

**Freie Universität Berlin**

**DIPLOMARBEIT**

Zu dem Thema

Überexpression in *Pichia pastoris*, Aufreinigung und Messung der Lipidtransfer- und  
Frostschutzaktivität von WAX9D- und WAX9E-Proteinen

Angefertigt von Anne de Oliveira-Funk

am

Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie

Institut für Biologie – Pflanzenphysiologie

August 2005

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen M. Schmitt (Freie Universität Berlin)

2. Gutachter: PD Dr. Dirk K. Hincha (MPI für molekulare Pflanzenphysiologie, Golm)

## Eidesstattliche Erklärung

Hier erkläre ich ehrenwörtlich,  
dass ich meine Diplomarbeit selbständig verfasst habe,  
dass ich keine andere als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe,  
dass ich meine Diplomarbeit bei keiner Prüfung vorgelegt habe.

Ich bin mir bewusst, dass eine falsche Erklärung rechtliche Folge haben kann.

Berlin, den 25. August 2005

Anne de Oliveira-Funk

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung .....	1
1.1.	Lipidtransferproteine .....	1
1.2.	WAX9-Proteine .....	1
1.2.1.	Frostschutz.....	1
1.3.	Überexpression von WAX9-Proteinen.....	2
1.3.1.	Prokaryotisches Überexpressionssystem.....	2
1.3.2.	Eukaryotisches Überexpressionssystem.....	4
1.4.	Zielsetzung der Arbeit .....	4
2.	Material und Methoden .....	6
2.1.	Material.....	6
2.1.1.	Hefestamm.....	6
2.1.2.	Expressionsvektor.....	6
2.1.3.	Verwendete <i>Wax9</i> -Gene .....	6
2.1.4.	Pflanzenmaterial .....	6
2.1.4.1.	Spinatpflanzen .....	6
2.1.4.2.	Wirsingkohl .....	7
2.1.5.	Antikörper.....	7
2.1.6.	Größenstandards: Proteinmarker .....	7
2.1.7.	Chemikalien.....	8
2.1.8.	Geräte und Apparaturen.....	8
2.1.9.	Verbrauchsmaterial.....	8
2.1.10.	Kommerzielle Kits.....	8
2.2.	Methoden.....	8
2.2.1.	Zusammenfassung der verwendeten Methoden bei der Aufreinigung der WAX9-Proteine .....	8
2.2.2.	Pflanzenanzucht.....	10
2.2.2.1.	Spinatpflanzen ( <i>Spinacia oleracea</i> ).....	10
2.2.2.2.	Wirsingkohl ( <i>Brassica oleracea</i> ) .....	10
2.2.3.	Hefekulturen .....	10
2.2.3.1.	Proteinüberexpression in <i>Pichia pastoris</i> .....	11
2.2.4.	Proteinanalyse.....	11
2.2.4.1.	Quantitative Proteinbestimmung .....	11
2.2.4.1.1.	Colorimetrische Proteinbestimmung .....	11
2.2.4.1.2.	Fluoreszenzproteinbestimmung mit dem Kit NanoOrange® .....	11
2.2.4.1.3.	UV-Proteinbestimmung.....	12
2.2.4.2.	SDS-Proteingelelektrophorese .....	14
2.2.4.2.1.	Coomassie-Färbung.....	16
2.2.4.2.2.	Silberfärbung .....	16
2.2.4.3.	Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membrane .....	16
2.2.4.4.	Immunologische Detektion mit spezifischem Antikörper.....	16
2.2.5.	Behandlung und Aufreinigung der überexprimierten WAX9-Proteine ..	17
2.2.5.1.	Proteinausfällung mit Ammoniumsulfat .....	17
2.2.5.2.	Zentrifugation .....	17
2.2.5.3.	Entsalzung: Gelfiltration mit Sephadex PD-10 Säule .....	17

2.2.5.4.	Die Ionenaustausch-Chromatographie .....	18
2.2.5.5.	Transfer der Elutionsfraktionen in Testpuffer .....	19
2.2.6.	Isolierung von Cryoprotectin aus dem Kohl ( <i>Brassica oleracea</i> ).....	19
2.2.7.	Frostschutzttest .....	20
2.2.7.1.	Thylakoidsisolierung aus Chloroplasten ungehärteter Spinatpflanzen .....	20
2.2.7.2.	Chlorophyllbestimmung .....	21
2.2.7.3.	Volumetrischer Test .....	21
2.2.7.4.	Durchführung .....	22
2.2.8.	Lipidtransfertest.....	22
2.2.8.1.	Vesikelherstellung .....	23
2.2.8.2.	Durchführung des Transfertests .....	23
2.2.9.	Datenverarbeitung .....	24
3.	Ergebnisse.....	25
3.1.	Überexpression der WAX9D- und WAX9E-Proteine in <i>Pichia pastoris</i> .....	25
3.1.1.	Prüfung der Überexpression .....	25
3.1.1.1.	Auftrennung der überexprimierten WAX9-Proteinproben mit dem Kationenaustauscher .....	25
3.1.1.2.	SDS-Gelelektrophorese der gesammelten Fraktionen.....	26
3.1.1.3.	Optimierung der WAX9-Proteinüberexpression .....	28
3.1.2.	Auftrennung der überexprimierten WAX9-Proben.....	29
3.1.2.1.	Chromatogramme .....	29
3.1.2.2.	SDS-Proteingelelektrophorese .....	31
3.1.2.3.	Westernanalyse.....	32
3.1.2.4.	Proteinkonzentrationsbestimmung .....	32
3.1.2.4.1.	Proteinkonzentrationsbestimmung mit der UV-Detektionsäquivalenzmethode.....	32
3.1.2.4.2.	Vergleich der Proteinbestimmungsmethoden: Rinderserumalbuminsäquivalenzmethode und NanoOrange® Fluoreszenzmethode .....	32
3.2.	Frostschutzttest .....	33
3.2.1.	Frostschutzaktivität bei WAX9D und WAX9E .....	33
3.2.2.	Spezifische Frostschutzaktivitäten .....	34
3.3.	Lipidtransferaktivität .....	36
3.4.	Beziehungen zwischen der Frostschutz- und der Lipidtransferaktivität .....	39
4.	Diskussion .....	40
4.1.	Cryoprotectin und WAX9D .....	40
4.2.	Frostschutzaktivität von WAX9D, WAX9E und anderen kryoprotektiven Proteinen.....	40
4.3.	Lipidtransferaktivitäten von WAX9D- und WAX9E-Proteinen .....	41
4.4.	Vergleich von WAX9D- und WAX9E-Proteinen .....	42
5.	Zusammenfassung .....	45
6.	Literaturverzeichnis .....	46
7.	Anhang .....	49
7.1.	Vektorkarte .....	49
7.2.	Abkürzungen .....	50

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1	Zusammenfassung der verwendeten Methoden.....	9
Abb. 2.2:	Rinderserumalbuminsäquivalent-Chromatogramm.....	12
Abb. 2.3:	Elutionschromatogramm der Probe WAX9D.....	13
Abb. 2.4:	Schematische Zeichnung der Kationenaustauscheranlage .....	19
Abb. 3.1:	Beispiel einer Aufzeichnung eines Chromatogramms von WAX9D- Proteinen während der Auftrennung mit dem Kationenaustauscher CM 52 .....	26
Abb. 3.2:	Coomassie gefärbtes Polyacrylamid-Gel und Westernanalyse .....	27
Abb. 3.3:	Silbergefärbtes Polyacrylamidgel, Analyse der Trennung von Abb. 3.1 ...	28
Abb. 3.4:	Elutionschromatogramm der Probe WAX9D.....	29
Abb. 3.5:	Elutionschromatogramm der Probe WAX9E .....	30
Abb. 3.6:	Elutionschromatogramm der Kontrollprobe X33 .....	30
Abb. 3.7:	Coomassie gefärbtes Polyacrylamid-Gel und Westernanalyse .....	31
Abb. 3.8:	Frostschutzaktivität der WAX9D-, WAX9E- und X33-Fraktionen.....	34
Abb. 3.9:	Lipidtransferaktivität von WAX9-Fraktionen .....	36
Abb. 3.10:	Lipidtransferaktivität der WAX9E- und WAX9D-Proben in Abhängigkeit der Proteinkonzentration.....	38
Abb. 4.1:	Aminosäuresequenzen von WAX9D und WAX9E-Proteinen ohne Transitsequenz .....	42
Abb. 4.2:	Modell von WAX9D .....	43
Abb. 4.3:	Modell von WAX9E.....	43
Abb. 4.4:	Modell von einem WAX9D- Dimer .....	44
Abb. 7.1:	Physikalische Karte des Expressionsvektors pPICZ $\alpha$ A (Invitrogen).....	49

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Verwendete <i>Wax9</i> -Gene .....	6
Tab. 2.2:	Auflistung der verwendeten Antikörper .....	7
Tab. 2.3:	Verbrauchsmaterial.....	8
Tab. 2.4:	Auflistung der verwendeten kommerziellen Kits .....	8
Tab. 2.5:	Kulturmedien .....	10
Tab. 2.6:	Gelzusammensetzung (für zwei 5,6 mL-Gele).....	15
Tab. 2.7:	Puffer .....	15
Tab. 2.8:	Probenpuffer .....	15
Tab. 2.9:	Coomassie-Färbelösung und -Entfärbelösung.....	16
Tab. 2.10:	Lösungen.....	16
Tab. 2.11:	Puffer .....	17
Tab. 2.12:	Homogenisationspuffer.....	20
Tab. 2.13:	Thylakoidisolationspuffer.....	21
Tab. 2.14:	Lösungen.....	22
Tab. 2.15:	Puffer und Liposomen .....	23
Tab. 2.16:	Lipidtransferansätze.....	24
Tab. 3.1:	Proteinkonzentrationsäquivalente der frostschutzgetesteten Eluatfraktionen .....	32

Tab. 3.2:	Vergleich von Proteinkonzentrationen .....	33
Tab. 3.3:	Spezifische Frostschutzaktivitäten der WAX9-Fractionen .....	35
Tab. 3.4:	Spezifische Lipidtransferaktivitäten der WAX9-Fractionen.....	37
Tab. 3.5:	Beziehungen zwischen spezifischen LTP- und Frostschutzaktivitäten.....	39
Tab. 4.1:	Frostschutzaktivitäten von verschiedenen Molekülen.....	41

## Danksagung

Danksagungen sind oft langweilig, besonders wenn der Leser seinen Namen dabei nicht finden kann.

Hier wird dem/der angehenden WissenschaftlerIn die Gelegenheit gegeben sich höflich zu bedanken – für die Betreuung, die Geduld, die guten und weniger guten Tipps, die Unterstützung in den schweren und leichten Stunden, die ernststen Ratschläge, aber auch für Streicheleinheiten, für die Herausforderung, das Vertrauen die einem/einer gegeben wird usw. ...

Hier habe ich mich entschieden ein paar Namen von Personen zu nennen, die mehr oder weniger an die Durchführung und Fertigung dieser Arbeit beteiligt waren. Dafür habe ich die folgende Liste ohne Titel und alphabetisch erstellt. Einige Leser dieser Arbeit werden vielleicht ihren Namen nicht finden können. So ist es. Also einfach für die, die ihren Namen finden werden aber auch für die anderen: Danke!

Daniel Bohn, Irma Dilba-Burnautzki, Petra Dümmler, Peter Grobe, Markus Heine, Patrick Hausmann, Dirk Hinch, Hilde Köth, Carsten Köhn, Frédéric de Lamotte, Jürgen Schmitt, Willi Reuter, Silke Schilling, Felicitas Wromski und...

... der Teufel, der hin und wieder in Details liegt und einen herausfordert.



# 1. Einleitung

## 1.1. Lipidtransferproteine

Lipidtransferproteine (LTP) verdanken ihren Namen ihrer Fähigkeit *in vitro* Lipide zu binden und transportieren zu können. Mehrere LTP sind aus Pflanzen aber auch aus Tieren, Hefen und Bakterien bekannt und isoliert worden (Han et al. 2001). Die Gruppe der pflanzlichen unspezifischen LTP sind mit 90 bis 95 Aminosäure kleine Moleküle, die je nach ihrem Molekulargewicht in zwei Untergruppen (LTP1 und LTP2) geordnet werden: Moleküle der Gruppe LTP1 weisen ein Molekulargewicht von 9 kDa und die von der Gruppe LTP2 von 7 kDa auf (Douliez et al. 2001). Sie wurden bereits in verschiedenen Pflanzen isoliert und sequenziert. Alle untersuchten Pflanzen-LTP weisen 8 Cystein-Aminosäuren auf, die in 4 Disulfidbrücken involviert sind. Ihre sekundäre Struktur zeigen typische  $\alpha$ -Helices und ein N-Terminus mit einem hydrophoben Stück (Kader 1996). Chemisch weisen sie die Besonderheit auf, sowohl gegenüber Hitze als auch Säure und anderen denaturierenden Chemikalien sowie Protease resistent zu sein (Hincha et al. 2001). LTP sind auch als Hauptallergen in pflanzlichen Kost für Menschen bekannt (Díaz-Perales et al. 2000). Es wird vermutet, dass LTP bei der Kutin-Biosynthese (Kader 1997) eine Rolle spielt. Für die Pathogenabwehr (Garcia-Olmedo et al. 1995), aber auch bei Umweltveränderungen und anderen Stressfaktoren (Yubero-Serrano et al. 2003) und bei der Embryogenese (Coutos-Thevenot et al. 1993) werden LTP von der Pflanze verstärkt exprimiert.

## 1.2. WAX9-Proteine

Ein *in vitro* Frostschutz gewährleistendes Protein genannt Cryoprotectin wurde aus Blättern von gehärteten Kohlpflanzen (*Brassica oleracea*) isoliert und identifiziert (Sieg et al. 1996). Später wurde nach Sequenzierung das Cryoprotectin, ein Vertreter der WAX9-Proteingruppe, als Lipidtransferprotein erkannt (Hincha et al. 2001). Dabei wurden mehrere Isoformen der WAX9-Proteine (Wax associated Proteins) in dem gereinigten Cryoprotectin identifiziert.

### 1.2.1. Frostschutz

Kälte schädigt Pflanzen entweder durch die Erniedrigung der Temperatur oder durch eine bei Frost auftretende Eiskristallbildung in den Geweben. Bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt friert erst das apoplastische Wasser, das hypoosmotisch zu Protoplasma ist, ein. Die Abnahme des Wasserpotentials im Apoplast wird durch Wassereinstrom aus dem Zytoplasma ausgeglichen. Es erfolgt eine Konzentrierung der gelösten Stoffe im Zytoplasma, die bis zu einer im Extremfall starken Entwässerung führen kann (Hincha et al. 1996). Heber und Kempfle konnten bereits 1970 zeigen, dass bestimmte Pflanzenproteine *in vitro* isolierte Thylakoidmembranen vor Gefrierschäden schützen können. Das von Sieg et al. (1996) aus dem Kohl isolierte Protein Cryoprotectin ist in der Lage *in vitro* Thylakoidmembrane vor Gefrierschäden zu schützen. Es

wird vermutet, dass die Frostschutzwirkung zu Stande kommt, in dem das Cryoprotectin an die Membrane bindet und infolgedessen deren Permeabilität herabsetzt (Sror et al. 2003). Auf dieser Weise wird der Einstrom von gelösten Stoffen aus dem Apoplast zum Protoplast bei dem Gefriervorgang reduziert und die Zellkompartimentierung wird erhalten (Hincha et al. 1990).

### **1.3. Überexpression von WAX9-Proteinen**

Damit die zu untersuchenden Proteine näher charakterisiert und getestet werden können, müssen sie möglichst in großen Mengen exprimiert werden. Für die Überexpression von heterologen Proteinen stehen eukaryotische sowie prokaryotische Systeme zur Verfügung. Bei der Wahl eines Expressionssystems werden verschiedene Kriterien in Betracht gezogen. Die Kultivierung der Wirtsorganismen sollte möglichst einfach und mit der vorhandenen Laborausstattung möglich sein. Neben der nötigen großen Expressionsmengen ist die Möglichkeit der Aufreinigung der rekombinanten Proteine auch erwünscht. Wichtig bei der Überexpression ist der Anteil des gesuchten Proteins am Gesamtprotein in der Zelle. Die zelleigenen Proteine kommen je nach Stärke ihrer Promotoren in verschiedenen Mengen vor. Für eine reiche Proteinexpression sollte ein so genannter starker und induzierbarer Promotor ausgewählt werden. Darüber hinaus ist eine eindeutige Resistenz notwendig, um die Transformanten selektieren zu können.

#### **1.3.1. Prokaryotisches Überexpressionssystem**

Bakterielle Expressionssysteme sind einfach zu handhaben und wurden im ersten Stadium der Überexpression und Charakterisierung der WAX9-Proteine ausgewählt (Schilling 2003). Dabei wurden die *Escherichia coli* (*E. coli*) Expressionswirtszellen *Origami*(DE3)pLysS (Novagen) und der Vektor pET32a(+) (Novagen) mit dem starken T7 lac-Promotor verwendet. Zur *in vitro* Induktion wurde das künstliche Analogon IPTG (Isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranosid) benutzt. Die überexprimierten Proteine wurden in „inclusion bodies“ in der bakteriellen Zelle angereichert. Diese unlöslichen Einschlusskörper, die aus Aggregaten denaturierter, überexprimierter Proteine bestehen, mussten am Ende der Induktionszeit per Ultraschall zerstört werden. Um die Löslichkeit der in den Einschlusskörper angereicherten Proteine zu erhöhen, wurden ein Fusionsteil mitexprimiert. Der Fusionsteil bestand aus einem S-tag, aus einem His-tag und aus einem Trx-tag. Der His-tag, der aus sechs Histidinen besteht hat eine hohe Affinität zu zweiwertigen Metallionen und ermöglicht eine Aufreinigung der rekombinanten Proteine mittels z.B. Nickel-Agarose-Affinitätschromatographie. Darüber hinaus ist das Thioredoxin A im Zytoplasma von *E. coli* gut löslich, so dass die Löslichkeit des gesamten Fusionsproteins erhöht wird. Eine Enterokinase wurde dann angesetzt um diesen Fusionsteil zu entfernen. WAX9-Proteine ohne Fusionsteil neigen zu präzipitieren (Schilling 2003), infolgedessen wurden die *in vitro* mit den in *E. coli* überexprimierten WAX9-Proteine durchgeführten Experimenten modifiziert. Der Lipidtransfertest sowie der Frostschutzttest wurden mit den Fusionsproteinen angesetzt. Das Enzym Enterokinase, das den Fusionsteil von dem eigentlichen WAX9-Protein abspalten sollte, wurde zu den Testansätzen zugegeben. Eine 3stündige

Inkubationszeit bei 4 °C sollte die komplette Spaltung der Fusionsproteine gewährleisten. Danach wurden die Frostschutz- sowie Lipidtransferexperimente wie in dieser Arbeit beschrieben durchgeführt.

