationen und Änderung der Spannungssignale (ΔV) aus der Kalibrierung der H₂O-Kanäle, am Beispiel der Kalibrierung des Differenz-BINOS 2, 2002.

VG	Δ ppmv· ΔV 1 ⁻¹		Δ ppmv· ΔV 2 ⁻¹		Δ ppmv· ΔV 3 ⁻¹		Δ ppmv· ΔV 4 ⁻¹		Δ ppmv· ΔV 5 ⁻¹		Δ ppmv· ΔV 0 ⁻¹	
6751	1004	0,11	3347	0,35	4502	0,47	8306	0,89	9253	0,93	0,00	0,00
7243	1061	0,11	2494	0,27	4669	0,50	5738	0,59	9103	0,93	0,00	0,00
9166	1544	0,14	3316	0,33	7113	0,67	10643	1,0	17237	1,57	0,00	0,00
11204	1450	0,13	4397	0,38	7521	0,65	13607	1,11	17009	1,35	0,00	0,00

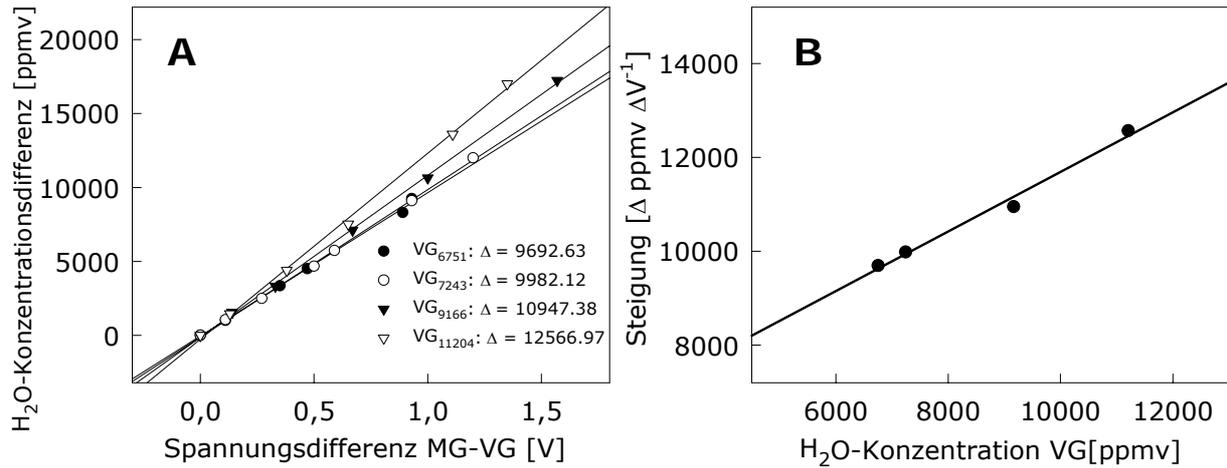


Abb. 2.13 Beispiel für die Kalibrierung der H₂O-Kanäle von Differenz-BINOS 2, 2002. Vier verschiedene H₂O-Konzentrationsstufen vom VG wurden mit jeweils 5 Konzentrationsdifferenzen zum MG kalibriert (A). Die Steigungen der linearen Regressionen (alle Geraden, $r^2 = 0,999$, $p < 0,001$) in A wurden gegen die H₂O-Grundlevel aufgetragen (B). Die daraus resultierende Geradengleichung ($r^2 = 0,987$, $p = 0,013$) diente zur Umrechnung der Spannungssignale.

Die Berechnung der Gaswechselgrößen (Netto-Assimilation, Transpiration, Stomatäre Leitfähigkeit und Blatt interne CO₂-Konzentration, Gl. 10 bis 13) erfolgte basierend auf den Gleichungen von CAEMERER und FARQUHAR (1981) nach BALL (1987). Die mittels Differenz-BINOS gemessenen Konzentrations-differenzen von CO₂ und H₂O zwischen Küvetteneingangs- und Küvettenabluft dienten als Grundlage zur Berechnung der Stomatären Leitfähigkeit und der blattinternen CO₂-Konzentration und wurden in folgenden Gleichungen von ihrem molaren Anteil im Küvettenfluss in die endgültigen Einheiten, bezogen auf die Gesamtblattfläche, umgerechnet.

$$E = \frac{u_e \cdot (w_a - w_e)}{G_{bf} \cdot (1 - w_a)} \quad (\text{Gl. 10}) \quad \text{und} \quad A = \frac{u_e \cdot (c_a - c_e)}{G_{bf}} \quad (\text{Gl. 11})$$

E	Transpiration [mmol m ⁻² s ⁻¹]
u_e	Massenfluss in die Küvette [μmol s ⁻¹]
w_a	Molfraktion H ₂ O am Küvettenausgang (dimensionslos)
w_e	Molfraktion H ₂ O am Küvetteneingang (dimensionslos)
G_{bf}	Gesamtblattfläche (Ober- und Unterseite der Blätter) [m ²]
A	Netto- CO ₂ -Assimilation [μmol m ⁻² s ⁻¹]
c_a	Molfraktion CO ₂ am Küvettenausgang (dimensionslos)
c_e	Molfraktion CO ₂ am Küvetteneingang (dimensionslos)

2.7.5 Stomatäre Leitfähigkeit und Blatt interne CO₂-Konzentration

Die Stomatäre Leitfähigkeit und die Blatt interne CO₂-Konzentration wurden mit Hilfe der in 2.7.4 ermittelten molaren Netto-Assimilations (A)- und Transpirationsdaten (E) nach folgenden Gleichungen berechnet:

$$g_{H_2O} = \frac{E \cdot (1-w_m)}{(w_{bl}-w_e)} \quad (\text{Gl. 12}) \quad \text{und} \quad c_i = \frac{(g_{CO_2} - E/2) \cdot c_a - A}{g_{CO_2} + E/2} \quad (\text{Gl. 13})$$

g_{H₂O}	Stomatäre Leitfähigkeit für H ₂ O [mmol m ⁻² s ⁻¹]
E	Transpiration [mmol m ⁻² s ⁻¹]
w_m	mittlere Molfraktion H ₂ O: $w_m = (w_{bl} + w_e) / 2$
w_{bl}	Molfraktion H ₂ O im Blattinneren (dimensionslos)
w_e	Molfraktion H ₂ O am Küvetteneingang (dimensionslos)
c_i	interzelluläre CO ₂ -Konzentration [ppmv]
g_{CO₂}	Stomatärer Leitwert für CO ₂ [mmol m ⁻² s ⁻¹]: $g_{CO_2} = g_{H_2O} / 1,6$
c_a	Molfraktion CO ₂ am Küvettenausgang (dimensionslos)
A	Netto-CO ₂ -Assimilation [μmol m ⁻² s ⁻¹]

2.7.6 Messung der Isoprenkonzentration

Die Messung der Isoprenemission der Pappelblätter erfolgte gleichzeitig mit der Messung des photosynthetischen Gaswechsels mit Hilfe eines schnellen (Fast) Isopren Sensors (FIS, FIS-97, Hills Scientific, Boulder, CO, USA). Isopren reagiert mit Ozon zu Formaldehyd und einigen anderen Produkten. Das angeregte Formaldehydmolekül gibt seine Energie in Form eines Photons bei einer Wellenlänge von 450-550 nm ab. Im FIS können einzelne Photonen (1 Photon pro Molekül Isopren) mittels Photomultiplier (Photomultiplier-Detektor-Einheit, HC-135, Hamamatsu, Middlesex, NJ, USA) nachgewiesen werden. Der Sensor ist sehr spezifisch für Isopren, Störungen durch Monoterpene, Nicht-Alkene, Stickstoffmonoxid oder Wasserdampf treten kaum auf, allerdings besteht eine Sensitivität für andere primäre Alkene, besonders Propen. Die Nachweisgrenze für Isopren liegt bei etwa 400 pptv (HILLS *et al.*, 1990). Das in dieser Arbeit verwendete Messsystem bestand aus einem externen Ozongenerator (Corona Discharge P-2000, Hills Scientific, Boulder CO, USA), und dem FIS sowie den verbindenden PTFE-Leitungen. 800 ml min⁻¹ Sauerstoff²¹ (3,5) wurden über einen Gasflussregler (FC-260 Serie, 2 slpm, Tylan General Corp., Rancho Dominguez, CA, USA) im FIS zum Ozongenerator geleitet. Dieser erzeugte durch elektrische Entladung ein Ozon/Sauerstoff (4/96, v/v)-Gemisch, das zurück zum FIS geleitet wurde und dort mit 800 ml min⁻¹ Küvettenabluft reagierte. Der Gesamtfluss von 1,6 l min⁻¹ wurde durch einen weiteren Gasflussregler (FC-280 Serie, 5 slpm,

Tylan General Corp., Rancho Dominguez, CA, USA) im FIS reguliert. Die Anzahl der registrierten Photonen wurde vom Detektor des eingebauten Photomultipliers pro s [counts s⁻¹] ausgegeben. Für die Messung der Isoprenemission wurde die Abluft der Küvetten alle Viertelstunden abwechselnd über 2 Ventile (s. 2.7.1) zur Analyse im FIS geschaltet. Die Aufzeichnung und Visualisierung der Daten erfolgte in 1-min-Mittelwerten. Der Messwert zu Beginn jeder Viertelstunde wurde verworfen, da es sich dabei um einen Mischwert der beiden Küvetten handelte.

Die Kalibrierung des FIS erfolgte über einen 3. Gasflussregler (FC-260 Serie, 20 scmpm, Tylan General Corp., Rancho Dominguez, CA, USA) im Gerät, indem verschiedene Konzentrationen eines bekannten Isoprengemisches²¹ (11,6 ppmv 2001 und 7,9 ppmv 2002 und 2003, in N₂ (5,0)) mit Reinluft anstelle von Küvettenluft in definierten Konzentrationsstufen gemischt wurden. Die Isoprenkonzentration in der Reaktionszelle des FIS [ppmv] ergab sich aus der Division des Isoprenstandardflusses [ml min⁻¹] durch den Gesamtfluss in der Reaktionszelle [ml min⁻¹] multipliziert mit der Konzentration des Isoprenstandards [ppmv]. Die Steigung und der Achsenabschnitt (entspricht dem Hintergrundsignal von ca. 400-500 counts s⁻¹) der linearen Regression aus der Eichgerade (s. Abb. 2.14) wurde für die Berechnung der Isoprenemissionsraten eingesetzt.

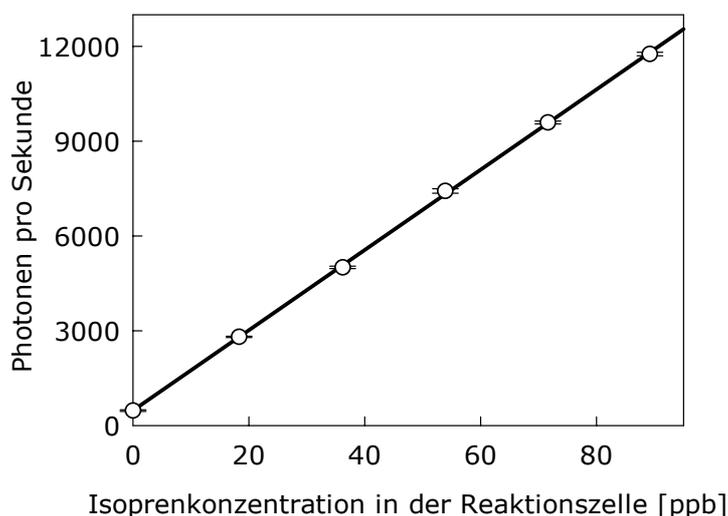


Abb. 2.14 Beispiel einer FIS-Kalibration 2001. Über einen Gasflussregler wurden Reinluft und Isoprenstandard in definierten Konzentrationsstufen (ca. 0, 10, 20, 40, 60 und 80 ppbv Isopren) gemischt. Jede Konzentrationsstufe wurde 6-19 min gemessen. Die gemittelten 1-min-Mittelwerte der Photonenzahl pro s (\pm SD) wurden gegen die Isoprenkonzentrationen [ppbv] in der Reaktionszelle aufgetragen. Der lineare Zusammenhang der beiden Größen war höchst signifikant ($r^2 = 0,999$ mit $p < 0,001$).

Dazu wurde zuerst die Isoprenkonzentration in der Küvettenabluft aus der Isoprenkonzentration in der FIS-Reaktionszelle berechnet und schließlich erfolgte die Umrechnung der Werte auf die Emissionsraten:

$$C_{\text{küv}} = \frac{F_{\text{ges}}}{F_{\text{ges}} - F_{\text{O}_2}} \cdot \frac{\text{counts} - b}{m} \quad (\text{Gl. 14}) \quad \text{und} \quad I = \frac{F_{\text{küv}} \cdot C_{\text{küv}}}{V_{\text{mol}} \cdot G_{\text{bf}} \cdot 60} \quad (\text{Gl. 15})$$

$C_{\text{küv}}$	Isoprenkonzentration in der Küvette [ppb]
F_{ges}	Gesamtfluss durch die FIS-Reaktionszelle [l min^{-1}]
F_{O_2}	Sauerstofffluss [l min^{-1}]
counts	Anzahl der pro s detektierten Photonen
b	Achsenabschnitt der linearen Regression der Eichgeraden [s^{-1}]
m	Steigung der linearen Regression der Eichgeraden [$\text{s}^{-1} \text{ppbv}^{-1}$]
I	Isoprenemissionsrate [$\text{nmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]
$F_{\text{küv}}$	Küvettenfluss [l min^{-1}]
V_{mol}	Molvolumen eines idealen Gases unter Standardbedingungen
G_{bf}	Gesamtblattfläche (Ober- und Unterseite) der untersuchten Blätter [m^{-2}]
60	Umrechnung von min auf s

2.7.7 Messung der Monoterpenemission

Die Messung der Monoterpene bei der Steineiche konnte wegen der Unempfindlichkeit des FIS gegenüber Monoterpenen nicht mit diesem Gerät durchgeführt werden. Zur Bestimmung der Monoterpene aus der Küvettenabluft wurden Adsorberröhrchen aus Glas (Perkin Elmer, Beaconsfield, GBR) verwendet, die mit spezieller adsorbierender Aktivkohle (90 mg Carbotrap C, 60 mg Carbotrap und 60 mg Carbopack X, Supelco, Bellefonte, USA), getrennt und abgeschlossen durch Glaswolle, gefüllt waren. Nachdem die Röhrchen mit dem adsorbierenden Material gefüllt worden waren, mussten sie vor jeder Probennahme konditioniert, d. h. 30-minütiges Erhitzen auf $350 \text{ }^\circ\text{C}$ unter 60 ml min^{-1} Durchfluss von Helium, und anschließend mit Hilfe eines Gasflussreglers für 1 min mit 20 ml min^{-1} Δ -2-Caren²¹ als internem Flächenstandard beladen werden. Die Röhrchen wurden in Richtung Carbotrap C zu Carbopack X beladen, mit Teflondichtungen (Swagelock, Best, München, D) gasdicht verschlossen und vor und nach der Beladung gekühlt und dunkel aufbewahrt. Die Küvettenluft wurde mittels Pumpe und Gasflussregler (Mfc, 500 sccm, MKS, München, D) mit ca. 150 ml min^{-1} durch die Röhrchen geleitet. Um den idealen Fluss zur optimalen Beladung zu bestimmen, wurden in Vorversuchen jeweils 2 Röhrchen hintereinander geschaltet. Bei einem höheren Durchfluss als 200 ml min^{-1} waren die Monoterpene nach 15-minütiger Inkubation

auch auf dem 2. Röhrchen nachzuweisen und eine korrekte Berechnung der Emissionsraten war nicht möglich. Die Schaltung (Abb. 2.15) zur Messung der Monoterpene erfolgte wie bei den Isoprenmessungen im 15-minütigen Wechsel über die Ventile 3 und 4. Dazu wurde die Leitung zum FIS geschlossen und die Ablassleitungen der Ventile zur Leitung, in die die Röhrchen für die Dauer der Probenahme eingesetzt wurden, verbunden. Von der Pumpe wurde die Küvettenabluft, über den Gasflussregler reguliert, durch das Röhrchen gezogen. Während der Tagesgang-Messkampagnen wurden pro Küvette und Tag jeweils zwischen 10 und 12 Röhrchen beprobt.

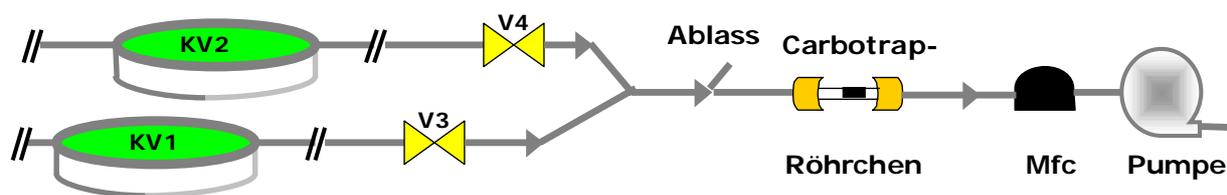


Abb. 2.15 Schaltung für die Monoterpenmessungen mit Carbotrap gefüllten Röhrchen. Die Abluft der Küvetten (KV1 und KV2) wurde durch abwechselndes, 15-minütiges Schalten der Ventile (V3, V4) mit Hilfe einer Pumpe durch die Röhrchen gezogen. Der Durchfluss von ca. 150 ml min^{-1} wurde über einen, vor die Pumpe geschalteten, Gasflussregler (Mfc, Mass flow controller, 500 sccm, MKS, München, D) reguliert.

Die über 15 min gezogenen Proben wurden wenige Tage nach den Kampagnen mittels Gaschromatographen (GC) mit Flammenionisationsdetektor (FID) und Massenspektrometer (MS, ATD 400, Autosystem XL GC, Turbo Mass MS Spectrometer, Perkin Elmer, Weiterstadt, D) nach SCHNITZLER *et al.* (2004b) gemessen. Dabei wurden Isopren und die Monoterpene α - und β - Pinen, Sabinen, Limonen, Myrcen, Camphen und Δ -3- sowie Δ -2-Caren (interner Standard) aufgetrennt. Ethylbenzol und p-Cymol wurden ebenso erfasst, wurden aber aufgrund der niedrigen Konzentrationen bei der Auswertung der Versuche nicht berücksichtigt. Nach Desorption der gebundenen Substanzen bei 280°C wurden diese mittels ATD 400 injiziert. Fünf min nach der Injektion erreichten alle leichten Verbindungen ($<C_6$) die Säule C2 ($\text{Al}_2\text{O}_3/\text{KCl}$, Beschichtung $10 \mu\text{m}$, Innendurchmesser $0,53 \text{ mm}$, Länge 30 m). Ein Ventil, das die Säule C1 (RTX-1701, Beschichtung $1 \mu\text{m}$, Innendurchmesser $0,25 \text{ mm}$, Länge 30 m) mit dem MS verbindet wurde geschaltet, um alle schweren Verbindungen ($>C_5$) zur Analyse im MS zu schleusen. Moleküle mit kleinerer Masse, wie das Isopren, wurden in der Säule C2 aufgetrennt und über den FID analysiert. Die Trennung erfolgte unter folgenden Parametereinstellungen:

Starttemperatur:	15°C
Heizrate 1:	10°C min ⁻¹
Haltezeit 1:	3,5 min
Heizrate 2:	5°C min ⁻¹
Plateautemperatur:	200°C
Haltezeit 2:	5 min

Die Kalibrierung erfolgte mittels Gasstandards für Isopren und Δ -2-Caren²¹ über Diffusionstechnik (STEINBRECHER UND RABONG, 1994) unter Einsatz selbst präparierten Eichstandards. Die aus den Signalintensitäten [mV s⁻¹] berechneten, in Nanogramm pro Röhrchen ausgegebenen Werte wurden nach folgender Gleichung in die physiologische, blattflächenbezogene Einheit umgerechnet:

$$C_{k\u00fcv} = \frac{C_R}{V_R \cdot MG_{mono}} \quad (\text{Gl. 16}) \quad \text{und} \quad I_{mono} = \frac{V_{k\u00fcv} \cdot C_{k\u00fcv}}{Gbf \cdot 60} \quad (\text{Gl. 17})$$

$C_{k\u00fcv}$	Monoterpenkonzentration in der K\u00fcvette [nmol l ⁻¹]
C_R	Monoterpenkonzentration pro R\u00f6hrchen [ng l ⁻¹]
V_R	Volumenanteil [l] der K\u00fcvettenabluft aus der die Probe stammt Gasfluss durch das R\u00f6hrchen [l min ⁻¹] multipliziert mit der Dauer der Beprobung [min]
MG_{mono}	Molekulargewicht der Monoterpene [136,24 mol l ⁻¹]
I_{mono}	Monoterpenemissionsrate [nmol m ⁻² s ⁻¹]
$V_{k\u00fcv}$	Gesamtvolumen [l] der K\u00fcvettenabluft \u00fcber die Dauer der Beprobung = Gasfluss durch die K\u00fcvette [l min ⁻¹] multipliziert mit der Dauer der Beprobung [min]
Gbf	Gesamtblattfl\u00e4che der untersuchten Bl\u00e4tter, Ober- und Unterseite m ⁻²]
60	Umrechnung von min auf s

2.7.8 Messung und Kalibrierung der versuchsbegleitenden Parameter

2.7.8.1 Thermosensoren der K\u00fcvette

Je 3 Thermoelemente (NiCr-Ni, GNTP, Greisinger Electronic GmbH, Regenstauf, D) wurden pro K\u00fcvette zur Ermittlung der Blattemperatur eingesetzt. Die Thermoelemente wurden in ein beheizbares Wasserbad (Julabo F25-E, Julabo) getaucht. Mittels Thermometer wurden unterschiedliche Temperaturstufen (ca. 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 und 50°C) eingestellt. Die Spannungssignale [V] wurden \u00fcber mehrere min als 1-min-Mittelwerte aufgezeichnet. Die Kalibrierfunktion wurde \u00fcber die lineare Regression der gegen die Spannungssignale aufgetragenen Temperaturen ermittelt.

2.7.8.2 Quantensensoren der Küvette

Die in den Blattküvetten eingesetzten Quantensensoren (Li-190 SA Quantum Sensor, Li-Cor, Lincoln, NE, USA) zum Messen der PPF_D [$\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$] in unmittelbarer Umgebung des eingespannten Blattes wurden in jedem Frühjahr mit Hilfe eines werkskalibrierten Sensors und Handauslesegerät (Li-Cor Li-189, Li-Cor, Lincoln, NE, USA) abgeglichen. Die Spannungssignale [V] des Verstärkergerätes (MV-10/1 in NG-3, 5s, 0...1 V = 0...3000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Walz, Effeltrich, D) wurden über mehrere min bei unterschiedlichen Beleuchtungsstärken (ca. 0, 100, 250, 500, 750, 1000 und 1500 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$), erzeugt mittels Lichtaufsatz und unterschiedlich dicken Lagen eines grünen Kunststoffnetzes⁴, als 1-min-Mittelwerte aufgezeichnet. Die Kalibrierfunktion ergab sich aus der linearen Regression der gegen die Spannungssignale aufgetragenen Quantenstromdichten.

2.7.8.3 Absolut-BINOS

Die Messung des CO₂-Gehaltes [ppmv] der Küvetteneingangsluft erfolgte mittels Absolut-BINOS (BINOS 1001, Fisher-Rosemount, Hanau, D). Der Nullgas- und Prüfgasabgleich erfolgte alle 2 Wochen über eine geräteinterne Funktion und wurde mit Hilfe von Stickstoff²¹ (5,0) und einem CO₂-Referenzgas²¹ (2543 ppmv \pm 2% CO₂ in N₂ (5,0)) durchgeführt.

2.7.9 Versuchsaufbau und Ablauf der Messungen von Tagesgängen

In den Sommermonaten 2001 bis 2003 wurde pro Pflanzenart je 4-mal pro Sommer in 2 aufeinander folgenden Tagen der Tagesverlauf des photosynthetischen Gaswechsels und der Isoprenoidemission ermittelt. Die Pflanzen wurden mindestens 10 Tage vor Beginn der Messungen in den Solardomen akklimatisiert. Zwei repräsentative Pflanzen wurden parallel in die Küvetten eingespannt und durchgehend während der 2 aufeinanderfolgenden Tage in der oben beschriebenen Gaswechsellanlage gemessen. Gleichzeitig wurden pro Tag 5 Probenahmezeitpunkte ausgewählt, die nach Licht- und Temperaturverhältnissen charakteristische Zustände der Pflanzenphysiologie reflektierten. Bei jeder Probennahme wurden von 4 Bäumen einige repräsentative Blätter in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert. Danach wurden die Bäume komplett geerntet und das Frischgewicht sowie die Blattfläche bestimmt. Die eingefrorenen Blätter dienten zur späteren Bestimmung der Dimethylallyldiphosphat-Gehalte (DMADP) sowie der ISPS- und

(Monoterpensynthese-) Mono-TPS-Aktivitäten in den Blättern. Die 1. Probennahme erfolgte kurz vor der Dämmerung (ca. 4 Uhr, MEZ), die 2. Probennahme wurde am Vormittag (ca. 10 Uhr, MEZ) vorgenommen, mittags (ca. 13 Uhr, MEZ) wurde die 3. Probe genommen. Die 4. Probennahme erfolgte am Spätnachmittag (17 Uhr, MEZ), die letzte um ca. 22 Uhr (MEZ). Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Arbeitsgruppen der Universität Freiburg (Professur für Baumphysiologie, Institut für Forstbotanik und Baumphysiologie) und der Universität Tübingen (Lehrstuhl für Physiologische Ökologie der Pflanzen, Botanisches Institut) durchgeführt. Zur Messung der Chlorophyllfluoreszenz (Uni Tübingen) wurde in die vorgefertigte Öffnung in den Deckel einer Küvette ein entsprechender Sensor (s. Abb. 2.1) eingesetzt. Zur Xylemsaftflussmessung (Uni Freiburg) wurden, ca. 1 Woche vor Beginn der Messungen, die untersten 4 Blätter der Bäume entfernt. Die Xylemsaftfluss Sensoren wurden gleichzeitig mit dem Einspannen der Bäume in die Gaswechsellküvetten am Stamm angebracht. Beide Sensorsysteme führten nicht zu einer Beeinträchtigung der Messungen. Alle Messungen wurden bei ambienten Licht- und Temperaturverhältnissen durchgeführt. Ein Absinken der Temperatur unter 10°C wurde verhindert.

2.7.9.1 Tagesgangexperimente mit Graupappel

Die Tagesgangexperimente an den Graupappelpflanzen wurden in den Sommermonaten 2001 (Juli und September) und 2002 (Juli und August) durchgeführt. Die besonders hohen Transpirationsraten der Graupappel erforderten eine Anpassung der Messanlage. Maßnahmen, wie die Erhöhung der Küvettenflussrate auf ca. 3 l min⁻¹, bessere Durchmischung der Küvette durch das Versetzen der Zuluftleitung in den Deckel der Küvette und das Herabsetzen des Taupunktes in der Zuluft der Küvetten führten zu einer Optimierung der Messungen. Von 2 repräsentativen Pflanzen wurde je 1 mittleres, voll ausgewachsenes Blatt parallel in die Küvetten eingespannt. Die Graupappeln für die Probennahmen wurden im linken Solardom untergebracht und für den Zeitraum der Adaptierung vor den Messungen von einem grünen Kunststoffnetz (Bayerische Gärtnereigenossenschaft) abgeschattet, um eine Anthocyanbildung (s. Abb. 2.1 C) in den Blättern, verursacht durch die hohe Strahlungsintensität, zu verhindern.

2.7.9.2 Tagesgangexperimente mit Steineiche

Um die Monoterpenemissionsraten der Steineichen messen zu können, wurde die Gaswechsellanlage wie in 2.7.7 beschrieben (s. Abb. 2.15) umgebaut. Die

Gaswechselfmessungen wurden wie bei der Graupappel durchgeführt. Die Messungen wurden im Sommer 2002 an den 3-jährigen Trieben (s. 2.1.2) direkt vor den Messungen an den Graupappeln und im Juli und August 2003 an 1-jährigen Pflanzen durchgeführt. Von 2 repräsentativen Bäumen wurden 4-5 voll ausgewachsene Blätter des Neuaustriebes ausgewählt und möglichst überlappungsfrei in die Küvetten eingebaut.

2.7.10 Messung der Lichtabhängigkeit

Wie bei der Kalibrierung der Quantensensoren (s. 2.7.8.2) wurden mittels Lichtaufsatz und unterschiedlich dicken Lagen eines grünen Kunststoffnetzes⁴ verschiedene Beleuchtungsstufen (ca. 0, 20, 50, 100, 200, 400, 750 und 1000 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in der Küvette erzeugt. Die Blatttemperatur wurde mittels Wasserbad konstant auf 30°C gehalten. Jede Messung wurde nach Einstellung eines Gleichgewichtszustandes der Gaswechselgrößen und Emissionen weitere 5-10 min als 1-min-Mittelwerte aufgezeichnet. Die Gaswechsel- und Emissionsmessungen erfolgten wie oben beschrieben. Die Auswertung der Daten wurde wie in 2.8 beschrieben durchgeführt. Stomatäre Leitfähigkeit und blattinterne CO_2 -Konzentration wurden nicht berechnet. Die Ergebnisse wurden zur Validierung des SIM-BIM (ZIMMER *et al.*, 2000) Modells verwendet und dienten auch zur Ermittlung des für die Graupappel und für die Steineiche spezifischen Licht-Faktors für den Algorithmus nach GUENTHER (1997; s. 2.7.12).

2.7.11 Messung der Temperaturabhängigkeit

Mit Hilfe eines beheizbaren Wasserbades (Julabo SW-20C, Julabo Labortechnik, Seelbach, D) wurden in der Küvette verschiedene Temperaturstufen (von ca. 10 bis 45°C in 5-Grad Schritten, Blatttemperatur) eingestellt und mit den Thermoelementen gemessen. Jede Temperaturstufe wurde nach erreichtem Gleichgewichtszustand des Gaswechsels weitere 5-10 min aufgezeichnet. Die Beleuchtungsstärke wurde mittels Lichtaufsatz konstant auf 1000 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gehalten. Die Auswertung und Verwendung (spezifischer Temperatur-Faktor im Algorithmus nach GUENTHER (1997), s. 2.7.12) der Ergebnisse erfolgte, wie bei der Lichtabhängigkeit (2.7.10) beschrieben.

2.7.12 Ermittlung der spezifischen Licht- und Temperaturfaktoren für den Algorithmus nach GUENTHER (1997)

Zur Ermittlung der spezifischen Licht- und Temperaturfaktoren für Graupappel und Steineiche wurde der Algorithmus von GUENTHER (1997) nach den Variablen c_L und α für den Einfluss der PPFD sowie nach c_{T1} , c_{T2} und T_M für den Temperatureinfluss aufgelöst. Die Gleichungen wurden im Microcal Origin 6.1 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA) eingegeben und mit Hilfe der experimentell ermittelten Daten aus den Licht- und Temperaturabhängigkeiten durch nicht lineare Kurvenanpassung über kleinste Quadrate (non-linear least square fitting) zum kleinsten χ^2 angepasst.

2.8 Datenerfassung und –verarbeitung

Alle, von den oben beschriebenen Messgeräten ausgegebenen Spannungssignale wurden in 5-s-Auflösung erfasst und zwischengespeichert. Aus den anfallenden Rohwerten wurden in der zentralen Datenerfassungseinheit (MILOS 500, Vaisala, Helsinki, Fin) 1-min-Mittelwerte mit dazugehörigem kalibrierten Mittelwert im ASCII-Format aufgezeichnet und mittels Visualisierungssoftware für Windows 3.11 (A.M.S. Software GmbH, Quickborn) auf einem Notebook (Compaq LTE5000CX, Compaq, Dornach, D) visualisiert. Die online-Erfassung der Messungen ermöglichte eine ständige Kontrolle und Regulierung der verschiedenen Parameter. Zur korrekten Erfassung und Berechnung der kalibrierten Daten mussten in jedem Frühjahr die Uhrzeit (MEZ) sowie die jeweiligen Kalibrierfaktoren (Yourlink für Windows, Vaisala, Helsinki, Fin) eingegeben werden. Die ASCII-Dateien wurden in Excel-4.0-Dateien umgewandelt und in SPSS 8.0.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) eingelesen. Mittels Auswertemaske (SPSS-Syntax File; s. 6.2.4) wurden die 1-min-Mittelwerte in physiologische, blattflächenbezogene Einheiten berechnet und nach Bedarf in 3- oder 15-min-Mittelwerte zusammengefasst.

2.9 Einfluss von Isopren auf die Superoxidanionenradikalkonzentration im Blatt

2.9.1 Isoprenbegasung

2001 und 2002 wurden Isoprenbegasungsversuche durchgeführt, um zu untersuchen, ob Isopren einen Einfluss auf die Superoxidanionenradikal-

konzentration im Blatt hat. Für die Versuche wurden Pflanzen gleichen Alters und gleicher Größe wie bei den Tagesgangversuchen 2001 und 2002 eingesetzt. Die Gegebenheiten der Gaswechsellmessanlage erforderten, dass begaste Blätter und Kontrollblätter nacheinander gemessen werden mussten. Als Probenblatt (+ Isopren) und Kontrollblatt (- Isopren) wurden jeweils die unmittelbar benachbarten, ausgewachsenen Blätter der mittleren Blattetage eines Baumes gewählt. Begasung und Kontrollmessung wurden in abwechselnder Reihenfolge durchgeführt, damit der Einfluss des Probenahme-Zeitpunktes auf die Blattproben bei beiden Messungen im gleichen Maß erfolgte und dadurch vernachlässigbar war. 2001 wurden $2,5 \text{ l min}^{-1}$ Luft mit $0,5 \text{ l min}^{-1}$ Isopren (Isopren²¹ 9,3 ppmv in N₂ (5,0)) zur Begasung durch die Küvetten geleitet. Die Endkonzentration von Isopren in der Küvettenluft betrug 2,6 ppmv. Um die Isoprenkonzentration in der Küvettenluft zu erhöhen, wurden 2002 ca. $0,75 \text{ l min}^{-1}$ Isopren (Isopren²¹ 1000 ppmv, in N₂ (5,0)) und etwa 3 l min^{-1} Zuluft über 2 Gasflussregler (30000 und 5000 sccm, MKS, München, D) reguliert und gemeinsam in die Küvetten geleitet. Daraus ergab sich ein Küvettenfluss von ca. 4 l min^{-1} mit einer Isoprenkonzentration von 188 ppmv Isopren. Für die Kontrollen wurde die gleiche Menge Stickstoff²¹ (N₂ (5,0)) ohne Isopren zur Zuluft zudosiert. Die Erfassung des Isoprens erfolgte mittels FIS (s. 2.7.6). Zwischen den Isopren begasten Proben und den Kontrollmessungen musste die Anlage so lange gespült werden, bis die Isopren Anzeige des FIS in etwa auf den Grundwert von 400 bis $1000 \text{ counts s}^{-1}$ gefallen war. Die Blätter von 2 Bäumen wurden wie oben beschrieben in die Küvetten eingespannt. Mittels Lichtaufsatz und Wasserbad wurden Standardbedingungen ($1000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ und 30°C) eingestellt. Innerhalb von ca. 15-20 min stellten sich Gleichgewichtsbedingungen der Netto-Assimilation, Transpiration und Isoprenemission der Blätter ein. Unter diesen Bedingungen wurde der Stoffwechsel über mehrere min aufgezeichnet. Danach wurden die Blätter 15 min lang mit Isopren²¹ bzw. Stickstoff²¹ (N₂ (5,0)) begast und wie in 2.9.2 beschrieben weiter behandelt. Im Jahr 2001 wurden 8 Blattpaare und 25 Blattpaare wurden im Jahr 2002 gemessen.

2.9.1.1 Hemmung der Isoprensynthese und -emission durch die Zugabe von Fosmidomycin

Nach einigen min im Gleichgewichtszustand (siehe oben) wurden die Kontrollblätter abgeschnitten und die Blattstiele in 5 mM Glukose¹⁷-Lösung getaucht. Nach ca. weiteren 20-30 min wurden die Blätter 15 min lang mit

Isopren²¹ bzw. Stickstoff²¹ begast. Die Probenblätter wurden mit Fosmidomycin¹⁸ (40 µM in der Glukoselösung) behandelt. Fosmidomycin¹⁸ hemmt die Isoprensynthese indem es als kompetitiver Hemmstoff zum Substrat Desoxyxylulose-5-Phosphat der Desoxyxylulose-5-Phosphat-Reduktoisomerase, dem 2. Enzym im DOXP-Stoffwechsel, an das Katalytische Zentrum des Enzyms bindet (ZEIDLER *et al.*, 1998, LORETO and VELIKOVA, 2001). Die Fütterung mit der Fosmidomycinlösung führte in diesem Versuch innerhalb 1 halben h zu einer ca. 70%igen Hemmung der Emission. Dadurch sollte der Effekt der anschließenden Isoprenbegasung (15 min) auf die Superoxidanionenradikalkonzentration im Blatt aufgehoben werden. Acht Blattpaare wurden mit Stickstoff und 6 Blattpaare mit Isopren begast.

2.9.2 NBT-Färbung

Der Superoxidanionenradikal- ($O_2^{\cdot-}$) Nachweis durch die Färbereaktion mit Nitroblautetrazoliumchlorid¹⁶ (NBT) erfolgte nach der Methode von JABS *et al.* (1996). Nitroblautetrazolium ist ein gelb gefärbter, wasserlöslicher Farbstoff. Zwei Superoxid Moleküle reagieren jeweils zu 1 Molekül Monoformazan, das zu Diformazan weiter reduziert werden kann. Die Reaktionsprodukte sind dunkelblau (UDILOVA, 1999). Es wurde angenommen, dass die Blaufärbung der Blätter der blattinternen Superoxidanionenradikalkonzentration entspricht. Eine absolute Quantifizierung der Radikalkonzentration ist mit dieser Methode nicht möglich. Im Anschluss an die Begasung wurden die Blätter aus der Küvette genommen, Stiele und größere Blattadern entfernt und in einer 60 ml Spritze (AmIZ GbR, Kühn & Neuhäuser, Arnsberg, D) durch Erzeugung von Unterdruck mit der NBT-Lösung (P1) infiltriert. Vollständige Infiltration zeigte sich durch die Dunkelfärbung der Blätter. Nach 20-minütiger Inkubation im Dunkeln bei RT wurden die Blätter über Nacht in reinem Ethanol⁹, bei 70°C im schüttelnden Wasserbad (Julabo, SW-20C, Julabo) entfärbt. Die Blätter wurden dann eingescannt und die blau gefärbten Flächen wurden mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogrammes SigmaScan Pro 5.0.0 (Image Analysis, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) bezüglich Anteil und Intensität der Färbung ausgewertet. Die Blattflächen wurden mit Hilfe eines mitgescannten Größenstandards bestimmt. Zur Bestimmung des gefärbten Anteils des Blattes wurde durch subjektive Einschätzung ein Graustufen-Grenzwert für die noch als gefärbt eingestuften Anteile des Blattes festgelegt. Die Summe der Pixel der gefärbten Anteile wurde von der Gesamt-Pixel-Anzahl subtrahiert, auf eine Blattfläche von 100 cm² normiert und in Prozent ausgedrückt. Zur Berechnung der

Intensitäten wurden die Graustufen (0-256, entspricht einer Skala von schwarz bis weiß) der Bildpunkte herangezogen. Die Anzahl der Pixel bis zum Graustufen-Grenzwert, jeweils mit dem Graustufen-Wert multipliziert, wurde summiert. Die Summe entsprach der Intensität des gefärbten Blattanteils. Die Aufbewahrung der Blätter erfolgte in 70%igem Ethanol bei 4°C.

2.9.3 Blattinterne Isoprenkonzentration und Superoxidanionenradikale

2.9.3.1 Versuchsaufbau und Ablauf

Für diesen Versuch wurden neben Pflanzen gleichen Alters und gleicher Größe wie oben beschrieben auch einige 1-jährige Graupappeln verwendet. Insgesamt wurden 10 verschiedenen Pflanzen in diesem Versuch eingesetzt. Die Bäume wurden vor dem Experiment in Anzuchtkammern des IFU bei 25°C und einem Tag-/Nachtrhythmus von 16/8 h gehalten. Pro Baum wurden jeweils 3 Blätter im zeitlichen Abstand von 5 min abgeschnitten und sofort in 3 Reagenzgläser mit 5 mM Glukoselösung gestellt. Um Beeinflussungen durch das Alter oder die Lage der Blätter am Baum zu verhindern, wurde die Reihenfolge und die Art der Behandlung vom obersten zum untersten Blatt abgewechselt. Es wurden nur ausgewachsenen Blätter der mittleren Blattetage verwendet. Die Gläschen wurden mit den Blättern 15 min lang bei 30°C und 750 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gehalten. Die Blatttemperaturen wurden durch die Nähe zur Lampe (KL2500 LCD, Schott, Köln, D) erreicht und mittels Strahlungs-pyrometer (KT15, Heimann Optoelectronics GmbH, Wiesbaden, D) gemessen. Die PPFD wurde mit Hilfe des Quantensensors (Li-Cor Li-189, Li-Cor, Lincoln, NE, USA) mit Handauslesegerät bestimmt. Nach jeweils exakt 15 min wurde 1 Blatt in eine 250 mM Abscisinsäurelösung¹⁶ (ABA, (\pm)-cis, trans-Abscisic acid, 99%) in 5 mM Glukose¹⁷ überführt, während das 2. Blatt in eine 40 $\mu\text{M Fosmidomycin}^{18}$ -Lösung in 5 mM Glukose¹⁷ transferiert wurde und das 3. Blatt in eine neue Glukose-Lösung überführt wurde. Das Gewicht der Röhrchen mit den Lösungen wurde jeweils vor und nach der Behandlung gewogen, um später die Transpirationsrate bestimmen zu können. Nach exakt 30 min Inkubation bei ca. 750 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und 35°C wurden die Blätter zur Endpunktbestimmung der Transpiration weitere 15 min in jeweils neue Lösungen überführt. Nach jeweils 60 min wurden die Blätter halbiert. Eine Hälfte wurde innerhalb von 10 s in flüssigem N₂ schockgefroren und aufbewahrt. Die 2. Hälfte der Blätter wurde wie in 2.9.2 beschrieben infiltriert und ausgewertet. Nachdem aufgrund erster Ergebnisse die

Vermutung nahe lag, dass ABA eventuell selbst als Radikalfänger fungieren könnte (2.9.3.2), wurden die Blätter statt in die ABA-Lösung, zur Erzeugung von Trockenstress in leere Röhrchen transferiert. Bei diesen Blättern konnte folglich keine Transpirationsrate bestimmt werden. Bei den Blättern unter Trockenstress erhöhte sich die Temperatur gegenüber den Kontrollblättern in der Glukoselösung um 2-3°C. Die Dauer der Behandlung führte gerade noch nicht zu einem Verwelken der Blätter. Der Versuch wurde an je 24 Blättern mit Glukose und Fosmidomycin, mit ABA an je 10 Blättern und mit Trockenstress an 15 Blättern durchgeführt.

2.9.3.2 Test zur Bestimmung des Einflusses der Abscisinsäure auf Superoxid-anionenradikale

Zur Untersuchung, ob die Abscisinsäure als Radikalfänger fungieren kann, wurde folgender Test durchgeführt: 650 µl Lösung A (P2) wurden mit 250 µl Lösung B (P3) in einer Quarzküvette gemischt und mit 100 µl 2,5 M ABA¹⁶ in H₂O *bide*st versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation unter einer UV-Lampe (UVIS, 254/366 nm, DESAGA, Heidelberg, D) wurde die Lösung 1:10 mit H₂O *bide*st verdünnt und bei 505 nm im Photometer (Perkin-Elmer Lambda 2 UV/VIS Spectrometer) gemessen. Im Mittel ergab sich eine um 9,6% ± 2% (Mittelwert von n = 3 Stichproben ± SD) geringere optische Dichte im Vergleich zur Kontrolle (Lösung A und B mit H₂O *bide*st statt ABA).

2.9.4 Messung und Berechnung des blattinternen Isoprengehaltes

Die Bestimmung des blattinternen Isoprengehaltes erfolgte nach der Methode von FALL and MONSON (1992). Die eingefrorenen Blätter wurden mit einem gekühlten Trichter in eine abgedunkelte 100 ml Schottflasche mit gasdichtem Schraubverschluss und integriertem Gummiseptum (Eigenbau, IFU) überführt. Das Blatt wurde in der Flasche 10 min bei 60°C inkubiert. Danach wurden 2-mal je 10 ml der Gasphase entnommen und mit Hilfe einer gasdichten Spritze per Hand in den Gaschromatographen (GC, Varian Star 3400, Darmstadt, D) injiziert. Zur Identifizierung und Berechnung der Isoprenkonzentration wurde das Glas mit einem Isoprenstandard²¹ (Acetylen 5,16 ppmv, N-Pentan 8,16 ppmv, Isopren 7.27 ppmv in N (6,0)) gefüllt und als Referenz ebenfalls 2-mal je 10 ml injiziert. Zwischen den Proben wurde die Säule je einmal 10 ml Luft gespült. Die Parametereinstellungen des GC wurden wie in 2.6.1.2 beschrieben gewählt. Die Isoprenkonzentration aus der injizierten Probe wurde mit Hilfe der Gleichungen

Gl. 2 und 3 (s. 2.6.1.2) berechnet. Zur Umrechnung dieser Daten auf die Konzentration im Blatt wurden 10 Pappelblätter eingescannt und mittels SigmaScan Pro 5.0.0 (Image Analysis, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) die Blattflächen ermittelt. Das Volumen der gasgefüllten Räume dieser Blätter wurde durch Wiegen der Blätter vor und nach einer Infiltration mit Wasser bestimmt. Dadurch ergab sich ein Verhältnis von blattinternem Gasraum [ml] zu Blattfläche [cm²], das in die Berechnung der blattinternen Isoprenkonzentration miteinbezogen wurde, indem die Blattflächen der Probenblätter auf 100 cm² normiert wurden. Mit dem ermittelten Faktor (0,22 ml interner Gasraum entsprechen 100 cm² Pappelblattfläche) konnten die Isoprenkonzentrationen [ppmv] auf den internen Gasraum bezogen werden.

2.10 Statistik

Alle statistischen Auswertungen der Arbeit wurden mit Hilfe von SPSS 8.0.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Nach den Gegebenheiten der Datenzusammensetzung wurden die adäquaten Tests ausgewählt und statistische Zusammenhänge ermittelt. Das jeweilige verwendete Testverfahren wurde in den Legenden der Abbildungen oder im Text beschrieben.

2.11 Herkunft verwendeter Kits, Bioreagenzien, Chemikalien und sonstige Verbrauchsmaterialien

Die Nummer der jeweiligen Firma ist in obenstehendem Text und in Abschnitt 2.12 als hochgestellte Zahl am Ende des Artikels angegeben.

Nr. Firma

- 1 Kynol Europa GmbH, Hamburg, D
- 2 Floragard Vertriebs GmbH f. Gartenbau, Oldenburg, D
- 3 Bayer, Leverkusen, D
- 4 Bayerische Gärtnerei- Genossenschaft, München, D
- 5 Spiess GmbH, Kleinkarlbach, D
- 6 Ökohum, Herbertingen, D
- 7 Biersack, Baustoffhandel, Garmisch- Partenkirchen, D
- 8 Compo GmbH, Münster, D
- 9 Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
- 10 Qiagen, Hilden, D
- 11 Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, D
- 12 BD CLONTECH, Heidelberg, D
- 13 Stratagene, Amsterdam, Niederlande
- 14 Boehringer Mannheim, Mannheim, D
- 15 PE Applied Biosystems, Weiterstadt, D
- 16 Sigma, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
- 17 Merck, Eurolab, Darmstadt, D

- 18 Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
 19 Serva, Heidelberg, D
 20 Fluka Chemie AG
 21 Messer-Griesheim, Olching, D

2.12 Verwendete Puffer und Nährlösungen

NL1: Pappelmedium

Makroelemente (A)	50	ml
Mikroelemente (B)	1	ml
Fe-EDTA Stammlsg. (C)	5	ml
Myo-Inositol ¹⁷	100	mg
L-Glutamin ¹⁷	200	mg
MES ¹⁷	250	mg
Saccharose ¹⁷	20	g
Agar ⁹	7	g

mit NaOH¹⁷ pH 5.9 einstellen

0.1 µl ml⁻¹ Indole-butyric acid

in Vitaminlösung (D) (200 µl ml⁻¹ NL1)

A: Makroelemente

NH ₄ NO ₃ ¹⁷	16.5	g
KNO ₃ ¹⁷	19	g
CaCl x 2H ₂ O ¹⁷	4.4	g
MgSO ₄ x 7H ₂ O ¹⁷	3.7	g
KH ₂ PO ₄ ¹⁷	1.7	g
H ₂ O	1	l

B: Mikroelemente

H ₃ BO ₃ ¹⁷	620	mg
MnSO ₄ x H ₂ O ¹⁷	1.69	g
ZnSO ₄ x H ₂ O ¹⁷	1.06	g
KJ	83	mg
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O ¹⁷	35	mg
CuSO ₄ x 5H ₂ O ¹⁷	2.5	mg
CoCl ₂ x 6H ₂ O ¹⁷	2.5	mg
H ₂ O	100	ml

C: Fe-EDTA Stammlsg.

