

Substratspezifität von rekombinant exprimierten Dihydroflavonol-4-reduktasen

Die NADPH-abhängige Oxidoreduktase DFR (Dihydroflavonol-4-reduktase) kann Selektivität bezüglich des Hydroxylierungsmusters ihrer Substrate aufweisen. Basierend auf Sequenzvergleichen von natürlich vorkommenden DFRs wurden Mutationen von Aminosäuren innerhalb der Substratbindungsstelle von zwei Isoenzymen vorgenommen, die aus der Erdbeere (*Fragaria*) stammen.

Zuerst werden drei unterschiedliche (1 Wildtyp und 2 Mutanten) GST-DFR Fusionsproteine heterolog in *E. coli* exprimiert und isoliert und mittels Affinitätschromatographie sowie Größenausschlusschromatographie gereinigt (**Teil A**).

Ziel des **Teils B** dieser Übung ist es, herauszufinden welche dieser Mutationen eine Änderung der **Substratspezifität** hervorruft. Zu diesem Zweck werden mit ^{14}C -markierten Substraten Aktivitätstests der zuvor hergestellten Enzyme durchgeführt. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wird eine Wertung abgegeben, welche Mutationen Unterschiede in der Substratspezifität hervorrufen.

Im **Teil C** überprüfen Sie den Erfolg der Proteinexpression mittels **Western Blot Analyse**. Dazu wird ein GST-spezifischer Antikörper verwendet. Zusätzlich färben Sie das Polyacrylamidgel mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blau, um alle Proteine unspezifisch sichtbar zu machen.

Hinweise:

* wird von dem/r Betreuer/in ausgegeben

(A) befindet sich im Abzug

(B) befindet sich am Betreuertisch

(E) befindet sich im allgemeinen Entnahmebereich auf RT

(G) befindet sich in der Gefrierlade

(I) befindet sich im Isotopenarbeitsbereich

(K) befindet sich im Kühlschrank

alle weiteren Materialien/Lösungen sind selbst herzustellen oder am Hörer/innenplatz vorhanden

Gerahmte Teile: es ist unter sterilen Bedingungen zu arbeiten!

Zackig gerahmte Teile: es wird mit radioaktiven Substanzen (^{14}C -markiert) gearbeitet. Daher ist mit besonderer Sorgfalt zu arbeiten!

Abkürzungen:

AK, Antikörper

DHK, Dihydrokaempferol

DHM, Dihydromyricetin

DHQ, Dihydroquercetin

dpm, Disintegrations per minute

GST, Glutathion-S-Transferase

GSB, Glutathion-Sepharose beads

h, Stunde(n)

LT, Protein LoBind Tubes

min, Minute(n)

RG, Reaktionsgefäß

RT, Raumtemperatur

s, Sekunde(n)

SDS-PAGE, Natrium dodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Aktivitätstests mit den radioaktiv markierten Substraten finden im Isotopenlabor des Geniegebäudes statt (BZ, 3. Stock). Eine Reservierung des Arbeitsplatzes ist erforderlich!

Reservierung des Mini-PROTEAN Tetra Cell Systems ist möglich!

TEIL A: Enzymexpression und -reinigung

1. Heterologe Expression der GST-DFR Fusionsproteine in *E. coli*

Lösungen: 1 M MgSO_4 (K)
Ampicillin (Stammlösung 100 mg/mL) (K)
50 % (v/v) Glycerin (K)
1 M IPTG (K)
NaOH (pH-Meter)

Feststoffe: Pepton (E)
Hefeextrakt (E)
NaCl (E)

Materialien: DFR-Klone (in *E. coli*) auf Agar-Platten (K)
Alufolie (E)

Durchführung:

- 350 mL Expressionsmedium herstellen (Angaben für 1 L): 10 g Pepton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
4 mL 50%iges Glycerin
1 ml MgSO₄
pH-Wert auf 7,5 einstellen (NaOH)
- in drei 250-mL-Erlenmeyerkolben je 100 mL Expressionsmedium füllen
- vom restlichen Medium in 3 Epruvetten je 5 mL aliquotieren (Dispenser bei Betreuer/in erhältlich)
- zusätzlich 1 Epruvette mit ca. 15-20 mL Medium als Blank für die OD₆₀₀-Messung bzw. als Reserve für nicht angewachsene Übernachtskulturen befüllen
- Epruvetten mit Metallkappen verschließen, in Korb oder Becherglas stellen, mit Alufolie (E) abdecken
- alles autoklavieren
- auf RT lagern
- die zugewiesenen (Gruppennummer!) drei *E. coli*-DFR-Klone entnehmen

- drei 5-mL-Aliquote (Epruvetten) Expressionsmedium mit Ampicillin (100 mg/L Endkonzentration) versetzen
- mit je einer *E. coli* Kolonie beimpfen (sterile gelbe Pipettenspitze oder steriler Zahnstocher)

- bei 37 °C und 200 rpm über Nacht inkubieren

- das bei RT gelagerte Medium in den Erlenmeyerkolben mit Ampicillin (100 mg/L Endkonzentration) versetzen
- je 2,5 mL der Übernachtskulturen in die Erlenmeyerkolben überführen.

- bei 37 °C und 160 rpm inkubieren bis eine OD₆₀₀ von mind. 0,6 (optimal: 0,6 - 0,8) erreicht wird (dauert i.d.R. 2-4 h; ca. nach 2 h das erste Mal zu messen beginnen), OD Wert vor IPTG Zugabe notieren
- Erlenmeyerkolben aus dem Schüttler nehmen und bei RT 10 min stehen lassen

- 100 µL IPTG-Lösung (1 mM Endkonzentration) hinzufügen

- bei 28 °C und 160 rpm für 3 h inkubieren
- finale Zelldichte (OD₆₀₀) bestimmen (1:10 verdünnt)
- Volumen ermitteln, das benötigt wird, um eine rechnerische Zelldichte von OD₆₀₀ = 12 zu erhalten (z.B. bei einer OD₆₀₀ der 1:10-Verdünnung von 0,2 beträgt das Volumen 12 : 2 = 6 mL)
- das jeweilige Volumen in mehreren Schritten in 2-mL-RG überführen und zentrifugieren: 14000 x g, 4 °C, 3 min (2 RG je Probe, 1 davon dient als Reserve)
- Überstände verwerfen
- Pellets weiterverwenden oder bei -80 °C lagern (dazu Betreuer/in kontaktieren)

2. Zellaufschluss

Lösungen: Lysispuffer (50 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.0) (K)
10 mg/ml Lysozym*
1 M MgCl₂ (E)
1 mg/mL DNase-Lösung: (G)

Durchführung:

- Tiefgefrorene Zellpellets auf Eis mit 450 µl Lysispuffer und 50 µl Lysozymlösung vollständig (kann mehrere Minuten dauern) resuspendieren (mit der Pipette; Schaumbildung möglichst vermeiden)
- restliches Lysozym verwerfen
- 45 min auf Eis inkubieren und alle 15 min resuspendieren (Pipette)
- 5 µL MgCl₂-Lösung zugeben und resuspendieren (Pipette)
- 10 µL DNase-Lösung zugeben, resuspendieren (Pipette)
- ca. 20 min auf Eis inkubieren
- zentrifugieren: 14000 x g, 4 °C, 10 min
- Überstand weiterverwenden
- 2 mal 10 µL jeder Probe in ein LT überführen und auf +4 °C für den Western Blotaufbewahren
- Rest für Affinitätschromatographie einsetzen

3. Affinitätschromatographie im Batch Verfahren

Lösungen: Lysispuffer: 50 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.0 (K)
Elutionspuffer: 100 mM KP_i , 200 mM NaCl, 20 mM Glutathion, pH 6.2*

Materialien: Glutathion Sepharose 4B (GSB) in 1,5-mL-LT (K)
LT (B)

Durchführung:

- GSB äquilibrieren (1 GSB-Aliquot pro Zellaufschluss): die in 1 mL Lysispuffer gelagerten GSB zentrifugieren (500 x g, 5 min, 4 °C)
- Überstand vorsichtig mit der Pipette abziehen und werfen
- nachfolgende Schritte 3 x durchführen: 1 mL Lysispuffer zugeben und durch schwaches (ca. Stufe 2-3) Schütteln resuspendieren, zentrifugieren (500 x g, 5 min, 4 °C) und Überstand vorsichtig mit der Pipette abziehen und werfen
- Überstand vom Zellaufschluss (Pkt. 1) auf die äquilibrierten GSB geben und durch schwaches (ca. Stufe 2-3) Schütteln resuspendieren
- jede Probe in ein mit Eis gefülltes 50-mL-RG geben
- im Überkopfschüttler 30 min inkubieren
- zentrifugieren: 500 x g, 5 min, 4 °C
- Überstand werfen
- GSB waschen (nachfolgende Schritte 3 x durchführen): 1 mL Lysispuffer zugeben und durch schwaches (ca. Stufe 2-3) Schütteln resuspendieren, zentrifugieren (500 x g, 5 min, 4 °C) und den Überstand werfen
- Kompetitive Elution der GST-DFR-Fusionsproteine von den GSB mit Hilfe von Glutathion: zu den GSB 80 μ L Elutionspuffer geben und durch schwaches (ca. Stufe 2-3) Schütteln resuspendieren
- 5 min auf Eis inkubieren
- zentrifugieren: 500 x g, 5 min, 4 °C
- Überstand in ein LT überführen
- Elutionsschritte 2 x wiederholen und die Überstände in die jeweiligen LT überführen
- restlichen Elutionspuffer werfen
- 2 mal 10 μ L jeder Probe in ein LT überführen und auf +4 °C für den Western Blotaufbewahren
- GSB regenerieren (nachfolgende Schritte 3 x durchführen): 1 mL Lysispuffer zugeben und durch schwaches (ca. Stufe 2-3) Schütteln resuspendieren, zentrifugieren (500 x g, 5 min, 4 °C) und den Überstand vorsichtig mit der Pipette abziehen und werfen; Lysispuffer nach dem letzten Regenerieren nicht mehr abpipettieren
- regenerierte GSB in den Kühlschrank zurückstellen

4. Umpufferung mittels Größenausschlusschromatographie

Lösungen: Lagerungspuffer (100 mM KP_i , 200 mM NaCl, pH 6.2) (K)

Materialien: Sephadex G-25 medium Säulchen (K)
Ständer/Halterung für Sephadex G-25 medium Säulchen (E)
LT (B)

Durchführung:

- ein Sephadex Säulchen pro Proteinprobe in den Säulchenständer geben und äquilibrieren: 3 x 1 mL Lagerungspuffer auf die Säule pipettieren und durchfließen lassen
- Durchfluss werfen
- Proteinproben (Eluate aus Pkt. 2; je ca. 200 – 240 μ L) auftragen
- Durchfluss werfen
- warten bis die überstehende Lösung in das Säulenbett gewandert ist
- LT unter die Säule geben
- mit 300 μ L Lagerungspuffer eluieren
- 2 mal 10 μ L jeder Probe in LT überführen und für den Western Blot aufbewahren

- alle Proteinproben auf 4 °C lagern
- gebrauchte Säulchen verwerfen

TEIL B: Bestimmung der Substratspezifität

5. Aktivitätstest

Lösungen: Aktivitätspuffer: 100 mM KPi, 0,4 % (w/v) Na-Ascorbat, pH 6.0 (frisch hergestellt) (I)
 NADPH-Lösung (NADPH-Tetra-Natrium-Salz; frisch hergestellt)*
 Eisessig (I)
 Ethylacetat (I)
 Methanol (I)
 Glycerin (50 %) (K)
 flüssiger N₂ (E)

Feststoffe: Dihydrokaempferol (¹⁴C-markiert; DHK), Reaktionsgefäß enthält 0,036 nmol (6000 dpm)*
 Dihydroquercetin (¹⁴C-markiert; DHQ), Reaktionsgefäß enthält 0,036 nmol (6000 dpm)*
 Dihydromyricetin (¹⁴C-markiert; DHM), Reaktionsgefäß enthält 0,036 nmol (6000 dpm)*

Materialien: Cellulose-Dünnschichtplatten (I)
 Chromatographie-Papierstreifen (I)

Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten soll die Umsatzrate für das bevorzugte Substrat bei ca. 50 % liegen, daher werden die Aktivitätstests in einem Gesamtvolumen von 50 µL jeweils mit 1, 10 und 25 µL Enzymlösung durchgeführt.