Mehrere Kritikpunkte an diese Versuchsbedingungen möchte ich hier äußern:

- a) Nach Zentrifugation der induzierten Bakterienkultur wurde das gesamte Sediment weiter verarbeitet und getestet. Dabei konnte keine genaue Proteinkonzentrationsbestimmung gewährleistet werden. Infolgedessen konnte weder für den Frostschutzeffekt noch für den Lipidtransferest eine Konzentrationsabhängigkeit der Proteinaktivitäten ermittelt werden.
- b) Das verwendete Enzym Enterokinase wird in einem Puffer mit 50% Anteil (v/v) Glycerin geliefert und gelagert. Glycerin wird häufig als Kryoprotektant verwendet und könnte infolgedessen die Messungen der Frostschutzexperimente verfälschen.
- c) Die Feststellung einer kompletten enzymatischen Spaltung mit der Enterokinase d.h. der Entfernung des Fusionsteils bei allen WAX9-Molekülen kann nicht gesichert werden. Die Experimente konnten sowohl mit WAX9-Proteinen als auch mit einem Gemisch an WAX9-Proteine und Fusions-WAX9-Proteine durchgeführt worden sein. Außerdem befanden sich die nach enzymatischer Spaltung mit der Enterokinase entfernten Fusionsteile weiterhin in den Testansätzen und konnten nicht eliminiert werden. Die Ergebnisse der Experimente konnten von diesen Fusionsteilen beeinflusst worden sein.
- d) Nach Abspaltung des Fusionsteils fielen verschiedenen WAX9-Proteine aus. Dieser Mangel an Löslichkeit stellte weiterhin eine Unsicherheit bei dem Ablauf und für die Ergebnisse der Experimente dar.
- e) Mögliche posttranslationale Modifikationen wie z. B. die Glykosylierung oder Phosphorylierung, die *in planta* gewährleistet werden können, könnten die Funktionalität der WAX9-Proteine beeinflussen. Heterologe Proteine können in *E. coli* nicht posttranslational modifiziert werden, was die Eignung des prokaryotischen Expressionssystems für die Überexpression von WAX9-Proteinen in Frage stellt.

Aus diesen Gründen wurde für diese Arbeit ein anderes Expressionssystem ausgewählt.

### 1.3.2. Eukaryotisches Überexpressionssystem

Neben der heterologen Genexpression in Prokaryoten wie *E. coli* nimmt die Bedeutung der eukaryotischen Expressionssysteme wie Hefen und Pilze zur Produktion von heterologen Proteinen in großem Maßstab zu. Insbesondere die *in vivo* Faltung, proteolytische Aufarbeitung, die Möglichkeit der Sekretion, sowie die posttranslationalen Modifikationen machen die Expression in Eukaryoten wie Hefen attraktiv. *Pichia pastoris* besitzt neben andere Hefearten wie *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* die oben genannten Vorteile eines eukaryotischen Expressionssystemes und erreicht Expressionsleistungen, die mit prokaryotischen Expressionssysteme vergleichbar sind (Higgins and Cregg 1998). Die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris* kann mit Methanol als einziger C-Quelle überleben. Damit verbunden ist die Oxidation von Methanol zu Formaldehyd in der Zelle. Diese Reaktion findet in einem speziellen Zellorganell, dem Peroxisom statt und wird von einer Alkoholoxidase (AOX1) katalysiert. Die Affinität von AOX1 zu Methanol ist schwach, zur Kompensation muss die Hefe das Enzym in großen Mengen produzieren. AOX1 ist bei Verfügbarkeit von z. B. Glukose oder Glycerin nur marginal in der Zelle vorhanden, kann jedoch mit Methanol als einziger C-Quelle bis zu 30 % des Gesamtzell-Proteins ausmachen. Deshalb wurde der Promotor AOX1, der die Expression dieses Enzyms reguliert, verwendet, um heterologe Proteine zu exprimieren. Durch die Entdeckung des in Pro- sowie in Eukaryoten exprimierbaren Resistenzgens aus *Streptoalloteichuns hindustanus* (Sh ble) gegen Zeocin™, einen Vertreter der Familie der Bleomycine, welcher sowohl für Pro- als auch Eukaryoten letal wirkt, konnte ein kleines Plasmid zur Proteinexpression entwickelt werden (Higgins and Cregg 1998).

### 1.4. Zielsetzung der Arbeit

Vorteile wie die preiswerte Handhabung oder einfache Transformation waren in der ersten Phase der Charakterisierung von WAX9-Proteinen entscheidend bei der Wahl des Wirtorganismus *E. coli* (Schilling 2003). Doch die Methode brachte mehrere Nachteile mit sich (siehe 1.3.1). Für genauere Messungen *in vitro* der Lipidtransferaktivität sowie der kryoprotektiven Fähigkeit der WAX9D- und WAX9E-Proteine müssten ausreichende und quantifizierbare Proteinmengen überexprimiert werden. Mögliche posttranslationale Modifikationen, die für die Funktionalität der Moleküle wichtig sein könnte, sollten gewährleistet werden. Darüber hinaus waren eine effiziente Aufreinigung und die Möglichkeit einer längeren Lagerung der überexprimierten Proteine erwünscht.

Diese Anforderungen wurden das Ziel der hier vorliegenden Arbeit.

Es wurden die eukaryotische Wirtszelle *Pichia pastoris* und das Expressionsvektor pPIC $\alpha$  A für die Überexpression von WAX9D- und WAX9E-Proteinen ausgewählt. Nach Optimierung der Kultur- und Expressionsbedingungen, konnten größere Mengen an heterologen Proteinen überexprimiert und geerntet werden. Nach Ausfällung mit Ammoniumsulfat konnten die

Proteinsuspensionen gesammelt und über mehrere Wochen gelagert werden. Mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromatographie wurden die überexprimierten Proteinproben aufgetrennt. Proteinkonzentrationen wurden in WAX9-Proteinhaltenden Elutionsfraktionen parallel zu der Durchführung der Lipidtransferaktivitäts- sowie der Frostschutzaktivitätsexperimenten bestimmt. Daraufhin konnten Konzentrationsabhängigkeiten der Proteinaktivitäten ermittelt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Hefestamm

Es wurde der *Pichia pastoris* Wildtyp X33-Stamm verwendet. Dieser Stamm wurde von der Firma Invitrogen bezogen und die transformierten Stämme wurden freundlicherweise von Herrn Dr. C. Köhn zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.2. Expressionsvektor

Der hier für die Proteinüberexpression verwendete Vektor pPICZ $\alpha$  A wurde von der Firma Invitrogen bezogen (Vektorkarte im Anhang).

#### 2.1.3. Verwendete *Wax9*-Gene

**Tab. 2.1:** Verwendete *Wax9*-Gene

Gen	Acc. No. (NCBI)	Referenz
<i>Wax9D</i>	L33907	Pyee and Kolattukudy (1995)
<i>Wax9E</i>	AF093751	Hincha et al. (2001)

Die *Wax9D*- und *Wax9E*-Gene wurden ohne ihre 75 bp-großen Leadersequenz in der multicloning site zwischen den Restriktionstellen *XhoI* und *XbaI* des Vektors pPICZ $\alpha$  A kloniert. Direkt nach dem Insert befinden sich ein Stopkodon und davor der  $\alpha$ -Faktor, der die Sekretion des heterologen Protein in dem umgebenden Medium ermöglicht. Die Stämme wurden nach der Einleitung des Transformationskits der Firma Invitrogen transformiert, so dass der Insert direkt hinter dem Promotor 5'Paox1 und vor dem TT-Box (transcription termination region) lag. Ein anderer X33-Stamm, der mit dem Vektor pPICZ $\alpha$  A ohne Insert transformiert wurde, diente in dieser Arbeit als Kontrolle.

#### 2.1.4. Pflanzenmaterial

##### 2.1.4.1. Spinatpflanzen

Die Spinatpflanzen (*Spinacia oleracea* L. cv. Monnopa) wurden aus Saatgut der Firma Julius Wagner GmbH gezogen.

#### 2.1.4.2. Wirsingkohl

Das Saatgut von den verwendeten Wirsingkohlpflanzen (*Brassica oleracea* convar. Capitata var. Sabauda L. cv. Tasmania) stammt aus der Firma Syngente Agro GmbH.

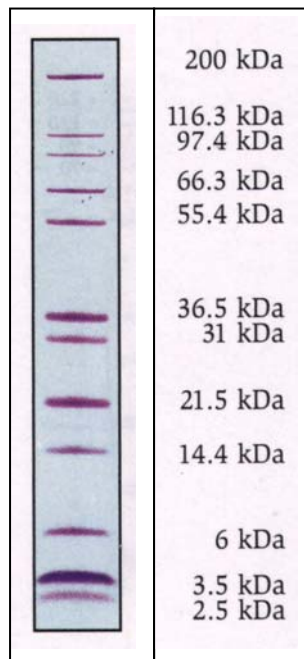
#### 2.1.5. Antikörper

**Tab. 2.2: Auflistung der verwendeten Antikörper**

Antikörper	Herkunft
Polyclonal Anti-Wax9	Hincha
70-6515 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP	Bio-Rad

#### 2.1.6. Größenstandards: Proteinmarker

Der in dieser Arbeit verwendete Proteinmarker Mark 12™ Unstained Standard wurde von der Firma Invitrogen bezogen.



### 2.1.7. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem, Fluka, Merck, Roth, Serva oder Sigma bezogen.

### 2.1.8. Geräte und Apparaturen

Es wurden die üblichen Laborgeräte von verschiedenen Herstellern verwendet.

### 2.1.9. Verbrauchsmaterial

**Tab. 2.3: Verbrauchsmaterial**

<b>Material</b>	<b>Firma</b>
Gelfiltration-NAPT <sup>TM</sup> 5-Säule	Amersham
Gelfiltration-PD 10-Säule	Amersham
Kationenaustauschermatrix CM 52	Whatman
Mikrohämatokritkapillaren	Brand
Nitrocellulose-Membrane	Amersham

### 2.1.10. Kommerzielle Kits

**Tab. 2.4: Auflistung der verwendeten kommerziellen Kits**

<b>Kit</b>	<b>Herkunft</b>
NanoOrange®	Molecular Probes
Roti®-Quant	Carl Roth
Silver Staining Kit	Serva

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Zusammenfassung der verwendeten Methoden bei der Aufreinigung der WAX9-Proteine

Die Abb. 2.1 stellt die Arbeitsschritte, die bei der Aufreinigung der Hefeproteinlösung nach Überexpression durchgeführt wurden. Dabei ist zu beobachten, dass 1 Liter ausgefällte Hefeproteinlösung zu 4 mL WAX9-Proteinlösung aufkonzentriert wurde.



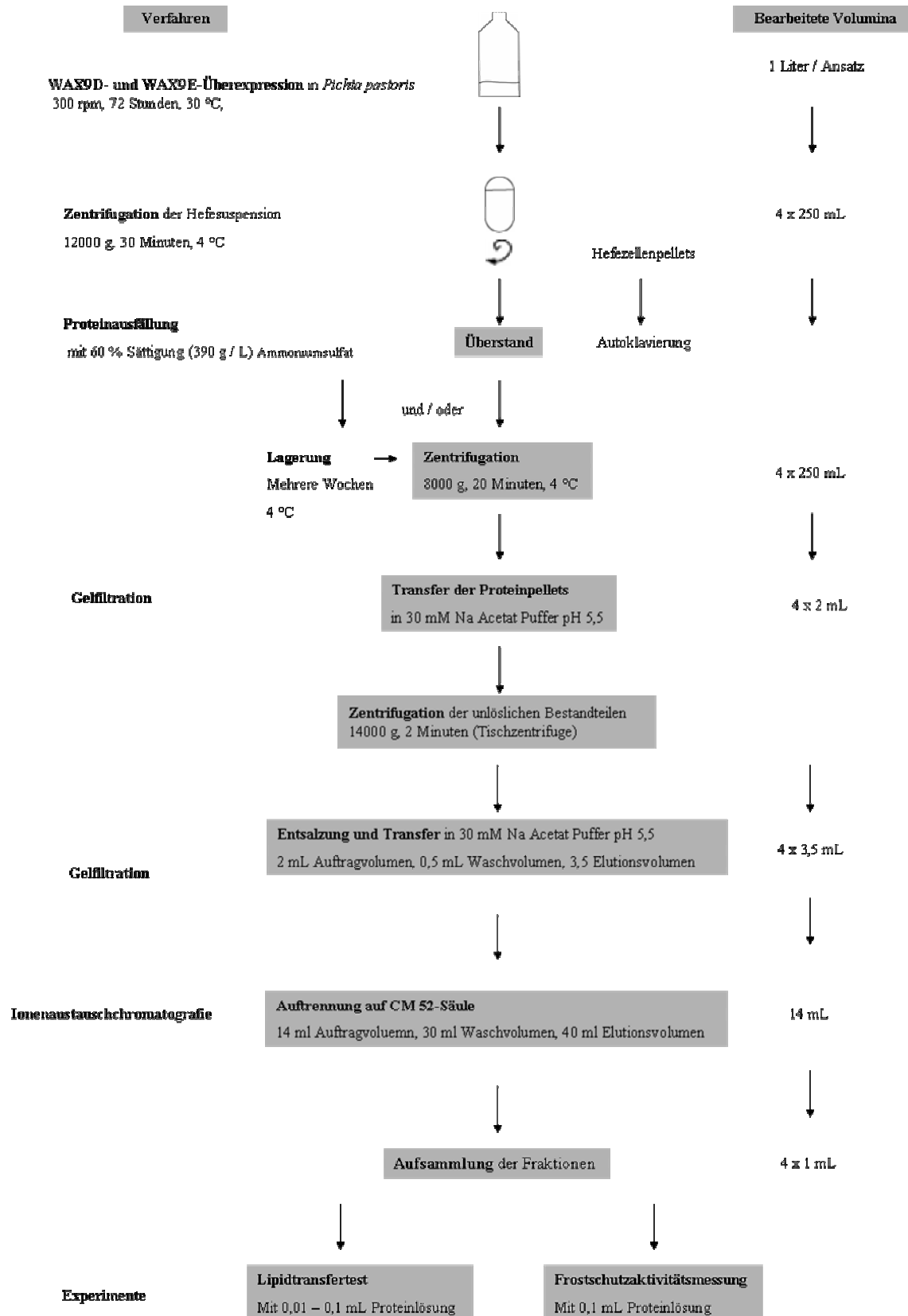


Abb. 2.1 Zusammenfassung der verwendeten Methoden

## 2.2.2. Pflanzenanzucht

### 2.2.2.1. Spinatpflanzen (*Spinacia oleracea*)

Die Spinatpflanzen wurden in Pflanzschalen ausgesät und bei 25 °C am Tag und 15 °C in der Nacht sowie einem Lichtregime von 14 Stunden Helligkeit ( $150 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) und 10 Stunden Dunkelheit angezogen.

### 2.2.2.2. Wirsing Kohl (*Brassica oleracea*)

Es wurden Kohlsamen gesät und für drei Wochen unter der in 2.2.2.1 beschriebenen Anzuchtbedingungen im Gewächshaus gezogen. Nach drei Wochen wurden die jungen Pflanzen ins Freiland pikiert. Die Ernte erfolgte im Winter, nachdem die Kohlpflanzen gehärtet wurden.

## 2.2.3. Hefekulturen

Die Hefen *Pichia pastoris* wurden direkt aus einem bei -70 °C gelagerten Glycerinstock auf festem YPD Agar-Medium (Tab. 2.5) gestrichen und ü. N. bei 30 °C inkubiert. Die Petri-Schalen wurden dann bei 4 °C aufbewahrt. Alle zwei Wochen wurden die Hefekolonien erneut ausplattiert, da sie bei 4 °C weiter wachsen. Aus diesen Agar-Kulturen konnten flüssige Kulturen angesetzt werden. Für Vorkulturen wurden 25 mL BMGY-Medium mit einer Hefekolonie angeimpft und ü. N. bei 30 °C bei 300 rpm geschüttelt. Das Selektionsantibiotikum Zeocin™ (Invitrogen) wurde zu jeder Flüssigkultur zugegeben. Die Endkonzentration betrug  $25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Tab. 2.5: Kulturmedien

YPD (Yeast Extract Peptone)	BMGY (Buffered Glycerol-complex Medium) BMMY (Buffered Methanol complex-Medium)
10 g Hefeextrakt	10 g Hefeextrakt
20 g Peptone	20 g Peptone
100 mL 10x Dextrose	100 mL 1 M Kalium Phosphat* Puffer pH 6,0
20 g Agar	3,4 g Yeast Nitrogen Base
mit A. bidest. ad 1 L	2 mL 500x Biotin*
	100 mL 10x Glycerin* (für den BMGY) oder
	100 mL 10x Methanol* (für den BMMY)
	mit A. bidest. ad 1 L

### Die Lösungen (\*):

10x Dextrose: 20%ige Dextroselösung in A. bidest

1 L 1 M Kalium Phosphat Puffer pH 6,0 wird aus 132 mL von einer 1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  Lösung und 868 mL einer 1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  zusammengestellt

500x Biotin: 20 mg Biotin / 100 mL A. bidest

10x Glycerin: 10 % (v/v) wasserfreies Glycerin in A. bidest

10x Methanol: 5% (v/v) Methanol in A. bidest

Die Methanol-, Biotin-, Yeast Nitrogen Base-Lösungen wurden steril filtriert. Alle anderen Medien wurden bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert.

### **2.2.3.1. Proteinüberexpression in *Pichia pastoris***

Es wurde Vorkulturen ü.N. in 25 mL BMGY-Medium mit einer Hefekolonie angeimpft und bei 30 °C und 300 rpm geschüttelt. Für die Proteinexpression wurden das gesamte Volumen der 25 mL-Übernachkultur in 1 L BMMY-Medium in einem 2L-Erlenmeyerkolben überimpft und erneut bei 30 °C und 300 rpm geschüttelt. Um eine gute Luftzufuhr zu gewährleisten, wurden die Erlenmeyerkolben mit einer sterilen Gaze verschlossen. Die Luftzufuhr ist eine wichtige Überexpressionsvoraussetzung da das Enzym AOX1 eine schwache Affinität zu seinem zweiten Substrat dem Sauerstoff hat, so dass die Sauerstoffzufuhr für die Überexpression einen begrenzenden Faktor darstellt. Die Zellen wuchsen 72 Stunden lang, wobei alle 24 Stunden 100 mL einer 5%igen Methanol-Lösung in der 1-litergroßen Flüssigkultur zugegeben wurde.