FeSO ₄ x 7H ₂ O ¹⁷	2.78	g
Na ₂ EDTA (V) Titriplex III ¹⁷	3.73	g

D: Vitaminlösung

Nicotinsäure (V)	50	mg
Pyridin Hydrochlorid (V)	50	mg
Calcium Pantothenat (K)	50	mg
Thiamin Hydrochlorid (V)	50	mg
L-Cystein Chlorhydrat (K)	50	mg
Biotin (K) 5 mg 50 ml ⁻¹	5	ml
H ₂ O	500	ml

NL2: SOC-Medium

Pepton aus Casein ⁹	20	g
Hefeextrakt ⁹	5	g
Glukose ¹⁷	3.6	g
MgSO ₄ ¹⁷	1.2	g
MgCl ₂ ¹⁷	0.95	g
NaCl ¹⁷	0.59	g
KCl ¹⁷	0.19	g
H ₂ O <i>bidest</i>	auf 1	l

NL3: LB-Nährlösung

Pepton aus Casein ⁹	10	g
Hefeextrakt ⁹	5	g
NaCl ¹⁷	5	g
H ₂ O <i>bidest</i>	auf 1	l

NL4: LB-Agar

wie LB_NL zuzüglich

Agar Agar ⁹	15	g
------------------------	----	---

NL5: Top-Agarose

wie LB_NL zuzüglich

Agarose reinst ¹¹	7.5	g
------------------------------	-----	---

NL6: 2xYT-Medium

Pepton aus Casein ⁹	16	g
Hefeextrakt ⁹	10	g
NaCl ¹⁷	5	g
H ₂ O <i>bidest</i>	auf 1	l

P1: NBT-Lösung

NBT (w/v) ⁹	0.1	%
KP _i pH 6.4 ⁹	50	mM

P2: Lösung A

NBT (w/v)	20	mg
H ₂ O <i>bidest</i>	65	ml
EDTA 0.5 M ¹⁷	200	µl
KPi 1 M, pH 7.8	5	ml
TEMED ¹¹	330	µl

P3: Lösung B

Riboflavin ²⁰	5	mg
H ₂ O <i>bidest</i>	100	ml

P4: PEB

Tris HCl pH 7 ¹⁷	100	mM
MgCl ₂ ¹⁷	20	mM
Glycerin (v/v) ⁹	5	%
Triton X-100 (v/v) ¹⁹	2	%
DTT (frisch zugeben) ⁹	20	mM

P5: ISB

Tris HCl pH 8.5 ¹⁷	50	mM
MgCl ₂ ¹⁷	20	mM
Glycerin (v/v) ⁹	5	%
DTT (frisch zugeben) ⁹	20	mM

P6: IEB

Mops HCl pH 7.3 ⁹	700	mM
PEG-1500 (w/v) ²⁰	1.5	%
PVP-30 (w/v) ²⁰	1	%
Dowex1x2 (w/v) ²⁰	8.3	%
MgCl ₂ ¹⁷	20	mM
Ascorbinsäure ¹⁶	200	mM
β-ME (frisch dazu) ¹⁹	50	mM

P7: Kpi-Puffer

KPi pH 7,3 ⁹	50	mM
Glycerin (v/v) ¹⁶	10	%
Natriumascorbat ¹⁷	10	mM
Nadisulfit ¹⁷	10	mM
DTT ⁹	10	mM

P8: TAE (Stammlsg. 50x)

Tris HCl ⁹	2	M
EDTA ¹⁷	50	mM
mit Eisessig ²⁰ pH 8 einstellen		

P9: Bromphenolblau

Bromphenolblau-Na-Salz ⁹	14	mg
TES-Puffer (P14)	10	ml
Glycerin (v/v) ¹⁶	10	ml

P10: TE (Stammlsg. 10x)

Tris HCl pH 8 ⁹	100	mM
EDTA pH 8 ¹⁷	10	mM

P11: BD1 (-20°C)

Glukose ¹⁷	50	mM
EDTA ¹⁷	10	mM
Tris HCl pH8 ⁹	25	mM

Lösung sterilfiltrieren

Lysozym ¹⁴	4	mg ml ⁻¹
-----------------------	---	---------------------

P12: BD2

NaOH ¹⁷	0.2	mol l ⁻¹
SDS ²⁰	1	%

P13: BD3

Natriumacetat ¹⁶	3	mol l ⁻¹
-----------------------------	---	---------------------

mit Essigsäure pH5-5,2⁹**P14: TES**

Tris HCl pH 8 ⁹	10	mM
EDTA pH 8 ¹⁷	1	mM
NaCl ¹⁷	100	mM

P15: SM-Phagenpuffer

NaCl ¹⁷	5.8	g
MgSO ₄ -Heptahydrat ¹⁷	2	g
Tris HCl 1M, pH 7,5 ⁹	50	ml
Gelatine 2% (w/v) ¹⁷	5	ml
H ₂ O <i>bidest</i>	auf 1	l

P16: Denaturierungspuffer

NaOH 1 M ¹⁷	50	ml
NaCl 3 M ¹⁷	50	ml

P17: Neutralisierungspuffer

NaCl 3 M ¹⁷	50	ml
Tris HCl 1 M, pH 7,5 ⁹	50	ml

P18: Waschpuffer W1

SSC 20x (P32)	10	ml
H ₂ O <i>bidest</i>	90	ml

P19: Waschpuffer W2

SSC 20x (P32)	2	ml
SDS 10% (w/v) ²⁰	4	ml
H ₂ O <i>bideest</i> auf	400	ml

P20: Hybridisierungspuffer

SSC 20x (P32)	50	ml
Blocking-Reagenz ¹¹	2	g
N-Laurosylysarcosine ¹⁹	0.66	ml
SDS 10% (w/v) ²⁰	0.4	ml
H ₂ O <i>bideest</i> auf	200	ml
65°C ca. 1 h rühren		

P21: Puffer I

Tris HCl pH 7,5 ⁹	100	mM
NaCl ¹⁷	150	mM

P22: Puffer II

Blocking-Reagenz ¹¹	2	g
Puffer I (P21)	200	ml
65°C ca. 1 h rühren		

P23: Puffer III

Tris HCl pH 7,5 ⁹	1.2	g
NaCl ¹⁷	0.58	g
MgCl ₂ -Hexahydrat ¹⁷	1.02	g
H ₂ O <i>bideest</i> auf	100	ml
mit HCl pH 9,5 (nicht autoklav., MgCl ₂ fällt aus)		

P24: Färbelösung

Puffer III (P23)	40	ml
NBT/BCIP ¹⁴	800	µl

P25: Lysispuffer

NaH ₂ PO ₄ ¹⁷	50	mM
NaCl ¹⁷	300	mM
Imidazol (C ₃ H ₄ N ₂) ²⁰	10	mM
β-ME (frisch dazu) ¹⁹	5	mM
mit NaOH pH 8 einstellen		

P26: Waschpuffer

NaH ₂ PO ₄ ¹⁷	50	mM
NaCl ¹⁷	300	mM
Imidazol (C ₃ H ₄ N ₂) ²⁰	20	mM
β-ME (frisch dazu) ¹⁹	5	mM
mit NaOH pH 8 einstellen		

27: Elutionspuffer

NaH ₂ PO ₄	50	mM
NaCl ¹⁷	300	mM
Imidazol (C ₃ H ₄ N ₂) ²⁰	250	mM
β-ME (frisch dazu) ¹⁹	5	mM

mit NaOH pH 8 einstellen

P28: Reaktionspuffer RB

Tris HCl pH 7 ⁹	150	mM
MgCl ₂ ¹⁷	5	mM
Thiamindiphosphat ¹⁶	1	mM
Glycerin (v/v) ¹⁶	10	%
β-ME (frisch dazu) ¹⁹	5	mM

P29: Bradfordlösung (2x filtriert)

Coomassie Brilliant Blue G-250 ¹⁹		
(w/v)	0.01	%
in Ethanol lösen (v/v) ⁹	5	%
o-Phosphorsäure 85% ⁹	10	%
H ₂ O <i>bideest</i>	85	%

P30: kolloidale Färbelösung

Methanol (v/v) ⁹	20	%
Rotiblu (v/v) ⁹	20	%
H ₂ O <i>bideest</i>	60	%

P31: Fixierlösung

o-Phosphorsäure (v/v) ⁹	1	%
Methanol (v/v) ⁹	20	%
H ₂ O <i>bideest</i>	79	%

P32: SSC (Stammlsg. 20x)

NaCl ¹⁷	175.3	g
tri-NaCitrat ¹⁷	88.2	g
H ₂ O <i>bideest</i> auf	1	l

P33: Ethidiumbromidlösung

Ethidiumbromid ¹⁶	200	mg
H ₂ O <i>bideest</i> auf	20	ml
(giftig und lichtempfindlich)		

P34: 100 bp Längenstandard

100 bp Standard ¹¹	50	µl
Bromphenolblau (P9)	40	µl
H ₂ O <i>bideest</i>	110	µl

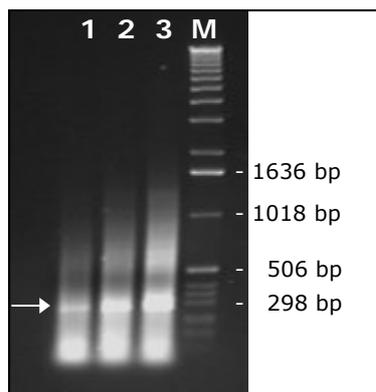
P35: 1 kb Längenstandard

1 kb Standard ¹¹	100	µl
Bromphenolblau (P9)	200	µl
H ₂ O <i>bideest</i>	700	µl

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung der PcDXR aus einer cDNA-Genbank der Graupappel und Überprüfung der Funktionalität des heterolog exprimierten Enzyms

3.1.1 Herstellung der Gensonde



Um die *DXR* aus der Genbank durch Hybridisierung isolieren zu können, musste zuerst eine geeignete Sonde hergestellt werden. Dazu wurde die Gesamt-RNA aus Blättern der Graupappel isoliert und davon die mRNA in cDNA umgeschrieben (s. 2.2). Diese konnte als Template für die PCR zur Herstellung der Sonde eingesetzt werden. Als Primer wurden *dxr_for1* und *dxr_rev1* eingesetzt.

Abb. 3.1 Gelelektrophorese (1% Agarose) von PCR-Amplifikaten eines *DXR* Fragmentes aus der Graupappel. Als Template wurden 0,5 (1), 1 (2) und 2 (3) µl der cDNA eingesetzt, was sich in der Intensität der Banden widerspiegelt. M bezeichnet den 1 kb Standard (s. Abb. 6.1 B). Das amplifizierte Fragment (Pfeil) hatte eine Größe von ca. 300 bp.

Das Fragment erschien in der Gelelektrophorese in der zu erwartenden Größe von ca. 300 bp und wurde anschließend in den Vektor pCR[®]II-TOPO[®] kloniert. Die Klonierung wurde mit Hilfe von Restriktionsenzymen überprüft. Da die Sequenz des klonierten *DXR*-Abschnittes unbekannt war und nach der Restriktion des gereinigten Plasmids mit EcoRI kein Fragment mit der Größe von ca. 300 bp, sondern nur kleinere Fragmente in der Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, lag die Vermutung nahe, dass sich noch eine weitere EcoRI Schnittstelle im Insert befand. Die Restriktion mit ApaI und KpnI (Abb. 3.2 A) brachte nur eine schwache Bande bei ca. 400 bp zum Vorschein. Durch die Linearisierung des Vektors mit dem Restriktionsenzym NotI konnte mittels 0,6%igem Agarose-Gel ein Fragment mit der Länge von 4200 bp (Insert ca. 300 bp plus Vektor mit 3,9 kb, s. Abb. 3.2 B) aufgetrennt werden. Anschließend wurde das Amplifikat sequenziert, was ein Fragment mit der exakten Länge von 309 bp ergab. Durch einen Datenbankvergleich mit dem Programm Fasta3 in der EMBL-Datenbank wurde bestätigt, dass es sich bei dem amplifizierten Genfragment um einen Abschnitt des *DXR* Gens handelte. Es ergab sich eine Übereinstimmung von 82,03% mit der mRNA der *DXR* von *Lycopersicon esculentum*.

Ergebnisse

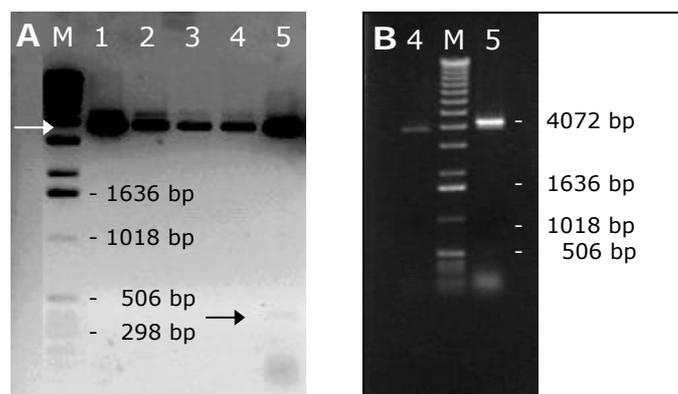


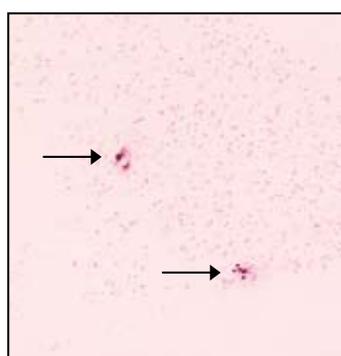
Abb. 3.2 (A) Gelelektrophorese (1% Agarose) der Restriktionsanalyse mit KpnI und ApaI. 1, 2, 3 und 4 bezeichnen die Banden der Vektoren ohne Insert bei ca. 4000 bp (weißer Pfeil). Der schwarze Pfeil bezeichnet die Bande des Inserts (ca. 400 bp). Die Linearisierung des Vektors pCR[®]II-TOPO mit dem Enzym NotI zeigte im 0,6% Agarosegel (B) den Vektor aus Klon 4 ohne Insert und Klon 5, der das Insert enthielt (ca. 4200 bp, Vektor plus 300 bp Insert). M bezeichnet den 1 kb Standard (s. Abb. 6.1 B).



Um das Fragment als Gensonde für die Hybridisierung mit der cDNA-Genbank einsetzen zu können, wurde es mit Digoxigenin markiert (s. 2.2.11.1). Die Gelelektrophorese (1,5% Agarose) zeigte deutlich, dass das markierte Genfragment aufgrund der Größenänderung im Vergleich zum unmarkierten Fragment im Gel wesentlich langsamer wanderte (Abb. 3.3).

Abb. 3.3 Gelelektrophorese (1,5% Agarose) des erfolgreich mit Digoxigenin markierten *DXR*-Fragmentes (1). Die unmarkierte Kontrolle (2) erschien bei ca. 300 bp, die Bande des markierten Fragmentes bei ca. 380 bp. M bezeichnet den 100 bp (s. Abb. 6.1 A) Standard.

3.1.2 Hybridisierung und Isolierung positiver Klone



Nach der erfolgreichen Hybridisierung der Gensonde mit der cDNA Bank wurden die Plaques, welche die gesuchte *DXR* enthielten und dadurch über das positive Hybridisierungssignal auf dem Nitrozellulosefilter identifiziert werden konnten, ausgeschnitten. Durch *in vivo* Exzision konnte anschließend das Phagemid isoliert und umklont werden.

Abb. 3.4 Positive Hybridisierungssignale auf der Nitrozellulosemembran (Pfeile). Durch die dunkellila Farbreaktion konnten die Phagen-PFUs, welche die *DXR*-cDNA enthielten, auf der Agarplatte identifiziert werden.

3.1.3 Sequenzierung und Sequenzvergleich

Nach erfolgreicher Excision des Phagemids und Klonierung (s. 2.2.11.5) in *E. coli* (SOLR), erfolgte die Auswahl der Klone, welche die *DXR* enthielten, durch PCR mit

den Primern *dxr_for1* und *dxr_rev1* (s. Abb. 3.5 A). Mit dem gereinigten Plasmid der positiven Klone wurde eine Restriktion mit EcoRI durchgeführt. In einem der positiv getesteten Klone war die *DXR* in der gesamten Länge von ca. 1700 bp im Vektor enthalten (s. Abb. 3.5 B). Wie sich in der Sequenzierung herausstellte, enthielt das *DXR*-Insert im pBSK(-) von den Adaptorsequenzen des Vektors ausgehend, 305 zusätzliche Basenpaare vor dem Startcodon am 5'-Ende und das Polyadenylierungssignal am 3'-Ende.

Bei der Erstellung der cDNA-Genbank werden die einzelnen cDNA-Fragmente an Adaptoren gehängt und mit diesen in die Polylinker-Region des Vektors kloniert. In der Adaptorsequenz befinden sich Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Eco RI, NotI und SalI. Das Insert kann später vollständig mit Hilfe eines dieser Enzyme wieder aus dem Vektor isoliert werden.

Die nach erfolgreicher Isolierung aus *E. coli* (SOLR) gereinigte Plasmid-DNA wurde im Vektor pBSK(-) sequenziert und aufgrund der hohen Homologie im Sequenzvergleich in der EMBL-Datenbank als putative *DXR* der Graupappel unter der Accession No. AJ574852 eingetragen. Um die PcDXR in funktionstüchtiger Form heterolog exprimieren zu können, wurde mittels PCR der codierende Abschnitt der PcDXR ohne die langen Anhänge amplifiziert. Die PCR erfolgte mit attB-Primern (s. 2.2.5.2), um die PcDXR in das Gateway-Klonierungssystem einführen zu können.

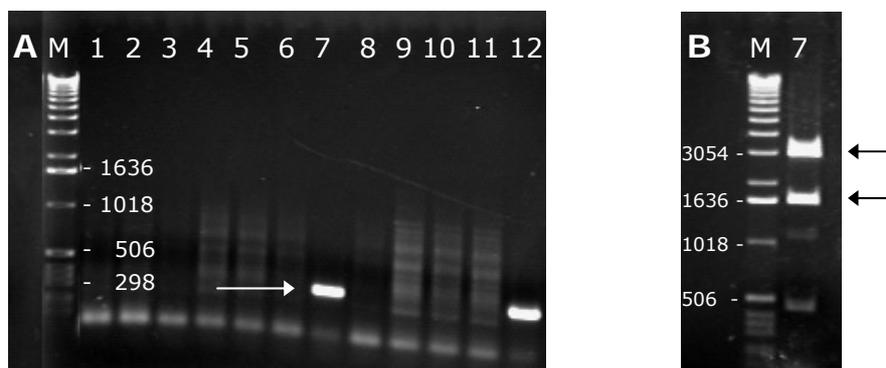


Abb. 3.5 Gelelektrophorese der mittels PCR überprüften Klone (A) und der ausgeschnittenen full length PcDXR (B). Bande 7 und 12 wiesen die erwartete Größe von ca. 300 bp auf (Pfeil). Die Bande des pBSK(-)-Vektors erscheint bei ca. 3 kb (oberer Pfeil), das mit EcoRI herausgeschnittene Insert bei ca. 1700 bp (unterer Pfeil). Die beiden darunter liegenden schwachen Banden entstanden durch eine EcoRI Schnittstelle in der PcDXR. Die Zahlen bezeichnen die Größe der DNA-Fragmente des 1 kb Standards M in bp (s. 6.1 B). A 1% Agarose, B 0,8% Agarose.

Ergebnisse

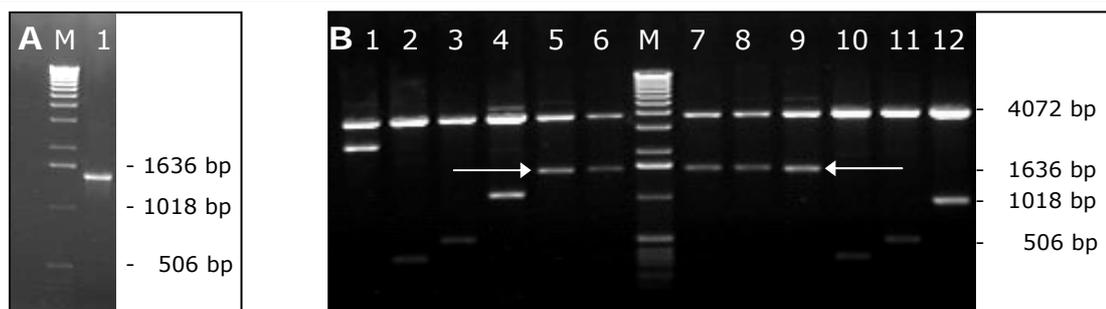


Abb. 3.6 A: Gelelektrophorese des PCR-Amplifikates. Das PCR-Amplifikat wurde zur Sequenzierung in den in den pCR[®]II-TOPO-Vektor kloniert. Das Fragment enthielt den gesamten codierenden Bereich der *PcDXR* und an den Enden die *attB*-Anhänge zur späteren Insertion in den Vektor DONR221 und war ca. 1480 bp lang. B: Gelelektrophorese der in den pCR[®]II-TOPO-Vektor klonierten PCR-Amplifikate der *PcDXR*. Aus den Klonen Nr. 5 bis Nr. 9 (Pfeile) konnten durch Restriktion mit *KpnI* und *ApaI* Fragmente mit der erwarteten Länge von ca. 1600 bp isoliert werden. Die oberste Bande lag bei ca. 3,8 kb und stammte vom Vektor. M bezeichnet den 1 kb Standard (s. Abb. 6.1 B).

Die Plasmide mit Inserts der gesuchten Länge (Abb. 3.6, Proben Nr. 5-9, Pfeile) wurden sequenziert. So konnte ein positiver Klon (Nr. 6, Abb. 3.6 B) ohne Stopcodon im offenen Leseraster isoliert werden. Zwei Abweichungen zur ursprünglichen Sequenz wurden festgestellt und in der EMBL-Datenbank korrigiert. In der folgenden Abb. 3.7 ist die ermittelte, korrekte Gen- (inklusive Polyadenylierungssignal) und Proteinsequenz der *PcDXR* aus der Graupappel angeführt. Die gesamte *PcDXR*-Sequenz besteht aus 1724 bp, davon 502 Adenin-, 484 Thymin-, 336 Cytosin- und 402 Guaninresten. Die Proteinsequenz besteht aus 472 codierenden Aminosäuren. Das Molekulargewicht beträgt ca. 51,3 kDa.

<u>ATG</u>	GCA	CTT	AAT	ATT	CTA	TCT	CCA	GCT	GAA	ATC	AAG	GCC	ATC	TCT	TTC	TTG	51
M	A	L	N	I	L	S	P	A	E	I	K	A	I	S	F	L	
GAT	TCT	ACT	AAA	TCC	AAT	CGC	CTA	CCT	AAG	CTT	CAA	GGT	GGG	CTT	TGT	TTG	102
D	S	T	K	S	N	R	L	P	K	L	Q	G	G	L	C	L	
AAG	AGG	AAG	GAT	TGT	GGG	GGG	AGA	AGA	ATT	CAG	TGT	TCA	GTT	CAG	AAT	CAG	153
K	R	K	D	C	G	G	R	R	I	Q	C	S	V	Q	N	Q	
AAT	AAT	CAG	CCA	CCT	CCA	GCT	TGG	CCA	GGA	AGA	GCC	TGT	CCA	GAA	CCT	GGA	204
N	N	Q	P	P	P	A	W	P	G	R	A	C	P	E	P	G	
CGC	AAG	ACA	TGG	GAT	GGT	CCT	AAG	CCT	ATA	TCA	ATC	GTT	GGA	TCT	ACT	GGT	255
R	K	T	W	D	G	P	K	P	I	S	I	V	G	S	T	G	
TCC	ATC	GGA	ACG	CAG	ACT	TTG	<u>¹GAC</u>	<u>ATT</u>	<u>GTA</u>	<u>GCG</u>	<u>GAG</u>	<u>AAT</u>	<u>CCA</u>	<u>GAT</u>	<u>AAA</u>	<u>TTC</u>	306
S	I	G	T	Q	T	L	D	I	V	A	E	N	P	D	K	F	
AAA	GTT	GTG	GCA	CTC	GCA	GCT	GGG	TCA	AAT	GTT	<u>²GCT</u>	<u>CTT</u>	<u>CTT</u>	<u>GCA</u>	<u>GAC</u>	<u>CAG</u>	357
K	V	V	A	L	A	A	G	S	N	V	A	L	L	A	D	Q	
<u>GTG</u>	AGG	ACA	TTC	AAA	CCT	CAA	CTG	ATT	GCT	GTT	AGA	AAC	GAG	TTA	TTA	GTT	408
V	R	T	F	K	P	Q	L	I	A	V	R	N	E	L	L	V	

Abb. 3.7 Gen- und Proteinsequenz der *PcDXR*. Unter den Basentriplets ist die übersetzte Aminosäure im 1-Buchstabencode angegeben (s. Abb. 6.2). Start- und Stopcodon ist dunkel-grau hinterlegt. Mit Hilfe von 6 Primern (hochgestellte Nummern¹⁻⁶ bezeichnen den jeweiligen Primer, s. Tab. 2.1) konnte das gesamte *PcDXR*-Gen sequenziert werden. Die Bindungsstellen sind in der Sequenz unterstrichen. Fortsetzung Seite 6.

Ergebnisse

GAT	GAA	CTC	AAA	GAG	GCC	CTG	GCT	GAT	GTC	GAG	GAA	AAG	CCT	GAG	ATT	ATT	459
D	E	L	K	E	A	L	A	D	V	E	E	K	P	E	I	I	
CCT	GGG	GAG	CAA	GGA	GTT	GTA	GAG	GTT	GCT	CGT	CAT	CCA	GAT	GCT	GTC	AGT	510
P	G	E	Q	G	V	V	E	V	A	R	H	P	D	A	V	S	
GTA	GTT	ACA	³ GGA	ATA	GTA	GGT	TGC	GCA	GGC	CTA	AAG	CCT	ACG	GTT	GCT	⁴ GCA	561
V	V	T	G	I	V	G	C	A	G	L	K	P	T	V	A	A	
<u>ATA</u>	<u>GAA</u>	<u>GCT</u>	<u>GGA</u>	<u>AAA</u>	<u>GAC</u>	<u>ATA</u>	<u>TGC</u>	TTG	GCC	AAT	AAA	GAG	ACA	TTA	ATT	GCT	612
I	E	A	G	K	D	I	C	L	A	N	K	E	T	L	I	A	
GGG	GGT	CCT	TTT	GTT	CTC	CCT	CTT	GCT	CAC	AAA	TAT	AAC	GTG	AAA	ATT	CTT	663
G	G	P	F	V	L	P	L	A	H	K	Y	N	V	K	I	L	
CCA	GCT	GAT	TCT	GAA	CAT	TCT	GCC	ATT	TTT	CAG	TGT	ATT	CAA	GGC	CTG	CCG	714
P	A	D	S	E	H	S	A	I	F	Q	C	I	Q	G	L	P	
GAG	GGT	GCA	TTG	CGG	CGC	ATC	ATT	TTA	ACT	GCT	TCT	GGT	GGG	GCT	TTC	AGG	765
E	G	A	L	R	R	I	I	L	T	A	S	G	G	A	F	R	
GAT	TGG	CCT	GTT	GAG	AAA	TTG	AAA	GAA	GTT	AAA	GTA	GCT	GAT	GCT	TTG	AAG	816
D	W	P	V	E	K	L	K	E	V	K	V	A	D	A	L	K	
CAT	CCC	AAC	TGG	AGT	ATG	GGT	AAA	AAG	ATT	ACT	GTA	GAC	TCT	GCT	ACC	CTT	867
H	P	N	W	S	M	G	K	K	I	T	V	D	S	A	T	L	
TTC	AAC	AAG	GGT	TTA	GAA	GTC	ATT	GAA	GCC	CAC	TAT	TTG	TTC	GGA	GCT	GAA	918
F	N	K	G	L	E	V	I	E	A	H	Y	L	F	G	A	E	
TAT	GAT	AAT	ATT	GAT	ATC	GTA	ATT	CAT	CAA	CAG	TCT	ATA	ATA	CAT	TCA	ATG	969
Y	D	N	I	D	I	V	I	H	Q	Q	S	I	I	H	S	M	
ATT	GAA	ACA	CAG	⁵ GAC	TCA	TCT	GTT	ATC	GCA	<u>CAG</u>	TTG	GGG	TGG	CCT	GAT	ATG	1020
I	E	T	Q	D	S	S	V	I	A	Q	L	G	W	P	D	M	
CGC	TTG	CCT	ATC	CTT	TAC	ACA	ATG	TCA	TGG	CCA	GAC	AGA	GTT	TAC	TGT	TCT	1071
R	L	P	I	L	Y	T	M	S	W	P	D	R	V	Y	C	S	
GAA	ATT	ACT	TGG	CCT	CGC	CTA	GAT	CTT	TGC	AAG	CTT	GGA	TCA	CTA	ACT	TTT	1122
E	I	T	W	P	R	L	D	L	C	K	L	G	S	L	T	F	
AAA	GCT	CCT	GAC	AAT	GTA	AAA	TAC	CCA	TCT	ATG	GAT	CTT	GCT	TAT	GCT	GCT	1173
K	A	P	D	N	V	K	Y	P	S	M	D	L	A	Y	A	A	
GGA	CGA	GCT	GGA	GGC	ACC	ATG	ACA	GGA	GTC	CTC	AGT	GCT	GCT	AAT	GAG	AAA	1224
G	R	A	G	G	T	M	T	G	V	L	S	A	A	N	E	K	
GCT	GTA	GAA	ATG	TTC	ATA	GAT	GAA	AAG	ATA	AGC	TAT	CTT	GAC	ATT	TTC	AAG	1275
A	V	E	M	F	I	D	E	K	I	S	Y	L	D	I	F	K	
GTT	GTG	GAG	CTA	ACA	TGT	GAT	AAG	⁶ CAC	CAG	GCA	GAG	TTA	<u>GTG</u>	GTC	TCA	CCT	1326
V	V	E	L	T	C	D	K	H	Q	A	E	L	V	V	S	P	
TCT	CTT	GAG	GAA	ATT	GTA	CAT	TAT	GAC	TTG	TGG	GCT	CGA	GAA	TAT	GCT	GCT	1377
S	L	E	E	I	V	H	Y	D	L	W	A	R	E	Y	A	A	
AGC	TTG	CAA	CAC	TCT	TCT	GGT	CCA	AGT	CCT	GTT	TTT	GCT	<u>TGA</u>	TTG	GAC	CAC	1428
S	L	Q	H	S	S	G	P	S	P	V	F	A	*				
ATG	CCA	ACG	CCA	TGC	AAG	CAT	CTA	TTC	GGC	CAT	GGC	AAG	ACC	TGC	CAA	AAC	1479
TGG	CAT	TCT	TGC	ATA	CTT	GGA	AGG	ATC	TTG	AAA	GTT	ATG	GCA	ATA	AAA	CCC	1530
TAA	AGA	AAT	GCA	TTT	TGC	AGA	GAA	GTT	AAG	ATC	TGG	GGA	TTG	ATT	AGC	AGT	1581
ATG	ATA	TAA	ATG	TTA	AGA	TAG	GCA	ACC	AGA	ATA	TGT	CCC	AGT	TTA	AGC	TTG	1632
CAC	AAG	TGC	ATT	TCT	TGT	TGA	AGG	ATC	GTG	AAA	GTT	ATG	GCA	ATA	AAA	CCC	1683
TAA	AGA	AAT	GCA	TTT	TGC	AGA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AA			1724

Fortsetzung der Abb. 3.7

Ergebnisse

Im Homologievergleich mit den DXR-Proteinsequenzen, die bisher bei Pflanzen bekannt und in der EMBL-Datenbank (<http://www.ebi.uniprot.org>) veröffentlicht sind, zeigte die Sequenz aus der Graupappel mit 86,23% die höchste Homologie zur DXR von *Arabidopsis thaliana*. In der folgenden Tabelle 3.1 sind alle ermittelten Homologien aufgelistet. Zusätzlich wurde die dxr von *S. leopoliensis* in den Vergleich miteinbezogen.

Tab. 3.1 Homologievergleich der Aminosäuresequenzen einiger DOXP-Reduktoisomerasen mit der Sequenz der Graupappel (Q70KX8). Der Vergleich wurde in der EMBL-Datenbank mit Hilfe des Programms ClustalW durchgeführt.

DXR von	EMBL	Anzahl aa	MG [Da]	Homologie [%]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9XFS9	477	51963	86,23
<i>Catharanthus roseus</i>	Q9M4W4	474	51164	86,23
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Q947C3	475	51497	84,75
<i>Antirrhinum majus</i>	Q5MJZ5	471	51372	83,34
<i>Zea mays</i>	Q9FXZ7	472	51284	82,20
<i>Artemisia annua</i>	Q9SP64	472	50740	82,20
<i>Plectranthus barbatus</i>	Q6R3F4	469	50787	81,88
<i>Oryza sativa japonica</i>	Q9FTN0	473	51497	81,78
<i>Oryza sativa</i>	Q8W250	473	51497	81,78
<i>Stevia rebaudiana</i>	Q8L6C5	473	51020	81,78
<i>Hordeum vulgare</i>	Q70EZ8	484	52517	78,60
<i>Mentha piperita</i>	Q9XES0	475	52029	78,60
<i>Taxus cuspidata</i>	Q6GZ43	477	51781	78,18
<i>Ginkgo biloba</i>	Q5J7B3	477	51976	77,18
<i>Pueraria lobata</i>	Q6EJD0	465	50555	76,34
<i>Synechococcus leopoliensis</i>	Q9RCT1	402	43876	62,94

Ergebnisse

Q6GZ43_T. <i>cuspidata</i>	--MALKIAPTSELCTSSFLGSTSG--LASSGSTKFTGQKLRFLGLSIKRSRT	46
Q5J7B3_G. <i>biloba</i>	--MALRIASPNELGASLLDWSSG--LASSESSQSTGRKIQYGLSMRNRT	46
Q9FTN0_O. <i>sativa j.</i>	MALKVVVSFPGDLA-AVSFLDS----NRGGAFNQL-----KVDLPFQTRD	39
Q8W250_O. <i>sativa</i>	MALKVVVSFPGDLA-AVSFLDS----NRGGAFNQL-----KVDLPFQTRD	39
Q9FXZ7_Z. <i>mays</i>	MAALKASFRGELS-AASFLDS----SRG-PLVQH-----KVDFTFQRKG	38
Q70EZ8_H. <i>vulgare</i>	-MALKASFSGELAGAPSLLDSSGVSRRGGAAFRHRQRQRCKVDFTFQRD	49
Q9M4W4_C. <i>roseus</i>	--MALNSLSPPKIKTISFLDS-----SKSNYNLNLKLPGGFAFKKKD	41
Q5MJZ5_A. <i>majus</i>	--MALNMLSPSEIKSLSFLDS-----SKSNYNLNLFLKLGQ---LKRKE	38
Q947C3_L. <i>esculentum</i>	--MALNLLSPAIEKISIFLND-----SKSSYNLNLKLFKFTGGLSIRRKE	41
Q6R3F4_P. <i>barbatus</i>	--MALNL----EIKALSFLDS-----SKSSYNLNLPLKLHGGAFAFKRKD	37
Q9XES0_M. <i>piperita</i>	--MALNLMAPTEIKTISFLDS-----SKSNYNLNLPLKFQGGFAFKRKD	41
Q9XFS9_A. <i>thaliana</i>	-MMLNLSLSPAESKAISFLDT-----SRFNP---IPKLSGGFSLRRRN	39
Q70KX8_P. x <i>canescens</i>	--MALNILSPAIEKAIISFLDS-----TKSNR---LPKLQGGGLCLKRKD	38
Q9SP64_A. <i>annua</i>	--MSLNTLSPSEIRVNSFLDT-----TKSNTN--LFKLQGGVSVKRKD	39
Q8L6C5_S. <i>rebaudiana</i>	--MSLSYLSPTQTNLITFSDT-----CKSQTH--LLKLQGGFCFKRKD	39
Q6EJD0_P. <i>lobata</i>	--MALNLPSPAQVQKPLFFSSN-----NST-----KLPGSFSLKRKD	34
Q9RCT1_S. <i>leopoliensis</i>	-----	-----
Q6GZ43_T. <i>cuspidata</i>	KK-ACTRAARCSIQA-----PPPAPWPGTAVVGED-RKVWDGPKPFSIIGS	89
Q5J7B3_G. <i>biloba</i>	RP-AFERTVNCSLNG-----PPPAPWGRAVVDDED-RKVWDGPKPFSIVGS	89
Q9FTN0_O. <i>sativa j.</i>	RRAVSLRRTCCSMQO----APPPAPWGRAVVEPG-RRSWDGPKPISIVGS	84
Q8W250_O. <i>sativa</i>	RRAVSLRRTCCSMQO----APPPAPWGRAVVEPG-RRSWDGPKPISIVGS	84
Q9FXZ7_Z. <i>mays</i>	KRAISLRRTCCSMQO----APPPAPWGRAVAEPG-RRSWDGPKPISIVGS	83
Q70EZ8_H. <i>vulgare</i>	KRAVYLTRTCCSMQO----GPPPAPWGRAVVEPG-RRSWEGPKPISIVGS	94
Q9M4W4_C. <i>roseus</i>	FGASGGKKIQCSVQ----PPPPAPWGRAVAEPG-YKTWEGQKPKISIVGS	85
Q5MJZ5_A. <i>majus</i>	NGCSAVKRVQCLAQ----TPPPAPWAGRAVADPG-HKRWEGPKPISIVGS	82
Q947C3_L. <i>esculentum</i>	CSGAFAKRVQCSAQL----PPPPAPWGRAVAEPG-RQSWDGPKPISIVGS	86
Q6R3F4_P. <i>barbatus</i>	SRCSAPNRVHCSAQP----PPPAPWGRAVYEPG-RKTWEGPKPISIVGS	81
Q9XES0_M. <i>piperita</i>	SRCTAAKRVHCSAQS---QSPPPAPWGRAVPEPG-RMTWEGPKPISIVGS	87
Q9XFS9_A. <i>thaliana</i>	QGRGFQKGVKCSVKVQOQOQPPAPWGRAVPEAP-RQSWDGPKPISIVGS	88
Q70KX8_P. x <i>canescens</i>	CG---GRRIQCSVQOQNNO-PPPAPWGRACPEPG-RKTWDGPKPISIVGS	83
Q9SP64_A. <i>annua</i>	SKVN---GIQCSAAAS---TPPPAPWGTALVQPG-TKNWSGPKPISIVGS	82
Q8L6C5_S. <i>rebaudiana</i>	VKLAGK-GIRCSAQP----PPPPAPWGTALVDPG-TKNWDGPKPISIVGS	83
Q6EJD0_P. <i>lobata</i>	SDTTVERRVYCSAASQ---SPSPAWPGTALPEPSDFKTWDGPKPISILGS	81
Q9RCT1_S. <i>leopoliensis</i>	-----MKAVTLLGS	9
	* . . . : : *	
Q6GZ43_T. <i>cuspidata</i>	TGSIGTQTLDIVAEHPDKFKVVALAAGSNVTLLAEQVRMFKPKLVSVRNE	139
Q5J7B3_G. <i>biloba</i>	TGSIGTQTLDIVAEHPDKFRVVALAAGSNVALLADQVRQFKPKLVAIRNE	139
Q9FTN0_O. <i>sativa j.</i>	TGSIGTQTLDIVAENPDKFRVVALAAGSNVTLLADQVKTFFKPKLVAVRNE	134
Q8W250_O. <i>Oryza sativa</i>	TGSIGTQTLDIVAENPDKFRVVALAAGSNVTLLADQVKTFFKPKLVAVRNE	134
Q9FXZ7_Z. <i>mays</i>	TGSIGTQTLDIVAENPDKFRVVALAAGSNVTLLADQVKTFFKPKLVAVRNE	133
Q70EZ8_H. <i>vulgare</i>	TGSIGTQTLDIVAENPDKFRVVALAAGSNVTLLADQVKTFFKPKLVAVRNE	144
Q9M4W4_C. <i>roseus</i>	TGSVGTQTLDIVAENPDKFRVVALAAGSNVTLLADQVKTFFKPKLVAVRNE	135
Q5MJZ5_A. <i>majus</i>	TGSIGTQTLDIVAENPDKFRVVALAAGSNVTLLADQIRTFFKPKLVAVRNE	132
Q947C3_L. <i>esculentum</i>	TGSIGTQTLDIVAENPDKFRVVALAAGSNVTLLADQVKTFRPKLVAVRNE	136
Q6R3F4_P. <i>barbatus</i>	TGSIGTQTLDIVAESPKFRVVALAAGSNVALLADQVKAFKPKLVSIKDE	131
Q9XES0_M. <i>piperita</i>	TGSIGTQTLDIVAENPDKFRIVALAAGSNVTLLADQ-KAFKPKLVSVKDE	136
Q9XFS9_A. <i>thaliana</i>	TGSIGTQTLDIVAENPDKFRVVALAAGSNVTLLADQVRRFKPALVAVRNE	138
Q70KX8_P. x <i>canescens</i>	TGSIGTQTLDIVAENPDKFKVVALAAGSNVALLADQVRTFFKPKQLIAVRNE	133
Q9SP64_A. <i>annua</i>	TGSIGTQTLDIVAENPDKFKVVALAAGSNVTLLAEQIKAFKPKQLVSIKNE	132
Q8L6C5_S. <i>rebaudiana</i>	TGSIGTQTLDIVAENPDKFRVVALAAGSNVTLLAEQIKAFKPKQLVSIQNE	133
Q6EJD0_P. <i>lobata</i>	TGSIGTQTLDIVAEFPERFKVVSLAAGSNITLLADQIKTFFKPEVVGLRNE	131
Q9RCT1_S. <i>leopoliensis</i>	TGSIGTQTLDILEQYPDRFRLVGLAAGRNVALLSEQIRRRHRPEIVAIQDA	59
	:**.*: : *::*:*.***** *::*:*: : .:* :.:::	

Abb. 3.8 Aminosäuresequenzvergleich der DXR von der Graupappel (*P. x canescens*, fett gedruckt), mit der DXR anderer Pflanzen. Hochkonservierte Bereiche sind mit Stern bezeichnet und grau hinterlegt. Die Sequenzen und Zugangsnummern stammen aus der EMBL-Datenbank (<http://www.ebi.uniprot.org>).

Ergebnisse

Q6GZ43_T. cuspidata	PNWNMGKKITVDSATLFN-KGLEVIEAHYLYGVDYDNIEIIVIHPQSI IHS	328
Q5J7B3_G. biloba	PNWNMGKKITVDSATLFN-KGLEVIEAHYLYGADYDNIEIIVIHPQSI VHS	328
Q9FTN0_O. sativa j.	PNWNMGKKITVDSATLFN-KGLEVIEAHYLFGA EYDDIEIIVIHPQSI IHS	323
Q8W250_O. sativa	PNWNMGKKITVDSATLFN-KGLEVIEAHYLFGA EYDDIEIIVIHPQSI IHS	323
Q9FXZ7_Z. mays	PNWNMGRKITVDSATLFN-KGLEVIEAHYLFGA EYDDIEIIVIHPQSI IHS	322
Q70EZ8_H. vulgare	PNWSMGKKITVDSATLFN-KGLEVIEAHYLFGA EYDDIDIVIHQPSSI IHS	333
Q9M4W4_C. roseus	PNWNMGKKITVDSATLFN-KGLEVIEAHYLFGA EYDNIDIVIHQPSSI IHS	324
Q5MJZ5_A. majus	PNWNMGKKITVDSATLFN-KGLEVIEAHYLFGA EYDDIEIIVIHPQSI IHS	321
Q947C3_L. esculentum	PNWNMGKKITVDSATLFN-KGLEVIEAHYLFGA EYDNIEIIVIHPQSI IHS	325
Q6R3F4_P. barbatus	PNWNMGKKITVDSATLFN-KGLEVIEAHYLFGA EYDDIEIIVIHPQSI IHS	320
Q9XES0_M. piperita	SNWNMGKKNTVRLQLFFNKGLEVIKAHYLFGA EYDDIEIIVHSPSI IHS	326
Q9XFS9_A. thaliana	PNWNMGKKITVDSATLFN-KGLEVIEAHYLFGA EYDDIEIIVIHPQSI IHS	327
Q70KX8_P. x canescens	PNWSMGKKITVDSATLFN-KGLEVIEAHYLFGA EYDNIDIVIHQSSI IHS	322
Q9SP64_A. annua	PNWSMGRKITVDSATLFN-KGLEVIEAHYLYGSSYDNIDIVIHQPSSI IHS	321
Q8L6C5_S. rebaudiana	PNWSMGKKITVDSATLFN-KGLEVIEAHYLYGSDYDNIEIIVIHPQSI IHS	322
Q6EJD0_P. lobata	PIWSLGRKITIDSATLFN-KGLEVIEAHYLFGA SYDDIEIIVIHPQSI IHS	320
Q9RCT1_S. leopoliensis	PNWSMGRKITVDSATLMN-KGLEVIEAHYLFGLDYDYIDIVIHQPSSI IHS	258
	. * . : * * * * * : * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *	
Q6GZ43_T. cuspidata	MVETQDSSVLAQLGWPDMRLPILY TMSWPERVPCSEITWPRLDLCKLGSL	378
Q5J7B3_G. biloba	MVETQDSSVLAQLGWPDMRLPILY TMSWPERVPCSEVTWPRLDLCKSGSL	378
Q9FTN0_O. sativa j.	MIETQDSSVLAQLGWPDMRIPILY TMSWPDRIYCEVTWPRLDLCKLGSL	373
Q8W250_O. sativa	MIETQDSSVLAQLGWPDMRIPILY TMSWPDRIYCEVTWPRLDLCKLGSL	373
Q9FXZ7_Z. mays	MVETQDSSVLAQLGWPDMRLPILY TMSWPDRIYCEVTWPRLDLCKLGSL	372
Q70EZ8_H. vulgare	MIETQDSSVLAQLGWPDMRLPILY TMSWPDRIYCEVTWPRLDLCKLGSL	383
Q9M4W4_C. roseus	MVETQDSSVLAQLGWPDMRLPILY TMSWPDRIYCEVTWPRLDLCKLGSL	374
Q5MJZ5_A. majus	MIETQDSSVLAQLGWPDMRLPILY TMSWPDRIYCEVTWPRLDLCKLGSL	371
Q947C3_L. esculentum	MVETQDSSVLAQLGWPDMRLPILY TMSWPDRIYCEVTWPRLDLCKLGSL	375
Q6R3F4_P. barbatus	MVETQDSSVLAQLGWPDMRLPILY TMSWPDRIYCEVTWPRLDLCKVSL	369
Q9XES0_M. piperita	MVETQDSSVLAQLGWPDMRLPILY TMSWPDRIYCEVTWPRLDLCKVSL	375
Q9XFS9_A. thaliana	MIETQDSSVLAQLGWPDMRLPILY TMSWPDRIYCEVTWPRLDLCKLGSL	377
Q70KX8_P. x canescens	MIETQDSSVLAQLGWPDMRLPILY TMSWPDRIYCEVTWPRLDLCKLGSL	372
Q9SP64_A. annua	MVETQDSSVLAQLGWPDMRLPILY TMSWPDRIYCEVTWPRLDLCKLGSL	371
Q8L6C5_S. rebaudiana	MVETQDSSVLAQLGWPDMRLPILY TMSWPDRIYCEVTWPRLDLCKLGSL	372
Q6EJD0_P. lobata	LVETQDSSVLAQLGWPDMRLPILY TMSWPDRIYCEVTWPRLDLCKVSL	370
Q9RCT1_S. leopoliensis	LIELEDTSVLAQLGWPDMRLPILY TMSWPDRIYCEVTWPRLDLCKVSL	305
	::* : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *	
Q6GZ43_T. cuspidata	TFKAPDCVKYPSMDLAYSAGRAGGTMTGVL SAANEKAVELFIDERISYLD	428
Q5J7B3_G. biloba	TFKAPDCVKYPSMDLAYSAGRAGGTMTGVL SAANEKAVELFIEEKISYLD	428
Q9FTN0_O. sativa j.	TFKAPDNVKYPSMDLAYSAGRAGGTMTGVL SAANEKAVELFIDEKIGYLD	423
Q8W250_O. sativa	TFKAPDNVKYPSMDLAYSAGRAGGTMTGVL SAANEKAVELFIDEKIGYLD	423
Q9FXZ7_Z. mays	TFRAPDNVKYPSMDLAYSAGRAGGTMTGVL SAANEKAVELFIDEKISYLD	422
Q70EZ8_H. vulgare	TFKAPDNVKYPSVDLAYSAGRAGGTMTGVL SAANEKAVELFIDEKISYLD	433
Q9M4W4_C. roseus	TFKTPDNVKYPSMDLAYSAGRAGGTMTGVL SAANEKAVELFIDEKISYLD	424
Q5MJZ5_A. majus	TFKVPDNVKYPSMDLAYSAGRAGGTMTGVL SAANEKAVEMFIDEKISYLD	421
Q947C3_L. esculentum	TFKAPDNVKYPSMDLAYSAGRAGGTMTGVL SAANEKAVELFISERISYLD	425
Q6R3F4_P. barbatus	TFKTPDHVKYPSMALAYSAGRAGGTMTGVL SAANEKAVEMFINE-IGYLD	418
Q9XES0_M. piperita	PFKKPDNREIPAMDLYAAWKSRSMTGVL SAANEKAVEMFIDEKIGYLD	425
Q9XFS9_A. thaliana	TFKKPDNVKYPSMDLAYSAGRAGGTMTGVL SAANEKAVEMFIDEKISYLD	427
Q70KX8_P. x canescens	TFKAPDNVKYPSMDLAYSAGRAGGTMTGVL SAANEKAVEMFIDEKISYLD	422
Q9SP64_A. annua	TFKAPDNVKYPSMHLAYSAGRAGGTMTGVL SAANEKAVEMFLDEKIGYLD	421
Q8L6C5_S. rebaudiana	TFKAPDNVKYPSMDLAYSAGRAGGTMTGVL SAANEKAVEMFIDEKIQYLD	422
Q6EJD0_P. lobata	TFKAPDDKKFPSVNL CYAAGRAGGTMTGVL SAANEKAVEMFVEEKISYLD	420
Q9RCT1_S. leopoliensis	EFREPDKYPCMDLAYSAGRAGGTMPAVLNAANEQAVALLFLEE QIHFSD	355
	* * * : * . : * . * * : * * . * * . * * * * * : * . * * : *	

Fortsetzung der Abb. 3.8

Ergebnisse

Q6GZ43_T. cuspidata	IFKVVVEKTCDKHRNELVLRPSLEEIIHYDLWARKYAASLAQSS--LEPAMV	477
Q5J7B3_G. biloba	IFKVVEMTCDKHKNELVLQPSLEEIIYYDQWARQYATSLVRSS--LEPIAV	477
Q9FTN0_O. sativa j.	IFKVVVELTCDADRNELVTRPSLEEIIHYDLWAREYAASLQPST-GLSPVPV	473
Q8W250_O. sativa	IFKVVVELTCDADRNELVTRPSLEEIIHYDLWAREYAASLQPST-GLSPVPV	473
Q9FXZ7_Z. mays	IFKVVVELTCNAHRNELVTSPSLEEIVHYDLWARRYAASLQPSS-GLSPVPA	472
Q70EZ8_H. vulgare	IFKVVEMTCDADRNELVTSPSLEEIIHYDQWARKFAANLQPSSGRSPVLA	484
Q9M4W4_C. roseus	IFKVVVELTCAKHQAEVLTSPSLDEIIHYDLGARDYAASFQNSLG-LSPALV	474
Q5MJZ5_A. majus	IFKVVVELTCDRHRAELVTAPSLLEEIVHYDLWAREYAANVQPMAD-LSPALV	471
Q947C3_L. esculentum	IFKIVVELTCAKHREELVSSPSLEEIIHYDLWARDYAASLEPSSG-LSPALV	475
Q6R3F4_P. barbatus	IFKVVVELTCDKHRAELVASPSLEEIVHYDQWARDYAAELHRSAAAGLSPALV	469
Q9XES0_M. piperita	IFKVVVELTCDKHRSEMAVSPSLEEIVHYDQWARDYAATVLSKAG-LSPALV	475
Q9XFS9_A. thaliana	IFKVVVELTCDKHRNELVTSPSLEEIVHYDLWAREYAANVQLSSG-ARPVHA	477
Q70KX8_P. x canescens	IFKVVVELTCDKHQAEVTVSPSLEEIVHYDLWAREYAASLQHSSG-PSPVFA	472
Q9SP64_A. annua	IFKVVVELTCEKHQAEVLTAPSLLEEIIHYDLWAREYAASVKPSSSGLTPALV	472
Q8L6C5_S. rebaudiana	IFKVVVELTCAKHQSEVLTAPSLLEEIVHYDLWARDYAASLKSPPGLTAVLV	473
Q6EJD0_P. lobata	IFKVVVELTQEHQKELVVAPSLLEEIIHYDQWARQYAASLQKASSV-----	465
Q9RCT1_S. leopoliensis	IPRLIERACDRHQTEWQQQPSLDDILAYDAWARQFVQASYQSLESVV----	402
	* : : * : * * : * * * : : * : * * * : .	

Fortsetzung der Abb. 3.8

Im Phylogramm (Abb. 3.9) sind die Verwandtschaftsverhältnisse der DOXP-Reduktoisomerasen der unterschiedlichen Pflanzen übersichtlich dargestellt. Die Aminosäuren des putativen Transitpeptids (die ersten 45 Aminosäuren bei *P. x canescens*, gezählt ohne Lücken; siehe auch Abb. 4.1) wurden bei der Erstellung des Phylogramms nicht berücksichtigt. Die engste Verwandtschaft der PcDXR besteht zur DXR aus *A. thaliana*.

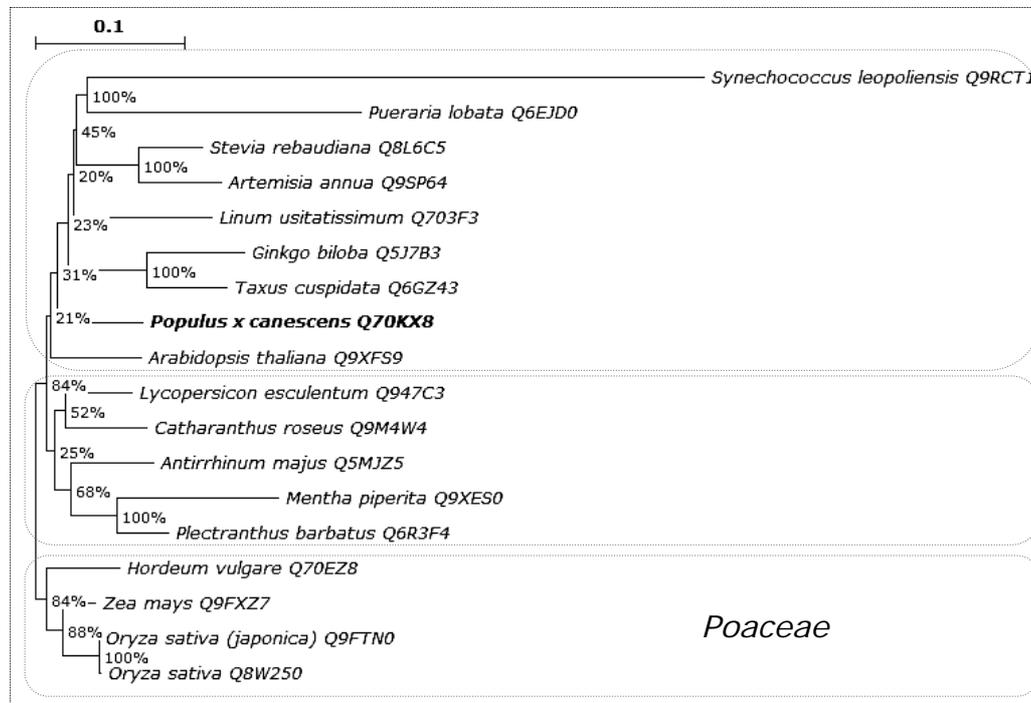


Abb. 3.9 Phylogentischer Baum basierend auf der Aminosäuresequenz der DXR verschiedener Pflanzen. Die Aminosäuresequenzen stammen aus der EMBL-Datenbank (<http://www.ebi.uniprot.org>), die Datenbank-Zugangsnummern sind neben den Artnamen angegeben. Der Baum wurde mittels *Neighbour-joining* Algorithmus mit Kimura-Korrektur im Softwareprogramm Treecon (1.3 b) erstellt. *Bootstrap*-Werte sind in Prozent angegeben. Der Maßstab entspricht 0,1 Änderungen pro Aminosäurenposition. Als Außen-gruppe des Phylogramms wurden die DXR aus der Familie der Poaceen gewählt.

Das vollständige PcDXR-Gen (vom Start- bis zum Stopcodon) wurde über die BP-Reaktion in den DONR221-Vektor kloniert und über die weitere LR-Reaktion schließlich in den pDEST17-Expressionsvektor eingeführt (s. 2.2.7.3.2). Die Kontrolle über den Erfolg der Klonierung wurde jeweils mittels PCR und anschließender Gelelektrophorese durchgeführt.

3.1.4 Heterologe Expression und Nachweis der Funktionalität

3.1.4.1 Indirekter Nachweis der Expression mittels SDS-PAGE

Nach erfolgreicher Insertion der PcDXR in den Expressionsvektor pDEST17 und Klonierung in *E. coli* BL21-Star (DE3), erfolgte die Expression des Enzyms und anschließend die Reinigung mittels Affinitätssäulenchromatographie (s. 2.4.2). Der Proteinextrakt der 1. Proteinreinigung, in dem nur sehr geringe Mengen an PcDXR gereinigt werden konnten, wurde als Kontrolle (Probe 0) im anschließenden Funktionstest eingesetzt. In der SDS-PAGE (s. Abb. 3.10) war an der Stelle des gesuchten Proteins nur ein leichter Schatten zu sehen. Die Bande der dxr aus *S. leopoliensis* (Probe S) wanderte etwas weiter im Gel als die PcDXR. Das bestimmte Molekulargewicht betrug ca. 50 kDa (402 aa) für die dxr aus *S. leopoliensis* und ca. 56 kDa, (472 aa, Probe E) für die PcDXR.