- Aktivitätspuffer (je nach Aktivitätstest 20, 35 bzw. 44 µL) in die Reaktionsgefäße pipettieren, in denen sich bereits die ¹⁴C-markierten Substrate befinden
- jeweils 1, 10 und 25 µL Enzymlösung zugeben
- 5 µL NADPH-Lösung zugeben und durch schwaches (ca. Stufe 2-3) Schütteln mischen
- kurz abzentrifugieren.
- 30 min bei 30 °C inkubieren

DHK- und DHQ-Reaktionen:

- Reaktion durch Zugabe von 10 µL Eisessig stoppen
- 70 µL Ethylacetat zugeben
- ca. 5 sec schütteln

- zentrifugieren: 3 min bei 14000 x g
- obere (organische) Phase in ein frisches Reaktionsgefäß pipettieren
- die organischen Phasen der Reaktionen von DHK und DHQ werden auf Cellulose-Dünnschichtplatten aufgetragen
- DHK- und DHQ-Standards ebenfalls auftragen.

DHM-Reaktionen:

- Reaktion durch Zugabe von 10 µL Eisessig und 30 µL MeOH stoppen
- kurz vortexen und kurz abzentrifugieren
- Reaktionsgemisch vollständig auf Chromatographie-Papierstreifen aufgetragen
- 1 Streifen für DHM-Standard verwenden
- Dünnschichtplatten und Papierstreifen in die Chromatographiekammern gegeben, in denen sich das Laufmittel Chloroform:Essigsäure:Wasser im Verhältnis 50:45:5 befindet
- Chromatographie über Nacht
- Platten und Papierstreifen im Abzug mindestens 45 min trocken
- am TLC-Linear-Analyzer messen

6. Auswertung

Klon	Sequenz der Substratbindungsstelle	N#aa
G1 (Wildtyp)	127SSAGAVAIEEHRKEVYSENNWS146	341
G10	127SSAGAVNVEEHRKEVYSENNWS146	341
G15	127SSAGAVAIEEHRKEVYDESNWS146	341
G16	127SSAGTVNIEEHRKEVYSESNWS146	341
G102	127SSAGAVAIEETQKPVYSENNWS146	341
G122	127SSAGAVVDEEHRKEVYSENNWS146	341
G126	127SSAGALDVEEHRKEVYSENNWS146	341
G142	127SSAGSVNVEEHRKEVYDESCWS146	341
G2 (Wildtyp)	127ASAGSVNVEETQKPVYNESNWS146	349
G26	127ASAGTVNVEETQKPVYNESNWS146	349
G31	127ASAGSVNVEETQKPVYSESNWS146	349
G33	127ASAGSVNIEETQKPVYDESNWS146	349
G35	127ASAGSVAVEETQKPVYNENNWS146	349
G37	127ASAGSVAIEETQKPVYSESNWS146	349
G38	127ASAGAVAIEETQKPVYNESNWS146	349
G50	127ASAGSVDVEETQKPVYNESNWS146	349
G203	127ASAGSVAVEETQKPVYNESNWS146	330
G209	127ASAGSVNVEETQKPVYDESHWS146	349

- Chromatogramme am TLC Linear-Analyser auswerten
- relative Umsatzraten des Wildtypenzymes mit denen der Mutanten vergleichen und Aussagen bezüglich der Relevanz der jeweiligen Mutation auf die Substratspezifität der DFRs treffen

TEIL C: Western Blot Analyse

7. SDS-PAGE

Lösungen: 10x SDS Laufpuffer (250 mM Tris, 1,92 M Glycin, 1% SDS)
Pre-stained Broad Range protein marker (NEB) (G)
Lämmli-Puffer (G)
Coomassie destain (Methanol (50% [v/v]), Glacial acetic acid (10% [v/v]), H₂O) (A)
Coomassie Blau-Lösung (2,5 g/L Coomassie Brilliant Blue R250 in Coomassie destain) (A)