## **2.2.4. Proteinanalyse**

### **2.2.4.1. Quantitative Proteinbestimmung**

#### **2.2.4.1.1. Colorimetrische Proteinbestimmung**

Die Methode nach Bradford (1976) wurde für die Bestimmung der Proteingehalte der Kohlextrakte verwendet. Es wurde 10 µL der Probe mit 790 µL Wasser und 200 µL der Lösung Roti®-Quant gemischt. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben photometrisch bei 595 nm gemessen. Der Nullwert wurde mit 10 µL Wasser anstatt 10 µL Probe ermittelt. Eine Eichreihe wurde mit Rinderserumalbumin mit Konzentrationen zwischen 2 und 20 µg · mL<sup>-1</sup> in Probenpuffer hergestellt. Die Konzentrationen der Proben wurden anhand der Eichgerade ermittelt.

#### **2.2.4.1.2. Fluoreszenzproteinbestimmung mit dem Kit NanoOrange®**

Die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) erwies sich für WAX9-Proteine ungeeignet, da der enthaltene Farbstoff Coomassie Blue G-250 hauptsächlich an basische Aminosäuren bindet (mündliche Mitteilung von C. Köhn). Die Proteinkonzentration der überexprimierten WAX9-Proteine in den Fraktionen wurde mit dem kommerziellen Kit NanoOrange® bestimmt.

Ein Volumen von 50 µL der zu bestimmenden Proteinprobe wurde mit 2,45 mL NanoOrange-Lösung gemischt. Die NanoOrange-Lösung besteht aus 4,9 µL gelieferten Solution A, 245 µL Solution B und 2,2 mL destilliertes Wasser. Um die Herstellung der Verdünnungen zu erleichtern und Pipettierfehler zu minimieren, wurde erst eine NanoOrange-Stammlösung hergestellt. Es wurde 5 mL Lösung B mit 45 mL destillierten Wasser verdünnt. Zu dieser Mischung wurde 100 µL der Solution A zugegeben. Diese Menge ermöglichte die Bestimmung von ca. 20 Proteinproben. Nach 10 Minuten Inkubation der gemischten Proben bei 90-96 °C ohne Licht

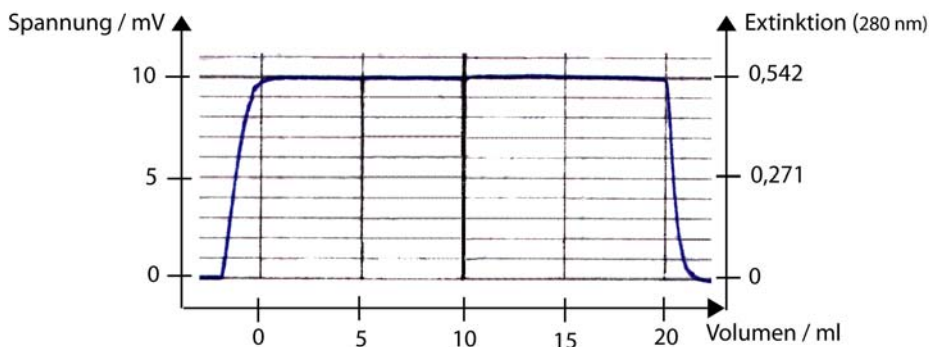
wurden die Fluoreszenzwerte in einem Fluorometer gemessen. Die Anregungswellenlänge betrug 485 nm und die Emission wurde bei 590 nm gemessen. Eine Eichreihe mit Rinderserumalbumin wurde mit Konzentrationen zwischen 1 und 10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  NanoOrange-Lösung angesetzt. Die Konzentrationen der Proben wurden anhand der ermittelten Eichkurve bestimmt.

### 2.2.4.1.3. UV-Proteinbestimmung

Bei der Wellenlänge von 280 nm absorbieren die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und in geringerem Maß Phenylalanin. Proteinkonzentrationen von 0,02 bis 3  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  können mit dieser Methode ermittelt werden, da Proteine die entsprechenden Aminosäuren enthalten. Diese Methode wurde in dieser Arbeit eingesetzt um die Proteinkonzentrationen der verschiedenen Fraktionen bei der graduellen Elution der Proben aus dem Kationenaustauscher zu bestimmen. Ein UV-Detektor war hinter der Kationenaustauscher-Säule geschaltet. Der Ausgangsschlauch der Säule führte die Proben direkt zum Detektor, so dass die Proteinkonzentrationen nach der Auftrennung kontinuierlich ermittelt werden konnten. Der am UV-Detektor angeschlossene Schreiber zeichnete den Elutionsverlauf auf (siehe Abb. 2.4, Seite 19).

#### Konzentrationsäquivalente

Um Proteinkonzentrationswerte der verschiedenen Fraktionen zu ermitteln, wurde ein Chromatogramm mit einer Rinderserumalbuminlösung ( $825 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) mit dem UV-Detektor erstellt. Mit Hilfe von Dreisatzrechnungen konnten die Proteinkonzentrationsäquivalente der Fraktionen bzw. Proben errechnet werden.



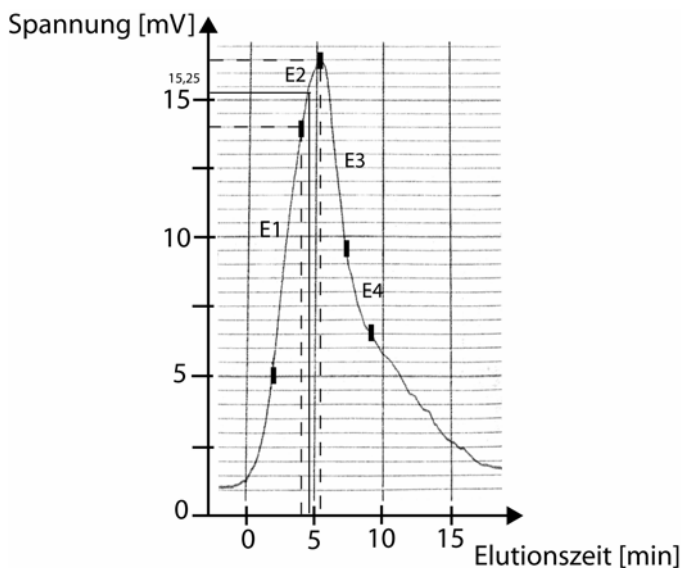
**Abb. 2.2:** Rinderserumalbuminsäquivalent-Chromatogramm

Das Signalsäquivalent einer Rinderserumalbuminlösung mit einer Konzentration von  $825 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  wurde mit dem UV-Detektor gemessen. Es wurde die Extinktion bei 280 nm in einem Spektralphotometer gemessen, sie betrug 0,542. Die Durchflussrate betrug ca.  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , die Geschwindigkeit des Schreibers  $2 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ .

Eine Konzentration von  $825 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Rinderserumalbumin ergab auf dem aufgezeichneten Chromatogramm eine Spannung von 10 mV. Diese Lösung hatte eine Extinktion von 0,542 bei der Wellenlänge 280 nm.

*Fallbeispiel für die Ermittlung der Rinderserumalbumin-Konzentrationsäquivalente.*

Die Abb. 2.3 stellt ein Elutionschromatogramm der WAX9D-Probe, deren Frostschutzaktivität gemessen wurde dar.



**Abb. 2.3: Elutionschromatogramm der Probe WAX9D**

Die Durchflussrate betrug ca.  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Der Schreiber hatte eine Geschwindigkeit von  $2 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ . Die schwarzen senkrechten Markierungen verzeichnen die Grenzen der 4 gesammelten  $1 \text{ mL}$  großen Fraktionen (E1, E2, E3 und E4).

Es wurde 4 Fraktionen (E1, E2, E3 und E4) gesammelt. Für jede Fraktion wurde ein Spannungsmittelwert ermittelt. Im Falle von der Fraktion E2 betragen die Fraktionsgrenzenpunkte jeweils 14 und 16,5 mV, was einen Mittelwert von 15,25 mV bildet. Anhand dieser mittleren Spannung wurde das Proteinkonzentrationsäquivalent errechnet. Eine konstante Durchflussrate konnte durch die Proteinüberladung der Kationenaustauscher-Säule nicht gewährleistet werden. Die Durchflussrate schwankte und betrug nicht immer  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , was hier durch die unterschiedlichen Breiten der Fraktionsflächen illustriert wird. Infolgedessen wurde für die x-Achse die Einheit Elutionszeit in Minuten ausgewählt. Eine Spannung von 15,25 mV entspricht einer Konzentration von  $15,25 \times (825 / 10) = 1258 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  BSA-Äquivalent, was einer Extinktion von  $15,25 \times (0,542 / 10) = 0,827$  entspricht.

### *Korrekturen der Messungen*

Die abgelesenen Spannungswerte und die Einteilungen der Fraktionen sind relativ zu betrachten, da das Sammeln der Fraktionen gegenüber den Aufzeichnungen der Elutionschromatogramme zwangsläufig verzögert aufgenommen wurde. Es bestehen dafür zwei Hauptgründe:

- a) Zeitverzögerung zwischen der Aufzeichnung des Schreibers und des Sammelns: Sie ist durch das Totvolumen der Messkammer des UV-Detektors bestimmt und beträgt ca. 1 mL. Es verzögert die Aufzeichnung um ca. eine Minute.
- b) Verzögerung der Fraktionensammlung zwischen der Messkammer des UV-Detektors und dem Ausgang des Abflussschlauches: Das Volumen des Schlauches von ca. 180  $\mu\text{L}$  verzögert das Sammeln der Fraktionen im Vergleich zu den Extinktionsmessungen um 10 Sekunden.

Die zwei Fehlerquellen ergeben zusammen eine Verzögerung des Schreibers im Bezug auf das Sammeln der Probe von ca. 70 Sekunden, was bei einer Schreibgeschwindigkeit von  $2 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$  eine Verschiebung der Chromatogrammaufzeichnung um 2,3 mm verursacht. Dies entspricht bei einer (mehr oder weniger konstanten) Durchflussrate von ca.  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  ein Volumen von 1,15 mL. Da die aufgesammelten Fraktionen ein Volumen von 1 ml haben, entspricht es auf dem Elutionschromatogramm eine Verschiebung um ca. eine ganze Fraktion. In diesem Fall stellt beispielsweise die aufgezeichnete Fraktion E2 auf der Abb. 2.3, die reale Fraktion E1. Die Fraktion E3 stellt die Peakfraktion dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Verschiebung im Betracht genommen: Die aufgezeichneten Elutionsfraktionen auf den abgebildeten Chromatogrammen stimmen mit den gesammelten Elutionsfraktionen überein.

#### **2.2.4.2. SDS-Proteingelelektrophorese**

Elutionsfraktionen sowie induzierte Hefelösungsproben wurden aufgetrennt mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese (Schägger and von Jagow 1987). Die Proteinproben wurden erst in Gegenwart von einem anionischen Detergent SDS (Natriumdodecylsulfat) und einem Reduktionsmittel wie DTT (Dithiothreitol) bei  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  5 Minuten gekocht und damit denaturiert. Der Probenpuffer, welcher SDS, DTT und den Farbstoff Bromphenolblau enthält, wurde 1:3 mit den Proben vermischt. Die Trenngele hatten eine Endkonzentration von Acrylamid von 16,5 %, die Sammelgele von 4 %. Die Elektrophorese-Anodenkammer wurde mit dem Anodenpuffer und die Kathodenkammer mit dem Kathodenpuffer gefüllt. Jede Geltasche wurde mit 18  $\mu\text{L}$  Probe geladen. Der Proteinstandard Mark 12™ (Invitrogen) diente als Marker. Die Auftrennung erfolgte bei 150 V für ca. 1 Stunde.

**Tab. 2.6: Gelzusammensetzung (für zwei 5,6 mL-Gele)**

	<b>Trenngel (16,5 %)</b>	<b>Sammelgel (4 %)</b>
Acrylamid-Lösung*	6,6 mL	0,83 mL
Gelpuffer*	4 mL	1,56 mL
Bidest.	72 µL	3,85 mL
Glycerin	1,33 mL	-
APS*	37 µL	62 µL
Temed*	4 µL	6 µL
Gesamtvolumen	12 mL	6,25 mL

Lösungen (\*):

Acrylamid-Lösung: Gemischlösung von Acrylamid: N,N'-Methylenbisacrylamid 37,5:1

Gelpuffer: 3 M Tris, pH 8,45

APS: Ammoniumpersulfat, 10%ige (w/v) Lösung in A. bidest.

Temed: N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin

**Tab. 2.7: Puffer**

	<b>Kathodenpuffer</b>	<b>Anodenpuffer</b>	<b>Gelpuffer</b>
Tris	100 mM	200 mM	3 M
SDS	0,1 %	-	-
Tricin	100 mM	-	-
pH	8,25	8,9	8,45
pH-Einstellung	keine	mit HCl	mit HCl

**Tab. 2.8: Probenpuffer**

<b>3x Probenpuffer</b>	
Tris-HCl pH 6,8	0,135 M
Glycerin	30 %
Bromphenolblau	0,03 %
DTT (Dithiothreitol)	0,15 M
SDS (Natriumdodecylsulfat)	3 %

#### 2.2.4.2.1. Coomassie-Färbung

Die Gele wurden in einer Coomassie-Färbelösung 50 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden die Gele 3 bis 12 Stunden in Entfärbelösung entfärbt.

**Tab. 2.9: Coomassie-Färbelösung und -Entfärbelösung**

	Färbelösung	Entfärbelösung
Methanol	45 %	45 %
Essigsäure	10 %	5 %
Coomassie Brillant R-250	0,2 %	-

Nach Entfärbung wurden die Gele zwischen zwei Folien auf einer Glasplatte getrocknet.

#### 2.2.4.2.2. Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde mit dem kommerziellen Silver Staining Kit von der Firma Serva und dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt.

#### 2.2.4.3. Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membrane

Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine von dem Gel auf einer Nitrocellulose-Membran transferiert. Das Gel wurde auf einer Membran appliziert und zwischen zwei Schwämme gepackt. Das Konstrukt wurde dann in einem mit Transferpuffer gefüllten Blot Tank eingesetzt. Der Transfer der Proteine vom Gel zur Membran erfolgte bei 80 V für 50 Minuten. Zur Überprüfung des Transfers wurde die Membran in einer wasserlöslichen Ponceau-rot-Lösung (0,2 % w/v in 3%iger Trichloressigsäure-Lösung) 3-5 Minuten inkubiert und anschließend mit A. bidest. entfärbt.

**Tab. 2.10: Lösungen**

Stammlösung Reservoir-Puffer 10 x	Transfer-Puffer
190 mM Tris	1 x Reservoirpuffer
1,9 M Glycin	20 % Methanol

#### 2.2.4.4. Immunologische Detektion mit spezifischem Antikörper

Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurde die Nitrocellulose-Membran nach Proteintransfer 3 mal 15 Minuten in 20 mL Blockierungspuffer auf einem Schüttler geschwenkt. Die Membran wurde dann 1 Stunde bei Raumtemperatur mit einem 1:500 mit MPT-Puffer verdünnt polyklonalen Kaninchen Anti-WAX9-Antikörper inkubiert. Die Membran wurde 3 mal 5 Minuten in 30 mL MPT-Puffer gewaschen. Der 1:3000 im MPT-Puffer verdünnte sekundäre Antikörper wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschschrritten mit MPT-Puffer wurde die Membran in Alkaline Phosphatase Puffer übernommen. Es wurden



33  $\mu\text{L}$  NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid,  $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  in 70 % Dimethylformamide) und 66  $\mu\text{L}$  BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat,  $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  in 100 % Dimethylformamide) pro 20 mL Alkaline Phosphatase Puffer zugegeben. Die Entwicklung erfolgt bei Raumtemperatur in Dunkelheit für 10-30 Minuten. Nach dem Erreichen der gewünschten Entwicklungsfarbe wurde die Reaktion mit destilliertem Wasser gestoppt und die Membran konnte getrocknet werden.

**Tab. 2.11: Puffer**

<b>MPT- Puffer 10 x</b>	<b>Blockierungspuffer</b>	<b>Alkaline Phosphatase Puffer</b>
100 mM Tris	1 x MPT	100 mM Tris
1,5 M NaCl	3 g / l Casein	100 mM NaCl
0,5 % Tween 20		50 mM $\text{MgCl}_2$
In A. bidest.		In A. bidest.
pH 7,4 mit HCl einstellen		pH 9,5 mit HCl einstellen

## **2.2.5. Behandlung und Aufreinigung der überexprimierten WAX9-Proteine**

### **2.2.5.1. Proteinausfällung mit Ammoniumsulfat**

Die überexprimierten Proteine werden von den Hefenzellen sekretiert und in das Medium angereichert. Nach 72 Stunden Überexpression wurde die induzierten Hefenkulturen 30 Minuten bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Die Hefenzellensedimente wurden gesammelt und autoklaviert. Der klare Überstand wurde mit 60 % Sättigung Ammoniumsulfat ( $390 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) behandelt. Die ausgefällte Proteinlösung wurde dann bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Unter diesen Bedingungen kann die Lösung mehrere Wochen ohne merkliche Veränderungen gelagert werden.

### **2.2.5.2. Zentrifugation**

Es wurde jeweils 1 Liter der verschiedenen ausgefällten Proteinlösungen behandelt. Nach einer 20minütigen Zentrifugation bei 8000 g wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 8 mL 30 mM Na Acetat-Puffer pH 5,5 aufgenommen. Das aufgenommene Sediment wurde nach einer kurzen Abzentrifugation der unlöslichen Bestandteile in der Tischzentrifuge (14000 g, 5 Minuten) entsalzt und in den Na Acetat-Puffer transferiert.

