

**Die *wax9*-Genfamilie; Klonierung, Expression und funktionale
Charakterisierung von Lipidtransfer und Kryoprotektion**

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Mohamad Alsuleiman

aus Syrien

Berlin 2012

Die Dissertation wurde angefertigt

Im Institut für Biologie , Pflanzenphysiologie, und Mikrobiologie unter Leitung von
Herrn Prof. Dr. Jürgen. M. Schmitt im Zeitraum von Januar 2008 bis Juni 2012

1. Gutachter: Herr Prof. J. M. Schmitt, Freie Universität Berlin

2. Gutachter: Herr PD Dr. D. K. Hinch, Max-Plank-Institut für molekulare
Pflanzenphysiologie, Golm

Disputation am Freitag **14.09.2012**

DANKSAGUNG

Ich biete meinen aufrichtigen Dank und Dankbarkeit meiner Doktorvater *Prof. Dr. Jürgen. M. Schmitt* für die Annahme von mir in seiner Arbeitsgruppe, die ununterbrochene Unterstützung meiner Arbeit und für die wöchentliche Diskussionsstunde. Er brachte mir sehr viel Geduld entgegen und sorgte mit wertvollen Ratschlägen für das Gelingen der Arbeit.

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an meiner Frau *Raghdaa* richten, die mich stets bestärkt hat, wenn ich an mir gezweifelt habe. Sie hat mir die ganze Zeit den Rücken frei gehalten und daher widme ich sie diese Arbeit.

Ganz besonders danken muss ich aber *Dr. Carsten Köhn* für seine stete Hilfsbereitschaft und für seine sofortige und ausdauernde Hilfe bei meiner Arbeit. Er hat mich dauerhaft in meiner Doktorarbeit mit Geduld und Freundlichkeit geholfen.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner ersten Laborlehrerin *Frau Felicitas Wronski*, die mir mit ihren Erfahrungen immer tatkräftig zur Seite standen. Für ihre Geduld und für ihr Lächeln danke ich.

Des Weiteren gilt meiner großer Dank *Frau Hildegard Köht* für die Organsierung allen Sachen im Labor, die Isolierung von Thylakoiden und CPP, die Vorbereitung allen Chemikalien und für die freundliche Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit.

Mein Dank richtet sich auch an *Dr. Silke Schilling* für die hilfreiche Unterstützung und für die Hilfe bei der Herstellung von Mutanten. Ich danke besonders dafür, dass ich sie jederzeit ansprechen und mit ihr über die Mutanten diskutieren konnte.

Mein besonderer Dank gilt auch an *Dr. De Lamotte* für die Computersimulation.

Ganz besonders möchte ich mich bei *Frau Sigrid Kimura* bedanken für die großen intensiven Korrekturen erst an meiner wissenschaftlichen Arbeit und dann an meiner Doktorarbeit und auch für die Hilfe bei der Erledigung der Formalitäten zur Dissertation.

Ein großer Dank geht aber auch an meine Kollegen, *Sandra Osthoff* für die Hilfestellungen und Korrekturlesearbeiten, *Engy Khalifa* und *Athiel Habasch*, die mich bei allen Fragestellungen, Störungen, Arbeitsprobleme und bei meinen persönlichen Situationen immer unterstützt haben.

Auch möchte ich mich bei meinen Geschwistern und meinen Freunden bedanken, die mich tatkräftig unterstützt haben.

Mohamad Alsuleiman

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Kältestreß und Härtungsphänome bei Pflanzen.....	1
1.2	Frostschaden und Frosttoleranz	2
1.3	Chemische und physikalische Gefrierschäden an Thylakoiden	4
1.4	Kryoprotektine und Lipidtransfer-Proteine	7
2	Zielsetzung der Arbeit	12
3	Material und Methoden	13
3.1	Geräte und Apparaturen.....	13
3.2	Chemikalien, Kits, Gene, Antikörper	13
3.2.1	Chemikalien	13
3.2.2	Kits	13
3.2.3	Gene	13
3.2.4	Antikörper	13
3.3	Verwendete Organismen und Kulturen	14
3.3.1	Stamm und Kulturen von <i>E. coli</i>	14
3.3.2	Stamm und Kulturen von <i>Pichia pastoris</i>	14
3.3.3	Anzucht der Pflanzen und Isolierung von Proteinen und Thylakoiden	15
3.4	Plasmide.....	17
3.4.1	<i>pJET1.2/blunt</i> cloning Vektor	17
3.4.2	Expressionsvektor <i>pPICZa</i>	17
3.5	Molekularbiologische Methoden.....	17
3.5.1	Extraktion genomischer DNA aus Wirsingkohlr mittels CTAB-Methode	17
3.5.2	Fällung und DNA-Konzentrationsbestimmung	18
3.5.3	Polymerase-Kettenreaktion PCR zur Vervielfältigung der DNA	19
3.5.4	Reinigung der PCR-Produkte.....	20
3.5.5	Trennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese	20
3.5.6	Klonierung des <i>wax9</i> -Gens in den <i>pJET1.2/blunt cloning</i> Vektor.....	22
3.5.7	Klonierung des <i>wax9</i> -Gens in den Expressionsvektor <i>pPICZa</i> Vektor	25
3.5.8	Herstellung kompetenter <i>Pichia pastoris</i> -Zellen und Transformation	28
3.5.9	Expression von rekombinantem Protein in <i>Pichia pastoris</i>	30
3.6	Proteinbiochemische Methoden	33
3.6.1	Zentrifugation und Lagerung	33
3.6.2	Entsalzung über Gelfiltration	33
3.6.3	Auftrennung von Proteinen bei der Ionenaustauschchromatographie	34
3.6.4	Reversed-Phase-Chromatographie über Amberlite XAD7 Matrix	35
3.6.5	Kolorimetrische Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradfordtest	38
3.6.6	Proteinfällung	38
3.6.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
3.6.8	Western-Blot	41
3.6.9	Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen über Gelfiltration	43
3.6.10	Test zum Nachweis von Proteinen mit Frostschutzaktivität	44
3.6.11	Test zum Nachweis von Proteinen mit Lipid-Transfer-Aktivität.....	45
3.6.12	Bindungsstudien von Proteinen an Thylakoidmembranen.....	47
3.6.13	Verwendete Mutanten	50
4	Ergebnisse	52
4.1	Klonierung der <i>wax9</i> -Gene.....	52
4.1.1	Isolation genomischer DNA und PCR-Amplifikation des <i>wax9A</i> -Gens	52

4.1.2	Klonierung in den <i>pJet1.2/Blunt</i> -Vektor und DNA-Sequenzierung	56
4.1.3	Klonierung im Expressionsvektor <i>pPICZα</i>	57
4.1.4	Transformation von <i>Pichia pastoris</i> mit <i>pPICZα</i> -Vektor	58
4.2	Expression des rekombinanten WAX9Am-Proteins in <i>Pichia pastoris</i>	58
4.2.1	Prüfung der Überexpression von WAX9-Proteinen.....	59
4.3	Reinigung von WAX9-Proteinen	60
4.3.1	Entsalzung von WAX9 an einer Sephadex-Matrix G25	60
4.3.2	Auftrennung von WAX9 mit dem Kationenaustauscher CM52	61
4.3.3	Auftrennung von WAX9 mit dem Kationenaustauscher SP-Sepharose	62
4.3.4	Auftrennung von WAX9 mit der Reverse-Phase Amberlite XAD7-Säule.....	64
4.4	Isolierung und Reinigung von Kryoprotektin aus dem Wirsingkohl	65
4.5	Bradfordtest und die Ausbeute von Proteinen	66
4.6	Molekulargewichtsbestimmung von CPP und WAX9-Proteinen	67
4.7	Frostschutzaktivität von WAX9-Proteinen	74
4.8	Lipidtransferaktivität von WAX9-Proteinen	77
4.9	Prüfung der Aktivitäten mit und ohne Calcium und Mangan-Ionen.....	80
4.10	Mischung aller WAX9-Proteine und Prüfung der Aktivitäten	82
4.11	Bindungsstudien von WAX9 und CPP an den Thylakoidmembranen.....	84
4.12	Prüfung der Aktivitäten nach dem Bindungsversuch	89
4.13	Test zum Nachweis von modifizierten Proteinen.....	92
5	Diskussion.....	98
5.1	Klonierung und Expression und von WAX9-Proteinen	98
5.2	Struktur- und Sequenzanalysen von WAX9-Proteine	100
5.2.1	Nucleotidsequenzen	100
5.2.2	Struktur und Aminosäuresequenzen der WAX9-Proteine	102
5.3	Entwicklung einer Reinigungsmethoden der WAX9-Proteinen und CPP	107
5.4	Molekulargewicht von CPP und WAX9-Proteinen.....	109
5.5	Analyse der Aktivitäten von WAX9-Proteinen und CPP.....	110
5.6	Bindungsstudien an den Thylakoidmembranen	112
5.7	Prüfung der modifizierten Proteine	113
6	Zusammenfassung	115
7	Abbildungsverzeichnis	119
8	Tabelleverzeichnis	121
9	Abkürzungsverzeichnis	122
10	Literaturverzeichnis	124

1 Einleitung

1.1 Kältestreß und Härtungsphänome bei Pflanzen

Der Kältestreß stellt neben dem Wasserangebot einer der grundlegenden und bestimmenden Stressfaktoren, die das Wachstum, und die Produktivität von Pflanzen in den verschiedenen Klimazonen der Erde limitieren, dar. Die Unterschreitung der optimalen Temperaturen für die Pflanzenentwicklung wird bereits als Stress definiert, so dass die suboptimalen Temperaturen zu den Stressfaktoren gehören (Boyer 1982). Die Jahreshöchst- und Mindesttemperaturen schließen diejenigen Organismen aus, deren Toleranzgrenzen darunter beziehungsweise darüber liegen. Indirekt hängen sie aber auch noch mit einer anderen Größe zusammen: je tiefer die Temperaturen im Winter, desto kürzer ist die für Pflanzen nutzbare Vegetationszeit, denn sie kann erst beginnen, wenn die durchschnittliche Tagestemperatur über etwa zehn Grad liegt (Heyer 2005).

Da zwei Drittel der Fläche der Erde sich unter Kälteklima befinden, lässt sich bereits ablesen, dass der Umgang mit niedrigen Temperaturen eine große Herausforderung für lebende Organismen ist. Deswegen haben Pflanzen Strategien wie Härtung entwickelt, die ihnen das Überleben bei niedrigen Temperaturen ermöglichen.

Wenn ein strenger Stress bei fehlender Toleranz auftritt, führt er innerhalb von Minuten bis Stunden zu Schädigungen bei Pflanzen. Der relevante Temperaturbereich bei kühlempfindlichen Pflanzen liegt zwischen 0 °C bis 6 °C und bei frostempfindlichen Pflanzen unterhalb von -3 °C. Ein anderer Stress kann aber zwischen 8 °C bis 16 °C bei kühlempfindlichen und bei -1 °C bei kühletoleranten Pflanzen auftreten. Dieser milde Stress kann eine zusätzliche Bedeutung haben als Vorbereitungsphase, Kälteakklimatisierung oder Härtung genannt, gegenüber strengem Stress (Levitt 1980).

In der gemäßigten Klimazone können die kälteakklimatisierten Pflanzen auf niedrige Temperaturen reagieren und das Einfrieren mit minimalem Schaden überstehen. Die Pflanzen haben wegen des Härtungsphänomens oder der Kälteakklimatisierung eine erhöhte Frosttoleranz gewonnen. Das Härtungsphänomen findet im Herbst statt und tritt auf, wenn die Pflanzen Temperaturen zwischen 0 °C und 10 °C für mehrere Tage ausgesetzt werden. Dieser Prozess bereitet die Pflanzen auf das Überleben im Winter vor. Die gehärteten Pflanzen

können auf diese Weise um 5 °C bis 25 °C tiefere Temperaturen als die nicht gehärteten Vertreter derselben Art überleben (Brauer & Kofler 1987).

Genau weiß man diese Strategien noch nicht, denn es ist bis heute nicht ganz klar, wie Pflanzen mit Kälte umgehen. Frosttoleranz ist sehr variabel: bei manchen Pflanzen reicht sie nur bis wenige Grade unter null, einige Bäume können aber bis zu -40 °C unterkühlt werden und die Eiskristallbildung vermeiden, Sträucher wie zum Beispiel der weiße Hartriegel können auch dann wieder austreiben, wenn ihre Äste in flüssigem Stickstoff bei minus 196 Grad eingefroren waren (Heyer 2005).

Bei -1 °C bis -2 °C werden kühlempfindliche Pflanzen in wenigen Stunden irreversibel geschädigt. Ungehärtete, kühletolerante Pflanzen überstehen aber hingegen -4 °C bis -9 °C schadenfrei durch Unterkühlung des Gewebewassers, ohne dass es zur Eiskristallbildung kommt. Im allgemeinen können Pflanzen das Überleben unter 0 °C durch zwei Mechanismen erreichen: Vermeiden oder Tolerieren des Gefrierens.

Um die physiologische und biochemische Anpassung während dieses Phänomens zu erklären, wurden viele Untersuchungen durchgeführt. Es ist aber nur selten gelungen, die Beziehung zwischen physiologischen Veränderungen während der Akklimatisierung und der Zunahme der Frosttoleranz aufzudecken. Es ist aber klar, dass viele Veränderungen generelle Anpassungen des Metabolismus an die niedrigen Wachstumstemperaturen darstellen und nicht alle in Pflanzen beobachtete Veränderungen direkt mit der Frosttoleranz zusammenhängen (Guy et al 2008).

1.2 Frostscha den und Frosttoleranz

Die Frosttoleranz ist also eine wichtige Determinante der geographischen Verteilung von Pflanzenarten, da die Frostscha den in Kulturpflanzen zu schweren Scha den in der Landwirtschaft führen. Deswegen sind für Landwirtschaft in den geographischen Gebieten, die sich unter Kälteklima befinden, nur frosttolerante Pflanzen geeignet. Die Frostresistenz wird in vielen Pflanzen durch eine Kälteperiode erworben (Levitt 1980). Viele gemäßigte Pflanzen steigern ihre Frosttoleranz während sie kühlen Temperaturen ausgesetzt sind. Dieser Vorgang ist als Kälteakklimatisierung oder Härtung bekannt (Hannah et al 2005). Während dieser Zeit wurde gezeigt, dass eine Veränderung in der Genexpression auftritt (Guy et al 1992) Frosttoleranz und Kälteakklimatisierung sind komplexe, quantitative genetische

Merkmale. Die Anzahl und die funktionelle Rolle der verantwortlichen Gene sind nicht für alle Pflanzenarten bekannt (Hannah et al 2005).

Steponkus und Lynch haben gezeigt, dass in den akklimatisierten Pflanzen ein Grund für die Frosttoleranz die Änderung der Lipidzusammensetzung der Plasmamembran ist. Ob für diese Änderung der Membranlipidzusammensetzung eine Aktivierung existierender Enzyme oder eine Synthese eines neuen Proteins nötig ist, blieb unklar (Steponkus et al 1993).

Ein Effekt des Frostschadens ist die Zustandsveränderung der Membran vom flüssigen in einen weniger flüssigen Zustand. Diese Zustandsveränderung verändert die Aktivität von membran-assoziierten Enzymen und erhöht die Membrandurchlässigkeit (Steponkus et al 1993).

Zwei physiologische Einheiten finden sich pflanzlichen Geweben. Der Protoplast (Symplast), der aus der Gesamtheit aller Zellinhalte besteht, enthält die Organellen wie Zellkern, Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum und Chloroplasten. Die zweite Einheit ist der Apoplast, der alle übrigen Strukturen, wie die Zellwand und die Strukturen, die sich zwischen den Zellen befinden, bildet.

Da der Apoplast im Vergleich zum Symplast nur eine geringe Osmolarität aufweist, gefriert er unmittelbar wenn die Temperatur unter 0 °C sinkt (Sakai & Larcher 1987). In den Geweben von frosttoleranten Pflanzen bilden sich in Frostperioden echte Eiskristalle. Diese entstehen aber nicht im Zellinneren (Symplasten), sondern nur in den Bereichen der Interzellularen (Apoplasten). Die interzellularen Eisbildungen spielen eine große Rolle beim Überstehen des Einfrierens. Wegen der gebildeten Eiskristalle im Apoplast sinkt das Wasserpotential, da die gebildeten Eiskristalle ein geringes Wasserpotential als das flüssige Wasser haben. Deswegen fließt das Wasser aus den Zellen immer mehr hinaus und friert dort in Interzellularen (Apoplasten) ein, so dass der Symplast entwässert oder dehydriert wird (Meryman et al 1977). Bei -10 °C verlieren die Zellen ca. 90 % ihres osmotischen Wassers, was zu einer erhöhten Konzentration der gelösten Stoffe im Symplast führt (Steponkus et al 1993). Die hohe Konzentration an gelösten Stoffen im Zellsaft senkt die Gefahr der intrazellulären Eisbildung, die den sicheren Tod bringt (Heyer 2005). Die Dehydrierung der Zelle ist abhängig vom Volumen der Zelle, vom Gradienten des chemischen Potentials zwischen Apoplast und Symplast und von der Wasserpermeabilität des Plasmalemmas (Sakai & Larcher 1987).

Durch das Gefrieren im extremen Fall und wegen der starken Permeabilitätsveränderung der Membranen verliert die Zelle so viel Wasser, was zu einem schnellen und starken Verlust in der Fluidität des Zytoplasmas führt. Dann tritt die so genannte „Verglasung“ oder „Vitrifikation“ ein. In diesem verglasten Zellinneren sind alle Lebensvorgänge so stark verlangsamt, dass die Zelle unter diesen Bedingungen gefahrlos die Frostperiode überstehen kann. Dieser Prozess ist in Samen eine wichtige Voraussetzung für die Lagerfähigkeit (Heyer 2005).

Eine erhöhte Zellosmolarität wurde auch häufig nach der Kälteakklimatisierung gefunden. Während des Gefrierens könnte diese erhöhte Zellosmolarität zwei günstige Effekte für die pflanzlichen Zellen haben: Reduzierung des dehydrierenden Effekts durch apoplastische Eisbildung und direkter Schutz durch Interaktion mit Membranen oder frostempfindlichen Proteinen (Guy et al 1992).

1.3 Chemische und physikalische Gefrierschäden an Thylakoiden

Zur Untersuchung des Frostschadens nach einem Gefrier/Auftau-Zyklus an einzelnen Zellbestandteilen werden die isolierte Proteine, Membranen oder Organellen benutzt. Weil sie frostempfindlich und schnell und problemlos aus Blättern zu isolieren sind sowie große biochemische Aktivität besitzen, wurden die photosynthetischen Membranen (Thylakoide) als ein besonders geeignetes Modellsystem für die Untersuchung von Frostschäden an Biomembranen verwendet (Hincha & Schmitt 1988a).

Die Thylakoide, die in den Chloroplasten lokalisieren, sind in Form von Membranstapeln organisiert und stellen den Ort der Lichtreaktionen dar. Über diese Membranen wird ein Protonengradient aufgebaut. Die Thylakoidmembranen erhalten die Lichtenergie, die in elektrochemische Energie umgewandelt wird und von den in der Thylakoidmembranen lokalisierten ATP-Synthase für die Synthese von ATP benutzt wird.

Durch die *in vitro* volumetrischen Studien wurden die Thylakoidmembranen nach einem Gefrier/Auftauvorgang auf Frostschäden untersucht. Der Gefrierversuch mit den aus Spinatblättern isolierten Thylakoidmembranen ermöglicht, den Einfluss verschiedener Faktoren auf den Frostschaden im Detail zu untersuchen und bietet Vorteile gegenüber Versuchen an intakten Blättern oder ganzen Pflanzen (Hincha 1992).

Beim Einfrieren und nachfolgenden Auftauen pflanzlicher Zellen tritt eine osmotische Kontraktion und Expansion auf, was zu einer vorübergehenden physikalischen Schädigung der Membranen führt (Hincha & Schmitt 1985). Nach dem volumetrischen Studium an Thylakoidmembranen während eines Einfrier/Auftau-Zyklus sind zwei kooperative Effekte an einer mechanischen Schädigung beteiligt. Zum einen nehmen die Thylakoide während des Einfrierens externe, gelöste Stoffe auf (wie Sorbit, NaCl und Saccharose). Des Weiteren können die Vesikel während der Auftauphase nur eingeschränkt expandieren (Hincha 1986).

Durch Einfrieren von Thylakoidmembranen in einem Medium niedriger Osmolarität (z. B. 5 mM Saccharose, 5 mM NaCl) verliert die Membranen das Elektronentransportprotein Plastocyanin, was zu einer irreversiblen Hemmung der zyklischen Photophosphorylierung führt (Hincha & Schmitt 1992). Das Plastocyanin ist ein lösliches Elektronentransportprotein und lokalisiert im Innenraum (Lumen) der Thylakoide (Haehnel 1984). Der Verlust des Plastocyanin wird auf das Aufreißen (mechanische Schädigung) der Thylakoide während des Gefrier/Tau-Zyklus zurückgeführt.

In vitro wurde die Größe der mechanischen Frostschäden von den eingefrorenen und wieder aufgetauten Thylakoiden volumetrisch mittels der Hämatokritkapillaren in einer Hämatokritzentrifuge gemessen. Das Volumen der eingefrorenen und wieder aufgetauten Thylakoide ist negativ zu der Menge an freigesetztem Plastocyanin korreliert, so dass die beiden Verfahren austauschbar sind (Hincha 1986). Die Menge an freigesetztem Plastocyanin in den Überständen wurde durch eine radiale Immundiffusion bestimmt (Hincha & Schmitt 1988a). Die Retention von Plastocyanin nach dem Einfrieren der isolierten Thylakoide zeigt den Schutz von Frostschaden. Es kann als ein zuverlässiger Test genutzt werden, um Auswirkungen von Frostschaden auf Membranen und die kryoprotektive Substanzen zu untersuchen (Hincha & Schmitt 1988b).

In vitro wurden die aus ungehärteten Spinatpflanzen isolierten Thylakoide in künstlichen Medien geringer Osmolalität (wie Saccharoselösungen 10-100 mOsm) eingefroren, um Substanzen mit direkter kryoprotektiver Wirkung zu identifizieren. Die Thylakoidmembranen verhalten sich in diesen Saccharoselösungen über einen weiten Konzentrationsbereich als semipermeable Osmometer, so dass sie mit sinkender Saccharosemolarität der sie umgebenden Lösung schwellen (Hincha & Schmitt 1992a). Nach dem Auftauen kann man die mechanische Schädigung an den Thylakoidmembranen beobachten, die auf das Platzen und

Kollabieren der Thylakoide aufgrund osmotischer Vorgänge zurückgeführt werden. Diese physikalischen Schäden führen zur Hemmung des Elektronentransports, was mit der Photophosphorylierung zusammenhängt. Die Thylakoidmembranen verschließen sich nach der Auftauphase wieder, was zu einer deutlichen Volumenverringerung führt (Abb. 1).

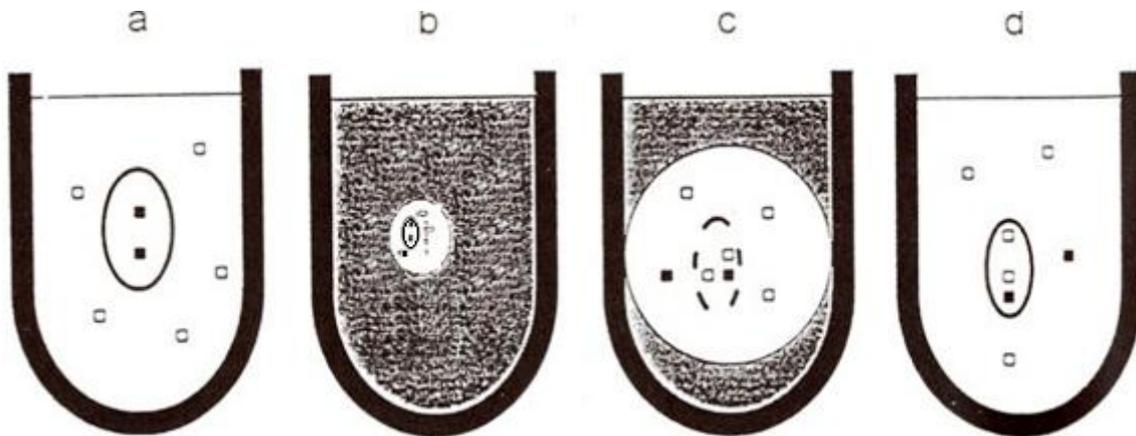


Abbildung 1: Schematische Darstellung des in vitro Gefrier-/Auftauvorganges

- a) Thylakoidmembranen sind in einer Lösung mit einer niedrigen Osmolalität suspendiert.
- b) Durch das Gefrieren entsteht Eis (schraffierte Fläche). Die Membranen und die gelösten Substanzen werden in einem kleinen Flüssigkeitsvolumen aufkonzentriert. Das Konzentrationsgefälle führt zum Einströmen von gelösten Substanzen in die Membranen.
- c) Während des Auftauens schmilzt das Eis, so dass sich die Konzentration der gelösten Substanzen erniedrigt. Die Thylakoide schwellen durch osmotische Vorgänge an bis sie schließlich platzen.
- d) Nach der Auftauphase verschließt sich die Membran wieder und hat ein geringeres Volumen (Hincha & Schmitt 1992).

Wie *in vitro* wird *in vivo* die Photosynthese irreversibel beim Gefrier/Auftau-Zyklus inhibiert (Krause et al 1988). Es kommt zu einem lumenalen Plastocyaninverlust, der die Inhibition des Elektronentransports erklärt (Schmidt et al 1986). Dieser Verlust ist zeit- und gefrier temperaturabhängig. Während eines langsamen Einfrierens einer Pflanze gefriert zuerst das extrazelluläre Wasser (das apoplastische Wasser). Bei einem weiteren Absinken der Temperatur wachsen die Eiskristalle auf Kosten von Wasser, das aus den Zellen nachdiffundiert und zur Dehydratisierung der Zellen, starken Volumenverringerung der Zellen und Aufkonzentrierung löslicher intrazellulärer Stoffe führt. Wegen des entstehenden Konzentrationsgradienten tritt das sogenannte „solute loading“ auf. Dieser Vorgang führt zu einer passiven Diffusion osmotisch aktiver Teilchen über die Thylakoidmembranen in den Innenraum der Thylakoide. Die Thylakoidmembranen sind noch in dieser Gefrierphase größtenteils intakt. Wegen des hohen osmotischen Wertes im Innenraum der Thylakoiden

kommt es in der Auftauphase zu einem starken Einstrom von Wasser, so dass die Thylakoide anschwellen bis sie überdehnt werden, platzen und das Plastocyanin freisetzen. Dabei wird die Photophosphorylierung vermindert. (Hincha & Schmitt 1992). Eine externe Zugabe von Plastocyanin zu dem Medium führt zu einem Gleichgewichtszustand mit dem lumenalen Plastocyanin und verringert auf diese Weise die Reduktion der Photophosphorylierung während eines Gefrier/Auftauvorgangs (Hincha et al 1985).

In vivo beobachtet man den zunehmenden Schaden bei Blättern über einen Zeitraum von mehreren Tagen, während er bei den isolierten Membranen bereits *in vitro* nach wenigen Stunden deutlich erkennbar ist. Wurden Spinatblättern in einem langsamen Gefrier/Tau Zyklus geworfen, wurden die Thylakoide geschädigt und die Photosynthese vollständig gehemmt, wenn eine bestimmte Temperatur unterschritten wurde. Diese Temperatur ist abhängig vom Frosthärtungsgrad der Pflanzen und reicht von ca. -6 °C im empfindlichen Zustand bis zu ca. -16 °C nach Abhärtung unter natürlichen Bedingungen im Winter (Hincha 1992). Auf die beiden Phasen des Gefrier/Tau-Schadens hat die Frosthärtung einen starken Einfluss. Dies gilt sowohl für Blätter als auch für die daraus isolierten Thylakoide (Hincha & Schmitt 1992a). Die isolierten Thylakoide aus geschädigten Blättern wurden *in vitro* untersucht und es konnte gezeigt werden, dass der Verlust des Plastocyanins mit der Hemmung der Photosynthese einhergeht (Hincha & Schmitt 1992a).

1.4 Kryoprotektine und Lipidtransfer-Proteine

Das Härtungsphänomen hat eine Schutzwirkung auf die Thylakoidmembranen. Der Mechanismus des Schutzes, mit dem die gehärteten Pflanzen mit Kälte umgehen können, konnte bis jetzt nicht vollständig geklärt werden. Es ist aber sicher, dass der Schutz der Thylakoide nach dem Härtungsprozess, teilweise auf die direkte Wirkung von Proteinen zurückzuführen ist (Hincha et al 1990).

In vitro war es klar, dass sich der Plastocyaninverlust aus Thylakoiden gehärteter im Vergleich zu nicht gehärteten Spinatpflanzen in beiden Phasen des Gefrier/Tau-Schadens reduziert, was deutlich erklärt, dass der Härtungsprozess eine Verringerung der Membranpermeabilität für Osmolyte während des „solute loading“ bezeichneten Vorgangs bewirkt. Außerdem kann der Härtungsprozess zu einer vergrößerten maximalen Ausdehnung der Membran beim Gefrieren führen (Hincha & Schmitt 1992b).

Mit indirekter und direkter kryoprotektiver Wirkung spielen die Frostschutzproteine eine große Rolle. Als eine indirekte kryoprotektive Wirkung haben manche Proteine durch Aufspaltung von hochmolekularen Verbindungen die Fähigkeit zur Anhäufung von niedermolekularen Osmolyten wie Zucker, Zuckeralkoholen, Glycerin in den Blättern kältgestreßter Pflanzen (Dowgert & Steponkus 1984). Bei vielen frostresistenten oder frosttoleranten Organismen (z.B. marinen Fischen, Insekten, Pflanzen und Bakterien) vermeiden die Frostschutzproteine den Gefrierpunkt und das Kristallwachstum durch eine direkte Interaktion mit der Oberfläche von Eis, wie im allgemein bekannt ist, und ermöglichen ein Überleben bei niedrigen Temperaturen bis zu $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Feeney et al 1986).

Der positive Effekt von Interaktionen zwischen pflanzlichen Membranen und Zuckern auf die Stabilität von Membranen bei Trocken- oder Kältestreß wird seit langem untersucht. Trehalose und Saccharose wurden als Stabilisatoren von Membranen identifiziert (Fabrie et al 1990).