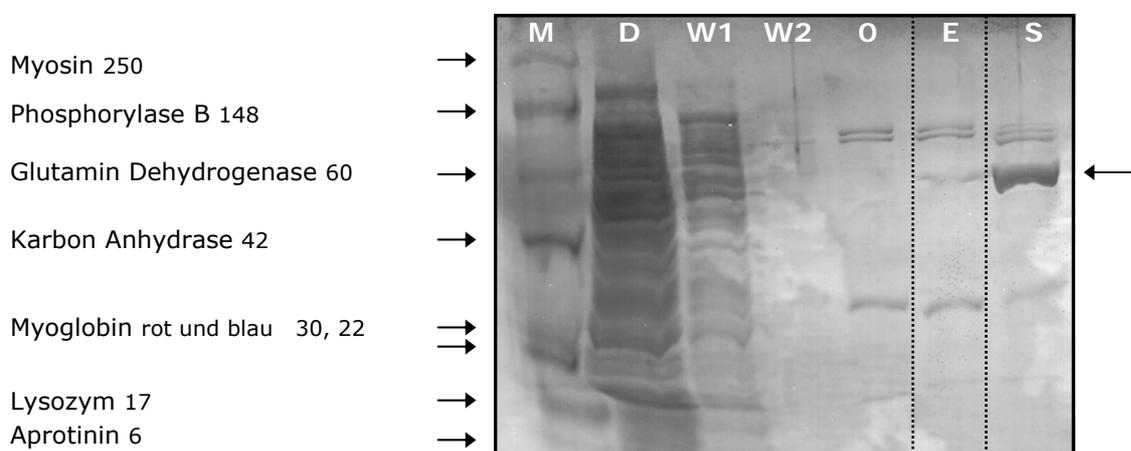


Abb. 3.10 SDS-PAGE (12%) der DXR-Reinigung. M bezeichnet den Protein Größenstandard von MultiMark® (Novex). Links sind die Proteine des Standards mit ihren Molekulargewichten in kDa angeführt. Mit D, W1, W2 und E sind die zusammengehörigen Reinigungsstufen des Enzyms aus der Graupappel: Durchfluss, Waschschrift 1 und 2 sowie Eluat bezeichnet, wobei die Probe E bereits die umgepufferte Probe darstellt. Die Proben 0 und S bezeichnen ebenfalls eluierte und umgepufferte Protein-Lösungen. In der Probe 0 war die Reinigung unzureichend, die PcDXR (Pfeil rechts) kommt in der Probe nur in sehr geringer Konzentration vor. Dieses Eluat wurde im Funktionstest als Kontrolle eingesetzt. Probe S bezeichnet die Reinigung aus *S. leopoliensis*.

Die Expressionsrate der *dxr* aus *S. leopoliensis* war im Gegensatz zur Expression des Graupappelgens wesentlich höher, was deutlich an der Intensität der Banden zu erkennen ist. Drei weitere Proteine, eine Doppelbande bei ca. 94 kDa und eine kleine Bande bei ca. 29 kDa erschienen bei jeder der Isolierungen. Die Proteine sind vermutlich bakteriellen Ursprungs und scheinen eine gewisse Affinität zur Ni-NTA-Säule zu besitzen.

3.1.4.2 Indirekter Funktionalitätsnachweis der DXR-Enzymaktivität durch die spektralphotometrische Messung der NADPH-Umsetzung

Die DXR, das 2. Enzym im DOXP-Stoffwechselweg, katalysiert die Isomerisierung und die Reduktion von DOXP zu MEP (s. Abb. 1.2). Dabei wird das Coenzym NADPH zu NADP^+ und H^+ oxidiert. Die Abnahme von NADPH durch die enzymatische Umsetzung der DXR wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen. In Abb. 3.11 ist die Abnahme des NADPHs durch die Umsetzung der verschiedenen Enzymextrakte dargestellt. Die Umsetzung des NADPHs durch die heterolog exprimierte, aus der Graupappel stammende PcDXR erfolgte mit ca. 41,5% der Umsatzrate der *dxr* aus *S. leopoliensis*, wobei die *dxr* aus der Blaualge in ca. zehnfach geringerer Konzentration in den Test eingesetzt wurde.

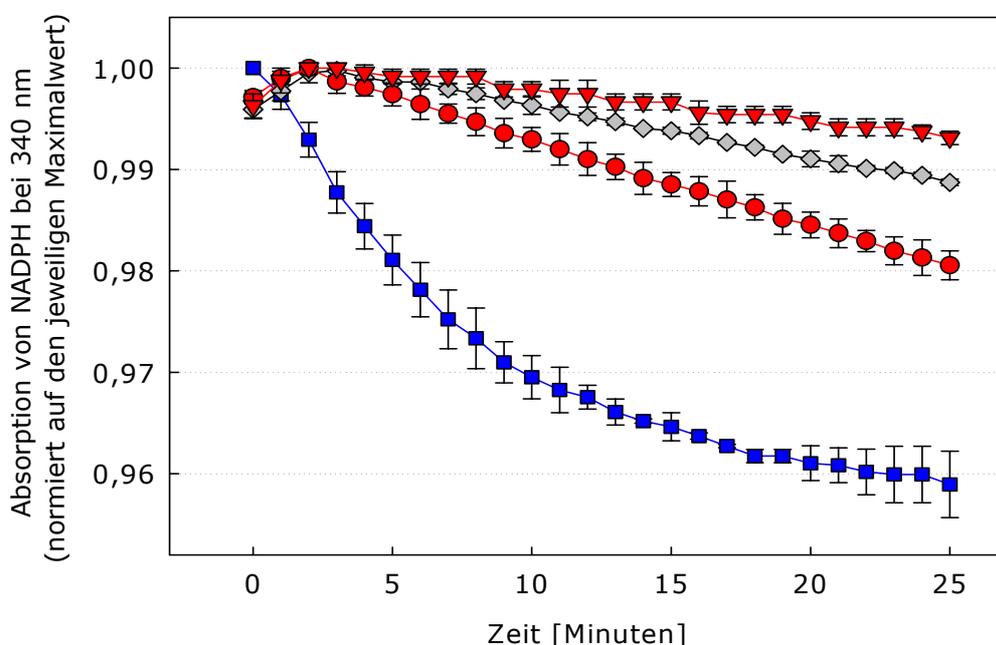


Abb. 3.11 Abnahme von NADPH durch die enzymatische Umsetzung der DXR, photometrisch gemessen bei 340 nm. Rote Kreise (-●-): Umsetzung des NADPHs durch die heterolog exprimierte PcDXR. Blaue Quadrate (-■-): Umsatzrate der *dxr* von *S. leopoliensis* (in ca. zehnfach geringerer Konzentration in den Test eingesetzt). Rote Dreiecke (-▼-): gehemmte NADPH-Umsatzrate durch die Zugabe von Fosmidomycin. Graue Raute (-◆-): Die Umsatzrate durch den Extrakt, der PcDXR nur in sehr geringer Konzentration enthielt (Probe 0).

Als Nachweis, dass die Umsetzung enzymatisch durch die DXR erfolgte, wurde eine spezifische Hemmung der PcDXR durch Zugabe von 1 mM Fosmidomycin durchgeführt. Durch die kompetitive Hemmung des Enzyms ging die NADPH-Abnahme auf 17,8% zurück. Zur weiteren Kontrolle wurde der Enzymextrakt einer unzureichenden Reinigung in den Test eingesetzt. Der Extrakt enthielt PcDXR nur in sehr geringer Konzentration (s. Abb. 3.10, Probe 0). Die Umsatzrate war ca. 41% der Umsatzrate der intakten PcDXR. Der genaue Anteil an PcDXR am Gesamtproteingehalt im gereinigten Proteinextrakt konnte mittels Bradford-Test nicht bestimmt werden. Deshalb wurde für die Berechnung der spezifischen Enzymaktivität die gesamte gemessene Proteinkonzentration des Rohextraktes herangezogen. Bezogen auf die im Bradford-Test ermittelte Proteinkonzentration beträgt die spezifische Aktivität der PcDXR mit 6,87 mkat pro kg Protein nur 4,9% der Blaualgen-dxr (139,97 mkat kg⁻¹ Protein). Die statistische Auswertung des Tests (s. Tab. 3.2) erfolgte für die Testvarianten mit der gleichen Enzymkonzentration, E, Fos und K. Die Hemmung der PcDXR durch Fosmidomycin war mit $p \leq 0,001$ erfolgreich. Im Ansatz der Kontrollprobe K wurde statt dem Substrat (DOXP) H₂O *bideest* zugefügt. Die Umsatzrate lag im Bereich der durch Fosmidomycin gehemmten Probe.

Tab. 3.2 Statistik des Funktionstests. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe einer einfaktoriellen ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur ermittelt. In der Probe Fos wurde die PcDXR durch Zugabe von Fosmidomycin gehemmt. Im Ansatz K fehlt das Substrat DOXP. Die Absorptionsänderungen (Δ -A) über 25 min bei 340 nm wurden für jeweils 3 Parallelmessungen (außer für E, n = 5) gemittelt und mit SD angegeben.

Probe	Δ -A MW	SD	Signifikanz	
			E	Fos
E	0.017	0.0015		
Fos	0.003	0.0012	0,001	
K	0.004	0.0045	0,003	1,000

3.2 Diurnaler Verlauf von Genexpression, Aktivität und Gehalt von Schlüsselmetaboliten des DOXP-Stoffwechselweges, des photosynthetischen Gaswechsels und der Isoprenemission bei der Graupappel

Die tageszeitliche Variation der physiologischen und biochemischen Kenngrößen der Isoprenemission wurde an 2-mal 2 aufeinander folgenden Tagen in den Sommermonaten der Jahre 2001 und 2002 ermittelt. Dabei wurden Netto-Assimilation, Isoprenemission (Abb. 3.12 und 3.14) und Transpiration an insgesamt 8 repräsentativen Bäumen (s. 2.1.1) gemessen, sowie die Stomatäre Leitfähigkeit und der interne CO_2 -Gehalt der Blätter berechnet (Tab. 6.1, S 166-167). Zudem wurden an jeweils 5 Zeitpunkten (kurz vor der Dämmerung, Vormittag, Mittag, Nachmittag und Nacht), welche die unterschiedlichen physiologischen Zustände und somit den internen diurnalen Rhythmus der Pflanzen widerspiegeln, an jedem Tag Blattmischproben von 4 Parallelpflanzen genommen. Aus diesen Blattproben wurden später der blattinterne DMADP-Gehalt, die Isoprensynthase- (ISPS) Aktivität (Abb. 3.13, 3.15) und im Juli 2001 sowie im August 2002 die Expression der *PcDXR* und der *PcISPS* (Abb. 3.16) ermittelt. Versuchsbegleitend wurden die PPFD und die Blatttemperatur in den Küvetten aufgezeichnet. In der Tabelle 6.1 sind die über den Probennahme Zeitraum von 15 min gemittelten Daten (\pm SD, n=15) dargestellt. Die starke Transpiration der eingespannten Pappelblätter führte vor allem im 1. Jahr teilweise zu Ausfällen der BINOS-Messgeräte. Die Daten der Transpiration und der Stomatären Leitfähigkeit folgten dem tageszeitlichen Verlauf von Licht und Temperatur ebenso, wie die Netto-Assimilation und die Isoprenemission. Während der Dunkelheit gingen alle Werte auf null zurück und die Blätter gingen von Assimilation zur Dunkelrespiration über. Die Blätter nahmen CO_2 auf und da die Stomata nur wenig geöffnet waren, kam es zur Akkumulation von CO_2 in den Blättern (C_i). Mit dem ersten Tageslicht stieg die Stoffwechselaktivität der Blätter an und erreichte mit dem Maximum der Lichtintensitäten zu Mittag oder am frühen Nachmittag ihre höchsten Werte. Während der Tageszeit-Probennahmen und der maximalen Stoffwechselaktivitäten waren die Stomata weiter geöffnet als in der Nacht und die blattinternen CO_2 -Konzentrationen sanken auf ca. ein Drittel der Nachtwerte ab. Der Anteil des assimilierten Kohlenstoffs, der in Form von Isopren emittiert wurde, betrug in beiden Jahren maximal 2,3% meistens jedoch unter 1%.

In den folgenden Abbildungen 3.12 bis 3.16 wurden die oben angeführten Daten grafisch dargestellt. Die Daten der Transpiration, der Stomatären Leitfähigkeit und des internen CO₂-Gehaltes wurden darin nicht gegenübergestellt. In den Abbildungen (s. auch Tab. 6.1) ist die statistische Auswertung der Daten zu den verschiedenen Probennahmezeitpunkten für die unterschiedlichen Parameter durch Kleinbuchstaben angegeben. Signifikante Veränderungen der Netto-Assimilations-, der Isoprenemissionsraten und der DMADP-Gehalte folgen den Änderungen der Licht- und Temperaturfaktoren. Keinerlei Unterschiede konnten in den Proben, die bei Dunkelheit genommen wurden, festgestellt werden. Die *in vitro* ISPS-Aktivität zeigte keine signifikante Veränderung während der Tagesgang-Messungen.

3.2.1 Tagesverlauf der physiologischen und biochemischen Parameter im Jahr 2001

Die beiden Pflanzen welche parallel in 2 Küvettensystemen (Abb. 3.12 links Küvette 1: A, C, E, G, I, K; rechts Küvette 2: B, D, F, H, J, L) gemessen wurden, wiesen im August nahezu identische Gaswechsellmesswerte auf. Die PPFD-Werte erreichten maximal 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mit Blattemperaturen bis zu 35°C um die Mittagszeit (A, B). Die Netto-Assimilation (C, D) verlief gemäß den Licht- und Temperaturwerten im diurnalen Verlauf und erreichte zu Mittag Maximalwerte von ca. 6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ am 2. Tag, bei etwas niedrigeren Licht- und Temperaturverhältnissen. Die Isoprenemission (E, F) erreichte am 1. Tag mittags ein Maximum von ca. 20 $\text{nmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ zusammen mit den höchsten Blattemperaturen und der höchsten PPFD.

Im September erreichte die PPFD bis zu 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei ähnlichen Blattemperaturen (G, H) wie im August. Die Netto-Assimilation (I, J) wies gemäß den Licht- und Temperaturverläufen einen diurnalen Verlauf auf, mit maximal 5 bzw. 3 (Küvette 2) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Trotz der hohen Licht- und Temperaturwerte erreichte die Isoprenemission (K, L) im September maximal 5 bis 10 $\text{nmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, wobei wie bei der Netto-Assimilation die Pflanzen in der 2. Küvette geringere Aktivität aufwies. Die statistische Auswertung zu den verschiedenen Probennahmezeitpunkten (Abb. 3.12, Kleinbuchstaben) zeigte, dass signifikante Maximalwerte der Netto-Assimilation, der DMADP-Gehalte sowie der Isoprenemissionsraten vor allem zu Mittag und am Nachmittag, zusammen mit den Licht- bzw. Temperaturmaxima auftraten.

Ergebnisse

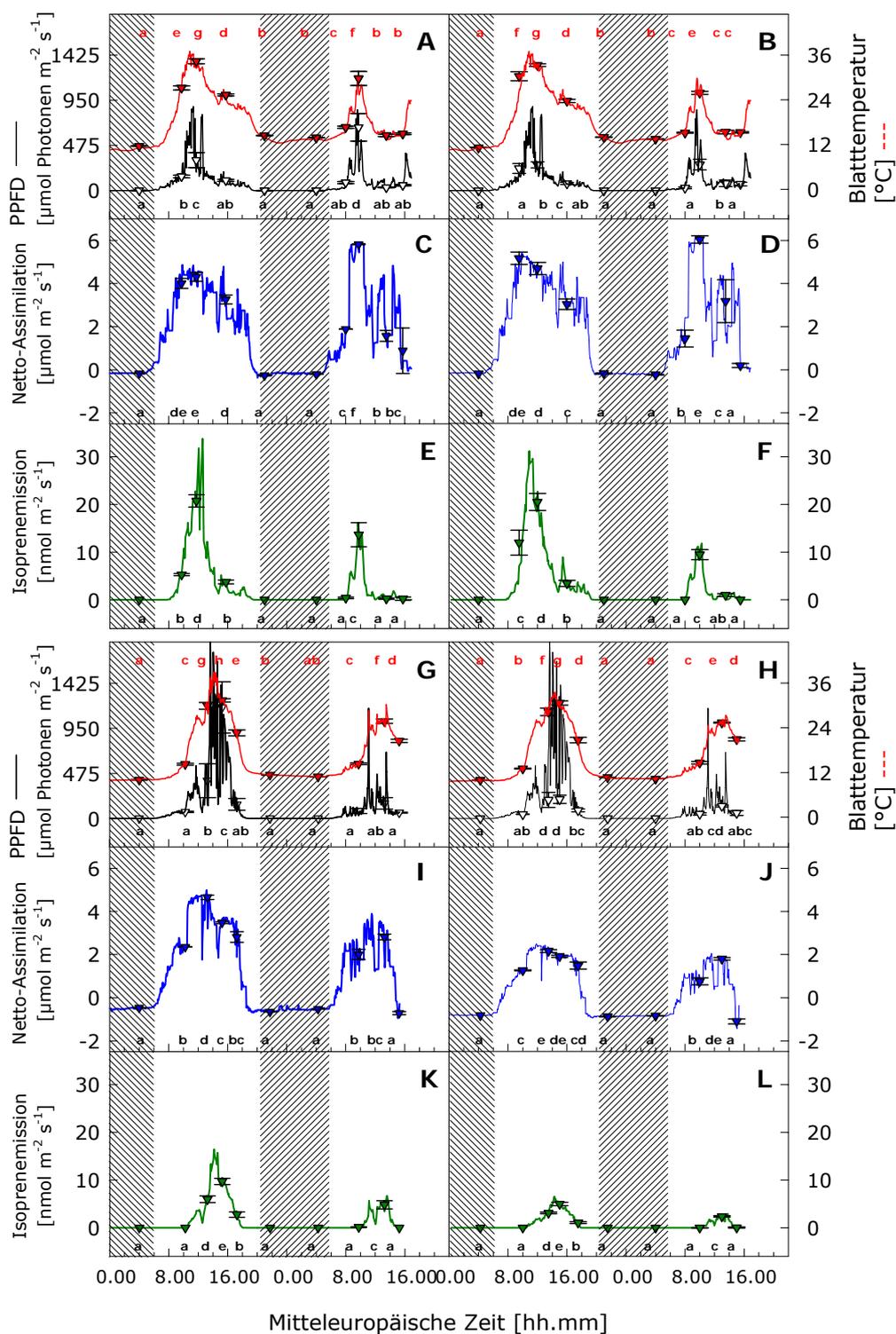


Abb. 3.12 Diurnaler Verlauf von Netto-Assimilation und Isoprenemission der Graupappel im Sommer 2001. A bis F repräsentieren die Messungen an 2 aufeinanderfolgenden Tagen an 2 Bäumen (Küvette 1: A, C, E; Küvette 2: B, D und F) im August, während die 2. Messreihe (G bis L) im September erfolgte. Als zeitliche Auflösung wurden 3 min gewählt. Die Symbole kennzeichnen den 15-min-Mittelwert (\pm SD, $n = 15$) der Probenentnahmen. In A, B und G, H sind die vorherrschenden Licht- (—) und Blatttemperaturverhältnisse (---) dargestellt, die Netto-Assimilation in C, D und I, J und die Isoprenemission der Blätter in E, F und K, L. Die Schattierung bezeichnet den Zeitraum der Dunkelheit. Unterschiedliche Kleinbuchstaben bezeichnen statistische Unterschiede der Daten zu den Probenentnahmezeitpunkten. Getestet wurde mittels ANOVA und nachfolgender Tukey-Korrektur für ($p \leq 0,01$, $n=15$).

Ergebnisse

Die DMADP-Gehalte (Abb. 3.13) zeigten einen ähnlichen Verlauf wie die Assimilationsraten und erreichten maximal ca. 110 pmol mg⁻¹ TG am Nachmittag des 1. Tages im August (A). Die Werte der 2. Messkampagne (B) im September 2001 waren um etwa 30-50% geringer als bei der 1. Versuchsreihe im August, obwohl die Klimadaten in etwa vergleichbar waren. Die *in vitro* ISPS-Aktivität (Abb. 3.13) erreichte im August (C) maximale Werte von ca. 12 nmol m⁻² s⁻¹, mit einem leicht ansteigenden Verlauf über die beiden Tage. Die Enzymaktivitäten lagen im September (D) um etwa 2 Drittel niedriger als im August und wiesen einen gleichbleibenden bzw. eher fallenden Verlauf auf. Aufgrund der großen Aktivitätsschwankungen der einzelnen Pflanzen, konnte kein statistisch signifikanter Trend nachgewiesen werden.

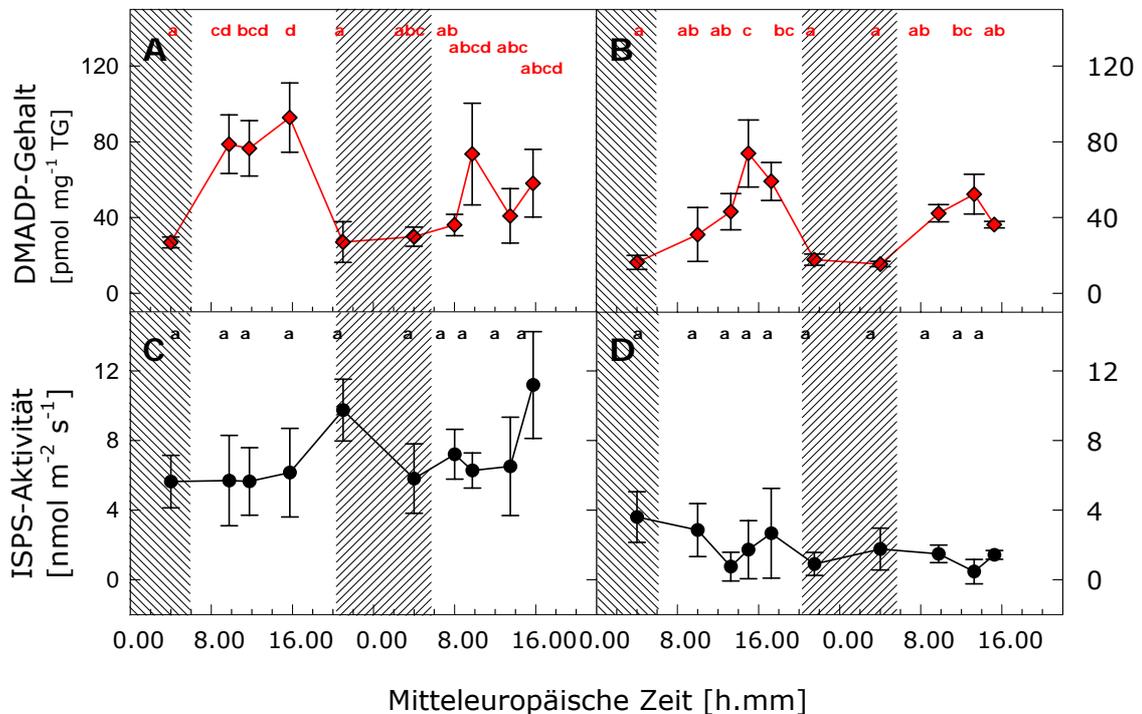


Abb. 3.13 Messungen der DMADP-Blattgehalte und der *in vitro* ISPS-Aktivität der Graupappel im Sommer 2001. A und C repräsentieren die Messungen an 2 aufeinanderfolgenden Tagen im August, während die 2. Messreihe (B und D) im September erfolgte. Die Symbole kennzeichnen den Mittelwert (\pm SD, $n = 4$) der Blattmischproben von 4 parallelen Bäumen ($n = 4$). In A und B sind die DMADP-Gehalte der Blätter dargestellt, in C und D die *in vitro* ISPS-Aktivitäten. Die Schattierung bezeichnet den Zeitraum der Dunkelheit. Verschiedene Kleinbuchstaben bezeichnen statistische Unterschiede der Daten zu den Probennahmezeitpunkten. Getestet wurde mittels ANOVA und nachfolgender Tukey-Korrektur für ($p \leq 0,05$, $n=4$).

3.2.2 Tagesverlauf der physiologischen und biochemischen Parameter im Jahr 2002

In Abbildung 3.14 sind die diurnalen Verläufe von Netto-Assimilation und Isoprenemission der Graupappel aus den Messungen im Jahr 2002 dargestellt. Am 1. Tag im Juli wurden kurzfristig mehr als $1400 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gemessen und Blatttemperaturen von ca. 35°C erreicht (A, B). Die Netto-Assimilation war bei der Pflanze in Küvette 1 (C) etwa doppelt so hoch und unregelmäßig im Verlauf, was auf ein Messproblem durch die hohen Transpirationwerte zurückzuführen ist. Die Assimilationsrate der 2. Pflanze (D) verlief im diurnalen Verlauf gemäß der Licht- und Temperaturwerte und erreichte Maximalwerte von ca. $7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ähnlich den Werten im Jahr 2001. Die Isoprenemission der Pflanze in Küvette 2 (F) war mit maximal ca. $14 \text{nmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ etwa doppelt so hoch wie die Emission der 1. Pflanze (E). Die Isoprenemissionraten waren jeweils am 1. Tag der Messkampagne am höchsten, zusammen mit hohen Licht- und Temperaturwerten.

Die Lichtintensitäten und Blatttemperaturen waren im August (G, H) um ca. ein Drittel geringer als im Juli, mit Maximalwerten am 2. Tag der Messkampagne. Die Netto-Assimilation (I, J) wies einen fast identischen diurnalen Verlauf mit maximal ca. $6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei beiden Pflanzen auf. Gemäß den höheren Licht- und Temperaturwerten erreichten die Isoprenemissionsraten (K, L) doppelt bis 3-fach höhere Werte am 2. Tag. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung für die Tagesgangmessungen im Jahr 2002 sind als Kleinbuchstaben dargestellt. Im Vergleich zum Jahr 2001, wurden, einhergehend mit den günstigeren Klimafaktoren, bereits am Vormittag signifikant höhere Werte gemessen.

Ergebnisse

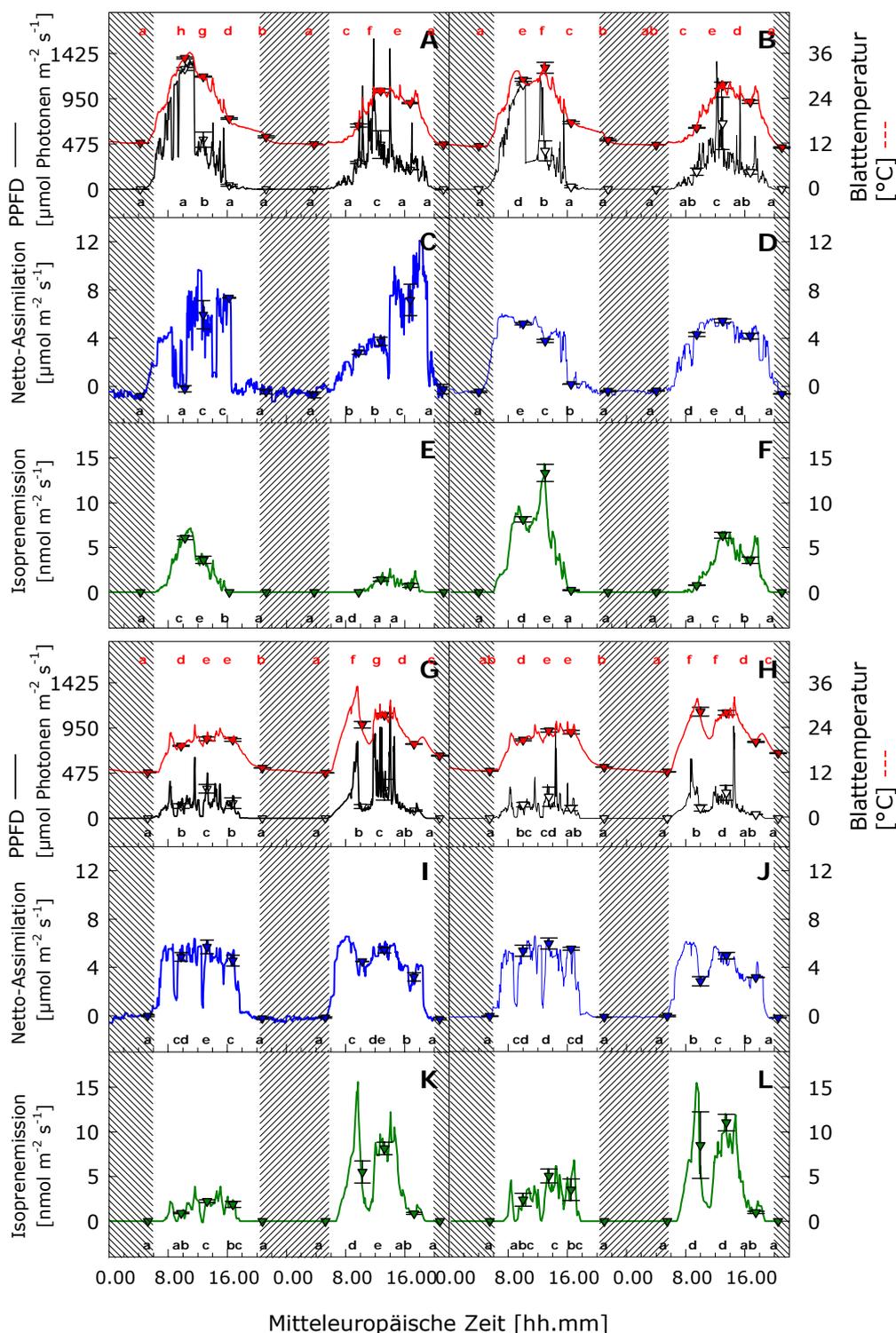


Abb. 3.14 Diurnaler Verlauf von Netto-Assimilation und Isoprenemission der Graupappel im Sommer 2002. A bis F repräsentieren die Messungen an 2 aufeinanderfolgenden Tagen an 2 Bäumen (Küvette 1: A, C, E; Küvette 2: B, D und F) im Juli, während die 2. Messreihe (G bis L) im August erfolgte. Als zeitliche Auflösung wurden 3 Minuten gewählt. Die Symbole kennzeichnen den 15-Minuten-Mittelwert (\pm SD, $n = 15$) der Probennahmen. In A, B und G, H sind die vorherrschenden Licht- (—) und Blatttemperaturverhältnisse (--) dargestellt, die Netto-Assimilation in C, D und I, J und die Isoprenemission der Blätter in E, F und K, L. Die Schattierung bezeichnet den Zeitraum der Dunkelheit. Unterschiedliche Kleinbuchstaben bezeichnen statistische Unterschiede der Daten zu den Probennahmezeitpunkten. Getestet wurde mittels ANOVA und nachfolgender Tukey-Korrektur für ($p \leq 0,01$, $n=15$).

Abbildung 3.15 zeigt den diurnalen Verlauf von DMADP-Gehalt (A, B) und ISPS-Aktivität (C, D) der Graupappel im Jahr 2002. Der DMADP-Gehalt der Blätter war im Jahr 2002 höher als 2001 mit Maximalwerten um $200 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ TG}$ im August (B). Die ISPS-Aktivität war in beiden Messkampagnen leicht steigend (nicht signifikant) und ebenfalls im August (D) höher als im Juli (C), obwohl die PPFD und die Blatttemperaturen im Juli (Abb. 3.14 A, B) wesentlich höher waren.

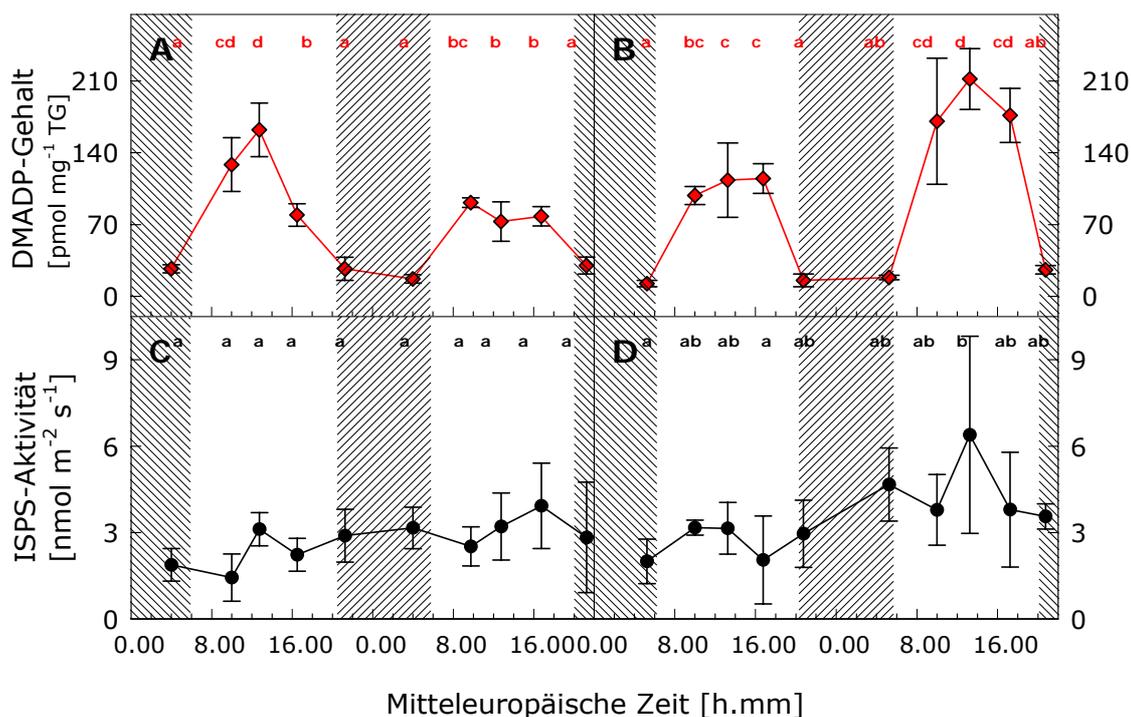


Abb. 3.15 Messungen der DMADP-Blattgehalte und der *in vitro* ISPS-Aktivität der Graupappel im Sommer 2002. A und C repräsentieren die Messungen an 2 aufeinanderfolgenden Tagen im Juli, während die 2. Messreihe (B und D) im August erfolgte. Die Symbole kennzeichnen den Mittelwert (\pm SD, $n = 4$) der Blattmischproben von 4 parallelen Bäumen ($n = 4$). In A und B sind die DMADP-Gehalte der Blätter dargestellt, in C und D die *in vitro* ISPS-Aktivitäten. Die Schattierung bezeichnet den Zeitraum der Dunkelheit. Verschiedene Kleinbuchstaben bezeichnen statistische Unterschiede der Daten zu den Probenahmezeitpunkten. Getestet wurde mittels ANOVA und nachfolgender Tukey-Korrektur für ($p \leq 0,05$, $n=4$).

3.2.3 Expression von *PcDXR* und *PcISPS* im diurnalen Verlauf

Die Transkriptgehalte von *PcDXR* und *PcISPS* wiesen im Jahr 2001 am 1. Untersuchungstag keinen ausgeprägten diurnalen Verlauf auf (Abb. 3.16 A). Dahingegen konnte am 2. Tag für die Transkriptgehalte der *PcISPS* ein signifikanter Anstieg der Werte nach Tagesbeginn festgestellt werden, mit einem Maximum der *PcISPS*-Expression bereits zum Zeitpunkt der 2. Probenahme, am Vormittag. Die Anzahl der Genkopien der *PcDXR* pro Genkopie *Pc β -TUB* war im Vergleich zur Menge der *PcISPS*-Kopien um etwa ein Drittel geringer. Obwohl die

Lichtintensitäten wie auch die Temperatur am 2. Tag der 1. Messkampagne im Verhältnis zum 1. Tag geringer waren, stieg die Transkriptmenge der *PcDXR* zum 2. Tag hin an und auch das Maximum der *PcISPS*-Kopienzahl war am 2. Tag etwa 5-mal so hoch wie am Vortag.

Die relativen Kopienzahlen der *PcDXR* zeigten im Jahr 2002 (Abb. 3.16 B) keine charakteristische Veränderung im Tagesverlauf, während die relativen Transkriptgehalte der *PcISPS* signifikant höhere Werte zum Zeitpunkt der Vormittags- und Mittagsprobenahmen aufwiesen. Die relativen Transkriptgehalte waren etwa 10-mal so hoch wie die im Jahr 2001 gemessenen Kopienzahlen.

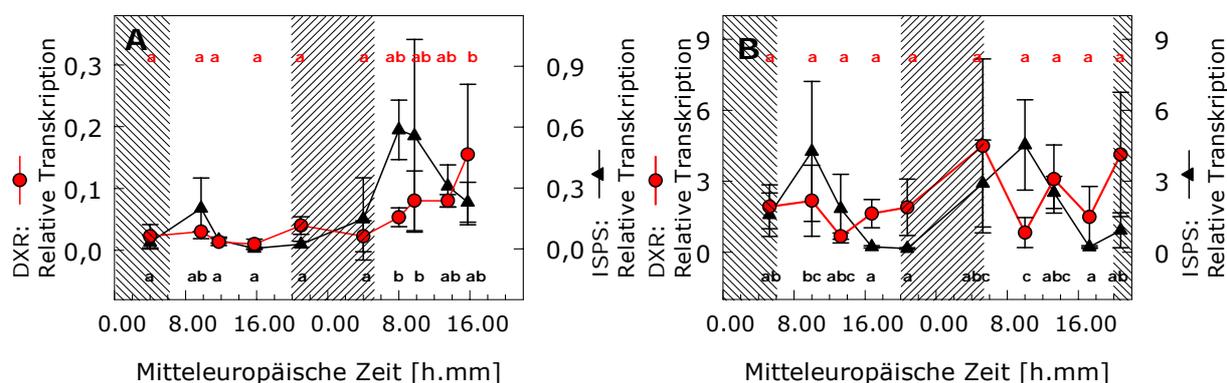


Abb. 3.16 Expressionsanalyse der *PcDXR* und *PcISPS* Gene im diurnalen Verlauf im Sommer 2001 (A) und 2002 (B). Die Anzahl der cDNA-Kopien (C) der *PcDXR* (●) und *PcISPS* (▲) sind relativ zur Anzahl der Genkopien des „Housekeeping“-Gens *Pcβ-Tubulin* (β -*TUB*) ausgedrückt. Die Schattierung bezeichnet den Zeitraum der Dunkelheit. Unterschiedliche Kleinbuchstaben bezeichnen statistische Unterschiede der Daten zu den Probenahmezeitpunkten. Getestet wurde mittels ANOVA und nachfolgender Tukey-Korrektur für ($p \leq 0,05$, $n=4$).

3.2.4 Zusammenhänge der gemessenen Parameter

In Tabelle 3.3 sind die linearen Korrelationen der Tagesgangdaten der Graupappel für die Jahre 2001 und 2002, angeführt. Die Daten aller 5 Probenzeitpunkte und aller Parallelen wurden zur Ermittlung der Zusammenhänge herangezogen. Parameter, die in ihren Werten einen tageszeitlichen Verlauf aufwiesen (PPFD, Blattemperatur, Netto-Assimilation, C_i , Transpiration, DMADP- Gehalte im Blatt und Isoprenemission) zeigten alle einen höchst signifikanten Zusammenhang zueinander. Die Stomatäre Leitfähigkeit (g_{H_2O}) hingegen, korrelierte nur mit der Transpiration. Die *in vitro* ISPS-Aktivität (ISPS_A) wies keinen Zusammenhang mit den Gaswechsel- oder Klimadaten auf. Die relativen Kopienzahlen der *PcDXR* waren schwach mit den Transkriptgehalten der *PcISPS* (Ex_*ISPS*) korreliert.

Einen schwachen Zusammenhang wiesen auch die Transkriptgehalte der *PcISPS* (Ex_*ISPS*) zu den DMADP-Gehalten der Blätter auf. Zum Zeitpunkt der

Ergebnisse

Probennahme bestand kein Einfluss von Lichtintensität und Blatttemperatur auf die Expression von *PcDXR* und *PcISPS*.

Tab. 3.3 Korrelationen aller Tagesgangdaten der Graupappel. Mit *r* ist der lineare Korrelationsfaktor nach Pearson angeführt. Die Messwerte zum Zeitpunkt der Probennahmen der insgesamt 8 Bäume wurden zur Ermittlung der Zusammenhänge herangezogen. Statistisch signifikante Zusammenhänge auf dem Signifikanzniveau von 0,01 bzw. 0,05 sind grau hinterlegt.

	Ass.	PPFD	Blattt.	Iso_Em.	Transp.	gH ₂ O	Ci	DMADP	ISPS_A	Ex_DXR
PPFD	r = 0,756 p = 0,000 n = 75									
Blattt.	r = 0,764 p = 0,000 n = 78	0,784 0,000 74								
Iso_Em.	r = 0,687 p = 0,000 n = 77	0,680 0,000 73	0,813 0,000 76							
Transp.	r = 0,729 p = 0,000 n = 76	0,766 0,000 71	0,742 0,000 74	0,702 0,000 73						
gH ₂ O	r = 0,210 p = 0,083 n = 69	0,245 0,051 64	0,029 0,818 67	0,139 0,264 66	0,512 0,000 69					
Ci	r = -0,892 p = 0,000 n = 71	-0,684 0,000 66	-0,861 0,000 69	-0,689 0,000 68	-0,612 0,000 71	-0,001 0,991 65				
DMADP	r = 0,722 p = 0,000 n = 39	0,683 0,000 36	0,704 0,000 38	0,652 0,000 37	0,820 0,000 37	0,290 0,102 33	-0,615 0,000 34			
ISPS_A	r = 0,186 p = 0,271 n = 37	-0,450 0,800 31	0,074 0,670 36	0,184 0,289 35	-0,75 0,666 35	-0,014 0,940 30	-0,139 0,449 32	0,138 0,422 36		
Ex_DXR	r = -0,178 p = 0,465 n = 19	-0,122 0,629 18	-0,266 0,270 19	-0,124 0,625 18	-0,110 0,655 19	-0,255 0,322 17	0,229 0,362 18	0,019 0,941 18	-0,426 0,088 17	
Ex_ISPS	r = 0,320 p = 0,169 n = 20	0,295 0,220 19	0,116 0,626 20	0,382 0,106 19	0,452 0,045 20	0,147 0,573 17	-0,080 0,745 19	0,496 0,031 19	-0,298 0,230 18	0,472 0,041 19

In der untenstehenden Abb. 3.17 sind einige ausgewählte Korrelationen der Tabelle 3.3 abgebildet. Die Zusammenhänge wurden mittels linearer bzw. polynomischer Funktionen 2. Ordnung dargestellt. Zum Zeitpunkt der Probennahme bestand kein Einfluss von Lichtintensität (A) und Blatttemperatur (B) auf die Transkriptgehalte von *PcDXR* und *PcISPS*. Die relativen cDNA-Kopienzahlen der beiden Gene (C) wiesen eine schwache Korrelation auf. Die Menge an *PcISPS*-Transkript hatte keinen signifikanten Einfluss auf die *in vitro* Enzymaktivität der *PcISPS* (D), wies jedoch einen signifikanten positiven Zusammenhang mit dem DMADP-Gehalt in den Blättern auf (E). Die Netto-

Assimilation korrelierte hochsignifikant mit dem DMADP-Gehalt der Blätter (F) und mit der Isoprenemission (H), die auch beide untereinander hochsignifikant korreliert waren (G). Die Stomatäre Leitfähigkeit hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Isoprenemission (I).

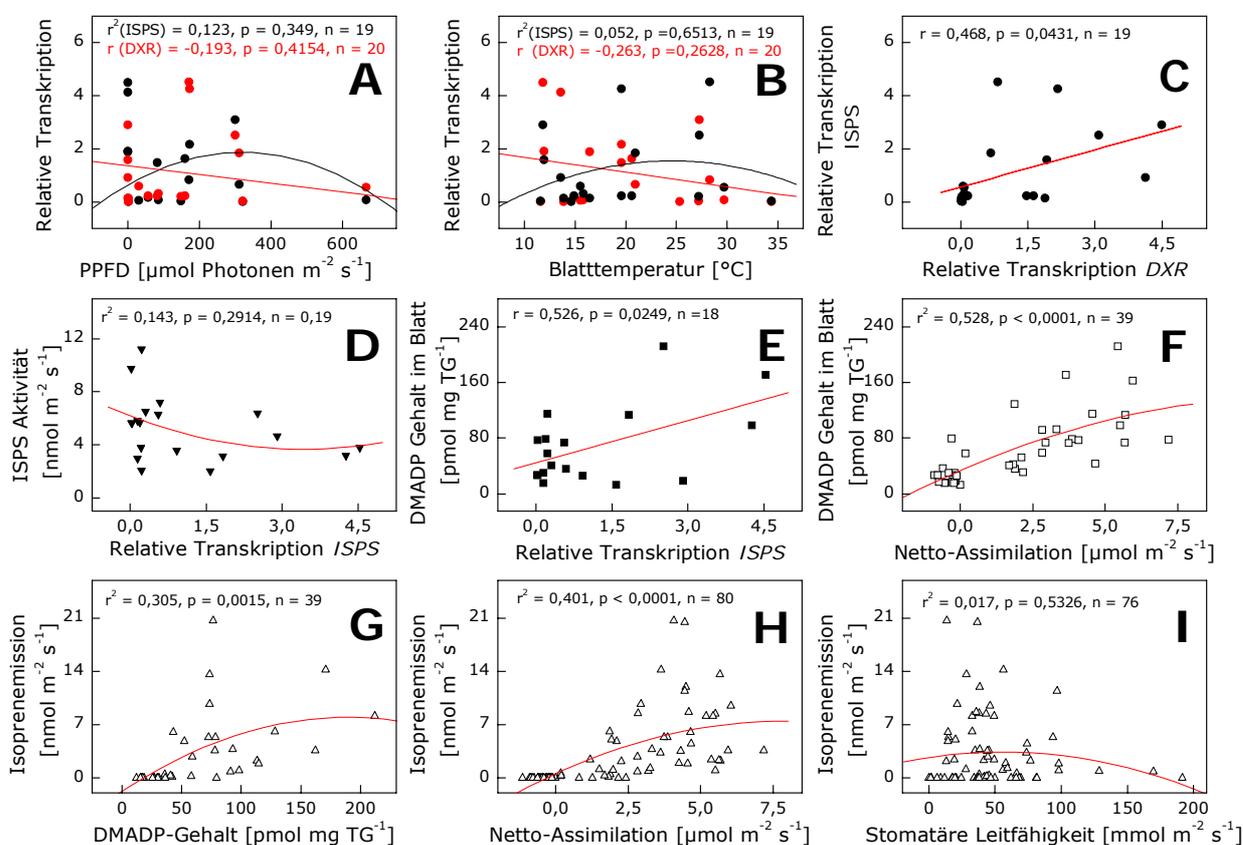


Abb. 3.17 Grafische Darstellung der für die Regulation der Isoprenemission interessanten Korrelationen bei der Graupappel. Die Zusammenhänge wurden mittels linearer (A und B für die *PcDXR*, C, E) bzw. polynomischer Funktionen (2. Ordnung) dargestellt. Einfluss von Lichtintensität (A) und Blatttemperatur (B) auf die relativen Transkriptmengen von *PcDXR* (rot) und *PcISPS* (schwarz). C: Korrelation zwischen den Expressionen. D: Korrelation der *PcISPS* cDNA-Genkopien zur *in vitro* *PcISPS*-Aktivität und zum DMADP-Gehalt (E). F: Korrelation der Netto-Assimilation zum DMADP-Gehalt der Pappelblätter. G bis I zeigen die Zusammenhänge der Isoprenemission mit den Parametern *PcISPS*-Aktivität, DMADP-Gehalt im Blatt, Netto-Assimilation und Stomatäre Leitfähigkeit.

3.2.5 Licht- und Temperaturabhängigkeit

Für die Entwicklung wie auch die Validierung von prozessorientierten Modellen, welche möglichst genaue Vorhersagen über die Isoprenemission treffen sollen, ist es notwendig, die spezifischen Abhängigkeitsfunktionen für Blatttemperatur und Licht für Transpiration, Netto-Assimilation und Isoprenemission für jede Pflanzenart zu kennen. Zur Erstellung der Kurven für die Graupappel wurden die Daten aus den Licht- und Temperaturabhängigkeitsversuchen auf $1000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bzw. $303,16 \text{ K}$ ($= 30^\circ\text{C}$) normiert.

Zur Beschreibung der Lichtabhängigkeit der Isoprenemission (Abb. 3.18 A) wurde der Guenther-Algorithmus (1997) herangezogen. Die Sättigungskurve der Assimilation (Abb. 3.18 B) wurde mit Hilfe einer Boltzmann-Kurvenanpassung (Origin[®] 7SR1, Northhampton, MA, USA) beschrieben. Die Isoprenemission und die Netto-Assimilation befinden sich bereits bei etwa $500 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ im Bereich der Sättigung. Aufgrund der hohen Transpirationsraten der Pappelblätter konnte keine Lichtabhängigkeit für die Transpiration ermittelt werden.

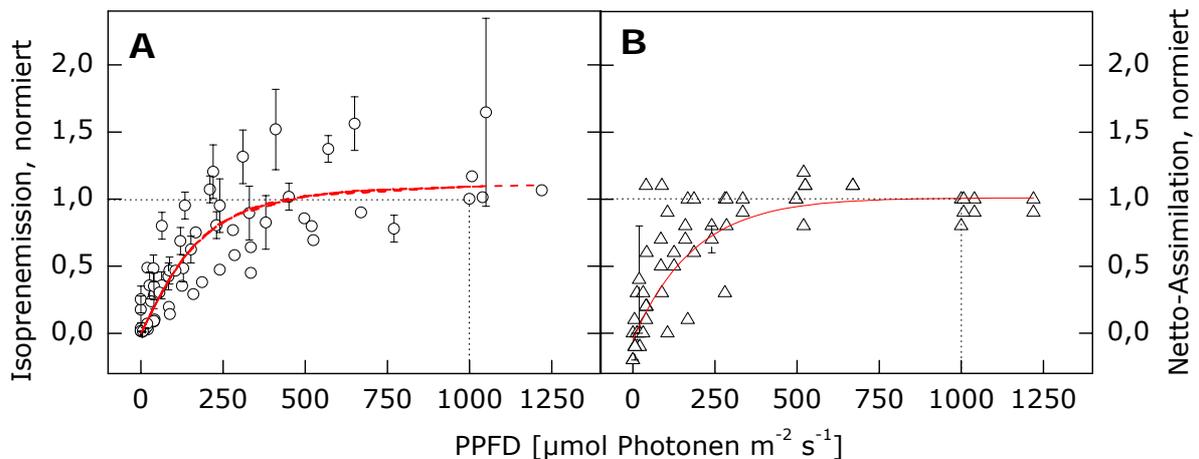


Abb. 3.18 Lichtabhängigkeit von Isoprenemission und Assimilation der Graupappel. Zur Erstellung der Kurven wurden die Daten aus den Lichtabhängigkeitsversuchen auf $1000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ normiert. Die gepunktete Linie weist auf die Standardwerte hin. Die Lichtabhängigkeit der Isoprenemission (A, $n = 6$ Bäume) wurde mit Hilfe des Guenther-Algorithmus (1997) beschrieben und für die Lichtabhängigkeit der Assimilation (B, $n = 6$ Bäume) wurde die Sättigungskurve mit Hilfe einer Boltzmann-Kurvenanpassung beschrieben. Das Erreichen des Gleichgewichtszustandes der Stoffwechselgrößen wurde bei jeder neuen Stufe abgewartet und dann für 15 min (Symbole bezeichnen die Mittelwerte des Zeitintervalls \pm Standardabweichung, $n = 15$) aufgezeichnet.

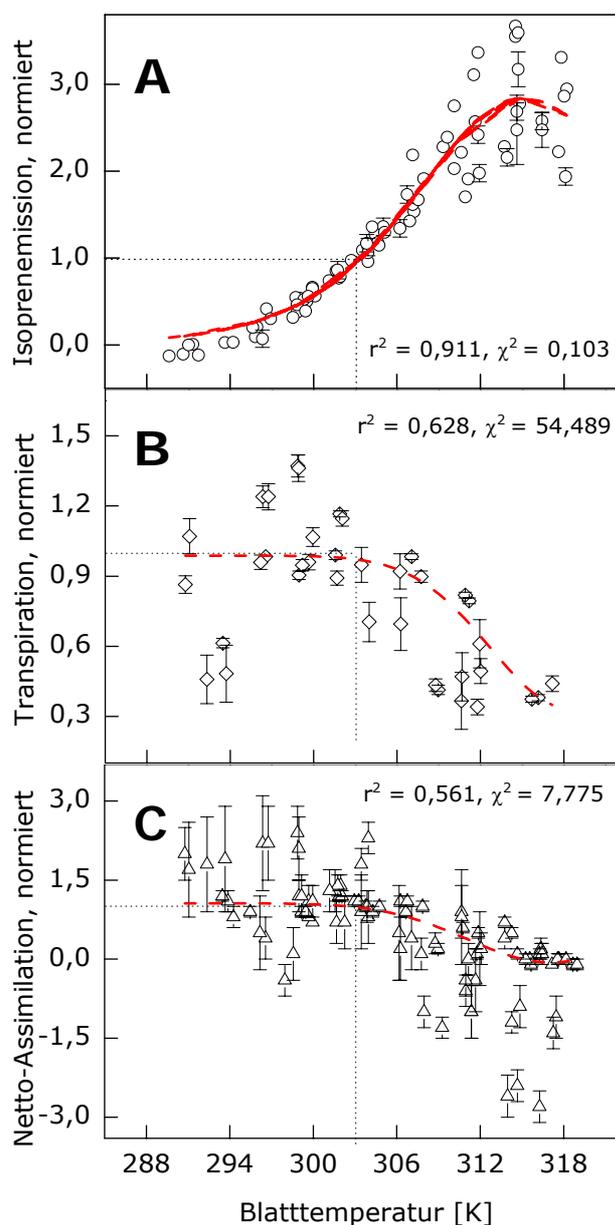


Abb. 3.19 Temperaturabhängigkeit von Isoprenemission, Transpiration und Assimilation der Graupappel. Zur Erstellung der Kurven wurden die Daten aus den Temperaturabhängigkeitsversuchen auf 303,16 K (= 30°C) normiert. Die gepunktete Linie weist auf die Standardwerte hin. Die Temperaturabhängigkeit für die Isoprenemission (A, n = 7 Bäume) wurde mit Hilfe der Guenther-Funktion, die Transpiration (B, n = 4 Bäume) und Assimilation (C, n = 7 Bäume) mit Hilfe einer Gauss-Funktion beschrieben. Das Erreichen des Gleichgewichtszustandes der Stoffwechselgrößen wurde bei jeder neuen Stufe abgewartet und dann für 15 min (Symbole bezeichnen die Mittelwerte des Zeitintervalls \pm Standardabweichung, n = 15) aufgezeichnet.