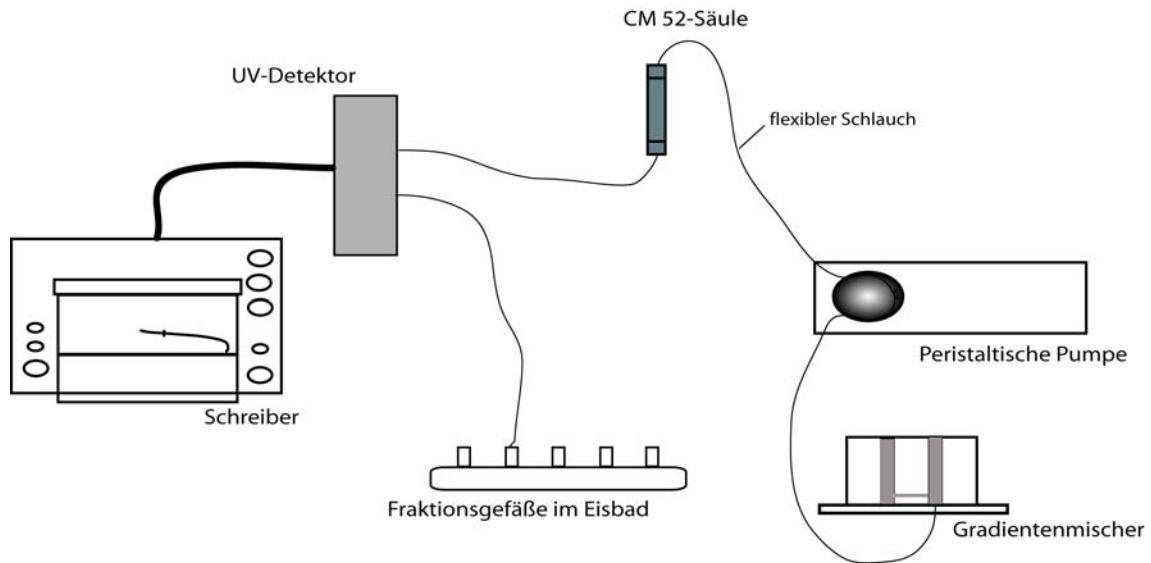
### **2.2.5.3. Entsalzung: Gelfiltration mit Sephadex PD-10 Säule**

Die PD-10 Säule ist mit dem Makromolekülmaterial Sephadex gefüllt, welches einen Molekularsiebeffekt besitzt. Die Entsalzung erfolgt dadurch, dass größere Moleküle wie Proteine im Ausschlussvolumen des Säulenmaterials eluieren, während die kleineren Moleküle wie Salze in den Poren des Gelfiltrationsmaterials zurückgehalten werden und später eluieren. Die PD-10-Säule wurde mit 25 mL Na Acetat-Puffer (30 mM Na Acetat, pH 5,5) equilibriert.

Es wurde 2 mL der Probe auf der Säule aufgetragen. Mit 0,5 mL Na Acetat-Puffer wurde die Säule gewaschen und mit 3,5 mL des gleichen Puffers die Probe eluiert. Die gesammelten Proben (insgesamt 4 mal 3,5 mL) konnten dann auf dem Kationenaustauscher aufgetragen werden.

#### **2.2.5.4. Die Ionenaustausch-Chromatographie**

Die Ionenaustausch-Chromatographie beruht auf der kompetitiven Wechselwirkung geladener Moleküle. Eine Ionenaustauscher-Matrix besitzt geladenen Gruppen auf die Probenmoleküle mit Ladungen und Ionen binden können. Erst binden die Moleküle (Proteine) an den fixierten Ladungen der stationären Phase, dann erfolgt deren Verdrängung und Elution durch eine steigende Salzkonzentration des Eluenten. Um die exprimierten WAX9-Proteine von den nativen Hefeproteinen und Peptone des Mediums aufzutrennen wurde ein Kationenaustauscher verwendet. WAX9-Proteine haben einen isoelektrischen Punkt bei einem pH-Wert von 9,4 und weisen infolgedessen protonierte Aminosäurenresten in dem 30 mM Na Acetat Puffer auf, dessen pH bei einem Wert von 5,5 eingestellt wurde. Infolgedessen verhalten sich die Proteine wie Kationen und können an negativ geladenen Gruppen der stationären Phase binden. Das Material der festen stationären Phase bestand aus einer makromolekularen unlöslichen Matrix (CM 52, Whatman), die mit Methylcarboxylgruppen besetzt ist. Das Material wurde in eine Säule (Höhe: 9 cm, Durchmesser: 0,8 cm) gefüllt. Die Säule wurde zwischen einer peristaltischen Pumpe und einem UV-Detektor geschaltet (siehe Abb. 2.4). Die Pumpe ermöglichte einen kontinuierlichen Zufluss der Proben und der Elutionslösung. Nach Equilibrierung der Säule mit 50 mL Puffer Durchlauf, konnte die Proteinprobe auf der Säule aufgetragen werden. Danach wurde die Säule mit ca. 30 mL Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte dann graduell mit einer Mischung von 30 mM Na Acetat pH 5,5 Puffer und 1 M NaCl 30 mM Na Acetat pH 5,5 Puffer. Das Gradientenvolumen betrug 40 mL. Das Eluat wurde in 1 mL großen Proben fraktioniert und gesammelt.



**Abb. 2.4:** Schematische Zeichnung der Kationenaustauscheranlage

Die Kationenaustauscheranlage besteht aus einer Säule in dem die Kationenaustauschermatrix eingeschlossen ist, einer peristaltischen Pumpe, einem Gradientenmischer und einem UV-Detektor. Ein flexibler Schlauch verbindet diese Elemente. Zusätzlich war ein Schreiber an dem UV-Detektor angeschlossen um den Ablauf der Proteinkonzentrationen im Detektor aufzuzeichnen. Die Proben sowie Wasch- und Elutionspuffer wurden mit Hilfe der peristaltischen Pumpe auf der Säule aufgetragen.

#### 2.2.5.5. Transfer der Elutionsfraktionen in Testpuffer

Nach dem Sammeln der Fraktionen, wurden diese in Testpuffer überführt. Auf einer mit Testpuffer equilibrierten NAP<sup>TM</sup>5-Säule wurden 500  $\mu$ L einer Fraktion aufgetragen, mit 200  $\mu$ L Testpuffer wurde die Säule gewaschen und mit 800  $\mu$ L Testpuffer wurden die Proben eluiert. Der Testpuffer war im Falle des Frostschutztests der Probenpuffer dessen Zusammensetzung in der Tab. 2.14 dargestellt wird oder der TES-Puffer (siehe Tab. 2.15) für den Lipidtransfertest.

#### 2.2.6. Isolierung von Cryoprotectin aus dem Kohl (*Brassica oleracea*)

Es wurde die Methode von Sieg et al. (1996) verwendet. Es wurden ca. 20 g frische oder tiefgefrorene gehärtete Kohlblätter mit ca. 50 mL Homogenisationspuffer in einem Mixer homogenisiert. Der Mix wurde dann durch eine Gaze mit 50  $\mu$ m großen Poren filtriert. Das Filtrat wurde 30 Minuten bei 23000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 100 °C 8 Minuten inkubiert. Nach Abkühlung in einem Eisbad wurde die Lösung erneut bei 23000 g 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 4,0 eingestellt. Nach einer 15minütigen Zentrifugation bei 23000 g wurde dem Überstand Polyamid-6-Matrix zugegeben bis die Lösung trübe wurde. Die Mischung wurde 20 Minuten

bei 4 °C gerührt. Nach Filtration wurde die Lösung mit 60 % Sättigung Ammoniumsulfat gefällt ( $390 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) und 1 Stunde bei 4 °C gerührt. Die ausgefällte Proteinlösung kann unter diesen Bedingungen mehrere Monate bei 4 °C gelagert werden.

**Tab. 2.12: Homogenisationspuffer**

---

50 mM Tris  
2 % Polyclar (w/v)  
2 mM EDTA  
300  $\mu\text{M}$  Mercaptobenzothiazole (frisch zugeben)  
auf pH 7,8 mit 99%iger Essigsäure einstellen

---

Zur weiteren Verarbeitung wurden die ausgefällten Proteine bei 8000 g, 4 °C und 20 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment wurde in Testpuffer aufgenommen. Nach Abzentrifugation in der Tischzentrifuge (14000 g, 5 Minuten) der unlöslichen Bestandteile wurde die Probe mit einer Gelfiltrationsäule entsalzt. Auf einer mit Testpuffer equilibrierten NAP-5-Säule wurden 500  $\mu\text{L}$  der Probe aufgetragen. Die Säule wurde anschließend mit 200  $\mu\text{L}$  Testpuffer gewaschen und mit 800  $\mu\text{L}$  des gleichen Testpuffers wurden die Proteine eluiert. Der Testpuffer war im Falle des Frostschutztests der Probenpuffer dessen Zusammensetzung in der Tab. 2.14 dargestellt wird oder der TES-Puffer (siehe Tab. 2.15) für den Lipidtransfertest.

## **2.2.7. Frostschutztest**

### **2.2.7.1. Thylakoidsisolierung aus Chloroplasten ungehärteter Spinatpflanzen**

Der hier in dieser Arbeit verwendete Frostschutztest wurde von Hinch und Schmitt (1992a) etabliert. In einem 2liter-Mixer wurden 50 g frischer Spinatblätter mit ca. 100 mL eiskaltem Isolationspuffer 10 Sekunden zerkleinert. Das Homogenat wurde dann durch eine Gaze mit 50  $\mu\text{m}$  Porengröße filtriert. Das Filtrat wurde bei 4000 g 5 Minuten und 4 °C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Sediment in ca. 2 mL 10 mM NaCl vorsichtig resuspendiert. Nach zwei weiteren Wasch- und Zentrifugationsschritten bei 7000 g wurde das Pellet in 2 mL 10 mM NaCl-Lösung aufgenommen und eine Chlorophyllbestimmung der Suspension wurde durchgeführt. Bei allen Protokollschritten war es wichtig für den Erhalt der intakten Thylakoidmembrane auf Eis und zügig zu arbeiten.

**Tab. 2.13: Thylakoidisolationspuffer**

240 mM Saccharose  
 160 mM NaCl  
 1 mM MgCl<sub>2</sub> (Hexahydrat) oder 1 mL 1 M Stammlösung  
 1mM MnCl<sub>2</sub> (Dihydrat) oder 1 mL 1 M Stammlösung  
 2 mM EDTA oder 4 mL 0,5 M Stammlösung  
 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> oder 1 mL 1 M Stammlösung  
 50 mM Tris  
 mit HCl (37%) auf pH 7,8 einstellen  
 mit A. bidest. ad 1 L

Vor der Benutzung frisch zugeben:

1,25 mM Na Ascorbat  
 3,3 mM Cystein

Hinweis: Die hier gegebene Reihenfolge bei der Zusammenstellung des Puffers muss beachtet werden. MnCl<sub>2</sub> fällt im basischen Milieu als Braunstein aus und muss deswegen erst in einer wässrigen neutralen Lösung aufgelöst werden.

### 2.2.7.2. Chlorophyllbestimmung

Die Methode wurde von Arnon (1949) entwickelt. Es wurde 10 µL der Thylakoidsuspension mit 990 µL 80%igen Aceton gemischt. Die nicht acetonlöslichen Bestandteile wurden bei einer 2minütigen Zentrifugation (14000 g) in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei 645 und 663 nm photometrisch bestimmt. Der Chlorophyllgehalt wurde nach der folgenden Gleichung ermittelt:

$$20,2 \times E_{(645nm)} + 8,02 \times E_{(663nm)} = mg \text{ Chlorophyll} / 10 mL$$

Für den volumetrischen Test war ein Chlorophyllgehalt von 1-1,2 mg · mL<sup>-1</sup> erwünscht. Die Thylakoidsuspension wurde mit 10 mM NaCl-Lösung verdünnt.

### 2.2.7.3. Volumetrischer Test

Bei diesem Test werden die zu testenden Proteine zu einer Thylakoidsuspension gegeben und bei -20 °C eingefroren. Nach Auftauen werden die Ansätze in Hämatokritkapillaren gefüllt und zentrifugiert. Die Größe der abzentrifugierten Pellets ist ein Maß für das erhaltene Volumen der Thylakoidmembrane nach Gefrier-Tau-Zyklus. Mit diesem Experiment ist es möglich Substanzen auf ihre Kryoprotektion zu prüfen.

Dieser Test wurde in dieser Arbeit angewendet um die in *Pichia pastoris* überexprimierten Proteine WAX9D und WAX9E (und die Kontrollprobe X33) auf ihre möglichen kryoprotektiven Effekte zu prüfen. Bei jedem Testdurchgang wurde parallel ein Ansatz mit dem aus

dem Kohl isolierten Cryoprotectin durchgeführt. Dies stellt eine positive Kontrolle dar und ermöglicht den Testablauf auf seine Gültigkeit hin zu beurteilen. Weiterhin wurden zwei Nullwerte-Ansätze mit Probenlösung angesetzt. Der eine wurde bei -20 °C eingefroren und aufgetaut, wie die anderen Proben, der andere wurde auf Eis 3 Stunden inkubiert. Dieser Ansatz stellt die intakte Probe mit intakten Thylakoidmembranen und infolgedessen „100 % Frostschutz“ dar. Weiterhin wurden Proben mit Proteinen auf Eis inkubiert um potenzielle thylakoid-schädigende Effekte bei 0 °C zu prüfen. Die Frostschutzaktivität wurde mit der folgenden Formel errechnet:

$$\frac{[TKV(+P,-20^{\circ}C) - TKV(-P,-20^{\circ}C)]}{[TKV(-P,0^{\circ}C) - TKV(-P,-20^{\circ}C)]} \times 100 = \% \text{ Frostschutz}$$

mit TKV: Thylakoidpelletgröße (mm)

+P: Ansatz mit Proteinproben

-P: kontrollansatz ohne Proteinproben, nur mit Probenlösung

**Tab. 2.14: Lösungen**

<b>Probenpuffer</b>	<b>Testlösung</b>
10 mM Saccharose	10 mM MgCl <sub>2</sub>
1 mM MnCl <sub>2</sub> (Dihydrat)	in a. bidest.
1 mM CaCl <sub>2</sub> (Dihydrat), in a. bidest.	

#### **2.2.7.4. Durchführung**

100 µL Thylakoidsuspension wurden mit 100 µL in Probenlösung aufgenommene Proteinfraktion vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde dann 3 Stunden bei -20 °C eingefroren. Die Ansätze wurden 2 Minuten in Wasserbad bei Raumtemperatur aufgetaut. Nach Zugabe von 100 µL Testlösung wurden die Proben in Hämatokritkapillaren gefüllt und diese in der Hämatokritzentrifuge 15 min bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Länge der entstandenen Sedimente wurde mit einer skalierten Lupe vermessen.

#### **2.2.8. Lipidtransfertest**

Der Test wurde nach der Methode von Geldwerth et al. (1991) etabliert. Nach Zugabe einer Substanz in einer Mischung aus Donor- und Akzeptorvesikeln, wobei die Donorvesikel mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, wird die Fluoreszenzemission in einem Fluorometer gemessen. Die Fluoreszenzzunahme pro Zeiteinheit stellt ein Maß für die Lipidtransferaktivität der zugegeben Substanz: Lipidtransferaktive Moleküle begünstigen den Lipidaustausch zwischen den zwei Typen von Vesikeln und somit auch den Transport und die Verteilung von fluoreszenzmarkierten Lipidemolekülen von den Donor- zu den Akzeptorvesikeln. Dabei wird der Anteil an fluoreszenzmarkierten Lipidemolekülen in den Akzeptorvesikeln erhöht, was eine Erhöhung der gemessenen Fluoreszenz bewirkt. Da der Lipidtransfer zwischen Vesikeln in

geringeren Maß auch ohne lipidtransferaktive Substanz abläuft wurde ein Leerwert mit Testpuffer bei jeder Messreihe angesetzt. Dessen relative Fluoreszenz pro Minute wurde gemessen und anschließend der entsprechende Messwert von den Messwerten der getesteten Proteinproben abgezogen.

### 2.2.8.1. Vesikelherstellung

Es wurden zwei Typen von Lipidvesikeln hergestellt: Donorvesikel, die Phospholipide und einen Fluoreszenzfarbstoff enthalten und Akzeptorvesikel, die Phospholipide ohne Markierung haben. Die Donorvesikel bestanden aus einem Gemisch von 50 % NBD-C12-HPC, 40 % EPC und 10 % an EPG, die Akzeptorvesikel aus 90 % EPC und 10 % EPG. Die folgende Tabelle gibt die genauen Volumenangaben der Vesikelproben.

**Tab. 2.15: Puffer und Liposomen**

Donorvesikel	Akzeptorvesikel	TES-Puffer
32 µL EPG 1/100	46 µL EPG	10 mM TES
13 µL EPC 1/100	40 µL EPC	auf pH 7,4 mit
20 µL NBD-C12-HPC		NaOH einstellen

EPG: Egg Phosphatidylglycerol (10 mg · mL<sup>-1</sup>), EPG 1/100 (0,1 mg · mL<sup>-1</sup>)

EPC: Egg Phosphatidylcholin (100 mg · mL<sup>-1</sup>), EPC 1/100 (1 mg · mL<sup>-1</sup>)

NBD-C12-HPC: 2-(12-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)dodecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (1,25 mg · mL<sup>-1</sup>)

Alle Lipide werden im Chloroform gelöst bei -20 °C gelagert.

TES: N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethansulfonsäure

Die Gemische wurden erst mit gasförmigem Stickstoff getrocknet und dann in einem Gefrier-trockner gestellt um eine vollständige Trocknung zu erzielen. Da die Lipide in Chloroform gelagert werden, ist eine vollständige Trocknung der Gemische bzw. Verdampfung des Lösungsmittels wichtig. Dann werden die getrockneten Fette in 500 µL 10 mM TES-Puffer aufgenommen, in einem Ultraschall-Wasserbad emulgiert und mit Ultraschall in einem Eisbad bei 60 Watt 2 x 3 Minuten zu Vesikeln von einer Größe von ca. 25 nm Durchmesser geformt.

### 2.2.8.2. Durchführung des Transfertests

Die Zunahme pro Minute der Fluoreszenzemission beim Transfer der markierten Lipide wurde in einem Fluorometer bei einer Emissionswellenlänge von 530 nm und einer Anregungswellenlänge von 475 nm gemessen. Vor jeder Messreihe wurde das Fluorometer auf 100 % relative Fluoreszenzemission kalibriert: Es wurde dafür ein Ansatz mit dem Detergens Triton X-100 gemischt. Das Detergens Triton X-100 zerstört die Lipidmembran und ruft eine maximale Fluoreszenz hervor (100 % rel. Fluoreszenz). Die Ansätze wurden in der Meßküvette gemischt und in die Messkammer gestellt. Ein Magnetrührer in der Küvette sorgte für eine homogene Mischung während der Messung. Die relative Fluoreszenzemission wurde jede 10 Sekunden eine Minute lang protokolliert.

**Tab. 2.16: Lipidtransferansätze**

<b>Kalibrierungsansatz</b>	<b>Testansatz</b>
2 mL TES-Puffer	2 mL TES-Puffer
10 $\mu$ L Akzeptorvesikel	10 $\mu$ L Akzeptorvesikel
10 $\mu$ L Donorvesikel	10 $\mu$ L Donorvesikel
20 $\mu$ L 1%iges (v/v) Triton X-100	10 - 100 $\mu$ L Proteinlösung

### **2.2.9. Datenverarbeitung**

Abbildungen von Elutionschromatogrammen, Proteingelen und Western Blots wurden mit den Computerprogrammen Adobe Photoshop CS und Adobe Illustrator CS bearbeitet.