Heber und Kempfle (1970) konnten zeigen, dass frostharte Spinat- und Wirsingkohlblätter Proteine mit kryoprotektiver Wirkung enthalten. Im Reagenzglas konnten diese Proteine die isolierten Thylakoidmembranen aus nicht gehärteten Spinatpflanzen gegen Frostschäden schützen. Bei diesem Experiment wurde die Intaktheit der Thylakoide nach einem Gefrier/Tau-Zyklus über die Messung der Photophosphorylierung bestimmt (Heber & Kempfle 1970).

Hincha konnte bereits finden, dass die kryoprotektiven Proteine aus frostharten Wirsingblättern die Plastocyaninfreisetzung aus Spinatthylakoiden beim Gefrieren und Tauen verhindern. Als er die Thylakoide in künstlichen Medien (Saccharoselösungen) suspendiert hat und einem Gefrier/Tau- Zyklus in Anwesenheit von kryoprotektiven Proteinen unterwarf, fand er einen deutlichen Schutzeffekt bei den beiden Phasen des Gefrier/Tau-Plastocyaninverlustes. Die Proteine aus den gleichen Wirsingkohlblättern, die im Gewächshaus unter nicht härtenden Bedingungen gewachsen waren, zeigten mit isolierten Thylakoiden keinen Gefrierschutz (Hincha et al 1990). Hincha konnte auch beweisen, dass es sich bei den frostschutzaktiven Substanzen tatsächlich um Proteine handelt. Er konnte durch Verdauung mit der Protease Trypsin zeigen, dass die Frostschutzaktivität vollständig zerstört wurde (Hincha et al 1990).

Proteine mit kryoprotektiver Wirkung werden als Kryoprotektine bezeichnet (Hincha et al 1989a). Diese Proteine können die pflanzlichen Membranen in Anwesenheit von Eis stabilisieren. Sie weisen eine hohe Hitze- und Säurestabilität auf, so dass sie durch eine 10-minütige Inkubation in einem kochenden Wasserbad nicht denaturieren (Hincha & Schmitt 1992b). Die Gelfiltrationschromatographie an Sephacryl S-200 unter nicht-denaturierenden Bedingungen ergab ein apparentes Molekulargewicht von 28.5 KDa. Unter denaturierenden Bedingungen bei der SDS-Gelelektrophorese enthielt das Kryoprotektin eine Vielzahl von Polypeptiden (Hincha et al 1989b).

Der Wirkmechanismus dieser Kryoprotektine ist ein anderer als bei den Anti-Gefrier-Proteinen, die bei anderen biologischen Systemen beschrieben wurden. Die entsprechenden Messungen zeigten, dass die pflanzlichen Kryoprotektine keinen Einfluss auf den osmotischen Wert von Lösungen, die in Gefrierversuchen verwendet wurden, haben. Deswegen wurde postuliert, dass die Wirkung der Kryoprotektine durch eine direkte Interaktion mit den Membranen verursacht wird (Hincha et al 1990).

Zur Erklärung dieser Interaktion gibt es zwei Hypothesen:

Zum einen kann eine Bindung von Proteinen an die Zuckergruppen der Galaktolipide in Membranen die Permeabilitätsreduktion der Membranen in Anwesenheit der Proteine beim Gefrieren erklären. Die andere Möglichkeit ist die Interaktion von Proteinen mit den Membranen über die hydrophoben Wechselwirkungen. Da diese Proteine beim Kochen in Lösung bleiben, müssen sie hydrophil sein. Die Kryoprotektine können aber unter bestimmten Bedingungen (z.B 20 % Ammoniumsulfat oder pH 2) an eine hydrophobe Säulenmatrix binden, deswegen verfügen sie offensichtlich auch über hydrophobe Domänen. Diese hydrophoben Domänen können den Kryoprotektinen beim Gefrieren durch die starke Aufkonzentrierung des Mediums eine Bindung an die Membranen ermöglichen. Dies bleibt allerdings noch zu erklären (Hincha 1992).

Die Sequenzanalyse des kryoprotektiven Polypeptids, das von Wirsingkohlblättern *Brassica oleracea* isoliert wurde, ergab, dass es zur Klasse der Lipidtransfer Proteine LTPs gehört (Sieg 1995). Von dem sequenzierten N-terminalen Peptid mit 23 Aminosäuren und von zwei internen tryptischen Peptiden mit 9 und 14 Aminosäuren wurde die Aminosäuresequenz bestimmt. Diese Aminosäuren sind 61 % identisch zu internen Aminosäuresequenz von dem

WAX9D-Protein, das aus der Wachsschicht von Brokkoliblättern *Brassica oleracea* mit einem Molekulargewicht von 9.4 KDa isoliert wurde (Pyee et al 1994).

Die Lipid-Transfer-Proteine (LTPs) haben im Prinzip die Fähigkeit *in vitro* Lipide zu binden und zwischen Membranen transportieren zu können. LTPs wurden bereits aus verschiedenen Pflanzen, Tieren, Hefen und Bakterien isoliert und sequenziert. In Pflanzen liegen die LTPs generell als Mitglieder einer Genfamilie vor. Die Familie der pflanzlichen LTPs zeichnet sich durch eine große Ähnlichkeit der einzelnen Vertreter aus. Die pflanzlichen LTPs enthalten kein Tryptophan und weisen wie alle anderen LTP 8 Cystein-Aminosäuren auf, die in 4 Disulfidbrücken involviert sind. Sie sind basische (pI ca. 9), niedermolekulare Proteine 7-10 KDa (Kader 1996) und sind in der Lage, Phospholipide zwischen Plasmamembran und der Cuticula oder zwischen Plasmamembranen zu transportieren.

Die sekundäre Struktur der LTPs zeigen typische α -Helices und ein N-Terminus mit einem hydrophoben Stück (Kader 1996). LTPs haben die chemische Besonderheit, dass sie gegenüber Hitze, Säure und anderen denaturierenden Chemikalien resistent sind (Hincha et al 2001).

Da die Familie der LTPs die am häufigsten vorkommenden Proteine in dem cuticulären Wachs von Brokkoli (Pyee & Kolattukudy 1995) sind, wird die Gen-Familie der LTPs mit *wax9* bezeichnet (Pyee et al 1994). Die WAX9-Familie besteht aus 5 Mitgliedern WAX9A, B, C, D und WAX9E. Alle codierende cDNA für Wax9-Mitglieder konnten isoliert und sequenziert werden. Fünf homologe Regionen mit einer TATA-Box-Region, deren Position hochkonserviert ist, gibt es in allen Genen dieser Genfamilie. Die fünf homologen Gene codieren bei Polypeptiden mit einer Länge zwischen 117 und 120 Aminosäuren, die zu 75-95 % identisch sind. Während WAX9D aus dem cuticulären Wachs von Brokkoli (*Brassica oleracea*) isoliert werden konnte, konnte WAX9E aus dem cuticulären Wachs von Kohl (*Brassica oleracea*) isoliert werden. WAX9A, WAX9B und WAX9C wurden gemeinsam durch Screening einer genomischen Bibliothek gefunden und sequenziert (Pyee & Kolattukudy 1995). In den kodierenden Bereichen ist die WAX9A-Sequenz zu 96 % identisch mit der von WAX9E, während sich WAX9B und WAX9D zu 88 % gleichen. Das Gen WAX9C ist ein Homolog des Gens WAX9D.

Durch in *E. coli*-Klonierung und Expression aller bekannten Vertreter der *wax9*-Genfamilie und Messung der Frostschutz- und Lipidtransfer-Aktivität wurde gefunden, dass nur zwei

Isoformen der WAX9-Proteine (WAX9B und WAX9E) Lipidtransferaktivität aber keine Frostschutzaktivität besitzen. Zwei weitere Vertreter (WAX9A und WAX9D) sind Kryoprotektine, können aber Lipide nicht transferieren. Die Kryoprotektion ist daher eine neue funktionale Eigenschaft der WAX9-Proteine. Wie die kryoprotektiven WAX9-Proteine funktionieren und wie sie sich auf den Frostschutz auswirken ist bis jetzt nicht ganz klar (Schilling 2003).

2 Zielsetzung der Arbeit

Für genauere Charakterisierung von WAX9-Proteinfamilie bzw. von Kryoprotektin CPP, war es wichtig, in Hinblick auf ihre Eigenschaften wie Molekulargewicht, Frostschutz- und Lipidtransfer-Aktivität zu vergleichen. Dafür war es notwendig die folgenden Fragen zu beantworten:

- Besitzen alle Mitglieder der WAX9-Familie und auch das CPP die beiden LTP- und Gefrierschutz -Aktivitäten oder jeweils besitzt nur eine dieser Aktivitäten?
- Ist die kryoprotektive Aktivität der WAX9-Proteinfamilie eine pleiotrope Eigenschaft von LTPs (Hincha et al 1996) oder ist es eine andere separate Eigenschaft.
- Ist die Bindung von Proteinen an die Thylakoidmembranen eine Voraussetzung für die kryoprotektive Wirkung oder gibt es keinen Zusammenhang zwischen den beiden Eigenschaften?

Durch Computersimulation der Bindung von Proteinen an die Membranen hat Herr Dr. De Lamotte vorhergesagt, dass das lipidtransferaktive WAX9E schwächer als das kryoprotektive WAX9D an die Membranen bindet. Diese Vorhersage sollte experimentell überprüft werden.

Bis jetzt war es noch nicht gelungen, WAX9-Proteine in *E. coli* in hoher Menge funktionell zu exprimieren, um anschließende Untersuchungen durchzuführen (Schilling 2003). Deswegen war ein Expressionssystem, das eine hohe Proteinausbeute liefern kann, und eine Reinigungsmethode, welche eine Einsparungsmöglichkeit von Zeit und Arbeit und auch die Möglichkeit einer längeren Lagerung der exprimierten Proteine ermöglicht, eine Voraussetzung zur Erreichung der genannten wissenschaftlichen Ziele.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und Apparaturen

Agarose-Elektrophorese-Kammern, Proteingelelektrophorese, Tank-Blot-Kammer, PH-Meter, Blockthermostat, Spectrophotometer, Pharmacia GradiFracto System, Pharmacia LKB RIC 102, LKB Microperpex Pumpe, Säulen von Pharmacia Fine Chemicals, Sonifier, Stromversorgungsgeräte, Ultraschall-Wasserbad, Vaccumspumpe, 5-Liter Labormixer, Zentrifugen, Spectrophotometer, Laborschüttler, Eppendorf Thermostat plus, UNIVAPO150H Concentrator Zentrifuge (Speed Vac), PCR-Gerät, Waagen, Wasserbäder

3.2 Chemikalien, Kits, Gene, Antikörper

3.2.1 Chemikalien

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

3.2.2 Kits

QIAGEN, QIAprep®Spin Miniprep Kit 250, QIAGEN, QIAquick®Gel Extraction Kit 250, QIAGEN-Plasmid Midi Kit 100, QIAGEN-Plasmid Mini Kit 25 cat Nr 12123, NucleoSpin®Extract II, CloneJET™ PCR Cloning Kit, Ligation with T4 DNA Ligase (Fermentas), EasyComp-Kits K1730-01 (Invitrogen), EasyComp Transformation-Kit (Invitrogen)

3.2.3 Gene

Tabelle 1: Verwendete *Wax9*-Gene

	Acc. No. (NCIB)	Referenz
<i>wax9A</i>	L33904	(Pyee & Kolattukudy 1995)
<i>wax9B</i>	L33905	(Pyee & Kolattukudy 1995)
<i>wax9D</i>	L33907	(Pyee & Kolattukudy 1995)
<i>wax9E</i>	AF093751	(Hincha et al 2001)

3.2.4 Antikörper

Tabelle 2: Verwendete Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Herkunft</i>
-------------------	-----------------

Polyclonal Anti-WAX9
70-6515 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP

Hincha et al 2001
Bio-Rad

3.3 Verwendete Organismen und Kulturen

3.3.1 Stamm und Kulturen von *E. coli*

Die für die Klonierung verwendeten *E. coli* Stämme XL1-blue (Stratagene, La Jolla) wurden in LB-Medium über Nacht unter Schütteln bei 37 °C kultiviert. Nach Transformation mit *pJET1.2/Blunt Cloning* oder mit *pPICZα* Vektor wurde das entsprechende Antibiotikum zum Nährmedium gegeben (Ampicillin oder Zeocin). Die Herstellung von Nährbodenplatten erfolgte unter Zusatz von Agar zum LB-Medium. Die erfolgreichen transformierten Klone konnten auf den LB-Platten wachsen. Die Lagerung der *E. coli* Stämme bei -80 °C erfolgte unter Zugabe von Glycerin zum Zellpellet.

LB-Medium (Ansatz für 1 Liter)

10g NaCl
10g Bacto-Trypton
5g Hefeextrakt
Mit A. bidest. ad 1 L (pH 7, 4)

Low Salt LB (Ansatz für 1 Liter)

wie LB, aber 5g NaCl

LB-Amp- oder Zeo-Agarplatten (Ansatz für 1 Liter)

10g NaCl
10g Bacto-Trypton
5g Hefeextrakt
15g Bacto-Agar
Mit A. bidest. ad 1 L (pH 7, 4)

Sämtliche Medien wurden bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert. Diesem Medium wurde kurz vor dem Gebrauch nach Bedarf (100µg Ampicillin oder 25µg Zeocin/ml Medium) zugefügt.

3.3.2 Stamm und Kulturen von *Pichia pastoris*

Es wurde der *Pichia pastoris* Wild Typ X33-Stamm verwendet. Dieser Stamm wurde von der Firma Invitrogen bezogen. Die Hefen *Pichia pastoris* wurden direkt aus einem bei -80 °C gelagerten Glycerinstock auf festes YPD Agar-Medium gestrichen und ü. N. bei 28 °C inkubiert. Die Petrischalen wurden dann bei 4 °C aufbewahrt. Alle zwei Wochen wurden die Hefekolonien erneut ausplattiert, da sie bei 4 °C weiter wachsen. Von diesen YPD-Agar-

Kulturen konnten flüssige Kulturen angesetzt werden. Die *Pichia pastoris* Stämme wurden in flüssigem YPD-Medium 20 Stunden bei 28 °C unter Schütteln kultiviert. Das verwendete Selektionsantibiotikum war Zeocin™ (Invitrogen). Die Endkonzentration betrug 25 µg/ml.

YPD -Medium (Yeast Extract Peptone Dextrose) Ansatz für 1 Liter

10 g Hefeextrakt
20 g Pepton aus Casein
20 g Glucose
Mit A. bidest. ad 1 L

YPD-Agar -Medium (Yeast Extract Peptone Dextrose) Ansatz für 1 Liter

10 g Hefeextrakt
20 g Pepton aus Casein
20 g Glucose
20 g Agar
Mit A. bidest. ad 1 L

3.3.3 Anzucht der Pflanzen und Isolierung von Proteinen und Thylakoiden

3.3.3.1 Anzucht von Spinatpflanzen

Die Spinatpflanzen (*Spinacia oleracea L. cv. Monnopa*) wurden aus Saatgut der Firma Julius Wagner GmbH gezogen. Die Pflanzen wurden in 50x30 cm großen Pflanzschalen in der Klimakammer bei 25 °C am Tag und 15 °C in der Nacht mit einem Lichtregime von 14 Stunden Helligkeit ($150 \mu \text{ mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) und 10 Stunden Dunkelheit kultiviert.

3.3.3.2 Anzucht von Wirsingkohl

Das Saatgut von den verwendeten Wirsingkohlpflanzen (*Brassica oleracea convar. Capitata var. Sabauda L. cv. Tasmania*) stammt von der Firma Syngente Agro GmbH. Wirsingkohl wurde in Töpfe von 20 cm Durchmesser in der Klimakammer verpflanzt. Der Lichtzyklus hatte 14 Stunden Helligkeit und 10 Stunden Dunkelheit. Die Lichtstärke der Flora-F Pflanzlichtlampe lag zwischen 2000 und 2500 Lux ($150 \mu \text{ mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Nach drei Wochen wurden die jungen Pflanzen entweder im freiem Land verpflanzt und im Winter nach der Härtung in der Natur genommen, oder in einem Kühlraum bei 5 °C für 14 Tage vorgehärtet. Die Blätter wurden geerntet und für eine längerfristige Lagerung bei -20 °C eingefroren. Von diesen gehärteten Wirsingkohlpflanzen konnten wir das Protein mit kryoprotektiver Aktivität isolieren.

3.3.3.3 Isolierung von Thylakoidmembranen aus ungehärteten Spinatpflanzen

Von den Spinatblättern wurden 50g mit einem 2L-Labormixer in 100 ml eiskaltem Thylakoidisolationspuffer für 10 Sekunden zerkleinert und durch eine Gaze gedrückt. Anschließend wurde die Suspension bei 4300 g für 5 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wurde in 5 mM NaCl (Waschlösung) resuspendiert und bei 7500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und dieser Schritt dann zweimal wiederholt. Danach wurde eine Chlorophyllbestimmung nach (Arnon 1949) durchgeführt, um einen festen Wert für die Konzentration an Thylakoiden zu erreichen.

Thylakoidisolationspuffer:

240 mM Saccharose

160 mM NaCl

1 mM MgCl₂ (Hexahydrat)

1 mM MnCl₂ (Dihydrat)

2 mM EDTA

1 mM KH₂PO₄

50 mM Tris

Mit 37 % HCl auf pH 7.8 einstellen und mit A. Bidest. ad 1 L. Vor der Benutzung frisch zugeben: 1.25 mM Na Ascorbat und 3.3 mM Cystein.

3.3.3.4 Chlorophyllbestimmung

Nach Arnon wurden 10 µl Thylakoidsuspension mit 990 µl 80 %igem Aceton gemischt. Das Präzipitierte Protein wurde durch eine zweiminütige Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge-14000 rpm) entfernt. Der Überstand wurde im Photometer bei 645 bzw. 663 nm gegen 80 % Aceton gemessen (Arnon 1949). Die Konzentration soll am Ende 1mg Chlorophyllgehalt/ml betragen. Die folgende Gleichung gibt Aufschluss über die Chlorophyllkonzentration:

$$20, 2 \times \text{Messwert}_{(645\text{nm})} + 8, 02 \times \text{Messwert}_{(663\text{nm})} = \text{Xmg Chlorophyll} / 10 \text{ ml}$$

3.3.3.5 Isolierung von Kryoprotektin aus Wirsing Kohl (*Brassica oleracea*)

Diese Methode wurde von (Sieg et al 1996) verwendet. Von den gehärteten Wirsingkohlblättern wurden ca.1000 g mit ca. 600 ml Homogenisationspuffer in einem 5 L-Labormixer mehrmals homogenisiert. Danach wurde der Mix durch eine Gaze (50µm große Poren) filtriert. Das Filtrat wurde 30 Minuten bei 23000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 100 °C ca. 8 Minuten inkubiert. Danach wurde die Lösung sofort in einem Eisbad abgekühlt und bei 23000 g 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 4,0 eingestellt, 15 Minuten bei 23000 g zentrifugiert und

dem Überstand Polyamid-6-Matrix zugegeben, bis die Lösung trübe wurde. Die Mischung wurde 20 Minuten bei 4 °C gerührt. Danach wurde die Mischung filtriert. Anschließend wurde die Lösung mit 60 % Sättigung Ammoniumsulfat gefällt (390 g für 1L) und eine Stunde im Kühlraum gerührt. Die ausgefällte Proteinlösung kann mehrere Monate bei 4 °C gelagert werden.

Homogenisationspuffer:

50 mM Tris, 2 mM EDTA, 2 % Polyclar (w/v), 300 µM Mercaptobenzothiazole (Frisch zugeben) auf pH 7.8 mit 99 %ige Essigsäure einstellen.

3.4 Plasmide

3.4.1 *pJET1.2/blunt* cloning Vektor

Für die Sequenzierung wurde in dieser Arbeit ein *wax9*-Gen mit dem *pJET1.2/Blunt Cloning* Vektor, der Resistenz gegen Ampicillin hat, in die DNA von *E. coli* eingebaut.

3.4.2 Expressionsvektor *pPICZa*

Für die Proteinüberexpression wurde der Vektor *pPICZa* (Invitrogen-Firma), der Resistenz gegen Zeocin hat, verwendet.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Extraktion genomischer DNA aus Wirsingkohl mittels CTAB-Methode

Um alle Vertreter der *wax9*-Genfamilie zu klonieren, musste die genomische DNA aus *Brassica oleracea* (z.B Wirsingkohl) isoliert werden. Die DNA-Isolierung erfolgte nach einem Standardprotokoll der CTAB-Methode (Sambrook et al 1989). CTAB ist ein ionisches Detergenz: Es inaktiviert Nukleasen und löst Membranen auf. CTAB-DNA-Salz ist zwar in wässriger Lösung löslich, jedoch nicht bei höheren Alkohol-Konzentrationen. 250 mg Blattgewebe wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und mit Mörser und Pistill zu Puder gerieben. Der Puder wurde mit etwa 500 µl CTAB-Puffer gemischt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Inkubation für ca. 5 min bei 68 °C in einem Wasserbad wurde das gleiche Volumen von 500 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) hinzugefügt und für 20 Sec kräftig gevortext. Das Gemisch wurde bei 13000 rpm für 5 min zentrifugiert. Von der Oberphase (enthält die DNA) wurde ca. 400 µl in ein frisches 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zu der abgenommenen Oberphase wurde 0.7-0.8 Volumen (300 µl pro 400 µl

Probe) Isopropanol zugegeben, kräftig gevortext und bei 13000 rpm für 5 min nochmals zentrifugiert. Bei diesem Schritt fallen die Nukleinsäuren aus. Vorsichtig wurde der Überstand abgesaugt, so dass kein Überstand blieb (falls nötig nochmal Zentrifugation und mit 20 µl-Pipette und weißer Spitze entfernen). Mit 70 % Ethanol wurde das Pellet gewaschen und nochmals bei 13000 rpm für 5 Min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und die letzten Reste des Überstands wie oben entfernt. Unter einer Glühlampe wurde das Pellet getrocknet und anschließend in 50 µl TE-Puffer für ca.10 Min in 68 °C Wasserbad (zwischendurch 2-3 x gevortext) gelöst.

Material: CTAB Puffer, Microfuge Tube, Mörser und Pistill, Liquid Nitrogen, Microfuge, 70 % Ethanol (Eis), 7.5 M Ammonium Acetate, 55 °C Wasserbad , Chloroform:Isoamylalkohol (24:1), Wasser (steril), Agarose, 6x Loading Puffer, 1x TBE Lösung, Agarose Gelelektrophorese System, Ethidiumbromide-Lösung

CTAB Puffer 100ml:

2 g CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid), 10 ml 1 M Tris pH 8., 4 ml 0.5M EDTA pH 8 (Ethylenediaminetetraacetic Acid Di-Sodium Salt), 28 ml 5M NaCl, 40 ml H₂O, 1 g PVP 40 (Polyvinyl pyrrolidone (vinylpyrrolidone homopolymer) Mw 40.000), Alle werden auf pH 5 mit HCl eingestellt und auf 100 ml mit H₂O (steril) gefüllt.

TBE 10x: 0.89 M Tris-HCl, 0.89 M Borsäure, 1 mM EDTA, pH 7.9

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA autoklavieren.

3.5.2 Fällung und DNA-Konzentrationsbestimmung

Um die DNA-Menge zu konzentrieren, fällt man die DNA mit Ethanol oder Isopropanol. In Anwesenheit einwertiger Kationen bildet sich ein DNA-Präzipitat, das mit Hilfe der Zentrifugation sedimentieren kann. Bei der Fällung mit Ethanol wird die DNA-Lösung mit dem 2,5-fachen Volumen an absolutem Ethanol versetzt. Nach gründlichem Mischen erfolgte die Fällung mindestens 30 min bei -20 °C. Nach zweimaliger Waschung des Sediments mit 70 %igem Ethanol wurde es für 2 min bei 37 °C oder in einer „Speed Vac“ getrocknet. Mit 0,1-1 x TE-Puffer wurde es aufgenommen. Bei der Fällung mit Isopropanol wurde die DNA-Lösung mit dem 0,7- fachen Volumen an Isopropanol versetzt und für 30 min bei RT inkubiert. Dann wurde sie zentrifugiert und mit Ethanol gewaschen.

Die Bestimmung einer DNA-Konzentration wird im Labor photometrisch, basierend auf dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Eine OD₂₆₀ =1 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelner DNA. Durch die Berechnung des Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ wurde die Reinheit der DNA-Lösung bestimmt, da

kontaminierende Proteine aufgrund ihrer aromatischen Aminosäuren ein Absorptionsmaximum bei 280 nm aufweisen. Bei einer reinen DNA-Lösung liegt dieser Quotient bei 1.8.

3.5.3 Polymerase-Kettenreaktion PCR zur Vervielfältigung der DNA

Die Polymerase-Kettenreaktion PCR (Polymerase Chain Reaktion) ist eine Labortechnologie, die im Jahr 1983 entdeckt wurde. Mit der PCR konnte von bestimmten Abschnitten der DNA *in vitro* in einer exponentiellen Amplifikation eine Vielzahl von Kopien angefertigt werden, d.h. ohne einen lebenden Organismus wie z.B. *E. coli* zu benutzen. Dabei kann es sich um einen Teil eines Gens oder um ein Gen handeln oder auch um nicht kodierende DNA-Sequenzen.

Um sich zu vermehren, muss die Zelle eine Kopie von ihrer eigenen DNA anfertigen können. Die lebenden Zellen haben natürlich die notwendigen Mittel zur Vervielfältigung von DNA in sich. Mit der PCR-Technik kann man sich diese Mittel zunutze machen und viele DNA-Verdopplungsschritte hintereinander ablaufen lassen. Die PCR-Technik kann im Gegensatz zu lebenden Organismen nur relativ kurze DNA-Stücke (bis zu etwa 3.000 Basenpaare) amplifizieren. Nach ca. 20-30 Schritten erhält man also theoretisch etwa 1 Million Kopien.

Für die Polymerase-Kettenreaktion PCR benötigt man ein bestimmtes Polymerase-Gemisch von:

- Oligonucleotid-Primer, die zu dem gesuchten DNA-Strang passen. Sie binden an den gegenüberliegenden Strängen und flankieren die Zielsequenz.
- Eine hitzestabile Taq-Polymerase, welche die Elongation bei 72 °C katalysiert
- Taq-Polymerase-Puffer.

Nach einer vorgeschalteten, längeren Denaturierungsphase von 5 min bei 95 °C, wurden die 30 Zyklen gefahren. Der Vorgang läuft wie folgt ab:

- Denaturierung der doppelsträngiger DNA (95 °C für 1 min)
- Primerbindung (50-55 °C für 1 min)
- Primereelongation (72 °C für 1 min)

Es wurden die Taq-Polymerase, Taq-Puffer, dNTP und MgCl₂ von Invitrogen verwendet. Ein Standard-PCR Ansatz setzte sich zusammen aus:

1-2 μl Template DNA (z.B. 10 - 20 ng Plasmid/cDNA),
1 μl sense- Primer (25 μM), 1 μl antisense-Primer (25 μM),
1 μl dNTP-Mix (10 mM),
5 μl 10 x Puffer mit MgCl_2
0.25 μl Polymerase (5 U/ μl) und mit A. Bidest bis 50 μl Endvolumen eingesetzt.

3.5.4 Reinigung der PCR-Produkte

DNA-Fragmente aus PCR-Reaktionen, Restriktionen und anderen Ansätzen wurden über das PCR Purifikation Kit von NucleoSpin® Extract II aufgereinigt. Das folgende Protokoll eignet sich für die Reinigung sowie Konzentration und Entfernung der Salze, Enzyme, usw. von PCR-Produkten ohne SDS.

Ein Volumen der Probe (100 μl PCR-Produkte) wurde mit 2 Volumen (200 μl) des NT-Puffer (0.5 M Tris-HCl pH 8, 50 mM MgCl_2 0, 5 mg/ml BSA H₂O) gemischt. Eine NucleoSpin® Extract II Säule wurde in einem 2 ml Probensammelröhrchen (im Kit enthalten) gelegt und der Mix wurde auf die Säule geladen. Nach einer Zentrifugation für 1 min bei 11.000 g wurde der Durchfluss unten in dem Röhrchen entfernt. Um die Silica-Membran zu waschen wurden 700 μl NT3-Puffer (0.1 M Tris-HCl pH 8.7, 1 mM MgCl_2 , Vor Beginn zugeben 4-Volumen von 96-100 % Ethanol) in die NucleoSpin® Extract II Säule hinzugefügt und wieder eine Zentrifugation für 1 min bei 11.000 g durchgeführt. Nach Entfernung des Durchflusses wurde die Säule für 2 Min bei 11.000 g zentrifugiert, um das Ethanol (im NT3-Puffer) zu entfernen. Die gesamte Entfernung von Ethanol kann man durch Inkubation der Säule für 2-5 min bei 70 °C vor der Elution erreichen. Die Elution der DNA-Fragmente erfolgt mit NE-Puffer (5 mM Tris/HCl, pH 8.5). In ein neues 1.5 ml Mikrozentrifugenröhrchen wurde die NucleoSpin® Extract II Säule gelegt und mit 15-50 μl NE-Puffer bei Raumtemperatur für 1 min inkubiert und bei 11.000 g für 1 min zentrifugiert.

3.5.5 Trennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, um die DNA oder RNA nach ihrer Größe zu trennen. Als Trägermedium wird ein Agarosegel, das bei der Elektrophorese wie ein Sieb wirkt, verwendet. Es handelt sich um ein lineares Polysaccharid, das aus Rotalgen gewonnen wird. Die Porengröße des Gels kann man durch die Konzentration von Agarose festlegen. Da alle DNA-Moleküle eine negative elektrische

Nettoladung besitzen, wandern sie auf dem Gel im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Die kurzen DNA-Stücke wandern schneller zur Anode als die langen und ringförmigen DNA-Stücke. Verschiedene Faktoren beeinflussen die Geschwindigkeit der Wanderung von DNA-Molekülen; die Konzentration des Agarosegels, die Zusammensetzung des Laufpuffers, die angelegte Spannung, Temperatur und Basenzusammensetzung der DNA (doppelsträngige, linear oder einzelsträngig). Die Elektrophoresepuffer enthalten EDTA und Tris-Acetat, Tris-Borat (TBE) oder Tris-Phosphat (TPE) und werden im pH-Bereich 7.5-8.0 bei 50 mM Konzentration verwendet. Für gewöhnliche Elektrophorese wird TBE-Puffer als Elektrophoresepuffer verwendet.