Mit Hilfe der oben beschriebenen Licht- und Temperaturabhängigkeiten der Isoprenemissionen wurden die Graupappel spezifischen Korrekturfaktoren für den Guenther-Algorithmus (1997) ermittelt (s. 2.7.12). Die ermittelten Faktoren für die PPFD sind für $\alpha = 0,00446$ und $cli = 1,12114$ (aus n = 6 Bäume für 2001 und 2002) und für die Temperatur für $ct1 = 134910,59$, $ct2 = 209014,29$ und $Tm = 313,096$ (aus n = 7 Bäume für 2001 und 2002).

Die Temperaturabhängigkeiten (Abb. 3.19) wurden im Fall der Isoprenemission mit Hilfe der Guenther-Funktion und für die Transpiration und Assimilation mit Hilfe einer Gauss-Funktion (Origin® 7SR1, Northhampton, MA, USA) beschrieben. Von 17°C bis ca. 39°C stieg die Isoprenemission um das 3-fache ihres Ausgangswertes an, erreichte ihr Maximum bei ca. 42°C und nahm dann, bei ca. 45°C sehr stark ab. Die Transpirations- und Assimilationsdaten waren von 17°C bis 30°C beinahe gleichbleibend, mit einem schwachen Maximum bei etwa 27°C. Bis 45°C verringerte sich die Transpiration bis zu einem Viertel des Ausgangswertes und die Blätter begannen zum Teil bereits ab 36°C zu respirieren.

3.2.5.1 Temperaturabhängigkeit von PcISPS-Aktivität und DMADP-Gehalt in Graupappelblättern

Zur Beschreibung der DMADP-Synthese und der PcISPS-Aktivität im Blatt in Abhängigkeit von der Blatttemperatur, wurde der DMADP-Gehalt und die PcISPS-Aktivität in 24 Blättern von 4 Bäumen bestimmt. Die Blätter wurden nach Erreichen verschiedener Temperaturstufen (ca. 20, 30 und 40°C) weitere 15 min bei einer PPFD von 700 bzw. 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ inkubiert. Die Daten der beiden Lichtstufen wurden zusammengefasst, da keine Unterschiede festgestellt werden konnten. Gleichzeitig erfolgte die Aufzeichnung von Isoprenemission und Netto-Assimilation. In der untenstehenden Abbildung 3.20 sind die Temperaturabhängigkeiten gegenübergestellt. Die Enzymaktivität der PcISPS wurde *in vitro* unter Standardbedingungen bestimmt und basierend auf der Temperaturabhängigkeit der *in vitro* Enzymaktivität (MAGEL *et al.*, 2006) entsprechend den gemessenen Blatttemperaturen im Blatt umgerechnet.

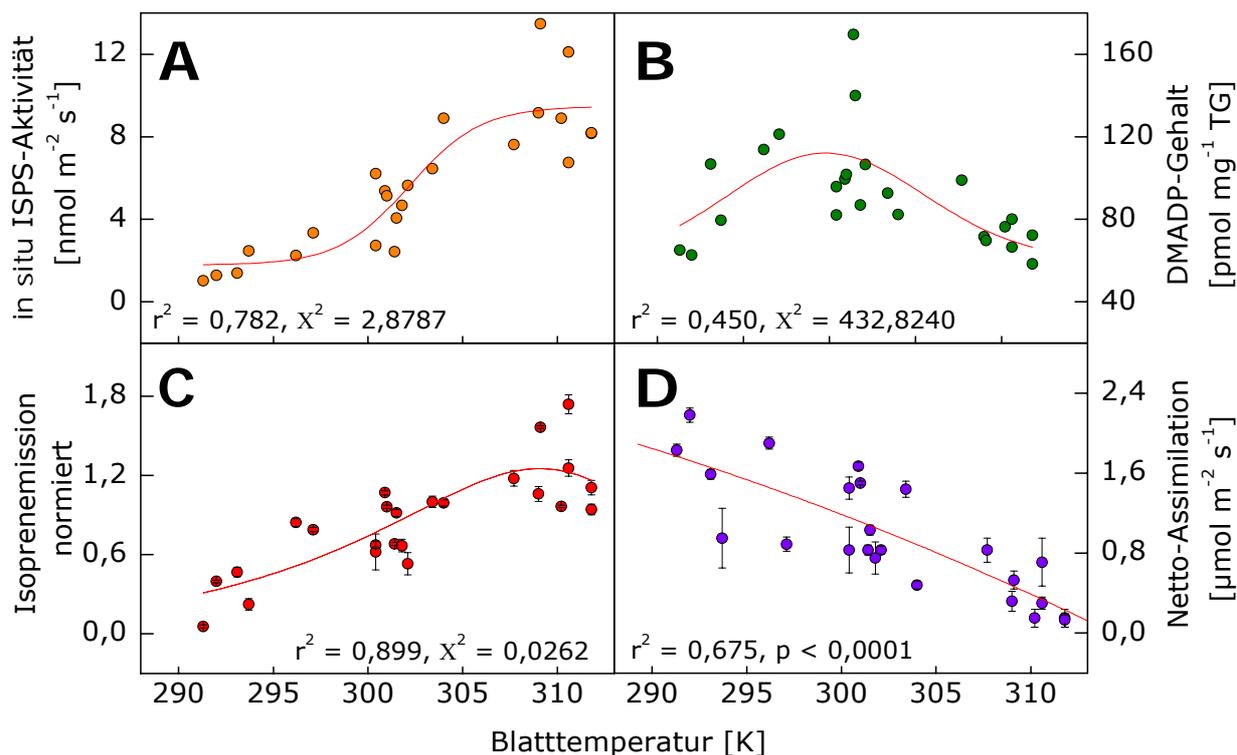


Abb. 3.20 Temperaturabhängigkeit von *in situ* PcISPS-Aktivität (A; Boltzmann-Funktion), DMADP-Gehalt im Blatt (B; LogNorm-Funktion), Isoprenemission (C, normiert, 1 entspricht $12,87 \text{ nmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei $303,4 \text{ K}$ bzw. $30,2^\circ\text{C}$ Blatttemperatur; Guenther-Algorithmus) und Netto-Assimilation (D, Polynomisch 2. Ordnung) der Graupappel. Das Erreichen des Gleichgewichtszustandes der Stoffwechselgrößen wurde bei jeder neuen Stufe abgewartet und dann für 15 Minuten aufgezeichnet. Die Symbole für Isoprenemission und Netto-Assimilation bezeichnen die 15-min-Mittelwerte ($\pm \text{SD}$).

Der Kurvenverlauf der *in situ* PcISPS-Aktivität wies einen sigmoidalen Kurvenverlauf (nach Boltzmann, Origin[®] 7SR1, Northhampton, MA, USA) ähnlich der Isoprenemissionsrate auf. Der Verlauf des DMADP-Gehaltes in den Pappelblättern wurde mittels Log Normal Funktion (Origin[®] 7SR1, Northhampton, MA, USA) beschrieben (Ab. 3.20 B). Maximale DMADP-Konzentrationen traten im Blatt bei ca. 27°C auf. Bei 37°C sank der Gehalt in den Blättern annähernd auf den Ausgangswert von ca. 70 pmol mg⁻¹ TG). Die Isoprenemission (Ab 3.20 C) hingegen stieg in sigmoidem Verlauf nach der Funktion von Guenther auch bei Erreichen einer Blattemperatur von 37°C (s. auch Abb. 3.19) weiterhin an. Die Netto-Assimilation folgte von ca. 18-37°C Blattemperatur abnehmend einer Boltzmannfunktion (Abb. 3.20 D).

3.3 Photosynthetischer Gaswechsel und Monoterpenemission bei der Steineiche

3.3.1 Gaswechsel und Monoterpenemission im Tagesverlauf

Nach dem gleichen Versuchsablauf wie in 2.7 beschrieben, wurden in den Sommermonaten 2002 und 2003 an 2-mal 2 aufeinanderfolgenden Tagen Gaswechsel und Monoterpenemission diesjähriger Blätter an insgesamt 8 repräsentativen Steineichen (s. 2.1.2) gemessen sowie an jeweils 5 Zeitpunkten an jedem Tag Blattmischproben des aktuellen Blattjahrgangs von 4 Parallelpflanzen genommen (Tab. 6.1, S 168-169, Abb. 3.21 und 3.23). Während der tageszeitlichen Probenahmen und der maximalen Stoffwechselaktivitäten waren die Stomata weiter geöffnet als in der Nacht und die blattinternen CO₂-Konzentrationen sanken auf ca. ein Drittel der Nachtwerte ab.

In den Abbildungen 3.21 und 3.23 wurden die diurnalen Verläufe von Netto-Assimilation, Monoterpenemission sowie Lichtintensitäten und Blatttemperaturen (s. auch Tab. 6.1) grafisch dargestellt. Die Lichtintensitäten und Temperaturen (3.21 A und B) der Messkampagne im Juli 2002 waren mit Maxima von etwa 1100 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und mehr als 36°C sehr hoch. Die Steineichenblätter in Küvette 1 wiesen geringe Netto-Assimilationsraten (C) von maximal 0,8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf, während in der 2. Küvette (D) etwa doppelt so hohe Werte gemessen werden konnten. Die Maximalwerte wurden bereits am Vormittag erreicht, zur Mittagszeit, bei höchsten Licht- und Temperaturwerten war in der 2. Küvette ein signifikanter Einbruch der Netto-Assimilation um ca. 50%, die sogenannte

Ergebnisse

Mittagsdepression, zu sehen. Am Nachmittag stiegen die Werte wieder um ca. 25% an. Die Summe der Monoterpenemission folgte dem diurnalen Verlauf der PPFD und Blatttemperaturen. Die Steineiche der 2. Küvette (F) emittierte am 2. Tag der Messkampagne maximal $1,8 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, etwa ein Drittel höher als bei der 1. Steineiche (E). Um eine statistische Aussage über die Diurnalität der Monoterpenemission machen zu können, wurden mehrere Messwerte zu 10 Gruppen zusammengefasst, welche den Probennahmezeitpunkten ungefähr entsprachen. Dies war notwendig, da durch die verwendete Messtechnik (s. 2.7.7) zum jeweiligen Probennahmezeitpunkt immer nur ein Wert existierte. Daher ist diese Statistik weder in den Abbildungen 3.21 und 3.23 noch in der Tabelle 6.2 enthalten, wird aber in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Im Vergleich zur Messkampagne im Juli blieben die Licht- und Temperaturwerte (3.21 G und H) Ende August 2002 mit maximal ca. $600 \text{ } \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ und Blatttemperaturen bis 30°C sehr niedrig. Die Netto-Assimilationsraten (I, J) beider Pflanzen wiesen einen diurnalen Verlauf mit deutlichem Einbruch der Raten um die Mittagszeit auf. Es konnten Assimilationsraten von maximal $2,4 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ gemessen werden. Aufgrund messtechnischer Probleme fehlen die Messwerte der Monoterpenemission der Messkampagne im August.

Tab. 3.4 Statistik über den diurnalen Verlauf der Summe der Monoterpenemission bei der Steineiche. Verschiedene Kleinbuchstaben bezeichnen statistische Unterschiede der Daten zum ungefähren Probennahmezeitpunkt. Getestet wurde mittels ANOVA und nachfolgender Tukey-Korrektur für ($p \leq 0,05$, $n \geq 3$ (harmonisches Mittel); * nur einzelne Messwerte)

Mess- kampagne	Probennahmen										
	KV	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2002	1	a	a	a	a	-*	-*		b	a	-*
Juli	2	a	ab	ab	ab	-*	-*	bc	c	a	-*
2003	1	a	b	ab	ab	-*	a	a	ab	ab	-*
Juli	2	ab	c	abc	abc	-*	a	abc	abc	bc	-*
2003	1	-*	a	a	a	-*	a	a	a	a	-*
September	2	-*	ab	ab	ab	a	-*	ab	b	ab	-*

Ergebnisse

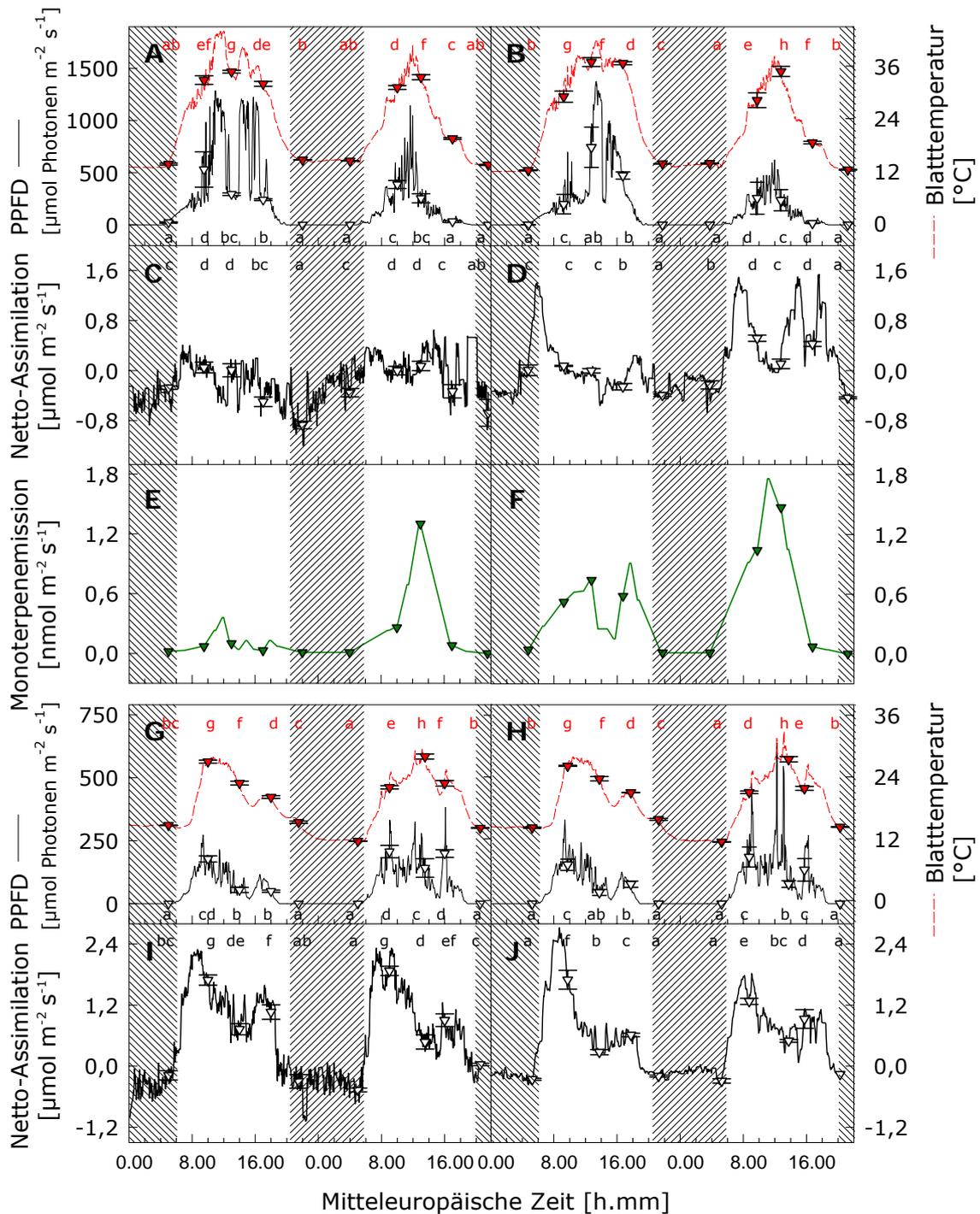


Abb. 3.21 Tagesgang Messungen am Neuaustrieb der Steineichen im Sommer 2002. Linke Abbildungen (A-I) repräsentieren die Messreihe im Juli, rechts (B-J) die 2. Messreihe im August. Die Gaswechsellmessungen wurden an 2 repräsentativen Bäumen durchgeführt und als 3-Minuten Mittelwerte dargestellt. Die Symbole bezeichnen den 15-Minuten-Mittelwert (\pm SD, $n = 15$) der Probenahmen. In A und B sind die vorherrschenden Licht- (—) und Blatttemperaturverhältnisse (---) dargestellt. C und D: Netto-Assimilation. Die Summe der Monoterpenemission E und F. Die Schattierung bezeichnet den Zeitraum der Dunkelheit. Verschiedene Kleinbuchstaben bezeichnen statistische Unterschiede der Daten zu den Probenahmezeitpunkten. Getestet wurde mittels ANOVA und nachfolgender Tukey-Korrektur für ($p \leq 0,01$, $n=15$).

Ergebnisse

Die Monoterpenemission der Steineichenblätter (Tab. 3.5) setzte sich zum größten Anteil aus α -Pinen (26% tagsüber, nachts 10%) und β -Pinen/Sabinen (17% tagsüber, nachts 22%) zusammen. Der Anteil von Isopren lag bei ca. 18% tagsüber, während die sehr geringe VOC-Gesamtemission in der Nacht zu 45% aus Isopren bestand. Der Myrcen-Anteil nahm von 2% während der Nachtprobenahmen auf 12% während der Lichtperiode zu. Der Anteil von Camphen war in der Nacht null und stieg untertags auf 13% der Gesamtemission an. Der Anteil von etwa 7% Limonen blieb fast unverändert während des Untersuchungszeitraumes von 48 h, während der Anteil von p-Cymol (5%) in der Nacht halb so hoch war. Der Anteil von Δ -3-Caren lag bei ca. 1%.

Tab. 3.5 Zusammensetzung der von der Steineiche emittierten VOC, ermittelt aus den Tagesgangmessungen 2002 und 2003. Tag- (n = 35, n = 43 am 22./ 23.07. 2003) und Nachtwerte (n = 8) wurden gemittelt und prozentual berechnet.

Zusammensetzung	01./ 02.07. 2002				22./ 23.07. 2003				03./ 04.09. 2003			
	Tag	± SD	Nacht	± SD	Tag	± SD	Nacht	± SD	Tag	± SD	Nacht	± SD
β -Pinen,Sabinen	17	10,1	22	15,2	26	13,1	8	7,0	35	11,8	18	7,7
α -Pinen	26	7,9	10	7,5	27	13,0	6	7,2	32	3,5	8	2,5
Myrcen	12	10,5	2	5,2	3	2,3	2	3,4	14	6,3	0	0,0
Isopren	18	13,5	45	28,8	33	29,1	71	14,6	6	5,8	25	5,6
Limonen	7	3,7	6	5,1	4	2,3	6	3,2	5	2,5	12	2,8
p-Cymol	5	3,1	2	2,4	3	2,2	2	1,0	4	2,4	5	1,9
Camphen	13	16,6	0	0,3	2	1,9	0	0,8	3	2,7	0	0,0
Ethylbenzol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	0,8	3	1,9	1	0,8	24	7,8
Δ -3-Caren	1,3	1	0,6	1,8	1	0,4	1	1,4	1	0,8	9	3,0

Die DMADP-Gehalte der Steineichenblätter (Abb. 3.22 A, B) zeigten keinen ausgeprägten diurnalen Verlauf und erreichten mit maximal ca. 150 pmol mg⁻¹ TG in der 2. Messreihe etwas höhere Werte als im Juli. Die *in vitro* gemessenen Monoterpensynthase-Aktivitäten (Mono-TPS; Abb 3.22 C, D) für die Synthese von Sabinen und α -Pinen lagen mit ca. 4 nmol m⁻² s⁻¹ ca. 4-mal so hoch wie die für β -Pinen, Myrcen und Limonen und etwa zwanzigmal so hoch wie die für α -Thujen und Camphen. Die Summe der Mono-TPS-Aktivitäten erreichte in der 1. Messkampagne (C) bereits am Vormittag an beiden Tagen ein Maximum von ca. 14 nmol m⁻² s⁻¹. Im Gegensatz zu den geringfügig höheren DMADP-Gehalten, waren die Summen der Aktivitäten in der 2. Messserie (D) niedriger, bei ca. 10 nmol m⁻² s⁻¹. Die negative Korrelation (s. Tab. 3.6) der beiden Parameter spiegelte sich auch deutlich im Verlauf der beiden Kurven im August wieder. Die geringe Mono-TPS-Aktivität am Vormittag des 1. Tages ging mit einem Maximum des DMADPs im Blatt einher, während gleichzeitig mit etwas höheren Enzymaktivitäten

um die Mittagszeit niedrigere DMADP-Gehalte beobachtet werden konnten. Der reziproke Verlauf der beiden Kurven ist am 2. Tag nicht mehr so deutlich zu erkennen. Aufgrund der hohen Streuung der Einzelwerte der Parallelbäume ist jedoch weder für die Mono-TPS-Aktivitäten noch für die DMADP-Blattgehalte ein signifikanter Tagesgang nachzuweisen.

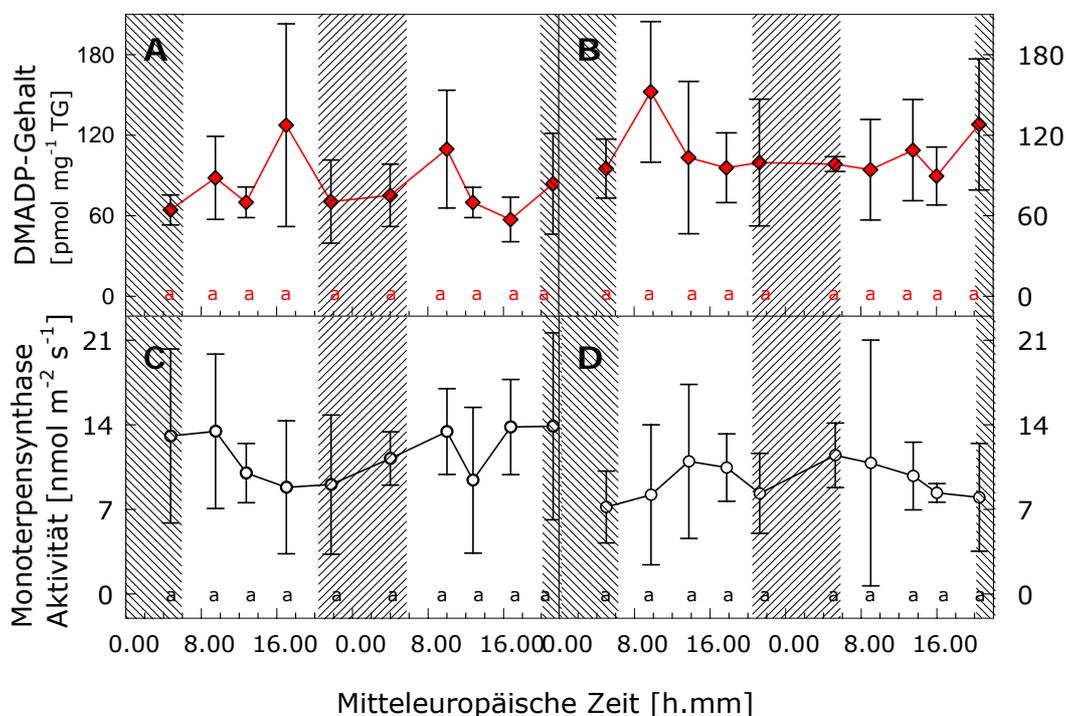


Abb. 3.22 DMADP-Gehalt und *in vitro* Mono-TPS-Aktivität der Steineichen im Sommer 2002. Linke Abbildungen (A, C) repräsentieren die Messungen im Juli, rechts (B und D) die 2. Messreihe im August. Die Symbole bezeichnen den Mittelwert (\pm SD, $n = 4$) der Blattmischproben, die von 4 parallelen Bäumen zu den Probennahmezeitpunkten genommen wurden. A und B zeigt den DMADP-Gehalt der Blätter, C und D die Summe der Mono-TPS-Aktivitäten. Die Schattierung bezeichnet den Zeitraum der Dunkelheit. Unterschiedliche Kleinbuchstaben bezeichnen statistische Unterschiede der Daten zu den Probennahmezeitpunkten. Getestet wurde mittels ANOVA und nachfolgender Tukey-Korrektur ($p \leq 0,05$, $n=4$).

Die klimatischen Parameter der Messkampagnen 2003 (Abb. 3.23, A, B und G, H) waren im Vergleich zum Jahr 2002 deutlich höher, mit PPFD Werten von bis zu $1500 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und Blatttemperaturen höher als 35°C . Im Juli war die Netto-Assimilation (C, D) bei beiden Pflanzen vergleichbar mit den Verläufen 2002, mit maximalen Werten von ca. $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und deutlichen Einbrüchen der Werte zur Mittagzeit. Die Summe der Monoterpenemissionsraten (E, F) waren bei beiden Pflanzen mit maximal $1,5 \text{ nmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ etwa gleich hoch wie im Juli 2002. Anfang September lagen die Netto-Assimilationsraten (I, J) fast doppelt so hoch und waren damit in der Größenordnung vergleichbar mit der Assimilation der Graupappel (s. 3.2.1).

Ergebnisse

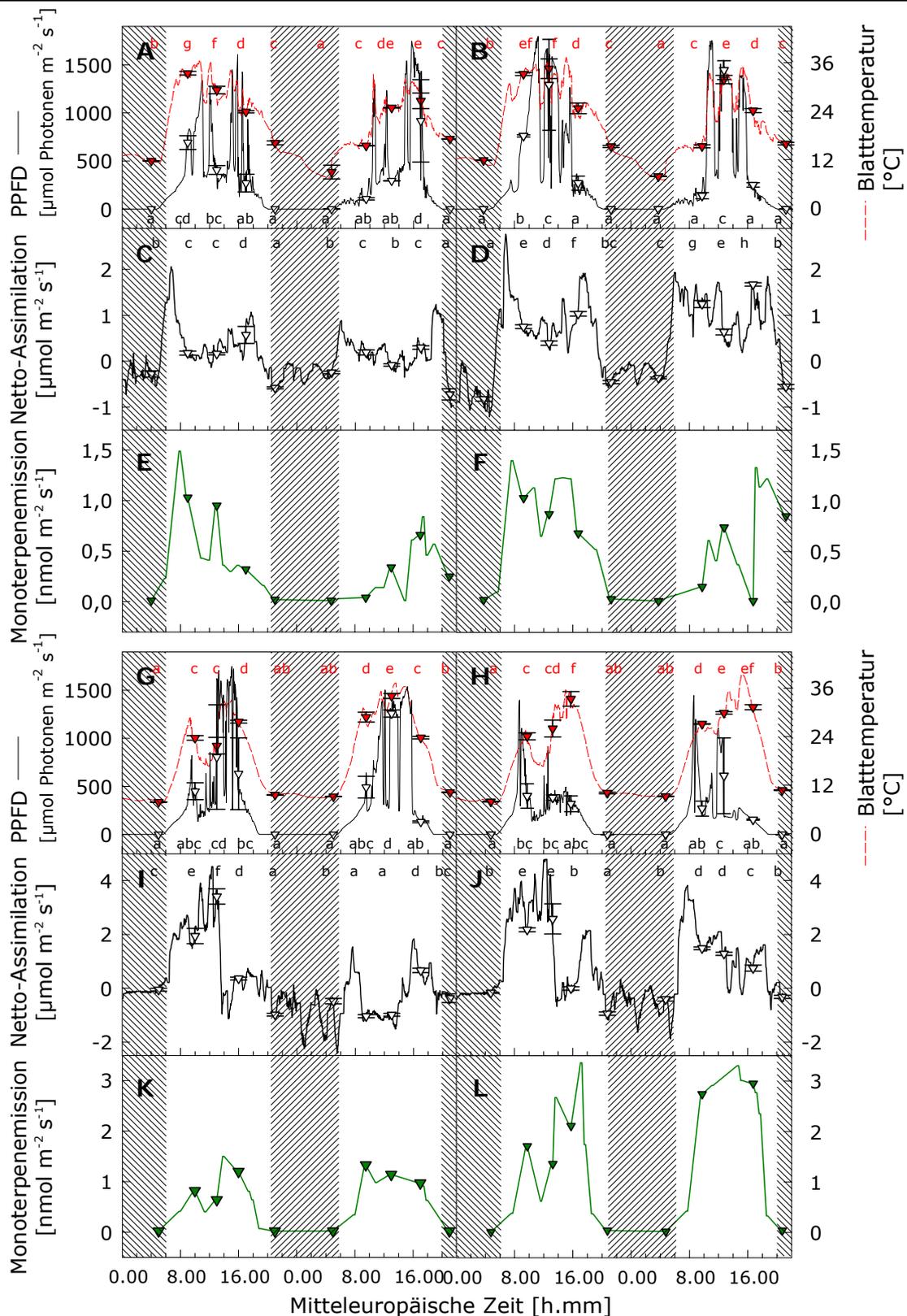


Abb. 3.23 Tagesgang Messungen am Neuaustrieb der Steineichen im Sommer 2003. Linke Abbildungen (A-K) repräsentieren die Messungen im Juli, rechts die 2. Messreihe (B-L) im September. Die Gaswechsellmessungen wurden an 2 repräsentativen Bäumen durchgeführt, gemittelt und als 3-Minuten Mittelwerte dargestellt. Die Symbole bezeichnen den 15-Minuten-Mittelwert (\pm SD, $n = 15$) der Probenahmen. In A und B sind die vorherrschenden Licht- (—) und Blattemperaturverhältnisse (---) in den Küvetten dargestellt. C, D und I, J: Netto-Assimilation. Summe der Monoterpenemission (E, F und K, L) Die Schattierung bezeichnet den Zeitraum der Dunkelheit. Getestet wurde mittels ANOVA und nachfolgender Tukey-Korrektur für ($p \leq 0,01$, $n=15$).

Ergebnisse

Die Monoterpenemissionsraten der 2. Pflanze (L) waren etwa doppelt so hoch wie bei der 1. Steineiche (K), mit maximalen Werten von ca. $3 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Im diurnalen Verlauf folgte die Emission den Licht- und Temperaturverläufen. Die ungleichmäßigen Meßwerte der PPFD der beiden Küvetten kann durch die unterschiedliche Plazierung des Lichtsensors in den Küvetten erklärt werden. Dies kam dadurch zustande, dass bei der Steineiche mehrere Blätter des Neuaustriebes in die Küvette eingespannt werden mussten und so eine gleiche Plazierung der Sensoren unmöglich machte.

Die DMADP-Gehalte der Blätter waren im September (Abb. 3.24 A), mit Maximalwerten von bis zu $600 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ TG}$, zum Teil doppelt so hoch wie Ende Juli (B), im Vergleich zu 2002 waren die DMADP-Konzentrationen beider Messkampagnen ca. 3-mal so hoch.

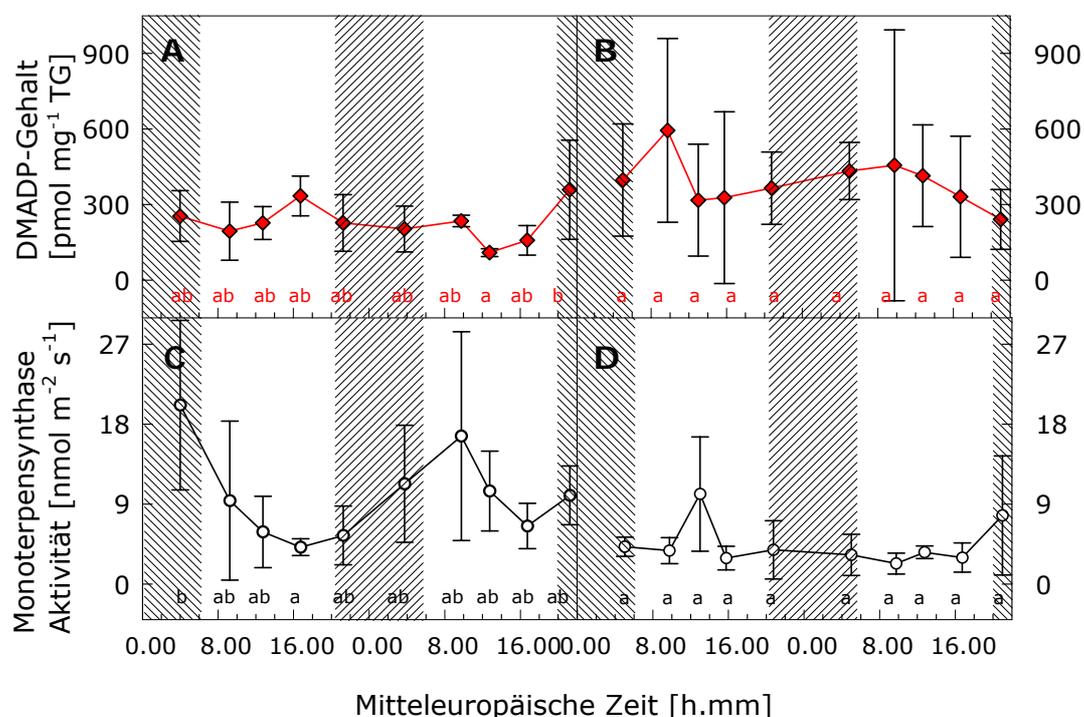


Abb. 3.24 DMADP-Gehalt und *in vitro* Mono-TPS-Aktivität der Steineichen im Sommer 2003. Linke Abbildungen (A, C) repräsentieren die Messungen im Juli, rechts (B und D) die 2. Messreihe im September. Die Symbole bezeichnen den Mittelwert (\pm SD, $n = 4$) der Blattmischproben, die von 4 parallelen Bäumen zu den Probennahmezeitpunkten genommen wurden. A und B zeigt den DMADP-Gehalt der Blätter, C und D die Summe der Mono-TPS-Aktivitäten. Die Schattierung bezeichnet den Zeitraum der Dunkelheit. Unterschiedliche Kleinbuchstaben bezeichnen statistische Unterschiede der Daten zu den Probennahmezeitpunkten. Getestet wurde mittels ANOVA und nachfolgender Tukey-Korrektur ($p \leq 0,05$, $n=4$).

Die Mono-TPS-Aktivitäten (Abb. 3.24 C und D) waren geringfügig höher als 2002. Während die Aktivität im Juli bereits in den frühen Morgenstunden bzw. am Vormittag Maximalwerte von ca. $18 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ erreichte, lagen die Maxima der

Ergebnisse

2. Messkampagne zu Mittag bzw. am Abend mit ca. $9 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ vergleichsweise niedrig, was mit der negativen Korrelation zum DMADP-Gehalt der Blätter übereinstimmt, der in der Messreihe vom September ca. doppelt so hoch wie im Juli lag. Der Summenparameter der Mono-TPS-Aktivität wies, wie im Jahr 2002, eine hohe Variabilität zwischen den Einzelpflanzen auf. Es konnte dadurch kein signifikanter diurnaler Verlauf festgestellt werden. Im Juli zeichnete sich jedoch tendentiell ein Maximum der Mono-TPS-Aktivität mit Werten von mehr als $18 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ am frühen Morgen ab. Die Aktivitäten sanken bis zum Nachmittag um ca. 50%, bei gleichzeitig erhöhten Monoterpenemissions-raten. Der Verlauf der Mono-TPS-Aktivität war im September wenig ausgeprägt und allgemein niedriger, mit maximal ca. $10 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. In den Steineichenblättern konnte weder 2002 noch 2003 ISPS-Aktivität nachgewiesen werden.

Tab. 3.6 Korrelationen der Tagesgangdaten der Steineiche. Mit r ist der lineare Korrelationsfaktor nach Pearson angeführt. Die Messwerte zum Zeitpunkt der Probenahmen der insgesamt 8 Bäume wurden zur Ermittlung der Zusammenhänge herangezogen. Statistisch signifikante Zusammenhänge sind grau hinterlegt.

	Ass.	PPFD	Blattt.	Mono Em.	Transp.	gH ₂ O	Ci	DMADP
PPFD	$r = 0,344$ $p = 0,004$ $n = 67$							
Blattt.	$r = 0,391$ $p = 0,001$ $n = 72$	$0,781$ $0,000$ 54						
Mono Em	$r = 0,460$ $p = 0,018$ $n = 26$	$0,643$ $0,000$ 49	$0,671$ $0,000$ 54					
Transp.	$r = 0,796$ $p = 0,000$ $n = 69$	$0,474$ $0,000$ 71	$0,490$ $0,000$ 76	$0,785$ $0,000$ 52				
gH ₂ O	$r = 0,821$ $p = 0,000$ $n = 69$	$0,280$ $0,000$ 69	$0,211$ $0,065$ 77	$0,577$ $0,001$ 29	$0,883$ $0,000$ 76			
Ci	$r = -0,684$ $p = 0,000$ $n = 69$	$-0,496$ $0,000$ 69	$-0,589$ $0,000$ 74	$-0,523$ $0,000$ 48	$-0,511$ $0,000$ 70	$-0,439$ $0,000$ 71		
DMADP	$r = -0,019$ $p = 0,911$ $n = 37$	$0,134$ $0,430$ 37	$-0,084$ $0,608$ 40	$0,373$ $0,046$ 29	$0,158$ $0,343$ 38	$0,008$ $0,962$ 38	$0,254$ $0,135$ 36	
Mono-TPS	$r = -0,071$ $p = 0,681$ $n = 36$	$0,039$ $0,823$ 35	$-0,078$ $0,642$ 38	$-0,442$ $0,021$ 27	$-0,255$ $0,134$ 36	$-0,103$ $0,550$ 36	$-0,044$ $0,803$ 35	$-0,581$ $0,000$ 30

In Abb. 3.25 sind einige für die Regulation der Monoterpenemission interessante Korrelationen aus Tab. 3.6 dargestellt. Der DMADP-Gehalt der Steineichenblätter korrelierte gut mit der Netto-Assimilation (A) und den Klimadaten. Die *in vitro* Mono-TPS-Aktivität wies einen schwachen negativen Zusammenhang zum

diurnalen Verlauf der Monoterpenemission (B) auf. Ein schwacher negativer Zusammenhang bestand auch zwischen dem DMADP-Gehalt der Blätter zur Monoterpenemission (C). Parameter, die in ihren Werten einen diurnalen Verlauf aufwiesen (Netto-Assimilation, PPFD, Blattemperatur, Transpiration, g_{H_2O} und C_i) zeigten alle einen signifikanten Zusammenhang, wie zum Beispiel die Netto-Assimilation zur Monoterpenemission (D). Im Gegensatz zur Graupappel existierte zwischen der Stomatären Leitfähigkeit und der Monoterpenemission der Steineichenblätter eine gute Korrelation (E). Der DMADP-Gehalt der Steineichenblätter und die *in vitro* Mono-TPS-Aktivität zeigten einen signifikanten, negativen Zusammenhang (F).

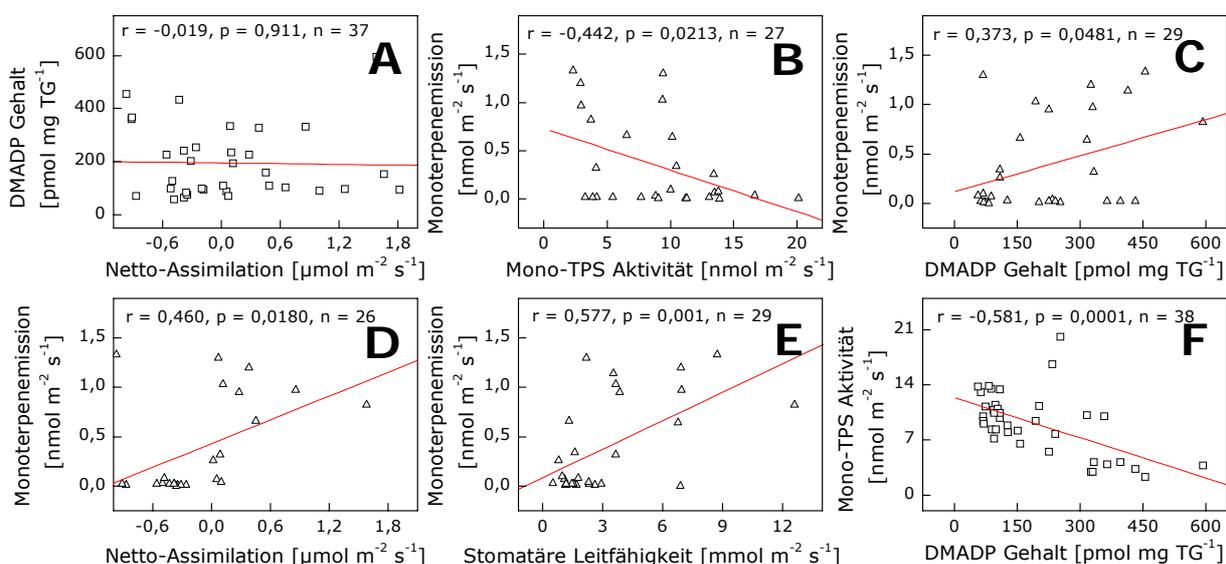
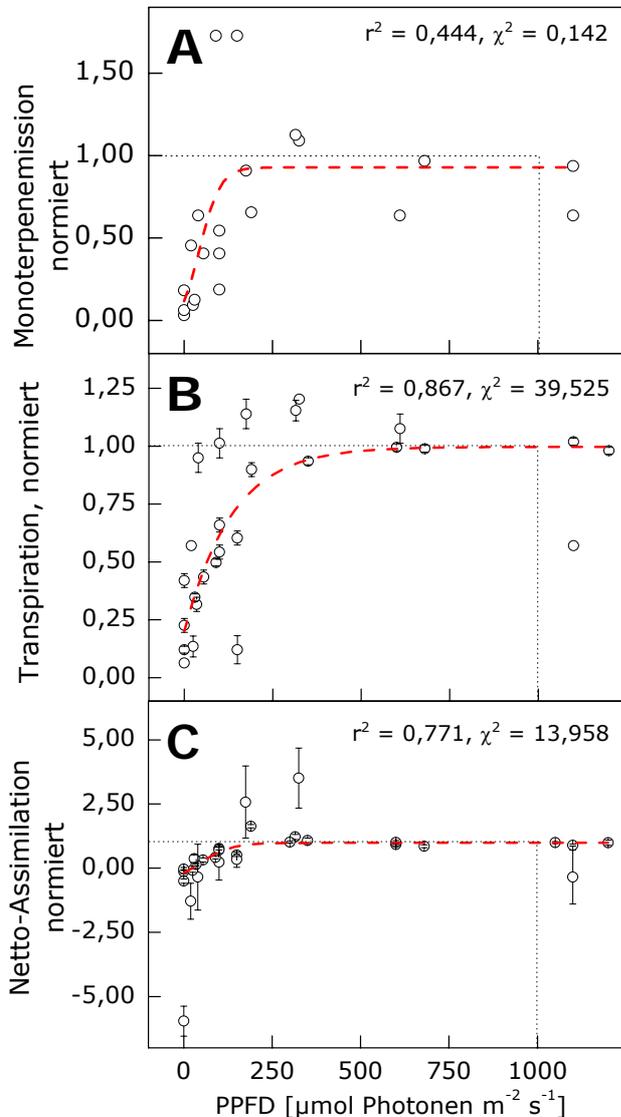


Abb. 3.25 Grafische Darstellung einiger für die Regulation der Monoterpenemission interessanten Korrelationen. Die Zusammenhänge wurden mittels linearer Funktionen dargestellt. A zeigt die Korrelation der Netto-Assimilation zum DMADP-Gehalt der Blätter. In B bis E sind die Zusammenhänge der biochemischen Parameter, Mono-TPS-Aktivität (B) und DMADP-Gehalt (C), sowie der Stoffwechselgrößen Netto-Assimilation (D) und Stomatären Leitfähigkeit (E) zur Monoterpenemission dargestellt. F zeigt den Zusammenhang zwischen dem DMADP-Gehalt der Steineichenblätter und der *in vitro* Mono-TPS-Aktivität.

In der Zusammensetzung der VOC-Emission (Tab. 3.5) zeigten sich deutliche Unterschiede der einzelnen flüchtigen Verbindungen gegenüber der Messung im Jahr 2002. Tagsüber bestand die Zusammensetzung zu 26-35% aus β -Pinen/Sabinen, zu 27-32% aus α -Pinen, zu 3-14% aus Myrcen, zu jeweils etwa 3-5% aus Limonen, p-Cymol und Camphen sowie zu je 1% aus Ethylbenzol und Δ -3-Caren. Der Isoprenanteil lag mit durchschnittlich 33% in der 1. Messserie und bei 6% in der 2. Messserie. In der Nacht bestand die sehr geringe Gesamtemission vorwiegend aus Isopren, β -Pinen/Sabinen, Limonen und Ethylbenzol, das 2002 nicht gemessen wurde. Myrcen und Camphen wurden nachts nicht oder kaum emittiert.

3.3.2 Licht- und Temperaturabhängigkeit

Auch für die Steineiche wurden die artspezifischen Licht- und Temperaturabhängigkeitsfunktionen für Monoterpenemission, Transpiration und Netto-Assimilation ermittelt. Zur Erstellung der Kurven wurden die Daten aus den Licht-



und Temperaturabhängigkeitsversuchen auf 303,16 K (= 30°C) bzw. 1000 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ normiert. Zur Beschreibung der Licht- und Temperaturabhängigkeit der Monoterpenemission (Abb. 3.26 A und 3.27 A) wurde der Guenther-Algorithmus (1997) herangezogen. Für den Verlauf der Transpiration (Abb. 3.26 B) und der Assimilation (Abb. 3.26 C) in Abhängigkeit zur Lichtstärke wurde die Sättigungskurve mit Hilfe einer Boltzmann-Kurvenanpassung (Origin[®] 7SR1, Northhampton, MA, USA) beschrieben. Die Auswertungen zeigen, dass der photosynthetische Gaswechsel wie auch die Monoterpenemission bei den Steineichenblättern bereits ab einer PPFD von ca. 250 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mit maximaler Rate erfolgte.

Abb. 3.26 Lichtabhängigkeit von Monoterpenemission, Transpiration und Assimilation der Steineichen. Zur Erstellung der Kurven wurden die Daten aus den Lichtabhängigkeitsversuchen auf 303,16 K (= 30°C) normiert. Die gepunktete Linie weist auf die Standardwerte hin. Zur Beschreibung der Lichtabhängigkeit der Monoterpenemission (A) wurde der Guenther-Algorithmus (1997) herangezogen. Für den Verlauf der Transpiration (B) und der Assimilation (C) in Abhängigkeit zur Lichtstärke wurde die Sättigungskurve mit Hilfe einer Boltzmann-Kurvenanpassung beschrieben. Die Daten stammen aus jeweils 2 bis 4 Messreihen von verschiedenen Versuchsbäumen. Das Erreichen des Gleichgewichtszustandes der Stoffwechselgrößen wurde bei jeder neuen Stufe abgewartet und dann für 15 min (Symbole bezeichnen die Mittelwerte des Zeitintervalls \pm SD, $n = 15$) aufgezeichnet. Bei den Monoterpenemissionsraten handelt es sich um die absolute Menge an Monoterpenen, die während der 15 min im Adsorberröhrchen gesammelt wurden.

Die Temperaturabhängigkeiten der Transpiration und der Assimilation wurden mit Hilfe einer Hillfunktion (Origin® 7SR1, Northhampton, MA, USA) beschrieben (Abb. 3.27 B und C). Von 15°C bis ca. 30°C stieg die Monoterpenemission um das 4-fache ihres Ausgangswertes an, erreichte ihr Maximum bei ca. 35°C bis 37°C und nahm dann stark ab, um bei ca. 43°C beinahe wieder den Ausgangswert zu erreichen. Die Transpirations- und Assimilationsraten waren von 15°C bis etwa 27°C beinahe gleichbleibend und bis ca. 35°C stark fallend. Im Fall der Transpiration näherten sich die Werte schließlich bis ca. 40°C gegen null. Die Netto-Assimilationsrate erreichte bereits bei etwa 35°C null und die Blätter begannen zu respirieren. Die Werte blieben bis 45°C im negativen Bereich.

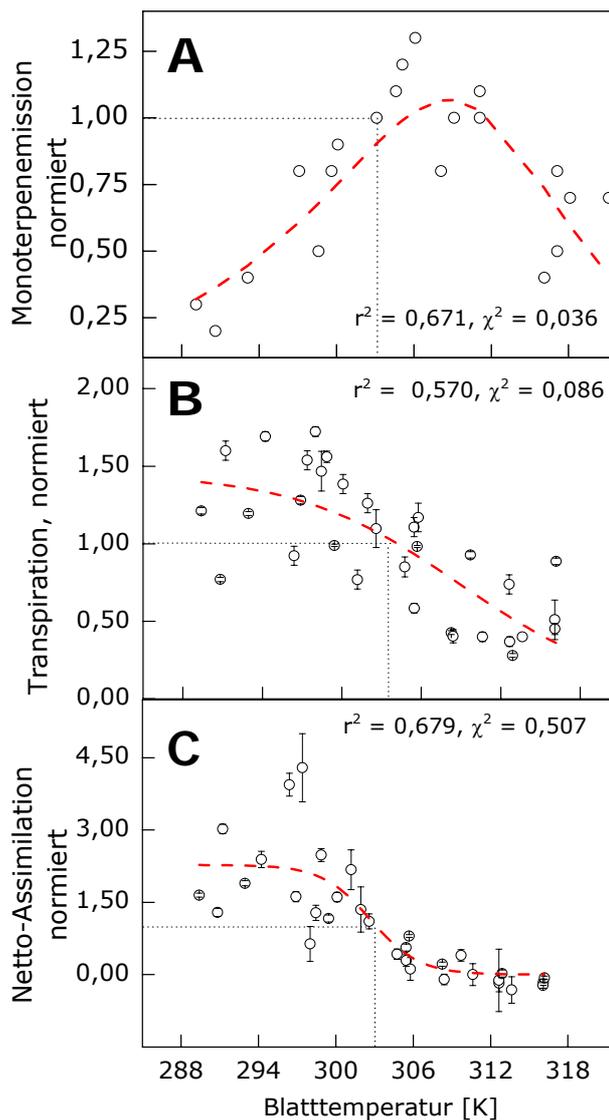


Abb. 3.27 Temperaturabhängigkeit von Monoterpenemission (A), Transpiration (B) und Assimilation (C) der Steineichen. Zur Erstellung der Kurven wurden die Daten aus den Temperaturabhängigkeitsversuchen auf $1000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ normiert. Die gepunktete Linie weist auf die Standardwerte hin. Zur Beschreibung wurde der Guenther-Algorithmus (1997) (A) und die Hillfunktion (B und C) herangezogen (alle $n = 2-4$ Bäume, aus verschiedenen Versuchsreihen). Nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes der jeweiligen Stoffwechselgrößen wurden die Daten für 15 min (Symbole bezeichnen die Mittelwerte des Zeitintervalls \pm SD, $n = 15$) aufgezeichnet. Bei den Monoterpenemissionsraten handelt es sich um die absolute Menge an Monoterpenen, die während der 15 min im Adsorberröhrchen gesammelt wurden.

Mit Hilfe der oben beschriebenen Licht- und Temperaturabhängigkeiten der Monoterpenemissionen wurden die für die Steineiche spezifischen Korrekturfaktoren für den Guenther-Algorithmus (1997) ermittelt (s. 2.7.12). Die Abb. 3.26 und 3.27 A zeigen den Kurvenverlauf (---) der Monoterpenemission nach Guenther in Abhängigkeit zur Lichtstärke und zur Blatttemperatur. Die ermittelten

Faktoren für die PPF_D sind $\alpha = 0,01412$ und $cl_i = 0,95017$ und für die Temperatur $ct_1 = 59160,80299$, $ct_2 = 189381,59706$ und $T_m = 312,14964$ ($n = 2-4$).

3.4 Einfluss von Isopren auf die Superoxidanionenradikal-konzentration im Blatt

Wie in der Einleitung beschrieben, hat die Emission von flüchtigen Isoprenoiden möglicherweise eine schützende Wirkung gegen erhöhten oxidativen Stress im Blatt. Um einen Einfluss von Isopren im bzw. in unmittelbarer Umgebung des Blattes auf die Superoxidanionenradikal- ($O_2^{\cdot-}$) Konzentration im Blatt feststellen zu können, wurden NBT-Färbungen der Pappelblätter durchgeführt, mit deren Hilfe die $O_2^{\cdot-}$ -Radikale im Blatt sichtbar gemacht werden konnten. Im 1. Teil wurde die Isoprenkonzentration in der Umgebung der Blätter durch Begasung erhöht. Eine Hemmung der Isoprensynthese und Emission wurde durch Zugabe von Fosmidomycin erreicht. Im 3. Teil wurde die positiv bzw. negativ beeinflusste endogene Isoprenkonzentration gemessen, um ihren Einfluss auf die $O_2^{\cdot-}$ -Radikalkonzentration bestimmen zu können.

In Abb. 3.28 sind exemplarisch jeweils 2 NBT-gefärbte Blattpaare abgebildet. Das für 15 min mit $188 \mu\text{l l}^{-1}$ Isopren (in N_2) begaste Blatt (A) konnte in einigen Fällen sogar mit freiem Auge vom stärker gefärbten Kontrollblatt (B) unterschieden werden. Die durch Fosmidomycin ($40 \mu\text{M}$ in 5 mM Glukoselösung) behandelten Blätter (C) wiesen meist eine bedeutend dunklere Färbung als die Kontrollblätter (5 mM Glukose) auf.