## 3. Ergebnisse

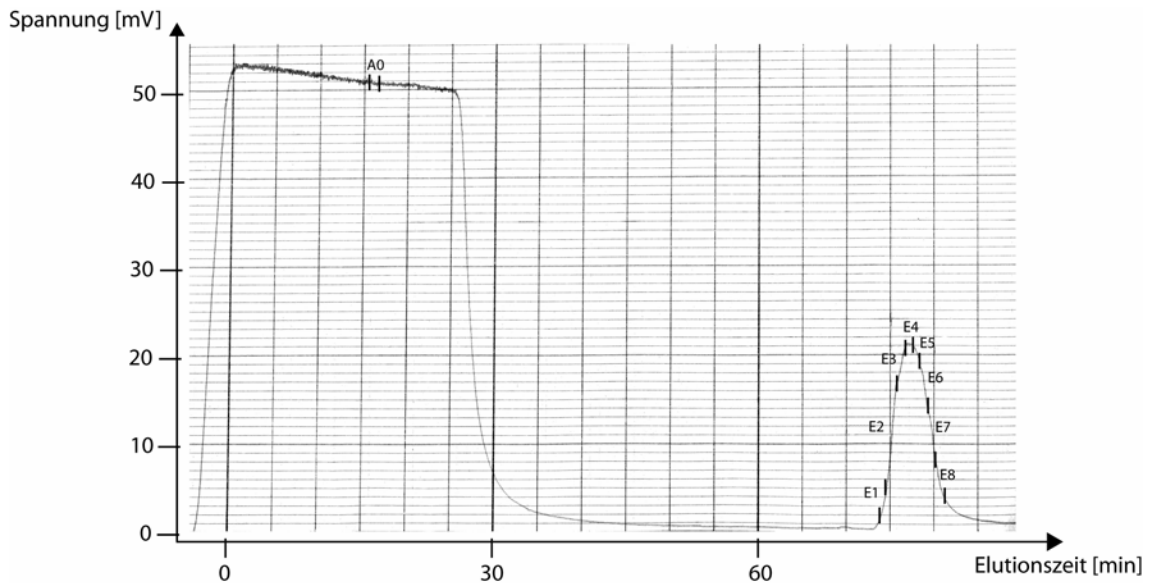
### 3.1. Überexpression der WAX9D- und WAX9E-Proteine in *Pichia pastoris*

#### 3.1.1. Prüfung der Überexpression

Eine ausreichende Luftzufuhr ist neben der Methanolverfügbarkeit ein wichtiger Faktor für eine gute Proteinüberexpression in *Pichia pastoris*. Die anfänglichen Überexpressionskulturen wurden in 250 mL-Kolben mit keinem optimalen Verhältnis Flüssigkultur / Luftraum angesetzt. Dies beeinträchtigte die Proteinüberexpression und machte die Detektion der WAX9-Proteine auf Proteingelen schwierig. Die Abb. 3.2 illustriert diese Tatsache. Das dargestellte mit Coomassie gefärbte Proteingel zeigte bei den aufgetrennten Proteinfractionen keine gefärbte Bande mit der erwarteten Größe zwischen den 6- und 14 kDa-Markerbanden. Ein empfindlicheres silbergefärbtes Gel (Abb. 3.3) zeigte drei Banden mit den entsprechenden Größen in drei gesammelten Fraktionen. Erst die spezifische Immunodetektion mit Anti-WAX-Antikörper zeigte auf einer Nitrocellulose Membran (Abb. 3.2) positive Signale mit der erwarteten Größe zwischen den 6- und 14 kDa-Markerbanden (Schilling 2003).

##### 3.1.1.1. Auftrennung der überexprimierten WAX9-Proteinproben mit dem Kationenaustauscher

WAX9-Proteine als Mitglieder der Lipidtransferproteine-Familie weisen einen basischen isoelektrischen Punkt bei einem pH-Wert von 9,4 auf (Kader 1996). Die mit Ammoniumsulfat ausgefällten WAX9-Proteinextrakte wurden in einem Puffer mit einem pH-Wert von 5,5 übernommen, infolgedessen werden sie protoniert und können auf einer Kationenaustauschermatrix binden. Mit einer NaCl-Lösung wurden sie graduell verdrängt und eluiert. Die Abb. 3.1 zeigt beispielsweise das bei der Elution aufgezeichnete Auftrennungschromatogramm. Das Elutionschromatogramm zeigt bei dem Auftragen der Proteinprobe ein Plateau auf. Während des Waschvorgangs der Säule mit ca. 30 ml Puffer, ist eine Abnahme der Spannung (was einer Abnahme der Proteinkonzentration entspricht) auf dem Chromatogramm zu erkennen. Nach dem die aufgezeichnete Kurve wieder die 0 mV-Linie erreicht hatte, wurden die gebundenen Proteine mit einer NaCl-Lösung aufsteigender Konzentration graduell eluiert. Auf der Abb. 3.1 ist ein deutlicher Elutionspeak zu erkennen.



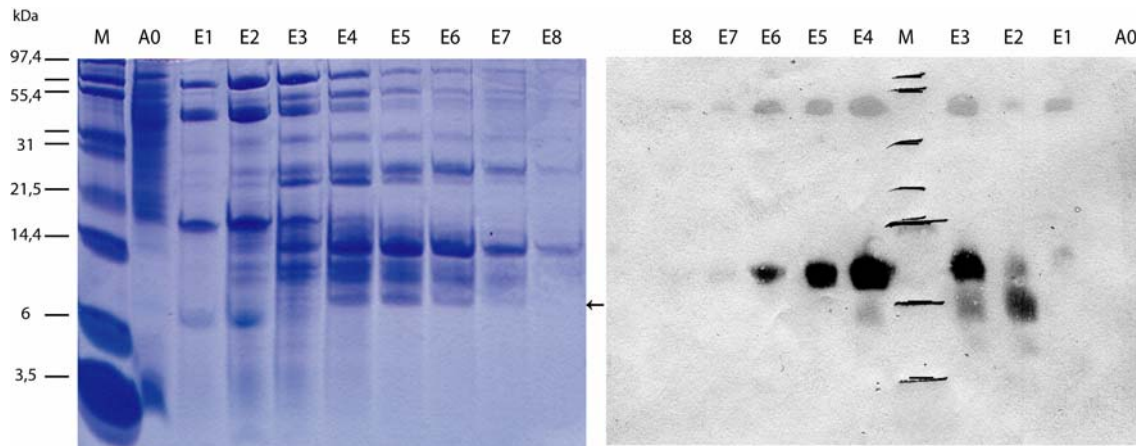
**Abb. 3.1: Beispiel einer Aufzeichnung eines Chromatogramms von WAX9D-Proteinen während der Auftrennung mit dem Kationenaustauscher CM 52**

Die Durchflussrate betrug ca.  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Der Schreiber hatte eine Geschwindigkeit von  $2 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ . Es wurden 9 Fraktionen gesammelt. A0 ist eine Fraktion aus dem Waschschrift. Die Elutionsfraktionen sind von E1 bis E8 nummeriert und voneinander durch senkrechte schwarze Markierungen getrennt.

Bei diesem Beispiel (Abb. 3.1) wurden 2 L ausgefällte WAX9D-Proteinsuspension nach Überexpression in *Pichia pastoris* verarbeitet. Es wurde 14 mL Proteinprobe auf der Kationenaustauschersäule aufgetragen, mit 30 mL 30 mM Na Acetat Puffer wurde die Säule gewaschen und mit einem Gradientenvolumen von 40 mL wurden die gebundenen Proteine eluiert. Bei der Elution wurde ein einziger Peak auf dem Chromatogramm aufgezeichnet. Es wurden 8 Elutionsfraktionen (von E1 bis E8) und eine Fraktion (A0) bei dem Waschschrift gesammelt. Die Fraktionen hatten jeweils ein Volumen von 1 mL. Der weitere Verlauf des Chromatogramms, der keine weiteren Peaks zeigte, wurde hier nicht gezeigt. Die Auftragungs-, Wasch- und Elutionsschritte für die WAX9D-, WAX9E- und die Kontrollproteinproben (X33) liefen auf ähnliche Weise wie in der Abb. 3.1 dargestellt ab. Deshalb wurde auf die detaillierten Darstellungen sämtlichen Chromatogramme verzichtet. Im folgenden Abschnitt werden nur die Chromatogrammaufzeichnungen der Elutionsschritte dargestellt.

### 3.1.1.2. SDS-Gelelektrophorese der gesammelten Fraktionen

Die in der Abb. 3.1 dargestellten gesammelten Fraktionen wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf einer Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Abb. 3.2 zeigt das entsprechende mit Coomassie Blue gefärbte Proteingel und die entsprechende Nitrocellulose Membran nach Immunodetektion mit Anti-WAX9-Antikörper.

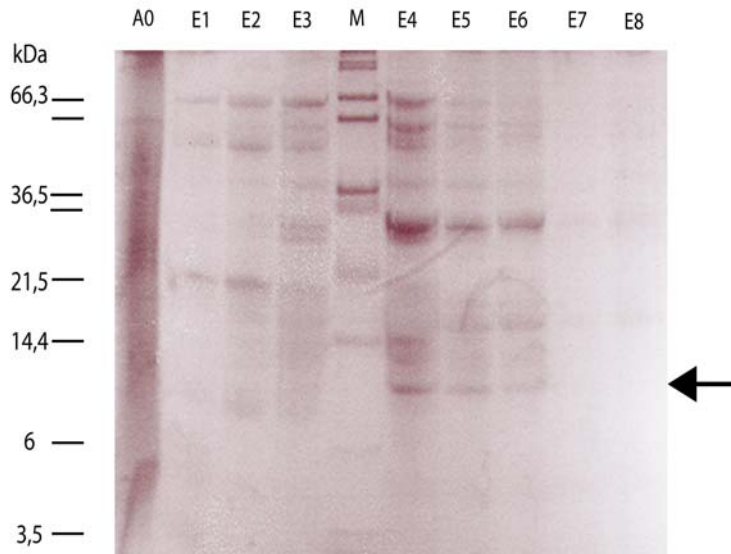


**Abb. 3.2: Coomassie gefärbtes Polyacrylamid-Gel und Westernanalyse**

Auf dem Gel sind in der Reihenfolge von links nach rechts: Marker, Fraktionen A0, E1 bis E8. Auf der Nitrocellulose Membran von rechts nach links: Fraktionen A0, E1 bis E3, Marker, Fraktionen E4 bis E8. Die Fraktion A0 wurde bei dem Auswaschschritt gesammelt und stellt die auf der Kationenaustauschersäule ungebundenen Proteine dar. Die Fraktionen E1 bis E8 wurden bei dem Elutionsschritt gesammelt. Die Proben setzen sich aus 100  $\mu$ L Proteinfraction und aus 50  $\mu$ L Probenpuffer zusammen, davon wurden 18  $\mu$ L pro Tasche aufgetragen. Es wurde die Proteine ca. 1 Stunde bei 150 V aufgetrennt.

Die Immunodetektion der immobilisierten Proteine illustriert die Auftrennung. Überexprimierte WAX9-Proteine befinden sich nicht in der Waschschriftsfraction (A0) sondern nur in bestimmten Fraktionen (E2, E3, E4, E5 und E6) des Elutionspeaks. WAX9-Proteine binden an die ausgewählte Kationenaustauschermatrix CM52 und die Säule wurde nicht überladen, so dass WAX9-Proteine bei dem Auftrag- oder Auswaschschritt ausgewaschen worden wären. Die Fraktionen E7 und E8 zeigen auf der Nitrocellulosemembran nach Immundetektion kein positives Signal. Die Fraktionen E3, E4 und E5 zeigen die stärksten Signale auf der Western Blot Membran nach Immundetektion. Auf dem zum Immunoblot korrespondierenden mit Coomassie Blue gefärbten Proteingel lassen sich keine stärker gefärbten Bande zwischen den 6- und 14 kDa-Markerbanden erkennen. Die WAX9-Proteine könnten sich mit dem Coomassie Blue R-250 schlecht färben lassen. Eine geringe Überexpression und infolgedessen niedrige WAX9-Proteinkonzentration der Eluatfraktionen könnte auch die Abwesenheit bzw. die schwache Färbung der Banden auf dem Gel erklären.

Um eventuelle Proteine mit geringeren Konzentrationen auf dem Polyacrylamidgel zu detektieren, wurde die sensitive Silberfärbemethode verwendet.



**Abb. 3.3: Silbergefärbtes Polyacrylamidgel, Analyse der Trennung von Abb. 3.1**

In der Reihenfolge von links nach rechts: Fraktionen A0, E1 bis E3, Marker, Fraktionen E4 bis E8. Die Fraktion A0 wurde bei dem Waschschrift gesammelt und stellt die auf der Kationenaustauschersäule ungebundenen Proteine dar. Die Fraktionen E1 bis E8 wurden bei dem Elutionsschrift gesammelt. Die Proben setzen sich aus 100  $\mu$ L Proteinfraktion und aus 50  $\mu$ L Probenpuffer zusammen. Es wurden 18  $\mu$ L Probe pro Tasche aufgetragen. Die Auftrennung bei 150 V dauerte ca. 1 Stunde.

Es sind leicht gefärbte Banden zwischen den 6- und 14 kDa-Markerbanden in den Fraktionen E4, E5 und E6 zu erkennen. Diese Fraktionen weisen positive Signale in der gleichen Höhe nach Immunodetektion mit Anti-WAX9-Antikörper auf und könnten WAX9-Proteine aufweisen. Allerdings zeigt die Fraktion E3, die ein starkes Signal auf der Nitrocellulose Membran (Abb. 3.2) aufweist, bei dem silbergefärbten Gel keine klare Bande.

### 3.1.1.3. Optimierung der WAX9-Proteinüberexpression

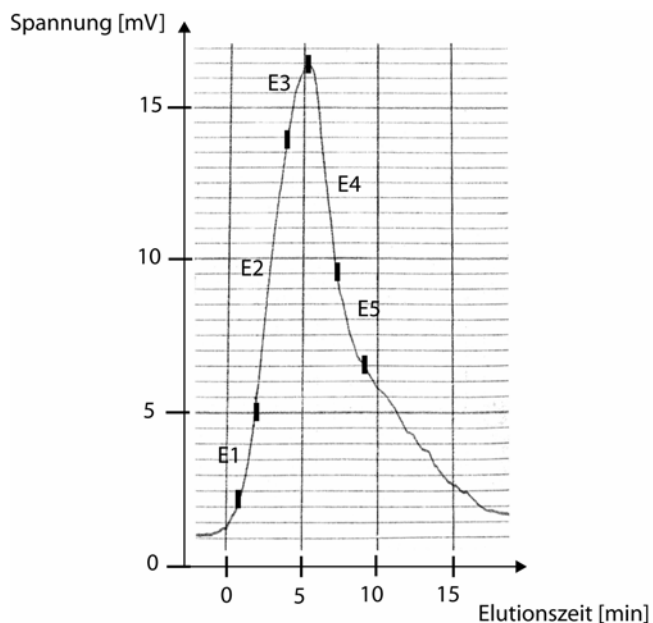
Um eine leistungsstärkere Überexpression zu erreichen musste das Verhältnis Luftraum / Flüssigkultur vergrößert werden. Es wurden 2liter-Erlenmeyerkolben ausgewählt. Sie wurden mit 1 Liter Hefekultur gefüllt und mit einer luftdurchlässigen Gaze verschlossen. Nach Optimierung der Überexpression konnten WAX9-Banden mit Coomassie gefärbten Proteingelen leicht erkannt werden (siehe Abb. 3.7).

### 3.1.2. Auftrennung der überexprimierten WAX9-Proben

In diesem Kapitel werden auszugsweise die Chromatogramme, Proteingel- und Westernanalyseabbildungen der Proben und Fraktionen dargestellt, deren Frostschutzaktivität getestet wurde. Die gleichen Protokolle wurden für die Proben und Fraktionen für den Lipidtransferrest angewendet und wurden hier nicht dargestellt, da deren Aufzeichnungen ähnlich sind.

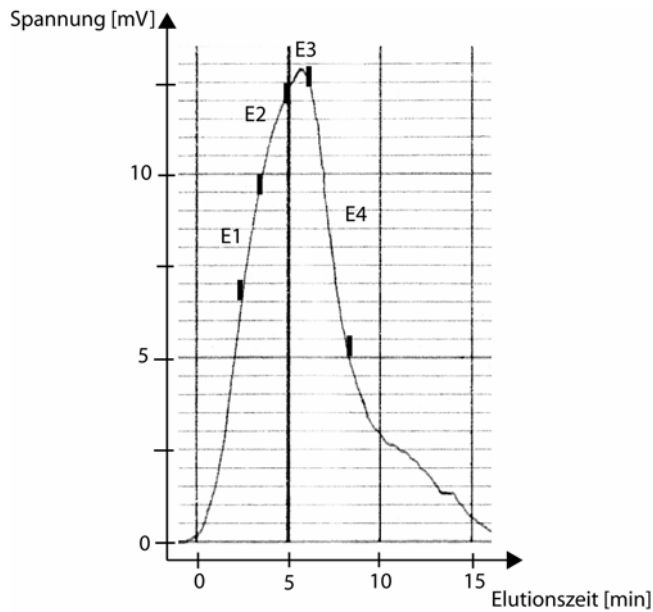
#### 3.1.2.1. Chromatogramme

Die folgenden Abb. 3.4, Abb. 3.5 und Abb. 3.6 stellen die während der Elution aufgezeichneten Chromatogramme der WAX9D-, WAX9E- und X33-Proben dar, deren Frostschutzaktivitätsmessungen in den Abb. 3.8 dargestellt wurden. Weitere Elutionschromatogramme wurden in dieser Arbeit nicht gezeigt, da andere Aufzeichnungen nach einem ähnlichen Muster abliefen.