Zur Auftrennung von DNA-Proben wurde die Agarose in Gegenwart des gewünschten Puffers geschmolzen (0.8 bis 1.5 g Agarose mit 100 ml 0.5x TBE-Puffer erhitzen). Nach Abkühlung wurde 1 µg/ml Ethidiumbromide (10 mg/ml) zugefügt und gut gemischt. Die Agarosegelelektrophorese wurde in einer Gelkammer in einem horizontalen Flachbett mit 0.5 M TBE-Puffer (0.045 M Tris-Borat, 0.001 M EDTA pH 8) durchgeführt. Vor dem Gelauftrag wurde die Probe mit 6x Gelladepuffer (Fermentas) gemischt. Nach dem Beladen des Gels mit der zu identifizierenden DNA wurde die Gelkammer an eine Stromquelle (nicht größer als 5 V/Cm; ca. 100 V/Gel) angeschlossen. Zur Identifizierung der DNA-Stücke lief in dem Gel ein Marker. Der Marker wurde mit 1µl GenRuler 100 pb DNA Lader Plus 0.5 µg/ml und 1µl von 6x Loading Dye Solution (Fermentas) mit 4µl A. bidest angesetzt. Die Lage der DNA im Gel kann direkt durch Anfärben mit Ethidiumbromide im UV-Licht bestimmt werden. 1-10 ng DNA sind noch nachweisbar.

Die Agarosestücke, die DNA-Fragmente enthalten, wurden ausgeschnitten, sowie die DNA über ein Gelextraktionskit (NucleoSpin® Extract II) isoliert. Das geschnittene DNA-Agarosestück (bis zu 200 mg) wurde in einem 1.5 ml Eppendorf-Gefäß gewogen und je 100 mg wurden 200 µl NT-Puffer hinzugefügt und bei 50 °C für 10 min aufgelöst. Dazwischen soll die Mischung 2-3-mal gevortext werden. Die in NT-Puffer gelösten DNA-Fragmente wurden auf die Säule (NucleoSpin® Extract II), die auf eine 1.5 ml Eppendorf festgelegt wurde, zugegeben und die Säule wurde bei 11000 g für 1 min zentrifugiert. Die Flüssigkeit unten wurde entfernt. Die Säule wurde mit 600 µl NT3-Puffer gewaschen und für 1 min zentrifugiert. Der Zentrifugationsvorgang wurde für 2 min wiederholt, um die ganze übrige Menge des NT3-Puffers zu entfernen. Die DNA-Fragmente wurden mit 25-50 µl NE-Puffer eluiert, für 1 min in Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 1 min /11000 g zentrifugiert. Die DNA kann so lange bei -20 °C oder bei 4 °C lagern.

3.5.6 Klonierung des *wax9*-Gens in den *pJET1.2/blunt cloning* Vektor

Der *pJET1.2/blunt* Vektor wurde zur Sequenzierung des *wax9*-Gens verwendet. Der Vektor zeichnet sich dadurch aus, dass die PCR-Produkte ohne vorherige Verdauung mit Restriktionsenzymen in den Genabschnitt eingeschleust werden können. Die Klonierung wurde nach Herstellerangaben (GeneJET™ PCR Cloning Kit- *Sticky-End Cloning Protocol*) durchgeführt. Dieses Protokoll wurde zur Klonierung von PCR-Produkten, die mit 3'-dA Überhängen durch Dream Taq DNA-Polymerase erzeugt werden, verwendet. Für die Ligation von DNA-Fragmenten ist es notwendig, dass die DNA-Fragmente kompatible Enden besitzen. Durch Blunting-Enzym können glatte Enden (blunt ends) durch Entfernen der 3'-dA Überhängen und Auffüllen der 5'-Überhängen entstehen. Nucleotide für diese Reaktion sind im Reaktionspuffer enthalten. Das so modifizierte DNA-Fragment lässt sich mit dem linearisierten *pJet1.2/blunt* Vektor, was ebenfalls glatte Enden besitzt, ligieren. Für die Blunt-Reaktion wurden die folgenden Ansätze benutzt:

10 µl von 2x Reaktionspuffer wurden mit 1-2 µl PCR-Produkt und bis zu 17 µl mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt, gut gemischt und dann wurde 1 µl DNA Blunting-Enzym hinzugefügt. Das gesamte Volumen von 18 µl wurde kurz gevortext und für 3-5 Sekunden zentrifugiert. Der Ansatz wurde bei 70 °C für 5 min dann kurz auf Eis inkubiert und zur Ligation benutzt.

3.5.6.1 Ligation in den *pJET1.2/blunt cloning* Vektor

Die Ligation ist die Verknüpfung des Inserts mit einem Vektor. Für die Ligation eines Insert wird neben einem offenen Vektor eine Ligase, um die Veresterungsreaktion zu katalysieren, benötigt. Die Ligation wurde nach (GeneJET™ PCR Cloning Kit) durchgeführt. Zum Ansatz wurde 1 µl *pJET1.2/blunt cloning* Vektor (50 ng/µl) und 1 µl T4 DNA-Ligase (5u /µl) hinzugefügt. Der gesamte 20 µl Ligationsansatz wurde kurz gevortext, für 3-5 Sekunden zentrifugiert und für 5-30 min bei Raumtemperatur (22 °C) inkubiert und direkt in den kompetenten *E. coli*-Stamm XL-blue transformiert

3.5.6.2 Herstellung von chemischen kompetenten *E. coli*-Zellen

Die kompetenten Zellen sind die Zellen, welche die Fähigkeit haben, fremde DNA aufnehmen zu können. In der Natur gibt es einige Bakterienstämme, die diese Fähigkeit besitzen. Sie können DNA ohne besondere Vorbehandlung aufnehmen. Diese Eigenschaft nennt man

natürliche Kompetenz (wie z.B. *Streptococcus pneumoniae*). Die direkte Aufnahmefähigkeit von DNA und die stabile Weitergabe dieser Information wird Transformation genannt. Das gramnegative Bakterium *Escherichia coli* besitzt keine natürliche Kompetenz kann aber durch verschiedene Methoden kompetent gemacht werden.

Durch Behandlung der *E. coli* Bakterien mit Rubidiumchlorid oder Manganchlorid, oder mit zweiwertigen Ionen (meist Ca^{++}) wird die Durchlässigkeit der Membran verändert und die Permeabilität der Zellmembran kurzzeitig erhöht. Die Zellen sind in der Lage, fremde DNA aus dem Medium aufzunehmen.

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 50 ml LB-Medium mit einer geringen Menge von *E. coli* (in $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert - nach Auftauen in Raumtemperatur) beimpft und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}/160\text{-}200\text{ rpm}$ geschüttelt. Von dem Mix wurde 1:100 mit einem neuen Medium (LB-Medium, 20 mM Glucose, 20 mM Mg^{++}) gemischt und für 2-3 Stunden bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}/160\text{-}200\text{ rpm}$ bis zu einer OD 600 nm von ca. 0.5 - 0.6 geschüttelt. Der Mix wurde für 15 min in Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 3000 rpm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min wurde das Pellet gewonnen und mit 1/2 des Ausgangsvolumens von abgekühlten 50 mM CaCl_2 (also 50 ml 50mM CaCl_2) resuspendiert und für 30 min in Eis inkubiert. Nach der zweiten Zentrifugation bei 3000 rpm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min wurde das Pellet in 1/15 des Ausgangsvolumens (3.3 ml) von eisgekühltem LB-Puffer vorsichtig resuspendiert und in Eis für 30 min inkubiert. Die Zellen wurden in 1.5 ml Eppendorf je 200 μl aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff für 2-3 min durchgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

3.5.6.3 Transformation von *pJET1.2/blunt* cloning-DNA-Plasmid in *E. coli*

Der Ligationsansatz wurde nach der Inkubationszeit direkt in den kompetenten *E. coli*-Stamm XL-blue transformiert. Die tiefgefrorenen (200 μl) *E. Coli* kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit dem gesamten 20 μl Ligationsansatz versetzt. Der Transformationsmix wird 20 min in Eis inkubiert. Daraufhin folgte ein Hitzeschock bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 90 Sec. Nach 5-minütiger Abkühlung auf Eis wurden 800 μl LB-Medium hinzugegeben und die *E. coli*-Zellen für 60-90 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ kultiviert, damit die auf der eingesetzten DNA kodierte Antibiotikaresistenz ausgeprägt wird. Anschließend wurden die Bakterien auf Ampicillinhaltigen LB Agar-Platten (100 μg Ampicillin /ml Medium) ausplattiert (jeweils 20 μl , 50 μl , 200 μl , und der ganze Rest der Kultur) und über

Nacht bei 37 °C inkubiert, so dass nur die transformierten Klone auf den LB-Amp-Platten wachsen können.

Im *pJET1.2/blunt* Vektor liegt die Klonierungsstelle inmitten eines Genabschnittes, der für das Wirtsbakterium letales Restriktionsenzym codiert. Bei der Ligation der DNA in der Klonierungsstelle des Plasmids wird dieses Enzym zerstört. Die Zellen mit rekombinantem Plasmid sind nur fähig zu wachsen, was den Gebrauch von blue/white screening unnötig macht. Bei nicht erfolgter Klonierung wird dieses Enzym exprimiert und tötet das nicht erfolgreich transformierte Bakterium ab (positive Selektion).

3.5.6.4 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung der Transformationseffizienz in *E. coli* wurden die Kolonien von LB-Platten abgenommen und in 20 µl sterilem Wasser 10 min bei 99 °C zerstört, um die Plasmide der PCR zugänglich zu machen. Danach erfolgte eine Standard-PCR mit den entsprechenden Primern des im Plasmid eingefügten Gens. Die PCR-Produkte wurden auf 1.5 %iges Agarosegel aufgetragen und Plasmide wurden isoliert und sequenziert.

3.5.6.5 Restriktionsverdauung von DNA-Molekülen aus dem *pJet1.2/blunt* Vektor

Die DNA-Fragmente wurden aus dem *pJet1.2/blunt* Vektor durch die Restriktionsenzyme *XbaI* und *XhoI* (Tab 3), die doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen binden und spalten, geschnitten, isoliert und nachher in den mit gleichen Restriktionsenzyme *XbaI* und *XhoI* geschnittenen *pPICZα*-Vektor ligiert. Mit der Verwendung der bakteriellen Restriktionsendonukleasen, welche die DNA sequenzspezifisch schneiden, entstehen 5'- bzw. 3'-Überhänge „stickyends“ oder doppelsträngige DNA-Enden „bluntends“. Die Restriktionsendonukleasen dienen zur Fragmentierung von DNA und auch Plasmiden, um *in vitro* Rekombination neue Plasmiden herzustellen.

Für den Restriktionsvorgang wurde ca. 20 µg DNA 1/10 Volumen des entsprechenden 10 x Restriktionspuffers (Fermentas) zugefügt. Pro 1µg DNA wurden 1-5 Units des Restriktionsenzym eingesetzt. Der Restriktionsvorgang dauert 1-2 h bei 37 °C. Um eine vollständige Verdauung zu gewährleisten, kann auch ÜN verdaut werden.

Tabelle 3: Verwendete Enzyme bei der Klonierung

Enzym	Quelle	Erkennungssequenz	Spaltsequenz
<i>XbaI</i>	<i>Xanthomonas badrii</i>	5-TCTAGA-3	5-T..CTAGA-3
		3-AGATCT-5	3-AGATC..T-5
<i>XhoI</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>	5-CTCGAG-3	5-C..TCGAG-3
		3-GAGCTC-5	3-GAGCT..C-5

3.5.7 Klonierung des *wax9*-Gens in den Expressionsvektor *pPICZα* Vektor

Um das Gen nachher in *Pichia pastoris* zu transformieren und zu exprimieren, wurde das Expressionsvektor *pPICZα* als Shuttle-Vektor verwendet. Das ringförmige *pPICZα* Plasmid (mit 3329 Nucleotiden) kann sowohl in *E. coli*, als auch in *Pichia pastoris* repliziert werden. Es enthält einen Replikationsstartpunkt für *E. coli* und verschiedene Selektionsmarkergene für beiderlei Organismen (Cregg et al 2000). *pPICZα* enthält zur Selektion positiver Transformanten ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Zeocin, das stark toxisch auf Bakterien, Pilze, Pflanzen und Säugetierzellen wirkt.

3.5.7.1 Restriktionsverdauung des *pPICZα* Vektors

Die Verdauung des *pPICZα*-Vektors erfolgt mit den gleichen *XbaI* und *XhoI* Enzyme. Je nach Konzentration werden 1-5 µl Vektor-DNA mit 1 µl der Enzymlösung und 1/10 des Endvolumens an Enzympuffer (10x) auf ein Endvolumen von 10-20 µl mit sterilem H₂O verdünnt und 1-2 h bei 37 °C inkubiert.

3.5.7.2 Ligation von DNA-Fragmenten mit *pPICZα*-Vektor

Die Ligation erfolgte nach dem Protokoll "Ligation with T4 DNA Ligase" (Fermentas). Die DNA-Fragmente, die Vektoren und das T4-Enzym wurden zusammengesetzt. Das Enzym DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert in Anwesenheit von ATP die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen doppelsträngiger DNA-Moleküle. Pro Ligationsansatz wird die Ligasekonzentration üblicherweise auf 1 U/10 µl eingestellt. An Vektor-DNA werden 100-200 ng eingesetzt und die 4-5 fache Molarität an Insert-DNA. Es wird 1µl des vom Hersteller mitgelieferten 10-fach Puffers zugegeben und das Endvolumen mit sterilem Bdest. Wasser auf 10 µl eingestellt. Der Ansatz wird bei 16 °C im Wasserbad ÜN inkubiert.

3.5.7.3 Transformation von pPICZ α -DNA-Plasmid in *E. coli*

Der Ligationsansatz wurde am nächsten Tag in den kompetenten *E. coli*-Stamm XL1-Blue transformiert. Der Transformationsvorgang heißt: eine gereinigte, rekombinante Fremd-DNA wird in den Kompetenten Zellen eingebracht. Die tiefgefrorenen (200 μ l) *E. Coli* kompetenten Zellen wurden nach Auftauen mit bis zu 20 μ l eines pPICZ α -Vektor-DNA Ligationsansatz versetzt und 20 min in Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sec wurden die *E. coli*-Zellen für 5 Minuten auf Eis abgekühlt, 800 μ l LB-Medium hinzugegeben und für 60-90 min bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien auf Zeocinhaltigen LB Agar-Platten (25 μ g ZeocinTM /ml Medium) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert, so dass nur die transformierten Klone auf den LB-Zeo-Platten wachsen können.

3.5.7.4 Kolonie-PCR

Eine Standard-PCR mit den entsprechenden Primern des im Plasmid eingefügten Gens wurde durchgeführt. Nach der Trennung der PCR-Produkte mittels 1.5 %iges Agarosegel wurden Plasmide isoliert und sequenziert.

3.5.7.5 Isolierung von Plasmid-DNA *E. coli*-Zellen

Mit Hilfe des Kit (QIAGEN-Plasmid Mini Kit 25 cat. No. 12123) erfolgte die Isolierung von pPICZ α -DNA-Plasmid aus Bakterienzellen. Vor der Verwendung der RNaseA Lösung soll in Puffer P1 (Resuspension Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8, 10 mM EDTA, RNase A 100 μ g/ml) hinzugefügt werden. Puffer P1/RNaseA und Puffer P3 sollten bei 2-8 °C gelagert werden und sind für 6 Monate stabil. Die anderen Puffer sind bei Raumtemperatur gelagert. Wenn es im Puffer P2 SDS Niederschläge aufgrund der niedrigen Lagertemperaturen gibt, sollte sie durch Erwärmen auf 37 °C aufgelöst werden.

3 ml LB-Zeocin-Medium wurden mit einem Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 37 °C /180 rpm geschüttelt. Diese Bakterienkultur wurde zentrifugiert (14000 rpm für 5 Min in 4 °C) und das Bakterienpellet in 300 μ l abgekühltem P1/RNaseA Puffer resuspendiert. Die Bakterien wurden komplett resuspendiert, so dass keine Zellenaggregate geblieben wurden. Der Puffer P2 (Lysis Puffer: 200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS) wurde hinzugefügt und vorsichtig (keinen Vortex, weil dies zu einem Scheren der genomischen DNA führen würde) gemischt und die Mischung bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Die Phospholipide und Proteinkomponenten der Zellwand wurden durch eine Zugabe von P2-Puffer, das ein SDS-

Detergenz enthält, gelöst. Die Chromosomale und Plasmid-DNA sowie die Proteine wurden durch NaOH denaturiert. Die Lyse-Reaktion sollte nicht länger als 5 min ablaufen. Der gekühlte P3-Puffer (Neutralisation Puffer: 3 M Potassiumacetat pH 5.5) wurde hinzugefügt und sofort vorsichtig gemischt und für 5 Min auf Eis inkubiert. Die Niederschlagsmenge ist mit gekühltem P3-Puffer und Inkubation auf Eis verstärkt. Nach Zugabe des P3-Puffers wird die Lösung trübe und sehr zähflüssig. Um lokalisierte Kalium-Dodecylsulfat Niederschläge zu vermeiden, sollte die Lösung vorsichtig, aber gründlich, unmittelbar nach Zugabe des P3-Puffers gemischt werden. Die Mischung erfolgt durch 4-6-maliges Invertieren des Röhrchens. Nach Neutralisation der Probe konnten die kleinen Plasmidmoleküle wieder renaturieren. Denaturierte Proteine und nicht-renaturierte chromosomale DNA wurden von den anderen Bestandteilen durch Zentrifugation (14000 rpm, 10 min, 4 °C) abgetrennt. Der plasmidhaltige Überstand (sollte klar sein) enthielt eine hohe Konzentration an Salzen, die für die Absorption der Plasmid-DNA an das Silicagel benötigt wird.

Vor dem Auftragen der Probe (der klare Überstand) auf die Säule (QIAGEN-Tip 20) soll die Säule mit 1ml QBT-Puffer (750 mM NaCl, 50 mM MOPS (3-Morpholino-propan-sulfonsäure) pH 7, 15 % (v/v) Isopropanol, 0.15 % Triton X-100) äquilibrieren. Nach dem Auftragen der Probe auf die Säule wurde diese mit 4x 1ml QC-Puffer (Waschpuffer: 1 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7, 15 % (v/v) Isopropanol) gewaschen. Die DNA-Plasmide wurden mit 800 µl des QF-Puffers (1.25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 8.5, 15 % (v/v) Isopropanol) eluiert und in sauberen 1.5 ml-Tuben gesammelt. 0.7 Volumen Isopropanol (560 µl für 800 µl) wurde hinzugefügt, um die DNA-Plasmide zu sedimentieren. Nach einer Zentrifugation bei 10000 rpm für 30 min / 4 °C wurden die ausgefallenen weißen DNA-Pellets mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend zentrifugiert. Das 70 %ige Ethanol dient dazu, ausgefallene Salze zu entfernen, sowie Isopropanol mit Ethanol zu ersetzen, wodurch die DNA sich leichter wieder löst. Eine zweite Waschung mit 70 % Ethanol bei Raumtemperatur könnte die Ergebnisse bei mehreren Anwendungen in sensiblen Bereichen verbessern, wie Sequenzierung. Nach einer sorgfältigen und vollständigen Entfernung von Ethanol, das Pellet sollte kurz (ca. 5 min) luftgetrocknet werden, bevor es in einem rücklösenden entsprechenden Volumen TE-Puffer gelöst wird.

3.5.7.6 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Alle Sequenzierungsreaktionen wurden bei der Firma (GATC Biotech AG-Deutschland) durchgeführt.

3.5.7.7 Lagerung von E. Coli-Klonen

Um die transformierte XL1-Blue Bakterienklone langfristige aufzubewahren, wurden sie je nach Technik 15 - 50 % Glycerin zugesetzt und in -80 °C gefroren. Von den auf LB-Platten ausplattierten Bakterien wurde eine Übernachtskultur (10 ml LB-Medium) bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. 0.15 Volumina steriles Glycerin werden zu 0.85 Volumina Kultur in LB-Medium gegeben, gut gemischt und in flüssigem Stickstoff für 2-3 min eingefroren. Bei -80 °C können die Bakterienklone mehr als 2 Jahre aufbewahrt werden.

3.5.8 Herstellung kompetenter *Pichia pastoris*-Zellen und Transformation

Da die *E. coli* billig sind, schnell wachsen und das fremde Protein in großen Mengen produzieren, wurden sie in den meisten Laboren als Expressionssystem verwendet. *E. coli* können aber Proteine nicht glycosylieren, phosphorylieren, methylieren, acetylieren oder anders posttranslational modifizieren. Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit das eukaryotische Expressionssystem in *Pichia pastoris* verwendet.

3.5.8.1 Herstellung kompetenter *Pichia pastoris*-Zellen

Mit Hilfe eines EasyComp-Kits K1730-01 wurde die kompetente *Pichia pastoris* hergestellt. Eine Einzelkolonie von *Pichia pastoris* wurde in 10 ml YPD-Medium angeimpft und bei 28-30 °C in einem Schüttelinkubator (250-300 rpm/min) inkubiert. Die Übernachtskultur wurde mit YPD-Medium zu einer OD600 von 0.1-0.2 verdünnt und bei 28-30 °C noch einmal im Schüttelinkubator ca. 4 bis 6 Stunden bis die OD600 0.6-1 geschüttelt. Durch eine Zentrifugation bei 500 xg für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen sedimentiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 10 ml Lösung I (1 M Sorbitol / 5.7 % DMSO / 3 % Ethylenglykol / 10 mM Tricine-NaOH, pH 8.4, zur Herstellung der kompetenten Zellen) resuspendiert und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 500 xg für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Lösung I nochmal resuspendiert. Die Zellen wurden jetzt kompetent. Die kompetenten *Pichia*-Zellen wurden in sterilem Eppendorfgefäß für 50 bis 200µl aufgeteilt, bei Raumtemperatur aufbewahrt und sofort zur Transformation verwendet oder langsam auf -80 °C für die zukünftige Verwendung abgekühlt. Wichtig ist, dass die kompetenten Zellen nicht mit flüssigem Stickstoff einfrieren. Es wurden 50 µl kompetente Zellen für jede Transformation benutzt. Die Zellen können mehrmals aufgetaut und wieder eingefroren werden ohne signifikanten Verlust in der Transformationseffizienz.

3.5.8.2 Linearisierung des zu transformierenden *pPICZ α* -Vektors

Um die *Pichia pastoris*-Zellen mit dem rekombinanten *pPICZ α* -Plasmid, das mit Hilfe des Kits (QIAGEN-Plasmid Mini Kit 25 cat. No. 12123) aus transformierten Bakterienzellen isoliert wurde, zu transformieren, soll das Plasmid zuerst linearisiert werden. Für die Linearisierung wird das Restriktionsenzym *PmeI* (*MssI* Fermentas) benutzt. 20 μ g DNA-*pPICZ α* -Plasmid werden mit 20U Restriktionsenzym, 6 μ l A. bidest und 2 μ l Puffer über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach der Linearisierung wird die DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt, mit Ethanol gefällt und in 10 μ l Wasser aufgenommen. Das DNA-Plasmid kann bei -20 °C gelagert oder direkt für die Transformation eingesetzt werden.

3.5.8.3 Transformation von *pPICZ α* -DNA-Plasmid in *Pichia pastoris*

Die kompetenten *Pichia pastoris*-Zellen wurden mit dem linearisierten rekombinanten *pPICZ α* -Vektor transformiert. Durch die heterologe Rekombination nimmt die *Pichia*-Zelle das fremde DNA-Gen auf und vermehrt es mit ihrem Genom. Die Transformation von kompetentem *Pichia pastoris* erfolgte mit Hilfe des EasyComp Transformation-Kits (Invitrogen). Für jede Transformation wurden 50 μ l frische kompetente *Pichia pastoris* Stamm x33 Zellen verwendet oder 50 μ l von gefrorenen kompetenten Zellen bei Raumtemperatur aufgetaut. 3 μ g von linearisierter *Pichia* Expressionsvektor-DNA wurden an die kompetenten Zellen hinzugefügt. Die Verwendung von mehr als 3 μ g DNA erhöht in einigen Fällen die Transformationseffizienzen. Das Volumen des linearisierten DNA-*pPICZ α* -Vektors sollte nicht mehr als 5 μ l betragen. Die DNA kann direkt aus einer Restriktionsverdauungsreaktion genommen werden, ohne die Transformationseffizienz zu beeinflussen.

1 ml von Lösung II (40 % PEG Polyethylenglycol / 200 mM Tricine-NaOH, pH 8.4, zur Transformation der kompetenten Zellen) wurde an die DNA / Kompetenten Zell-Mischung zugegeben und durch Vortexen oder Bewegen des Eppendorfgefäßes wurde der Transformationsansatz gemischt eine Stunde bei 30 °C im Wasserbad oder im Inkubator inkubiert. Das Reaktionsgefäß muss alle 15 Minuten gevortext werden, ansonsten würde sich die Transformationseffizienz verringern. Um den Zellen einen Hitzeschock zuzufügen, wurden sie in einem 42 °C Heizblock oder im Wasserbad für 10 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden in 2 Reaktionsgefäße aufgeteilt und jedem 1 ml YPD-Medium (10 g Hefeextrakt / 20 g Pepton / 20 g Glucose per 1L) hinzugefügt und bei 30 °C für 1 Stunde inkubiert. Durch

eine Zentrifugation bei 3.000 xg für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen sedimentiert und der Überstand verworfen. Jedes Reaktionsgefäß wurde mit 500 µl Lösung III (0.15 M NaCl / 10 mM Tricine-NaOH, pH 8.4, zum Waschen und Plattieren transformierten Zellen) resuspendiert, in einem Gefäß zusammengesammelt und bei 3.000 xg für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstands wurde das Pellet mit 100-150µl Lösung III resuspendiert. Die gesamte Transformation wurde auf 25 µg/ml Zeocinhaltigen YPD Agar-Medium (10 g Hefeextrakt / 20 g Pepton aus Casein / 20 g Glucose / 20 g Agar per 1L) kultiviert und bei 28-30 °C für 3 bis 10 Tage inkubiert.

3.5.8.4 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung der Transformationseffizienz in *Pichia pastoris* wurde eine Kolonie-PCR angewendet. Die Pichiakolonien wurden von YPD-Platten abgenommen und in 20 µl sterilem Wasser 10 min bei 99 °C zerstört, um die Plasmide der PCR zugänglich zu machen. Danach erfolgte eine Standard-PCR mit den entsprechenden Primern des im Plasmid eingefügten Genes.

3.5.9 Expression von rekombinantem Protein in *Pichia pastoris*

Gegenüber bakteriellen Expressionssystemen hat die Expression in *Pichia pastoris* einen großen Vorteil: die Hefe ist in der Lage, posttranslationale Modifikationen durchzuführen. *Pichia pastoris* sowie die höheren Eukaryonten spalten im Laufe der Proteinprozessierung Signalsequenzen ab, bilden Disulfidbrücken aus, heften Lipide an, falten Proteine korrekt und desweiteren können sie Proteine O- und N-spezifisch Glycosylieren (Higgins & Cregg 1998).

Pichia pastoris ist eine methylotrophe Hefeart d. h. sie besitzt die Fähigkeit Methanol durch die Metabolisierung als einzige Kohlenstoff- bzw. Energiequelle nutzen (Higgins & Cregg 1998b). Das erste Enzym dieses Stoffwechselweges ist die Alkoholoxidase AOX. Die AOX oxidiert Methanol mit atmosphärischem Sauerstoff zu Formaldehyd Diese Reaktion, die in den Peroxisomen der Hefe abläuft, ist der erste Schritt der Metabolisierung. Als Nebenprodukt dieser Reaktion wird das toxische Wasserstoffperoxid produziert (Veenhuis et al 1983). Die Affinität der Alkoholoxidase zu Sauerstoff ist schwach, deswegen gleicht *Pichia pastoris* dies durch die Produktion großer Menge (bis zu 30 % des löslichen Gesamtproteinanteils der Zelle) des Enzyms aus (Higgins & Cregg 1998b). Bei der Nutzung von Glucose, Ethanol, Acetaldehyd oder Glycerin als Kohlenstoff- bzw. Energiequelle wird die Alkoholoxidase in der Zelle nicht exprimiert, da sie als Repressor wirken. Das Methanol

hebt diese Repression wieder auf und aus diesem Grunde kann der AOX-Promotor, der die Expression dieses Enzyms reguliert, durch den Wechsel von Glycerin-haltigem auf Methanol-haltiges Medium induzieren und somit als starker gentechnischer Promotor bei der heterologen Expression rekombinanter Proteine in *Pichia pastoris* verwendet werden (Koutz et al 1989). Mit der Verwendung dieses AOX-Promotors kann man Ausbeuten bis zu einem Gramm pro Liter Kultur erreichen (Ellis et al 1985).

Mit einer 97 % Übereinstimmung in den Aminosäuresequenzen existieren in *Pichia pastoris* zwei Gene (*AOX1* und *AOX2*) für Alkoholoxidasen. Im Gegensatz zum *AOX2*-Gen geht die Mehrheit der Alkoholoxidase-Aktivität der Zellen auf das *AOX1*-Gen zurück. Bei der Induktion wird die Expression des *AOX1* Gens stark induziert und nun verwendet, um die Expression der gewünschten heterologen Proteine zu induzieren (Koutz et al 1989).

Zwei Expressionsvektoren, *pPICZ* und *pPICZ α* mit dem „*Pichia pastoris*-Überexpressions-System“ (Invitrogen) erlauben die Überexpression von Proteinen. Bei der Verwendung von *pPICZ* verbleibt das rekombinante Protein intrazellulär. Im Gegensatz zu *pPICZ* besitzt der Vektor *pPICZ α* die Fähigkeit, das rekombinante Protein in den extrazellulären Raum auszuschleusen (Cregg et al 1993). Das Protein kann von *Pichia pastoris* sekretiert oder durch die heterologe Proteinexpression intrazellulär exprimiert werden. Um das Protein zu sekretieren, ist eine Signalsequenz notwendig, die das Protein zu dem sekretorischen Pathway leitet. Die Signalsequenz des α -Faktor Prepro Peptids aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde als Sekretionssignal verwendet.

Die Verwendung des Expressionsvektors *pPICZ α* bietet den Vorteil einer Reinigung des rekombinanten Proteins. Da *Pichia pastoris* nur in geringem Maße zelleigene Proteine in das extrazelluläre Medium sekretiert und das zur Überexpression verwendete Minimalmedium nur einen geringen Anteil von Proteinen enthält, liegt das rekombinant exprimierte Protein im Medium also in einer relativ reinen Form vor (Barr et al 1992) .