Materialien: 4-15% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 10-well, 30 µl (Bio-Rad) (K)

Geräte: Mini-PROTEAN Tetra Cell System (Bio-Rad)*

Durchführung:

- die erste Gruppe stellt 1 L 10x SDS Laufpuffer her
- 1 L 1x SDS Laufpuffer herstellen und kühl stellen
- zwei Gele auspacken, Kamm entfernen, grünes Band entfernen und in den Kammereinsatz einsetzen
- den Laufpuffer einfüllen
- die Taschen mit Laufpuffer spülen (Spritze und Nadel)
- 7 µL Marker in die erste Geltasche laden
- alle Proben (9 x 2 Stück) mit 10 µL Lämmli-Puffer mischen
- jeweils einen Probensatz in die Geltaschen nach dem Marker laden
- Gellauf: 80 V, 20 - 30 min (bis der Lämmli-Puffer am Gelende angekommen ist)
- ein Gel für den Western Blot weiterverwenden
- das zweite Gel in Coomassie Blau-Lösung schwenken (Abzug, Nitrilhandschuhe!)
- Coomassie Blau-Lösung zur Wiederverwendung in die Flasche zurück leeren (Abzug, Nitrilhandschuhe!)

- Gel 30 min mit Coomassie destain waschen (Abzug, Nitrilhandschuhe!)
- Waschlösung in die Entsorgungsflasche füllen (Abzug, Nitrilhandschuhe!)
- Gel 2 h oder o/n mit Coomassie destain waschen (Abzug, Nitrilhandschuhe!)
- Waschlösung in die Entsorgungsflasche füllen (Abzug, Nitrilhandschuhe!)
- das Gel fotografieren

8. Western Blot

Lösungen: Anodenpuffer I (25 mM Tris/HCl, 20 % (v/v) Methanol, pH 10,4) (K)
 Anodenpuffer II (300 mM Tris/HCl, 20 % (v/v) Methanol, pH 10,4) (K)
 Kathodenpuffer (25 mM Tris/HCl, 40 mM 6-Aminocaprinsäure, 20 % (v/v) Methanol, pH 9,4) (K)
Materialien: zugeschnittene PVDF-Membran*
 Whatman Filterpapier (E)

Geräte: Semi-Dry-Blotter*

Durchführung:

- Gelaktivierung mittels ChemiDoc (dazu Betreuer/in kontaktieren)
- die Gelkassette seitlich vorsichtig mit dem Gelkassettenöffner aufbrechen
- eine Platte entfernen
- die andere Platten mit dem Gel oben auf die ChemiDoc legen
- "Protein Gel" und "Stain-free Gel" und "Gels used in blotting (1min)" auswählen
- auf "Position gel" klicken, die Position des Gels ev. ausrichten, ev. zoomen
- auf "Run protocol" klicken
- Daten speichern unter "Transfer" / "LU BMB" / "2020" / "Übung 5"
- Gel samt Platte mitnehmen und vorsichtig von der Platte in dest. Wasser geben
- Gel dreimal 10 min in dest. Wasser waschen
- PVDF-Membran (Handschuhe, Pinzette!) durch Schwenken in Methanol für 10-15 s aktivieren (Abzug)
- Membran in Anodenpuffer I für 15 min equilibrieren
- während des dritten Gelwaschgang, 9 Stücke Whatman Filterpapier in Gelgröße zuschneiden
- Unmittelbar vor Aufbau des Western Blots, das Gel 1-2 min im Kathodenpuffer schwenken
- Aufbau des Western Blot Sandwich (Blasen- und Polsterbildung ist zu vermeiden):
 - 3 Stk. Filterpapier in Anodenpuffer II einweichen und auf den Semi-Dry-Blotter legen
 - 3 Stk. Filterpapier in Anodenpuffer I einweichen und darauf legen
 - Equilibrierte Membran darauf legen
 - Gel auf die Membran legen (entschlüpft leicht!)
 - 3 Stk. Filterpapier in Kathodenpuffer einweichen und darauf legen
 - überschüssige Pufferlösungen um den Sandwich entfernen: ein 50-mL-RG fest über den Sandwich rollen und austretende Flüssigkeit aufsaugen (Papiertücher oder Tork)
- Deckel auf den Semi-Dry-Blotter setzen und sanft zuschrauben (1/4-Drehung nachdem die Schraube den Deckel berührt)
- 2 h bei 12 V mit 100 mA pro Gel in Betrieb nehmen
- Stromzufuhr beenden
- Blot abbauen und Übertragung überprüfen (Marker!)
- Membran 10 - 15 s in Methanol schwenken
- Membran auf frisches Whatman Filterpapier legen
- bei RT trocknen lassen
- Membran weiter verwenden oder bei 4 °C für einige Tage aufbewahren