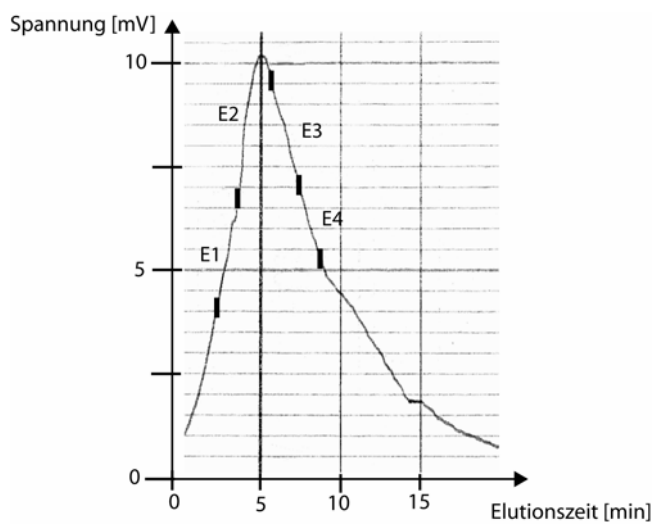
**Abb. 3.4: Elutionschromatogramm der Probe WAX9D**

Jeweils wurde pro Fraktion 1 mL Eluat gesammelt. Der Schreiber hatte eine Geschwindigkeit von  $2 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$  und die Elutionsdurchflußrate betrug ca.  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Da die Durchflußrate nicht konstant blieb, wurde die x-Achse mit der Einheit Elutionszeit (in Minuten) anstatt Elutionsvolumen skaliert. Es wurde mit einem Gradientenvolumen von 40 mL eluiert. Die Verschiedenen Elutionsfraktionen wurden E1, E2, E3, E4 und E5 genannt und sind mit schwarzen Markierungen von einander getrennt.



**Abb. 3.5: Elutionschromatogramm der Probe WAX9E**

Jeweils wurde pro Fraktion 1 mL Eluat gesammelt. Der Schreiber hatte eine Geschwindigkeit von  $2 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$  und die Elutionsdurchflußrate betrug ca.  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Da die Durchflußrate nicht konstant blieb, wurde die x-Achse der folgenden Abbildungen mit der Einheit Elutionszeit (in Minuten) skaliert. Es wurde mit einem Gradientenvolumen von 40 mL eluiert. Die Verschiedenen Elutionsfraktionen wurden E1, E2, E3 und E4 genannt und sind mit schwarzen Markierungen von einander getrennt.



**Abb. 3.6: Elutionschromatogramm der Kontrollprobe X33**

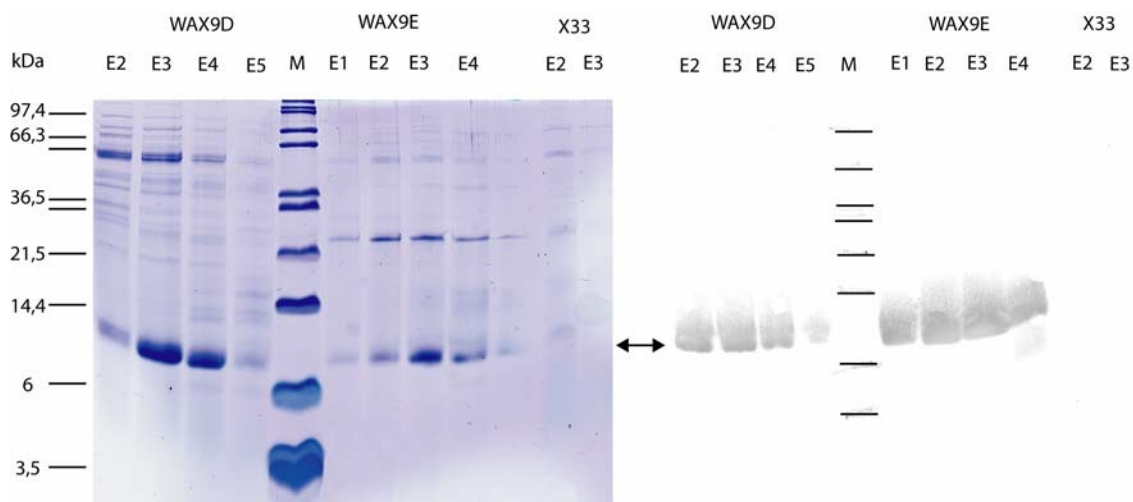
Unter den in Abb. 3.5 vorgestellten Bedingungen wurden die Fraktionen der Kontrollprobe X33 gesammelt.

Die Kontrollprobe X33 wurde mit den gleichen Protokollen wie die WAX9-Proteinproben behandelt. Sie stellt den Proteinhintergrund der Hefesuspension dar und besteht sowohl aus nativen Hefe- als auch aus Mediumproteinen. Das Chromatogramm (Abb. 3.6) der Kontrollprobe ohne WAX9-Proteine weist einem Maximalabsorptionspunkt bei 10,3 mV auf, während die anderen Chromatogramme der WAX9-Proteinproben (Abb. 3.4 und Abb. 3.5) Maximalabsorptionspunkte bei 16,5 mV (für WAX9D) und 12,8 mV (für WAX9E) zeigen. Die Kontrollprobe X33, mit einem Maximalabsorptionspunkt bei 10,3 mV zeigt eine höhere Proteinkonzentration als erwartet.

Die Proteinzusammensetzung der gesammelten Fraktionen wurde mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassiefärbung geprüft.

### 3.1.2.2. SDS-Proteingelelektrophorese

Die Abb. 3.7 stellt die Auftrennung im Coomassie Blue gefärbten SDS-Proteingel der aufgenommenen Fraktionen dar, deren Elutionschromatogramme in den Abb. 3.4, Abb. 3.5 und Abb. 3.6 dargestellt sind.



**Abb. 3.7: Coomassie gefärbtes Polyacrylamid-Gel und Westernanalyse**

Vier Elutionsfraktionen der Proben WAX9D, WAX9E und zwei der Kontrollproben X33 wurden aufgetrennt. In der Reihenfolge von links nach recht: E2 bis E5: Elutionsfraktionen der Probe WAX9D, Marker, E1 bis E4: Elutionsfraktionen der Probe WAX9E, E2 und E3: Elutionsfraktionen der Probe X33. Die Proben setzten sich aus 100  $\mu$ l Eluat und 50  $\mu$ l Probenpuffer zusammen. Es wurde 18  $\mu$ l Probe pro Geltasche aufgetragen. Die Auftrennung bei 150 V dauerte ca. 1 Stunde.

Die Elutionsfraktionen der Probe WAX9D sowie der Probe WAX9E zeigen eine kräftig gefärbte Bande jeweils zwischen den 6- und 14 kDa-Markerbanden, die der Größe der WAX9-Proteine entspricht, wobei die stärkste Färbung bei den Fraktionen E3 und E4 vorkommt. Die Fraktionen der X33-Proben weisen weder gefärbte Banden auf dem Gel noch auf der Membran auf.

### 3.1.2.3. Westernanalyse

Die Abbildung 3.7 zeigt neben dem Proteingel eine Nitrocellulose-Membran nach Immunodetektion. Auf dieser Membrane wurden zuvor die gleichen Proben mit derselben Reihenfolge wie auf dem abgebildeten Proteingel transferiert. Die kräftige Farbentwicklung war entscheidend für die Auswahl der Testfraktionen. Folgende Fraktionen wurden für die Tests in Betracht genommen: Die Fraktionen E3 und E4 der Probe WAX9D und der Probe WAX9E. Die Fraktionen E2 und E3 der Kontrollprobe X33 weisen keine Farbentwicklung auf. Die Fraktion E2 der X33-Probe wurde als Kontrolle parallel getestet, da sie der Elutionspeakfraktion der WAX9-Proben entspricht. (Siehe Abb. 3.4, Abb. 3.5 und Abb. 3.6).

### 3.1.2.4. Proteinkonzentrationsbestimmung

#### 3.1.2.4.1. Proteinkonzentrationsbestimmung mit der UV-Detektionsäquivalenzmethode

Die Proteinkonzentrationen der frostschutzgetesteten Fraktionsproben, die mit Hilfe der UV-Detektionsäquivalenzmethode (siehe 2.2.4.1.3, Seite 12) ermittelt wurden, sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

**Tab. 3.1: Proteinkonzentrationsäquivalente der frostschutzgetesteten Eluatfraktionen**

Proben		Abgelesene mittlere Spannung (mV)	RSA*-Äquivalenz Konzentration ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
<b>Kontrolle X33</b>	Fraktion E3	8,3	681
<b>WAX9D</b>	Fraktion E3	15,3	1258
	Fraktion E4	13	1073
<b>WAX9E</b>	Fraktion E2	11	908
	Fraktion E3	12,5	1031
	Fraktion E4	9	743

\*RSA: Rinderserumalbumin, Fraktion V von der Firma Roth

#### 3.1.2.4.2. Vergleich der Proteinbestimmungsmethoden: Rinderserumalbuminsäquivalenzmethode und NanoOrange® Fluoreszenzmethode

Um die UV-Detektionsäquivalenzmethode zu überprüfen wurde Proteinkonzentrationen von den Fraktionen zusätzlich mit der NanoOrange-Methode (siehe 2.2.4.1.2, Seite 11) gemessen. Die Tab. 3.2 stellt die Werte der zwei verwendeten Methoden gegenüber.



Tab. 3.2: Vergleich von Proteinkonzentrationen

Proben	Abgelesene mittlere Spannung (mV)	RSA*-Äquivalenz Konzentration ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	Konzentration (NanoOrange-Methode) ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
<b>Kontrolle X33</b>			
Fraktion E4	8	660	650
<b>WAX9D</b>			
Fraktion E2	12,5	1031	950
Fraktion E3	10,5	866	720
<b>WAX9E</b>			
Fraktion E3	32	1320	1200
Fraktion E4	25	1031,3	920

\*RSA: Rinderserumalbumin, Fraktion V von der Firma Roth

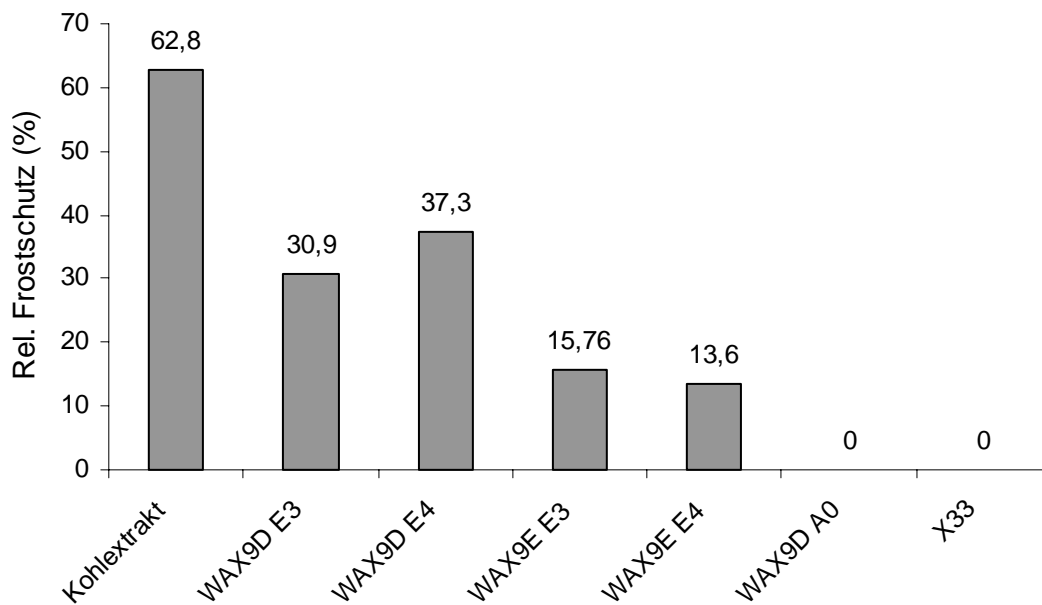
Die hier aufgeführten Proben wurden mit der Lipidtransfermethode getestet. Mit der NanoOrange-Methode wurden für alle Proben geringere Proteinkonzentrationen ermittelt. Verglichen mit der Fluoreszenzmethode (NanoOrange) liegt die Proteinkonzentration der Fraktion E3 der WAX9D-Probe ca. 20 % über der ermittelten Konzentration auf Basis der Äquivalenzmethode. Insgesamt blieben die Unterschiede zwischen den mit den zwei Methoden bestimmten Konzentrationen jedoch gering. Für die anderen Proteinkonzentrationen waren erhöhte Werte von 1,5 % für die Fraktion X33-E4 bis zu 12 % für die WAX9E-E4-Fraktion. Die angegebenen Proteinkonzentrationen in den folgenden Abbildungen wurden nach der Äquivalenzmethode berechnet.

### 3.2. Frostschutztest

Der Frostschutztest wurde bei den Proben WAX9D, WAX9E sowie bei der Kontrollprobe X33 durchgeführt, deren Elutionschromatogramme in den Abb. 3.4, Abb. 3.5 und Abb. 3.6 dargestellt wurden. Ein Paralleltest mit Kohlextrakt als Positivkontrolle wurde bei allen Tests durchgeführt. Die X33-Probe stellte die Negativkontrolle dar.

#### 3.2.1. Frostschutzaktivität bei WAX9D und WAX9E

Die Abb. 3.8 zeigt die Aktivitätswerte der WAX9-Proben, des Kohlextrakts und die der Negativkontrolle X33. Die Aktivität einer Waschfraktion A0 wurde auch getestet. Diese Fraktion wurde bei dem Auftragen der Probe auf dem Kationenaustauscher gesammelt. Sie enthält Proteine, die keine Bindungsaffinität zu der Säulenmatrix aufwiesen und die mit dem Waschpuffer ausgewaschen werden.



**Abb. 3.8: Frostschutzaktivität der WAX9D-, WAX9E- und X33-Fractionen**

Der Test wurde wie im Abschnitt 2.2.7 (Seite 20) beschrieben durchgeführt. Es wurde parallel eine Positivkontrolle (Kohlextrakt), eine Negativkontrolle (X33) und eine Kontrollprobe mit der Waschfraktion A0 getestet.

Weder die Negativkontrolle X33-Probe noch die Waschfraktion A0 weisen eine Frostschutzaktivität auf. Dies zeigt, dass native Hefeproteine keine kryoprotektive Wirkung besitzen und dass die Waschfraktion A0 keine aktiven Proteine enthält. Dieses Ergebnis stimmt mit der Abb. 3.7 des Coomassie gefärbten Polyacrylamid-Gels und der Westernanalyse überein. Mit einer Aktivität von 30,9 % und 37,3 % zeigen die Eluatsfraktionen E3 und E4 der WAX9D-Probe eine kryoprotektive Wirkung. Die Fraktionen der WAX9E-Proben haben mit 15,76 % und 13,6 % eine geringere aber noch messbare Frostschutzwirkung.

Um Proben zu vergleichen wurden unter der Annahme, dass sich die Frostschutzaktivität linear zu der Proteinkonzentration verhält (Hincha et al. 1992a) die spezifischen Frostschutzaktivitäten pro mg Proteinäquivalent berechnet.

### 3.2.2. Spezifische Frostschutzaktivitäten

Die Tab. 3.3 stellt die Werte der absoluten spezifischen Frostschutzaktivitäten der WAX9-Proteinfractionen in % / (mg · mL<sup>-1</sup>) Rinderserumalbumin-Konzentrationsäquivalenz sowie die theoretischen Proteinkonzentrationen, die 100 % Frostschutz gewährleisten dar.

Tab. 3.3: Spezifische Frostschutzaktivitäten der WAX9-Fractionen

Proben	Konzentrations- Äquivalenz ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) / Ansatz	% Frostschutz / Ansatz	% Frostschutz / ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	Proteinkonz. ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) / 100 % Frostschutz
<b>Kohlextrakt</b>	230	62,8	273	0,37
<b>WAX9D</b>				
Fraktion E3	629	30,9	49	2,04
Fraktion E4	536	37,3	70	1,44
<b>WAX9E</b>				
Fraktion E3	516	15,76	30	3,28
Fraktion E4	372	13,6	37	2,74

Die Proteinkonzentrationen der WAX9-Proben wurden mit Hilfe der RSA-Äquivalenzmethode ermittelt (Tab. 3.1, Seite 32). Die Proteinkonzentration des Kohlextrakts wurde mit Hilfe der Bradford-Methode bestimmt. Die Versuchansätze bestehen aus 100  $\mu\text{L}$  Thylakoidsuspension und 100  $\mu\text{L}$  Proteinlösung, so dass die Proteinkonzentrationen halbiert werden. Die 1. Spalte stellt diese Proteinkonzentrationen in den Versuchansätzen und die 2. Spalte die gemessenen Aktivitäten dar. Es wurde Frostschutzaktivitätswerte pro  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  Protein berechnet (Spalte 3) und die Proteinkonzentrationen, die 100 % Frostschutzaktivität ermöglichen ermittelt (Spalte 4).

Der Kohlextrakt zeigt mit einer Proteinkonzentration von  $0,37 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , die 100 % Frostschutz gewährleistet, die höchste Aktivität. Die Elutionsfraktion WAX9D-E4 stellt mit  $1,44 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  Protein 100 % Frostschutz die höchste Aktivität der überexprimierten Proteine.

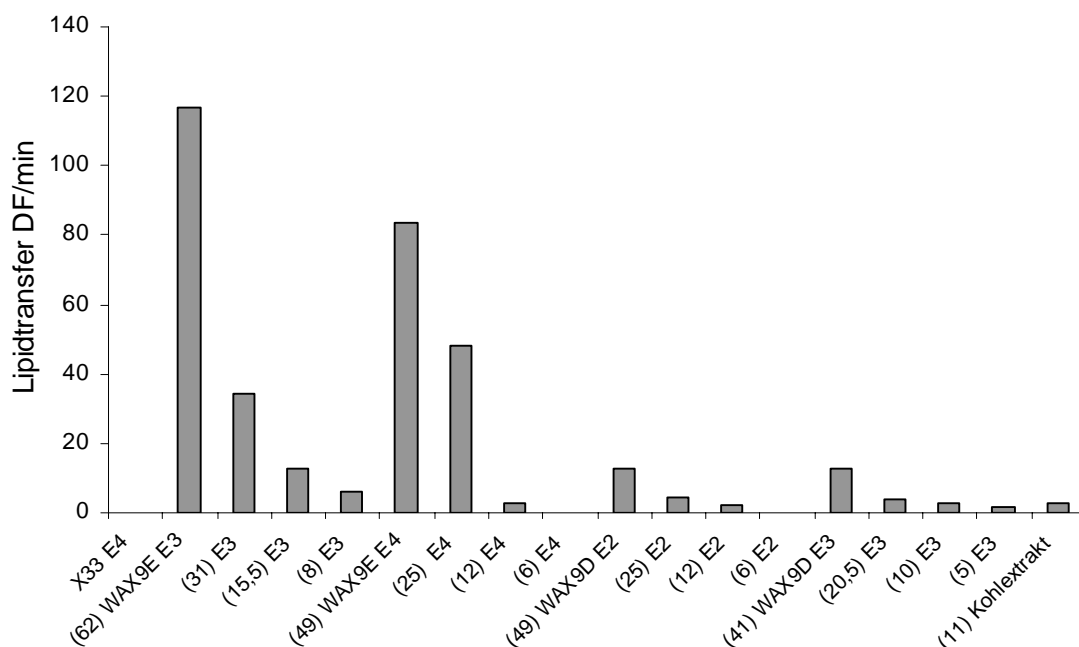
Sieg et al. (1996) konnte zeigen, dass der Kohlextrakt eine spezifische Frostschutzaktivität von 17,5 % und die aufgearbeitete Fraktion nach Reversed-Phase-Chromatographie eine Aktivität von 372 % / mg Protein aufwies. In dieser Arbeit wurde eine spezifische Frostschutzaktivität von der Kohlextraktprobe von 273 % / mg Protein gemessen. Diese kleinere gemessene Aktivität könnte auf die Aufarbeitung und Isolierung des Kohlextrakts zurück zu führen sein. Die Erfahrung zeigte, dass die Frostschutzaktivität von einem Kohlextrakt zu einem anderen stark variieren kann. In dieser Arbeit wurde daher mit ein und demselben Kohlextrakt gearbeitet. Die Experimente *in vitro* mit den WAX9-Proteinen zeigten zwar mit einem Wert von 70 % für WAX9D und 37 % für WAX9E pro mg Protein eine kryoprotektive Wirkung, doch war diese Wirkung geringer als die der Kohlextraktproteine (273 % / mg Proteine).