Die Expression kann in gepuffertem Vollmedium BMGY oder Minimalmedium BMGH und auch in ungepuffertem Minimalmedium MGY erfolgen. Der pH sinkt während der Induktion auf pH 3 oder darunter, dies beeinträchtigt die Hefen jedoch nicht. Die Induktion der 48-stündigen Überexpression wurde durch einen Wechsel des Minimalmediums von Glycerin-haltigem BMGH auf Methanol-haltiges BMMH erzielt.

Nach Integration der entsprechenden DNA in das Genom der Hefe erfolgt erst die Expression von Fremdgenen in *Pichia pastoris*. Durch ein „Cross Over-Ereignis“ zwischen der zu transformierenden DNA und homologen Regionen im Hefegenom erzeugen lineare DNA-Fragmente dabei stabile Transformanden durch homologe Rekombination (Cregg et al 1993). Die positiven transformierten Hefeklonen wuchsen für 4 Tage bei 30 °C auf YPD-Platten. Die Kultivierung (Vorkultur) von *Pichia*-Zellen nach der Transformation mit dem *pPICZα*-Vektor erfolgt über Nacht in BMGH-Minimalmedium. Für Vorkulturen wurden 100 ml BMGH mit einer Hefekolonie angeimpft und ü. N. bei 28 °C bei 180 rpm in einem 500 ml-Kolben bis zu einer optischen Dichte bei 600nm von ca. 2-4 geschüttelt. Das Selektionsantibiotikum Zeocin™ (Invitrogen) wurde zu jeder Flüssigkultur zugegeben. Die Endkonzentration betrug 25 µg/ml. Durch 5-minütige Zentrifugation bei 1500 xg und 4 °C werden die Hefezellen pelletiert. Das Sediment wurde resuspendiert und in einem 2L-Kolben mit 200 ml BMMH-Minimalmedium überimpft. Die Erlenmeyerkolben wurden mit einer sterilen Gaze verschlossen, um eine gute Luftzufuhr zu gewährleisten. 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 Proteinüberexpression in BMMH erfolgt in 2-5 Tagen bei 28 °C, 180 rpm. Damit die Methanol-Konzentration während der Expression nicht zu stark absinkt, wird alle 24 Stunden Methanol mit einer Endkonzentration von 0.5 % (v/v) zugegeben.

Zur Überprüfung der Überexpression wurde jeden Tag 1 ml von dem Expressionskolben genommen und mit SDS-PAGE auf Anwesenheit des Proteins geprüft.

BMGH-Minimalmedium (Buffered Glycerol-Minimal Medium) /Vorkultur

700 ml autoklaviertes Bidest
 100 ml 1M Kaliumphosphatpuffer pH 6*
 100 ml 10x **Glycerin** (10 % (v/v) wasserfrei Glycerin in A. Bidest)
 100 ml 10x YNP (Yeast Nitrogen Base)
 2 ml 500x Biotin

BMMH-Minimalmedium (Buffered Methanol-Minimal Medium)/Induktion

795 ml autoklaviertes Bidest
 100 ml 1M Kaliumphosphatpuffer pH 6*
 5 ml 100 % **Methanol** (5 % (v/v) Methanol in A. Bidest)
 100 ml 10x YNP (Yeast Nitrogen Base)
 2 ml 500x Biotin (20 g Biotin /100 ml A.Bidest)

* 1L 1M Kaliumphosphatpuffer pH 6 mit 10 M KOH wird aus 132 ml von einer 1M K₂HPO₄ (174,17 g/l) und 868 ml einer 1M KH₂PO₄ (136,1 g/l) zusammengestellt. Die Methanol-,

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

3.6 Proteinbiochemische Methoden

3.6.1 Zentrifugation und Lagerung

Das Kulturmedium mit dem rekombinanten Protein wurde bei 13.000 rpm, 4 °C, 30 min geerntet. Der Überstand wurde gesammelt, bei 4 °C gelagert und für weitere Proteinreinigungen verwendet.

3.6.2 Entsalzung über Gelfiltration

3.6.2.1 Entsalzung an einer Sephadex G25-Säule

Die Entsalzung erfolgte über die Gelfiltration an der Sephadex Matrix G25 (FINE). Die Moleküle wurden bei der Gelfiltration (auch Ausschlusschromatographie genannt) nach ihrer Größe, genauer nach dem hydrodynamischen Radius (oder Stokes Radius) getrennt. Die Gelfiltration trennt Moleküle mit unterschiedlichem Molekulargewicht. Die Elution erfolgt mit nur einem Puffer ohne Gradienten und die Zusammensetzung des Puffers hat in der Regel keinen Einfluss auf die Trennung.

Das Prinzip der Gelfiltration beruht darauf, dass die Polymere des Gels ein Netzwerk mit unterschiedlich großen Poren ausbilden, durch welche die Moleküle hindurchfließen können. Kleine Moleküle können in die Poren des Gelfiltrationsmaterials eindringen und erst später eluieren, während die großen daran vorbei diffundieren. Aus diesem Grund bleiben die kleinen Moleküle länger in der Säule zurück. Wird eine Mischung verschieden großer Moleküle (z.B. Protein mit Salz) auf eine Säule dieses Materials aufgetragen, so können die größeren Moleküle (Proteine) nicht in die Poren hinein diffundieren und werden ohne oder mit nur geringem Widerstand eluiert.

Um eine Gelfiltrationssäule zu packen wurden ca. 100 g des Sephadex-Materials mit ca. 500 ml eines Puffers zusammengemischt und ü. N in Raumtemperatur gelassen. Der Mix wurde entgast und in eine Säule (ca. 30 cm lang x 5 cm Durchmesser) mit Hilfe eines Reservoirs und eines GradiFracto-Systems (Schreiber, Photometer, Pumpe) mit ca. 400 ml Bettvolumen gepackt. Die Säule wurde mit dem Puffer gut äquilibriert, bis der Schreiber eine klare Linie zeichnete (ca. 2 Stunden).

Ca. 100 ml von der Überexpressionsproteinlösung (ca. 30 % des Bettvolumens) wurde genommen und auf der Sephadexsäule aufgetragen. Mit Hilfe des GradiFracto-Systems wurden die Peaks, die den Proteinen und dem Salz entsprachen, aufgezeichnet. Der verwendete Puffer war 30 mM Na-Acetatpuffer pH 5.5 mit Essigsäure. Um herauszufinden, in welchen Fraktionen es eine Salzkonzentration gibt, wurde die Leitfähigkeit der gesammelten Fraktionen aufeinanderfolgend gemessen.

3.6.2.2 Entsalzung an einer Sephadex PD10 Säule

Um die kleine Proteinprobe zu entsalzen, wurden die mit dem Makromolekülmaterial Sephadex gefüllten PD10 Säulen verwendet. Die Entsalzung mit diesen Säulen erfolgte 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. Mit 25 ml verwendetem Puffer wurde eine PD10-Säule äquilibriert und 2 ml der Proteinprobe auf der Säule aufgetragen. Mit 0.5 ml Puffer wurde die Säule gewaschen und mit 3.5 ml des gleichen Puffers die Probe eluiert.

3.6.3 Auftrennung von Proteinen bei der Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie ist eine analytische Methode in der Chemie oder Biologie. Sie ist eine spezielle Art der Adsorptionschromatographie, welche eine Trennung geladener Stoffe ermöglicht. An einer polymeren Matrix befinden sich die Adsorptionsstellen und tragen eine elektrische Ladung, die reversibel geladene Stoffe (z.B. Kationen beim Kationenaustauscher) in der flüssigen Phase gebunden haben, d.h. die entgegengesetzte geladene Spezies werden von den Adsorptionsstellen angezogen und dort festgehalten. Mit Hilfe dieses chromatographischen Verfahrens erfolgt die Trennung von Proteinen, basierend auf ihrer Ladung. Die Aminosäuren des Proteins können neben deren ungeladenen Seitenketten auch saure und basische Reste tragen und so zur Gesamtladung des Proteins beitragen. Die Gesamtladung eines Proteins ist bei niedrigen pH-Werten wegen der Protonierung der geladenen Seitenketten positiv, bei höheren pH-Werten aufgrund der Deprotonierung negativ. Jedes Protein hat zwischen diesen beiden Zuständen einen isoelektrischen Punkt (PI). Der pH-Wert wird so gewählt, dass das Protein der Wahl an die Matrix bindet. Im Fall von Anionenaustauschern ist der pH-Wert mindestens in einer pH-Stufe oberhalb des isoelektrischen Punktes des Proteins, bei Kationenaustauschern ist der pH-Wert unterhalb des isoelektrischen Punktes.

Die Bindung an die Matrix erfolgt über elektrostatische Interaktionen. Die entgegengesetzt geladenen Proteine binden an die Matrix und die anderen Proteine werden mit Puffer herausgewaschen. Die gebundenen Proteine werden durch Zugabe von Salzen eluiert. In der Regel wird ein linearer NaCl Gradient verwendet. Die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und der Matrix werden von NaCl unterbunden und dann werden die Proteine von der Matrix gelöst. Durch die Anwesenheit des linearen NaCl Gradienten nimmt die Konzentration von NaCl während der Elution gleichmäßig zu. Zum Abschluss wird die Matrix mit einem Hochsalzpuffer gewaschen, um alle restlichen Proteine herunterzuwaschen. Wird eine Proteinlösung an eine Kationenaustauschermatrix (trägt z.B. CM 52 Methylcarboxylgruppen bei pH-Wert von 5.5) zugegeben, binden die positiv geladenen Proteine an die Matrix. Durch Zugabe von NaCl oder einem anderen Salz konkurrieren die Na-Ionen mit den positiv geladenen Gruppen des Proteins um die Bindung am Kationenaustauscher und die Proteine werden wieder von der Gelmatrix abgelöst. Proteine mit geringer positiver Nettoladung werden in diesem Beispiel eher verdrängt als Proteine mit hoher positiver Ladung.

Wax9-Proteine haben einen isoelektrischen Punkt bei einem pH-Wert von 9.4. Sie weisen infolgedessen protonierte Aminosäurereste in einem Puffer mit pH 5.5 (z.B. 30 mM Na Acetat) auf. Unter diesen Bedingungen verhalten sich die WAX9-Proteine wie Kationen und können an negativ geladenen Gruppen der stationären Phase binden. Für die Proteinreinigung über Ionenaustauscherchromatographie wurde in dieser Arbeit eine Säule (Höhe: 9 cm, Durchmesser: 0.8 cm) benutzt, die mit einem Material von (CM 52, Whatman bzw. SP-Sepharose) gefüllt ist. Die feste stationäre Phase bestand aus einer makromolekularen unlöslichen Matrix, die mit Methylcarboxylgruppen besetzt ist.

Die Säule wurde zwischen eine Pumpe und einen UV-Detektor geschaltet. Das Äquilibrieren der Säule erfolgt mit 50 ml 30 mM Na-Acetat Puffer pH 5.5. Nach dem Auftragen der Proteinprobe auf der Säule wurde die Säule mit ca. 30 ml gleichem Puffer gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden 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 eluiert. Das Gradientenvolumen betrug ca. 40 ml. Das Eluat wurde fraktioniert und gesammelt.

3.6.4 Reversed-Phase-Chromatographie über Amberlite XAD7 Matrix

Diese Methode wurde bereits von (Buhot et al 2004) zur Reinigung von pflanzlichen

Lipidtransfer-Proteinen aus Tabak verwendet, es wurden aber in dieser Arbeit einige Schritte der Methode geändert. Amberlite XAD7 ist eine industrielle adsorbierte Matrix zur Reinigung von Peptiden, Proteinen und kleinen Molekülen aus wässrigen Lösungen durch die Reversed-Phase-Chromatographie. Die unpolaren Amberlite XAD-Harze werden im Allgemeinen für die Adsorption von organischen Stoffen aus wässrigen Systemen und polaren Lösungsmitteln verwendet. Amberlite XAD7 ist ein polymeres Adsorbens aus weißen unlöslichen Kügelchen. Es ist ein nichtionischer, aliphatischer Acryl-Polymer, der seine adsorptiven Eigenschaften aus seiner patentierten makroretikulären Struktur mit großer Oberfläche und dem aliphatischen Charakter seiner Oberfläche erhält. Diese makroretikuläre Struktur gibt auch dem Amberlite XAD7 hervorragende physikalische und thermische Stabilität. Aufgrund der chemischen Beschaffenheit seiner Oberfläche ist Amberlite XAD7 ein nützliches Adsorbens für wenig polare Verbindungen aus nicht-polaren Lösungsmitteln. Es wurde benutzt, um relativ polare Verbindungen von nicht-wässrigen Lösungsmitteln und nicht-aromatische Verbindungen aus polaren Lösungsmitteln zu entfernen. Der pH-Bereich ist 0-14, mit einer maximalen Gebrauchstemperatur von 150 °C.

Der Trennungsmechanismus in der Reversed-phase-Chromatographie ist abhängig von der hydrophoben Wechselwirkung zwischen den gelösten Molekülen in der mobilen Phase und den immobilisierten hydrophoben Liganden in der stationären Phase. Die Trennung erfolgt hier aufgrund der unterschiedlichen hydrophoben Eigenschaften der zu trennenden Moleküle, wobei hydrophile Moleküle als erstes eluiert werden. Die relativ unpolaren Medien (Amberlite XAD7) werden als stationäre Phase bei dieser Chromatographie verwendet. Als mobile hydrophile Phase wurde ein organisches Lösungsmittel in wässriger Lösung (wie Acetonitril, Methanol und Isopropanol) verwendet. Eine schnelle Auftrennung und eine gute Auflösung der Einzelkomponenten können durch diese Chromatographie ermöglicht werden. Je hydrophiler eine Substanz ist, desto leichter wird sie sich in der hydrophilen, mobilen Phase bewegen und schneller von dem stationären Medium eluiert. Umgekehrt gilt: je hydrophober eine Komponente in der Probe ist, desto eher wird sie an die hydrophoben Liganden in der stationären Phase binden und auf der Säule zurückgehalten werden.

Die Amberlitematrix wurde in eine kleine Säule (Höhe 10 cm, Durchmesser 1 cm) gefüllt. Die Säule wurde zwischen eine peristaltische Pumpe und einen UV-Detektor geschaltet. Nach 5 Tagen Kultivierung wurde der WAX9-Kulturüberstand oder CPP-Rohextrakt nach Zentrifugierung bei 13.000g/30 min/4 °C zurückgewonnen. Der pH Wert der Lösung wurde auf 2 mit TFA eingestellt. Nach dem Äquilibrieren der Amberlite XAD7-Säule mit 0.1 %

wässrigem TFA wurde der Kulturüberstand auf die Säule aufgetragen und mit 0.1 % TFA und 10 % CH₃CN 0.1 % TFA gewaschen. Nach dem Waschen wurde das Protein durch 40 % CH₃CN, 0.1 % TFA eluiert (Buhot et al 2004). TFA (Trifluoressigsäure) im Eluat wirkt als Ionenpaarbildner. Sie formt Ionenpaare mit den Peptiden/Proteinen. Von dem Eluat wurde in originalen Methode von (Buhot et al 2004) das Acetonitril verdampft, die getrockneten Proteinfractionen mit einem Puffer resuspendiert, auf pH 7 eingestellt und über die Ionenaustauschsäule (Trisacryl SP) nochmal gereinigt.

Um die Arbeitsschritte zu verkürzen, die Verlust des Proteins durch die Reinigung über die zweiten Säule zu vermeiden und die Proteine in Trockenform zu bekommen wurde diese Methode wie am folgenden Abbildung geändert:

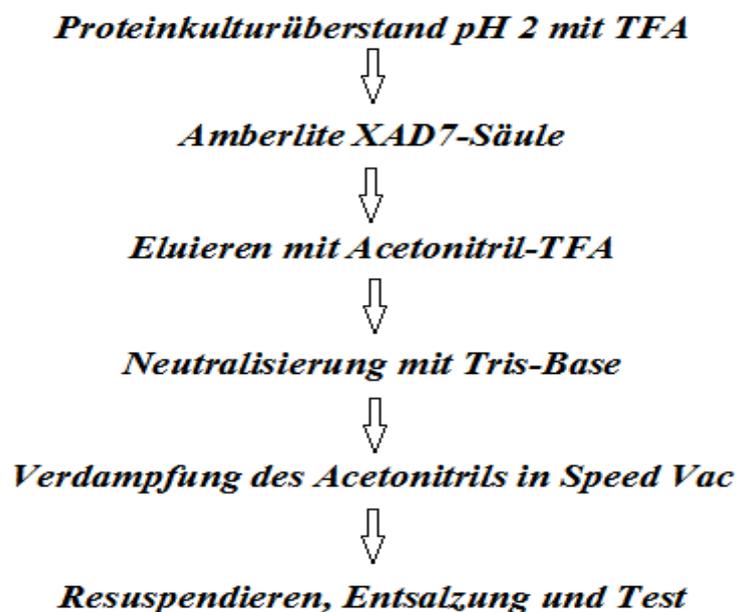


Abbildung 2: Aufreinigung über Amberlite XAD7

Die mit Acetonitril eluierten Proteine wurden mit Tris-Base auf pH 8 neutralisiert und in der Speed Vac für 5-7 Stunden oder ü. N angesetzt, um das Acetonitril zu verdampfen. Anschließend wurden die getrockneten Proteinfractionen mit einem Puffer resuspendiert, entsalzt und für die nächsten Experimente (LTP-, Frostschutz-, Bradford-Test, und SDS-Gelelektrophorese) vorbereitet. Die getrockneten Proteine können bis 4 Monate im Kühlschrank aufbewahrt werden.

3.6.5 Kolorimetrische Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradfordtest

Gemäß dem Bradfordtest bilden die basischen und aromatischen Aminosäuren-Seitenketten von Proteinen mit Coomassie Brilliant Blue G250 einen Protein-Farbstoff-Komplex, der in Lösung blau erscheint. Das Absorptionsmaximum dieses Komplexes liegt bei 595 nm. Durch die Zunahme der Absorption bei OD595 im Vergleich mit einer Eichkurve kann die Konzentration eines Proteins bestimmt werden. Die Intensität der Färbung ist proportional zu der Menge des Proteins im Reaktionsansatz (Bradford 1976).

100 µl Proteinprobe wurde mit 700 µl H₂O und 200 µl der Roti-Quant-Lösung gemischt. Nach 5 bis maximal 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben photometrisch bei 595 nm gemessen. Für den Nullabgleich wurden 800 µl H₂O und 200 µl Roti-Quant Lösung reguliert. Eine Eichkurve wurde mit (BSA) Rinderserumalbumin mit Konzentrationen zwischen 2 und 2000 µg/ml in Probenpuffer hergestellt. Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte durch den Vergleich mit den Werten der Eichkurve.

3.6.6 Proteinfällung

3.6.6.1 Ammoniumsulfatfällung

Um das isolierte Protein zu fällen, wurde die Lösung mit 60 % Sättigung Ammoniumsulfat gefällt (390 g für 1L) und eine Stunde im Kühlraum gerührt. Die ausgefällte Proteinlösung kann mehrere Monate bei 4 °C gelagert werden.

3.6.6.2 Acetonfällung

Vier Volumen eiskaltes 100 %iges Aceton wurde mit der Proteinprobe gemischt und mindestens eine Stunde bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurden die gefällten Proteine 30 min 15.000g, 4 °C abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit 90 % Aceton gewaschen und nochmals abzentrifugiert und bei Raumtemperatur oder bei 37 °C getrocknet. Zur Verwendung wurde das Sediment mit dem gewünschten Puffer aufgenommen.

3.6.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Gelelektrophoresemethode wurde von Schägger und Jagow für die Trennung von Proteinen benutzt. Die Elektrophorese stellt eine sehr effektive Methode zur Trennung von Makromolekülen und der Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen dar. Sie beruht auf der Eigenschaft, dass geladene Moleküle im elektrischen Feld wandern. Diese

Molekülenwanderung können in Gelen aus Polyacrylamid durchgeführt werden (Schägger & von Jagow 1987). Durch die Anlagerung von SDS Molekülen erhalten alle Proteine die gleiche negative Ladungsdichte und werden im elektrischen Feld unter Einfluss der Polyacrylamidmatrix nur aufgrund ihrer unterschiedlichen Massen aufgetrennt (Laemmli 1970).

3.6.7.1 Herstellung der SDS-Gele

Das Gel besteht aus zwei Trenngelschichten und einer kurzen Sammelgelschicht. Jede Schicht hat eine bestimmte Konzentration von Acrylamid und Bisacrylamid. Durch den Vergleich mit einem Proteinstandardgemisch (Mark 12™ Unstained Standard, Invitrogen) ist eine Größenabschätzung der zu untersuchenden Proteine möglich. Die Gele verhindern Konvektionsströme und dienen gleichzeitig als Molekularsieb und verbessern so die Auflösung. Die Trenngel-Mischung wird mit dem Radikalstarter Ammoniumpersulfat (APS) sowie dem Polymerisierungskatalysator Tetramethylethylenediamin (TEMED) versetzt und zügig zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen. Zwischen den Glasplatten ist ein Abstandhalter von 1 mm. Die verwendeten Gele hatten eine Größe von 7x 8x 0.1 cm. Es wurden zwei Trenngele hergestellt, wobei ein 16.5 %iges Gel von einem 10 %igen Trenngel überschichtet wurde. Das Sammelgel hatte einen Acrylamidgehalt von 4 %. Die Polymerisation des 16.5 %igen Trenngels (6.5 ml) wurde mit 20µl APS gestartet, die des 10 %igen Trenngels (2 ml) mit 8µl APS. Zuerst wurde das Trenngel 16.5 %, dann das Trenngel 10 % gegossen. Mit 2-Butanol oder H₂O wurde das gegossene Gel überschichtet. Nach etwa 45 Minuten ist das Trenngel auspolymerisiert und das Wasser oder 2-Butanol abgesaugt worden. Danach wird das Sammelgel (2.5 ml) mit APS und TEMED versetzt und etwa einen Zentimeter hoch über das Trenngel gegossen und der Kamm für die Ausbildung der Probenaschen platziert. Die Polymerisation des Sammelgels wurde mit 25 µl APS gestartet. Nach etwa 20 Minuten ist auch dieses Gel auspolymerisiert und der Kamm kann entfernt werden.

Die Proteinproben wurden erst in Gegenwart von einem anionischen Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) und einem Reduktionsmittel wie DTT (Dithiothreitol) bei 95 °C 10 Minuten gekocht und damit denaturiert. Der Probenpuffer wurde 1:3 mit den Proben vermischt. Wird das negativ geladene SDS dem Proteingemisch hinzugefügt, löst es alle nicht kovalenten Bindungen der Proteine und bindet sich an die Hauptketten etwa ein SDS-Molekül pro zwei Aminosäureresten. Somit entsteht ein Komplex aus SDS und denaturierten

Proteinen, dessen stark negative Ladung der Masse des Proteins ungefähr proportional ist. Die Trennung der Proteine in der SDS-Polyacrylamidelektrophorese erfolgt also nicht aufgrund der unterschiedlichen Ladungen der nativen Proteine, sondern wird bestimmt von deren Molekulargewicht.

Die Proben wurden vor dem Auftragen kurz abzentrifugiert, um die unlöslichen Bestandteile zu entfernen. Der Proteinstandard Mark 12™ (Invitrogen) wurde auf das Gel aufgetragen, um eine Größenbestimmung der Proteine nach dem Lauf zu ermöglichen. Die Elektrophorese-Anodenkammer wurde mit dem Anodenpuffer und die Kathodenkammer mit dem Kathodenpuffer gefüllt. Jede Geltasche wurde mit ca. 20-25 µl Probe geladen. Nach dem Probenauftrag bewegten sich die Proteine bei einer konstanten Spannung von 30 V durch das Sammelgel. Anschließend wurde die Voltzahl auf 150 V konstant gesetzt. Die Auftrennung dauerte etwa 1 bis 1.5 Stunden.

Tabelle 4: Gel-, Kathoden- und Anodenpuffer

	Gelpuffer	Kathodenpuffer	Anodenpuffer
SDS	0.3 %	0.1 %	
Tris	100 mM	200 mM	50 mM
Tricin		100 mM	
pH	8.4	8.25	8.9

Ladepuffer oder Probenpuffer (3X)

0.135 M Tris-HCl pH 6,8

30 % Glycerin

0.03 % Bromphenolblau

0.15 M (Dithiothreitol) DTT

3 % SDS (Natriumdodecylsulfat)

Stammlösungen

Acrylamid-Lösung: Gemischlösung von 30 % Acrylamid: 0.8 % N, N'-Methylenbisacrylamid 37, 5:1

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

TEMED: N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin

3.6.7.2 Coomassie –Färbung und Entfärbung

Die Gele wurden in 0.2 % Coomassie Brilliant Blau G-250 in 45 % Methanol (v/v), 10 % Essigsäure (v/v) für 45-60 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Dann wurden die Gele 3 bis

12 Stunden in Entfärbelösung entfärbt. Nach Entfärbung wurden die Gele 5-10 Minuten in 5 % (v/v) Glycerin angereichert.

Tabelle 5: Coomassie-Färbelösung und –Entfärbelösung

Färbelösung	Entfärbelösung
45 % Methanol	45 % Methanol
10 % Essigsäure	5 % Essigsäure
0.2 % Coomassie Brilliant R-250	

3.6.7.3 Trocknen und Lagerung von SDS-Polyacrylamidgelen

Um die Gele zu bewahren, wurden sie in 5 % (v/v) Glycerin für 5 min inkubiert und direkt zwischen zwei Cellophanfolien getrocknet.

3.6.8 Western-Blot

3.6.8.1 Proteintransfer an eine Nitrozellulose-Membran

Der Western-Blot ermöglicht die Erkennung spezifischer Proteine. Nach einer elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine von dem Gel an eine Nitrozellulose-Membran gebunden und durch spezifische Antikörper identifiziert. Der Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen wird in Anlehnung an Towbin (Towbin et al 1979) im Tank-Blot-Verfahren mit Blot-Apparaturen der Firma BioRad (Deutschland) durchgeführt.

Die SDS-Gele werden im Transferpuffer (25 mM Tris, 100 mM Glycin, 20 % Methanol) für einige Minuten äquilibriert. Danach werden die Gele in einem luftblasenfreien Sandwich-Blot zwischen zwei Schwämme mit einer Nitrocellulose-Membran gepackt, so dass die Nitrocellulose-Membranen (Protran® Nitrozellulose Transfer Membran; Schleicher & Schuell, Deutschland) zur Anode zeigen. Das Sandwich-Blot wurde in einem mit Transferpuffer (10x Reservoir Puffer = 190 mM Tris, 1.9 M Glycin, 20 % Methanol) gefüllten Blot Tank eingesetzt. Bei 100 mA Stromstärke, 14 Stunden und einer Temperatur von 4 °C erfolgte der Transfer der Proteine vom Gel zur Membran.

3.6.8.2 Ponceaurotfärbung

Nach dem Transfer des Proteins auf einer PVDF- bzw. Nitrocellulose-Membran wurde die Ponceaurotfärbung benutzt, um die Transfereffektivität des Proteins zu prüfen und sichtbar

auf der Membran zu machen. Die Membranen wurden direkt nach dem Proteintransfer in die Ponceaufärbelösung (0.2 % (w/v) Ponceau-Rot S, 3 % (v/v) Trichloressigsäure, 3 % (w/v) Sulfosalicylsäure) gelegt und für 10 Minuten gefärbt. Anschließend wurden sie mit H₂O zweifach gewaschen. Bei Verwendung des Standard Markers werden die Markerbanden auf der Membran markiert.

3.6.8.3 Blockierung der freien Flächen der Membranen

Das Immunprinting diente zum spezifischen Nachweis von auf PVDF- bzw. Nitrocellulose-Membranen durch Western-Blot immobilisierten Proteinen. Nach Transfer des Proteins wurde die Membran 3-mal 15 min in 20 ml Blockierungspuffer auf einem Schüttler unter leichtem Schütteln geschwenkt, um die freien Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Als Blockierungspuffer wurde MPT mit Casein verwendet. Dann wurde die Membran 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit dem ersten 1:500 im MPT-Puffer verdünnten polyklonalen Kaninchen Antikörper (Anti-WAX9) inkubiert. Nach der 3-maligen 5 Minuten in 30 ml MPT-Puffer Waschung wurde die Membran mit dem sekundären 1:3000 im MPT-Puffer verdünnten Antikörper (Anti-Rabbit Goat IgG (H+L) HRP Conjugate Bio-Rad) 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Erneut wurde 3-malig 5 Minuten mit MPT-Puffer gewaschen.

3.6.8.4 Die Entwicklung: Färbung der gebundenen Proteine

Die Entwicklung der Membran erfolgte in Alkaline Phosphatase Puffer. Es wurden 33 µl NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid, 50 mg/ml in 70 % Dimethylformamide) und 66 µl BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat, 50 mg/ml in 100 % Dimethylformamide) pro 10 ml Alkaline Phosphatase Puffer zugegeben. Um den Hintergrund gering zu halten, wurde die Farbreaktion im Dunkeln bei Raumtemperatur für 5-30 Minuten ausgeführt. Nach dem Erreichen der gewünschten Entwicklungsfarbe wurde die Reaktion durch Waschen in H₂O beendet und die Membran an der Luft getrocknet. Die Färbereaktion wurde nicht geschüttelt.

Tabelle 6: MPT-, Blockierung-, und AP- Puffer

10x MPT-Puffer	AP-Puffer (Alkaline Phosphatase)	Blockierungspuffer
100 mM Tris	100 mM Tris	1x MPT
1.5 M NaCl	100 mM NaCl	3 g/l Casein
0.5 % Tween	50 mM MgCl ₂	
pH 7.4 mit HCl	pH 9.5 mit HCl	

3.6.9 Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen über Gelfiltration

Der Test erfolgt über die Gelfiltration an der Fractogel-Matrix TSK HW 50 (S). Durch diese Matrix liefen die Proteine durch und ihre Größe wurde abgeschätzt. Die Gelfiltration trennt Moleküle mit unterschiedlichem Molekulargewicht. Die Elution erfolgt mit nur einem Puffer und ohne Gradienten. Die Zusammensetzung des Puffers hat wenig Einfluss auf die Trennung. Die Polymere des Gels bilden ein Netzwerk mit unterschiedlich großen Poren aus, durch welche die Moleküle hindurchfließen können. Kleine Moleküle können sich dort einlagern, während die großen daran vorbei diffundieren. Aus diesem Grund bleiben die kleinen Moleküle länger in der Säule zurück. Wird eine Mischung verschieden großer Moleküle auf eine Säule dieses Materials aufgetragen, so können die größeren Moleküle nicht in die Poren hinein diffundieren und werden ohne oder mit nur geringem Widerstand eluiert.