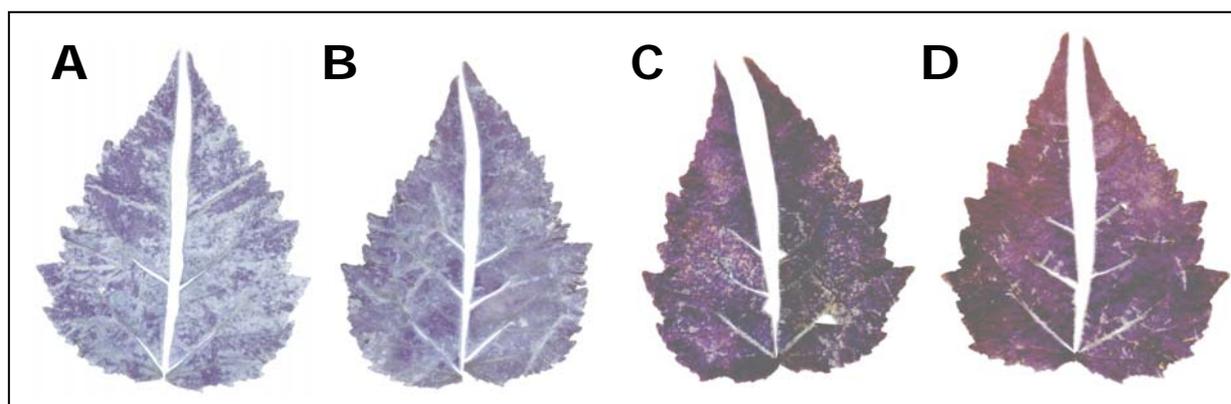


Abb. 3.28 Graupappelblätter nach Infiltration mit NBT-Lösung und Entfärbung in Ethanol. A zeigt ein Isopren-begastes Blatt (15 min, $188 \mu\text{l l}^{-1}$ Isopren in N_2), das dazugehörige, unbehandelte Kontrollblatt (15 min, $188 \mu\text{l l}^{-1}$ N_2) ist in B abgebildet. C zeigt ein durch Fosmidomycin gehemmtes Blatt ($40 \mu\text{M}$ Fosmidomycin in 5 mM Glucose), D das dazugehörige Kontrollblatt (5 mM Glucose).

3.4.1 Auswirkung von Isoprenbegasung auf die Konzentration von Superoxidanionradikalen im Blatt

Im Jahr 2001 wurden 8 Graupappelblätter von 8 Blattpaaren, deren Emissionsraten bei ca. $10 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ lagen, mit $2,6 \mu\text{l l}^{-1}$ Isopren (in N_2) begast (s. 2.9.1). Der anschließenden Färbung der Superoxidanionenradikale in den Blättern mit Hilfe der NBT-Infiltrationstechnik nach JABS *et al.* (1996) folgte die Auswertung des prozentualen Anteils der gefärbten Fläche an der Gesamtblattfläche und die Intensität der Färbung. Die Größe und die Intensität des gefärbten Blattanteils reflektierte die Höhe und die Verteilung der blattinternen $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Konzentration. Mit Hilfe des Experimentes konnte ein Hinweis auf eine mögliche reduzierende Wirkung von Isopren in der Umgebung des Blattes bzw. einer erhöhten blattinternen Isoprenkonzentration auf die $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Konzentration im Blatt festgestellt werden. Die Reduktion der Farbinintensität konnte jedoch aufgrund der geringen Stichprobenanzahl und der niedrigen Konzentration von Isopren statistisch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Der Student-t-Test für verbundene Stichproben (2-seitig) ergab einen schwachen signifikanten Unterschied in der Färbung zu den Kontrollblättern auf dem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ ($p = 0,053$). In den Intensitäten der NBT-gefärbten Flächen konnte kein Unterschied zwischen Kontroll- und begasten Blättern festgestellt werden ($p = 0,674$, Wilcoxon, 2-seitig). Um einen möglichen Effekt von Isopren auf die blattinterne $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Konzentration bestätigen zu können, wurde im Jahr 2002 eine höhere Isoprenkonzentration gewählt und die Stichprobenanzahl erhöht.

Je 2 Blätter von 11 Bäumen wurden 15 min lang mit $188 \mu\text{l l}^{-1}$ Isopren (in N_2), jeweils 2 Kontrollblätter der gleichen Pflanze mit $188 \mu\text{l l}^{-1}$ N_2 begast, um die gleiche Zusammensetzung der Küvettenluft zu gewährleisten. Von weiteren 3 Bäumen wurde jeweils nur 1 Blattpaar beprobt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.29 dargestellt. Pro Baum wurden Mittelwerte der beiden NBT-gefärbten Blattflächenanteile von Proben- (B) und Kontrollblättern (A) gebildet (+SD) und im Balkendiagramm gegenübergestellt. Zur besseren Übersicht wurden die Differenzen der Blattpaarmittelwerte in Prozent berechnet (C). Nur in 3 Fällen (Baum 4, 5 und 9) waren im Mittel die Anteile der NBT-gefärbten Blattflächen der Isopren-begasten Blätter höher, als die der Kontrollen.

Ergebnisse

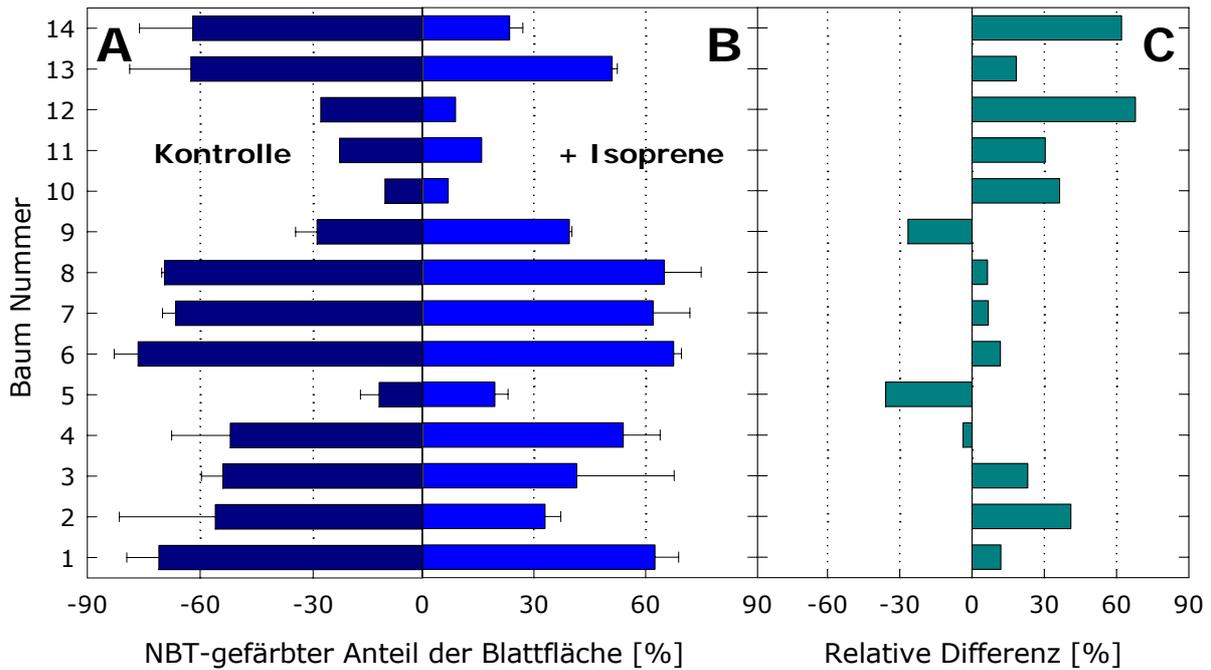


Abb. 3.29 Gegenüberstellendes Balkendiagramm von Kontroll- ($188 \mu\text{l l}^{-1} \text{N}_2$, A) und Isopren-begasten ($188 \mu\text{l l}^{-1}$ Isopren in N_2 , B) Blättern. Die gefärbten Blattflächenanteile wurden pro Baum gemittelt und mit SD dargestellt. In C sind die Differenzen der gefärbten Anteile von Kontrollblättern zu den Anteilen der mit Isopren begasten Blätter abgebildet.

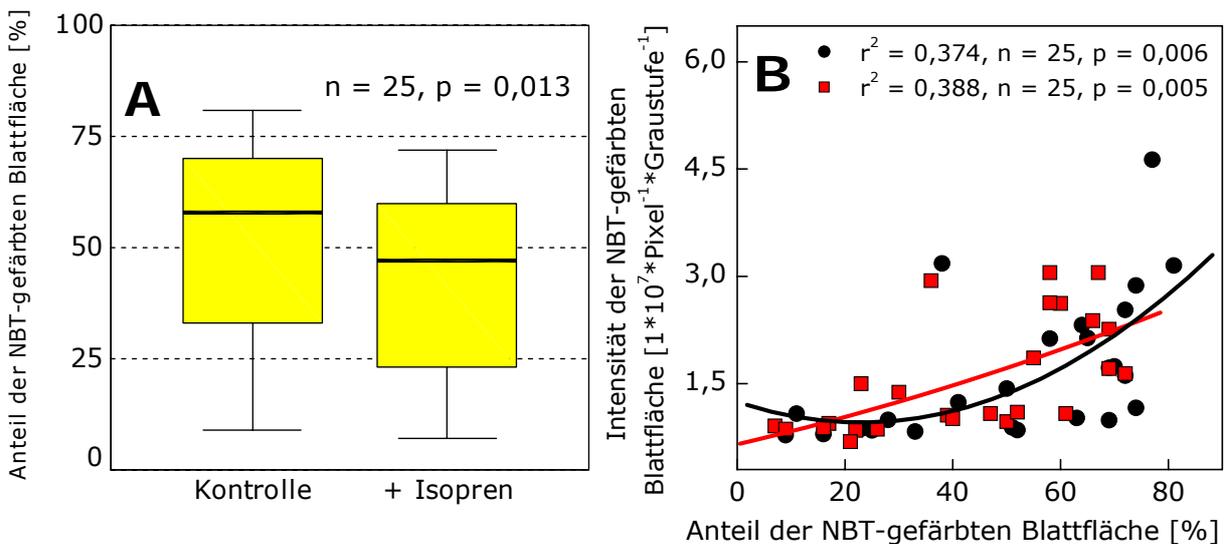


Abb. 3.30 A: Boxplotdarstellung des Isoprenbegasungsversuches mit erhöhter Isoprenkonzentration. Links alle Kontrollblätter (15 min, $188 \mu\text{l l}^{-1} \text{N}_2$) im Vergleich zu den Isopren-begasten (15 min, $188 \mu\text{l l}^{-1}$ in N_2) Blättern ($n = 25$ Blattpaare, $p = 0,013$). In B ist die Korrelation der Intensität der NBT-Färbung zum Anteil der NBT-gefärbten Blattfläche für die Isopren-begasten Blätter und die Kontrollblätter dargestellt. Die Korrelationen wurden mit Hilfe einer Polynomfunktion 2. Ordnung beschrieben. Die roten Symbole stehen für die Intensitäten der Färbung der begasten Blätter. Die schwarzen Symbole bezeichnen die Intensität der Färbung der Kontrollblätter.

Die Boxplots in Abb. 3.30 A zeigen einen statistisch signifikanten Effekt der Isoprenbegasung auf die NBT-gefärbten Blattflächenanteile. Die Auswertung erfolgte mittels Student-t-Test für verbundene Stichproben bei einem Signifikanz-

niveau von $p \leq 0,05$ (2-seitig, $p = 0,013$, $n = 25$). Die Intensität der NBT-gefärbten Flächen der Isopren-begasten Blätter war im Vergleich zu den Kontrollen nicht unterschiedlich ($p = 0,415$, $n = 25$), bestätigte jedoch durch die hochsignifikante Korrelation zum gefärbten Anteil der Blattflächen den radikalreduzierenden Effekt von Isopren (Abb. 3.30 B). Zwischen der Netto-Assimilation und dem NBT-gefärbten Anteil der Blattfläche konnte kein Zusammenhang nachgewiesen werden.

3.4.2 Einfluss von Fosmidomycin auf die Isoprensynthese und damit auf die $O_2^{\cdot-}$ -Konzentration

Zur weiteren Überprüfung der reduzierenden Wirkung von Isopren auf die $O_2^{\cdot-}$ -Konzentration, wurde in den folgenden beiden Versuchen die Isoprenemission der Pappelblätter durch die spezifische Hemmung des DOXP-Stoffwechselweges mit Hilfe von Fosmidomycin ($40 \mu\text{M}$ in 5 mM Glucose, 2.9.1.1) unterdrückt, während das Kontrollblatt unbehandelt blieb. Der 2. Versuch sollte zeigen, dass sich die Wirkung von Fosmidomycin auf die $O_2^{\cdot-}$ -Konzentration im Blatt durch die Begasung von hohen Isoprenkonzentrationen ($188 \mu\text{l l}^{-1}$) aufheben ließ.

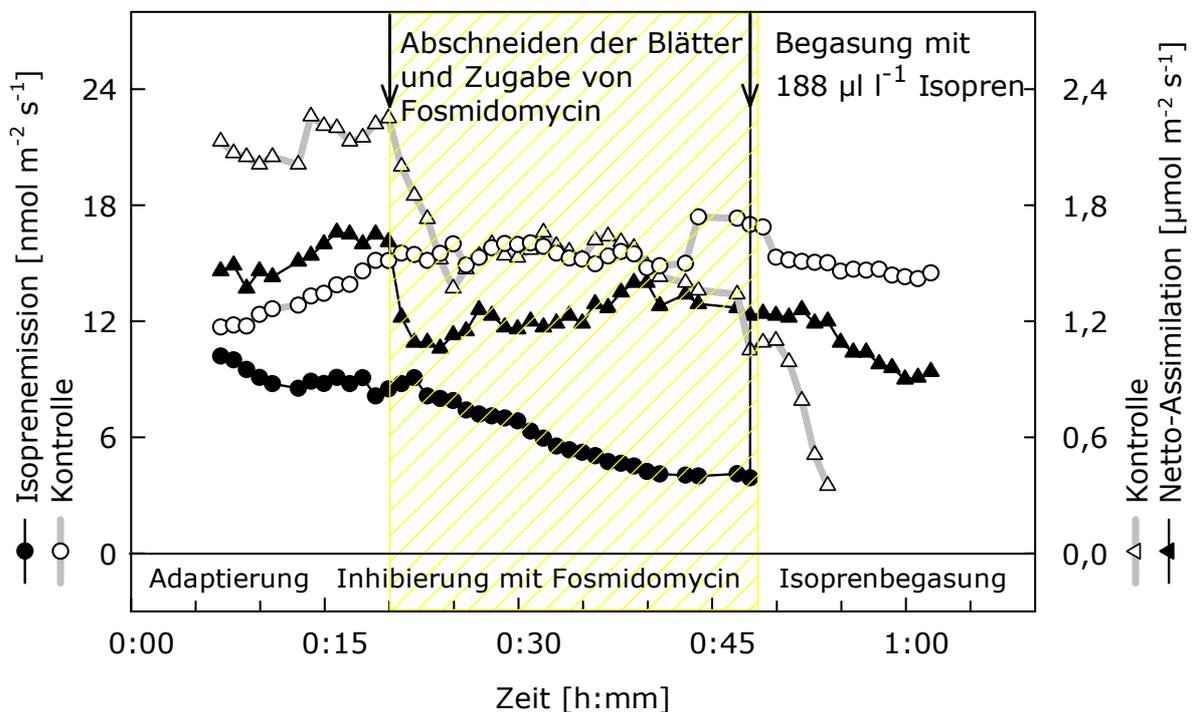


Abb. 3.31 Schematischer Verlauf der Fosmidomycin-Hemmversuche nach realen Daten. Nach dem Einspannen der Blätter und Einstellen von Standardbedingungen erfolgte eine Adaptierungsphase von ca. 15 min, in der die Isoprenemission (Kreise) und die Netto-Assimilation (Dreiecke) in einen Gleichgewichtszustand gelangten. Danach wurden die Blätter abgeschnitten und die Blattstiele sofort in die 5 mM Glucoselösung mit (\bullet , \blacktriangle) und ohne (\circ , \triangle) Fosmidomycin ($40 \mu\text{M}$) getaucht. Nach weiteren 20 min erfolgte die 15-minütige Begasung der Blätter mit $188 \mu\text{l l}^{-1}$ Isopren in N_2 (\bullet , \blacktriangle) bzw., wie bei den Kontrollblättern im 1. Versuch mit $188 \mu\text{l l}^{-1}$ N_2 (\circ , \triangle).

Ergebnisse

Tab. 3.7 Auflistung der Assimilations-, Transpirations- und Isoprenemissionsraten, während der Adaptierungs- und Begasungs- bzw. hemmenden Phase der untersuchten Graupappelblätter. P = Probenblatt, K = unbehandeltes Kontrollblatt, P+Iso bedeutet P mit 188 $\mu\text{l l}^{-1}$ Isopren begast, P+Fos bedeutet P durch Zugabe von 40 μM gehemmt. Es sind die Mittelwerte aus $n = 25$ (Isoprenbegasung), $n = 8$ (Hemmung durch Fosmidomycin) und $n = 6$ (Hemmung durch Fosmidomycin und anschließender Begasung) Blättern verschiedener Bäume \pm SD, jeweils für den Behandlungszeitraum von 15 min, bzw. 5-10 min am Ende der hemmenden Phase, angegeben.

Isoprenbegasung						
Adaptierung						
	Assimilation [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]		Transpiration [$\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]		Isoprenemission [$\text{nmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	
n = 25	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD
P	4,86	4,09	0,81	0,36	11,75	4,05
K	5,66	4,97	0,76	0,47	15,29	5,65
Isoprenbegasung						
P + Iso	3,99	4,08	0,82	0,40		
K	4,73	4,22	0,75	0,46		

Hemmung durch Fosmidomycin						
Adaptierung						
	Assimilation [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]		Transpiration [$\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]		Isoprenemission [$\text{nmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	
n = 8	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD
P	1,64	0,95	0,74	0,18	11,92	5,26
K	4,43	1,99	0,40	0,21	11,37	3,25
Hemmung durch Fosmidomycin						
P + Fos	0,47	0,52	0,74	0,24	3,59	1,28
K	4,68	1,93	0,36	0,13	12,27	3,48
Hemmung durch Fosmidomycin und anschließende Begasung						
Adaptierung						
	Assimilation [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]		Transpiration [$\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]		Isoprenemission [$\text{nmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	
n = 6	MW	\pm SD	MW	\pm SD	MW	\pm SD
P	1,53	1,899	0,82	0,553	15,65	10,723
K	1,67	0,450	0,86	0,159	14,43	7,401
Hemmung durch Fosmidomycin						
P + Fos	0,87	1,710	0,83	0,544	12,95	5,881
K	0,56	0,575	0,89	0,151	6,59	2,495
Isoprenbegasung						
P _{Fos} +Iso	0,47	1,505	0,81	0,570		
K + Iso	0,22	0,620	0,89	0,245		

In Abb. 3. 31 ist der Ablauf der beiden Versuche exemplarisch dargestellt. Nach dem Einspannen der Blätter und dem Einstellen der Standardbedingungen (30°C und $1000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) erfolgte eine Adaptierungsphase von ca. 15 min,

in der die Stoffwechselfparameter in einen Gleichgewichtszustand gelangten. Danach wurden die Blätter abgeschnitten und die Blattstiele sofort in die 5 mM Glucoselösung mit und ohne Fosmidomycin (40 μM) getaucht. Nach weiteren 20 min erfolgte die Begasung beider Blätter mit 188 $\mu\text{l l}^{-1}$ N_2 im bzw. mit 188 $\mu\text{l l}^{-1}$ Isopren in N_2 (0.75 : 3, $\text{N}_2 \pm$ Isopren : Küvettenzuluft).

Um den Einfluss von Fosmidomycin oder der Isoprenbegasung auf die Photosynthese zu überprüfen, wurden die Netto-Assimilation und die Transpiration über die gesamte Versuchsdauer mit aufgezeichnet. Die in der Tabelle 3.7 aufgelisteten Daten zeigen die gemittelten Gaswechselwerte während der Adaptierungs-, der Begasungs- und der hemmenden Phase. Der Einbruch der Assimilationswerte in den Proben- und Kontrollblättern (P und K) in der Adaptierungsphase gegenüber den gehemmten Blättern (s. auch Abb. 3.31), wurde durch das Abschneiden der Blätter verursacht (siehe GRAUS *et al.*, 2004) und ist nicht auf die Wirkung von Fosmidomycin zurück zu führen, während die Abnahme der Assimilationswerte gegenüber den begasten Blättern durch den erhöhten N_2 -Anteil in der Küvettenzuluft während der Begasung zustande kam. Fosmidomycin (40 μM) hatte keinen Einfluss auf die Photosynthese. Die Hemmung der Isoprenemission erfolgte innerhalb von ca. 20 min zu 50-80% des Ausgangswertes. Nachdem eine gleichbleibend niedrige Isoprenemissionsrate erreicht wurde, erfolgte die Isoprenbegasung für weitere 15 Minuten. Abschließend wurden die Blätter sehr schnell aus der Küvette entnommen und die NBT-Färbung durchgeführt.

Die Auswertung der Daten zeigte, dass ohne zusätzliche Isoprenbegasung (Abb. 3.32 A und C) die Färbungsunterschiede zwischen natürlich emittierenden Blättern (Kontrolle) und Blättern mit gehemmter Isoprenemission zu gering waren, um einen statistisch signifikanten Unterschied ermitteln zu können. Zwei der 8 beprobten Blattpaare wiesen im Fall der Kontrolle eine stärkere Färbung auf. Für die Färbung wurde mittels 2-seitigem t-Test für verbundene Stichproben auf dem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ getestet ($p = 0,771$, $n = 8$). Für die Intensitätsunterschiede konnte ebenfalls kein Unterschied festgestellt werden (Wilcoxon, 2 verbundene Stichproben, $p = 0,484$, $n = 8$).

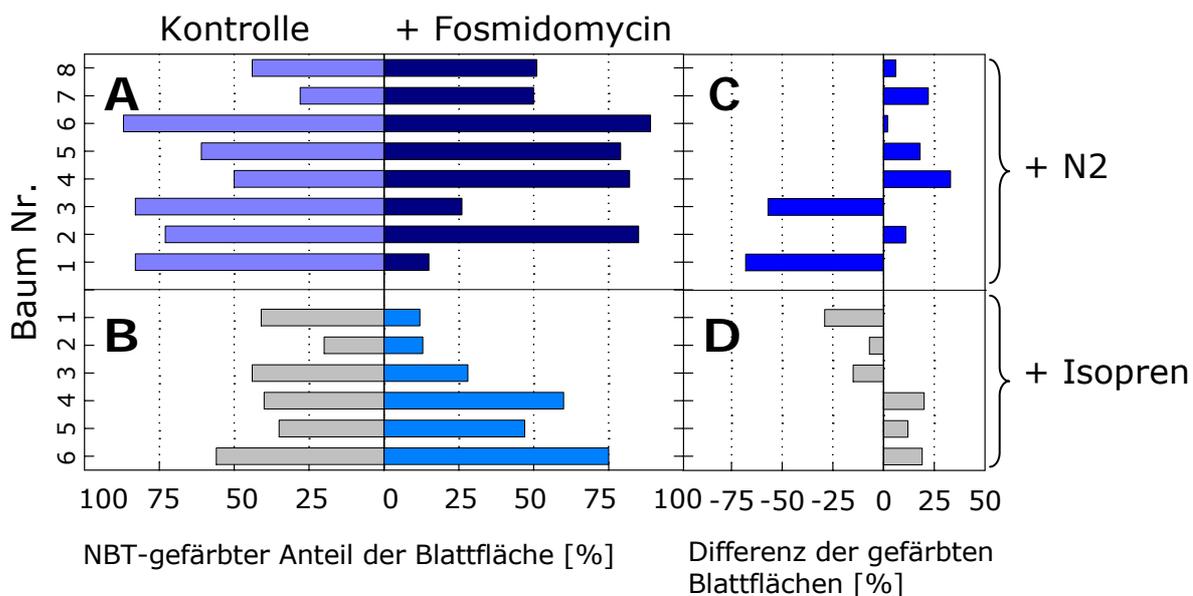


Abb. 3. 32 Auswirkung der Fosmidomycinhemmung auf die $O_2^{\cdot-}$ -Konzentration. Im 1. Versuch (A) wurden die Probenblätter mit Fosmidomycin behandelt, während die Kontrollblätter unbehandelt blieben. Beide Blätter wurden mit N_2 ($188 \mu l l^{-1}$) begast. Es wurden je 2 Blattpaare von 8 Bäumen beprobt. Im 2. Versuch (B) wurden beide Blattpaare der 6 beprobten Bäume mit Isopren ($188 \mu l l^{-1}$ Isopren in N_2) begast. In C und D sind jeweils die Differenzen der NBT-gefärbten Blattflächen dargestellt.

Um zu prüfen, wie sich die Anwesenheit von hohen Isoprenkonzentrationen in der unmittelbaren Umgebung des Blattes auf die Radikalkonzentration im Blatt bei Fosmidomycinhemmung auswirkt, wurde ein Hemmversuch, wie oben beschrieben, mit anschließender Isoprenbegasung durchgeführt (s. Abb. 3. 32 B und D). Es wurden 6 Bäume beprobt. Bei 3 von den 6 untersuchten Blattpaaren wurde im Vergleich zu den Fosmidomycin behandelten Blättern in den Kontrollblättern eine höhere Radikalkonzentration festgestellt, während die anderen 3 Kontrollblätter geringere $O_2^{\cdot-}$ -Konzentrationen aufwiesen. Nach dem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben konnten keine Unterschiede zwischen Kontroll- und behandelten Blättern mit $p = 0,917$ für die Färbung und mit $p = 0,173$ für die Intensität der Färbung festgestellt werden ($n = 6$).

3.4.3 Blattinterne Isoprenkonzentration und Superoxidationenradikale

Die bisherigen Versuche konnten zum Teil Hinweise auf die Wirksamkeit von Isopren auf die $O_2^{\cdot-}$ -Konzentration im Blatt liefern. Die Isoprenkonzentration im Inneren des Blattes wurde bisher nicht berücksichtigt. Um die Frage zu klären, ob die blattinterne Isoprenkonzentration entscheidend für den radikalreduzierenden Effekt ist, wurde der folgende Versuch durchgeführt: die Pappelblätter wurden nicht, wie bisher, mit Isopren begast, sondern es wurde versucht mittels Abscisinsäure bzw. durch Trockenstress sowie durch Fosmidomycinfütterung die

blattinterne Isoprenkonzentration zu erhöhen bzw. zu erniedrigen. Nach paralleler Behandlung (s. 2.9.3) der Blätter mit Abscisinsäure (ABA) bzw. mit Wasserentzug (-H₂O), mit Fosmidomycin (Fos) und zur Kontrolle mit Glukose (Glc), wurde jeweils eine Hälfte der Blätter mit NBT infiltriert und die andere Hälfte zur gaschromatographischen Messung des blattinternen Isoprens verwendet. Nach einigen Probennahmen wurde aufgrund der auffällig gering gefärbten ABA-Blätter getestet, ob ABA als Radikalfänger fungieren könnte (s. 2.9.3.2). Nachdem diese Vermutung bestätigt wurde, wurden die Blätter zum Schließen der Stomata statt mit ABA mit Wasserentzug behandelt. In diesem Versuch wurden die Gaswechselparameter nicht gemessen. Alle Versuche wurden bei $35 \pm 5^\circ\text{C}$ und einer PPF von ca. $1000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durchgeführt. In Abbildung 3.33 ist die Gesamtheit aller Blätter je Behandlungsvariante dargestellt. Die Werte der Kontrollblätter wurden auf 100% gesetzt (100% entsprechen $1,52 \pm 1,375$ ppmv Isopren) und die Daten der behandelten Blätter wurden in Relation dazu berechnet. Die blattinternen Isoprengehalte (A) waren im Fall der unter Trockenstress gehaltenen Blätter um ca. das 5-fache gegenüber den Kontrollblättern erhöht, während die Isoprenkonzentration bei den Fosmidomycin behandelten Blätter um ca. 50% geringer als in den Kontrollblättern war. Dementsprechend war der NBT-gefärbte Anteil der Blattflächen um ca. 30% gegenüber den Kontrollblättern erhöht. Die Färbung der Blätter, die durch Wasserentzug gestresst wurden, war um ca. 5-10% im Vergleich zu den Kontrollblättern erhöht. Alle Versuche wurden bei $30 \pm 5^\circ\text{C}$ und ca. $1000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durchgeführt. Die Blatttemperatur der -H₂O-Blätter erhöhte sich während der Versuchsdauer um ca. $3-5^\circ\text{C}$.

Um eine korrekte statistische Auswertung machen zu können, wurden die zusammengehörigen Blattpaare (Fos, Glc) und Blattripletts (-H₂O, Fos, Glc) aufgeteilt. Die NBT-Färbung der 23 Blattpaare der zusammengehörenden Fosmidomycin behandelten und der Kontrollblätter wurde mit Hilfe des Student t-Tests für verbundene Stichproben auf dem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ ausgewertet. Die blattinterne Isoprenkonzentration wurde nach Wilcoxon getestet. Die Fosmidomycin behandelten Blätter wiesen eine signifikant niedrigere Isoprenkonzentration mit $p = 0,001$ (2-seitig) und auch eine signifikant stärkere Färbung, gleichbedeutend mit höherer O₂⁻-Konzentration, als die Kontrollblätter mit $p = 0,002$ (2-seitig) auf.

Ergebnisse

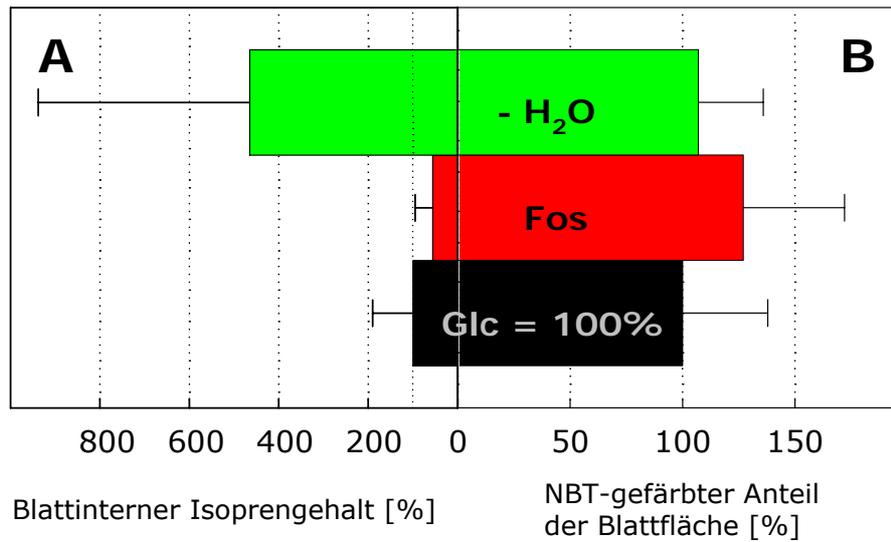


Abb. 3.33 Gegenüberstellung von blattinternem Isoprengehalt (A, 100% entsprechen $1,52 \pm 1,375$ ppmv Isopren) zu NBT-gefärbtem Anteil der Blattflächen (B). Die Balken entsprechen der Gesamtheit aller Blätter je Behandlungsvariante. Die Kontrollblätter wurden mit 5 mM Glukose (Glc, $n = 24$ Blätter) gefüttert. Die Werte der Kontrollblätter wurden auf 100% gesetzt und die Daten der behandelten Blätter in Relation dazu berechnet. Mit Fos sind Fosmidomycin ($40 \mu\text{M}$ in 5 mM Glucose) behandelte Blätter ($n = 24$ Blätter) und die Blätter, die Trockenstress ausgesetzt waren, sind mit $-\text{H}_2\text{O}$ ($n = 15$ Blätter) bezeichnet.

In der 2. Versuchsreihe ($-\text{H}_2\text{O}$, Fos, Glc) wurden je 15 Blätter beprobt (Abb. 3.33). Mittels t-Test für verbundene Stichproben für die Färbung der Blätter und nach Wilcoxon für die Isoprenkonzentration in den Blättern wurde paarweise getestet. Die blattinterne Isoprenkonzentration in den Blättern, die durch Wasserentzug behandelt wurden, war gegenüber den Kontrollblättern ($p = 0,001$) und auch gegenüber den durch Fosmidomycin gehemmten Blättern ($p = 0,002$) signifikant erhöht. Die gefärbten Anteile der Blattflächen der durch Wasserentzug behandelten Blätter wiesen jedoch keinen signifikanten Unterschied zu den gefärbten Anteilen der Kontrollblätter ($p = 0,632$) auf. Im Vergleich zu den durch Fosmidomycin gehemmten Blättern waren die durch Wasserentzug gestressten Blätter hingegen mit $p < 0,001$ signifikant weniger gefärbt.

4 Diskussion

Die besondere Bedeutung von Isopren und der Monoterpene für die Atmosphärenchemie erfordert genaue Abschätzungen der globalen täglichen und saisonalen Emissionsraten der Vegetation. Dazu ist die detaillierte Kenntnis der biochemischen und physiologischen Vorgänge in der Pflanze unerlässlich. Experimentell charakterisierte Parameter können dabei die nötigen Informationen für prozess-basierte Vorhersagemodelle liefern. Daher war das zentrale Ziel dieser Arbeit, Basiswissen über die Regulation der Isoprenoidemission durch verschiedene Umweltfaktoren auf transkriptionaler, translationaler und physiologischer Ebene zu verbessern. Die Untersuchungen wurden an der Graupappel, als Vertreter eines starken Isopren-Emitters und an der Steineiche, einer Monoterpen-emittierenden Art, durchgeführt. Des Weiteren wurde in der Arbeit die Hypothese, Isopren könne als antioxidativer Schutz gegen oxidativen Stress wirken, überprüft.

4.1 Isolierung und heterologe Expression der *PcDXR*

Im ersten Abschnitt der Arbeit wurde mit Hilfe molekularbiologischer Methoden die *DXR* der Graupappel (*PcDXR*) aus einer cDNA-Genbank isoliert und anschließend heterolog exprimiert.

Am 3'-Ende des isolierten Gens war eine Signalfrequenz vorhanden, welche vermutlich das N-terminale Transitpeptid codiert. Diese Erweiterung des in der Pflanze synthetisierten Enzyms dient als Signal zum Transport in den Chloroplasten und wird beim Transport durch die Membran abgespalten. Das Transitpeptid der *DXR* in Pflanzen umfasst ca. 73 bis 80 Aminosäuren (CARRETERO-PAULET *et al.*, 2002), welche bei der heterologen Expression die Funktionalität des Enzyms durch sterische Behinderung der Faltung zur Tertiärstruktur erheblich behindern können (FISCHBACH, 2001; MILLER, 2001; BACHL, 2004). In der Gegenüberstellung von 14 N-terminalen *DXR*-Peptidsequenzen verschiedener Pflanzenarten von CARRETERO-PAULET *et al.* (2002) wird die putative Abspaltungsstelle des Transitpeptids vor einem konservierten Cysteinrest gefolgt von einem Serinrest angegeben, das auch in der *PcDXR* vorhanden ist (Abb. 4.1). Die verschiedenen Transitpeptidsequenzen sind bis auf wenige Aminosäuren sehr unterschiedlich. Für die *PcDXR* umfasst das Transitpeptidsignal demnach 45 Aminosäuren.

Die codierende Sequenz hinter der Transitpeptidsequenz ist in vielen verschiedenen Pflanzenarten hoch konserviert. Im Vergleich zu 15 bekannten pflanzlichen DXR-Proteinsequenzen konnte die höchste Ähnlichkeit der PcDXR zur DXR der *A. thaliana* mit einer Homologie von 86,23% festgestellt werden. In der Enzymsequenz der DXR ist besonders das Sequenzmotiv der NADPH-Bindungsstelle („GSTGSIGT“; Position in der PcDXR-Sequenz 81-88, Abb. 3.8) hoch konserviert, welche in der Sekundärstruktur des Enzyms als Rossmann-Faltung ausgebildet wird. Eine Rossmannfaltung besteht generell aus β -Blättern mit einer α -Helix-Verbindung, die den C-Terminus von einem Blatt zum N-Terminus des nächsten Blattes verbindet (URL: <http://www.ebi.ac.uk>).

Q6GZ43_ <i>T. cuspidata</i>	--MALKIAPTSELCTSSFLGSTSG--LASSGSTKFTGQKLRFGLSIKSRTKK-ACTRAAR↓CSIQA	60
Q5J7B3_ <i>C. biloba</i>	--MALRIASPNEI GRASLLDWSSG--LASSSQSTGRKI QYGLSMRNRTRP-AFERTVN↓CSLNG	60
Q9FTN0_ <i>O. sativa j.</i>	MALKVVVFPGDLA-AVSFLDS----NRGGAFNQL-----KVDLPFQTRDRRAVSLRRTC↓CSMQQ	54
Q8W250_ <i>O. sativa</i>	MALKVVVFPGDLA-AVSFLDS----NRGGAFNQL-----KVDLPFQTRDRRAVSLRRTC↓CSMQQ	54
Q9FXZ7_ <i>Z. mays</i>	MAALKASFRGELS-AASFLDS----SRG-PLVQH-----KVDFTFQQRKGRRAISLRRTC↓CSMQQ	53
Q70EZ8_ <i>H. vulgare</i>	-MALKASFGELAGAPSLLDGSGVSSRGGAAFRHRQRQRCKVDFTFQRRDKRAVYLTRTC↓CSMQQ	64
Q9M4W4_ <i>C. roseus</i>	--MALNSLSPPKIKTISFLDS-----SKSNYNLNLKLPGGFAFKKKDFGASGGKKIQ↓CSVQ-	55
Q5MJZ5_ <i>A. majus</i>	--MALNMLSPSEIKSLSFLDS-----SKSNYNLNLFKLQG---LKRKENGCSAVKRVO↓CLAQ-	52
Q947C3_ <i>L. esculentum</i>	--MALNLLSPAIEIKSISFLDN-----SKSSYNLNLKFTGGLSIRKKECSGAFKRVQ↓CSAQL	56
Q6R3F4_ <i>P. barbatus</i>	--MALNL----EIKALSFLDS-----SKSSYNLNLKLPKLGFFAFKRRKDSRCSAPNRVH↓CSAQP	52
Q9XES0_ <i>M. piperita</i>	--MALNLMAPTEIKTISFLDS-----SKSNYNLNLKLPKLGFFAFKRRKDSRCSAQRVH↓CSAQS	56
Q9XFS9_ <i>A. thaliana</i>	-MRTLNSLSPAESKAI SFLDT-----SRFNP---IPKLSGGFSLRRRNQGRGFGKGVK↓CSVKV	54
Q70KX8_ <i>P. x canescens</i>	--MALNLLSPAIEIKAISFLDS-----TKSNR---LPKLQGGCLKRRKDCG---GRIIQ↓CSVQN	50
Q9SP64_ <i>A. annua</i>	--MSLNTLSPSEIRVNSFLDT-----TKSNTN--LFKQLQGGVSVKRKDSKVN---GIQ↓CSAAA	51
Q8L6C5_ <i>S. rebaudiana</i>	--MSLSYLSPTQTNLITFSDT-----CKSQTH--LLKLQGGFCFKRKDVKLAGK-GIR↓CSAQP	53
Q6EJD0_ <i>P. lobata</i>	--MALNLPSPAQVKPLFFSSN-----NST-----KLPGSFSLKRKDSDTTVERRVY↓CSAAS	49
Q9RCT1_ <i>S. leopoliensis</i>	-----	

Abb. 4.1 Aminosäuresequenzvergleich der PcDXR aus der Graupappel (*P. x canescens*, fett gedruckt) mit der DXR anderer Pflanzen. Die putative Abspaltungsstelle des Transitpeptidsignals ist durch einen Pfeil gekennzeichnet (nach CARRETERO-PAULET *et al.*, 2002). Die Sequenzen und Zugangsnummern stammen aus der EMBL-Datenbank (URL: <http://www.ebi.uniprot.org>).

Die Quartärstruktur der dxr besteht aus einem Homodimer, was durch Kristallisierung der dxr aus *E. coli* gezeigt werden konnte (REUTER *et al.*, 2002; YAJIMA *et al.*, 2002).

Die heterologe Expression der *PcDXR* in *E. coli* war erfolgreich, es konnten jedoch keine hohen Ausbeuten erreicht werden, was wahrscheinlich auf das Vorhandensein des Transitpeptids zurückzuführen ist. Zur Überprüfung der Funktionalität des exprimierten Enzyms wurde die Umsatzrate von NADPH durch das Enzym photometrisch bestimmt (3.1.4.2). Dabei konnte zusätzlich zur Beeinträchtigung der heterologen Expression, eine starke Reduktion der Aktivität des gereinigten Enzyms beobachtet werden. Dieses kann durch das Vorhandensein des Transitpeptids, aber auch durch N-terminalen Histidinreste (SCHNITZLER *et al.*, 2005), welche zur Reinigung des Enzyms an die Sequenz

angefügt wurden, verursacht werden kann. Durch die spezifische Hemmung der PcDXR-Aktivität durch Fosmidomycin im Testansatz und die erreichte NADPH-Umsatzrate konnte die Funktionalität der isolierten PcDXR jedoch eindeutig nachgewiesen werden.

Die Klonierung der isolierten PcDXR in einen Gateway-Expressionsvektor (Invitrogen, Karlsruhe, D), welcher die Möglichkeit für eine einfache Klonierung und viele weitere Anwendungen bietet, und durch das Vorhandensein der Transitpeptidsequenz wurde gewährleistet, dass die isolierte PcDXR für weitere Untersuchungen verwendet werden kann. Des Weiteren ermöglichte die erfolgreiche Isolierung der PcDXR die Durchführung einer spezifischen Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR.

4.2 Genexpressionsanalyse: Regulation auf Transkriptionsebene

Die Genexpressionsanalyse von PcDXR und Isoprensynthase (PcISPS) sollte einen Einblick in die diurnale Regulation der Isoprensynthese auf Transkriptionsebene parallel zu physiologischen Stoffwechselfparametern und Enzymaktivitäten (nur ISPS) ermöglichen. Zur Etablierung der Genexpressionsanalyse wurde neben der in dieser Arbeit sequenzierten PcDXR, die PcISPS-Sequenz von MILLER (2001) verwendet.

Während die Expression der PcDXR, dem ersten spezifischen Enzym des DOXP-Stoffwechselweges, in allen Geweben stattfindet (CARRETERO-PAULET *et al.*, 2002), fanden SASAKI *et al.* (2005), dass die Genexpression der ISPS bei *Populus alba* hauptsächlich in den Blättern erfolgt. Keine Expression konnte hingegen in Wurzel und Stamm der Bäume nachgewiesen werden. Die Expressionsrate bei gleich bleibend niedrigen Lichtintensitäten ($120 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) war in dieser Studie durch Einwirkung hoher Temperaturen (40°C) über einen längeren Zeitraum (6 h) etwa um das 5-fache gegenüber den Kontrollpflanzen (25°C) erhöht, während kühlere Temperaturen (15°C) keinen signifikanten Effekt hervorrufen konnten. Erhöhte Lichtintensität um etwa $50 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bewirkte eine etwa doppelt so hohe Transkriptionsrate. Über 24 h in Dunkelheit gehaltene Bäume wiesen fast keine Expression der ISPS auf. Die Autoren schließen aus diesen Ergebnissen, dass die Erhöhung der Enzymaktivität als Antwort auf Temperatur und Licht auf Transkriptionsebene reguliert wird.

Betrachtet man die Verläufe der Genexpression von PcDXR und PcISPS der Tagesgangmessungen, so konnten bei der PcISPS klare diurnale Verläufe mit Maxima am Vormittag festgestellt werden, während im Gegensatz dazu bei den

Transkript-Konzentrationen der *PcDXR* kein Tagesgang auftrat, jedoch ein Anstieg der Transkript-Gehalte am Ende des Tages beobachtet werden konnte (MAYRHOFER *et al.*, 2005). Auffällig am Verlauf der Expressionsraten, vor allem der *PcDXR* war, dass scheinbar niedrige Emissionsraten hohe Transkript-Gehalte zur Folge hatten, also möglicherweise eine Aktivierung stattfand. Zum Zeitpunkt hoher Isoprenemission konnten niedrige Transkript-Gehalte gemessen werden. Die Korrelation der beiden Parameter ist negativ, aber es konnte kein signifikanter Zusammenhang ermittelt werden (s. Tab. 3.3, Abb. 3.17). In verschiedenen Expressionsanalysen der Schlüsselenzyme des DOXP-Stoffwechselweges konnten Tag und Nacht Unterschiede bzw. diurnale Verläufe der Genexpression von *ISPS* (ARIMURA *et al.*, 2004; SASAKI *et al.* 2005) und *DXS* (DUDAREVA *et al.*, 2005) in verschiedenen Pflanzen nachgewiesen werden. Hingegen scheint die Regulation der DXR einem anderen Mechanismus zu folgen. Wie in der vorliegenden Arbeit bei der Graupappel konnten DUDAREVA *et al.* (2005) auch in *Antirrhinum majus* keinen diurnalen Verlauf der Genexpression der *DXR* beobachten.

Es konnte kein kurzfristiger Einfluss der PPFD und der Temperatur auf die Expression von *PcDXR* oder *PcISPS* nachgewiesen werden. Das Maximum der *PcISPS* Expressionsraten wurde schon erreicht, bevor die maximalen Temperaturwerte auftraten. Und auch wenn die Lichtintensitäten wie auch die Blattemperaturen im Verhältnis zum ersten Tag geringer waren, kam es zu einem Anstieg der Expressionsraten. Es scheint als wäre die Expression der *PcDXR* durch längerfristige Klimaänderungen eher beeinflusst (MAYRHOFER *et al.*, 2005), als durch kurzzeitige Temperatur- oder Lichtänderungen (Abb. 3.17, A und B; Tab. 3.3). Der Einfluss dieser Klimafaktoren auf längere Sicht ist durch den saisonalen Verlauf der Transkript-Gehalte von *PcDXR* und *PcISPS* nachgewiesen worden. Neben dem Einfluss des Entwicklungsstadiums der Blätter kommt es zu einer starken positiven Korrelation der *PcDXR*- und der *PcISPS*-Transkript-Konzentration mit den täglichen, mittleren Lufttemperaturen im Verlauf der Vegetationsperiode. Die *PcISPS*-Transkript-Gehalte zeigen auch eine klare Abhängigkeit von den täglichen, mittleren Lichtintensitäten. *PcISPS* und *PcDXR* Transkript-Konzentrationen zeigten einen ähnlichen Verlauf und daher wird eine gemeinsame Regulation auf Ebene der Transkription vermutet (MAYRHOFER *et al.*, 2005). Für eine gemeinsame Regulation könnte auch der im Rahmen dieser Arbeit beobachtete, wenn auch nur schwache Zusammenhang der beiden Expressionsraten sprechen.

4.3 Regulation der Isoprenoidbiosynthese und -emission durch Umweltfaktoren

4.3.1 Regulation bei der Graupappel

Die tageszeitliche Variation der physiologischen und biochemischen Kenngrößen der Isoprenemission bei der Graupappel wurde an zweimal 2 aufeinanderfolgenden Tagen ermittelt. Die Werte der gemessenen Kenngrößen des photosynthetischen Gaswechsels der Pflanzen (Netto-Assimilation, C_i , Transpiration und die Stomatäre Leitfähigkeit), DMADP-Gehalt der Blätter und der Isoprenemission sind in etwa vergleichbar mit Messwerten der Stieleiche (Brüggemann, 2002). Höchsten Einfluss auf die Isoprenemission wies die Blatttemperatur auf. Der geringere Einfluss der Lichtintensität auf die Emissionsrate während der Lichtperiode lässt sich durch die Lichtabhängigkeit der Isoprenemission erklären. Sobald die Lichtintensität über $300 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ansteigt, bei einer Blatttemperatur von 30°C , verändert sich die Emissionsrate der Graupappelblätter nicht mehr, sie befindet sich im Bereich der Sättigung (Abb. 3.18). Die Stomatäre Leitfähigkeit hatte keinen Einfluss auf die Isoprenemission, was auch in anderen Studien beobachtet werden konnte (SHARKEY, 1991; FALL UND MONSON, 1992; BRÜGGEMANN, 2002; NIINEMETS *et al.*, 2004). Anders als bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemessenen Tagesgängen der Steineichen- und bei Stieleichenblättern (BRÜGGEMANN, 2002), konnte bei den Pappelblättern kein Einbruch der Netto-Assimilation bzw. der Isoprenemission während der Tagesgangexperimente zu den höchsten Lichtintensitäten und Blatttemperaturen („Mittagsdepression“) beobachtet werden. Dies ist dadurch zu erklären, dass die PPFD kaum über $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ anstieg und die Temperaturen nie dauerhaft über 30°C blieben.

Bei hohen Temperaturen steigt die Aktivität der ISPS (LEHNING *et al.*, 1999) und auch die der DXR (GROLLE, 2000; PEGORARO, 2004), was einen erhöhten Umsatz im Stoffwechselweg zur Folge hat. Die Isoprenemission steigt an. Steigt die Temperatur weiter an und bleibt so lange auf einem hohen Niveau, dass die Photosyntheseleistung stark reduziert wird, kommt es zur Abnahme des verfügbaren DMADPs. Deshalb ist eine kurzzeitige Regulation der Isoprenemission durch Substratverfügbarkeit unter den Bedingungen, die während der Lichtperiode bei den Tagesgangmessungen herrschten nicht sehr wahrscheinlich, wohl aber unter Extrembedingungen (BRÜGGEMANN and

SCHNITZLER, 2002c; ROSENSTIEL *et al.*, 2002). Die Ergebnisse der Temperaturabhängigkeiten zeigen, dass es bei der Assimilation erst ab ca. 40°C und bei der Isoprenemission erst mit ca. 45°C zu einer deutlichen Abnahme der Werte kommt (Abb. 3.19). Erst dann kommt es durch das Absinken des in den Chloroplasten verfügbaren DMADPs unter eine für die Substratversorgung der ISPS-Aktivität notwendigen Schwelle, zu einer Reduktion der Isoprenbiosynthese. Durch Substratmangel sinkt die ISPS-Umsatzrate und damit in weiterer Folge die Isoprenemissionsrate ab. Bei reduzierter Photosynthese erfolgt die Regulation der Isoprenbiosynthese durch Substratmangel nach WOLFERTZ *et al.* (2003, 2004) über die DXS, durch die geringere Kohlenstoffverfügbarkeit in Form von Pyruvat und GAP (Glycerinaldehyd-3-Phosphat) aus dem Calvin-Zyklus.

Die DMADP-Gehalte von an Dunkelheit adaptierten Blättern sind etwa 70% geringer als von lichtadaptierten Blättern (FISHER *et al.*, 2001; BRÜGGEMANN and SCHNITZLER, 2002b). Parallel zur raschen Einstellung der Isoprenemission bei plötzlicher Dunkelheit (GRAUS *et al.*, 2004) kommt es innerhalb weniger Minuten zur Reduktion des DMADP Gehaltes im Blatt um über 50% (MAGEL *et al.*, 2006), was dadurch zu erklären ist, dass im Blatt 2 DMADP-Pools existieren, ein cytosolischer und ein plastidärer DMADP-Pool. Die Verteilung des DMADPs auf die beiden Pools kann dabei zwischen 30% (ROSENSTIEL *et al.*, 2002; BRÜGGEMANN UND SCHNITZLER, 2002b) und 70% (LORETO *et al.*, 2004) variieren. Dieses Phänomen erklärt auch die Tatsache, dass die DMADP-Gehalte der Pappelblätter bei den Nachtprobenahmen nicht auf Null absanken (Abb. 3.13 und 3.15). Etwa 10-20% der maximalen DMADP-Konzentrationen repräsentieren vermutlich den cytosolischen Anteil des DMADPs in den Pappelblättern. Ähnliche Beobachtungen konnte auch BRÜGGEMANN (2002) für die Stieleiche machen. NOGUES *et al.* (2006) konnten eine inverse Korrelation zwischen der Isoprenemission und der DMADP-Poolgröße bei der Weißpappel bzw. zwischen der Monoterpenemission und der GDP-Poolgröße bei der Steineiche nachweisen. Demnach wird die Emission von Isopren und Monoterpenen nicht durch die Poolgrößen der Vorläufermoleküle limitiert. Mögliche Austauschraten von IDP und DMADP zwischen Cytosol und Plastiden sind noch unbekannt. Für eine Verbindung der beiden Stoffwechselwege (HEMMERLIN *et al.*, 2003) sprechen verschiedene Markierungsexperimente (ARIGONI *et al.*, 1997; MÜLLER, 2003; FLÜGGE und GAO, 2005), welche auf einen Austausch von Metaboliten zwischen Cytosol und Chloroplasten in beide Richtungen hinweisen. FLÜGGE und GAO (2005) konnten den Transport von

DOXP durch einen Xylulose-5-Phosphat Translokator nachweisen. Die Autoren stellten fest, dass der Transport von IDP nicht über einen plastidären Phosphattranslokator erfolgt, sondern von phosphorylierten *trans*-Verbindungen abhängig ist. Sie vermuteten deshalb die Existenz eines bisher unbekanntes Transportmoleküls für IDP auf Basis eines Anti- bzw. Uniport-Transportmechanismus. Der Austausch von Metaboliten zwischen den beiden Synthesewegen im Cytosol und in den Plastiden liegt unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlich bei weniger als 1% und spielt daher vermutlich *in vivo* eine geringe Rolle (EISENREICH *et al.*, 2001). Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass bei Hemmung eines der Stoffwechselwege (Mevalonat-Stoffwechselweg im Cytosol oder plastidärer DOXP-Stoffwechselweg) die Funktion des anderen nicht kompensieren werden kann (MÜLLER, 2003).