Schilling (2003) zeigte ebenfalls kryoprotektive Effekte bei den in *E. coli* exprimierten WAX9D-Proteine, wobei die Frostschutzaktivität mit einem gemessenen Wert von 57,0 % / 15  $\mu\text{g}$  Protein (umgerechnet: 3800 % / mg Protein) viel ausgeprägter war, als die in der vorliegenden Arbeit behandelten Proteine. Bei der WAX9E-Probe konnte Schilling keinen kryoprotektive Effekt messen, was mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen nicht übereinstimmt. Mit einer maximal gemessenen spezifischen Frostschutzaktivität von 37 % / mg

Protein zeigten hier WAX9E-Proteine einen kryoprotektiven Effekt auf isolierten Thylakoidmembranen. Dies entspricht etwa 50 % der Frostschutzaktivität der WAX9D-Proteine.

### 3.3. Lipidtransferaktivität

Die nachfolgenden Lipidtransferergebnisse wurden mit Elutionsfraktionen aus anderen Überexpressionschargen gewonnen, und sind somit unabhängig von den zuvor vorgestellten Ergebnissen der Frostschutztests. Die Proteinkonzentrationen der getesteten Elutionsfraktionen sind in der Tab. 3.2 (Seite 33) aufgeführt. Die Lipidtransferaktivitätswerte der WAX9D- und WAX9E-Proben sind in der Abb. 3.9 dargestellt. Dabei sind mehrere Fraktionen und mehrere Verdünnungen getestet worden. Der Kohlextrakt wurde auch auf Lipidtransferaktivität getestet.



**Abb. 3.9: Lipidtransferaktivität von WAX9-Fraktionen**

Die Fraktionen E3 und E4 der WAX9E-Probe und die Fraktionen E2 und E3 der WAX9D-Probe wurden jeweils unverdünnt und mit Testpuffer verdünnt getestet. Die Zahlen in Klammer geben die Proteinkonzentrationen in  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  der Ansätze wieder. X33-E4 stellt die Proteinextraktkontrollprobe dar. Ein Kohlextrakt wurde parallel getestet.

Die unverdünnten WAX9E-Fraktionen weisen die höchsten Lipidtransferwerte mit jeweils 116,8 und 83,5  $\Delta\text{F} \cdot \text{min}^{-1}$  für die Fraktionen E3 und E4 auf. Die Fraktionen E2 und E3 der WAX9D-Proben haben eine Aktivität von 13 und 12,5  $\Delta\text{F} \cdot \text{min}^{-1}$ . Mit zunehmender Verdün-

nung nehmen die Messwerte ab. Der Kohleextrakt weist mit einer Aktivität von  $2,8 \Delta F \cdot \text{min}^{-1}$  eine minimale Aktivität auf, die geringer als die der WAX9D-Proben ist. Die Kontrollprobe X33 wies keine Lipidtransferaktivität auf. Die Abwesenheit der Aktivität in dieser Fraktion zeigt, dass weder native Hefeproteine noch Proteine aus dem Kulturmedium die Messungen der WAX9-Proteinfraktionen stören bzw. verfälschen.

Um die Lipidtransferwirkung der jeweiligen Proben zu vergleichen wurden aus den in Abb. 3.9 dargestellten Messungen spezifischen Aktivitäten / mg Protein berechnet.

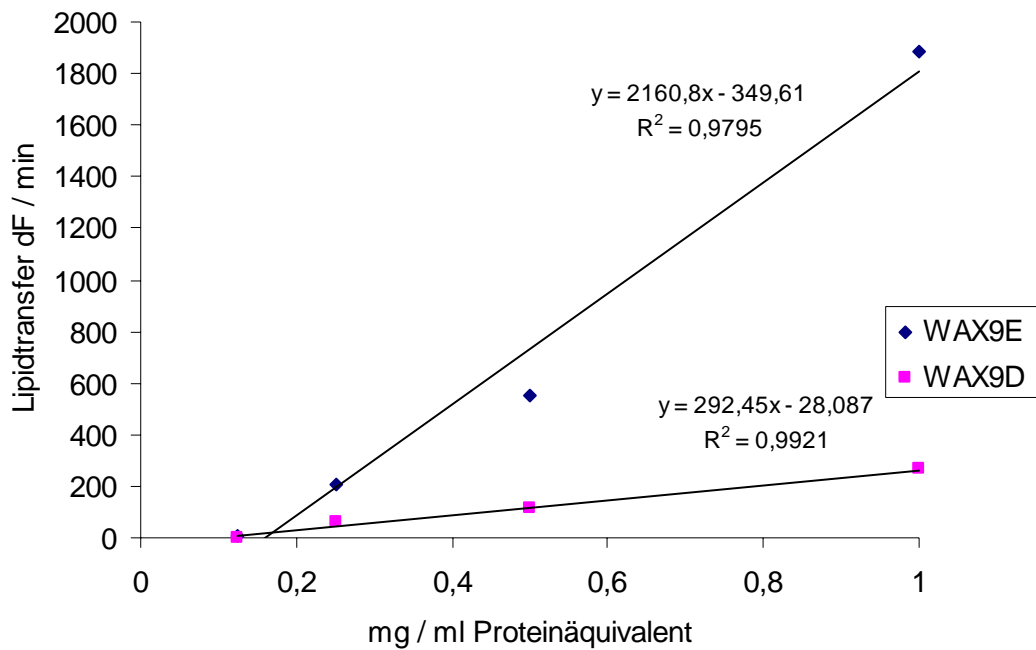
**Tab. 3.4: Spezifische Lipidtransferaktivitäten der WAX9-Fractionen**

Proben	Konzentrations- Äquivalenz ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) / Ansatz	Lipidtransfer ( $\Delta F \cdot \text{min}^{-1}$ ) / Ansatz	Lipidtransfer ( $\Delta F \cdot \text{min}^{-1}$ ) / mg Protein
<b>Kohleextrakt</b>	11	2,8	255
<b>WAX9D</b>			
Fraktion E2	49	13	265
Fraktion E3	41	12,5	305
<b>WAX9E</b>			
Fraktion E3	62	116,8	1884
Fraktion E4	49	83,5	1704

Die Proteinkonzentrationen der WAX9-Proben wurden mit Hilfe der RSA-Äquivalenzmethode ermittelt. (Tab. 3.1, Seite 32). Die Proteinkonzentration des Kohleextrakts wurde mit Hilfe der Bradford-Methode bestimmt. Die Ansätze bestehen jeweils aus 2 ml TES-Puffer, 10  $\mu\text{L}$  Akzeptorvesikel, 10  $\mu\text{L}$  Donorvesikel und 100  $\mu\text{L}$  Proteinlösung. Mit diesem Verdünnungsverhältnis wurden die Aktivitäten / mg Protein berechnet (Spalte 3).

Aufgetrennte WAX9D-Proteine zeigte mit  $305 \Delta F \cdot \text{min}^{-1} / \text{mg Protein}$  eine sehr nahe Aktivität zu der von dem isolierten Cryoprotectin aus dem Kohleextrakt ( $255 \Delta F \cdot \text{min}^{-1} / \text{mg Protein}$ ). Schilling (2003) zeigte für die in *E. coli* überexprimierten WAX9D-Proteine eine ähnliche Lipidtransferaktivität von  $4 \Delta F \cdot \text{min}^{-1} / 15 \mu\text{g Protein}$ , was umgerechnet einer Aktivität von  $267 \Delta F \cdot \text{min}^{-1} / \text{mg Protein}$  entspricht. Mit einer spezifischen Aktivität der WAX9E-Proteine von  $1884 \Delta F \cdot \text{min}^{-1} / \text{mg Protein}$  wurde eine Aktivität gemessen, die um 35 % unter dem Ergebnis von Schilling (Aktivität von  $2933 \Delta F \cdot \text{min}^{-1}$ ) lag. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen eine Lipidtransferaktivität bei WAX9E, die 6mal höher als bei WAX9D ist. Die Ergebnisse von Schilling wiesen einen Unterschiedsfaktor von 11 auf.

Aus den Daten, die in Abb. 3.9 gezeigt wurden, wurde die Abb. 3.10 zusammengestellt. Die Abb. 3.10 stellt die Beziehung zwischen Aktivitäten und Proteinkonzentrationen der WAX9D- und WAX9E-Proben dar.



**Abb. 3.10: Lipidtransferaktivität der WAX9E- und WAX9D-Proben in Abhängigkeit der Proteinkonzentration**

Die Verdünnungsreihen wurden mit Testpuffer erstellt. Die Proteinkonzentrationen wurden mit der RSA-Äquivalenzmethode ermittelt.

Sowohl die WAX9E-Probe als auch WAX9D-Probe zeigen eine lineare Beziehung (jeweils  $R^2 = 0,9795$  und  $0,9921$ ) zwischen den Proteinkonzentrationen und den gemessenen Lipidtransferaktivitäten. Dabei ist der Konzentrationseffekt bei WAX9E stärker ausgeprägt als bei WAX9D (stärkere Steigung  $a$ ). Während bei einer Proteinkonzentration von  $0,125 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  WAX9E-Proteine eine geringe Aktivität von  $6 \Delta F \cdot \text{min}^{-1}$  aufwiesen, wurde bei der WAX9D-Probe keine Aktivität gemessen. In beiden Fällen ist eine minimale Proteinkonzentration erforderlich um eine Transferaktivität messen zu können.

### 3.4. Beziehungen zwischen der Frostschutz- und der Lipidtransferaktivität

Da von Tag zu Tag unterschiedliche Frostschutz- und Lipidtransferaktivitäten gemessen wurden, wurden Daten von jeweils 10 Experimenten genommen und die Mittelwerte und Standardabweichungen, die in der Tab. 3.5 wiedergegeben sind, berechnet.

**Tab. 3.5: Beziehungen zwischen spezifischen LTP- und Frostschutzaktivitäten**

	LTP-Aktivität ( $\Delta F \cdot \text{min}^{-1}$ ) / ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	% Frostschutz / ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	Quotient LTP / FST
<b>WAX9D</b>	288 ± 22	62 ± 26	4,7 ± 0,8
<b>WAX9E</b>	1800 ± 185	35 ± 11	51,4 ± 16,8
<b>Kohlextrakt</b>	263 ± 16	273 ± 13	0,96 ± 1,2

LTP: Lipidtransferaktivität

FST: Frostschutzaktivität

Anhand diesen Daten werden die Lipidtransfer / Frostschutz-Verhältnisse deutlicher. WAX9E-Proteine zeigen mit einem LTP/FST-Quotient von 51,4 eine stark ausgeprägte Lipidtransferaktivität im Vergleich zu der Frostschutzwirkung.

Sowohl WAX9D als auch der Kohlextrakt (Cryoprotectin) weisen geringe Quotienten auf, was auf eine geringere Ausprägung der Lipidtransferaktivität im Vergleich zu der Frostschutzaktivität hinweist. Mit einem LTP/FST-Quotient von 4,7 zeigt der WAX9D eine deutlich höhere Lipidtransferaktivität als das aus dem Kohlextrakt Cryoprotectin. Damit ordnet sich WAX9D zwischen dem typischen Lipidtransferprotein WAX9E und dem *in vitro* frostschutzgewährleistenden Cryoprotectin ein.

## 4. Diskussion

### 4.1. Cryoprotectin und WAX9D

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das in *Pichia pastoris* überexprimiert WAX9D-Protein mit einem Wert von 70 % / (mg · mL<sup>-1</sup>) einen kryoprotektiven Effekt *in vitro* aufweist und mit einer Aktivität von 305 ΔF · min<sup>-1</sup> / (mg · mL<sup>-1</sup>) zum leichten Lipidtransfer fähig ist. Parallel dazu wies das aus dem Kohl isolierte und grob gereinigte Cryoprotectin eine ähnlich schwach messbare Lipidtransferaktivität von 255 (ΔF · min<sup>-1</sup>) / mg auf, jedoch eine viel höhere Frostschutzaktivität von 273 % / (mg · mL<sup>-1</sup>). Diese gemessene Kryoprotektion stimmt mit den von Sieg et al. (1996) veröffentlichten Ergebnissen (siehe Tab. 4.1) überein, dennoch fällt auf, dass das Cryoprotectin eine weit höhere Frostschutzaktivität aufwies als das in *Pichia pastoris* überexprimierte und gereinigte WAX9D-Protein. Dieses Ergebnis kommt überraschend vor, da Schilling (2003) bei dem in *E. coli* exprimierten WAX9D-Protein eine Frostschutzaktivität von 3800 % / (mg · mL<sup>-1</sup>) ermitteln konnte und infolgedessen charakterisierte sie WAX9D als kryoprotektive Protein.

Zusätzlich ist zu beachten, dass die Kryotoxizität der verschiedenen Stoffe in Versuchansätzen die Frostschutzaktivität von den untersuchten Proteinen kaschieren und die Ergebnisse auf diese Weise verfälschen könnte. Dies kann z. B. der Fall sein bei den Kulturmedien- oder Hefezellenproteinen. Es wurde zwar in dieser Arbeit keine Volumenreduktion der Thylakoidsansätze mit dem Kontrollansatz X33 bei einer Inkubation bei 0°C (Daten nicht gezeigt) beobachtet, doch könnte die Kryotoxizität erst bei einer anderen Proteinzusammensetzung der Experimentansätze auftreten (z. B. bei verschiedenen Überexpressionschargen mit mehr oder weniger überexprimierten Proteinen). Weitere Reinigungsschritte der Eluatsfraktionen könnten den Anteil an fremden Proteinen reduzieren.

Die *in vitro* Frostschutzversuche wurden bisher mit einzelnen überexprimierten Proteintypen durchgeführt, so dass keine Daten über mögliche synergetische Effekte vorliegen. Um Frostschutzeffekte, die möglicherweise durch WAX9-Interaktionen hervorgerufen werden, zu erfassen, würde ich Versuche mit WAX9-Proteinen-Mischungen vornehmen. Die Auswahl der Mischungskombinationen könnte anhand der bisher bekannten Ergebnisse getroffen werden.

### 4.2. Frostschutzaktivität von WAX9D, WAX9E und anderen kryoprotektiven Proteinen

Als Bestandteil des Cryoprotectins (Hincha et al. 2001) zeigte WAX9D hier eine geringere Frostschutzaktivität, die vergleichbar ist mit der gemessenen 67 % / (mg · mL<sup>-1</sup>) Aktivität der β-1,3-Glucanase aus Tabakpflanzen (Hincha et al. 1997a). Lektine zeigen mit 100 % / (mg · mL<sup>-1</sup>) Mistelextrakt oder 250 % / (mg · mL<sup>-1</sup>) Samenproteinextrakt aus der Paternoster-



erbse (*Abrus precatorius*) auch höhere Aktivitätswerte als das schon genannte WAX9D (siehe Tab. 4.1). Das in der vorliegenden Arbeit überexprimierte und getestete WAX9E hatte mit 37 % / (mg · mL<sup>-1</sup>) einen leichten messbaren Frostschutzeffekt. Dagegen zeigte Schilling (2003), dass WAX9E in *E. coli* überexprimiert keine Aktivität aufwies. Dies könnte auf die getesteten Proteinkonzentrationen zurück zu führen sein, da in dieser Arbeit mit höheren Proteinkonzentrationen Aktivitätsmessungen durchgeführt worden sind.

**Tab. 4.1: Frostschutzaktivitäten von verschiedenen Molekülen**

Frostschutz / (mg · mL <sup>-1</sup> )	WAX9D	WAX9E	Cryoprotectin	Lektine	β-1,3-Glucanase
<b>Vorliegende Arbeit</b>	70 %	37 %	273 %		
<b>Schilling 2003</b>	3800 %	0 %			
<b>Sieg et al. 1996</b>			375 %		
<b>Hincha et Schmitt 1992a</b>			140 %		
<b>Hincha et al. 1993*</b>				250 %	
<b>Hincha et al. 1997b*</b>				100 %	
<b>Hincha et al. 1997a</b>					67 %

\*: Es wurde mit Lektinen aus Blätter von *Viscum album* (Hincha et al. 1997b) bzw. aus Samen von *Abrus precatorius* (Hincha et al. 1993) gearbeitet. Der Verlust während dem Gefrier-Tau-Zyklus von dem löslichen Plastocyanin wurde als Maß für die Kryotoxizität verwendet. Der Verlust an Plastocyanin verhält sich umgekehrt proportional zu dem Erhalt des Thylakoidmembranvolumens (Hincha and Schmitt 1992a). Infolgedessen wurde hier die Frostschutzaktivität mit der Beziehung 100 – Kryotoxizität % = Frostschutzaktivität in % grob abgeschätzt und ermittelt. Mit der Annahme, dass sich die Frostschutzaktivität linear zu der Stoffkonzentration verhält, wurden die hier angegebenen Werte aus den gemessenen Aktivitäten extrapoliert.

### 4.3. Lipidtransferaktivitäten von WAX9D- und WAX9E-Proteinen

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Lipidtransferaktivitätsmessungen von WAX9E-Protein stimmen mit den Ergebnissen von Schilling (2003) überein (siehe Tab. 4.1). WAX9E-Protein in *E. coli* oder *Pichia pastoris* überexprimiert besitzt deutlich das Charakteristikum eines Lipidtransferproteins.