Das Matrix Fractogel TSK HW 50 (S) hat 25-40 μm Korngröße. Die benötigte Gelmenge wurde über Fritte abgesaugt und im Standzylinder mit dem 6-8 fachen Wasser aufgerührt (kein Magnetrührer). Die Lösung wurde 2-4 Stunden stehen gelassen, um das Gel zu sedimentieren. Der trübe Überstand wurde dekantiert und dieser Vorgang mehrfach wiederholt, bis der Überstand klar wurde. Das Gel wurde abgesaugt und im Becherglas mit der 1-4 fachen Menge Puffer (50 mM Tris pH 8 mit HCl) 1-2 Minuten aufgerührt. Dann wurde die Lösung im Wasserstrahlvakuum entgast. Eine Säule (I.D 15 mm und Höhe ca.1m) mit einem Reservoir wurde verwendet. Das Reservoir wurde mit Slurry gefüllt. Bei konstantem Fluss (20 ml/Stunde) wurde die Säule mit Hilfe einer Pumpe gepackt, und bis zur Konstanz der Schreiber-Grundlinie mit Elutionsmedium äquilibriert. Die Bestimmung des Molekulargewichtes erfolgte anhand eines Standards aus Proteinen verschiedener Größe (69 KDa bovines Serumalbumin; 45 KDa Ovalbumin; 22 KDa Trypsin Inhibitor; 17 KDa: Myoglobin; 5.7 KDa Insulin). Mit Hilfe des Pharmacia GradiFracto Systems (Pumpe, Schreiber, Photometer 280 nm, Fraktionssammler).

1-2 mg von der Proteinprobe wurden in einer 2-3 ml (50 mM Tris, 20 % Saccharose pH 8 mit HCl) gelöst und auf der Säule aufgetragen. Der Schreiber zeichnete einen bestimmten Peak für jedes Protein. Dieser Vorgang wurde mehrfach mit verschiedenen Proteinen wiederholt und am Ende zusammen verglichen, um zu wissen, wie viel Elutionsvolumen jedes Protein gebraucht hat. Im Prinzip brauchen die Proteine, die ein großes Molekulargewicht haben, ein geringes Elutionsvolumen verglichen mit den kleinen Proteinen. Mit dem Fraktionssammler

wurden die Fraktionen, die den Peaks entsprechen, gesammelt und mit den SDS-Gelen, Western-Blot, Frostschutz- und LTP-Test geprüft.

3.6.10 Test zum Nachweis von Proteinen mit Frostschutzaktivität

Nach der Isolierung der photosynthetischen Membranen (Thylakoide) aus Spinatpflanzen wurden die zu testenden Proteine auf ihre Frostschutzaktivität im Reagenzglas unter genau definierten Bedingungen geprüft. Dieser Test wurde nach Hinchä und Schmitt durchgeführt, um die in *Pichia pastoris* überexprimierten WAX9-Proteine und die Kontrollprobe X33 auf ihre möglichen kryoprotektiven Effekte zu prüfen. Die Proteine wurden zu einer Thylakoidsuspension gegeben und bei -20 °C eingefroren. Diesen membranhaltigen Lösungen können vor dem Einfrieren Stoffe zugesetzt werden, von denen man vermutet, dass sie Gefrierschäden mildern. Nach einem Gefrier/Tau-Zyklus wird die Intaktheit der Membranen bestimmt und auf diese Weise Schädigung oder Schutz festgestellt. Diese Proteine mit den membranhaltigen Lösungen werden nach dem Auftauen in Hämatokritkapillaren gefüllt und zentrifugiert. Die Größe der Pellets ist ein Maß für das erhaltene Volumen der Thylakoidmembranen nach dem Gefrier/Tau-Zyklus (Hinchä & Schmitt 1992).

Wenn die Thylakoide in einer geringen Osmolarität eingefroren und danach aufgetaut wurden, platzen sie und kollabieren. Sie haben in diesem Fall weniger Volumen verglichen mit einem normalen Fall. Der Gefrierschutzstoff kann in diesem Fall das Gesamtvolumen der Thylakoidmembranen vor einer Verkleinerung während eines Gefrier/Tau-Zyklus schützen. Deshalb kann das Volumen der sedimentierten Thylakoide ein Signal zur Quantifizierung des Effekts von kryoprotektiven Proteinen zeigen. Zur Kalibrierung wird ein Volumen mit gleicher Menge von kältesensitiven Thylakoiden ohne Gefrier/Auftau-Zyklus bestimmt, das die vollständig geschützten Thylakoide darstellt. Dieses Volumen entspricht dem Volumen bei 100 % Frostschutz. Mit Hilfe der PD10- oder NAP5-Säulen wurden die Proteinproben entsalzt. 100 µl Thylakoidsuspension wurden mit 100 µl Proteinlösung und Probenlösung vorsichtig gemischt. In drei Gruppen :

- 1- 100 µl Thylakoidsuspension + 100µl Proteinprobe
- 2- 100 µl Thylakoidsuspension + 100 µl Probenlösung (Null wert)
- 3- 100 µl Thylakoidsuspension + 100 µl CPP (Positivkontrolle)

Der Ansatz wurde dann 2 Stunden bei -20 °C eingefroren. Die positive Kontrolle wurde mit dem aus dem Kohl isolierten Kryoprotektin durchgeführt. Dies ermöglichte, den Testablauf auf seine Gültigkeit hin zu beurteilen. Zwei Nullwerte-Ansätze mit Probenlösung wurden angesetzt; einer wurde bei -20 °C eingefroren und aufgetaut, der andere wurde auf Eis 2 Stunden inkubiert. Dieser Ansatz stellt die intakte Probe mit intakten Thylakoidmembranen und infolgedessen „100 % Frostschutz“ dar.

Nach 2 Stunden wurden die Ansätze 2 Minuten in Wasserbad bei Raumtemperatur aufgetaut und mit einer Zugabe von einem gleichen Volumenteil 100µl Testlösung (10 mM MgCl₂) versetzt und gut gemischt. Die Ansätze wurden 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. Das 100 %ige vor Frost geschützte Thylakoidvolumen (100 % Frostschutzaktivität) wird durch die Differenz aus der 0 °C und der -20 °C Kontrolle wiedergegeben. Die Frostschutzaktivität wurde mit der folgenden Formel errechnet:

$$TKV(+P,-20\text{ °C}) - TKV(-P,-20\text{ °C}) / TKV(-P,0\text{ °C}) - TKV(-P,-20\text{ °C}) \times 100 = \% \text{ Frostschutz}$$

TKV: Thylakoidpelletgröße (mm)

+P: Ansatz mit Proteinproben

-P: Kontrollansatz ohne Proteinproben, nur mit Probenlösung

Tabelle 7: Wasch-, Proben- und Testlösungen

Probenlösung	Waschlösung	Testlösung
10 mM Saccharose	10 oder 5 mM NaCl	10 mM MgCl ₂
1 mM MnCl ₂		
1 mM CaCl ₂		

Die Probenlösung enthält Mangan und Calcium, weil die kryoprotektive Eigenschaft des Proteins kationenabhängig ist. Es benötigt zur Aktivität sowohl Calcium als auch Mangan (Sieg et al 1996) und ist mit dieser Eigenschaft einigen Lektinen aus Leguminosen ähnlich, die ebenfalls Calcium- und Manganabhängig sind.

3.6.11 Test zum Nachweis von Proteinen mit Lipid-Transfer-Aktivität

Unter der Katalyse von pflanzlichen Lipidtransferproteinen LTPs werden die Phospholipide verstärkt zwischen Membranen ausgetauscht. Auf diese Weise kann man die Lipidtransfer-Aktivität durch die Messung des Transfers von Phospholipiden von einer Donor zu einer Akzeptormembran abschätzen (Wirtz 1991). Die Lipidtransferproteine begünstigen den

Lipidaustausch und auch den Transport und die Verteilung von fluoreszenzmarkierten Lipidemolekülen von den Donor- zu den Akzeptorvesikeln. Diese Methode wurde von Geldwerth gewählt (Geldwerth et al 1991). Um die Lipidtransfer-Aktivität zu messen, 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 bestanden aus 90 % EPC und 10 % EPG. Die folgende Tabelle gibt die genauen Volumenangaben der Vesikelproben.

Tabelle 8: Puffer und Liposomen für LTP-Test

Donorvesikel	Akzeptorvesikel	TES-Puffer
32 µl EPG 1/100	46 µl EPG	10 mM TES pH 7.4 mit NaOH
13 µl EPC 1/100	40 µl EPC	
20 µl NBD-C ₁₂ -HPC		

EPG: Egg Phosphatidylglycerol (10 mg.ml⁻¹), EPG 1/100 (0, 1 mg.ml⁻¹).

EPC: Egg Phosphatidylcholin (100 mg.ml⁻¹), EPC 1/100 (1 mg.ml⁻¹)

NBD-C₁₂-HPC: 2-(12-(7-Nitrobenz-2-oxa-1.3-diazol-4-yl) amino) dodecanoyl-Sn-glycero-3-Phosphocholin (1.25 mg.ml⁻¹)

Alle Lipide werden in Chloroform gelöst bei -20 °C gelagert

TES-Puffer: N-Tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethansulfonsäure

Die Ansätze wurden erst mit gasförmigem Stickstoff getrocknet. Um eine vollständige Trocknung zu erzielen wurden die Ansätze in einen Gefriertrockner gestellt. Da die Lipide in Chloroform gelagert wurden, war eine vollständige Trocknung der Gemische bzw. Verdampfung des Lösungsmittels wichtig. Die getrockneten Fette wurden jeweils 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. Zwischendurch wurden die Ansätze für 1 min abgekühlt.

Die mit einem Fluorophor markierten Phospholipide der Donormembran (NBD-C₁₂-HPC) wurden in einer hohen Konzentration eingesetzt. Aufgrund der räumlichen Nähe der Fluorophore wurde das Fluoreszenzsignal gemindert. Zur Messung der Lipid-Transfer-Rate wurden die zu testenden Proteine in eine Mischung aus Donor- und Akzeptorvesikel zugegeben, wobei die Donorvesikel mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden. Die Fluoreszenzemission wurde in einem Fluorimeter gemessen. Wegen der Katalyse der Lipidtransferproteine verließen die fluoreszenzmarkierten Lipide die Donormembran und

wurden zur Akzeptormembran transportiert. Dieser Vorgang bewirkte eine Erhöhung der gemessenen Fluoreszenz, weil die Selbstlöschung der transportierten Lipide aufgehoben wurde. Die Fluoreszenzzunahme pro Zeiteinheit stellt ein Maß für die Lipidtransferaktivität der zugegebenen Substanz (Kader 1996).

Normalerweise läuft der Lipidtransfer zwischen den Donor- und den Akzeptorvesikeln in geringerem Maß auch ohne lipidtransferaktive Substanz ab. Deswegen wurde ein Leerwert nur mit Testpuffer bei jedem Messvorgang angesetzt und anschließend von den Messwerten der getesteten Proteinproben abgezogen. Die Zunahme pro Minute der Fluoreszenzemission beim Transfer der markierten Lipide wurde in einem Fluorimeter bei einer 530 nm Emissionswellenlänge und einer Anregungswellenlänge von 475 nm gemessen. Vor jeder Messreihe wurde das Fluorimeter auf 100 % relative Fluoreszenzemission kalibriert. Die Kalibrierung wurde mit 2 ml TES-Puffer, 10 µl der Emulsion von Donorvesikeln, 10 µl Akzeptorvesikel und 20 µl Triton x-100 Detergenz durchgeführt.

Das Detergenz 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.

Material: 50µl Glasspitze, Lipide (NBD-C12-HPC, EPC, EPG), Glasröhrchen, N₂-Begasung, Vakuum-Anlage, Ultraschallwasserbad, Tip-Sonicator, Fluorometer mit Wasserkühlung.

Lösungen: TES-Puffer (10 mM TES, pH 7.4 mit NaOH), 1 % Triton X-100
Kalibrierungsansatz: 2 ml TES-Puffer, 10 µl Akzeptorvesikel, 10 µl Donorvesikel, 20 µl 1 %iges (v/v) Triton X-100

Testansatz: 2 ml TES-Puffer, 10 µl Akzeptorvesikel, 10 µl Donorvesikel, 10 - 100 µl Proteinprobe.

3.6.12 Bindungsstudien von Proteinen an Thylakoidmembranen

Um die Bindungstheorie zu bestätigen oder zu widerlegen, wurde ein Test zur Prüfung der zu testenden Proteine auf ihre Bindung an die Thylakoidmembranen im Reagenzglas unter genau definierten Bedingungen durchgeführt (Abb. 3). Nach der Isolierung und der Chlorophyllbestimmung der photosynthetischen Membranen (Thylakoide) aus Spinatpflanzen, werden diese mit den zu testenden Proteinen gemischt und in Eis 15, 30 und

60 min inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 14000 rpm wurde das Pellet und der Überstand einer Probe mit SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot auf Anwesenheit des Proteins geprüft. Die anderen Pellet-Proben wurden mit Waschlösung gewaschen und zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mehrmals wiederholt. Um das Chlorophyll von den SDS-Gele-Proben zu entfernen, wurden zu den Proben 4-Volumen 100 % Aceton hinzugefügt und diese für 1 Stunde im Gefrierschrank inkubiert.

Mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot wurden die Proben getestet. Wenn die Proteine an die Membranen binden, bleiben sie nach der Zentrifugation in den Pelletproben. Die nicht an die Thylakoidmembranen gebundenen Proteine bleiben im Überstand. Dieser Test gibt uns ein deutliches Signal, ob die Proteine an die Thylakoidmembranen binden oder nicht.

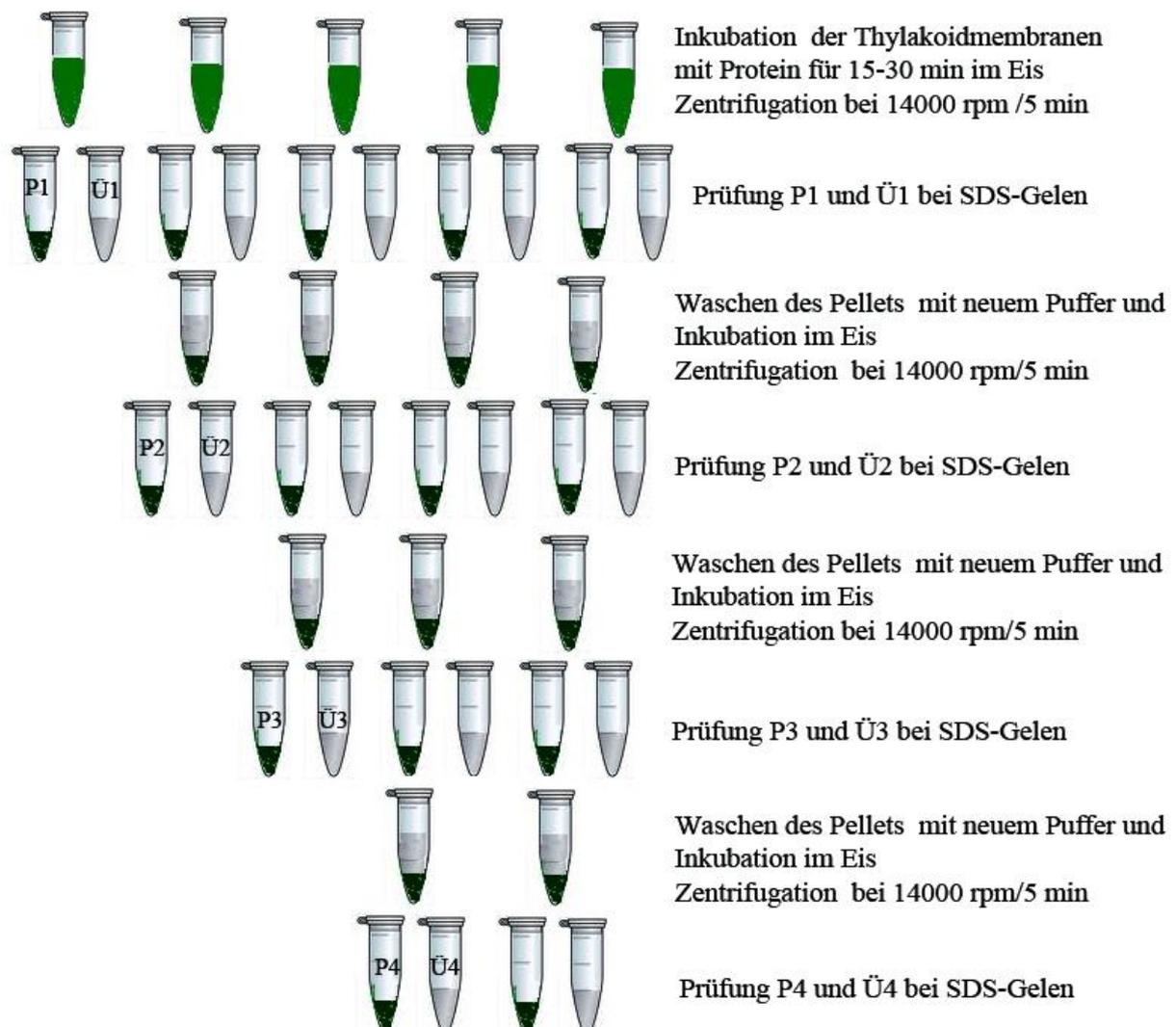


Abbildung 3: Bindungsversuch 1

Als Entwicklung des Bindungsversuchs wurden andere Versuche durchgeführt (Abb. 4), dabei wurde jedes Mal eine neue Thylakoide nach der Zentrifugation zu dem Überstand hinzugefügt, um zu sehen, ob das übrige Protein im Überstand wieder an die neuen Thylakoide bindet oder nicht. Es wurden die ganzen Pelletproben und die ganzen Überstandsproben mit der SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot auf Anwesenheit des Proteins getestet.

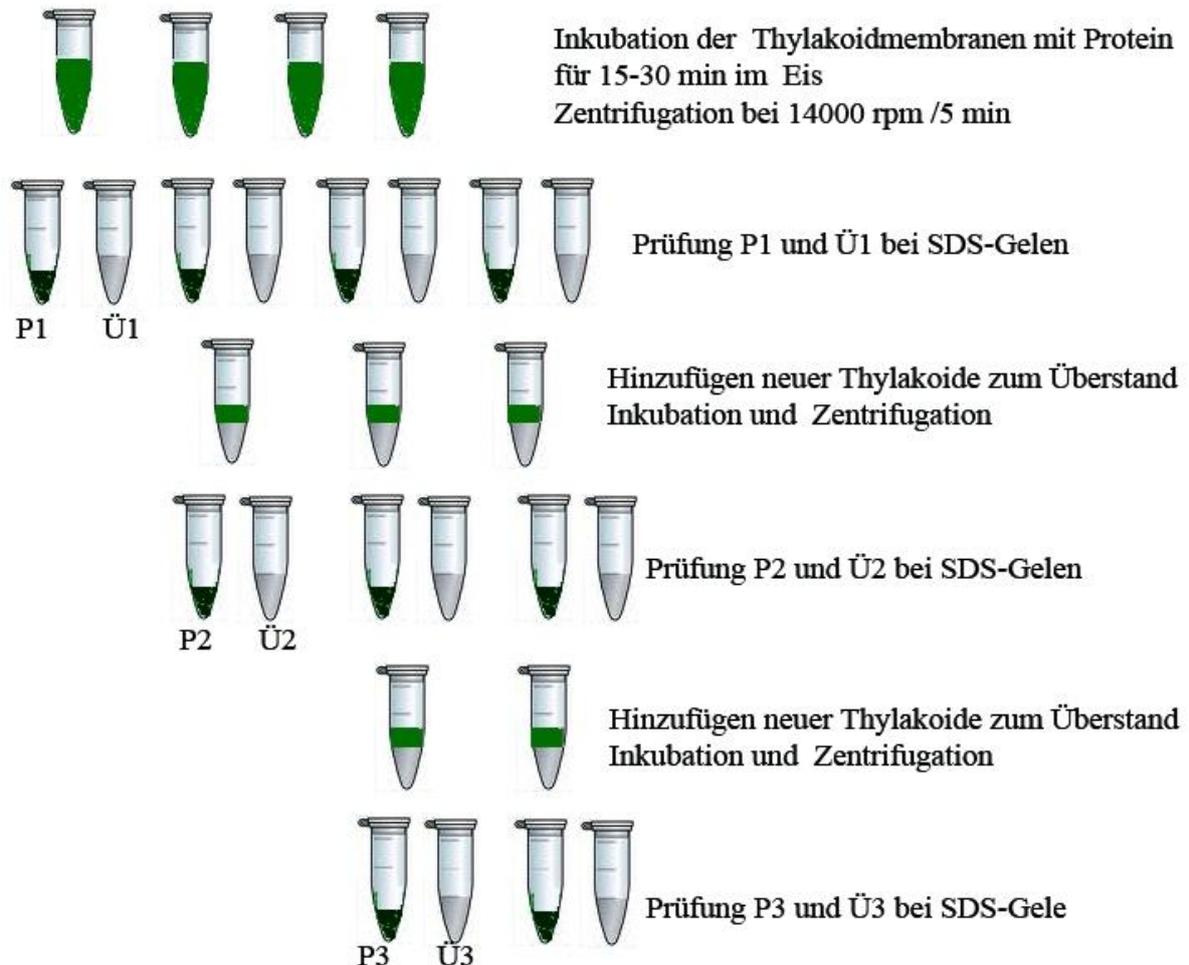


Abbildung 4: Bindungsversuch 2

Um zu ermitteln, wie viele Thylakoidmoleküle an die Proteinmoleküle binden, wurde ein anderer Versuch durchgeführt (Abb. 5). Dabei wurde zu einer bestimmten Proteinkonzentration steigende Chlorophyllkonzentration (steigende Thylakoidmengen) hinzugefügt, inkubiert und anschließend zentrifugiert. Gemäß der Bindung von Protein an die Thylakoidmembranen bleibt das Protein entweder beim Pellet oder beim Überstand. Deswegen wurde jeder Überstand auf die Frostschutzaktivität und Lipidtransferaktivität geprüft.

Wenn das Protein an Thylakoidmembranen bindet, bleibt es nicht mehr oder in nur niedriger Konzentration beim Überstand, was zu keiner oder niedriger Frost- oder Lipidtransfer-Aktivität führt.

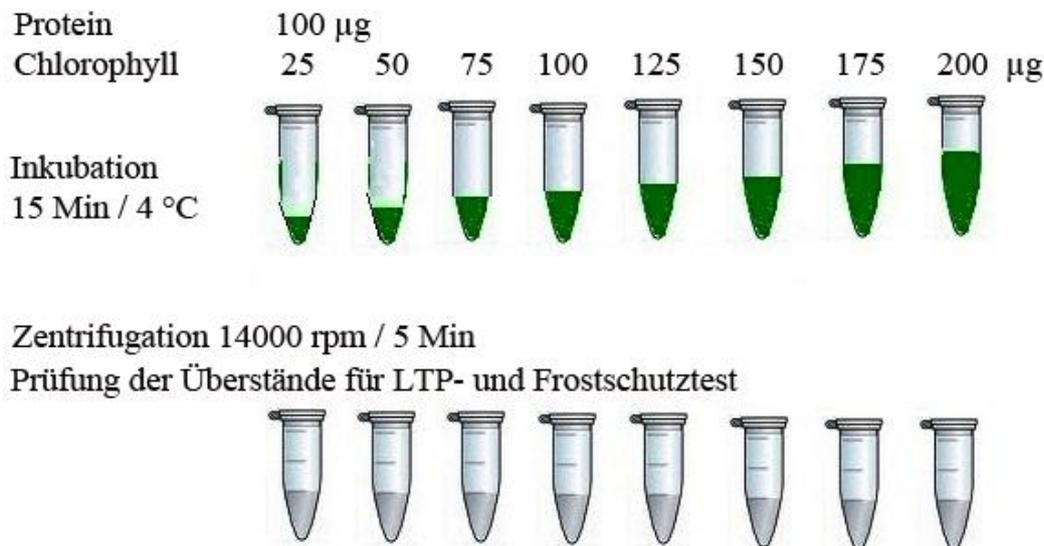


Abbildung 5: LTP – und Frostschutz-Test nach Bindungsversuch

3.6.13 Verwendete Mutanten

Die Computersimulationen und molekulare Modellierung der Bindung von Proteinen an die Membranen (In der Zusammenarbeit mit Dr. De Lamotte - Frankreich, Montpellier-UNI) vorhersagen, dass die kryoprotektiven Proteine an die Membranen in bestimmten Situationen binden und auf diesem Weg die Thylakoidmembranen vor Frostschädigungen schützen. Der Zusammenhang zwischen Proteinen und der Membrane basiert auf einer starken Bindung durch spezifische Aminosäuren. Um diese Bindung zu prüfen wurde diese spezielle Aminosäure in der Proteinsequenz ausgewechselt oder mit anderen Aminosäuren anders Proteins umgetauscht. Diese Veränderung wurde von Dr. Silke Schilling mittels codon usage von *Pichia pastoris* durchgeführt, wobei die Aminosäuresequenz des originalen Proteins erhalten blieb. Es wurden 3 unterschiedliche Konstrukts generiert. Die drei neuen Mutanten wurden in *E. coli* und *Pichia pastoris* kloniert und mit SDS-Gelen, Western-Blot geprüft, um ihr Molekulargewicht zu testen. Sie wurden auch auf ihre Frostschutz- und Lipidtransfer-Aktivität und auch auf ihre Bindungsfähigkeit an die Thylakoidmembranen geprüft. Nach

Analyse der Mutanten könnte möglicherweise geklärt werden, welcher Teil der Moleküle Lipidtransfertätigkeit oder kryoprotektive Aktivität angibt.

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung der *wax9*-Gene

Da die Expression in *Pichia pastoris* einen großen Vorteil gegenüber bakteriellen Expressionssystemen hat, müssten alle *wax9*-Gene in *Pichia pastoris* kloniert und exprimiert werden. WAX9B, WAX9D und WAX9E wurden in *Pichia pastoris* bereits von der Arbeitsgruppe kloniert und exprimiert. In dieser Arbeit wurde versucht, die anderen WAX9-Vertreter (WAX9A und WAX9C) in *Pichia pastoris* zu klonieren und zu exprimieren. Während die Klonierung des WAX9C leider erfolglos war, konnte das WAX9A wie folgt kloniert werden.

4.1.1 Isolation genomischer DNA und PCR-Amplifikation des *wax9A*-Gens

Wie in 3.5.1. beschrieben, wurde die genomische DNA von Wirsingkohl (*Brassica oleracea*) nach einem Standardprotokoll der CTAB-Methode (Sambrook et al 1989) isoliert. Durch die PCR-Amplifikation und Sequenzierung der Amplifikationsprodukte, konnte nachgewiesen werden, dass im Genom von Wirsingkohl (*Brassica oleracea*) die genetische Information für die WAX9-Proteine vorhanden ist. Während WAX9A und WAX9E im 5'UTS-Bereich 100 % identisch sind, sind im Leaderbereich 3 Basen, in der Gensequenz 8 Basen und im 3'UTS-Bereich 5 Basen Unterschied. Bei den kodierenden Sequenzen von WAX9A und WAX9E sind 5 Aminosäuren Unterschied (Abb. 6).

```
wax9E      ACCCAAATATCTTACTTAAACACATTTTCTTTTGCAAACCAACAGAAACACTAATAGAAA
wax9A      ACCCAAATATCTTACTTAAACACATTTTCTTTTGCAAACCAACAGAAACACTAATAGAAA
*****

wax9E      AATGGCCGGGGTGATGAAGTTGGCATGCTTGGTCTTGGCCTGCATGATTGTGGCAGGTCC
wax9A      AATGGCCGGTGTGATGAAGTTGGCATGCTTGGTCTTGGCCTGCATGATTGTGGCAGGTCC
*****

wax9E      CATCACAGCGAACCGAGCTCTGACCTGTGGCACCGTTAACAGCAACGTGGCACCGTGCAT
wax9A      CATCACAGCGAACCGAGCTCTGACCTGTGGCACCGTTAACAGCAACGTGGCACCGTGCAT
*****

wax9E      TGGCTACATAACCCAAGGTGGAAACCTTCCCAGAGCGTGCTGCACCGGTGTTAGTAAGCT
wax9A      TGGCTACATAACCCAAGGTGGAAACCTTCCCAGAGCGTGCTGCACCGGTGTTAGTAAGCT
*****

wax9E      TAACAGCATGGCCCGTACAACCCCGGACCGTCAGCAAGCTTGTGTTGCCTTAAACTGC
wax9A      TAACAGTATGGCCCGTACAACCCCGGACCGGCAGCAAGCTTGCCTTGAAGTGC
*****
```

```

wax9E      TGCAAGCGCCTTAGGCCCTAATCTCAACGCTGGCCGTGCAGCTGGAATTCCCAAGGCATG
wax9A      TGCTAGAGCCTTAGGCCCTAATCTCAACGCTGGCCGTGCAGCTGGAATTCCCAAGGCATG
          *** ** *****

wax9E      TGGAGTCAGTGTTCCTTTCCCAATCAGCACCAACACCAACTGCAACAACGTGAAATGAGC
wax9A      TGGAGTCAGTGTTCCTTTCCCAATCAGCACCAACACCAACTGCAACAACGTGAAATGAGC
          *****

wax9E      GACAGTGTGATGAAGCTTTAGGGGACGTTCCGAATATTATAATATGGATCAGAATATTAA
wax9A      GACAGTGTGATGAAGCTTTAGGGGACGTTCCGAATATTATAATATGGATCAGAATATTAA
          *****

wax9E      ATAAGAAATGTTTCGAATGGATGTTTTAAAAATGTTTTCTAATTTCTTTTCTTTTTTAAT
WAX9A      ATAAGATATGTTTCGAATGGATGTTTTAAAAATGTTTTCTAATTTCTTTTCTTTTTTAAT
          *****

wax9E      ATGGCGATCAATATCATATATTCCTATGAACTGGTTCGTTTGTACTATGTTATCGAACAC
wax9A      ATGGCGATCAATATCATATATTCCTATGAACTGGTTCGTTTGTACTATGTTATCGAACAC
          *****

wax9E      GTTATATGAAATTCAGATTTGAAGTTTATATC
wax9A      GTTATATGAAATTCAGATTTGAAGCTTATATCATTCTTCCGTGTTGTACCGCCTCTTAT
          *****

WAX9A      MAGVMKLACLVLACMIVAGPITANRALTCGTVNSNVAPCIGYITQGGTLPGACCTGVSKL
WAX9E      MAGVMKLACLVLACMIVAGPITANRALTCGTVNSNVAPCIGYITQGGPLPRACCTGVSKL
          *****

WAX9A      NSMARTTPDRQQACRCLETAARSALGPNLNAGRAAGIPKACGVSVPFPPISTNTNCNNVK
WAX9E      NSMARTTPDRQQACRCLKTAASALGPNLNAGRAAGIPKACGVSVPFPPISTNTNCNNVK
          *****

```

Abbildung 6: Die Nukleotid und Aminosäuresequenzen der *wax9A/E*-Gene aus *B. oleracea*

Die identischen Bereiche in den Sequenzen sind unter der Sequenz mit einem * gekennzeichnet, die Start- und Stoppkodons sind unterstrichen, die Leadersequenz ist rot, die untranslatierten 5'- und 3'-UTS Bereichen sind grau und die *wax9*-Gensequenz ist schwarz gedruckt. Die unterschiedlichen Nucleotid bzw. Aminosäuren sind mit gelbem Hintergrund gedruckt.