Für die Gehalte des Vorläufermoleküls von Isopren, dem DMADP in den Blättern und den Gaswechselfparametern konnten hochsignifikante Zusammenhänge nachgewiesen werden (Tabelle 3.3, Abb. 3.17). Das Problem der DMADP-Konzentrationsmessungen (FISHER *et al.* 2001, BRÜGGEMANN UND SCHNITZLER 2002b, MAGEL *et al.* 2006) ist die nicht vorhandene Unterscheidbarkeit von cytosolischem und plastidärem DMADP bzw. IDP. Für präzisere Aussagen müssen daher Methoden etabliert werden, um zwischen den beiden Pools unterscheiden zu können. Eine Möglichkeit dies zu tun, liegt im Einsatz von ¹³C-Markierungsversuchen wie z.B. bei LORETO *et al.* (2004) beschrieben. In dieser Arbeit konnte über ¹³CO₂-Fütterung und GC-MS-Analyse des zu Isopren hydrolysierten DMADP eine Abschätzung der Poolverteilungen vorgenommen werden. Demnach umfasst der chloroplastidäre DMADP-Pool nur etwa ein Drittel des Gesamtpools, wohingegen ROSENSTIEL *et al.* (2002) ein umgekehrtes Verhältnis der Pools ermittelten. Diese unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, dass der Gehalt an chloroplastidärem DMADP umgekehrt proportional zur Isoprenemissionskapazität (WOLFERTZ *et al.*, 2003) ist. Starke Isopren-Emitter verfügen also über einen kleinen chloroplastidären DMADP-Pool (LORETO *et al.* 2004).

Wie bereits bei der Stieleiche (BRÜGGEMANN, 2002; LEHNING *et al.*, 1999) konnte auch bei der Graupappel keine Veränderung der *in vitro* PcISPS-Aktivität im Tagesverlauf gemessen werden. Es bestand kein Zusammenhang zwischen der *in vitro* PcISPS-Aktivität und den Stoffwechsel- oder Umweltfaktoren zum Zeitpunkt der Probenahmen (Tabelle 3.3). Wird die *in situ* PcISPS-Aktivität über die Blatttemperaturen berechnet, zeigt die Enzymaktivität bezüglich der

Temperaturabhängigkeit einen ähnlichen Verlauf wie die Isoprenemissionsrate (Abb. 3.20). Die sigmoidale Kurve weist einen Wendepunkt bei ca. 30°C auf und erreicht bei ca. 33°C gleich bleibende Aktivität bis 40°C. Die Regulation der PcISPS-Aktivität erfolgt möglicherweise durch die Temperatur- und Lichtverhältnisse innerhalb ca. 2 vorangehender Tage, wie die Untersuchungen der basalen Emissionsraten an verschiedenen Pflanzen ergaben (SHARKEY *et al.*, 1999; GERON *et al.*, 2000; LEHNING *et al.*, 2001). Nach den Untersuchungen der diurnalen Isoprenemission der Graupappel in der vorliegenden Arbeit sowie nach den Untersuchungen von Brüggemann (2002) an der Stieleiche, war der Einfluss der Blatttemperatur auf die Isoprenemission innerhalb der Lichtperiode wesentlich höher, als der Einfluss durch die Änderung der Lichtintensitäten. Dasselbe kann für die berechneten *in situ* PcISPS-Enzymaktivitäten (Abb. 3.20) aus dem Versuch zur Temperaturabhängigkeit abgeleitet werden. Die Tatsache, dass die ISPS in *P. alba* vorwiegend in Blättern exprimiert wird und das Enzym in den Plastiden lokalisiert ist, sowie dessen biochemischen Eigenschaften, führte SASAKI *et al.* (2005) hingegen zum Schluss, dass die Regulation des Enzyms auf Proteinebene durch die Lichtintensität erfolgt, da der photosynthetische Elektronentransport zur Akkumulation von Mg²⁺-Ionen mit gleichzeitiger pH-Wert Erhöhung im Stroma führt. Neben dieser Art der Regulation könnte jedoch auch eine Aktivierung der ISPS durch posttranslationale Modifikation erfolgen (SCHNITZLER *et al.*, 2005). MÜLLER (2003) vermutet ebenfalls eine Regulation der DXR in Gerstenkeimlingen durch die Lichtintensität über die pH-Wert Änderung im Stroma der Chloroplasten, wohingegen der Einfluss von Mg²⁺-Ionen auf die DXR in seiner Untersuchung gering war. Zusätzlich konnte er eine Aktivitätssteigerung der DXR durch Licht in Etioplasten der Gerste beobachten, welche mit erhöhter Carotinoidbiosynthese und lichtinduzierter Bildung von Chlorophyllen einherging. Eine Regulation durch Licht konnte für die DXS in den Gerstenkeimlingen nicht nachgewiesen werden. Neuere Untersuchungen zur Circadianen Regulation der Isoprenoidbiosynthese widersprechen jedoch der Ansicht, dass die Isoprenoidemission primär durch Lichtintensitäten reguliert wird (WILKINSON *et al.*, 2006). WILKINSON *et al.* (2006) berichteten über die circadiane Rhythmik der Isoprenemission in Blättern der Ölpalme (*Elaeis guineensis*) und auch in den Blättern der Graupappel konnte diese festgestellt werden (LOIVAMÄKI, persönliche Mitteilung). LU *et al.* (2002) konnten für die β -Pinen-Synthase in *Artemisia annua* Blättern und DUDAREVA *et al.* (2003) für die β -Ocimen- und die

Myrcensynthase in *Antirrhinum majus* circadiane Rhythmen auf Transkriptionsebene nachweisen.

4.3.2 Regulation bei der Steineiche

Wie bei der Graupappel wurde die tageszeitliche Variation der physiologischen und biochemischen Kenngrößen der Monoterpenemission bei der Steineiche an zweimal 2 aufeinander folgenden Tagen ermittelt. Der photosynthetische Gaswechsel der Steineichen (Netto-Assimilation, C_i , Transpiration und die Stomatäre Leitfähigkeit), und die Monoterpenemission folgten dem tageszeitlichen Verlauf von Licht und Temperatur ebenfalls. Wie bei der Graupappel wies die Blatttemperatur den höchsten Einfluss auf die Monoterpenemission auf. Der Einfluss der Lichtintensität auf die Emissionsrate während der Lichtperiode war im Vergleich zur Graupappel noch geringer, da der Bereich der maximalen Isoprenemission bei wesentlich geringeren Lichtintensitäten erreicht wurde ($> 150 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Abb. 3.26). Hochsignifikante Korrelationen konnten zwischen den physiologischen Kenngrößen Netto-Assimilation, Transpiration und C_i zur Monoterpenemission beobachtet werden (Tab. 3.6). Ebenso bestand eine signifikante, aber schwache Korrelation zwischen dem DMADP-Gehalt der Blätter und der Monoterpenemissionsrate, obwohl der DMADP-Gehalt nicht mit den Lichtintensitäten und den Blatttemperaturen korreliert war. Das direkte Substrat der Mono-TPS ist das GDP. Bisher gibt es noch keine genaueren Kenntnisse über den Zusammenhang des DMADP-Gehaltes mit der Monoterpenemission (OWEN und PEÑUELAS, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die DMADP-Gehalte der Steineichenblätter gemessen. Der Gehalt der Blätter an DMADP ist vergleichbar mit dem der Graupappelblätter, aber es konnte kein ausgeprägter diurnaler Verlauf festgestellt werden. Isopren-emittierende Pflanzen zeigen generell höhere DMADP-Konzentrationen als nicht-emittierende, aber auch diese verfügen nach OWEN und PEÑUELAS (2005) über eine lichtabhängige DMADP-Synthese. Deshalb plädieren diese Autoren dafür, dass die Isoprenoidbiosynthese vorwiegend aus der Synthese von DMADP- und IDP-Molekülen profitiert, welche primär zur Synthese von essentiellen höheren Isoprenoiden, wie zum Beispiel Chlorophylle und Carotinoide, synthetisiert werden. Als direkter Vorläufer-Metabolit zum GDP kann über die DMADP-Gehalte indirekt Rückschluss auf die GDP-Gehalte gezogen werden, auch wenn davor eine Prenyltransferasereaktion, bei der DMADP und IDP unter Abspaltung eines Diphosphatrestes zu GDP kondensieren, abläuft

(ALONSO und CROTEAU, 1993). Weiteren Einfluss kann dabei jedoch auch ein möglicher Austausch von DMADP bzw. IDP zwischen dem Cytosol und dem Chloroplasten haben (s. 4.3.1). Die *in vitro* Mono-TPS Aktivität wies keinen charakteristischen diurnalen Verlauf auf (Abb. 3.22 und 3.24). Es konnte aber ein hochsignifikanter, negativer Zusammenhang zum DMADP-Gehalt der Blätter der Steineichen und zur Monoterpenemission festgestellt werden (Tab. 3.6). Dies spricht dafür, dass je aktiver die Mono-TPS waren, umso mehr Substrat umgesetzt wurde und deshalb umso weniger DMADP in den Blättern vorhanden war. Wie bei der Regulation der Isoprenemission durch Substratverfügbarkeit (LEHNING, 1999; EISENREICH *et al.*, 2001; SHARKEY und YEH, 2001) könnte auch die Monoterpenemission der Steineiche über die Substratverfügbarkeit reguliert werden (FISCHBACH, 2001; LORETO *et al.*, 1996c). Allerdings waren die in dieser Arbeit gemessenen Monoterpenemissionsraten im Verhältnis zu den *in vitro* Mono-TPS Aktivitäten sehr gering. Auch FISCHBACH (2001) beschrieb eine Enzymaktivität der Steineiche von einem Vielfachen der Höhe der Emissionsraten unter Standardbedingungen. Eine Substratverarmung unter den bei den Versuchen herrschenden Licht- und Temperaturverhältnissen erscheint deshalb unwahrscheinlich. Obwohl bei den Versuchen zur Temperaturabhängigkeit (Abb. 3.27) bereits bei 27-30°C eine reduzierte Netto-Assimilationsrate zu beobachten war, was sich bei den Messungen der Tagesgänge in der 2. Messkampagne (Abb. 3.23) in einer ausgeprägten Mittagsdepression der Gaswechselwerte widerspiegelte. In den Versuchen zur Temperaturabhängigkeit konnte jedoch weiterhin ein Anstieg der Monoterpenemission bis ca. 37°C trotz stark abnehmender Assimilationsrate beobachtet werden. Für eine Regulation durch die Substratverfügbarkeit würde auch die positive Korrelation der Netto-Assimilationsraten und der Gesamt-Monoterpenemissionsrate sprechen, obwohl zwischen Assimilation und DMADP-Gehalt der Blätter kein Zusammenhang beobachtet werden konnte. Letzteres ist möglicherweise durch die hohe Variabilität der Einzelbäume zu erklären. PEÑUELAS UND LLUSTIÀ (2004) plädieren in ihrer opportunistischen Hypothese (s. u.) für die hauptsächliche Regulation der Isoprenoidemission durch Substratmangel, da das DMADP nach dieser These vorwiegend zur Synthese der lebensnotwendigen Isoprenoide verbraucht und nur im Falle eines Überschusses zur Synthese von Isopren bzw. Monoterpenen genutzt wird. Im Gegensatz zu den Messungen bei der Graupappel war bei der Steineiche ein regulierender Einfluss der Stomatären Leitfähigkeit auf die Monoterpenemission zu beobachten. Dieser könnte durch die chemischen

Eigenschaften und die damit verbundene geringe Flüchtigkeit der Monoterpene (s. Tab. 1.1) hervorgerufen werden. Durch die geringen Emissionsraten bei relativ niedrigen Blatttemperaturen, wäre eine durch die Stomata verzögerte Monoterpenemission (NIINEMETS *et al.*, 2004) denkbar und könnte die negative Korrelation der Monoterpenemission zur Enzymaktivität erklären.

Die Hauptkomponenten des Emissionsspektrums der Steineiche sind α - und β -Pinen, Sabinen und Myrcen bzw. je nach Emissionstyp (s. 1.6) Limonen (BERTIN und STAUDT, 1996; STAUDT und BERTIN, 1998; LORETO *et al.*, 1996b; NÚÑEZ *et al.*, 2002). Auch die in dieser Arbeit verwendeten Steineichen emittierten zum größten Anteil die genannten Komponenten (Tab. 3.4). In der Nacht sinken die Monoterpenemissionen auf beinahe Null ab. Nächtliche Monoterpenemissionen (NIINEMETS *et al.*, 2002; LORETO *et al.*, 2000) werden auf verzögerte Emissionen durch eine Art von Speicherung der Monoterpene im pflanzlichen Gewebe (NIINEMETS *et al.*, 2004) aufgrund der geringen Volatilität der Monoterpene zurückgeführt, ohne dass spezifische Speicherorgane vorhanden wären. Dadurch könnte es auch tagsüber zu unterschiedlicher Emission der einzelnen Komponenten kommen (NIINEMETS *et al.*, 2004). Unterschiede in der Zusammensetzung des Monoterpenspektrums, die im Rahmen dieser Arbeit beobachtet wurden, kamen wahrscheinlich durch die Variabilität der Pflanzen zustande. So war beispielsweise bei den Messungen der 2. Messkampagne ein einzelner Limonen-Emitter enthalten. Um eine genauere Analyse der Monoterpenemissionen zu erhalten, wäre eine *online* Messung mit hoher Zeitauflösung, wie sie mit Hilfe der Protonentransferreaktions-Massenspektrometrie (PTR-MS, THOLL *et al.*, 2006) möglich ist, unabdingbar.

4.4 Die Funktion der Isoprenoidemission für die Pflanze

Trotz zahlreicher Untersuchungen zu diesem Thema (siehe Einleitung), ist die Funktion der temperatur- und lichtabhängigen Isoprenoidemission für die Pflanzen selbst noch nicht vollständig geklärt. Zwanzig, bis zum Teil sogar 50% (SHARKEY UND LORETO, 1993; LERDAU UND KELLER, 1997; BRÜGGEMANN UND SCHNITZLER, 2002c; PEÑUELAS UND LLUSIÀ, 2003; PEGORARO, 2004) des assimilierten Kohlenstoffs werden von den Pflanzen in Stresssituationen in Form von Isopren emittiert. Verschiedene Hypothesen wurden in den letzten Jahren aufgestellt, Hinweise auf deren Richtigkeit gefunden, oder widerlegt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung von externem Isopren auf die $O^{\cdot-}$ -Radikalbildung in Graupappelblättern untersucht.

Hypothese: Isopren stellt ein Ventil für überschüssige Energie und Stoffwechselprodukte dar

Die Hypothese, dass Isopren als „Sicherheitsventil“ für überschüssige Energie dienen könnte, wurde von ROSENSTIEL *et al.* (2006) aufgestellt. Die Autoren legen dieser Hypothese die Theorie zugrunde, dass für die Synthese von DMADP, dem Vorläufermetabolit von Isopren, teilweise extrachloroplastidäres Phosphoenolpyruvat (PEP) herangezogen wird. Eine indirekte Regulation der Isoprenemission über eine Konkurrenzsituation von cytosolischen und chloroplastidären Prozessen um PEP wäre daher denkbar. Ein unidirektionaler PEP-Translokator mit höherer Affinität für PEP in Isopren-emittierenden Pflanzen soll die notwendige Zufuhr an PEP für die chloroplastidäre Synthese essentieller Isoprenoide gewährleisten. Die Isoprensynthese/ -Emission soll demnach eine Akkumulation von überschüssigem DMADP in der Zelle verhindern. Die Hypothese entstammt der ursprünglichen Idee, dass durch die Emission von Isopren überschüssiger Kohlenstoff oder überschüssige Energie abgeleitet werden würde und so Schäden am Photosystem durch erhöhte Energie reduziert oder verhindert werden (LOGAN *et al.*, 2000), wie es bei Bakterien (FALL UND COPLEY, 2000) oder anderen Mechanismen in Pflanzen beschrieben wurde (ROSENSTIEL *et al.*, 2006). MAGEL *et al.* (2006) postulieren ebenfalls die schützende Wirkung von Isopren für den Photosyntheseapparat bei reduzierter Kohlenstoff-Assimilation, verursacht vor allem durch hohe Lichtintensitäten und Blatttemperaturen.

Um die aufwendige Biosynthese von Isopren erklären zu können, gibt es jedoch noch weitere Theorien, welche zur Erklärung der Emission einen aktiven Schutzmechanismus heranziehen.

Hypothese: Isopren bewirkt Thermotoleranz

Eine weitere Hypothese sorgte für Aufsehen, als SHARKEY und SINGSAAS (1995) zeigten, dass Isopren eine erhöhte Thermotoleranz der Pflanzen bewirkte. Der Mechanismus dieser Schutzfunktion ist unklar. SINGSAAS *et al.* (1997) beschrieben erhöhte Thermotoleranz von Kudzu-Blättern aufgrund von externer Isoprenbegasung. Die Autoren führten die Thermotoleranz der Blätter auf erhöhte blattinterne Isoprenkonzentrationen zurück. Das lipophile Isopren sollte mit den Chloroplastenmembranen in Wechselwirkung treten und ähnlich wie Zeaxanthin die Thylakoide stabilisieren (SINGSAAS, 2000). Die schützende Wirkung konnte nicht für die nicht-Isopren-emittierende Art *Phaseolus vulgaris* beobachtet werden. WILDERMUTH UND FALL (1998) plädierten ebenfalls für die

Hypothese einer Thermostabilisierung durch die hydrophobe Wechselwirkung von Isopren mit der Thylakoidmembran. Diese Hypothese konnte von LOGAN *et al.* (1999) durch umfangreiche Untersuchungen des Einflusses von Isopren auf Phosphatidylcholin-Liposomen, Membranperoxidation, Permeabilität und Proteinstabilität von Thylakoiden, die aus Spinat isoliert wurden, jedoch nicht belegt werden. Isopren könnte jedoch ähnlich wie β -Carotin durch die beiden konjugierten Doppelbindungen als Radikalfänger dienen (ZEIDLER *et al.*, 1997; VELIKOVA *et al.*, 2004).

Während LOGAN UND MONSON (1999) keinerlei Steigerung der thermotoleranten Wirkung durch externe Isoprenbegasung ermitteln konnten und zum Schluss gelangen, dass Isopren möglicherweise keinen Einfluss auf die Thermotoleranz der Pflanzen hat, konnten DELFINE *et al.* (2000), im Gegensatz zu SINGSAAS *et al.* (1997) feststellen, dass die schützende Wirkung der Terpene gegen hohe Temperaturen nicht auf emittierende Pflanzen beschränkt ist. Auch LORETO *et al.* (1998b) konnte erhöhte Thermotoleranz bei Steineichen durch die emittierten Monoterpene feststellen. In ihrer Arbeit, wie auch in der von PEÑUELAS UND LLUSIÀ (2002 und PEÑUELAS *et al.* 2005) wird die Verstärkung der Thermotoleranz durch Monoterpene, vor allem Limonen und α - und β -Pinen bestätigt.

Hypothese: Isopren schützt vor Ozon und Superoxidanionenradikalen

Nach SINGSAAS *et al.* (1997) erhöht eine externe Isoprenbegasung den blattinternen Isoprengehalt. Erhöhte interne Isoprenkonzentrationen könnten der oxidativen Schädigung der Membranen durch Superoxidradikale entgegenwirken (LORETO UND VELIKOVA, 2001). In den Veröffentlichungen von LORETO *et al.* (2001b), SHARKEY *et al.* (2001) sowie LORETO und VELIKOVA (2001) ist die schützende Wirkung von Isopren und von Monoterpenen (LORETO *et al.*, 2004) vor Ozon, Superoxidradikalen und Hydroxylradikalen durch die Stärkung der Thylakoidmembranen und die Wirkung, die Oxidation der Membranlipide zu reduzieren, beschrieben. Die Autoren postulieren, dass Isopren eine wichtige antioxidative Rolle in den emittierenden Pflanzen erfüllt. LORETO *et al.* (2001b) vermuten, dass Isopren und Ozon direkt im Interzellularraum oder auf der Blattoberfläche miteinander reagieren und so die Ozonkonzentration reduziert wird.

Isopren-begaste, junge, nicht-emittierende Blätter von *Myrtus communis* zeigten bei Behandlung der Blätter mit Rose Bengal (RB) eine deutliche

Reduktion der schädigenden Wirkung auf die Netto-Assimilation (AFFEK und YAKIR, 2002). RB ist ein Herbizid und wurde eingesetzt um $^1\text{O}_2$ -Radikale im Blatt zu erzeugen. Bei der Isoprenbegasung von älteren, Isopren-emittierenden Blättern zeigten sich keine positiven Effekte. Junge *Rhamnus alaternus* Blätter wiesen bei Isoprenbegasung eine signifikant geringere Reduktion der Netto-Assimilation, verursacht durch die Zugabe von RB, auf (AFFEK und YAKIR, 2002). Die Autoren postulierten einen Schutzeffekt vor oxidativer Schädigung für den Photosyntheseapparat durch Isopren. Die Isoprenbegasung wurde entsprechend den natürlich vorkommenden Konzentrationen durchgeführt und der schützende Effekt konnte nachgewiesen werden.

In der Arbeit von SINGSAAS *et al.* (1997) wurde der blattinterne Isoprengehalt als Funktion der Isoprenemission sowie der Stomatären Leitfähigkeit, basierend auf dem Diffusionskoeffizienten von Isopren nach LYMAN *et al.* (1990) berechnet. Es wurden blattinterne Isoprengehalte von maximal $30 \mu\text{l l}^{-1}$ für einen starken Isopren-Emitter wie Kudzu ermittelt und als physiologisch bezeichnet. Bei Zugabe von Abscisinsäure bzw. Wasserentzug der Pflanzen kommt es zum Schließen der Spaltöffnungen, was nach SINGSAAS *et al.* (1997) zu einer erhöhten Konzentration von Isopren im Inneren der Blätter führt. Die blattinternen Isoprengehalte der Graupappeln, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelt wurden, lagen zwischen 2 und maximal $15 \mu\text{l l}^{-1}$, bzw. erreichten in Blättern, welche massivem Trockenstress ausgesetzt waren, Werte von bis zu $37 \mu\text{l l}^{-1}$.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche sollten weitere Hinweise auf die mögliche Schutzfunktion von Isopren vor Superoxidanionenradikalen in den Pappelblättern bringen. Die Methode von JABS *et al.* (1996) ermöglicht ein Anfärben und somit Sichtbarmachen der Superoxidanionenradikalen im Blatt. Durch Isoprenbegasungsversuche konnte ein signifikanter Effekt (Abb. 3.29 und 3.30) von hohen Isoprenkonzentrationen in der Umgebung des Blattes auf die Radikalkonzentration im Blatt gezeigt werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Isoprenkonzentrationen waren mit $188 \mu\text{l l}^{-1}$ ca. 10-mal so hoch wie die in der Natur vorkommenden Konzentrationen (LOGAN UND MONSON, 1999). AFFEK UND YAKIR (2002) beschreiben in ihren Experimenten, dass eine Erhöhung der Konzentration über das 4-fache der physiologischen Konzentrationen bei *Myrtus communis* keine weitere Verbesserung der schützenden Effekte bewirkte. Die Isoprenkonzentration wurde so hoch gewählt, um die vermuteten positiven Effekte aus einem vorangegangenen Versuch, in dem mit einer sehr niedrigen,

natürlichen Isoprenkonzentration ($2,6 \mu\text{l l}^{-1}$) begast wurde, eindeutig bestätigen zu können.

Durch die spezifische Hemmung des DOXP-Stoffwechselweges durch Zugabe von Fosmidomycin, sollte geklärt werden, ob ohne die möglicherweise radikalreduzierende Wirkung von Isopren in natürlich emittierenden Blättern höhere O_2^- -Konzentrationen nachgewiesen werden können bzw. ob sich der positive Effekt durch die Isoprenbegasung wieder aufheben ließe. Beide Nachweise konnte jedoch nicht erbracht werden. Da die Reduktion der Isoprenemission maximal zu 70% erfolgte und die Emission der Pflanzen aufgrund von niedrigerer Stoffwechselaktivität im Spätsommer nicht so hoch war, reichte möglicherweise der Unterschied in der Isoprenkonzentration nicht aus, ein eindeutiges Ergebnis zu erzielen. Zudem beschreiben MUNNÉ-BOSCH und ALEGRE (2002) einen erhöhten oxidativen Stress beim Altern der Blätter. Versuche mit höherem Stichprobenumfang mit stark emittierenden Pflanzen, könnten möglicherweise einen signifikanten Nachweis liefern.

In einem weiteren Versuch wurde anstelle externer Isopren-Begasung, der endogene Gehalt an Isopren in den Blättern verändert und gemessen. Fosmidomycin sollte die Isoprenkonzentration im Blatt im Vergleich zum Kontrollblatt verringern, während Abscisinsäure die Isoprenkonzentration im Inneren des Blattes, durch Schließen der Stomata, erhöhen sollte. Die spezifische Hemmung des DOXP-Stoffwechselweges durch Fosmidomycin führte zu einer Konzentrationsminderung des blattinternen Isoprens um ca. 50%, im Vergleich zu den Kontrollblättern. Trotzdem konnte keine eindeutig stärkere NBT-Färbung im Vergleich zu den Kontrollblättern beobachtet werden. Die mit ABA behandelten Blätter wiesen im Vergleich zu den Kontrollblättern, eine um fast 50% geringere NBT-Färbung, bei gleichzeitig geringer Erhöhung der internen Isoprenkonzentration auf. Die Tatsache, dass die Biosynthese von ABA über die Spaltung von Xanthophyllen führt (SCHOPFER UND BRENNICKE, 1999), die im Xanthophyll-Zyklus eine entscheidende, radikalreduzierende Wirkung zur Bekämpfung von oxidativem Stress erfüllen (HAVAUX und NIYOGI, 1999), führte zur Vermutung, dass ABA mit seinen 3 konjugierten Doppelbindungen als Radikalfänger fungieren könnte. Daher erschien die starke Reduktion der Radikalkonzentration im Blatt nicht dem realen Wert zu entsprechen. Die schließende Wirkung auf die Stomata konnte auch durch Trockenstress der Blätter, zwar ebenfalls nur durch die Induktion von ABA, herbeigeführt werden, die ABA-Konzentration war dabei aber (natürliche Induktion bei Trockenstress ca.

4 $\mu\text{g g}^{-1}$ FG, SCHOPFER und BRENNICKE, 1999) erheblich geringer. Theoretisch wurde bei den durchgeführten Messungen von 1 Blatt innerhalb 1 h 3,3 mg g^{-1} FG aufgenommen. Im Gegensatz zu den ABA-behandelten Blättern (30%), stieg die interne Isoprenkonzentration bei Wasserentzug um ein Vielfaches zum Wert der Kontrollblätter an (ca. 450%), die Färbung der Blätter war jedoch trotzdem geringfügig höher als die der Kontrollblätter (5-10%). Da Wasserentzug ebenfalls oxidativen Stress in den Pflanzen erzeugt (AFFEK und YAKIR, 2002), ist anzunehmen, dass ein möglicher, positiver Effekt der hohen internen Isoprenkonzentration stark reduziert wurde.

Opportunistische Hypothese:

PEÑUELAS UND LLUSIÀ (2004) beschreiben in ihrer opportunistischen Hypothese, dass der DOXP-Stoffwechselweg vorwiegend zur Synthese essentieller Isoprenoide vorhanden ist. DMADP und IPP würde vorwiegend bei dieser Synthese verbraucht und nur überschüssige Metabolit-Konzentrationen würden für die Synthese von anschließend emittiertem Isopren bzw. Monoterpenen verwendet werden, in Übereinstimmung mit der oben beschriebenen Hypothese, dass Isopren als „Sicherheitsventil“ für überschüssige Energie dienen könnte. Dabei könnten sich die für die Pflanze vorteilhaften Eigenschaften der volatilen Isoprenoidemission, wie erhöhte Thermotoleranz und Schutz vor Superoxidradikalen, zu einer durch Licht- und Temperatur regulierten Funktion entwickelt haben. Bedingungen, welche Einfluss auf die Synthese primärer Isoprenoide haben, sollten sich demnach auch auf die Synthese der volatilen Isoprenoide auswirken. Ein Hauptargument für diese These liefert die Tatsache, dass nicht alle Pflanzen volatile Isoprenoide emittieren und trotzdem Thermotoleranz besitzen bzw. sich gegen Superoxidanionenradikale schützen können. Die Hypothese wird unterstützt durch ein Experiment mit transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen, die eine Überexpression von *DXS* und dadurch höhere Konzentrationen an primären Isoprenoiden und umgekehrt, bei supprimierter Expression von *DXS*, geringere Konzentrationen an primären Isoprenoiden aufwiesen (ESTEVEZ *et al.*, 2001). Die *DXS*, das 1. Enzym im DOXP-Stoffwechselweg scheint demnach in erster Linie die Synthese essentieller Isoprenoide zu regulieren. Während moderater Trockenstress keinen Einfluss auf die Isoprenemission der Pflanzen hat, führt starker Trockenstress zur Reduktion der Isoprenemission, ein weiteres Indiz für die Hypothese, da bei starkem Stress vermehrt primäre Isoprenoide (Carotinoide, Abscisinsäure oder Gibberellinsäure)

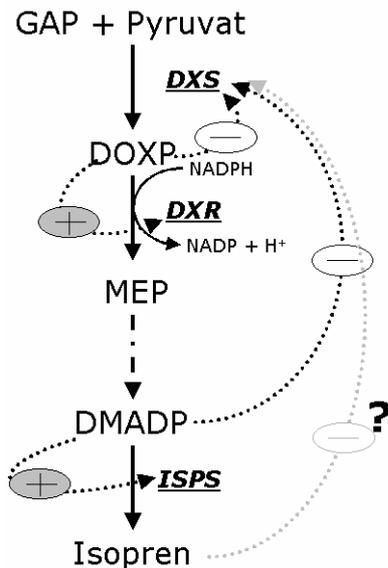
produziert und akkumuliert werden, um das Gewebe vor oxidativen Schäden zu bewahren (OWEN UND PEÑUELAS, 2005).

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sowie der in der Literatur beschriebenen Erkenntnisse sind bezüglich einer möglichen schützenden Wirkung von Isopren gegen oxidativen Stress sehr widersprüchlich und können keine klare Antwort auf diese Frage geben. Sehr viele der Untersuchungen sprechen jedoch für einen möglichen Schutzeffekt. Wahrscheinlich ist die Schutzwirkung von Isopren gegen oxidativen Stress oder gegen Hitzestress ein Mechanismus, um schädigende Verbindungen, die durch rasche Veränderungen von wechselnde Lichtintensitäten und Temperaturen gebildet werden, schnellst möglich abzufangen, noch bevor oder zusätzlich zur Aktivierung anderer Schutzmechanismen, wie dem Xanthophyll-Zyklus oder der Synthese von Hitzeschockproteinen.

4.5 Feedback-Regulation der Isoprenemission?

In der Veröffentlichung von WOLFERTZ *et al.* (2004), stellen die Autoren die Hypothese einer Feedback-Regulation der DXS auf Proteinebene zur Diskussion. DOX-d₂ in moderater Konzentration wurde von außen zugeführt und ersetzte das innere DOXP. DOXP und DMADP wurden im Inneren der Plastiden als konstant angenommen, da die Isoprenemissionsrate konstant blieb. Zugabe von hohen DOX-d₂ Konzentrationen sollte die weitere Regulation verhindern. Die DMADP und DOXP-Gehalte waren erhöht, die Aktivität der DXS sollte gegen Null gehen und die Isoprensynthase-Aktivität führte dadurch zur erhöhten Isoprenemission. Diese negative Feedback-Schleife von DOXP, DMADP oder anderen Intermediaten des Stoffwechselweges auf die DXS führt zur Regulation der DXR über die Substratverfügbarkeit. Hohe DOXP-Konzentrationen, erzeugt durch eine hohe Aktivität der DXS, führen zu hoher Aktivität der DXR um die hohen Substratkonzentrationen rasch umsetzen zu können, was in weiterer Folge zu hohen DMADP-Gehalten und damit verbunden zu hohen Isoprenemissionsraten führt. Die negative Feedback-Regulation könnte nicht nur durch hohe DMADP-Gehalte sondern auch durch hohe endogene Isoprenkonzentrationen im Blatt aktiviert werden. Bei hohen Isoprenkonzentrationen würde die DXS geringere Substratmengen (DOXP) erzeugen, damit ebenfalls die Aktivität der DXR reduzieren und in Folge möglicherweise auch die Transkriptionsrate der *DXR* negativ beeinflussen.

Eine Feedback-Hemmung von volatilen Isoprenoiden auf die Synthese von DMADP konnte bisher nicht nachgewiesen werden (OWEN UND PEÑUELAS, 2005). PEÑUELAS UND LLUSIÀ (2002) vermuten jedoch, dass eine hohe Monoterpenemissionsrate möglicherweise zu niedrigeren blattinternen Monoterpenkonzentrationen führen könnte und konnten diese Hypothese durch eine weitere Studie (PEÑUELAS *et al.*, 2005) bestätigen.



Die Theorie der Feedback-Regulation von WOLFERTZ *et al.* (2004) und die Ergebnisse der Versuche von PEÑUELAS UND LLUSIÀ (2005) könnten jedoch auch auf eine mögliche negative Endprodukt-Hemmung durch das Isopren selbst auf die DXS hinweisen (Abb. 4.2). Bei hohen Isoprenkonzentrationen im Inneren des Blattes könnte die DXS geringere Substratmengen an DOXP erzeugen, damit ebenfalls die Aktivität der DXR reduzieren und möglicherweise auch die Transkriptionsrate der *DXR* negativ beeinflussen.

Abb. 4.2 Regulation der Isoprenbiosynthese im DOXP-Stoffwechselweg auf Proteinebene über die DXS verändert nach WOLFERTZ *et al.* (2004). Negative Feedbackregulation der DXS über DMADP und DOXP. DOXP wiederum stimuliert die Aktivität der DXR positiv. Eine negative Endprodukt-Hemmung könnte jedoch auch durch das Isopren selbst auf die DXS wirken. Bei hohen blattinternen Isoprenkonzentrationen würde die DXS geringere Substratmengen DOXP erzeugen und damit ebenfalls die Aktivität der DXR reduzieren.

Die Durchführung eines Versuches, bei dem der blattinterne Isopren-Gehalt bei begasten und unbegasten Blättern gemessen und der Isoprenemission gegenübergestellt wird in Kombination mit der Messung von *DXR* und *ISPS* Expressionsraten sowie von DMADP-Gehalten und *ISPS*-Enzymaktivitäten könnte weitere Fortschritte in der Aufklärung der Regulation der Isoprenbildung ermöglichen.

GUEVARA-GARCÍA *et al.* (2005) beschreiben eine posttranskriptionale Regulation der DXS in Mutanten von *A. thaliana*, deren DOXP-Stoffwechselweg durch Fosmidomycin gehemmt wurde. Dabei kam es zur Ansammlung von DXS. Die Signalmoleküle für diese posttranslationale Regulation sind unbekannt, könnten aber möglicherweise die Endprodukte IDP oder DMADP sein. Da die Regulation nur in Mutanten nachgewiesen werden konnte, postulieren die Autoren eine Aktivierung des Mechanismus nach den Bedürfnissen des Stoffwechsels.

Die gewonnenen Daten wurden und werden nun in weiterer Folge zur Validierung und Weiterentwicklung des Modells SIM-BIM (ZIMMER *et al.*, 2000 und 2003; LEHNING *et al.*, 2001) und SIM-BIM 2 (GROTE *et al.*, 2006) dienen. Die Experimente, welche in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen der Universität Freiburg (Professur für Baumphysiologie, Institut für Forstbotanik und Baumphysiologie) und der Universität Tübingen (Lehrstuhl für Physiologische Ökologie der Pflanzen, Botanisches Institut) durchgeführt wurden, konnte das Kohlenstoff-Gleichgewicht in jungen Graupappelpflanzen erforscht werden. (MAYRHOFER *et al.*, 2004). Des Weiteren konnten Erkenntnisse über die Photosynthese und der Substrat-Zufuhr für die Isoprenbiosynthese in Graupappelblättern gewonnen werden.

4.6 Ausblick

Durch die Beleuchtung der biochemischen und physiologischen Zusammenhänge der Isoprenoidemission durch die simultane Messung von Enzymaktivitäten, DMADP-Gehalten und Isoprenoidemission sowie des photosynthetischen Gaswechsels im diurnalen Verlauf, konnten in der vorliegenden Arbeit weitere Einblicke in die Regulation der Isoprenoidemission gewonnen werden. Die spezifischen Parameter der Licht- und Temperaturabhängigkeit konnte für beide Pflanzenarten bestimmt werden. Die ermittelten Daten all dieser Messungen können nun zur Weiterentwicklung und Validierung der prozess-orientierten Modelle SIM-BIM für Isopren und SIM-BIM2 für Monoterpene eingesetzt werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit klonierte *PcDXR* aus der Graupappel verfügt über das für die Expression in der Pflanze notwendige Transitpeptid. Damit wurde ein molekulares Werkzeug zur weiteren Erforschung regulativer, transkriptionaler Vorgänge geschaffen. Dieses Gen kann direkt zur Überexpression der *DXR* in Pflanzen eingesetzt werden (BACHL, 2004). Damit können Erkenntnisse über die regulierende Rolle der *DXR* erlangt werden. In den Untersuchungen von LANGE UND KETCHUM (2002) konnte die regulative Wirkung der *DXR* bei der Ölproduktion in der Pfefferminze festgestellt werden. Transgene Pflanzen mit entweder überexprimierter *DXR* oder aber auch RNAi-Pflanzen (RNA-Interferenz) mit supprimierter Expression dieses Enzyms werden in Hinblick auf Funktionsuntersuchungen wichtige Erkenntnisse bringen können. Speziell durch Untersuchungen der transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp unter

Stressbedingungen könnten weitere Aufschlüsse über die physiologische Bedeutung der Isoprenbildung und -emission gewonnen werden.

Um genauere Kenntnisse über die enzymatischen Eigenschaften der PcDXR zu erlangen, wäre eine Klonierung und heterologe Expression der PcDXR ohne Transitpeptid notwendig. Mit dem isolierten Enzym könnte dann in Folge die Charakterisierung durchgeführt werden. Anstelle der indirekten Messung durch die Oxidation von NADPH müsste dafür die Entwicklung eines direkten Produktnachweises von MEP erfolgen.

Expressionsanalysen von DXS, DXR und ISPS bei Temperatur- und Lichtabhängigkeitsversuchen in Korrelation mit ISPS-Aktivitäten und DMADP-Gehalten über kurz- und langfristige Zeiträume sowie bei Begasungsexperimenten könnten weiteren Aufschluss über die Regulation des DOXP-Stoffwechsels und die Rolle dieser Schlüsselenzyme geben.

5 Literatur

- Aas,G, Riedmiller,A: Laubbäume. GU-Naturführer. München. ISBN 3-77424184-8 (1992).
- Adam,P, Hecht,S, Eisenreich,W, Kaiser,J, Gräwert,T, Arigoni,D, Bacher,A, Rohdich,F: Biosynthesis of terpenes: Studies on 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase. PNAS 99: 12108-12113 (2002).
- Affek,HP, Yakir,D: Protection by isoprene against singlet oxygen in leaves. Plant Physiology 129: 269-277 (2002).
- Alonso,WR, Rajaonarivony,J, Gershenzon,J, Croteau,R: Purification of 4S-Limonen synthase, a monoterpene cyclase from the glandular trichomes of peppermint (*Mentha x piperita*) and spearmint (*Mentha spicata*). Journal of Biological Chemistry 267: 7582-7587 (1992).
- Alonso,WR, Croteau,R: Prenyltransferases and cyclases. Methods in Plant Biochemistry 9: 239-260 (1993).
- Araki,N, Kusumi,K, Masamoto,K, Niwa,Y, Iba,K: Temperature-sensitive *Arabidopsis* mutant defective in 1-deoxy-D-Xylulose 5-phosphate synthase within the plastid nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. Physiologia Plantarum 108: 19-24 (2000).
- Arigoni,D, Sagner,S, Latzel,C, Eisenreich,W, Bacher,A, Zenk,MH: Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-d-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. Proc Natl Acad Sci USA 94: 10600-10605 (1997).
- Arimura,G, Huber,DPW, Bohlmann,J: Forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*) induce local and systemic diurnal emissions of terpenoid volatiles in hybrid poplar (*Populus trichocarpa x deltoides*): cDNA cloning, functional characterisation, and patterns of gene expression of (2) germacrene D synthase, PtdTPS1. The Plant Journal 37: 616 (2004).
- Atkin,OK, Tjoelker,MG: Thermal acclimation and the dynamic response of plant respiration to temperature. Trends in Plant Science 8: (2003).
- Atkinson,R, Arey,J: Atmospheric chemistry of biogenic organic compounds. Accounts of Chemical Research 31: 574-583 (1998).
- Bachl,A: Biochemische Charakterisierung der Isoprensynthese aus der Graupappel (*Populus x canescens* (Ait.) Sm.) und ihre Expression in *Arabidopsis thaliana* L. Dissertation. Forschungszentrum Karlsruhe. 1-122 (2004).

- Ball, JT: Calculations related to gas exchange. In: E. Zeiger, G.D. Farquhar, J.R. Cowan (Eds.), *Stomatal Function*. Stanford University Press, Stanford, California, USA 445-467 (1987).
- Bell, N, Shindell, DT, Faluvegi, G. The indirect greenhouse effect of isoprene. Abstract. EGS-AGU-EUG Joint Assembly Nice, France, 6-11 (2003).
- Bertin, N, Staudt, M: Effect of water stress on monoterpene emission from young potted holm oak (*Quercus ilex* L.) trees. *Oecologia* 107: 456-462 (1996).
- Birnboim, HC, Doly, J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513-1523 (1979).
- Bradford, MM: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Biochemistry* 72: 248-254 (1976).
- Brüggemann, N: Untersuchungen zur Regulation der Isoprenbildung bei Eichen. Dissertation. Schriftenreihe des Fraunhofer-Instituts für Atmosphärische Umweltforschung. 70: 1-203 (2002).
- Brüggemann, N, Schnitzler, J-P: The relation of IDP isomerase activity to isoprene emission of oak leaves. *Tree Physiology* 22: 1011-1018 (2002a).
- Brüggemann, N, Schnitzler, J-P: Diurnal variation of dimethylallyl diphosphate concentrations in oak (*Quercus robur*) leaves. *Physiologia Plantarum* 115: 190-196 (2002b).
- Brüggemann, N, Schnitzler, J-P: Comparison of isoprene emission, intercellular isoprene concentration and photosynthetic performance in water-limited oak (*Quercus pubescens* Willd. and *Quercus robur* L.) saplings. *Plant Biology* 4: 456-463 (2002c).
- Caemmerer, S, Farquhar, GD: Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153: 376-387 (1981).
- Carrau, FM, Medina, K, Boido, E, Farina, L, Gaggero, C, Dellacassa, E, Versini, G, Henschke, PA: De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters* 243: 107-115 (2005).
- Carretero-Paulet, L, Ahumada, I, Cunillera, N, Rodríguez-Concepción, M, Ferrer, A, Boronat, A, Campos, N: Expression and molecular analysis of the Arabidopsis DXR gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant Physiology* 129: 1581-1591 (2002).

- Centritto,M, Nascetti,P, Petrilli,L, Raschi,A, Loreto,F: Profiles of isoprene emission and photosynthetic parameters in hybrid poplars exposed to free-air CO₂ enrichment. *Plant, Cell & Environment* 27: 403-412 (2004).
- Delfine,S, Csiky,O, Seufert,G, Loreto,F: Fumigation with exogenous monoterpenes of a non-isoprenoid-emitting oak (*Quercus suber*): monoterpene acquisition, translocation, and effect on the photosynthetic properties at high temperatures. *New Phytologist* 146: 27-36 (2000).
- Delwiche,CF, Sharkey,TD: Rapid appearance of ¹³C in biogenic isopren when ¹³CO₂ is fed to intact leaves. *Plant, Cell & Environment* 16: 587-591 (1993).
- Dott,W, Thißen,R, Müller,T, Wiesmüller,GA, Fischer,G: Belastung der Arbeitnehmer bei Schimmelpilzsanierungsarbeiten in Innenräumen. Literaturstudie. Tiefbau-Berufs-Genossenschaft. München, Deutschland: (2004).
- Dudareva,N, Martin,D, Kish,CM, Kolosova,N, Gorestein,N, Fäldt,J, Miller,B, Bohlmann,J: (E)- β -ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: Function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily. *Plant Cell* 15: 1227-1241 (2003).
- Dudareva,N, Andersson,S, Orlova,I, Gatto,N, Reichelt,M, Rhodes,T, Boland,W, Gershenzon,J: The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 933-938 (2005).
- Estévez,JM, Cantero,A, Reindl,A, Reichler,S, Léon,P: 1-Deoxy-d-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *The Journal of Biological Chemistry* 276 : 22901-22909 (2001).
- Fall,R, Monson,RK: Isoprene emission rate and intercellular isoprene concentration as influenced by stomatal distribution and conductance. *Plant Physiology* 100: 987-992 (1992).
- Fall,R, Copley,SD: Bacterial sources and sinks of isoprene, a reactive atmospheric hydrocarbon. *Environmental Microbiology* 2: 123-130 (2000).
- Fehsenfeld,FJ, Calvert, Fall,R, Goldan,P: Emissions of volatile organic compounds from vegetation and the implications for atmospheric chemistry. *Global Biogeochemical Cycles* 6: 389-430 (1992).
- Fellermeier,M, Sagner,S, Spiteller,P, Spiteller,M, Zenk,MH: Early steps of deoxyxylulose phosphate pathway in chromoplasts of higher plants. *Phytochemistry* 64: 199-207 (2003).

- Fischbach,RJ, Zimmer,W, Schnitzler,J-P: Isolation and functional analysis of a cDNA encoding a myrcene synthase from holm oak (*Quercus ilex* L.). European Journal of Biochemistry 268: 5633-5638 (2001).
- Fischbach,RJ: Monoterpensynthasen in Blättern der Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) und der Steineiche (*Quercus ilex* L.). Dissertation. Schriftenreihe des Fraunhofer-Instituts für Atmosphärische Umweltforschung. 67: 1-188 (2001).
- Fisher,AJ, Rosenstiel,TN, Shirk,MC, Fall,R: Nonradioactive assay for cellular Dimethylallyl Diphosphate. Analytical Biochemistry 292: 272-279 (2001).
- Flügge,U-I: Phosphate translocaters in plastids. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 50: 27-45 (1999).
- Flügge,U-I, Gao,W: Transport of isoprenoid intermediates across chloroplast envelope membranes. Plant Biology 7: 91-97 (2005).
- Franke,W: Nutzbare Gewächse der gemäßigten Breiten, Subtropen und Tropen. Thieme Verlag Stuttgart. ISBN 3-13-530405-1 (1992).
- Fuentes,JD, Hayden,BP, Garstang,M, Lerdau,M, Fitzjarrald,D, Baldocchi,DD, Monson,R, Lamb,B, Geron,C: VOCs and biosphere-atmosphere feedbacks. Atmospheric Environment 31: 189-191 (2000).
- Funk,JL, Mak,JE, Lerdau,MT: Stress-induced changes in carbon sources for isoprene production in *Populus deltoides*. Plant, Cell & Environment 27: 747-755 (2004).
- Geron,C, Guenther,A, Sharkey,TD, Arnsts,RR: Temporal variability in basal isoprene emission factor. Tree Physiology 20: 799-805 (2000).
- Gershenzon,J, Croteau,R: Terpenoids. In: Herbivores. Their interactions with secondary plant metabolites, ed 2, vol. 1: the chemical participants (eds.: Rosenthal G.A., Berenbaum M.R.). Academic Press, San Diego 165-219 (1991).
- Graus,M, Schnitzler,J-P, Hansel,A, Cojocariu,C, Rennenberg,H, Wisthaler,A, Kreuzwieser,J: Transient release of oxygenated volatile organic compounds during light-dark transitions in gray poplar leaves. Plant Physiology 135(4): 1967-1975 (2004).
- Griffin,RJ, Cocker,DRI, Flagan,RC, Seinfeld,JH: Organic aerosol formation from the oxidation of biogenic hydrocarbons. Journal of Geophysical Research 104: 3555-3567 (1999).
- Grolle,S: Untersuchungen zu einem neuen Isopentenylidiphosphat-Biosyntheseweg in *Escherichia coli* und *Zymomonas mobilis*: Identifizierung

- und Charakterisierung beteiligter Gene. Dissertation. Berichte des Forschungszentrums Jülich. 3799: 1-111 (2000).
- Grote,R, Mayrhofer,S, Fischbach,RJ, Steinbrecher,R, Staudt,M, Schnitzler,J-P: Process based modelling of isoprenoid emissions from evergreen leaves of *Quercus ilex* (L.). Atmospheric Environment 40: 152-165 (2006).
- 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: A global model of natural volatile organic compound emissions. Journal of Geophysical Research 100: 8873-8892 (1995).
- Guenther,AB: Seasonal and spatial variations in natural volatile organic compound emissions. Ecological Applications 7: 34-45 (1997).
- Guevara-García,A, SanRoman,C, Arroyo,A, Cortés,ME, Gutiérrez-Nava,M, León,P: Characterization of the arabidopsis *clb6* mutant illustrates the importance of posttranscriptional regulation of the methyl-d-erithritol 4-phosphate pathway. The Plant Cell 17: 628-643 (2005).
- Hagit,P, Yakir,A, Yakir,D: Protection by isoprene against singlet oxygen in leaves. Plant Physiology 129: 269-277 (2002).
- Hanson,DT, Swanson,S, Graham,LE, Sharkey,TD: Evolutionary significance of isoprene emission from mosses. Am.J.Bot 86: 634-639 (1999).
- Hanson,DT, Sharkey,TD: Effect of growth conditions on isoprene emission and other thermotolerance -enhancing compounds. Plant, Cell & Environment 24: 929-936 (2001).
- Harley,PC, Monson,RK, Lerdau,MT: Ecological and evolutionary aspects of isoprene emission from plants. Oecologia 111: 109-123 (1999).
- Havaux,M, Niyogi,KK: The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. Plant Biology 96: 8762-8767 (1999).
- Hemmerlin,A, Hoeffler,J-F, Meyer,O, Tritsch,D, Kagan,IA, Grosdemange-Billiard,C, Rohmer,M, Bach,TJ: Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells. Journal of Biological Chemistry 278(29): 26666-26676 (2003).
- Heuser,T: Entwicklung und Anwendung von Isolierungs- und Quantifizierungsmethoden für epiphytische Mikroorganismen auf Blattoberflächen der Stieleiche (*Quercus robur* L.). Dissertation. Forschungszentrum Karlsruhe. 1-106 (2003).

- Hills,AJ, Zimmerman,PR: Isoprene measurement by ozone-induced chemiluminescence. *Analytical Chemistry* 62: 1055-1060 (1990).
- Hoffmann,T, Odum,J, Bowman,F, Collins,D, Klockow,D, Flagan,RC, Seinfeld,JH: Formation of organic aerosols from the Oxidation of biogenic hydrocarbons. *Journal of Atmospheric Chemistry* 26: 189-222 (1997).
- Hofmann,M: Handwörterbuch der Pflanzennamen (eds.: Encke F., Buchheim G., Seybold S.). Ulmer Verlag, Stuttgart (1984).
- Hofmann,M. Pappeln, Aspen und Weiden in Deutschland: Nutzung, Erhaltung, Forschung. URL:<http://www.bfafh.de/inst2/pappelnaspenweiden.pdf>. Report 533 (2003).
- Jabs,T, Dietrich,AD, Dangl,JL: Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* 273: 1853-1856 (1996).
- Karl,T, Curtis,AJ, Rosenstiel,TN, Monson,RK, Fall,R: Transient releases of acetaldehyde from tree leaves-products of a pyruvate overflow mechanism? *Plant, Cell & Environment* 25: 1121-1131 (2002).
- Keller,KR, Thompson,R: A rapid synthesis of isoprenoid diphosphates and their isolation in one step using either thin layer or flash chromatography. *Journal of Chromatography* 645: 161-167 (1993).
- Kellomäki,S, Rouvinen,I, Peltola,H, Strandman,H, Steinbrecher,R: Impact of global warming on the tree species composition of boreal forests in Finland and effects on emissions of isoprenoids. *Global Change Biology* 7: 531-544 (2001).
- Kesselmeier,J, Staudt,M: Biogenic volatile organic compounds (VOC): an overview on emission, physiology and ecology. *Journal of Atmospheric Chemistry* 33: 23-88 (1999).
- Kesselmeier,J, Ciccioli,P, Kuhn,U, Stefani,P, Biesenthal,T, Rottenberger,S, Wolf,A, Vitullo,M, Valentini,R, Nobre,A, Kabat,P, Andreae,O: Volatile organic compound emissions in relation to plant carbon fixation and the terrestrial carbon budget. *Global Biogeochemical Cycles* 16: 1126 (2002).
- Kreuzwieser,J, Schnitzler,J-P, Steinbrecher,R: Biosynthesis of organic compounds emitted by plants. *Plant Biology* 1: 149-159 (1999).
- Kreuzwieser,J, Graus,M, Wisthaler,A, Hansel,A, Rennenberg,H, Schnitzler,J-P: Xylem-transported glucose as an additional carbon source for leaf isoprene formation in *Quercus robur* L. *New Phytologist* 156: 171-178 (2002).
- Kuzma,J, Fall,R: Leaf isoprene emission rate is dependent on leaf development and the level of isoprene synthase. *Plant Physiology* 101: 435-440 (1993).