WAX9D-Proteine, die in *Pichia pastoris* exprimiert worden sind, zeigten eine messbare Lipidtransferaktivität. Schilling (2003) zeigte aber in ihrer Arbeit, dass WAX9D-Proteine keine Lipidtransferaktivität besitzen, was die bisher veröffentlichte Ergebnisse bestätigte (Hincha et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde WAX9D- und WAX9E-Proteinproben mit unterschiedlichen Konzentrationen getestet als in der Vergangenheit vorgenommenen Versuchen.

Dies könnte die vorliegenden Ergebnisse erklären, da der Lipidtransfereffekt erst bei einer minimalen Proteinkonzentration messbar wird (siehe Abb. 3.10, Seite 38).

#### 4.4. Vergleich von WAX9D- und WAX9E-Proteinen

WAX9D- und WAX9E-Proteine haben im Rahmen dieser Arbeit sowohl Lipidtransfer- als auch Frostschutzaktivität gezeigt: WAX9E verhielt sich wie ein typisches LTP und WAX9D zeigte als Bestandteil des Cryoprotectins viel weniger Frostschutzaktivität als das Cryoprotectin selbst. Die Analyse der Aminosäuresequenzen (siehe Abb. 4.1) zeigt neben den stark konservierten Merkmalen der Lipidtransferproteine wie z. B. die 8 Cysteine oder die Aminosäure Tyrosin auf Position 17 (Kader 1996) einen Unterschied in der Zusammensetzung von 30 Aminosäuren. Die Unterschiede sind zu zahlreich um Aussagen zu treffen. Erst nach gezielten Mutagenesenarbeiten (z. B. der gegenseitige Tausch des 50-Aminosäure langen vorderen Stücks zwischen WAX9D und WAX9E) könnte unterschiedliches Verhalten bei den Experimenten hervorrufen und Hinweise auf die Beziehung Aminosäure / Funktion verraten.

```

WAX9E      ALTCGTVNSNVAPCIGYITQGGP-LPRACCTGVSK
WAX9D      ..S....SGY.....LA.NA.AV.T...S...TS

WAX9E      LNSMARTTPDRQQACRCLKTAASALGPNLNAGRAAGIPKACGVSVPFPPISTNT---NCNNVK
WAX9D      ..N.....VG..N...TL.VA....L.....NL.YK..KT.....S..

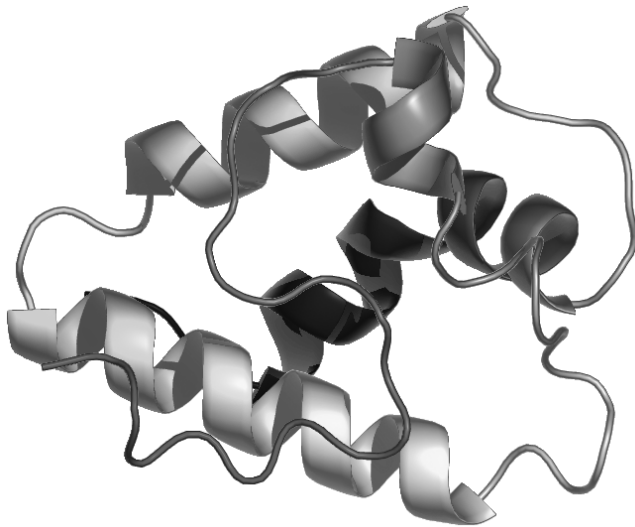
```

**Abb. 4.1: Aminosäuresequenzen von WAX9D und WAX9E-Proteinen ohne Transitsequenz**

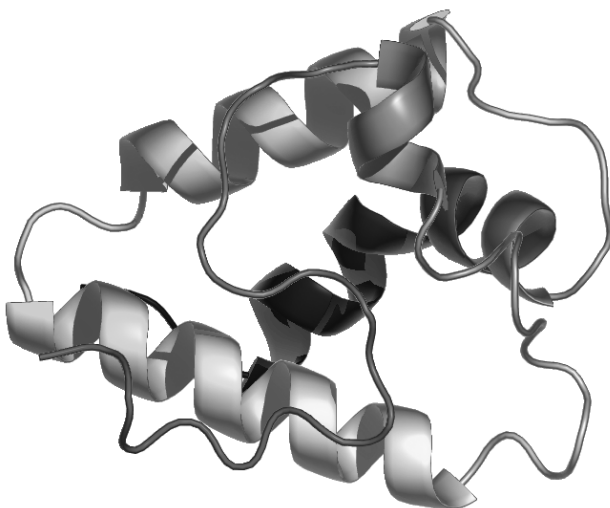
(Hincha et al. (2001) für WAX9E, Pyee and Kolattukudy (1995) für WAX9D)

Die Überprüfung des Moleküls WAX9D im Bezug auf dessen mögliche posttranslationale Modifikationen nach Überexpression in *Pichia pastoris* könnte helfen, das hier gezeigte abweichende Verhalten *in vitro* zu verstehen.

Der Vergleich von dreidimensionalen Modellen der WAX9D und WAXE-Molekülen liefert keinen Hinweis auf die unterschiedlichen Aktivitäten, da die Modelle identisch sind (Abb. 4.2 und Abb. 4.3). Genauere Rechnungen wären erforderlich um mögliche Unterschiede darzustellen. Dennoch könnten unterschiedlichen Aktivitäten auch aus anderen Gründen als aus den nicht darstellbaren tertiären Strukturdetails erklärt werden. Das Auftreten eines Hilfsfaktors um eine korrekte Faltung zu gewährleisten oder die Bindungsfähigkeit des WAX9D zu erhöhen könnte eine auch plausible Erklärung sein.



**Abb. 4.2: Modell von WAX9D**



**Abb. 4.3: Modell von WAX9E**

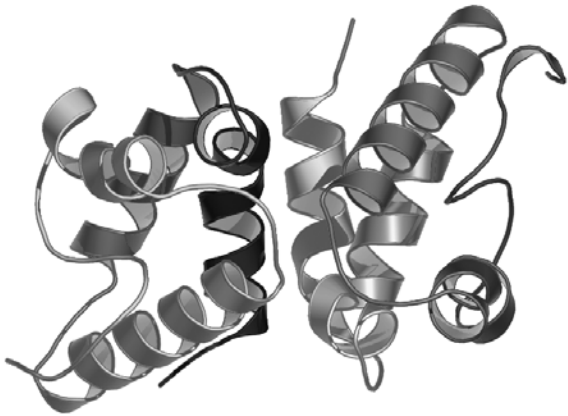
Die mit Computer gerechneten 3-Dimensionale Modelle von WAX9D und WAX9E wurden von Herrn Dr. F. de Lamotte (INRA, Montpellier / Frankreich) freundlicherweise gefertigt und zur Verfügung gestellt. Hierfür sei er herzlich bedankt.

Darüberhinaus spielen vermutlich Dimere für die Funktion der Moleküle und deren Kontrolle eine wichtige Rolle (pers. Mitteilung von de Lamotte).

Die Frostschutzwirkung des WAX9D könnte mit dem Auftreten Dimere verbunden sein. Hinch et al. (1989) konnte anhand eines apparenten Molekulargewichts von 28,5 kDa auf einer

Säule die Anwesenheit von einem Multimer bei einer Cryoprotectinsfraktion zeigen, was deren Frostschutzaktivität erklären könnte.

Die folgende Abbildung zeigt ein mit Computer gerechneten Dredimensionale-Model eines möglichen WAX9-Dimers.



**Abb. 4.4: Modell von einem WAX9D- Dimer**

(Mit Computer gerechneten 3-Dimensionale Modell von Herrn Dr. F. de Lamotte, INRA, Montpellier / Frankreich)

## 5. Zusammenfassung

Es wurden die Lipidtransferproteine der WAX9-Familie WAX9D und WAX9E in *Pichia pastoris* überexprimiert. Nach Optimierung der Proteinüberexpression wurden die WAX9D- und WAX9E-Proteine ausgefällt, so dass sie mehrere Wochen gelagert werden konnten und jederzeit für Experimente zur Verfügung standen. Nach Reinigung, Entsalzung und Auftrennung der ausgefallenen Proteine mit einem Kationenaustauscher wurden WAX9D- und WAX9E-Proteine auf ihre kryoprotektiven Effekt und Lipidtransfereigenschaften getestet. Im Rahmen dieser Arbeit verhielten sich die WAX9E-Proteine wie die von Schilling untersuchten WAX9E-Proteine (2003) und zeigten stark ausgeprägte Lipidtransferaktivitäten. Einen Frostschutzeffekt konnte für das erste Mal den WAX9E-Proteinen ebenfalls nachgewiesen werden. WAX9D-Proteine zeigten weniger Frostschutzaktivitäten als das aus Kohlblättern isolierte und grob gereinigte Cryoprotectin aber ähnliche Aktivitäten wie die Lektine aus *Viscum album* (Hincha et al. 1997b) oder die  $\beta$ -1,3-Glucanase aus Tabakpflanzen (Hincha et al. 1997a). Bei dem Lipidtransferexperiment wiesen WAX9D-Proteine auch messbare Aktivitäten auf, was bisher nicht gezeigt werden konnte. Das aus dem Kohl (*Brassica oleracea*) isolierte Cryoprotectin zeigte einen vergleichbar leichten Lipidtransfereffekt wie WAX9D. Die dreidimensionale Modellisierung von WAX9D und WAX9E zeigte keine Unterschiede und kann somit das unterschiedliche *in vitro* Verhalten nicht erklären.

## 6. Literaturverzeichnis

**Arnon D.J.** (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24: 1-15

**Bradford M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-54

**Coutos-Thevenot P., Jouenne T., Maes O., Guerbette F., Grosbois M., Le Caer J. P., Boulay M., Deloire A., Kader J. C., Guern J.** (1993) Four 9-kDa proteins excreted by somatic embryos of grapevine are isoforms of lipid-transfer proteins. Eur. J. Biochem. 217: 885-889

**Díaz-Perales A., Lombardero M., Sánchez-Monge, García-Selles F. J., Pernas M., Fernandez-rivas, Barber D., Salcedo G.** (2000) Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of Artemisia pollen, Castanea nut and rosaceae fruits, with different IgE-binding capacities. Clin. Exp. Allergy. 30: 1403-1410

**Douliet J-P., Pato C., Rabesona H., Mollé D., Marion D.** (2001) Disulfide bond assignment, lipid transfer activity and secondary structure of a 7-kDa plant lipid transfer, LTP2. Eur. J. Biochem. 268: 1400-1403

**Garcia-Olmedo F., Molina A., Segura A., Moreno M.** (1995) The defensive role of non-specific lipid-transfer proteins in plants. Trends in microbiology. 3: 72-74

**Geldwerth D., de Kermel A., Zachowski A., Guerbette F., Kader J. C., Henry J.P. and Devaux P.F.** (1991) Use of spin-labeled and fluorescent lipids to study the activity of the phospholipid transfer protein from maize seedling. Biochim. Biophys. Acta 1082: 222-264

**Han G.W., Lee. J. Y., Song H. K., Chang C., min K., Moon J., Shin D.H., Kopka M.L., Sawaya M.R., Yuan H.S., Kim T.D., Choe J., Lim D., Moon H. J., Suh S. W.** (2001) Structural basis of non-specific lipid binding in maize lipid-transfer protein complexes revealed by high-resolution X-ray crystallography. J Mol. Biol. 308: 263-278

**Heber U., Kempfle M.** (1970) Proteine als Schutzstoffe gegenüber dem Gefriertod der Zelle. Z. Naturforsch. 25b: 834-842

**Hincha D.K., Heber U., Schmitt J.M.** (1989) Freezing ruptures thylakoid membranes in leaves and ruptures can be in prevented in vitro by cryoprotective proteins. Plant biol. Chem. 27: 795-801

**Hincha D.K., Heber U., Schmitt J.M.** (1990) Proteins from frost-hardy leaves protect thylakoids against mechanical freeze-thaw damage *in vitro*. *Planta* 180: 416-419

**Hincha D.K. and Schmitt J.M.** (1992a) Cryoprotective leaf proteins: assay methods and heat stability. *J. Plant Physiol.* 140: 236-240

**Hincha D.K. and Schmitt J.M.** (1992b) Freeze-thaw injury and cryoprotection of thylakoid membranes. In: Somero G.N., Osmond C.B. and Bolis C.L. (ed) *Water and life*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 316-337

**Hincha D.K., Bakaltcheva I., Schmitt J.M.** (1993) Galactose-specific lectins protect isolated thylakoids against freeze-thaw damage. *Plant physiol.* 103: 59-65

**Hincha D.K., Sieg F., Bakaltcheva I., Köth H., Schmitt J.M.** (1996) Freeze-Thaw damage to thylakoid membranes: specific protection by sugars and proteins. In: *Advances in low-Temperatures Biology Vol. 3* Steponkus P.L. (ed.), JAI Press, London: 141-183

**Hincha D.K., Meins F. Jr., Schmitt J.M.** (1997a)  $\beta$ -1,3-Glucanase is cryoprotective *in vitro* and is accumulated in leaves during cold acclimation. *Plant Physiol.* 114: 1077-1083

**Hincha D.K., Pfüller U., Schmitt J.M.** (1997b) The concentration of cryoprotective lectins in mistletoe (*Viscum album* L.) leaves is correlated with leaf frost hardiness. *Planta* 203: 140-144

**Hincha D.K., Neumann Birgit, Srour Hany A.M., Sieg Frank, Weckwarth W., Rückels M., Lullien-Pellerin V., Schröder W., Schmitt J.M.** (2001) Cabbage cryoprotectin is a Member of the nonspecific Plant Lipid Transfer Gene Family. *Plant Physiol.* 125: 835-846

**Higgins R. D., Cregg J. M.** (ed.) (1998) *Pichia* protocols. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 103. Humana Press, Totowa New Jersey

**Kader J.C.** (1996) Lipid transfer Proteins in Plant. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant mol. Bio.* 47: 627-654

**Kader J.C.** (1997) Lipid-transfer proteins: a puzzling family of plant protein. *Trends in plant sciences.* 2: 66-70

**Pyee, J. and Kolattukudy, P.E.** (1995) The gene for the major cuticular wax-associated protein and three homologous genes from broccoli (*Brassica oleracea*) and their expression patterns. *Plant J.* 7(1): 49-59

**Schägger H., von Jagow G.** (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368-379

**Schilling S. M.** (2003) Klonierung, Expression und charakterisierung der Lipidtransferprotein-Genfamilie *wax9* aus *Brassica oleracea*. Diss., FB Biologie der FU Berlin

**Sieg F., Schroder W., Schmitt J.M., Hinch D.K.** (1996): Purification and characterization of a cryoprotective Protein (cryoprotectin) from the leaves of cold-acclimated cabbage. *Plant Physiol.* 111: 215-221

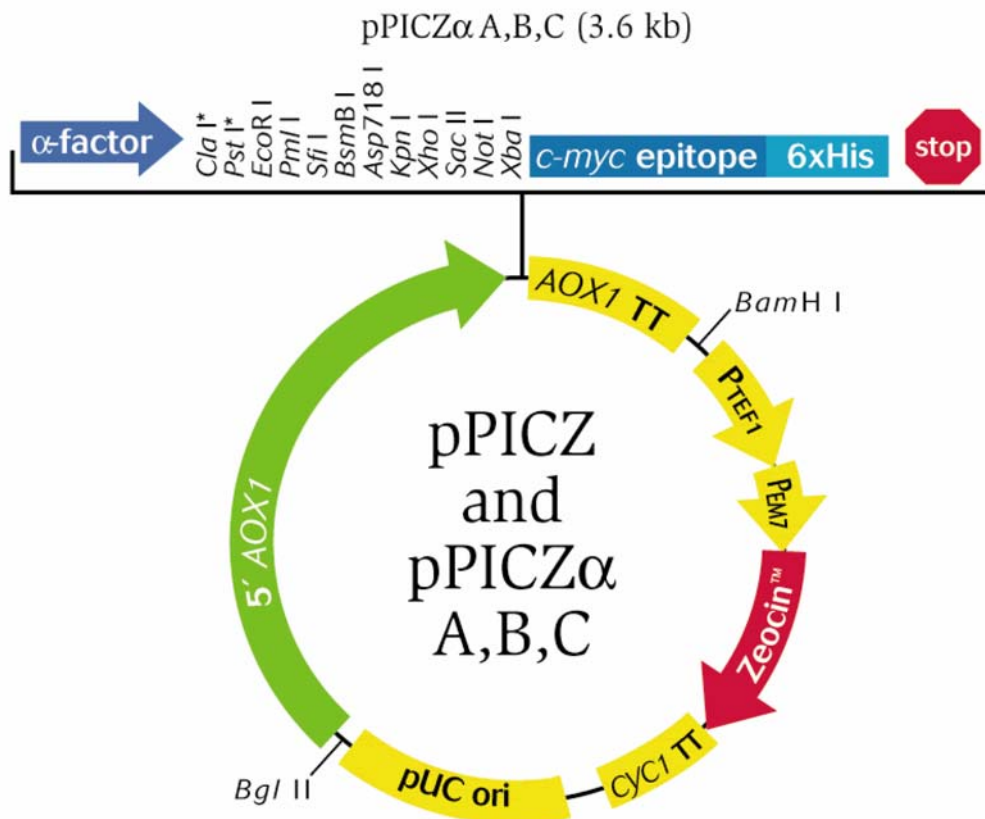
**Sror H. A. M., Tischendorf G., Sieg F., Schmitt J. M., Hinch D. K.** (2003) Cryoprotectin protects thylakoids during a freeze-thaw cycle by a mechanism involving stable membrane binding. *Cryobiology.* 47: 191-203

**Yubero-Serrano E.-M., Moyano E., Medina-Escobar N., Muñoz-Blanco J., Caballero J.-I.** (2003) Identification of a strawberry gene encoding a non-specific lipid transfer protein that responds to ABA, wounding and cold stress. *J. Exp. Bot.* 54, 389: 1865-1877



## 7. Anhang

### 7.1. Vektorkarte



**Abb. 7.1: Physikalische Karte des Expressionsvektors pPICZ $\alpha$  A (Invitrogen)**

5' AOX1 Promotor region: bases 1-941

5' end of AOX1 mRNA: base 824

5' AOX1 priming site: bases 932-1011

: bases 932-1011

3' AOX priming site: bases 1159-1179

3' end of mRNA: bases 1250

AOX1 transcription termination region: bases 1078-1418

Fragment containing TEF1 promotor: bases 1419-1830

EM7 promotor: bases 1831-1898

*Sh ble* ORF: bases 1899-2273

CYC1 transcription termination region: bases 2274-2591

pUC origin: bases 2602-3275

Für die Überexpression von WAX9-Proteinen wurde ein Stopkodon hinter der Multicloning site gesetzt.

## 7.2. Abkürzungen

A. bidest	Aqua bidestillata
ca.	circa
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
rpm	round per minute
ü. N.	über Nacht