Da die kodierenden Sequenzen der *wax9*-Genfamilie sehr ähnlich sind, konnten keine Primer gewählt werden, die innerhalb der kodierenden Sequenz binden. Deswegen konnte keine spezifische einzelne Amplifikation für *wax9*-Gene durchgeführt werden. Jedes *wax9*-Gen sollte zwei Mal mit PCR amplifiziert werden. Im 5'- und 3'- UTS untranslatierten Bereich unterscheiden sich die Nukleotidsequenzen aller *wax9*-Gene sichtlich voneinander. Durch diese Unterscheidung war es möglich, entsprechende Primer für die *wax9*-Gene-Amplifikation zu wählen (Schilling 2003). Aufgrund der einfachen Unterschiede zwischen

wax9A- und *wax9E*-Genen im Leaderbereich gewährleisten möglicherweise die genspezifischen Primer in diesem Bereich eine Amplifikation der einzelnen Gene.

Um die *wax9A*-Expressionsklone herzustellen, wurde zuerst genomische DNA aus Wirsingkohl mit genspezifischen Forward-Primer (F-Wax9A) aus dem Leaderbereich nach dem Startkodon und Reverse-Primer (R-Wax9A) aus dem 3'-UTS-Bereich hinter dem Stoppkodon (Tabelle. 9) amplifiziert. Als Polymerase wurde Dream Taq der Firma Fermentas benutzt. Bei dieser PCR-Amplifikation wurde das Gen von dem Leaderbereich bis zum 3'-UTS-Bereich nach dem Stoppkodon mit Intron (ca. 630-640 bp) amplifiziert.

Tabelle 9: Primer für die PCR-Amplifikation des *wax9A*-Gens

Primer	Sequenz
<i>F-wax9A</i>	5- <i>GTCCCATCACAGCGAACCG</i> -3
<i>R-wax9A</i>	5- <i>TTAAAACATCCATTTCGAACATA</i> -3
<i>F/Ex-wax9A</i>	5- <i>CCGCTCGAGAAAAGAGCTCTGACCTGTGGC</i> -3
<i>R/Ex-wax9A</i>	5- <i>GCTCTAGACTATTTACG.TTGTTGCAGTTGGTGTG</i> -3

Bei der zweiten PCR-Amplifikation wurden die ersten PCR-Produkte mit entsprechenden Expressionsprimern amplifiziert. Da in dieser Arbeit der *pPICZα*-Vektor aus *Pichia pastoris* als Expressionsvektor verwendet wurde, wurden gleich mit in den Expressionsprimern (Tab. 9) Schnittstellen für *pPICZα* (für *XbaI* und *XhoI* Enzyme) eingefügt. Der Forward-Expressionsprimer *F/Ex-wax9A* besteht aus Schnittstelle für *XbaI* Enzyme und 19 Basen aus dem Anfang des ersten Exons ohne Leadersequenz. Der Reverse-Expressionsprimer *R/Ex-wax9A* besteht aus Schnittstelle für *XhoI* Enzyme und 18 Basen aus dem Ende des ersten Exons, die gesamten 7 Basen des zweiten Exons mit Stoppkodon ohne Basen des Introns. Mit Verwendung dieser Expressionsprimer wurde das *wax9A*-Gen mit der korrekten Sequenz mit Stoppkodon sowie den Restriktionsschnittstellen für die Klonierung in den Expressionsvektor, ohne Leaderbereich und ohne Intron amplifiziert (Abb. 7 und 8).

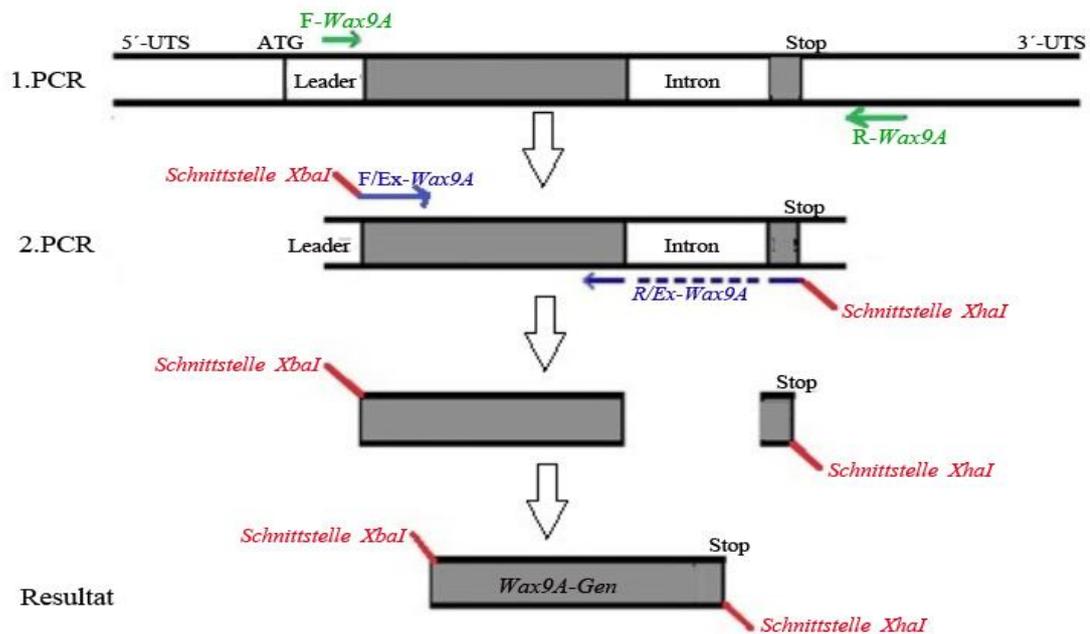


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Amplifikationsvorgangs von *wax9A*-Gen

```

1081 atcttactta aacacatfff cttttgcaaa ccaacagaaa cactaataga aaaatggccg
1141 gtgtgatgaa gttggcatgc ttggtottgg cctgcatgat tgtggcaggt cccatcacag
1201 cgaaccgagc tctgacctgt qgcaccg tta acagcaacgt qgcaccgtgc attggtaca
1261 taacccaagg tggaaacctt cccggagcgt gctgcaccgg ttttaqtaag cttaacagta
1321 tggcccgtac aaccccggac cggcagcaag cttgccgttg cttgaaact gctgctagag
1381 ccttaggccc taatctcaac gctggccgtg caqctggaat tcccaaggca tctggaqta
1441 gtgttccttt cccaatcagc accaacacca actgcaacaa gtacgtatat taatttgatg
1501 aactctcaca ctgctcttg aactottaat tatattaacg gttttatggt ttaatagttt
1561 tttaatgtaa agaaaactct tccgggtcta acaatggtat aaaggaaatt ttgagttttt
1621 ataatgattc agcaagtata cataaaaagg tttgtttagt agaaattga ggttctcata
1681 tactatatta acgatgttgt gtttgattgg gogtggttg agcgtgaaat gagcgacagt
1741 gtgatgaagc tttaggggac gttcogaata ttataatatg gatcagaata ttaaataaga
1801 tatgttcgaa tggatgtttt aaaaatgttt tctaatttct tttctttttt aatatggcga
1861 tcaatatcat atattcctat gaactggctg tttgtactat gttatcgaac aacgttatat
1921 gaaattcaga tttcgaagct ttatcattct tccgtgttgt accgctctt ca

```

Abbildung 8: Die Nukleotidsequenzen des originalen *wax9A*-Gens

Stopp- und Startkodon sind rot gedruckt. Leadersequenz ist schwarz mit Linie unterstrichen. Intron ist orange, die untranslatierten 5'-und 3'-UTS Bereiche sind grau gedruckt. Die *wax9A*-Gensequenz ist dick unterstrichen. Die im ersten PCR verwendeten

Primern sind grün und die in weitem PCR verwendeten Expressionsprimern sind blau gedruckt.

Nach Auftrennung von Aliquots der ersten PCR-Reaktionsansätze auf einem 1.5 %igen Agarosegel konnten in allen Reaktionsansätzen DNA-Fragmente im Größenbereich von ca. 630-640 bp lokalisiert werden, welche mit der erwarteten Länge des Fragments übereinstimmten. Die aus dem Agarosegel mittels Gelextraktion isolierten DNA-Fragmente wurden bei der zweiten PCR-Amplifikation mit Expressionsprimern (Tab. 9) ohne Intron und Leaderbereich amplifiziert. Die Länge der Fragmente waren 270-300 bp, welche mit der erwarteten Länge des Fragmentes ohne Intron übereinstimmen.

4.1.2 Klonierung in den *pJet1.2/Blunt*-Vektor und DNA-Sequenzierung

Nach dem zweiten PCR-Vorgang wurden die aus dem Agarosegel isolierten DNA-Fragmente mittels Gelextraktion über QIAGEN-Kit gereinigt und ohne Modifikation der Enden (wie unter 3.5.6 beschrieben) in den Vektor *pJet1.2/blunt* ligiert. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert, in den *E. coli*-Stamm XL-blue transformiert und auf LB-Platten mit Ampicillin ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Es konnten 6 Klone isoliert werden. Jeder Klon wurde in neuem ampicillinhaltigem LB-Medium über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Klon-PCR wurde durchgeführt, um die richtigen Größen zu prüfen. Anschließend wurden die Amplifikationsansätze auf 1.5 %iges Agarosegel aufgetragen.

Die Plasmide der Klone 1-6 zeigten die erwarteten Größen der Plasmide. Ein einzelner Klon wurde auf neue LB-Platten mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Plasmidpräparation über Mini-Präparation QIAGEN-Kit wurde durchgeführt. Die Plasmide wurden zur Sequenzierung an eine Firma (GATC Biotech AG- Deutschland) geschickt, sequenziert und ein Homologievergleich mit verschiedenen WAX9-Proteinen durchgeführt.

Gemäß der Sequenzierung und des Vergleichs zwischen *wax9A* (Genbank) und dem klonierten *wax9A*-Gen zeigten alle Plasmide die richtige DNA-Sequenz mit zwei unterschiedlichen Nucleotiden, die zu einer Mutante mit zwei Aminosäuren bei neuen klonierten WAX9A führen (Abb. 9 und 10). Obwohl hier eine Mutante vorlag wurde mit diesem Konstrukt weitergearbeitet, um zu sehen, ob diese Mutante in den beiden

Aminosäuren zu einem wichtigen Unterschied zwischen dem originalen und dem mutierten *wax9A* führt oder nicht. Deswegen wird das klonierte *wax9A*-Gen als ***wax9Am*** bezeichnet.

```
AGAATAAAAAGAAGAACATCGATTTTCCATGGCAGCTGAGAATATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAAGATCCGCTCGA
GAAAAGAGCTCTGACCTGTGGCACCGTTAACAGCAACGTGGCACCGTGCATTGGCTACATAACCCAAGGTGGAAC
CCTTCCCGGAGCGTGCTGCACCGGTGTTTGTAAGCTTAACAGTATGGCCCGTACAACCCCGGACCGGCAGCAAGC
TTGCCGTTGCCTTGAAACTGCTGCTAGAGCCTTAGGCCCTAGTCTCAACGCTGGCCGTGCAGCTGGAATTCCCAA
GGCATGTGGAGTCAGTGTTTCCCTTTCCCAATCAGCACCAACACCAACTGCAACAACGTGAAATAGTCTAGAGCATC
TTGCTAAAAACCGAGTACA
```

Abbildung 9: Nukleotidsequenzen des klonierten *wax9Am*-Gens

Die *wax9Am*-Sequenz ist schwarz, die Forward- und Reverse-Expressionsprimer-*wax9Am* sind unterstrichen und die Schnittstellen für *XbaI* und *XhoI* sind bunt gedruckt.

Das originale *wax9A* wurde von Dr. Silke Schilling kloniert und ebenfalls in dieser Arbeit verwendet.

4.1.3 Klonierung im Expressionsvektor *pPICZα*

Um das rekombinante WAX9Am-Protein zu exprimieren wurde *Pichia pastoris* benutzt. Der Expressionsvektor *pPICZα* ist ein Shuttle-Vektor, der sowohl in *E. coli*, als auch in *Pichia pastoris* repliziert werden kann. Die PCR-Produkte (*wax9Am*-Gen) wurden aufgereinigt, über *XbaI* und *XhoI* Enzyme aus dem *pJet1.2/blunt* Vektor geschnitten, isoliert und in den mit *MssI* linearisierten *pPICZα*-Vektor ligiert. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Ligationsansatz in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue transformiert und in einem Zeocinhaltenen LB-Medium über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation bei 37 °C konnten 5 Kolonien gepickt und eine Klone-PCR durchgeführt werden, um die Transformation zu überprüfen.

Die Plasmide der Klone 1-5 zeigten die erwarteten Größen der Plasmide. Die Plasmide wurden zur Sequenzierung an eine Firma (GATC Biotech AG- Deutschland) geschickt. Alle Plasmide zeigten die richtige DNA-Sequenz. Von einem einzelnen Klon mit Insert wurde eine Plasmidpräparation über Mini-Präparation-Kit (QIAGEN) durchgeführt. Der Expressionsvektor *pPICZα*-Vektor wurde mit (*MssI*=*PmeI*) linearisiert, und für Ligation und Transformation in *Pichia pastoris* vorbereitet.

4.1.4 Transformation von *Pichia pastoris* mit *pPICZα*-Vektor

Zur Expression des WAX9Am-Proteins wurde die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris*, Stamm X33 ausgewählt. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte über ihre Fähigkeit, im Zeocinhaltigen Medium wachsen zu können. Zur Transformation in *Pichia pastoris* wurde ein EasyComp Transformation-Kit verwendet. Die präparierten Plasmide wurden mittels *MssI*-Enzyme linearisiert, über Hitzeshock in kompetente *Pichia pastoris* X33-Zellen transformiert und in Zeocinhaltigem YPD-Medium 3-10 Tage inkubiert. Von den Transformanten wurden mindestens drei mittels Klone-PCR auf die Integration der Expressionsvektor getestet. Die Plasmide der 6 Klone zeigten die erwartete und richtige Größe. Nach erfolgreicher Transformation in *Pichia pastoris* wurden einzelne Klone zur Kultivierung ausgewählt, die Plasmidpräparation über Mini-Präparation QIAGEN-Kit durchgeführt und zur Sequenzierung geschickt. Alle Plasmide zeigten die richtige DNA-Sequenz. Verglichen mit dem originalen *wax9A*-Gen gab es lediglich die gleiche Mutante mit zwei Aminosäuren von Serin nach Cystein und auch von Asparagin nach Serin (Abb. 10).

```

WAX9A      MAGVMKLAACLVLACMIVAGPITANRALTCGTVNSNVAPCIGYITQGGTLPGACCTGVSKL
WAX9Am     MAGVMKLAACLVLACMIVAGPITANRALTCGTVNSNVAPCIGYITQGGTLPGACCTGVCKL
*****. **

WAX9A      NSMARTTPDRQQACRCLETAARALGPNLNAGRAAGIPKACGVSVPFPPISTNTNCNNVK
WAX9Am     NSMARTTPDRQQACRCLETAARALGPSLNAGRAAGIPKACGVSVPFPPISTNTNCNNVK
*****.*****

```

Abbildung 10: Aminosäuresequenz der WAX9A und WAX9Am-Proteine

Die identischen Bereiche in den Sequenzen sind unter der Sequenz mit einem * gekennzeichnet. Die unterschiedlichen Aminosäuren sind mit gelbem Hintergrund gedruckt.

4.2 Expression des rekombinanten WAX9Am-Proteins in *Pichia pastoris*

Nach erfolgreicher Klonierung und Transformation des *wax9Am*-Gens in *Pichia pastoris* wuchsen die positiven transformierten Hefeklone für 4 Tage bei 30 °C auf YPD-Platten. Die anfängliche Überexpressionskultur (Vorkultur) erfolgt über Nacht mit 100 ml von BMGH-Minimalmedium (mit Glycerin) in einem 500 ml-Kolben. Am nächsten Tag wurden 200 ml von BMMH-Minimalmedium (mit Methanol) in einem 2L-Kolben für 72 Stunden Überexpression benutzt.

4.2.1 Prüfung der Überexpression von WAX9-Proteinen

Um die Proteinsynthese während der Induktion zu überprüfen wurden im Zeitabstand von 24 h von den Hefekulturen vor der Methanolzugabe ein Aliquot entnommen, der Überstand von den Hefezellen separiert und durch SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Eine ausreichende Luftzufuhr ist neben der Methanolzugabe ein wichtiger Faktor für eine gute Proteinüberexpression in *Pichia pastoris*. Deswegen wurden die 2L-Kolben mit einer luftdurchlässigen sterilen Gaze verschlossen. Unter diesen Bedingungen wuchsen die Hefezellen und führten zur erfolgreichen Expression der rekombinanten WAX9-Proteine. Die Proteinbanden konnten mit Coomassie gefärbten Proteingelen leicht detektiert werden.

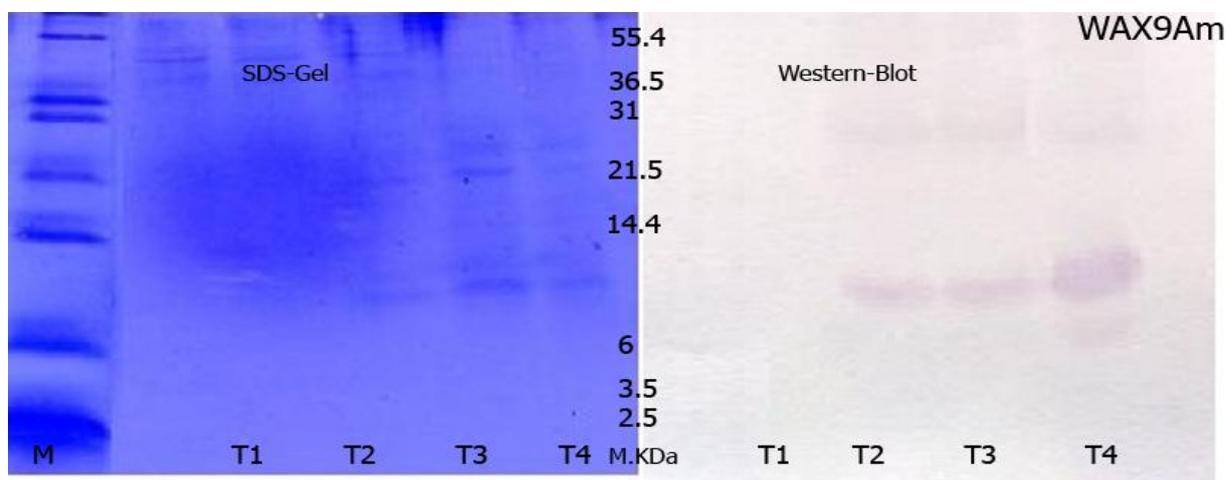


Abbildung 11: Prüfung der Überexpression von WAX9Am

Westernanalyse und Coomassie gefärbtes SDS-Gel des überexprimierten WAX9Am-Proteins. Im Zeitabstand von 24 h wurden Proben entnommen, der Überstand von den Hefezellen separiert und durch Western-Blot und SDS-PAGE analysiert. Die Proben setzen sich aus 50 μ l Proteinfraction und aus 50 μ l Probenpuffer zusammen, davon wurden 20 μ l pro Tasche aufgetragen. Die Proteine wurden ca. 1.5 Stunden bei 150 V aufgetrennt. T1 wurde von den 200 ml-Kolben (BMGH-Medium mit Glycerin) nach einem Tag genommen. T2, T3 und T4 wurden von den 2L-Kolben mit BMMH-Medium mit Methanol nach zwei, drei und vier Tagen genommen.

Wie in der Abb. 11 dargestellt, konnten bei Coomassie-gefärbten SDS-Gelen nur schwache Expressionsbanden mit der erwarteten Größe zwischen den 6-14 kDa-Markerbanden nachgewiesen werden. Die spezifische Immunodetektion mit Anti-WAX-Antikörper konnte auf einer Nitrozellulose-Membran positive Protein-Signale im Überstand mit der erwarteten Größe zwischen den 6-14 kDa-Markerbanden zeigen. Überexprimierte WAX9Am befindet

sich in beiden Überexpressionsmedien, aber es war in BMMH (mit Methanol) stärker als in BMGH (mit Glycerin).

4.3 Reinigung von WAX9-Proteinen

In diesem Teil der Arbeit wurden die überexprimierten Proteine über verschiedene Reinigungsmethoden gereinigt.

4.3.1 Entsalzung von WAX9 an einer Sephadex-Matrix G25

100 ml von dem Kulturüberstand der überexprimierten WAX9-Proteine (ca. 30 % des Bettvolumens) wurde auf die Sephadex G25 aufgeladen. Mit Hilfe eines Gradi-Frac-Systems ergab sich das nächste Diagramm. Der verwendete Puffer war 30mM Na-Acetat pH 5.5. Dieser Vorgang wurde 7-9-mal wiederholt, um eine ausreichende Menge von den entsalzenden WAX9-Proteinen zu erreichen (Abb.12).

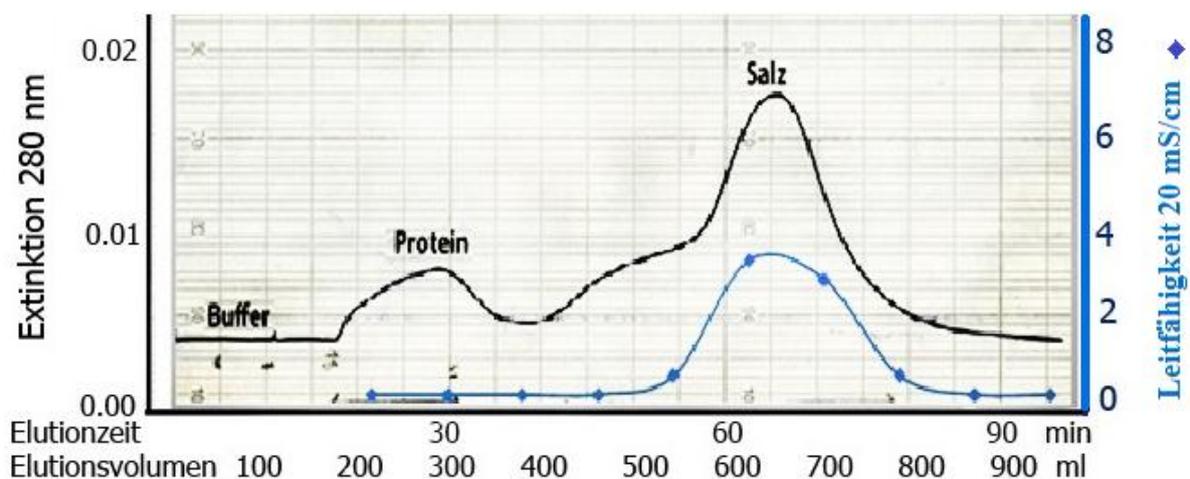


Abbildung 12: die Entsalzung über Sephadex-Säule und die Leitfähigkeitsmessung

Der WAX9-Kulturüberstand von 100 ml wurde auf die Säule (Sephadex G25-FINE Höhe 30 cm Durchmesser 5 cm, mit Bettvolumen von ca. 415 ml) aufgetragen und mit 30 mM Na-Acetat Puffer pH 5,5 eluiert. Die Durchflussrate betrug ca.10 ml/min. Der Schreiber hatte eine Geschwindigkeit von 2 mm/min. Alle Fraktionen wurden gesammelt und eine Leitfähigkeitsmessung durchgeführt. Um die Ergebnisse der Entsalzung zu bestätigen, wurde die Leitfähigkeitsmessung für alle gesammelten Fraktionen mit dem Gerät (Konduktometrie CG855) auf 20 mS/cm gemessen.

4.3.2 Auftrennung von WAX9 mit dem Kationenaustauscher CM52

WAX9-Proteine als Mitglieder der Lipidtransferproteine weisen einen basischen isoelektrischen Punkt bei einem pH-Wert von 9.4 auf (Kader 1996). Die überexprimierte WAX9-Proteinsuspension wurde über Sephadex G25-Säule entsalzt und in einen Puffer mit einem pH-Wert von 5.5 übernommen. Infolgedessen wurden die Proteine protoniert, so dass sie auf einer Kationenaustauschermatrix binden können. Anschließend wurden sie auf der Kationenaustauschersäule (CM52) aufgetragen. Nach Beginn des Gradienten wurde ein einziger deutlicher Peak auf dem Chromatogramm aufgezeichnet. Die Fraktionen wurden bei Gelelektrophorese untersucht (Abb. 13).

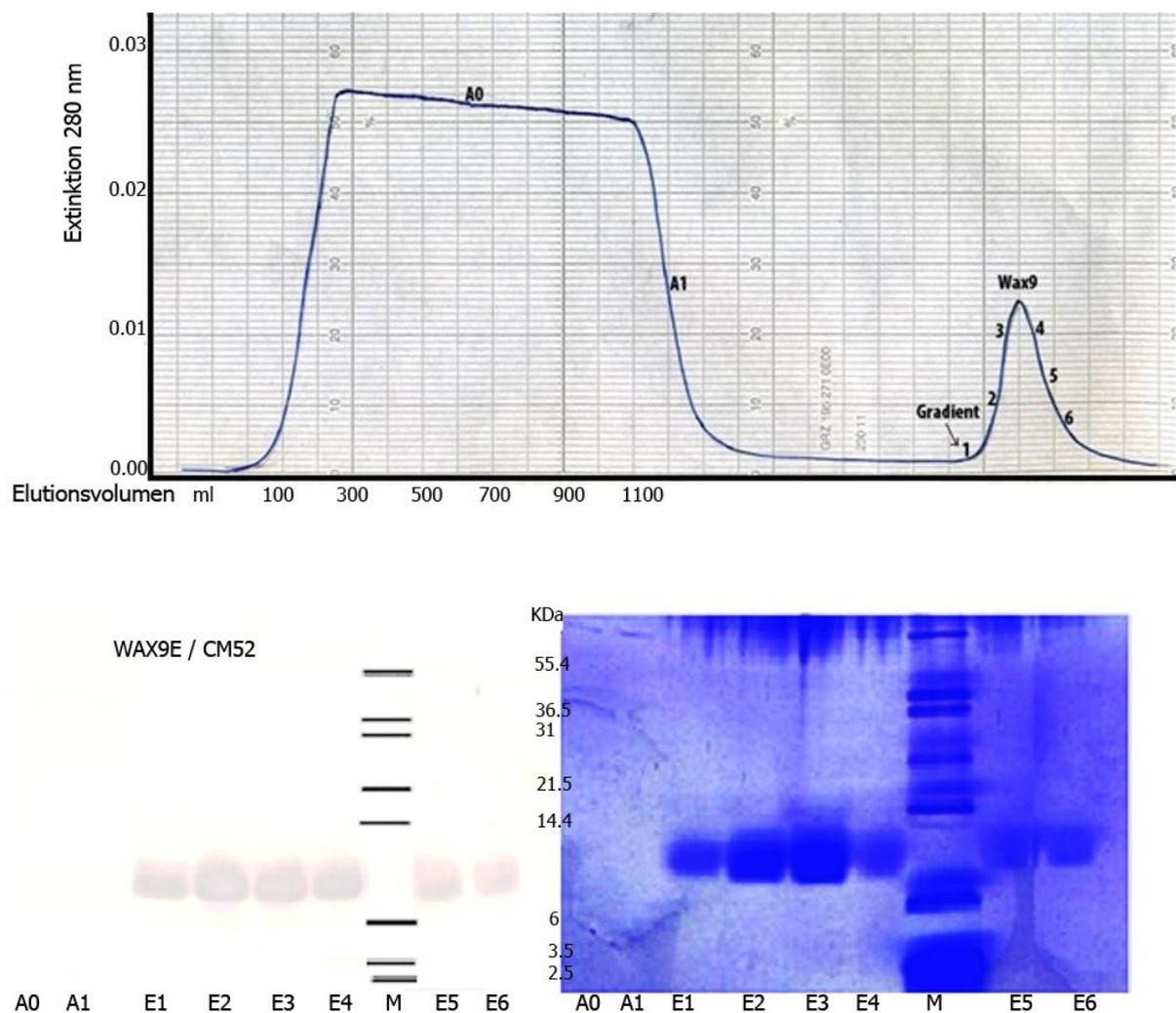


Abbildung 13: Auftrennung mit dem Kationenaustauscher CM52 und SDS-Gel

Beispiel einer Aufzeichnung eines Chromatogramms und Coomassie gefärbtes Polyacrylamid-Gel und Westernanalyse von WAX9E-Protein während der Auftrennung mit dem Kationenaustauscher CM52. Nach Äquilibrieren der Säule (Höhe 9 cm, Durchmesser 0.8 cm mit Bettvolumen von 4-5 ml) mit 30mM Na-Acetat Puffer pH 5.5 wurde der entsalzte WAX9E-Kulturüberstand (1L) in gleichem Puffer (30mM Na-Acetat Puffer pH 5.5) übernommen und auf der Kationenaustauschersäule (CM52) aufgetragen. Die Durchflussrate betrug ca.10 ml/min. Der Schreiber hatte eine Geschwindigkeit von 1 mm/min. Mit gleichem Puffer wurde die Säule gewaschen und mit einem Gradientenvolumen von 40 ml (Mischung von 30mM Na-Acetat pH 5.5 Puffer und 30mM Na-Acetat pH 5.5 Puffer, 1 M NaCl) wurden die gebundenen Proteine eluiert. Es wurden 6 Elutionsfraktionen, eine Fraktion A0 bei dem Durchlauf, und eine Fraktion A1 bei dem Waschschrift gesammelt. Die Fraktionen A1, A0 stellen die auf der Kationenaustauschersäule ungebundenen Proteine dar. Die gesammelten Fraktionen werden bei Gelelektrophorese untersucht. Auf dem Gel sind in der Reihenfolge von links nach rechts zu sehen: A0, A1, E1-E4, Marker E5, E6. Die gleiche Reihenfolge ist auf der Nitrocellulose-Membran. Die Proben setzen sich aus 50 µl Proteinfraction und aus 50 µl Probenpuffer zusammen, davon wurden 25 µl pro Tasche aufgetragen. Die Proteine wurden ca. 1-1.5 Stunden bei 150 V aufgetrennt.