- Kuzma,J, Nemeck-Marshall,J, Pollock,WH, Fall,R: Bacteria produce the volatile hydrocarbon isoprene. *Current Microbiology* 30: 97-103 (1995).
- Kuzuyama,T, Shizimu,T, Takahashi,S, Seto,H: Fosmidomycin, a specific inhibitor of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reduktoisomerase in the nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Tetr Letters* 39: 7913-7916 (1998).
- Lange,BM, Ketchum,REB: 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 (2002).
- Langenheim,JH: Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology* 20: 1223-1280 (1994).
- Lehning,A, Zimmer,I, Steinbrecher,R, Bruggemann,N, Schnitzler,JP: Isoprene synthase activity and its relation to isoprene emission in *Quercus robur* L-leaves. *Plant, Cell & Environment* 22: 495-504 (1999).
- Lehning,A, Zimmer,W, Zimmer,I, Schnitzler,J-P: Modeling of annual variations of oak (*Quercus robur* L.) isoprene synthase activity to predict isoprene emission rates. *Journal of Geophysical Research* 106: 3157-3166 (2001).
- Leplé,JC, Brasiliero,A-CM, Michel,MF, Delmotte,F, Jouanin,L: Transgenic poplars: Expression of chimeric genes using four different constructs. *Plant Cell Reports* 11: 137-141 (1992).
- Lerdau,M, Keller,M: Controls on isoprene emission from trees in a subtropical dry forest. *Plant, Cell & Environment* 20: 569-578 (1997).
- Lewinsohn,E, Gijzen,M, Croteau,R: Wound-inducible pinene cyclase from grand fir: Purification, characterization and renaturation after SDS-PAGE. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 293: 167-173 (1992).
- Lichtenthaler,HK: The 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47-65 (1999).
- Logan,BA, Anchordoquy,TJ, Monson,RK, Pan,RS: The effect of isoprene on the properties of spinach thylakoids and phosphatidylcholine liposomes. *Plant Biology* 1: 602-606 (1999).
- Logan,BA, Monson,RK: Thermotolerance of leaf discs from four isoprene-emitting species is not enhanced by exposure to exogenous isoprene. *Plant Physiology* 120: 821-825 (1999).
- Logan,BA, Monson,RK, Potosnak,M: Biochemistry and physiology of foliar isoprene production. *Trends in Plant Science* 5: 477-481 (2000).

- Lois,L-M, Rodríguez-Concepción,M, Gallego,F, Campos,N, Boronat,A: Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *The Plant Journal* 22: 503-513 (2000).
- Loreto,F, Sharkey,TD: A gas exchange study of photosynthesis and isoprene emission in *Quercus rubra* L.. *Planta* 182: 523-531 (1990).
- Loreto,F, Ciccioli,P, Brancaleoni,E, Cecinato,A, Frattoni,M, Sharkey,TD: Different sources of reduced carbon contribute to form three classes of terpenoid emitted by *Quercus ilex* L. leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9966-9969 (1996a).
- Loreto,F, Ciccioli,P, Cecinato,A, Brancaleoni,E, Frattoni,M, Tricoli,D: Influence of environmental factors and air composition on the emission of α -pinene from *Quercus ilex* leaves. *Plant Physiology* 110: 267-275 (1996b).
- Loreto,F, Ciccioli,P, Cecinato,A, Brancaleoni,E, Frattoni,M, Fabozzi,C, Tricoli,D: Evidence of the photosynthetic origin of monoterpenes emitted by *Quercus ilex* L. leaves by ^{13}C labeling. *Plant Physiology* 110: 1317-1322 (1996c).
- Loreto,F, Förster,A, Dürr,M, Csiky,O, Seufert,G: On the monoterpene emission under heat stress and on the increased thermotolerance of leaves of *Quercus ilex* L. fumigated with selected monoterpenes. *Plant, Cell & Environment* 21: 101-107 (1998a).
- Loreto,F, Ciccioli,P, Brancaleoni,E, Valentini,R, De Lillis,M, Csiky,O, Seufert,G: A hypothesis on the evolution of isoprenoid emission by oaks based on the correlation between emission type and *Quercus* taxonomy. *Physikalische Blätter* 115: 302-305 (1998b).
- Loreto,F, Ciccioli,P, Brancaleoni,E, Frattoni,M, Delfine,S: Incomplete ^{13}C labelling of α -pinene content of *Quercus ilex* leaves and appearance of unlabelled C in α -pinene emission in the dark *Plant, Cell & Environment* 23: 229-234 (2000).
- Loreto,F, Fischbach,RJ, Schnitzler,JP, Ciccioli,P, Brancaleoni,E, Calfapietra,C, Seufert,G: Monoterpene emission and monoterpene synthase activities in the Mediterranean evergreen oak *Quercus ilex* L. grown at elevated CO_2 concentrations. *Global Change Biology* 7: 709-717 (2001).
- Loreto,F, Mannozi,M, Maris,C, Nascetti,P, Ferranti,F, Pasqualini,S: Ozone quenching properties of isoprene and its antioxidant role in leaves. *Plant Physiology* 126: 993-1000 (2001).
- Loreto,F, Velikova,V: Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiology* 127: 1781-1787 (2001).

- Loreto,F, Pinelli,P, Brancaleoni,E, Ciccioli,P: ^{13}C labelling reveals chloroplastic and extra-chloroplastic pools of dimethylallyl pyrophosphate and their contribution to isoprene formation. *Plant Physiology* 135: 1903-1907 (2004).
- Lu,S, Xu,R, Jia,J-W, Pang,J, Matsuda,SPT, Chen,X-Y: Cloning and functional characterization of a b-pinene synthase from *Artemisia annua* that shows circadian regulation of expression. *Plant Physiology* 130: 477-486 (2002).
- Magel,E, Mayrhofer,S, Müller,A, Zimmer,I, Hampp,R, Schnitzler,J-P: Photosynthesis and substrate supply for isoprene biosynthesis in poplar leaves. *Atmospheric Environment* 40: 138-151 (2006).
- Mahmoud,SS, Croteau,RB: Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 8915-8920 (2001).
- Mahmoud,SS, Croteau,RB: Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *PNAS* 98: 8917-8920 (2001).
- Mayrhofer,S, Heizmann,U, Magel,E, Eiblmeier,M, Müller,A, Rennenberg,H, Hampp,R, Schnitzler,J-P, Kreuzwieser,J: Carbon balance in leaves of young poplar trees. *Plant Biology* 6: 730-739 (2004).
- Mayrhofer,S, Teuber,M, Zimmer,I, Louis,S, Fischbach,RJ, Schnitzler,J-P: Diurnal and seasonal variation of isoprene biosynthesis-related genes in Grey Poplar leaves. *Plant Physiology* 139: 474-484 (2005).
- Miller,B, Heuser,T, Zimmer,W: 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 Letters* 460: 485-490 (1999).
- Miller,B, Heuser,T, Zimmer,W: Functional involvement of a deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene harbouring locus of *Synechococcus leopoliensis* in isoprenoid biosynthesis. *FEBS Letters* 481: 221-226 (2000).
- Monson,RK, Fall,R: Isoprene emission from aspen leaves. *Plant Physiology* 90: 267-274 (1989).
- Monson,RK, Jaeger,CH, Adams III,WW, Driggers,EM, Silver,GM, Fall,R: Relationships among isoprene emission rate, photosynthesis, and isoprene synthase activity as influenced by temperature. *Plant Physiology* 98: 1175-1180 (1992).

- Moore,R, Oram,DE, Penkett,SA: Production of isoprene by marine phytoplankton cultures. *Geophysical Research Letters* 21: 2507-2510 (1994).
- Munné-Bosch,S, Alegre,L: Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts. *Planta* 214: 608-615 (2002).
- Mülhardt,C: *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. ISBN 3-8274-1460-1. 1-280 (2003).
- Niinemets,U, Reichstein,M: Controls on the emission of plant volatiles through stomata: Differential sensitivity of emission rates to stomatal closure explained. *Journal of Geophysical Research* 108: 1-17 (2003).
- Niinemets,U, Loreto,F, Reichstein,M: Physiological and physicochemical controls on foliar volatile organic compound emissions. *Trends in Plant Science* 9: 180-186 (2004).
- Niinemets,Ü, Seufert,G, Steinbrecher,R, Tenhunen,JD: A model coupling foliar monoterpene emissions to leaf photosynthetic characteristics in Mediterranean evergreen *Quercus* species. *New Phytologist* 153: 257-275 (2002).
- Nogues,I, Brilli,F, Loreto,F: Dimethylallyl diphosphate and geranyl diphosphate pools of plant species characterized by different isoprenoid emissions. *Plant Physiology* 141: 721-30 (2006).
- Núñez,L, Plaza,J, Pérez-Pastor,R, Pujadas,M, Gimeno,BS, Bermejo,V, García-Alonso,S: High water vapour pressure deficit influence on *Quercus ilex* and *Pinus pinea* field monoterpene emission in the central Iberian Peninsula (Spain). *Atmospheric Environment* 36: 4441-4452 (2002).
- Owen,S, Penuelas,J: Opportunistic emissions of volatile isoprenoids. *Trends in Plant Science* 10: 420-426 (2005).
- Pegoraro,E. Environmental control of isoprene emission: from leaf to canopy scale. Dissertation. University of Edinburgh. 1-163 (2004).
- Penuelas,J, Filella,I, Llusia,J, Siscart,D, Pinol,J: Comparative field study of spring and summer leaf gas exchange and photobiology of the mediterranean trees *Quercus ilex* and *Phillyrea latifolia*. *Journal of Experimental Botany* 49: 229-238 (1998).
- Penuelas,J, Llusia,J: Linking photorespiration, monoterpenes and thermotolerance in *Quercus*. *New Phytologist* 155: 227-237 (2002).
- Penuelas,J, Llusia,J: BVOCs: plant defense against climate warming. *Trends in Plant Science* 8: 105-109 (2003).

- Penuelas,J, Llusià,J: Plant VOC emissions: making use of the unavoidable. *Trends in Ecology and Evolution* 19: 402-404 (2004).
- Penuelas,J, Llusià,J, Asensio,D, Munné-Bosch,S: Linking isoprene with plant thermotolerance, antioxidants and monoterpene emissions. *Plant, Cell & Environment* 28: 278-286 (2005).
- Peñuelas,J, Llusià,J: Seasonal emission of monoterpenes by the mediterranean tree *Quercus ilex* in field conditions: Relations with photosynthetic rates, temperature and volatility. *Physiologia Plantarum* 105: 641 (1999).
- Poisson,N, Kanakidou,M, Crutzen,PJ: Impact of non-methane hydrocarbons on tropospheric chemistry and the oxidizing power of the global troposphere: 3-dimensional modelling results. *Journal of Atmospheric Chemistry* 36: 157-230 (2000).
- Puschenreiter,M. Heavy Metal für Pflanzen. Universität für Bodenkultur Wien. Forschung Newsletter. Juni, Jahrgang 10, Ausgabe 3 (2005). URL: <http://boku.ac.at/2741.html>
- Querol,J, Campos,N, Imperial,S, Boronat,A, Rodríguez-Concepción,M: Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* GCPE protein involved in plastid isoprenoid biosynthesis. *FEBS Letters* 514: 343-346 (2002).
- Reuter,K, Sanderbrand,S, Jomaa,H, Wiesner,J, Steinbrecher,I, Beck,E, Hintz,M, Klebe,G, Stubbs,MT: Crystal structure of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, a crucial enzyme in the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 277: 5378-5384 (2002).
- Rodríguez-Concepción,M, Campos,N, Maria-Lois,L, Maldonado,C, Hoeffler,JF, Grosdemange-Billiard,C, Rohmer,M, Boronat,A: Genetic evidence of branching in the isoprenoid pathway for the production of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 473: 328-332 (2000).
- Rodríguez-Concepción,M, Ahumada,I, Diez-Juez,E, Sauret-Güeto,S, Lois,L-M, Gallego,F, Carretero-Paulet,L, Campos,N, Boronat,A: 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening. *The Plant Journal* 27: 213-222 (2001).
- Rodríguez-Concepción,M, Boronat,A: Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiology* 130: 1079-1089 (2002).
- Rohdich,F, Hecht,S, Gärtner,K, Adam,P, Krieger,C, Amslinger,S, Arigoni,D, Bacher,A, Eisenreich,W: Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic

- pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein. PNAS 99: 1158-1163 (2002).
- Rohmer,M, Knani,M, Simonin,P, Sutter,B, Sahm,H: Isoprenoid biosynthesis in bacteria: A novel pathway for the early steps leading leading to isopentenyl diphosphate. Journal of Biochemistry. 295: 517-524 (1993).
- Rohmer,M, Seemann,M, Horbach,S, Bringer-Meyer,S, Sahm,H: Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternativ nonmevalonate pathway of terpenoid biosynthesis. J Am Chem Soc 118: 2564-2566 (1996).
- Rosenstiel,TN, Fisher,AJ, Fall,R, Monson,RK: Differential accumulation of dimethylallyl diphosphate in leaves and needles of isoprene- and methylbutenol-emitting and nonemitting species. Plant Physiology 129: 1276-1284 (2002).
- Rosenstiel,TN, Potosnak,M, Griffin,KL, Fall,R, Monson,RK: Increased CO₂ uncouples growth from isoprene emission in an agriforest ecosystem. Nature 421: 256-259 (2003).
- Sacchettini,JC, Poulter,CD: Creating isoprenoid diversity. Science 277: 1788-1789 (1997).
- Sanadze,GA: Isoprene effect- light-dependent emission of isopren by green parts of plants. In: Trace gas emissions by plants (T.D. Sharkey, E.A. Holland, H.A. Mooney, eds.). Academic Press, New York 135-151 (1991).
- Schnitzler,J-P, Graus,M, Kreuzwieser,J, Heizmann,U, Rennenberg,H, Wisthaler,A, Hansel,A: Contribution of different carbon sources to isoprene biosynthesis in poplar (*Populus x canescens*) leaves. Plant Physiology 135: 152-160 (2004a).
- Schnitzler,J-P, Steinbrecher,R, Zimmer,I, Steigner,D, Fladung,M: Hybridization of european oaks (*Quercus ilex x Q. robur*) results in a mixed isoprenoid emitter type. Plant, Cell & Environment 27: 585-593 (2004b).
- Schnitzler,J-P, Zimmer,I, Bachl,A, Arend,M, Fromm,J, Fischbach,RJ: Biochemical properties of isoprene synthase in poplar (*Populus x canescens*). Planta 222: 777-786 (2005).
- Schnitzler,JP, Lehning,A, Steinbrecher,R: Seasonal pattern of isoprene synthase activity in quercus robur leaves and its significance for modeling isoprene emission rates. Botanica Acta 110: 240-243 (1997).
- Scholefield,PA, Doick,KJ, Herbert,BMJ, Hewitt,CN, Schnitzler,J-P, Pinelli,P, Loreto,F: Impact of rising CO₂ on emissions of volatile organic compounds: isoprene emission from *Phragmites australis* growing at elevated CO₂ in a

- natural carbon dioxide spring. *Plant, Cell & Environment* 27: 393-401 (2004).
- Schopfer,P, Brennicke,A: *Pflanzenphysiologie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. ISBN 3-540-64231-5. 1-395 (2006).
- Schwender,J, Müller,C, Zeidler,J, Lichtenthaler,HK: Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reduktoisomerase of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 455: 140-144 (1999).
- Sharkey,TD, Loreto,F, Delwiche,CF: The biochemistry of isoprene emission from leaves during photosynthesis. In: *Trace gas emission by plants* (eds. Sharkey T.D., Holland E.A., Mooney H.A.), pp. Academic Press, New York 153-184 (1991).
- Sharkey,TD, Loreto,F: Water stress,temperature and light effects on the capacity for isoprene emission and photosynthesis of kudzu leaves. *Oecologia* 343: 1-6 (1993).
- Sharkey,TD, Singaas,EL: Why plants emit isoprene. *Nature* 374: 769 (1995).
- Sharkey,TD, Singaas,EL, Lerdau,M, Geron,C: Weather effects on isoprene emission capacity and applications in emission algorithms. *Ecological Applications* 9: 1132-1137 (1999).
- Sharkey,TD, Yeh,SS: Isoprene emission from plants [Review]. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology* 52: 407-436 (2001).
- Sharkey,TD, Chen,XY, Yeh,S: Isoprene increases thermotolerance of fosmidomycin-fed leaves. *Plant Physiology* 125: 2001-2006 (2001).
- Silver,GM, Fall,R: Characterization of aspen isoprene synthase, an enzyme responsible for leaf isoprene emission to the atmosphere. *Journal of Biological Chemistry* 270: 13010-13016 (1995).
- Singaas,EL, Lerdau,M, Winter,K, Sharkey,TD: Isoprene increases thermotolerance of isoprene-emitting species. *Plant Physiology* 115: 1413-1420 (1997).
- Singaas,EL, Sharkey,TD: The regulation of isoprene emission responses to rapid leaf temperature fluctuations. *Plant, Cell & Environment* 21: 1181-1188 (1998).
- Singaas,EL, Sharkey,TD: The effects of high temperature on isoprene synthesis in oak leaves. *Plant, Cell & Environment* 23: 751-757 (2000).
- Singaas,EL: Terpenes and the thermotolerance of photosynthesis. *New Phytologist* 146: 1-2 (2000).

- Sprenger,GA, Schörken,U, Wiegert,T, Grolle,S, De Graaf,AA, Taylor,SV, Begley,TP, Bringer-Meyer,S, Sahm,H: 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 (1997).
- Staudt,M, Seufert,G: Light-dependent emission of monoterpenes by Holm Oak (*Quercus ilex* L.). *Naturwissenschaften* 92: 89-92 (1995).
- Staudt,M, Bertin,N: Light and temperature dependence of the emission of cyclic and acyclic monoterpenes from holm oak (*Quercus ilex* L.) leaves. *Plant, Cell & Environment* 21: 385-395 (1998).
- Staudt,M, Mandl,N, Joffre,R, Rambal,S: Intraspecific variability of monoterpene composition emitted by *Quercus ilex* leaves. *Canadian Journal of Forest Research-Journal Canadien de la Recherche Forestiere* 31: 174-180 (2001).
- Steinbrecher,R, Ziegler,H: Monoterpene produktion by trees. In: H. Rennenberg, W. Eschrich, H. Ziegler: *Trees - Contributions to modern tree physiology*. Backhuys Publishers, Leiden, NL 119-138 (1997).
- Steinbrecher,R, Rabong,R. Emission of terpenoids and C2–C6 hydrocarbons by Norway Spruce: Phytotron experiment and field studies. Borrell,PM ed. *The Proceedings of EUROTRAC Symposium '94*. The Hague, Academic Publ., 502-505 (1994).
- Street,RA, Owen,S, Duckham,SC, Boissard,C, Hewitt,CN: Effect of habitat and age on variations in volatile organic compound (VOC) emissions from *Quercus ilex* and *Pinus pinea*. *Atmospheric Environment* 31: 1-100 (1997).
- Strohm,M, Jouanin,L, Kunert,KJ, Pruvost,C, Polle,A, Foyer,CH, Rennenberg,H: Regulation of glutathione synthesis in leaves of transgenic poplar (*Populus tremula* x *P. alba*) overexpressing glutathione synthetase. *The Plant Journal* 7: 141-145 (1995).
- Takahashi,S, Kuzuyama,T, Watanabe,H, Seto,H: 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 (1998).
- Tholl,D, Boland,W, Hansel,A, Loreto,F, Rose,U, Schnitzler,J-P: Practical approaches to plant volatile analysis. Review. *The Plant Journal* 45: 540-60 (2006).
- Tingey,DT, Evans,RC, Bates,EH, Gumpertz,MH: Isoprene emission and photosynthesis in three ferns - the influence of light and temperature. *Physiologia Plantarum* 69: 609-616 (1987).

- Tingey,DT, Turner,DP, Weber,JA: Factors controlling the emissions of monoterpenes and other volatile organic compounds. In: Trace gas emissions by plants. T.D. Sharkey, E.A. Holland, H.A. Mooney, (eds.). Academic Press, New York. 93-119 (1991).
- Tognetti,R, Johnson,JD, Michelozzi,M, Raschi,A: Response of foliar metabolism in mature trees of *Quercus pubescens* and *Quercus ilex* to long-term elevated CO₂. *Environ Exp Bot* 39: 233-245 (1998).
- Velikova,V, Edreva,A, Loreto,F: Endogenous isoprene protects *Phragmites australis* leaves against singlet oxygen. *Physiologia Plantarum* 122: 219 (2004).
- Wildermuth,MC, Fall,R: Biochemical characterisation of stromal and thylakoid-bound isoforms of isoprene synthase in willow leaves. *Plant Physiology* 116: 1111-1123 (1998).
- Wilkins,K: Volatile metabolites from actinomycetes. *Chemosphere* 32: 1427-1434 (1996).
- Wilkinson,MJ, Owen,SM, Possell,M, Hartwell,J, Gould,P, Hall,A, Vickers,C, Hewitt,CN: Circadian control of isoprene emission from oil palm (*Elaeis guineensis*). *The Plant Journal* 47: 960-968 (2006).
- Wise,ML, Savage,TJ, Katahira,E, Croteau,R: Monoterpene synthases from Common sage (*Salvia officinalis*). cDNA isolation, characterisation, and functional expression of (+)-sabinene synthase, 1,8-cineole synthase, and (+)-bornyl diphosphate synthase. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 14891-14899 (1998).
- Wolfertz,M, Sharkey,TD, Boland,W, Kühnemann,F, Yeh,S, Weise,SE: Biochemical regulation of isoprene emission. *Plant, Cell & Environment* 26: 1357-1364 (2003).
- Wolfertz,M, Sharkey,TD, Boland,W, Kühnemann,F: Rapid regulation of the Methylerythritol 4-Phosphate pathway during isoprene synthesis. *Plant Physiology* 135: 1939-1945 (2004).
- Yajima,S, Nonaka,T, Kuzuyama,T, Seto,H, Ohsawa,K: Crystal structure of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase complexed with cofactors: Implications of a flexible loop movement upon substrate binding. *Journal of Biochemistry* 131: 313-317 (2002).
- Zander,R: Handwörterbuch der Pflanzennamen. Ulmer Verlag, Stuttgart, (1984).
- Zeidler,JG, Lichtenthaler,HK, May,HU, Lichtenthaler,FW: Is isoprene emitted by plants synthesized via the isopentenyl pyrophosphate pathway? *Zeitschrift für Naturforschung* 52: 15-23 (1997).

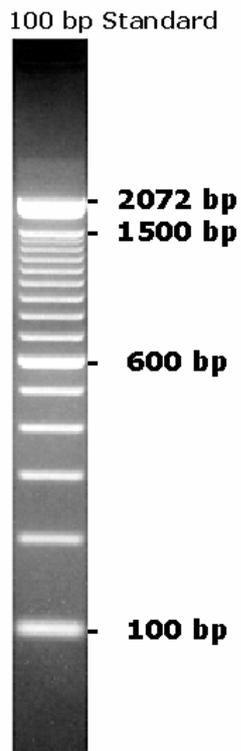
- Zimmer,W, Bruggemann,N, Emeis,S, Giersch,C, Lehning,A, Steinbrecher,R, Schnitzler,JP: Process-based modelling of isoprene emission by oak leaves. *Plant, Cell & Environment* 23: 585-595 (2000).
- Zimmer,W, Steinbrecher,R, Körner,C, Schnitzler,J-P: The process-based SIM-BIM model: towards more realistic prediction of isoprene emissions from adult *Quercus petraea* forest trees. *Atmospheric Environment* 37: 1665-1671 (2003).

6 Anhang

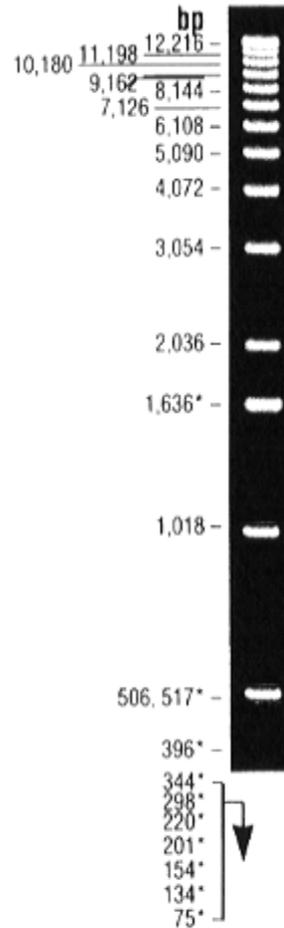
6.1 Molekularbiologie

6.1.1 DNA-Größenstandards

A



B



0.5 µg/lane; 1.0% agarose gel stained with ethidium bromide.* *Hinf* I fragments of the vector

Abb. 6.1 A 100 bp DNA-Standard und B 1 kb DNA-Standard (Invitrogen, Karlsruhe, D)

6.1.2 Der genetische Code

A

1. Position	2. Position				3. Position
	U (A)	C (G)	A (T)	G (C)	
U (A)	Phe	Ser	Tyr	Cys	U (A)
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C (G)
	Leu	Ser	Ende	Ende	A (T)
	Leu	Ser	Ende	Trp	G (C)
C (G)	Leu	Pro	His	Arg	U (A)
	Leu	Pro	His	Arg	C (G)
	Leu	Pro	Gln	Arg	A (T)
	Leu	Pro	Gln	Arg	G (C)
A (T)	Ile	Thr	Asn	Ser	U (A)
	Ile	Thr	Asn	Ser	C (G)
	Ile	Thr	Lys	Arg	A (T)
	Met ^a	Thr	Lys	Arg	G (C)
G (C)	Val	Ala	Asp	Gly	U (A)
	Val	Ala	Asp	Gly	C (G)
	Val	Ala	Glu	Gly	A (T)
	Val	Ala	Glu	Gly	G (C)

B

Aminosäuren:

A (Ala)	Alanin
C (Cys)	Cystein
D (Asp)	Asparaginsäure
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

Abb. 6.2 A Das Schema des genetischen Codes (aus <http://www.gesundheit.de/roche/pics/p06257.000-1.html>). „Ende“ bezeichnet ein Stopcodon, Met^a ist das Startcodon. B Aminosäuren mit 1- und 3-Buchstabencode.

6.2 Photosynthetischer Gaswechsel und Isoprenoidemission

6.2.1 Flussdiagramm der Gaswechsellmessanlage

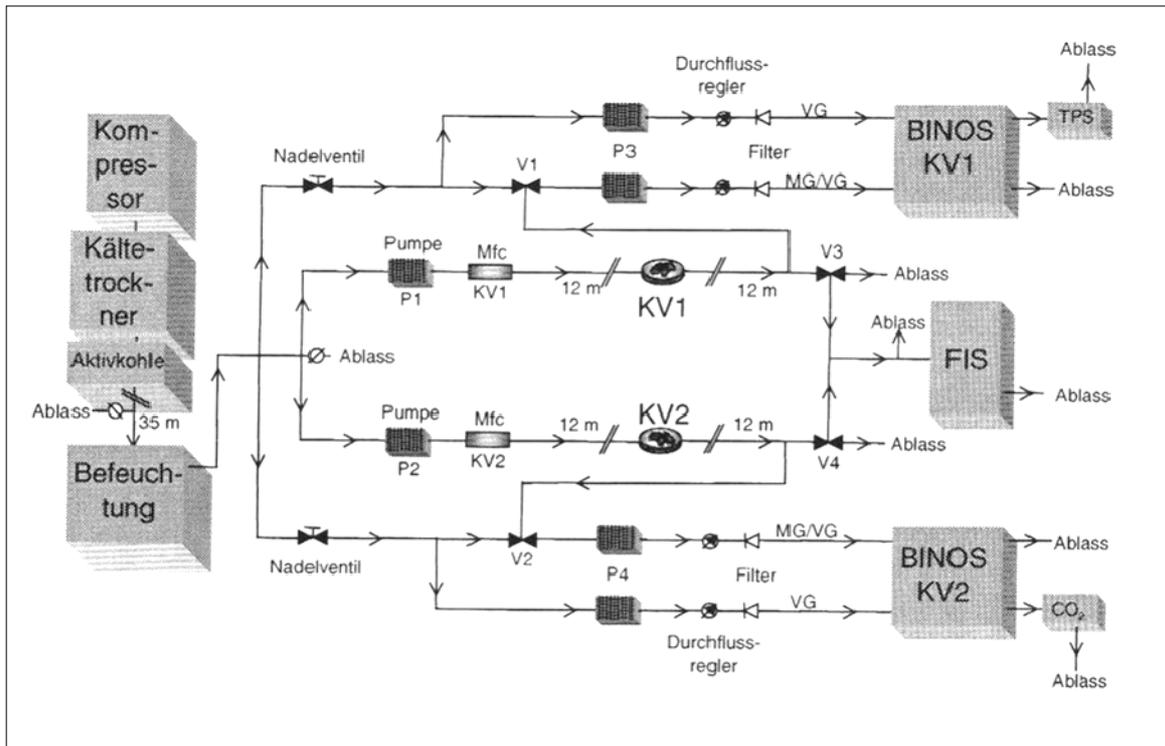


Abb. 6.3 Schematische Darstellung der Gaswechsellmessanlage aus BRÜGGEMANN (2002). Die verwendeten Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis angegeben.

6.2.2 Tagesgangmessungen der Graupappel und der Steineiche

Tab. 6.1 Gaswechsellmessungen der Graupappel und Steineiche im Tagesverlauf, die in den Messkampagnen 2001 (Graupappel), 2002 (Graupappel, Steineiche) und 2003 (Steineiche) an jeweils 2 Bäumen (Küvetten 1 (S 171 und 173) und 2 (S 172 und 174)), an 2 mal 2 aufeinander folgenden Tagen ermittelt wurden. An 5 Zeitpunkten (Angabe der Uhrzeit am Beginn des 15-min Probennahmeintervalls in MEZ) wurden an jedem Tag Blattmischproben von 4 parallelen Bäumen genommen. Die Daten repräsentieren die 15-min Mittelwerte. Spalten von links nach rechts: Datum und Uhrzeit der Probennahme, PPFD [$\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$] \pm SD, Blatttemperatur (BT) [$^{\circ}\text{C}$] \pm SD, Isoprenemission (Iso, Graupappel) [$\text{nmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] \pm SD bzw. die Summe der Monoterpenemission (Mono, Steineiche) [$\text{nmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$], Transpiration (Transp) [$\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] \pm SD, Stomatäre Leitfähigkeit (gH_2O) [$\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] \pm SD, Netto-Assimilation (Ass) [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] \pm SD, blattinterne CO_2 -Konzentration (C_i) [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] \pm SD. Die statistische Auswertung der Daten ist durch Kleinbuchstaben angegeben. Getestet wurde mittels ANOVA und nachfolgender Tukey-Korrektur für ($p \leq 0,01$, $n=15$)

Graupappel Tagesgangmessungen Küvette 1														
Probennahme	PPPFD	+/- SD	BT	+/- SD	Iso	+/- SD	Transp	+/- SD	gH ₂ O	+/- SD	Ass	+/- SD	Ci	+/- SD
07.08.2001 04:15	2 ^a	0,9	11,6 ^a	0,05	0,00 ^a	0,000	0,16 ^a	0,000	20,6 ^{ab}	0,11	-0,17 ^a	0,004	403 ^e	1,3
07.08.2001 09:45	149 ^b	14,5	27,2 ^e	0,55	5,29 ^b	0,219	0,45 ^d	0,005	15,9 ^a	0,67	4,01 ^{de}	0,230	53 ^a	0,9
07.08.2001 11:45	321 ^c	79,9	34,4 ^g	0,66	20,74 ^d	1,300	0,60 ^e	0,005	12,9 ^a	0,63	4,31 ^e	0,204	30 ^a	0,9
07.08.2001 15:45	108 ^{ab}	10,9	25,3 ^d	0,27	3,74 ^b	0,392	0,68 ^f	0,004	37,6 ^{de}	1,12	3,26 ^d	0,209	145 ^b	15,9
07.08.2001 21:12	1 ^a	0,5	14,4 ^b	0,07	0,00 ^a	0,000	0,20 ^a	0,000	20,0 ^{ab}	0,14	-0,27 ^a	0,013	394 ^e	1,0
08.08.2001 04:12	1 ^a	0,5	13,8 ^b	0,05	0,00 ^a	0,000	0,27 ^b	0,000	34,4 ^{cd}	0,33	-0,20 ^a	0,004	385 ^e	1,1
08.08.2001 08:12	85 ^{ab}	10,6	16,6 ^c	0,31	0,42 ^a	0,163	0,33 ^c	0,000	32,9 ^{cd}	1,62	1,88 ^c	0,005	242 ^c	5,9
08.08.2001 09:42	666 ^d	145,0	29,7 ^f	1,87	13,66 ^c	2,522	0,79 ^g	0,016	28,4 ^{bc}	5,79	5,82 ^f	0,022	13 ^a	1,1
08.08.2001 13:36	33 ^{ab}	3,4	14,5 ^b	0,31	0,26 ^a	0,129	0,33 ^c	0,010	46,1 ^e	0,90	1,57 ^b	0,255	285 ^{cd}	12,9
08.08.2001 15:36	57 ^{ab}	7,4	14,9 ^b	0,23	0,24 ^a	0,320	0,32 ^c	0,052	42,4 ^{de}	12,35	0,88 ^{bc}	1,056	326 ^d	59,6
06.09.2001 04:15	2 ^a	0,4	10,0 ^a	0,10	0,00 ^a	0,000	-	-	-	-	-0,46 ^a	0,014	-	-
06.09.2001 10:15	70 ^a	6,9	14,2 ^c	0,23	0,00 ^a	0,000	0,20 ^a	0,004	18,6 ^{ab}	0,35	2,36 ^b	0,013	239 ^{bc}	3,3
06.09.2001 13:15	399 ^b	178,6	29,9 ^g	0,90	5,98 ^d	0,702	0,53 ^d	0,016	14,5 ^a	0,89	4,66 ^d	0,430	42 ^a	28,0
06.09.2001 15:15	1170 ^c	270,4	31,3 ^h	0,43	9,73 ^e	0,652	0,87 ^f	0,021	23,5 ^b	0,89	3,48 ^c	0,094	180 ^b	10,2
06.09.2001 17:15	149 ^{ab}	61,9	22,6 ^e	0,81	2,78 ^b	0,580	0,70 ^e	0,028	44,4 ^c	6,05	2,82 ^{bc}	0,673	285 ^c	32,2
06.09.2001 21:45	2 ^a	0,8	11,3 ^b	0,02	0,00 ^a	0,000	-	-	-	-	-0,66 ^a	0,017	-	-
07.09.2001 04:15	2 ^a	0,8	10,9 ^{ab}	0,01	0,00 ^a	0,000	-	-	-	-	-0,53 ^a	0,033	-	-
07.09.2001 09:45	79 ^a	25,0	14,3 ^c	0,22	0,13 ^a	0,075	0,36 ^c	0,004	44,7 ^c	1,10	2,01 ^b	0,372	277 ^c	18,2
07.09.2001 13:15	160 ^{ab}	60,3	25,8 ^f	0,60	4,83 ^c	0,868	0,40 ^c	0,004	14,8 ^a	1,03	2,82 ^{bc}	0,671	60 ^a	64,5
07.09.2001 15:15	62 ^a	4,4	20,5 ^d	0,42	0,00 ^a	0,000	0,29 ^b	0,027	15,6 ^a	2,15	-0,72 ^a	0,137	449 ^d	15,8
03.07.2002 04:15	0 ^a	0,0	12,0 ^a	0,01	0,00 ^a	0,000	0,41 ^b	0,000	71,9 ^c	0,56	-0,78 ^a	0,000	430 ^f	1,9
03.07.2002 10:15	1263 ^d	11,4	34,8 ^h	0,25	6,08 ^e	0,200	1,11 ^e	0,004	22,8 ^a	0,33	-0,19 ^a	0,256	368 ^{de}	22,2
03.07.2002 12:45	522 ^c	17,7	29,8 ^g	0,14	3,61 ^d	0,406	1,03 ^{de}	0,099	34,8 ^{ab}	4,48	5,95 ^c	1,168	52 ^a	35,6
03.07.2002 16:15	42 ^a	10,0	18,6 ^d	0,21	0,00 ^a	0,000	0,85 ^c	0,015	133,8 ^e	22,38	7,35 ^c	0,037	205 ^b	33,3
03.07.2002 21:15	0 ^a	0,0	13,7 ^b	0,26	0,00 ^a	0,000	0,42 ^b	0,016	67,9 ^c	2,42	-0,46 ^a	0,159	398 ^{ef}	6,4
04.07.2002 03:45	0 ^a	0,0	11,7 ^a	0,03	0,00 ^a	0,000	0,37 ^b	0,024	79,4 ^{cd}	7,61	-0,70 ^a	0,245	402 ^{ef}	8,9
04.07.2002 09:42	281 ^b	40,3	16,7 ^c	0,42	0,00 ^a	0,000	1,01 ^d	0,032	170,7 ^f	4,42	2,83 ^b	0,166	319 ^{cd}	5,8
04.07.2002 12:42	469 ^c	81,0	26,0 ^f	0,49	1,43 ^c	0,206	1,59 ^f	0,015	93,9 ^d	5,56	3,74 ^b	0,344	269 ^c	11,6
04.07.2002 16:39	205 ^b	32,3	22,7 ^e	0,17	0,74 ^b	0,202	0,78 ^c	0,034	44,5 ^b	3,54	7,17 ^c	1,306	49 ^a	38,2
04.07.2002 20:57	0 ^a	0,0	11,6 ^a	0,05	0,00 ^a	0,000	0,25 ^a	0,043	34,0 ^{ab}	8,42	-0,22 ^a	0,390	392 ^{ef}	22,3
29.08.2002 05:15	0 ^a	0,0	11,9 ^a	0,03	0,00 ^a	0,000	0,10 ^a	0,000	9,0 ^a	0,07	-0,01 ^a	0,068	373 ^e	10,8
29.08.2002 09:45	129 ^b	24,6	19,1 ^d	0,14	0,92 ^{ab}	0,084	0,91 ^b	0,036	90,6 ^{de}	6,96	4,87 ^{cd}	0,363	229 ^c	12,6
29.08.2002 13:15	311 ^c	45,6	20,9 ^e	0,50	2,23 ^c	0,159	0,97 ^c	0,055	76,8 ^c	3,70	5,69 ^e	0,563	170 ^b	12,5
29.08.2002 16:45	159 ^b	55,5	20,6 ^e	0,35	1,89 ^{bc}	0,344	1,07 ^d	0,007	98,1 ^e	4,91	4,56 ^c	0,448	211 ^c	15,0
29.08.2002 20:45	0 ^a	0,0	13,1 ^b	0,05	0,00 ^a	0,000	0,08 ^a	0,005	6,3 ^a	0,27	-0,23 ^a	0,085	432 ^f	22,6
30.08.2002 05:15	0 ^a	0,0	11,8 ^a	0,02	0,00 ^a	0,000	0,10 ^a	0,005	9,0 ^a	0,50	-0,16 ^a	0,058	395 ^{ef}	12,5
30.08.2002 10:12	124 ^b	20,7	24,7 ^f	0,88	5,52 ^d	1,243	1,34 ^f	0,008	80,7 ^{cd}	9,44	4,50 ^c	0,005	235 ^c	15,1
30.08.2002 13:12	300 ^c	110,0	27,3 ^g	0,52	8,14 ^e	0,702	1,14 ^e	0,005	49,3 ^b	2,81	5,44 ^{de}	0,252	112 ^a	20,2
30.08.2002 17:12	81a ^b	7,9	19,5 ^d	0,09	0,87 ^{ab}	0,106	1,11d ^e	0,004	128,9 ^f	1,93	3,21 ^b	0,352	279 ^d	8,4
30.08.2002 20:42	0 ^a	0,0	16,4 ^c	0,11	0,00 ^a	0,000	0,10 ^a	0,005	5,6 ^a	0,18	-0,28 ^a	0,073	421 ^f	22,4

Graupappel Tagesgangmessungen Küvette 2														
Probennahme	PPPFD	+/- SD	BT	+/- SD	Iso	+/- SD	Transp	+/- SD	gH ₂ O	+/- SD	Ass	+/- SD	Ci	+/- SD
07.08.2001 04:30	0 ^a	0,0	11,2 ^a	0,01	0,00 ^a	0,000	0,26 ^a	0,000	44,5 ^{cd}	0,17	-0,18 ^a	0,000	397 ^e	1,0
07.08.2001 10:00	233 ^c	52,6	30,3 ^f	1,20	11,99 ^c	2,618	0,90 ^c	0,017	29,9 ^{ab}	4,15	5,17 ^{de}	0,287	27 ^a	30,1
07.08.2001 12:00	270 ^c	32,1	33,3 ^g	0,36	20,52 ^d	1,779	1,19 ^e	0,032	35,5 ^{abc}	1,80	4,70 ^d	0,281	63 ^{ab}	23,0
07.08.2001 16:00	76 ^b	11,3	23,7 ^d	0,44	3,46 ^b	0,632	0,92 ^c	0,031	73,6 ^f	0,39	3,04 ^c	0,243	236 ^c	10,9
07.08.2001 20:57	0 ^a	0,0	14,0 ^b	0,07	0,00 ^a	0,000	0,31 ^a	0,000	37,7 ^{bc}	0,34	-0,17 ^a	0,012	375 ^e	4,1
08.08.2001 03:57	0 ^a	0,0	13,5 ^b	0,06	0,00 ^a	0,000	0,29 ^a	0,005	36,2 ^{bc}	0,53	-0,23 ^a	0,008	388 ^e	1,5
08.08.2001 07:57	29a ^b	8,9	15,2 ^c	0,14	0,00 ^a	0,000	0,40 ^b	0,004	49,8 ^{de}	0,23	1,45 ^b	0,391	303 ^d	18,9
08.08.2001 09:57	275 ^c	55,4	25,9 ^e	0,39	9,49 ^c	1,052	1,07 ^d	0,050	69,7 ^f	10,74	6,05 ^e	0,171	120 ^b	27,2
08.08.2001 13:21	77 ^b	34,6	15,4 ^c	0,50	0,99 ^{ab}	0,294	0,43 ^b	0,016	56,5 ^e	1,77	3,18 ^c	0,995	225 ^c	50,5
08.08.2001 15:51	69a ^b	19,3	15,3 ^c	0,19	0,00 ^a	0,000	0,28 ^a	0,012	26,4 ^a	1,44	0,20 ^a	0,096	363 ^e	7,6
06.09.2001 04:30	0 ^a	0,0	10,0 ^a	0,03	0,00 ^a	0,000	0,19 ^a	0,000	25,2 ^{bc}	0,12	-0,82 ^a	0,000	442 ^{cd}	1,2
06.09.2001 10:00	45 ^{ab}	2,4	13,0 ^b	0,12	0,00 ^a	0,000	0,34 ^b	0,000	41,3 ^e	0,84	1,27 ^c	0,054	331 ^b	2,4
06.09.2001 13:30	196 ^d	79,3	28,3 ^f	1,01	3,11 ^d	0,176	0,75 ^d	0,085	25,3 ^{bc}	6,04	2,17 ^e	0,242	214 ^a	46,5
06.09.2001 15:00	203 ^d	42,7	30,7 ^g	0,59	4,99 ^e	0,354	0,76 ^d	0,107	20,3 ^{ab}	5,23	1,92 ^{de}	0,066	195 ^a	28,1
06.09.2001 17:30	86 ^{bc}	15,0	20,7 ^d	0,73	1,08 ^b	0,198	0,53 ^c	0,008	32,0 ^{cd}	2,07	1,49 ^{cd}	0,151	293 ^b	14,1
06.09.2001 21:30	0 ^a	0,0	10,7 ^a	0,03	0,00 ^a	0,000	0,32 ^b	0,000	61,9 ^f	0,47	-0,87 ^a	0,015	405 ^c	1,0
07.09.2001 04:00	0 ^a	0,0	10,3 ^a	0,04	0,00 ^a	0,000	0,13 ^a	0,005	18,1 ^a	0,46	-0,84 ^a	0,007	466 ^d	0,7
07.09.2001 10:00	49 ^{ab}	12,1	14,6 ^c	0,33	0,01 ^a	0,013	0,36 ^b	0,011	37,1 ^{de}	0,25	0,76 ^b	0,267	339 ^b	14,3
07.09.2001 13:00	132 ^{cd}	9,6	25,4 ^e	0,15	2,39 ^c	0,129	0,52 ^c	0,005	19,9 ^{ab}	0,74	1,80 ^{de}	0,075	207 ^a	11,9
07.09.2001 15:00	58 ^{abc}	25,1	20,9 ^d	0,43	0,05 ^a	0,112	0,34 ^b	0,043	18,4 ^{ab}	2,66	-1,10 ^a	0,388	480 ^d	48,3
03.07.2002 04:00	0 ^a	0,0	11,2 ^a	0,06	0,00 ^a	0,000	0,31 ^b	0,000	68,0 ^{cd}	1,05	-0,45 ^a	0,063	412 ^e	4,7
03.07.2002 10:00	1102 ^d	10,5	28,9 ^e	0,37	8,15 ^d	0,309	0,90 ^e	0,055	34,0 ^a	3,93	5,20 ^e	0,086	27 ^a	28,4
03.07.2002 13:00	403 ^b	105,1	32,2 ^f	1,46	13,34 ^e	0,958	1,88 ^f	0,065	110,8 ^e	21,24	3,78 ^c	0,130	248 ^d	14,7
03.07.2002 16:30	28 ^a	13,0	17,5 ^c	0,32	0,23 ^a	0,060	-	-	-	-	0,19 ^b	0,013	-	-
03.07.2002 21:30	0 ^a	0,0	12,8 ^b	0,20	0,00 ^a	0,000	0,27 ^{ab}	0,005	46,2 ^{ab}	0,80	-0,38 ^a	0,063	400 ^e	3,1
04.07.2002 04:00	0 ^a	0,0	11,5 ^{ab}	0,02	0,00 ^a	0,000	0,24 ^a	0,004	45,3 ^{ab}	0,41	-0,35 ^a	0,034	401 ^e	4,1
04.07.2002 09:27	184 ^{ab}	38,4	16,1 ^c	0,11	0,77 ^a	0,026	0,61 ^c	0,005	85,1 ^d	3,29	4,31 ^d	0,159	228 ^{cd}	7,5
04.07.2002 12:57	692 ^c	274,9	27,5 ^e	0,82	6,36 ^c	0,332	0,93 ^e	0,010	39,0 ^a	3,60	5,44 ^e	0,164	72 ^b	29,2
04.07.2002 16:54	181 ^{ab}	21,8	23,0 ^d	0,42	3,57 ^b	0,360	0,82 ^d	0,005	58,3 ^{bc}	3,77	4,17 ^d	0,246	196 ^c	19,3
04.07.2002 21:12	0 ^a	0,0	10,8 ^a	0,19	0,00 ^a	0,000	0,30a ^b	0,000	65,8 ^c	1,19	-0,62 ^a	0,023	403 ^e	4,9
29.08.2002 05:30	0 ^a	0,0	12,3 ^a	0,04	0,00 ^a	0,000	0,02 ^a	0,000	1,4 ^a	0,03	-0,04 ^a	0,030	423 ^c	33,6
29.08.2002 10:00	144 ^{bc}	24,1	20,6 ^{bc}	0,24	2,41 ^{abc}	0,725	0,69 ^b	0,004	49,5 ^d	1,23	5,38 ^{cd}	0,463	117 ^a	25,9
29.08.2002 13:30	227 ^{cd}	101,8	23,2 ^{cd}	0,43	5,07 ^c	0,774	0,76 ^d	0,019	41,8 ^c	3,73	5,98 ^d	0,452	46 ^a	43,8
29.08.2002 16:30	107 ^{ab}	27,6	22,7 ^{ab}	0,48	3,53 ^{bc}	1,208	0,72 ^c	0,005	41,6 ^c	3,09	5,54 ^{cd}	0,117	52 ^a	19,2
29.08.2002 21:00	0 ^a	0,0	13,4 ^a	0,04	0,00 ^a	0,000	0,02 ^a	0,000	1,2 ^a	0,01	-0,12 ^a	0,005	541 ^d	10,7
30.08.2002 05:30	0 ^a	0,0	12,1 ^a	0,01	0,00 ^a	0,000	0,02 ^a	0,000	1,9 ^a	0,06	-0,03 ^a	0,065	392 ^c	57,0
30.08.2002 09:57	109 ^b	32,9	28,2 ^b	1,16	8,52 ^d	3,723	1,03 ^f	0,010	38,2 ^{bc}	3,88	2,85 ^b	0,384	200 ^b	39,1
30.08.2002 13:27	268 ^d	78,1	27,9 ^d	0,60	11,06 ^d	0,928	0,86 ^e	0,004	33,1 ^b	2,15	4,97 ^c	0,269	45 ^a	28,8
30.08.2002 17:27	42 ^{ab}	2,3	20,1 ^{ab}	0,16	0,98 ^{ab}	0,125	0,76 ^d	0,008	61,5 ^e	0,56	3,17 ^b	0,023	232 ^b	3,0
30.08.2002 20:27	0 ^a	0,0	17,1 ^a	0,10	0,00 ^a	0,000	0,02 ^a	0,000	1,3 ^a	0,01	-0,17 ^a	0,004	561 ^d	2,6

Steineiche Tagesgangmessungen Küvette 1													
Probennahme	PPFD	+/- SD	BT	+/- SD	Mono	Transp	+/- SD	gH ₂ O	+/- SD	Ass	+/- SD	Ci	+/- SD
01.07.2002 05:00	0 ^a	0,0	13,6 ^{ab}	0,21	0,02	0,03 ^{cd}	0,000	2,92 ^f	0,086	-0,27 ^c	0,027	488 ^{abc}	9,5
01.07.2002 09:30	531 ^d	169,6	32,8 ^{ef}	0,97	0,07	0,06 ^f	0,004	1,10 ^{cd}	0,072	0,05 ^d	0,087	289 ^a	100,5
01.07.2002 13:00	294 ^{bc}	12,6	34,7 ^g	0,30	0,10	0,05 ^{ef}	0,000	0,87 ^{bc}	0,051	0,01 ^d	0,105	322 ^a	158,4
01.07.2002 17:00	241 ^b	8,6	31,9 ^{de}	0,56	0,03	0,03 ^{bc}	0,005	0,52 ^a	0,031	-0,50 ^b	0,077	1505 ^d	172,2
01.07.2002 22:00	0 ^a	0,0	14,6 ^b	0,03	0,01	0,01 ^a	0,000	1,06 ^{bcd}	0,053	-0,87 ^a	0,062	1403 ^d	120,3
02.07.2002 04:00	0 ^a	0,0	14,3 ^{ab}	0,04	0,01	0,02 ^{ab}	0,004	1,23 ^d	0,187	-0,35 ^c	0,066	710 ^c	42,3
02.07.2002 10:00	387 ^c	38,8	31,1 ^d	0,43	0,26	0,04 ^{de}	0,007	0,78a ^b	0,088	0,00 ^d	0,070	358 ^{ab}	116,0
02.07.2002 13:00	255 ^{bc}	44,1	33,5 ^f	0,59	1,30	0,15 ^g	0,009	2,77 ^f	0,272	0,07 ^d	0,075	316 ^a	32,7
02.07.2002 17:00	32 ^a	9,9	19,5 ^c	0,20	0,08	0,04 ^{de}	0,000	1,93 ^e	0,090	-0,33 ^c	0,107	582 ^{bc}	61,7
02.07.2002 21:30	0 ^a	0,0	13,4 ^a	0,12	0,00	0,05 ^{ef}	0,000	4,52 ^g	0,054	-0,68 ^{ab}	0,214	593 ^{bc}	63,3
27.08.2002 05:00	0 ^a	0,0	14,6 ^{bc}	0,03	-	0,11 ^b	0,005	10,98 ^b	0,695	-0,18 ^{bc}	0,092	385 ^d	16,8
27.08.2002 10:00	178 ^{cd}	12,3	27,0 ^g	0,29	-	0,49 ^f	0,021	16,48 ^c	0,390	1,69 ^g	0,102	184 ^a	14,2
27.08.2002 14:00	54 ^b	10,4	22,8 ^f	0,37	-	0,28 ^d	0,033	11,37 ^b	1,721	0,72 ^{de}	0,110	234 ^{ab}	24,2
27.08.2002 18:00	49 ^b	4,1	20,1 ^d	0,28	-	0,21 ^c	0,008	11,68 ^b	0,239	1,06 ^f	0,142	219 ^{ab}	21,1
27.08.2002 21:30	0 ^a	0,0	15,2 ^c	0,21	-	0,03 ^a	0,005	1,83 ^a	0,432	-0,30 ^{ab}	0,133	631 ^e	89,1
28.08.2002 05:00	0 ^a	0,0	11,5 ^a	0,02	-	0,03 ^a	0,005	3,04 ^a	0,330	-0,47 ^a	0,037	615 ^e	23,9
28.08.2002 09:00	207 ^d	24,6	22,0 ^e	0,31	-	0,53 ^f	0,013	27,78 ^d	0,694	1,87 ^g	0,090	236 ^{ab}	8,9
28.08.2002 13:30	141 ^c	36,9	28,0 ^h	0,49	-	0,33 ^e	0,018	9,48 ^b	0,463	0,47 ^d	0,140	270 ^{bc}	24,6
28.08.2002 16:00	199 ^d	15,1	22,8 ^f	0,56	-	0,33 ^e	0,021	15,09 ^c	1,795	0,90 ^{ef}	0,125	254 ^{abc}	7,0
28.08.2002 20:30	0 ^a	0,0	14,1 ^b	0,07	-	0,03 ^a	0,005	2,05 ^a	0,183	0,03 ^c	0,025	333 ^{cd}	17,2
22.07.2003 04:00	0 ^a	0,0	11,7 ^b	0,02	0,01	0,02 ^a	0,005	2,53 ^c	0,146	-0,28 ^b	0,068	1098 ^d	194,9
22.07.2003 09:00	691 ^{cd}	72,3	33,4 ^g	0,44	1,03	0,22 ^e	0,016	4,06d ^e	0,437	0,18 ^c	0,043	230 ^{ab}	6,5
22.07.2003 13:00	406 ^{bc}	45,3	29,2 ^f	0,92	0,95	0,16 ^d	0,004	4,07d ^e	0,258	0,16 ^c	0,025	241 ^{ab}	8,3
22.07.2003 17:00	270 ^{ab}	92,0	23,8 ^d	0,26	0,32	0,13 ^c	0,005	4,64 ^e	0,174	0,57 ^d	0,186	160 ^a	55,3
22.07.2003 21:00	0 ^a	0,0	16,2 ^c	0,48	0,02	0,02 ^a	0,000	1,31 ^a	0,079	-0,58 ^a	0,020	1054 ^d	39,7
23.07.2003 04:45	0 ^a	0,9	8,9 ^a	1,71	0,01	0,02 ^a	0,009	2,03 ^{abc}	0,482	-0,24 ^b	0,027	476 ^c	58,2
23.07.2003 09:30	107 ^{ab}	11,6	15,4 ^c	0,08	0,04	0,06 ^b	0,000	3,81 ^d	0,072	0,19 ^c	0,055	389 ^{bc}	20,4
23.07.2003 13:00	294 ^{ab}	2,1	24,8 ^{de}	0,10	0,34	0,06 ^b	0,016	2,07 ^{bc}	0,526	-0,08 ^b	0,024	516 ^c	36,3
23.07.2003 17:00	917 ^d	428,3	26,6 ^e	1,93	0,66	0,04 ^b	0,009	1,42 ^{ab}	0,060	0,30 ^c	0,038	176 ^a	46,2
23.07.2003 21:00	0 ^a	0,0	17,1 ^c	0,06	0,25	0,02 ^a	0,000	1,31 ^a	0,016	-0,72 ^a	0,124	1577 ^e	134,3
03.09.2003 05:00	0 ^a	0,0	7,8 ^a	0,06	0,02	0,02 ^a	0,004	2,35 ^b	0,070	-0,06 ^c	0,053	292 ^b	32,2
03.09.2003 10:00	450 ^{abc}	88,0	23,7 ^c	0,55	0,82	0,47 ^f	0,027	15,70 ^f	0,615	1,94 ^e	0,287	230 ^{ab}	26,5
03.09.2003 13:00	805 ^{cd}	543,1	21,7 ^c	2,04	0,64	0,18 ^c	0,021	6,74 ^c	0,347	3,41 ^f	0,286	64 ^a	13,2
03.09.2003 16:00	632 ^{bc}	372,5	27,7 ^d	0,35	1,20	0,31 ^e	0,022	7,83 ^{de}	0,682	0,36 ^d	0,054	355 ^b	10,4
03.09.2003 21:00	0 ^a	0,0	9,6a ^b	0,08	0,02	0,02 ^a	0,000	1,46 ^{ab}	0,044	-0,98 ^a	0,048	1606 ^f	51,8
04.09.2003 05:00	0 ^a	0,0	9,2 ^{ab}	0,04	0,02	0,02 ^a	0,000	1,56 ^{ab}	0,073	-0,48 ^b	0,103	1275 ^e	101,5
04.09.2003 09:30	493 ^{abc}	112,4	28,8 ^d	1,22	1,33	0,30 ^e	0,005	6,92 ^{cd}	0,574	-1,04 ^a	0,060	571 ^c	34,1
04.09.2003 13:00	1258 ^d	36,8	34,1 ^e	0,63	1,14	0,13 ^b	0,000	2,16 ^b	0,129	-0,99 ^a	0,050	1033 ^d	28,0
04.09.2003 17:00	132 ^{ab}	9,3	23,7 ^c	0,31	0,97	0,24 ^d	0,009	8,30 ^e	0,422	0,66 ^d	0,081	360 ^b	13,1
04.09.2003 21:00	0 ^a	0,0	10,2 ^b	0,08	0,02	0,01 ^a	0,000	1,18 ^a	0,064	-0,37 ^{bc}	0,159	1399 ^e	200,4