9. Western Blot Analyse

Lösungen: 10x PBS (1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 17,6 mM KH₂PO₄, pH 7,4)
 10x PBS-T (1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 17,6 mM KH₂PO₄, 1 % (v/v) Tween-20, pH 7,4)
 erste AK-Lösung (1:2000 in PBS-T, 0,3 % BSA, 0,02 % NaN₃) (K)
 zweite AK-Lösung (1:2500 goat X rabbit-Poly-HRP in PBS-T) (K)
 SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat (B)

Materialien: Magermilchpulver (E)

Geräte: ChemiDoc Imager (Bio-Rad)

Durchführung:

- die erste Gruppe stellt 500 mL 10x PBS her
- die erste Gruppe stellt aus 250 mL 10x PBS durch Zugabe von Tween 20 10x PBS-T her
- Reaktivieren der Membran durch Schwenken in Methanol für 10 - 15 s
- Equilibrieren der Membran durch Schwenken in 1x PBS für 5 - 10 min
- Membran in 5 % Magermilchpulver (in 1x PBS) für 1 h bei RT blockieren
- Membran weiter verwenden oder über Nacht in der Blockierungslösung aufbewahren
- Membran zweimal mit ca. 20 mL 1x PBS-T für 5 - 10 min waschen
- Membran in 4 mL der ersten AK-Lösung bei RT für 1 h schwenken
- Die AK-Lösung in einem 15-mL-RG bei 4 °C zur Wiederverwendung aufbewahren.
- Membran dreimal mit ca. 20 mL 1x PBS-T für 5 - 10 min waschen
- Membran in 4 mL der zweiten AK-Lösung bei RT für 1 h schwenken
- Membran zweimal mit ca. 20 mL 1x PBS-T für 5 - 10 min waschen
- Membran zweimal mit ca. 20 mL 1x PBS für 5 - 10 min waschen
- PBS sorgfältig entfernen
- je 1 mL von den beiden SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substraten auf die Membrane geben (darauf achten, daß die Membran bis zur Detektion mit dem Substrat überzogen bleibt)
- Detektion am ChemiDoc Imager (dazu Betreuer/in kontaktieren)
- "Blot", "Chemic highest sensitivity", "signal accumulation mode 1- 30s, 30 images" auswählen
- auf "Position gel" klicken, die Position des Gels ev. ausrichten, ev. zoomen
- auf "Run protocol" klicken
- Daten speichern unter "Transfer" / "LU BMB" / "2020" / "Übung 5"

10. Abgabe der Ergebnisse

Geben Sie ein DIN A4 Blatt mit folgenden Angaben ab:

1. OD der Kulturen zum Zeitpunkt der IPTG Zugabe und finale OD
2. Relative Umsatzraten des Wildtypenzymes und der beiden mutierten Enzyme (27 Werte),
3. Davon Auswahl aussagekräftiger Ergebnisse/Umsatzraten treffen (9 Werte).
4. Interpretation: Welche Mutationen bewirken eine/keine Änderung der Substratspezifität der DFR
5. Beschriftete Bilder des gefärbten Gels und der Western Blot Analyse.
6. Einschätzung des Erfolges der Proteinexpression.