Die SDS-Gel und Western-Blot-Analyse mittels eines Antikörpers konnte zeigen, dass die überexprimierten WAX9-Proteine sich nicht in den Durchlaufsfractionen A0 oder in der Waschschriftsfraction A1 befinden, sondern nur in bestimmten Fractionen des Elutionspeaks.

4.3.3 Auftrennung von WAX9 mit dem Kationenaustauscher SP-Sepharose

Als Kationenaustauschermatrix wurde auch SP-Sepharose verwendet. Dieser Versuch sollte klären, ob der Entsalzungsschritt, der für CM52-Chromatographie nötig war, eingespart werden konnte. Deswegen wurde bei diesem Versuch der pH-Wert des WAX9-Kulturüberstands mit Phosphorsäure auf 2.5 erniedrigt, um die positive Ladung des Proteins zu verstärken und die Bindung an die SP-Sepharose-Matrix zu ermöglichen. Eine SP-Sepharose-Säule (Höhe 9 cm, Durchmesser 0.8 cm) wurde benutzt. Mit ca. 100 ml 25 mM Na-Phosphat-Puffer pH 2.5 wurde die Säule gewaschen. Nach der Einstellung des pH-Werts des Kulturüberstands auf 2.5 wurde direkt ohne Entsalzung auf die SP-Sepharose-Säule aufgetragen und die Säule mit 25 mM Na-Phosphat-Puffer pH 2.5 gewaschen. Die Elution erfolgte dann graduell mit einer Mischung von 25 mM NA-Phosphat-Puffer und 25 mM Na-Phosphat-Puffer, 1 M NaCl. Das Gradientenvolumen betrug 40 ml. Nach Beginn des Gradienten ist es ein deutlicher Elutionspeak zu erkennen. 5 Elutionsfraktionen, eine Fraktion A0 bei dem Durchlauf, und eine Fraktion A1 bei dem Waschschrift wurden gesammelt. Die Fraktionen hatten jeweils ein Volumen von ca. 1 ml. Die Fraktionen A1, A0 stellen die auf der Kationenaustauschersäule ungebundenen Proteine dar. Die Fraktionen wurden bei Gelelektrophorese untersucht (Abb. 14).

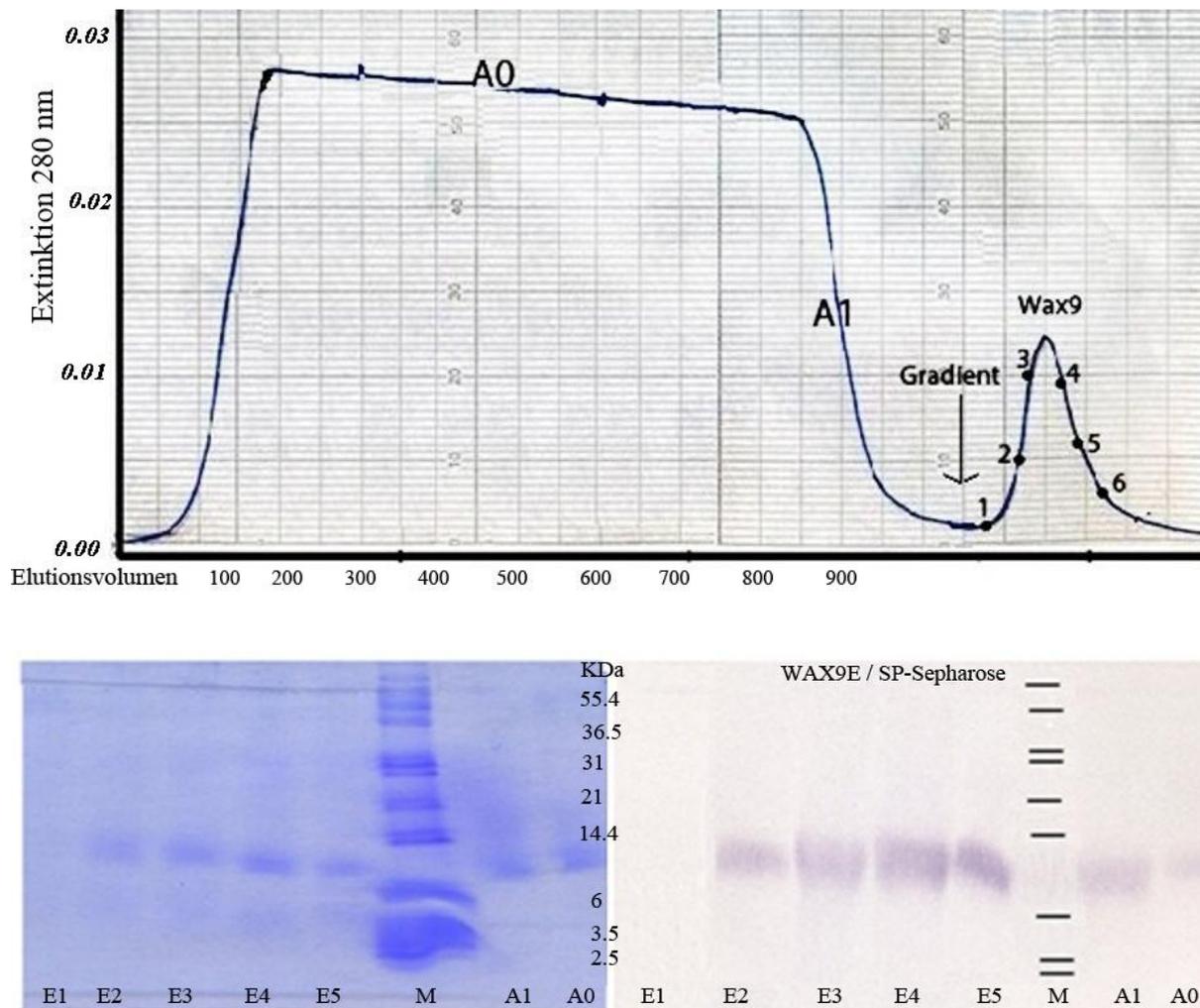


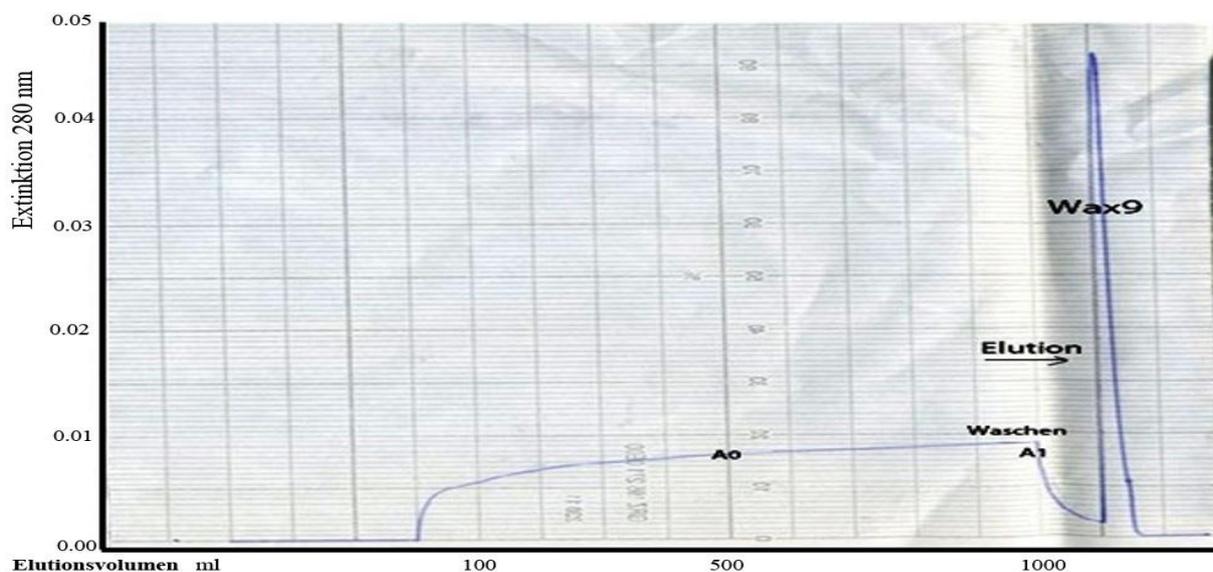
Abbildung 14: Auftrennung mit dem Kationenaustauscher SP-Sepharose und SDS-Gel

Beispiel einer Aufzeichnung eines Chromatogramms und Coomassie gefärbtes Polyacrylamid-Gel und Westernanalyse von WAX9E-Protein während der Auftrennung mit dem Kationenaustauscher SP-Sepharose. Nach Äquilibrieren der Säule (Höhe 9 cm, Durchmesser 0,8 cm mit Bettvolumen von 4-5 ml) mit 25mM Na-Phosphat-Puffer pH 2.5 wurde der pH-Wert des WAX9E-Kulturüberstands auf 2.5 eingestellt und auf der Kationenaustauschersäule SP-Sepharose aufgetragen. Die Durchflussrate betrug ca. 5 ml/min. Der Schreiber hatte eine Geschwindigkeit von 1 mm/min. Mit gleichem Puffer wurde die Säule gewaschen und mit einem Gradientenvolumen von 40 ml (Mischung von 25 mM NA-Phosphat Puffer und 25 mM Na-Phosphat Puffer, 1 M NaCl, pH 2.5) wurden die gebundenen Proteine eluiert. Es wurden 5 Elutionsfraktionen, eine Fraktion A0 bei dem Durchlauf, und eine Fraktion A1 bei dem Waschschrift gesammelt. Die Fraktionen A1, A0 stellen die auf der Kationenaustauschersäule ungebundenen Proteine dar. Die gesammelten Fraktionen werden bei Gelelektrophorese untersucht. Auf dem Gel sind in der Reihenfolge von links nach rechts zu sehen: Elutionsfraktionen E1-E5, Marker, und A0, A1. Die gleiche Reihenfolge ist auf der Nitrocellulose-Membran. Die Proben setzen sich aus 50 µl Proteinfraction und aus 50 µl Probenpuffer zusammen, davon wurden 25 µl pro Tasche aufgetragen. Die Proteine wurden ca. 1 Stunden bei 150 V aufgetrennt. Die Fraktion A0 wurde aus dem Durchlaufschritt, Fraktion A1 aus dem Auswaschschrift gesammelt.

Nicht alle WAX9-Proteine binden an die Kationenaustauschermatrix SP-Sepharose, weil die WAX9-Proteine sich in den Durchlaufsfractionen A0, in der Waschschriftsfraction A1 und auch in Elutionsfractionen des Elutionspeaks befinden. Sie zeigen starke Signale auf dem Gel und auf der Membran nach Immundetektion. Das bedeutet: Die Reinigung über den Kationenaustauscher SP-Sepharose zeigt einen starken Verlust an Protein. Der hohe Salzgehalt des gepufferten Minimalmediums verhindert die Bindung von WAX9-Proteinen an dem Kationenaustauscher.

4.3.4 Auftrennung von WAX9 mit der Reverse-Phase Amberlite XAD7-Säule

Bei diesem Versuch wurde 1L überexprimierte WAX9-Proteinsuspension auf pH 2 mit TFA eingestellt und direkt ohne Entsalzung auf einer kleinen Amberlite-Säule aufgetragen. Der verwendete Puffer war 0.1 % TFA (Buhot et al 2004). WAX9-Proteine binden an die Amberlite XAD7-Matrix und die Säule wurde nicht überladen, so dass WAX9-Proteine bei dem Auftrag- oder Auswaschschritt ausgewaschen worden wären. Die Fractionen wurden bei Gelelektrophorese untersucht (Abb. 15).



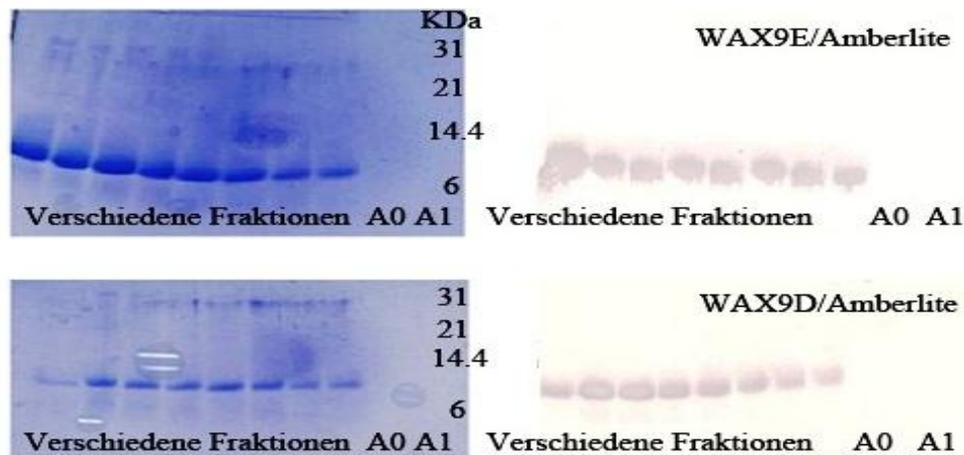


Abbildung 15: Auftrennung mit der Reverse-Phase-Matrix Amberlite XAD7

Beispiel einer Aufzeichnung eines Chromatogramms und Coomassie gefärbtes Polyacrylamid-Gel und Westernanalyse von WAX9E/D-Proteinen während der Auftrennung mit der Reverse-Phase-Matrix Amberlite XAD7. Ca 1L WAX9E/D-Proteinkulturüberstand wurde auf die Säule (Höhe 10 cm, Durchmesser 1 cm mit Bettvolumen von 4-5 ml) aufgetragen, mit ca.100 ml 10 % CH₃CN, 0.1 % TFA wurde die Säule gewaschen und mit ca. 50 ml Gradienten 40 % CH₃CN, 0.1 % TFA wurden die gebundenen Proteine eluiert und gesammelt. Nach Beginn des Gradienten wurde ein einziger Peak auf dem Chromatogramm aufgezeichnet. Die gesammelten Fraktionen wurden mit Tris-Base auf pH 8 neutralisiert, in einer UNIVAPO150H Concentrator Zentrifuge unter Vakuum ü. N. gehalten, um das CH₃CN zu verdampfen, bis die Proben ganz trocken werden. Die getrockneten Proteine-Proben wurden mit 50 µl Probenpuffer gelöst, davon wurden 20 µl pro Gel-Tasche aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Proteine wurden ca. 1 Stunde bei 150 V aufgetrennt. Auf dem Gel sind in der Reihenfolge von links nach rechts zu sehen: WAX9E oder WAX9D-Fraktionen, A0, A1. Die gleiche Reihenfolge ist auf der Nitrocellulose-Membran. Die Fraktion A0 wurde aus dem Durchlaufschritt, Fraktion A1 aus dem Auswaschschritt gesammelt.

Wie in der Abb. 15 zeigen SDS-Gel und Western-Blot-Analyse, dass die überexprimierten WAX9-Proteine sich nicht in der Durchlaufsfraction A0 oder in der Waschschrittsfraction A1 sondern nur in bestimmten Fraktionen des Elutionspeaks.

4.4 Isolierung und Reinigung von Kryoprotektin aus dem Wirsingkohl

Wirsingkohl wird in Töpfe verpflanzt und, wie in Material und Methoden (3.3.3) beschrieben, gehärtet und für langfristige Lagerung bei -20 °C eingefroren. Von diesen gehärteten Wirsingkohlpflanzen wurde das Protein mit kryoprotektiver Aktivität isoliert, mit 60 % Sättigung Ammoniumsulfat gefällt und für mehrere Monate bei 4 °C gelagert und für weitere Proteinexperimente vorbereitet. 200 ml von dem mit Ammoniumsulfat gefällten Kohlextrakt wurde auf 12000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit ca.15-20 ml 0.1 % TFA gelöst und

auf pH 2 mit TFA eingestellt und direkt ohne Entsalzung auf die Amberlite XAD7-Säule mit einer Pumpe aufgetragen. Bei der Elution wurde ein einziger deutlicher Peak auf dem Chromatogramm aufgezeichnet (Abb. 16).

Die mit Acetonitril eluierten Proteine wurden mit Tris-Base auf pH 8 neutralisiert und in Speed Vac für 5-7 Stunde oder ü. N angesetzt, um das Acetonitril zu verdampfen. Anschließend wurden die getrockneten Proteinfractionen mit einem Puffer resuspendiert, entsalzt und für die nächsten Experimente vorbereitet. Bei Gelelektrophorese wurden die Fraktionen untersucht.

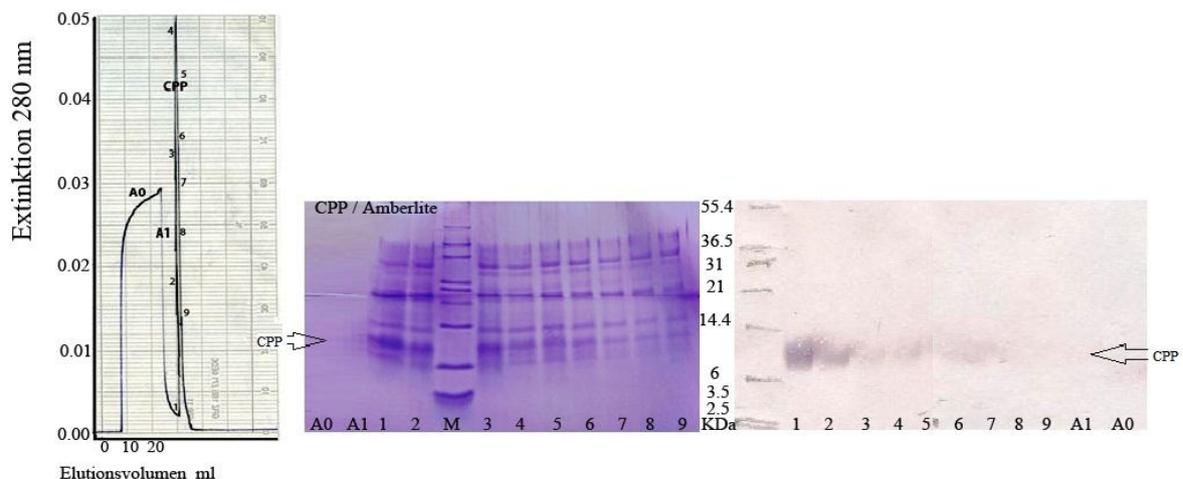


Abbildung 16: Reinigung der CPP über Amberlite XAD7-Säule und das Coomassie Gel

Beispiel einer Aufzeichnung eines Chromatogramms von CPP während der Auftrennung mit der AmberliteXAD7-Matrix und ein Coomassie gefärbtes Polyacrylamid-Gel der CPP-Fractionen. Die Flussrate betrug 2 ml/min. Der Schreiber hatte eine Geschwindigkeit von 2 mm/min. 20 ml von CPP-Kohlextrakt wurde mit der Pumpe auf die Säule (Höhe 10 cm, Durchmesser 1 cm mit Bettvolumen von 4-5 ml) aufgetragen. Nach dem Waschen mit 0.1 % TFA und 0.1 % TFA, 10 % CH₃CN wurden die gebundenen Proteine mit 0.1 % TFA, 40 % CH₃CN eluiert. A0 ist eine Fraktion aus dem Durchlauf, A1 aus dem Waschschrift. Das Eluat wurde in 9 Fraktionen gesammelt und mit Tris-Base auf pH 8 neutralisiert. Beim Speed Vac für 5-7 Stunden oder ü. N wurde das Acetonitril verdampft. Die getrockneten Proteine wurden durch Gelelektrophorese untersucht.

4.5 Bradfordtest und die Ausbeute von Proteinen

Die Proteinmenge wurde nach dem Bradfordtest für die über Kationenaustauscher bzw. Amberlite XAD7 gereinigten WAX9-Proteine bestimmt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 10: Die Proteinausbeute

Von 1L Kulturüberstand	WAX9A	WAX9B	WAX9D	WAX9Am	WAX9E	CPP*
<i>CM 52</i>	6-7 mg	6-7.5 mg	7-8 mg	6-8 mg	7-8 mg	47 mg
<i>Amberlite XAD7</i>	10-11 mg	9-10 mg	11-13 mg	9-11 mg	10-11 mg	60 mg

* CPP ist Rohextrakt.

Da die Reinigung der WAX9-Proteine über Amberlite XAD7-Säule ohne Entsalzung erfolgt ist und die Ausbeute des Proteins besser als die bei anderen Methoden war, wurden nur mit dieser Methode die WAX9-Proteine und CPP weitergereinigt. Einen wichtigen anderen Vorteil bietet die Verwendung der Amberlite XAD7-Matrix: Die getrockneten Proteinfractionen können bis 4 Monaten im Kühlschrank aufbewahrt werden und aktiv bleiben.

4.6 Molekulargewichtsbestimmung von CPP und WAX9-Proteinen

Um eine Antwort auf die Frage zu erhalten, wie groß die CPP und WAX9-Proteine sind, wurde der Gelfiltrationsversuch durchgeführt. Als Gelfiltrations-Matrix wurde Fractogel TSK HW-50S verwendet. Eine große Säule von 100 cm wurde mit Gelmatrix gepackt, mit 50 mM Tris-HCl pH 8 äquilibriert und mit bekannten Standard Proteinen geeicht. Jedes Protein hat ein bestimmtes Elutionsvolumen (Abb. 17), das dem Molekulargewicht dieses Proteins entspricht.

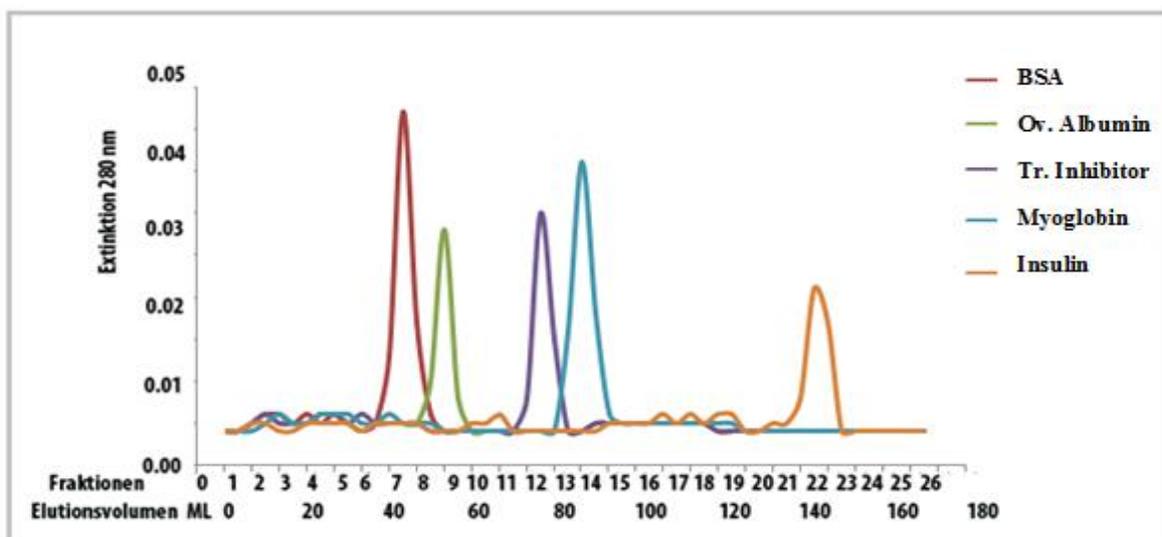
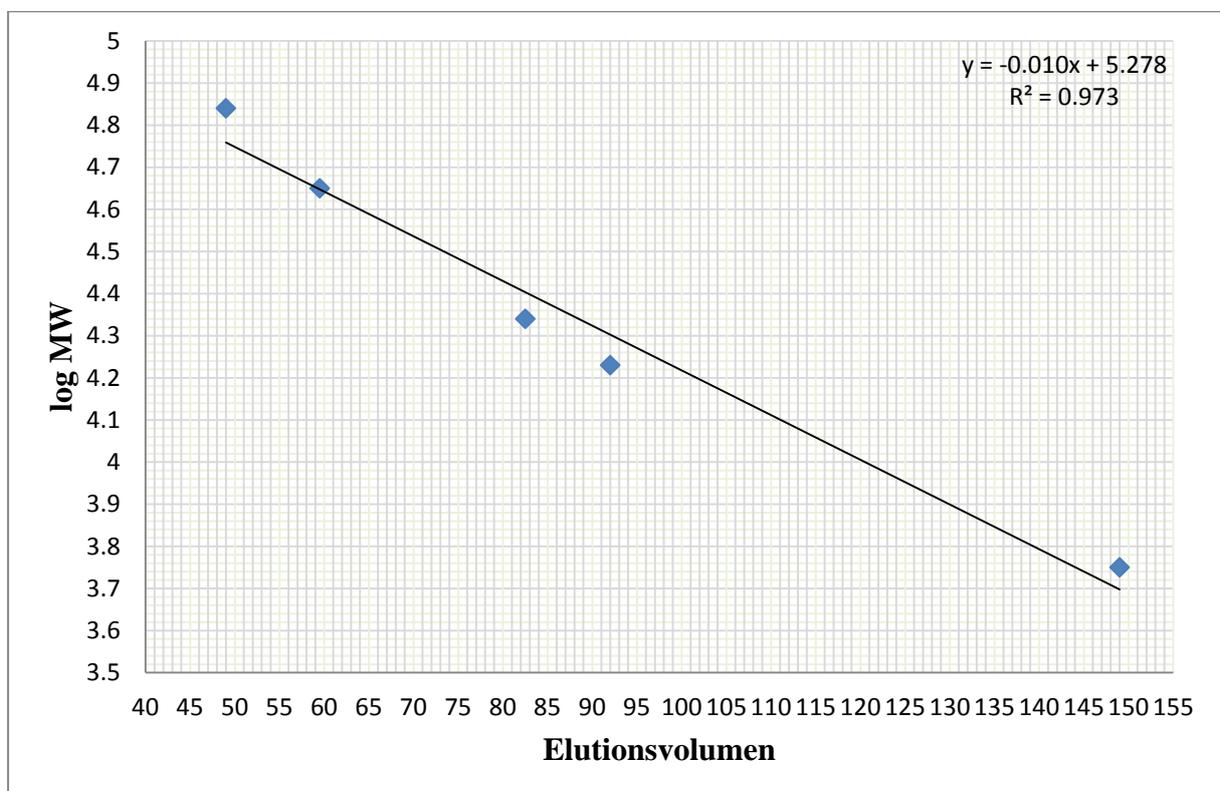


Abbildung 17: Darstellung der Standardproteine nach Fractogel-Säule

Tabelle 11: Molekulargewicht und Elutionsvolumen verschiedener Proteine

Protein	MW Da	Log MW	Elutionsvolumen ml
BSA	69000	4.84	49
Ovalbumin	45000	4.65	59.5
Tr. Inhibitor	22000	4.34	82.5
Myoglobin	17000	4.23	92
Insulin	5700	3.75	149

Eine Beziehung zwischen Elutionsvolumen des Proteins und seinem log Molekulargewicht wurde in der Tabelle 11 und der Abbildung. 18 gezeigt.

**Abbildung 18: Eichkurve der Fractogel-TSK HW-50(S)-Säule**

Von der ausgefällten Wirsingkohlpoteinlösung wurden ca. 100 ml genommen, zweimal zentrifugiert, über PD10 Säulen entsalzt und anschließend auf der Fractogelsäule beladen. Mit Hilfe des GradiFracto-System wurde die Aufzeichnung in Abb. 19 dargestellt.

Die Abb. 19 zeigt drei deutliche Peaks. Durch einen Vergleich mit der Eichkurve findet man, dass der erste große Peak (Fr. 11) einem Molekulargewicht von 34-35 KDa, der zweite (Fr.

12) einem von 28-29 KDa, und der dritte (Fr. 20) einem von 7-8 KDa entspricht. Auf dem Gel konnten viele Banden erkennbar gezeigt werden, welche auch mit dem WAX9-Antikörper reagierten und auf der Membran im Bereich von 6-14 KDa gezeigt werden. Diese Ergebnisse stimmen teilweise mit den Ergebnissen von Hinch, 1989 überein. Hinch hat für die Gelfiltration das Material Sephacryl S-200 benutzt, und hat gefunden, dass das CPP ein Molekulargewicht von 28.5 KDa besitzt (Hinch et al 1989b). Die Fraktionen wurden mit dem Speed Vac-Gerät konzentriert und wurde ein Frostschutz-Test für alle CPP-Fraktionen durchgeführt.