Steineiche Tagesgangmessungen Küvette 2													
Probennahme	PPFD	+/- SD	BT	+/- SD	Mono	Transp	+/- SD	gH ₂ O	+/- SD	Ass	+/- SD	Ci	+/- SD
01.07.2002 04:45	1 ^a	1,4	12,2 ^a	0,08	0,04	0,04 ^{ab}	0,004	3,99 ^{cd}	0,289	0,01 ^c	0,086	359 ^{bc}	43,0
01.07.2002 09:15	198 ^{abc}	93,7	29,0 ^c	1,28	0,52	0,14 ^c	0,013	3,49 ^{bcd}	0,084	0,08 ^c	0,009	328 ^b	6,2
01.07.2002 12:45	743 ^e	193,3	36,9 ^e	1,01	0,74	0,17 ^c	0,013	2,65 ^{abcd}	0,054	0,00 ^c	0,034	331 ^b	19,4
01.07.2002 16:45	473 ^d	34,4	36,7 ^{de}	0,35	0,58	0,05 ^{ab}	0,005	0,68 ^a	0,053	-0,26 ^b	0,051	880 ^d	109,9
01.07.2002 21:45	0 ^a	0,0	13,7 ^a	0,05	0,01	0,01 ^a	0,000	0,91 ^{ab}	0,094	-0,39 ^a	0,019	1039 ^e	95,1
02.07.2002 03:45	0 ^a	0,0	13,8 ^a	0,07	0,01	0,03 ^{ab}	0,009	2,51 ^{abc}	0,623	-0,23 ^b	0,066	482 ^c	38,5
02.07.2002 09:45	256 ^{cd}	153,6	28,2 ^c	1,69	1,04	0,27 ^d	0,026	7,01 ^{ef}	0,405	0,52 ^d	0,051	252 ^{ab}	6,6
02.07.2002 12:45	236 ^{bc}	101,1	34,8 ^d	1,16	1,47	0,30 ^d	0,037	5,21 ^{de}	0,506	0,11 ^c	0,077	315 ^b	16,7
02.07.2002 16:45	15 ^{ab}	1,5	18,5 ^b	0,30	0,07	0,06 ^b	0,024	3,30 ^{abcd}	1,452	0,43 ^d	0,038	152 ^a	69,4
02.07.2002 21:15	0 ^a	0,0	12,3 ^a	0,09	0,00	0,07 ^b	0,005	9,43 ^f	2,853	-0,44 ^a	0,017	495 ^c	18,9
27.08.2002 05:15	0 ^a	0,0	14,1 ^b	0,12	-	0,02 ^{ab}	0,000	1,53 ^{ab}	0,069	-0,26 ^a	0,019	629 ^c	29,9
27.08.2002 09:45	154 ^c	22,4	26,1 ^g	0,09	-	0,56 ^c	0,058	20,41 ^c	2,481	1,70 ^f	0,184	218 ^b	5,6
27.08.2002 13:45	44 ^{ab}	11,7	23,6 ^f	0,43	-	0,05 ^{ab}	0,004	1,73 ^{ab}	0,219	0,27 ^b	0,049	103 ^a	49,3
27.08.2002 17:45	77 ^b	12,4	21,0 ^d	0,04	-	0,06 ^{ab}	0,000	2,88 ^{ab}	0,074	0,61 ^c	0,035	40 ^a	14,2
27.08.2002 21:15	0 ^a	0,0	15,7 ^c	0,18	-	0,01 ^a	0,000	0,56 ^a	0,076	-0,20 ^a	0,018	935 ^e	59,0
28.08.2002 05:15	0 ^a	0,0	11,4 ^a	0,05	-	0,01 ^a	0,000	1,11 ^{ab}	0,108	-0,29 ^a	0,043	767 ^d	44,0
28.08.2002 08:45	185 ^c	39,9	21,0 ^d	0,25	-	0,53 ^c	0,009	30,46 ^d	0,757	1,27 ^e	0,061	286 ^b	5,3
28.08.2002 13:45	78 ^b	13,1	27,4 ^h	0,52	-	0,06 ^{ab}	0,009	1,61 ^{ab}	0,124	0,50 ^{bc}	0,027	96 ^a	0,7
28.08.2002 15:45	134 ^c	44,8	21,8 ^e	0,38	-	0,10 ^b	0,087	4,68 ^b	3,976	0,93 ^d	0,186	86 ^a	60,5
28.08.2002 20:15	0 ^a	0,0	14,3 ^b	0,07	-	0,01 ^a	0,000	0,57 ^a	0,038	-0,16 ^a	0,000	807 ^d	34,0
22.07.2003 03:45	0 ^a	0,0	11,8 ^b	0,04	0,02	0,02 ^a	0,005	2,41 ^a	0,130	-0,18 ^c	0,095	1000 ^b	56,6
22.07.2003 09:15	761 ^b	11,3	33,2 ^{ef}	0,37	1,03	0,60 ^e	0,005	12,31 ^c	0,433	0,75 ^e	0,041	189 ^a	2,9
22.07.2003 12:45	1291 ^c	472,8	34,5 ^f	2,43	0,87	0,31 ^c	0,046	5,55 ^b	0,377	0,39 ^d	0,046	190 ^a	24,2
22.07.2003 16:45	270 ^a	73,8	24,7 ^d	1,33	0,68	0,40 ^d	0,013	15,22 ^d	1,322	1,03 ^f	0,050	229 ^a	3,9
22.07.2003 21:15	0 ^a	0,4	15,3 ^c	0,27	0,03	0,01 ^a	0,000	0,55 ^a	0,041	-0,45 ^{ab}	0,036	1642 ^c	142,3
23.07.2003 03:45	0 ^a	0,0	7,9 ^a	0,05	0,01	0,00 ^a	0,005	0,72 ^a	0,193	-0,36 ^b	0,019	1198 ^b	280,2
23.07.2003 09:45	139 ^a	32,4	15,3 ^c	0,37	0,15	0,23 ^b	0,036	18,53 ^e	3,081	1,25 ^g	0,077	332 ^a	21,2
23.07.2003 12:45	1445 ^c	97,9	31,8 ^e	1,02	0,74	0,33 ^c	0,019	7,15 ^b	0,264	0,64 ^e	0,064	306 ^a	8,6
23.07.2003 16:45	251 ^a	22,9	24,1 ^d	0,51	0,01	0,31 ^c	0,011	12,57 ^{cd}	0,236	1,67 ^h	0,037	265 ^a	14,9
23.07.2003 21:15	0 ^a	0,4	16,0 ^c	0,32	0,85	0,01 ^a	0,004	1,05 ^a	0,219	-0,55 ^a	0,048	1507 ^c	116,2
03.09.2003 04:45	0 ^a	0,0	7,9 ^a	0,10	0,01	0,04 ^a	0,000	3,92 ^{bc}	0,096	-0,17 ^b	0,018	318 ^{bc}	5,8
03.09.2003 09:45	401 ^{bc}	126,9	24,1 ^c	0,86	1,71	0,55 ^d	0,029	18,34 ^f	0,737	2,17 ^e	0,072	261 ^{ab}	14,9
03.09.2003 13:15	384 ^{bc}	29,2	26,0 ^{cd}	2,10	1,36	0,29 ^b	0,018	8,13 ^d	1,551	2,57 ^e	0,559	412 ^d	55,2
03.09.2003 15:45	319 ^{abc}	81,7	33,3 ^f	1,80	2,11	0,25 ^b	0,021	4,40 ^c	0,358	-0,01 ^b	0,065	425 ^d	19,8
03.09.2003 20:45	0 ^a	0,4	10,1 ^{ab}	0,21	0,04	0,03 ^a	0,000	2,61 ^{ab}	0,113	-0,94 ^a	0,063	1163 ^f	49,5
04.09.2003 04:45	0 ^a	0,0	9,2 ^{ab}	0,04	0,02	0,03 ^a	0,000	2,76 ^{abc}	0,062	-0,41 ^b	0,069	1039 ^e	45,2
04.09.2003 09:45	270 ^{ab}	79,0	27,1 ^d	0,08	2,74	0,82 ^f	0,017	23,95 ^g	0,509	1,48 ^d	0,050	201 ^a	5,2
04.09.2003 12:45	611 ^c	393,5	29,9 ^e	0,28	3,54	0,68 ^e	0,008	15,92 ^e	0,116	1,28 ^d	0,057	199 ^a	5,4
04.09.2003 16:45	155 ^{ab}	5,4	31,3 ^{ef}	0,62	2,95	0,42 ^c	0,038	8,79 ^d	1,201	0,74 ^c	0,114	382 ^{cd}	14,9
04.09.2003 20:45	0 ^a	0,4	10,7 ^b	0,09	0,04	0,03 ^a	0,004	2,13 ^a	0,053	-0,32 ^b	0,058	1100 ^{ef}	44,1

6.2.3 Berechnung des photosynthetischen Gaswechsels und der Isoprenemission

Beispiel für die Berechnung des photosynthetischen Gaswechsels und der Isoprenemission als SPSS-Syntax-File:

```
*Berechnung der Gaswechsel- und Emissionsdaten

*!!!!Ganz unten Dateinamen anpassen!!!!
*!!!Gesamt-Blattflächen eingeben (Projizierte Blattfläche mal 2) in m2!!!
*Küvette 1 + 2
COMPUTE k1lai=0.03374.
COMPUTE k2lai=0.028398.
EXECUTE.

*!!!Werte aus der lin. Regression der FIS-Calibration (y=mx+b) eingeben!!!
COMPUTE m=121.807.
COMPUTE b=483.262.
EXECUTE.

*Grafiken fuer die einzelnen Blattemperaturen
GRAPH
  /LINE(MULTIPLE)= VALUE( t1cuv1ca t2cuv1ca t3cuv1ca ) BY time
  /TITLE= 'Blattemperaturen Küvette 1 [°C]' .
GRAPH
  /LINE(MULTIPLE)= VALUE( t1cuv2ca t2cuv2ca t3cuv2ca ) BY time
  /TITLE= 'Blattemperaturen Küvette 2 [°C]' .
GRAPH
  /LINE(MULTIPLE)= VALUE( h2o1mc01 h2o1vc01 ) BY time
  /TITLE= 'Rohwerte H2O-BINOS KV1' .
GRAPH
  /LINE(MULTIPLE)= VALUE( h2o2mc01 h2o2vc01 ) BY time
  /TITLE= 'Rohwerte H2O-BINOS KV2' .
GRAPH
  /LINE(MULTIPLE)= VALUE( co21mc01 co21vc01 ) BY time
  /TITLE= 'Rohwerte CO2-BINOS KV1' .
GRAPH
  /LINE(MULTIPLE)= VALUE( co22mc01 co22vc01 ) BY time
  /TITLE= 'Rohwerte CO2-BINOS KV2' .
GRAPH
  /LINE(MULTIPLE)= VALUE( fis_ca01 fis_ra01 ) BY time
  /TITLE= 'Rohwerte FIS' .

*Mittelwerte der Blattemperaturen
COMPUTE tcuv1mit = (t1cuv1ca + t2cuv1ca + t3cuv1ca) / 3 .
EXECUTE .
COMPUTE tcuv2mit = (t1cuv2ca + t2cuv2ca + t3cuv2ca) / 3 .
EXECUTE .

*PAR-Werte fuer grafische Darstellung durch 100 teilen
COMPUTE psr1_100 = psr_1_ca / 100 .
EXECUTE .
COMPUTE psr2_100 = psr_2_ca / 100 .
EXECUTE .

*Flussberechnung Gesamtfluss FIS aus Kalibration vom 15.04.1998
COMPUTE flcfitoc = flcfitor * 0.99566 + 0.00262918.
EXECUTE .

*Flussberechnung O2-Fluss FIS aus Kalibration vom 15.04.1998
COMPUTE flcfio2c = flcfio2r * 0.3916 + 0.0226777 .
EXECUTE .

*Isoprenkonzentration in der Küvettenluft [ppb]:
COMPUTE ppbcuv = flcfitoc / (flcfitoc - flcfio2c) * (fis_ca01 - b) / m.
EXECUTE .

*Stoffmenge Isopren in der Küvettenabluft [nmol/sec] =
*Küvettenfluss [slpm] / Molvolumen id. Gas * Isoprenkonzentration in der Küvettenluft / 60
Sek/min
IF (baum = 1) nmoliso = flccuv1c / 22.414 * ppbcuv / 60 .
EXECUTE .
IF (baum = 2) nmoliso = flccuv2c / 22.414 * ppbcuv / 60 .
```

Anhang

```
EXECUTE .

*Emissionsrate [nmol/m2*sec]:
IF (baum = 1) nmolm21 = nmoliso / k1lai .
EXECUTE .
IF (baum = 2) nmolm22 = nmoliso / k2lai .
EXECUTE .

*Grafiken fuer die mittlere Blatttemperatur und die Emissionsraten

GRAPH
  /LINE(MULTIPLE)= VALUE( tcuvlmit psr1_100 ) BY time
  /TITLE= 'Mittlere Blatttemperaturen Kuvette 1 [°C]' 'und PAR [µE*100]' .
GRAPH
  /LINE(SIMPLE)=VALUE( nmolm21 ) BY time
  /TITLE= 'Isoprenemissionsrate Kuvette 1 [nmol/qm/s]' .
GRAPH
  /LINE(MULTIPLE)= VALUE( tcuv2mit psr2_100 ) BY time
  /TITLE= 'Mittlere Blatttemperaturen Kuvette 2 [°C]' 'und PAR [µE*100]' .
GRAPH
  /LINE(SIMPLE)=VALUE( nmolm22 ) BY time
  /TITLE= 'Isoprenemissionsrate Kuvette 2 [nmol/qm/s]' .

*Umrechnung des Taupunkts von °C in Kelvin
COMPUTE tdp_1_K = tdp_1_ca + 273.16 .
EXECUTE .

*Berechnung des Wassergehaltes am Kuvetteneingang.
*!!!!Der Luftdruck auf dem Wank wurde aufgrund sehr geringer Schwankungen über die ganze
Messperiode als *konstant 825 hPa für Kalibration und für die Messungen angenommen!!!!

COMPUTE n=-7.9298*(373.16/tdp_1_K-1)+5.02808*lg10(373.16/tdp_1_K)-1.3816*10**(-7)*
(-1+10**(11.344*(1-tdp_1_K/373.16)))+8.1328*10**(-3)*(-1+10**(-3.49149*(373.16/tdp_1_K-1)))+
lg10(1013.246).
COMPUTE dd=10**n.
COMPUTE h2oainppm=dd/825*10**6.
EXECUTE.

*Berechnung der H2O-Abgabe in die Kuvettenluft in ppm
*Kuvette 1 (= Binos 5 = Binos Fichte 2 Karin, musste als Austauschgeraet eingesetzt werden),
Kalibration vom 12./18./25.07.2001
COMPUTE h2od1ppm=(0.34274*h2oainppm + 2813.25849).
EXECUTE.
COMPUTE h2ok1ppm=h2od1ppm*h2o1mr_d.
EXECUTE.
GRAPH
  /LINE(SIMPLE)=VALUE( h2ok1ppm ) BY time
  /TITLE= 'Transpiration Kuvette 1 [ppm]' .

*Kuvette 2 (= Binos 6), Kalibration vom 12./18./25.07.2001
COMPUTE h2od2ppm=(0.61359*h2oainppm + 5797.05506).
EXECUTE.
COMPUTE h2ok2ppm=h2od2ppm*h2o2mr_d.
EXECUTE.
GRAPH
  /LINE(SIMPLE)=VALUE( h2ok2ppm ) BY time
  /TITLE= 'Transpiration Kuvette 2 [ppm]' .

*Berechnung des abs. CO2-Gehaltes in der Kuvettenzuluft
COMPUTE co2_5_ca = co2_5_ra * 500.
EXECUTE .

*Berechnung der CO2-Aufnahme aus der Kuvettenluft in ppm
*Kuvette 1 (= Binos 5 = Binos Fichte 2 Karin, musste als Austauschgeraet eingesetzt werden),
Kalibration vom 17./18.06.1999

COMPUTE co2k1ppm=(-0.06130*co2_5_ca - 48.52185)*(-co21mrad).
EXECUTE.
GRAPH
  /LINE(SIMPLE)=VALUE( co2k1ppm ) BY time
  /TITLE= 'Assimilation Kuvette 1 [ppm]' .

*Kuvette 2 (= Binos 6), Kalibration vom 09.05.2000
COMPUTE co2k2ppm=(-0.04951*co2_5_ca - 43.54158)*(-co22mrad).
EXECUTE.
GRAPH
  /LINE(SIMPLE)=VALUE( co2k2ppm ) BY time
  /TITLE= 'Assimilation Kuvette 2 [ppm]' .
```

Anhang

```
* Berechnung der Transpirations- und der Assimilationsrate.
* Küvette 1
COMPUTE tcuv1mk =273.16+tcuv1mit.
EXECUTE.

*Berechnung des Wassergehaltes im Blatt in ppm
COMPUTE nk1 = -7.9298*(373.16/tcuv1mk-1)+5.02808*lg10(373.16/tcuv1mk)-1.3816*10**(-7)*
(-1+10**(11.344*(1-tcuv1mk/373.16)))+8.1328*10**(-3)*(-1+10**(-3.49149*(373.16/tcuv1mk-1)))+
lg10(1013.246).

COMPUTE ddk1=10**nk1.

COMPUTE klwblppm=ddk1/825*10**6.

*Zuluftfluss mol/s
COMPUTE klairin=flccuv1c/60/22.414.

* Anteil des Wassergehaltes an der Gesamtstoffmenge der Zuluft
COMPUTE klwinfak=h2oinppm*0.000001.

* Anteil des Wassergehaltes an der Blattinnenluft
COMPUTE klwblfak=klwblppm*0.000001.

* Anteil des Wassergehaltes an der Küvettenabluft
COMPUTE klwofak=klwinfak+h2ok1ppm*0.000001.

compute klwoppm=klwofak*10**6.

* Berechnung des Abluftflusses in nmol/s
COMPUTE klairout=klairin*(1-klwinfak)/(1-klwofak).
EXECUTE.

*Küvette 2
COMPUTE tcuv2mk =273.16+tcuv2mit.
EXECUTE.

*Berechnung des Wassergehaltes im Blatt in ppm
COMPUTE nk2 = -7.9298*(373.16/tcuv2mk-1)+5.02808*lg10(373.16/tcuv2mk)-1.3816*10**(-7)*
(-1+10**(11.344*(1-tcuv2mk/373.16)))+8.1328*10**(-3)*(-1+10**(-3.49149*(373.16/tcuv2mk-1)))+
lg10(1013.246).

COMPUTE ddk2=10**nk2.

COMPUTE k2wblppm=ddk2/825*10**6.

*Zuluftfluss mol/s
COMPUTE k2airin=flccuv2c/60/22.414.

* Anteil des Wassergehaltes an der Gesamtstoffmenge der Zuluft
COMPUTE k2winfak=h2oinppm*0.000001.

* Anteil des Wassergehaltes an der Blattinnenluft
COMPUTE k2wblfak=k2wblppm*0.000001.

* Anteil des Wassergehaltes an der Küvettenabluft
COMPUTE k2wofak=k2winfak+h2ok2ppm*0.000001.

COMPUTE k2woppm=k2wofak*10**6.

* Berechnung des Abluftflusses in nmol/s
COMPUTE k2airout=k2airin*(1-k2winfak)/(1-k2wofak).

EXECUTE.

*Berechnung der Transpirationsrate
*Küvettel
*Transpirationsrate in mmol/m2/s
COMPUTE kltrbf=klairin*(klwofak-klwinfak)/(kllai*(1-klwofak))*1000.

*Druckänderung durch Transpiration
COMPUTE klpdw=(klwblfak-klwofak)*825.

*Stomatäre Leitfähigkeit
COMPUTE klgh2obf=kltrbf*(1-(klwblfak+klwofak)/2)/(klwblfak-klwofak).

EXECUTE.

*Küvette2
*Transpirationsrate in mmol/m2/s
```

Anhang

```
COMPUTE k2trbf=k2airin*(k2wofak-k2winfak)/(k2lai*(1-k2wofak))*1000.

*Druckänderung durch Transpiration
COMPUTE k2pdw=(k2wblfak-k2wofak)*825.

*Stomatäre Leitfähigkeit
COMPUTE k2gh2obf=k2trbf*(1-(k2wblfak+k2wofak)/2)/(k2wblfak-k2wofak).

EXECUTE.

*Berechnung der Assimilationsrate
*Küvette 1
*Bruchteil des Eingangs-CO2-Gehaltes an der Gesamtstoffmenge
COMPUTE co2infak=co2_5_ca*0.000001.

*Bruchteil der CO2-Aufnahme an der Gesamtstoffmenge
COMPUTE k1co2fak=co2k1ppm*0.000001.

*Bruchteil des CO2 an der Abluft
COMPUTE k1cofak=co2infak+k1co2fak.

*Berechnung der Assimilationsrate in  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 
COMPUTE klassbf=(k1airin*co2infak-k1airout*k1cofak)/k1lai*1000000.

*Berechnung des Ci
COMPUTE k1ci=((k1gh2obf/1.605/1000-k1trbf/2000)*k1cofak-klassbf/1000000)/
(k1gh2obf/1.605/1000+k1trbf/2000)*1000000.

EXECUTE.

*Küvette 2
*Bruchteil der CO2-Aufnahme an der Gesamtstoffmenge
COMPUTE k2co2fak=co2k2ppm*0.000001.

*Bruchteil des CO2 an der Abluft
COMPUTE k2cofak=co2infak+k2co2fak.

*Berechnung der Assimilationsrate in  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 
COMPUTE k2assbf=(k2airin*co2infak-k2airout*k2cofak)/k2lai*1000000.

*Berechnung des Ci
COMPUTE k2ci=((k2gh2obf/1.605/1000-k2trbf/2000)*k2cofak-k2assbf/1000000)/
(k2gh2obf/1.605/1000+k2trbf/2000)*1000000.

EXECUTE.

*Temperaturkorrektur der Assimilations- und der Transpirationsrate
*mit den Werten der Temperaturabhängigkeitsbestimmung vom 31.08./04.09./01.10.2001
compute klasskor = klassbf/(6.78251e-5*tcuvlmit**3 - 0.00797*tcuvlmit**2 + 0.28109*tcuvlmit -
2.10086).
execute.
compute k2asskor = k2assbf/(6.78251e-5*tcuvlmit**3 - 0.00797*tcuvlmit**2 + 0.28109*tcuvlmit -
2.10086).
execute.
*compute k1trkor = k1trbf/(-1.6193161382e-3*tcuvlmit**2 + 0.1270257644*tcuvlmit -
1.4196562895).
*execute.
*compute k2trkor = k2trbf/(-1.6193161382e-3*tcuv2mit**2 + 0.1270257644*tcuv2mit -
1.4196562895).
*execute.

*Graphische Darstellung der stomatären Leitfähigkeit in  $\text{mmol}/\text{m}^2/\text{s}$ 
GRAPH
  /LINE(MULTIPLE)= VALUE( k1gh2obf k2gh2obf ) BY time
  /TITLE= 'Stomatäre Leitfähigkeit Küvette 1 + 2 [mmol/m2/s]' .

*Graphische Darstellung der Transpirationsrate in  $\text{mmol}/\text{m}^2/\text{s}$  für KV1 und KV2
GRAPH
  /LINE(MULTIPLE)= VALUE( k1trbf k2trbf ) BY time
  /TITLE= 'Transpirationsrate Küvette 1 + 2 [mmol/m2/s]' .

*Graphische Darstellung der T-korr. Transpirationsrate in  $\text{mmol}/\text{m}^2/\text{s}$  für KV1 und KV2
*GRAPH
* /LINE(MULTIPLE)= VALUE( k1trkor k2trkor ) BY time
* /TITLE= 'T-korr. Transpirationsrate [mmol/m2/s]' '(T-Abhängigkeit v. 18./19.08.98)' .

*Graphische Darstellung des Ci in ppm
GRAPH
```

Anhang

```
/LINE(MULTIPLE)= VALUE( klci k2ci ) BY time
/TITLE= 'Ci-Wert Küvette 1 + 2 [ppm]' .

*Graphische Darstellung der Assimilationsraten in µmol/m2/s
GRAPH
/LINE(MULTIPLE)= VALUE( klassbf k2assbf ) BY time
/TITLE= 'Assimilationsrate Küvette 1 + 2 [µmol/m2/s]' .

*Graphische Darstellung der T-korr. Assimilationsraten in µmol/m2/s
GRAPH
/LINE(MULTIPLE)= VALUE( klasskor k2asskor ) BY time
/TITLE= 'T-korr. Assimilationsrate [µmol/m2/s]' '(T-Abhängigkeit v.
31.08./04.09.01/01.10.01)' .

*Berechnung des Anteils des als Isopren emittierten Kohlenstoffs
*am assimilierten Kohlenstoff (nicht T-korr.)
IF (nmolm21 > 0) Iso_co21 = (nmolm21 * 5 / 1000) / klassbf .
EXECUTE .
IF (nmolm22 > 0) Iso_co22 = (nmolm22 * 5 / 1000) / k2assbf .
EXECUTE .
GRAPH
/LINE(MULTIPLE)= VALUE( Iso_co21 Iso_co22 ) BY time
/TITLE= 'Verhältnis Isopren-C zu Assimilat-C' .

*Temperaturkorrigierter Emissionsfaktor, berechnet mit der am 31.08./04.09.01/01.10.01
*bestimmten T-Abhängigkeit der Isoprenemission
COMPUTE emftkor1 = nmolm21 / (-2.9297e-5*tcuvlmit**4 + 3.23e-3
*tcuvlmit**3 -0.1254*tcuvlmit**2 +
2.12713*tcuvlmit -13.47235) .
EXECUTE .
COMPUTE emftkor2 = nmolm22 / (-2.9297e-5*tcuvlmit**4 + 3.23e-3
*tcuvlmit**3 -0.1254*tcuvlmit**2 +
2.12713*tcuvlmit -13.47235) .
EXECUTE .

GRAPH
/LINE(MULTIPLE)= VALUE( emftkor1 emftkor2 ) BY time
/TITLE= 'Emissionsfaktoren berechnet nach' 'exp. T-Abhängigkeit v. 31.08./04.09./01.10.2001'
.

*Berechnung des Anteils des als Isopren emittierten Kohlenstoffs
*am assimilierten Kohlenstoff (T-korr.)
IF (emftkor1 > 0) Isoco21k = (emftkor1 * 5 / 1000) / klasskor .
EXECUTE .
IF (emftkor2 > 0) Isoco22k = (emftkor2 * 5 / 1000) / k2asskor .
EXECUTE .
GRAPH
/LINE(MULTIPLE)= VALUE( Isoco21k Isoco22k ) BY time
/TITLE= 'Verhältnis Isopren-C zu Assimilat-C (T-korr.)' .

*Berechnung des Standardemissionsfaktors für Isopren
*mit dem von Guenther 1997 publizierten Algorithmus
compute T1=95000.
compute T2=230000.
compute T3=314.12.
compute a=0.0027.
compute ll=1.066.

*Küvette 1
compute x1=tcuvlmit+273.12.
compute Ctcuvl=(exp((T1*(x1-303.12))/(8.314*x1*303.12)))/(0.961+exp((T2*(x1-
T3))/(8.314*x1*303.12))).
execute.

compute Clcuvl=a*ll*psr_1_ca/(sqrt(1+a*a*psr_1_ca*psr_1_ca)).
execute.

compute ell_1=psr_1_ca/(1000+psr_1_ca).
execute.
compute el2_1=(a*ll*psr_1_ca/(sqrt(1+a*a*psr_1_ca*psr_1_ca)))**2.
execute.

compute stdfact1=nmolm21/Ctcuvl/Clcuvl.
execute.

compute gkf1=Ctcuvl*Clcuvl.
execute.

*Küvette 2
```

```

compute x2=tcuv2mit+273.12.
compute Ctcuv2=(exp((T1*(x2-303.12))/(8.314*x2*303.12)))/(0.961+exp((T2*(x2-
T3))/(8.314*x2*303.12))).
execute.

compute a=0.0027.
compute l1=1.066.
compute Clcuv2=a*l1*psr_2_ca/(sqrt(1+a*a*psr_2_ca*psr_2_ca)).
execute.

compute el1_2=psr_2_ca/(1000+psr_2_ca).
execute.
compute el2_2=(a*l1*psr_2_ca/(sqrt(1+a*a*psr_2_ca*psr_2_ca)))*2.
execute.

compute stdfact2=nmolm22/Ctcuv2/Clcuv2.
execute.

compute gkf2=Ctcuv2*Clcuv2.
execute.

GRAPH
  /LINE(MULTIPLE)= VALUE( stdfact1 stdfact2 ) BY time
  /TITLE= 'Standardemissionsfaktoren berechnet' 'nach Guenther 1997' .

*Berechnung der 15min-Mittelwerte
*!!!Dateinamen anpassen!!!!
AGGREGATE
  /OUTFILE='G:\pflabio\mayrhofer\Wank 01\Tagesgang1\15minTG1080801.SAV'
  /BREAK=gruppe
  /psr1_1_1 = MEAN(psr1_100) /psr1_SD = SD(psr1_100) /psr2_1_1 = MEAN(psr2_100) /psr2_SD =
SD(psr2_100)
  /tcuv1m_1 = MEAN(tcuv1mit) /tcuv1_SD = SD(tcuv1mit) /tcuv2m_1 = MEAN(tcuv2mit) /tcuv2_SD =
SD(tcuv2mit)
  /nmolm2_1 = MEAN(nmolm21) /nmolm1SD = SD(nmolm21) /nmolm2_2 = MEAN(nmolm22) /nmolm2SD =
SD(nmolm22)
  /stdfac_1 = MEAN(stdfact1) /stdfac1SD = SD(stdfact1) /stdfac_2 = MEAN(stdfact2) /stdfac2SD =
SD(stdfact2)
  /emftko_1 = MEAN(emftkor1) /emftk1sd = SD(emftkor1) /emftko_2 = MEAN(emftkor2) /emftk2sd =
SD(emftkor2)
  /k1trbf_1 = MEAN(k1trbf) /k1trbfSD = SD(k1trbf) /k2trbf_1 = MEAN(k2trbf) /k2trbfSD =
SD(k2trbf)
  /k1gh2o_1 = MEAN(k1gh2obf) /k1gh2oSD = SD(k1gh2obf) /k2gh2o_1 = MEAN(k2gh2obf) /k2gh2oSD =
SD(k2gh2obf)
  /klassb_1 = MEAN(klassbf) /klassSD = SD(klassbf) /k2assb_1 = MEAN(k2assbf) /k2assSD =
SD(k2assbf)
  /klasskom = MEAN(klasskor) /klassksd = SD(klasskor) /k2asskom = MEAN(k2asskor) /k2assksd =
SD(k2asskor)
  /k1ci_1 = MEAN(k1ci) /k1ci_1SD = SD(k1ci) /k2ci_1 = MEAN(k2ci) /k2ci_1SD = SD(k2ci).

```

6.2.4 Klimadaten der Sommermonate von 2001 bis 2003

Die Tagesgangmessungen von photosynthetischem Gaswechsel und Isoprenoidemission wurden jeweils in den Sommermonaten der Jahre 2001 bis 2003 durchgeführt. Versuchsbegleitend wurden dabei die mittleren Tageslufttemperaturen in den Solardomen (SD), die Tagesdosen der UV-B Strahlung im SD (-) und im Freiland (...) und die Lichtperioden-MW der PPFd im SD (-) und im Freiland gemessen (Abb. 6.4 bis 6.6) und zu Monatsmittelwerten zusammengefasst (Tab. 6.2). Die statistischen Analysen zeigten für die Monate in denen die Versuche an der Graupappel im Jahr 2001 stattfanden, signifikant niedrigere Werte im September zu den vorangegangenen Monaten.

Tab. 6.2 Klimadaten der Jahre 2001 bis 2003 im Solardom am Versuchsstandort in Garmisch-Partenkirchen, 1780 m). In der Tabelle sind jeweils die Monatsmittelwerte der UV-B Strahlung, die Lichtperioden-MW der PPFD sowie die mittleren Tagestemperaturen \pm SD angegeben. Unterschiedliche Kleinbuchstaben bezeichnen die statistischen Unterschiede aus einer einfaktoriellen ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur (für $p \leq 0.05$). Monate in denen die Versuche stattfanden, sind grau hinterlegt.

Monate 2001	MW d. UV-B Tagesdosen [J m ⁻² d ⁻¹]	\pm SD	Lichtperioden MW d. PPFD [μ mol m ⁻² s ⁻¹]	\pm SD	MW d. Tages- temperaturen im SD [°C]	\pm SD
Juni	1419 ^b	740,7	446 ^b	243,2	15,6 ^{bc}	5,68
Juli	1408 ^b	569,9	460 ^b	187,0	18,3 ^{cd}	4,98
August	1224 ^b	495,6	449 ^b	191,7	20,3 ^d	5,21
September	506 ^a	271,6	226 ^a	137,0	9,0 ^a	3,41
Oktober	541 ^a	201,5	363 ^b	117,9	14,1 ^b	4,07

Monate 2002	MW d. UV-B Tagesdosen [J m ⁻² d ⁻¹]	\pm SD	Lichtperioden MW d. PPFD [μ mol m ⁻² s ⁻¹]	\pm SD	MW d. Tages- temperaturen im SD [°C]	\pm SD
Juni	1723 ^c	702,0	483 ^b	226,3	19,9 ^c	6,49
Juli	1383 ^c	632,8	387 ^{ab}	228,4	17,1 ^{bc}	3,99
August	1005 ^b	465,1	327 ^a	190,0	15,5 ^b	3,17
September	742 ^{ab}	403,2	284 ^a	210,1	12,2 ^a	3,02
Oktober	486 ^a	213,4	285 ^a	142,4	10,5 ^a	2,07

Monate 2003	MW d. UV-B Tagesdosen [J m ⁻² d ⁻¹]	\pm SD	Lichtperioden MW d. PPFD [μ mol m ⁻² s ⁻¹]	\pm SD	MW d. Tages- temperaturen im SD [°C]	\pm SD
Juni	1693 ^b	553,6	481 ^b	183,1	19,5 ^b	3,78
Juli	1626 ^b	634,7	477 ^b	199,5	18,0 ^b	4,52
August	1386 ^b	470,3	503 ^b	173,1	21,0 ^b	4,45
September	754 ^a	413,9	304 ^a	212,8	13,4 ^a	3,69

In Abb. 6.4 wird deutlich, dass die Messungen der 2. Messkampagne gerade in einer klimatisch sehr ungünstigen Zeit stattfand, diesen Tagen jedoch eine länger anhaltende Phase mit hohen Licht- und Temperaturwerten vorangegangen ist. Im Jahr 2002 wurden in den Monaten Juli und August die Versuche an den Graupappeln und an den Steineichen unmittelbar nacheinander durchgeführt (Abb. 6.5). In der gesamten Sommerperiode waren die Licht- und Temperaturwerte im Vergleich zu den anderen beiden Jahren nicht sehr hoch, im

Juli waren die Klimafaktoren etwas günstiger als im August. Im Sommer 2003 waren die Licht- und Temperaturwerte besonders hoch im Vergleich zu den beiden anderen Jahren. In diesem Jahr wurden die Versuche an Steineichen im Juli und September durchgeführt. Im September folgten der lang anhaltenden Schönwetterperiode jedoch extrem niedrige Licht- und Temperaturwerte. Die 2. Messkampagne in diesem Jahr wurde nach einem ca. 5-tägigen Wettereinbruch durchgeführt (Abb. 6.6).

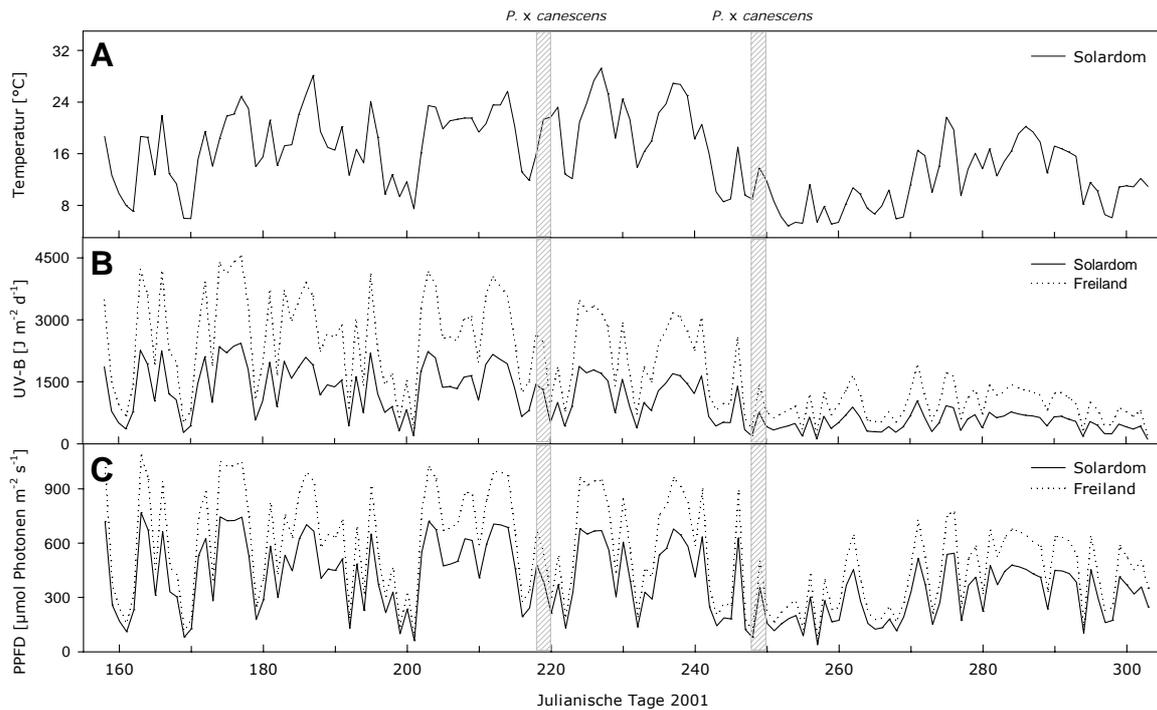


Abb. 6.4 Klimadaten im Jahr 2001 im Solardom bzw. außerhalb der SD am Versuchsstandort in Garmisch-Partenkirchen, 1780 m). In A sind die mittleren Tagestemperaturen im SD dargestellt. B zeigt die Tagesdosen der UV-B Strahlung im SD (-) und im Freiland (...) und in C sind die Lichtperioden-MW der PPFD im SD (-) und im Freiland (...) dargestellt. Die Tage in denen die Versuche stattfanden, sind mit einem grauen Balken (Graupappel) markiert.

Anhang

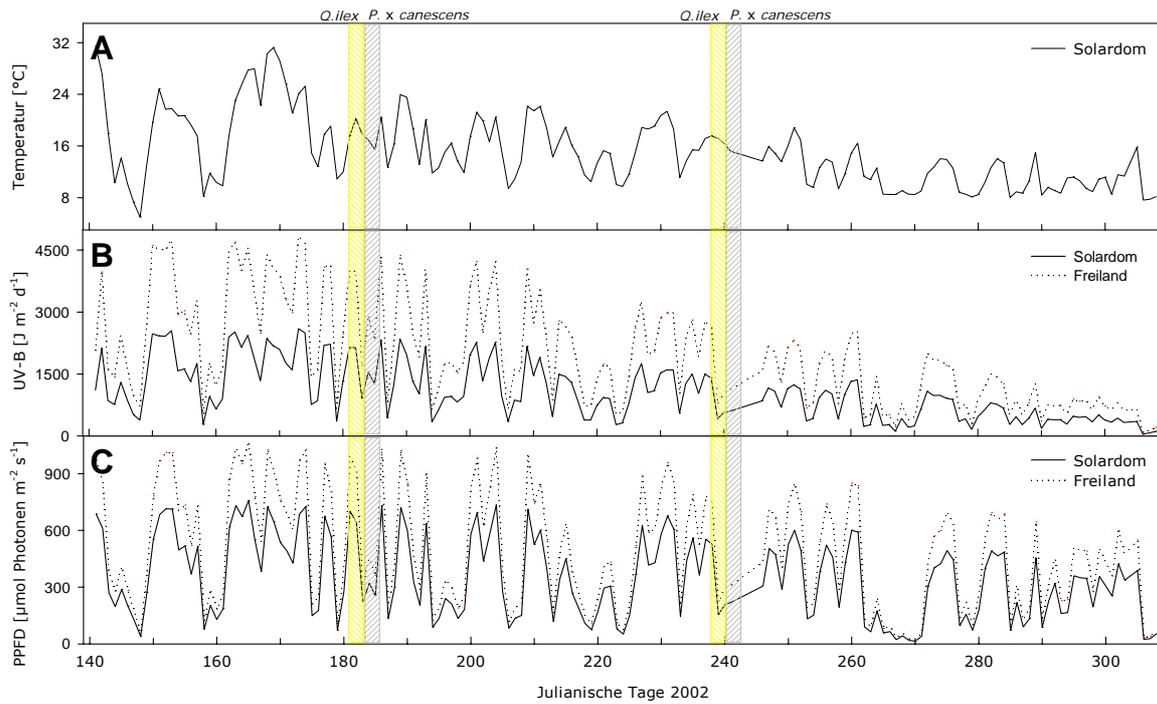


Abb. 6.5 Klimadaten im Jahr 2002 im Solardom bzw. außerhalb der SD am Versuchsstandort in Garmisch-Partenkirchen, 1780 m). In A sind die mittleren Tagestemperaturen im SD dargestellt. B zeigt die Tagesdosen der UV-B Strahlung im SD (-) und im Freiland (...) und in C sind die Lichtperioden-MW der PPFD im SD (-) und im Freiland (...) dargestellt. Die Tage in denen die Versuche stattfanden, sind mit einem grauen (Graupappel) bzw. gelben Balken (Steineiche) markiert.

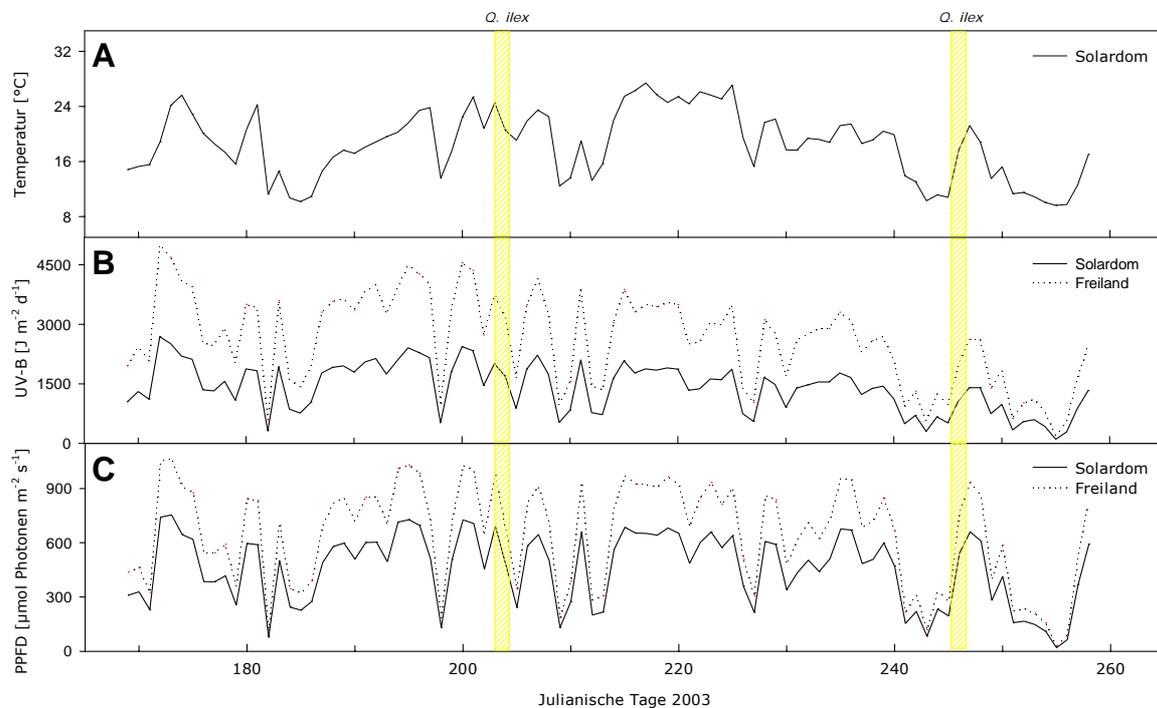


Abb. 6.6 Klimadaten im Jahr 2003 im Solardom bzw. außerhalb der SD am Versuchsstandort in Garmisch-Partenkirchen, 1780 m). In A sind die mittleren Tagestemperaturen im SD dargestellt. B zeigt die Tagesdosen der UV-B Strahlung im SD (-) und im Freiland (...) und in C sind die Lichtperioden-MW der PPFD im SD (-) und im Freiland (...) dargestellt. Die Tage in denen die Versuche stattfanden, sind durch einen gelben Balken (Steineiche) markiert.

6.3 Abkürzungen

ABA	"abscisic acid", Abscisinsäure	DOXP	Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat
Abb.	Abbildung	ds	"double stranded", doppelsträngig
ANOVA	Varianzanalyse	DTT	Dithiothreitol
ATP	Adenosintriphosphat	Desoxyxylulose-5-Phosphatreduktoisomerase:	
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat	DXR	Protein in Pflanzen
BIM	Biochemisches Isoprenemissionsmodell	dxr	Protein in Bakterien
BINOS	Infrarotgasanalysator für die Bestimmung von CO ₂ bzw. H ₂ O-Gehalte in Luft	DXR	pflanzliches Gen
β-ME	β-Mercaptoethanol	dxr	Gen in Bakterien
bp	Basenpaare	Desoxyxylulose-5-Phosphat-Synthase:	
BSA	bovine serum albumin, Rinderserum Albumin	DXS	Protein in Pflanzen
BVOC	"biogenic volatile organic compounds", biogene flüchtige organische Verbindungen	dxs	Protein in Bakterien
C	Cytosin/ Kohlenstoff	DXS	pflanzliches Gen
cDNA	complement DNA, komplementäre DNA	dxs	Gen in Bakterien
CDP-ME	4-(Cytidin-5'-Diphospho)-2-C-2-Phosphat-Methylerythritol	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
CDP-ME2P	4-(Cytidin 5'-Diphospho)-2-C-Methyl-erythritol-2-Phosphat	EMBL	European Molecular Biology Laboratory
CHES	2-(N-Cyclohexylamino)-Ethansulfonsäure	EthBr	Ethidiumbromid
C_i	intrazelluläre CO ₂ -Konzentration	f	femto (10 ⁻¹⁵)
CMK	CDP-ME-Kinase	FG	Frischgewicht
CMP	Cytidylmonophosphat	FID	Flammenionisationsdetektor
CMS	CDP-ME-Synthase	FIS	Fast Isoprene Sensor
CO₂	Kohlendioxid	g	Erdbeschleunigung
CoA	Coenzym A	g	gramm. Erdbeschleunigung
CTP	Cytosintriphosphat	GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
d	Tag	GC	Gaschromatograph
DEPC	Diethylpyrocarbonat	GDP	Geranyldiphosphat
DIG	Digoxygenin	GGDP	Geranylgeranyldiphosphat
DMADP	Dimethylallyldiphosphat	gH₂O	Stomatäre Leitfähigkeit
DNA	"deoxyribonucleic acid", Desoxyribonukleinsäure	°C	Grad Celsius
Dnase	Desoxyribonuclease	GTP	Guanintriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	h	Stunden
		H₂O bidest	doppelt destilliertes Wasser

Anhang

HMBDP	1-Hydroxy-2-Methyl-2- ϵ -Butenyl-4-Diphosphat	mRNA	messenger Ribonukleinsäure
IDP	Isopentenylidiphosphat	Mt	Megatonne
IMP	Isopentenyl-Monophosphat	MW	Mittelwert
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalactosid	N	Stickstoff
Isoprensynthase:		n	nano (10^{-9})
ISPS	Protein in Pflanzen	N, n	Anzahl der Stichproben
isps	Protein in Bakterien	NaAc	Natriumacetat
ISPS	pflanzliches Gen	NADPH	Nicotinamid-Dinucleotidphosphat
isps	Gen in Bakterien	NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
K	Kelvin	NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
KAS	Kaltaufgabesystem	No_x	Stickoxid
kat	katal = mol s ⁻¹	O	Sauerstoff
kb	Kilobasen	O⁻	Superoxidanionenradikal
kDa	Kilo-Dalton	OD	Optische Dichte
KJ	Kilojoule	p	Wahrscheinlichkeit
Kpi	Kaliumphosphat	p	pico (10^{-12})
λ	Wellenlänge	P	Pumpe
LB	Luria-Bertani	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
M	molar	Pc	<i>Populus x canescens</i>
m	milli	PCR	"polymerase chain reaction", Polymerase Kettenreaktion
MED	Minimal-Erythem-wirksame Dosis	PEP	Phosphoenolpyruvat
MEP	2-C-Methylerythritol-4-Phosphat	pfu	plaque forming unit
MEZ	Mitteuropäische Zeit	pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
MFC	"Mass flow controller", Massenflussregler	ppbv	"parts per billion by volume"
MG	Messgas	PPFD	Photosynthetische Photonenflussdichte (bei $\lambda = 400-700$ nm)
MG	Molekulargewicht	ppmv	"parts per million by volume"
min	Minuten	pptv	"parts per trillion by volume"
μmol	Mikromol (10^{-6} mol)	PTR-MS	Protonentransferreaktions-Massenspektrometer
mmol	Millimol (10^{-3} mol)	r	Regressionskoeffizient
Mono-TPS	Monoterpensynthase	Rnase	Ribonuklease
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure	rpm	"rounds per minute", Umdrehungen pro Minute

Anhang

s	Sekunden	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
SD	Solardom	TTP	Thymidintriphosphat
SD	"standard deviation", Standardabweichung	U	Unit
SDS	Natriumdodecylsulfat	ü.N.N.	Seehöhe über Normalnull
SIM	„Seasonal isoprenoid synthase model“		
slpm	Fluss in Litern pro Minute unter Standardbedingungen	Ultraviolettstrahlung:	
ss	"single stranded", einzelsträngig	UV-A	UV-A=380-315 nm
SSC	Natriumcitratpuffer	UV-B	UV-B= 315-280 nm
T	Tyrosin	UV-C	UV-C=280-100 nm
Tab.	Tabelle	V	Volt, Ventil
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Elektrophoresepuffer	v/v	"volume per volume", Volumen pro Volumen
TE	Tris-EDTA-Puffer	VG	Vergleichsgas
TG	Trockengewicht	w/v	"weight per volume", Gewicht pro Volumen
		X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indol-b-Galactopyranosid