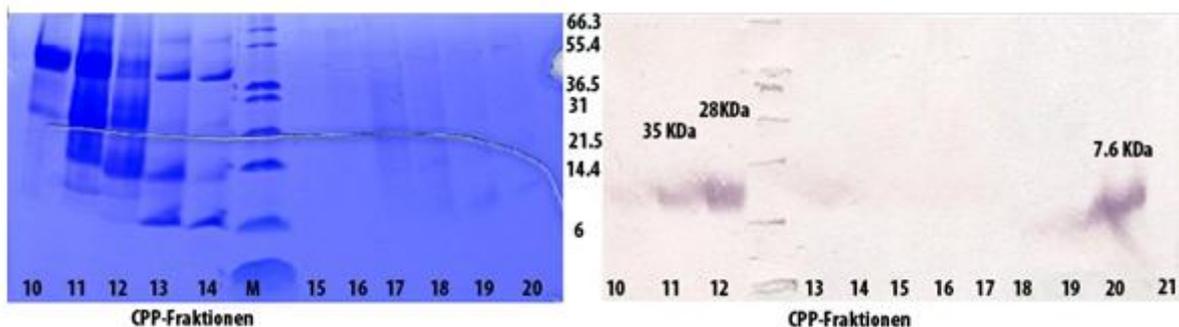
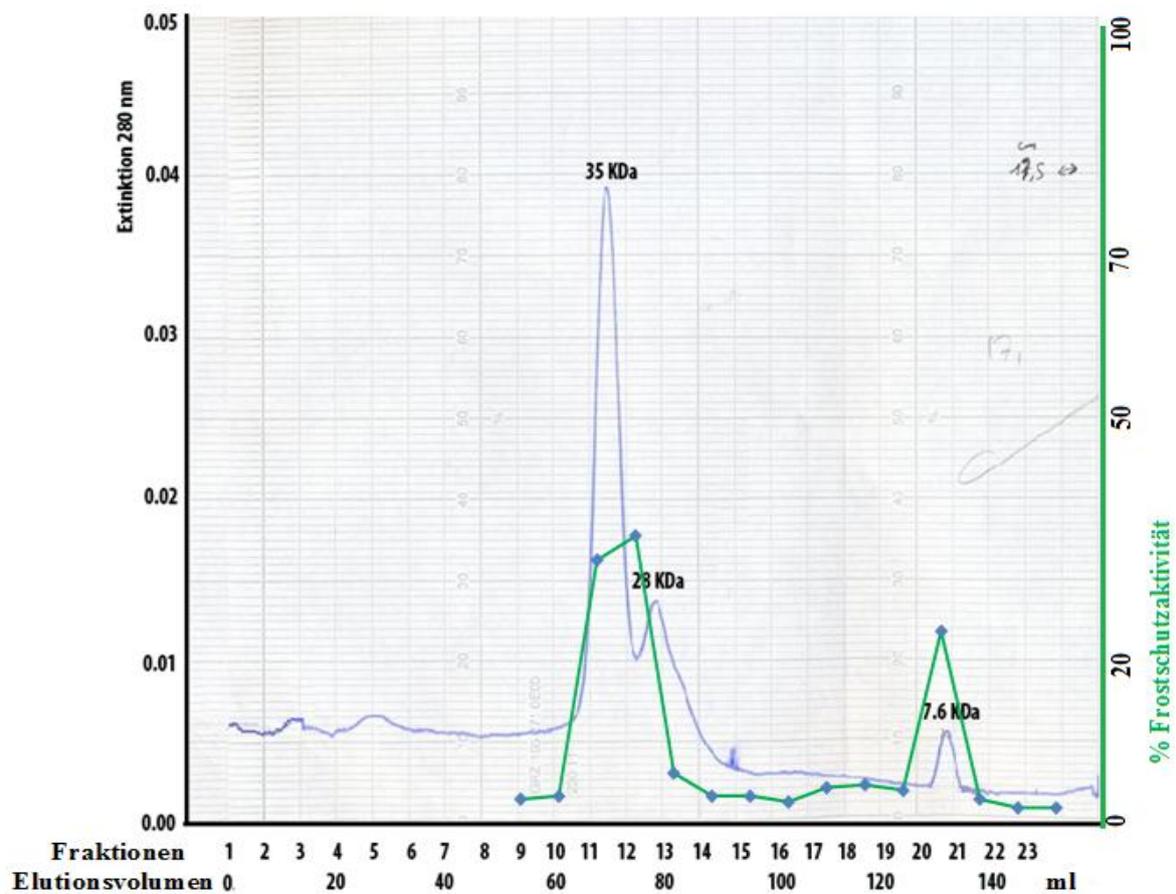


Abbildung 19: CPP nach Fractogel und Coomassie Gel

Beispiel einer Aufzeichnung eines Chromatogramms von CPP während der Auftrennung mit der Gelfiltration über Fractogel-Matrix und ein Coomassie gefärbtes Polyacrylamid-Gel der CPP-Fractionen nach der Filtration. 20 ml Hitze-behandelte und mit Ammoniumsulfat gefällte CPP-Kohlextrakt wurde mit einem pH-Wert von 2 (mit TFA) in 0.1 % TFA aufgenommen und auf die Amberlite XAD-Säule (Höhe 10 cm, Durchmesser 1 cm mit Bettvolumen von 4-5 ml) aufgetragen. Die gebundenen Proteine wurden mit 0.1 % TFA, 40 % CH₃CN eluiert. Das Eluat wurde mit Tris-Base auf pH 8 neutralisiert und beim Speed Vac für 5-7 Stunden oder ü. N wurde das Acetonitril verdampft. Die getrocknete CPP von 1mg/ml wurde in 50 mM Trispuffer pH 8 aufgenommen und auf die Fractogelsäule aufgetragen. Die gesammelten CPP-Fractionen wurden unter Vakuum konzentriert. Der Frostschutztest und die Auftrennung durch SDS-Gele wurden durchgeführt.

Während die Fraktion 12 mit einem Molekulargewicht von 28 KDa die höchste Frostschutzaktivität von 36 % hatte, zeigte die Fraktion 13 mit einem Molekulargewicht von 35 KDa ca. 32 % Frostschutzaktivität und die Fraktion 20 mit dem Molekulargewicht von 7-8 KDa eine geringe Frostschutzaktivität von ca. 24 %. Es könnte sein, dass das CPP ein Pentamerprotein oder Tetramerprotein ist, so dass jede Untereinheit ca. 7 KDa betrug. Nach dieser Analyse stellt die kleinste Größe des CPP ein Monomer, der Zweite ein Tetramer von 4 Untereinheiten und das Größte ein Pentamer von 5 Untereinheiten dar.

Der gleiche Gelfiltrationsversuch wurde für alle WAX9-Proteine durchgeführt, um ihr Molekulargewicht zu bestimmen. Durch einen Vergleich mit der Eichkurve zeigten die Experimente, dass für alle WAX9-Proteine zwei Peaks aufgezeichnet wurden. Der erste Peak entspricht einem Molekulargewicht von 14-19 KDa, der zweite Peak einem von 7-12.5 KDa (Abb. 20 bis 23). Die gesammelten Fractionen wurden unter Vakuum konzentriert und jede Fraktion mit Probenpuffer gelöst, davon wurden 20 µl pro Tasche auf dem Polyacrylamid-Gel aufgetragen und ca. 1.5 Stunden bei 150 V aufgetrennt. Auf der Membran konnte man erkennbar Banden bemerken, die ein Molekulargewicht zwischen 6-14 KDa hatten. Es könnte sein, dass die WAX9-Proteine dimere Proteine mit 6-7 KDa pro Untereinheit sind. Wegen der Mengeprobleme konnte keine Aktivität von WAX9-Proteinen gemessen werden.

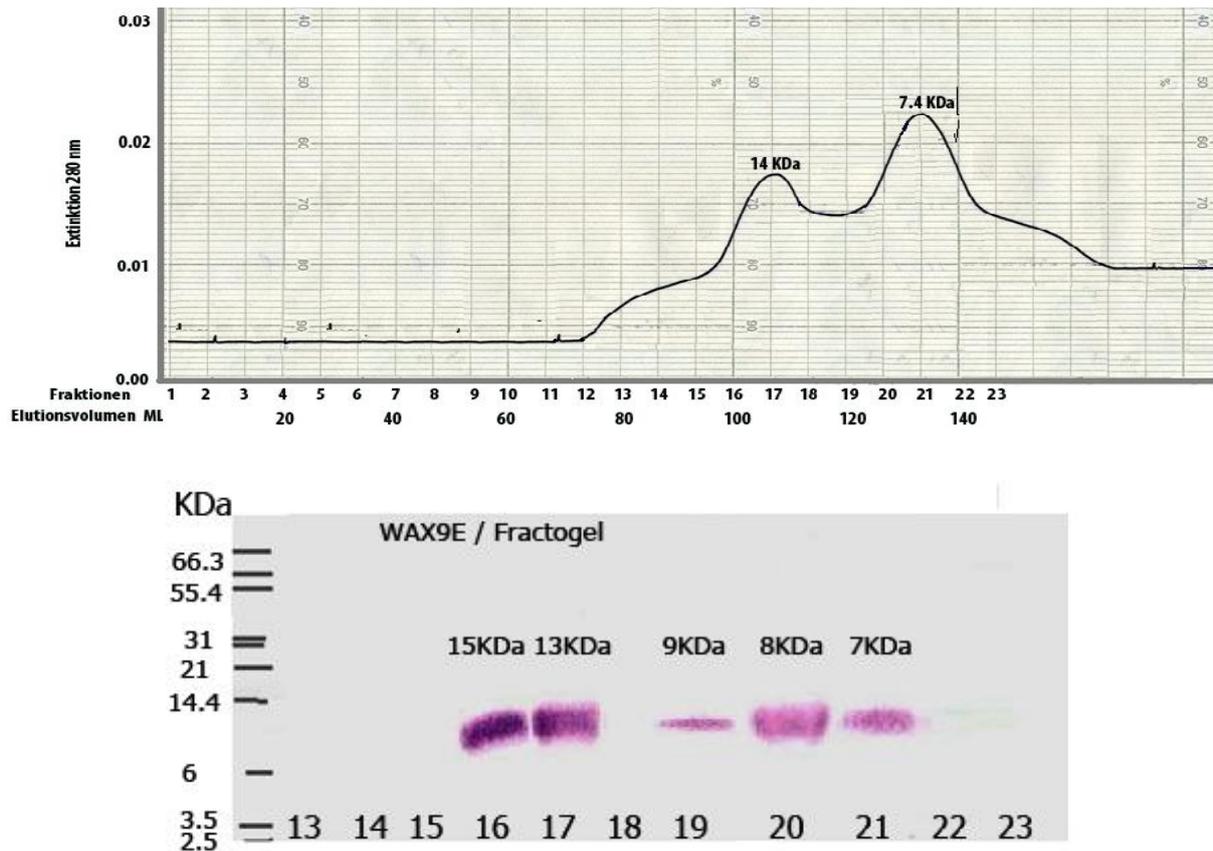
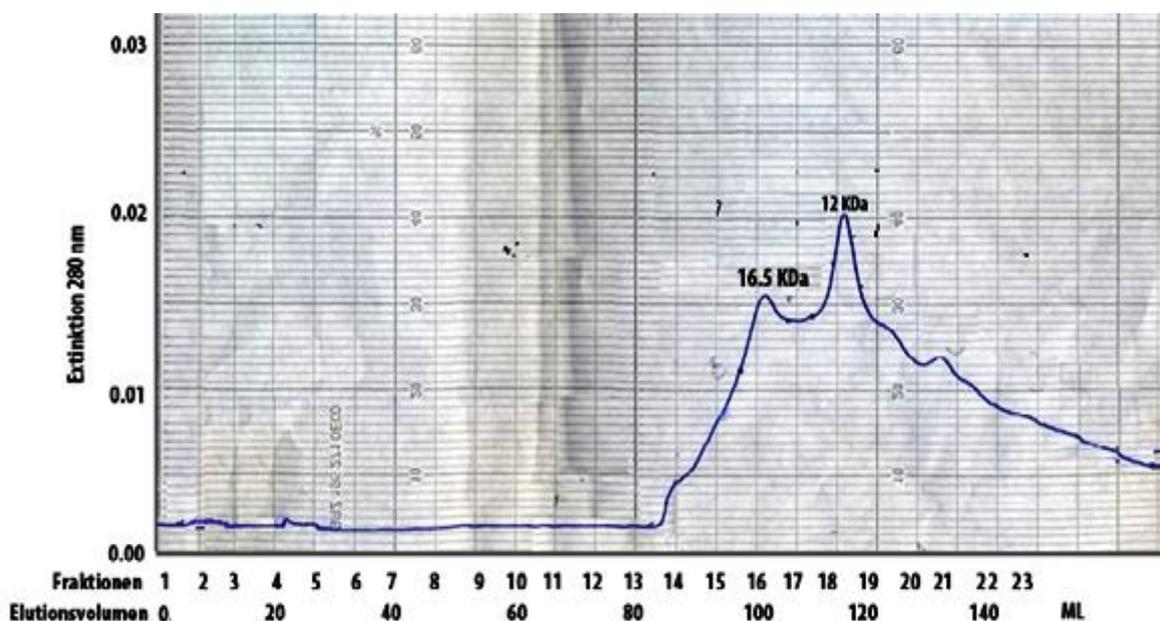


Abbildung 20: Molekulargewichtsbestimmung von WAX9E über Fractogelsäule

Beispiel einer Aufzeichnung eines Chromatogramms von WAX9E während der Gelfiltration über Fractogel-Matrix und ein Coomassie gefärbtes Polyacrylamid-Gel. Die gesammelten Fraktionen wurden unter Vakuum konzentriert und jede Fraktion mit Probenpuffer gelöst, davon wurden 20 μ l pro Tasche auf dem Polyacrylamid-Gel aufgetragen und ca. 1.5 Stunde bei 150 V aufgetrennt.



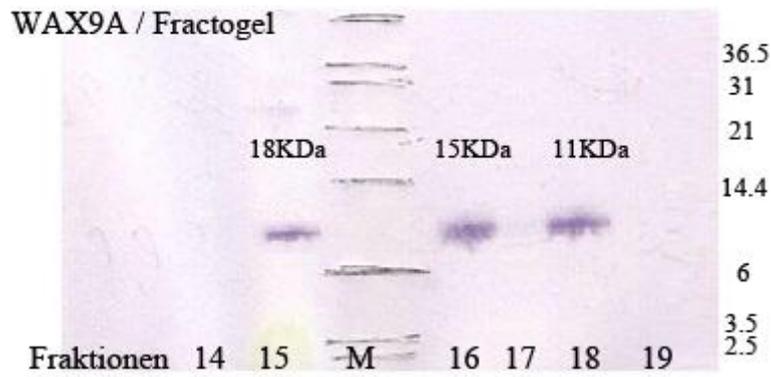


Abbildung 21: Molekulargewichtsbestimmung von WAX9A über Fractogelsäule

Beispiel einer Aufzeichnung eines Chromatogramms von WAX9A während der Gelfiltration über Fractogel-Matrix und ein Coomassie gefärbtes Polyacrylamid-Gel. Die gesammelten Fraktionen wurden unter Vakuum konzentriert und jede Fraktion mit Probenpuffer gelöst, davon wurden 20 µl pro Tasche auf dem Polyacrylamid-Gel aufgetragen und ca. 1.5 Stunde bei 150 V aufgetrennt.

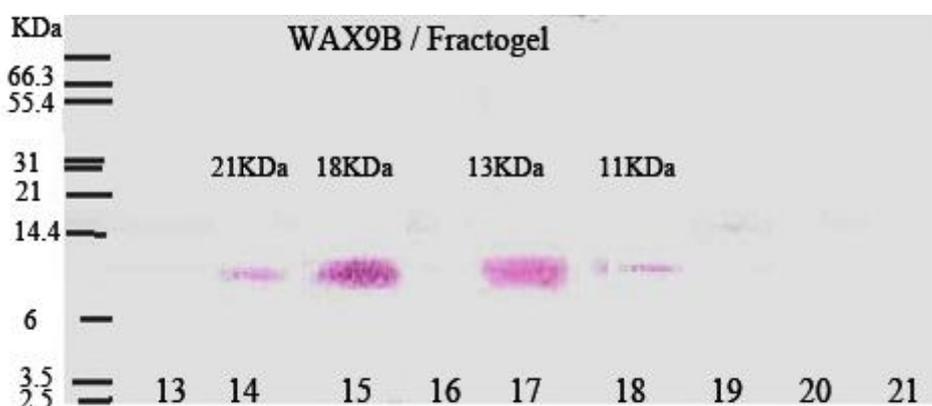
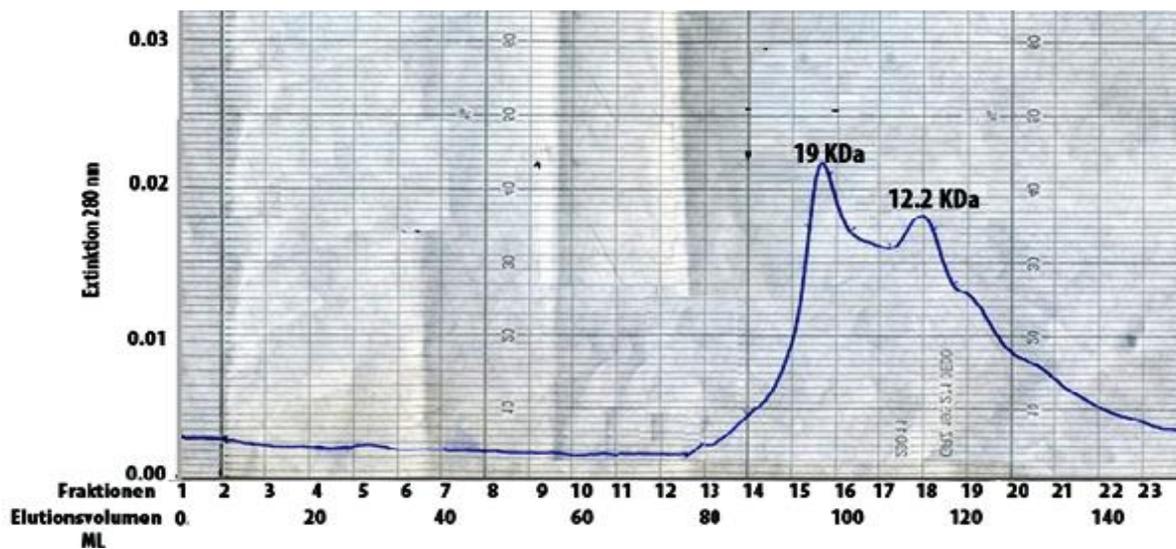


Abbildung 22: Molekulargewichtsbestimmung von WAX9B über Fractogelsäule

Beispiel einer Aufzeichnung eines Chromatogramms von WAX9B während der Gelfiltration über Fractogel-Matrix und ein Coomassie gefärbtes Polyacrylamid-Gel. Die gesammelten Fraktionen wurden unter Vakuum konzentriert und jede Fraktion mit Probenpuffer gelöst, davon wurden 20 µl pro Tasche auf dem Polyacrylamid-Gel aufgetragen und ca. 1.5 Stunde bei 150 V aufgetrennt.

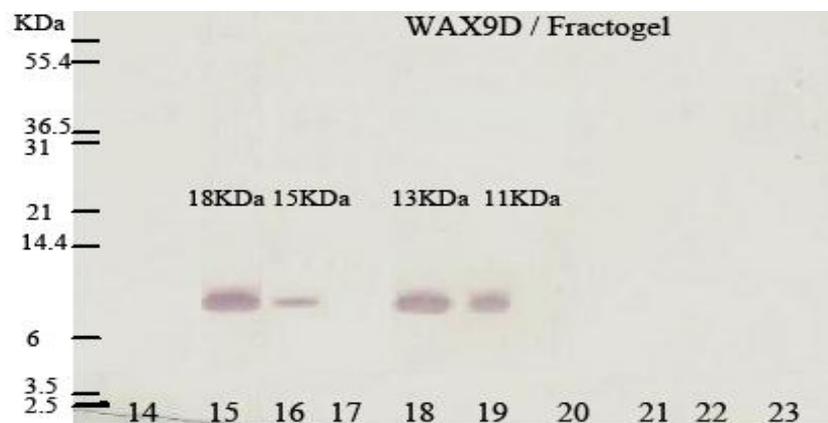
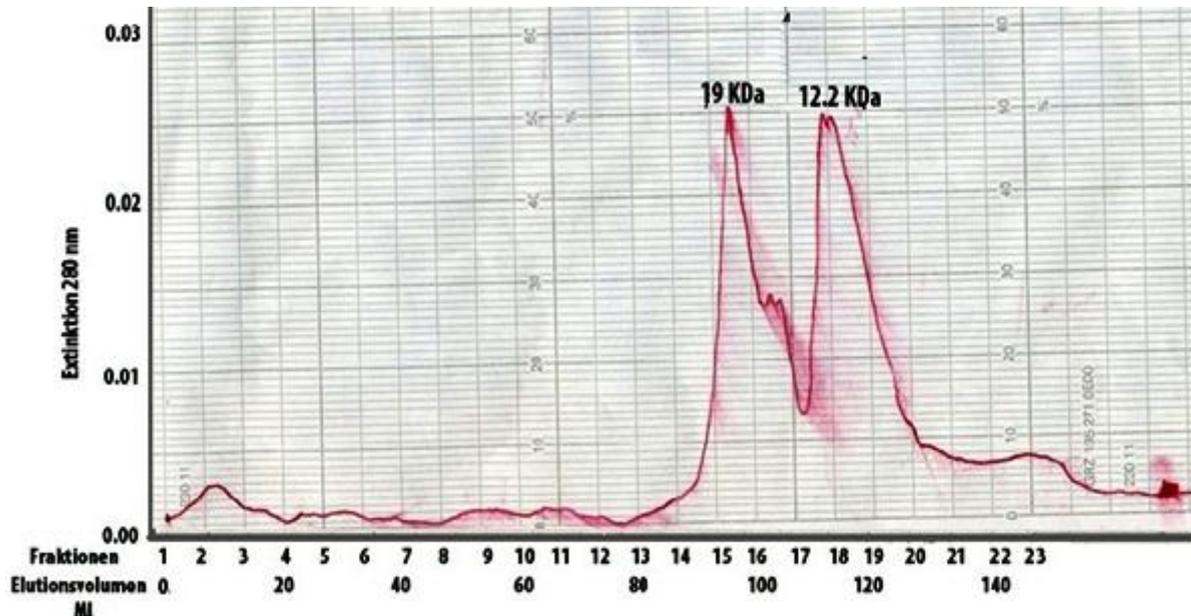


Abbildung 23: Molekulargewichtsbestimmung von WAX9D über Fractogelsäule

Beispiel einer Aufzeichnung eines Chromatogramms von WAX9D während der Gelfiltration über Fractogel-Matrix und ein Coomassie gefärbtes Polyacrylamid-Gel. Die gesammelten Fraktionen wurden unter Vakuum konzentriert und jede Fraktion mit Probenpuffer gelöst, davon wurden 20 µl pro Tasche auf dem Polyacrylamid-Gel aufgetragen und ca. 1.5 Stunde bei 150 V aufgetrennt.

4.7 Frostschutzaktivität von WAX9-Proteinen

Der Frostschutztest wurde bei den nach Reverse-Phase-Chromatographie über die Amberlite XDA7-Matrix gesammelten WAX9A/B/D/E und WAX9Am-Proben sowie bei der Negativkontrollprobe (*Pichia pastoris* Wild Typ X33) durchgeführt, deren Elutionschromatogramme in den Abbildungen 15 und 16 dargestellt wurden. Ein Paralleltest mit Kohlextrakt (CPP) als Positivkontrolle wurde bei allen Tests durchgeführt. Die Proteinkonzentrationen (1 mg/ml) der WAX9-Proben und des Kohlextrakts CPP wurden mit Hilfe der Bradford-Methode bestimmt. Wie in 3.6.10 beschrieben wurde, bestehen die Versuchansätze aus 100 µl Thylakoidsuspension von 1 mg Chlorophyll/ml und 100 µl Proteinprobe, so dass die Endkonzentration des getesteten Proteins halbiert wird. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung aufgeführt.

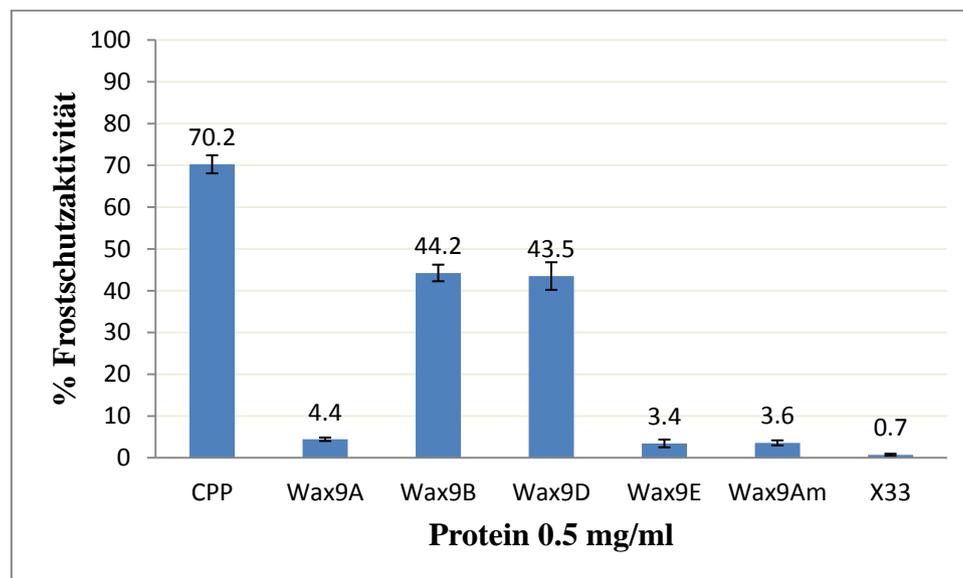


Abbildung 24: Frostschutzaktivität des CPP und von WAX9-Proteinen

Die nach Reverse-Phase-Chromatographie über Amberlite XAD7-Matrix gesammelten WAX9-Proteine und CPP wurden nach der Verdampfung des Acetonitrils über Speed Vac mit der Probenlösung (10 mM Saccharose, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂) resuspendiert und über NAP5-Säule entsalzt. Die Proteinproben wurden von einer 1 mg/ml Proteinstammlösung genommen. 100 µl Thylakoidsuspension (von 1 mg Chlorophyll/ml) wurde mit 100 µl Proteinprobe 2-3 Stunden bei -20 °C eingefroren, so dass die Endkonzentration des getesteten Proteins 0.5 mg/ml betrug, aufgetaut und die Frostschutzaktivität gemessen. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert mit der Standardabweichung von drei getesteten Proben dar.

Die Abb. 24 zeigt die Aktivitätswerte aller getesteten Proben. WAX9D zeigt als Bestandteil des Kryoprotektins (Hincha et al. 2001) eine kryoprotektive Wirkung von ca. 43.5 %,

Kohleextrakt eine von 70.2 %. WAX9B zeigt die ungefähr gleiche Aktivität wie WAX9D. WAX9E, WAX9A und WAX9Am, die in der vorliegenden Arbeit überexprimiert und getestet wurden, hatten keinen Frostschutzeffekt. Wie Schilling 2003 gezeigt hat, wies WAX9E in *E. coli* überexprimiert keine Aktivität auf. Die Negativkontrolle *Pichia pastoris* X33-Probe wies auch keine Frostschutzaktivität auf und dies zeigt, dass native Hefeproteine keine kryoprotektive Wirkung besitzen. Die Gefrierschutzaktivität ändert sich nicht weder mit noch ohne Calcium und Mangan-Ionen in Probenlösung.

Unter der Annahme, dass sich die Frostschutzaktivität linear zu der Proteinkonzentration verhält (Hincha & Schmitt 1992a) wurden die spezifischen Frostschutzaktivitäten pro mg Proteinäquivalent berechnet, um die Proben zu vergleichen.

Tabelle 12: Spezifische Frostschutzaktivitäten der WAX9-Proteine und CPP

Protein	% Frostschutz für 0.5 mg/ml	Konz. mg/ml für 100% Frostschutz
CPP	70.2	0.712
WAX9A	4.4	11.36
WAX9B	44.2	1.13
WAX9D	43.5	1.14
WAX9E	3.4	14.7
WAX9Am	3.6	13.8

Die Tabelle 12 stellt die Werte der spezifischen Frostschutzaktivitäten der WAX9-Proteine sowie die theoretischen Proteinkonzentrationen, die 100 % Frostschutz gewährleisten, dar. Die verwendeten Endkonzentrationen der Proteine in den Versuchsansätzen betragen 0.5 mg/ml. Die 2. Spalte stellt die gemessenen Aktivitäten dar. Die Proteinkonzentrationen, die 100 % Frostschutzaktivität ermöglichen, wurden in Spalte 3 ermittelt. Mit einer Proteinkonzentration von 0.712 mg/ml zeigt der Kohleextrakt die höchste Aktivität, die 100 % Frostschutz gewährleistet. Der aufgearbeitete Kohleextrakt nach Reverse-Phase-Chromatographie wies spezifische Frostschutzaktivität von 372 % pro mg Protein auf (Sieg et al 1996). Bei Hincha 2002 wies das von Cabbage isolierte CPP eine spezifische Frostschutzaktivität von 266 % pro mg Protein (Hincha 2002). De Oliveira-Funk hat gefunden, dass WAX9D *in vitro* einen kryoprotektiven Effekt von 70 %, WAX9E von 37 % und das CPP von 273 % pro mg/ml besitzen (De Oliveira-Funk 2005).

Die aufgearbeitete Kohleextraktprobe nach Reverse-Phase-Chromatographie wies in dieser Arbeit eine spezifische Frostschutzaktivität von 140.4 % pro mg Protein auf. Der

Messungsunterschied der spezifischen Frostschutzaktivitäten im Vergleich mit Sieg et al 1996 und Hinch 2002 könnte auf die Isolierung des Kohleextrakts zurückzuführen sein. Die Frostschutzaktivität kann auch von einem Kohleextrakt zum anderen unterschiedlich sein. Die WAX9D-, WAX9B-Proben zeigen mit ca. 1.13 mg/ml Proteinkonzentration die höchste Aktivität (100 % Frostschutz) der überexprimierten Proteine. Die beiden WAX9D und WAX9B zeigten eine spezifische kryoprotektive Wirkung von ca. 87 % pro mg bei WAX9D und von 88.4 % pro mg bei WAX9B. Diese Wirkungen waren gering im Vergleich mit dem Kohleextrakt (140.4 % pro mg Protein). Schilling zeigte auch, dass das in *E. coli* exprimierte WAX9D eine sehr hohe Frostschutzaktivität mit einem gemessenen Wert von 57 % pro 15 µg Protein (3800 % pro mg Protein) besitzt (Schilling 2003). WAX9E zeigt keine oder sehr geringe Frostschutzaktivität, was mit den Ergebnissen von Schilling übereinstimmt. WAX9A, WAX9Am wiesen sehr geringe Frostschutzaktivität auf. Schilling konnte aber eine klare Frostschutzaktivität für WAX9A messen.

Tabelle 13: Frostschutzaktivitäten von verschiedenen Molekülen

% Frostschutz pro 1 mg/ml	CPP	WAX9A	WAX9B	WAX9D	WAX9E
In dieser Arbeit	140.4	8.8	88.4	87	6.8
Schilling 2003	-	-	-	3800	0
Sieg 1996	375	-	-	-	-
Hinch 2002	266	-	-	-	-
De Oliveira-Funk	273	-	-	70	37

Es wurde auch eine Beziehung zwischen den Proteinkonzentrationen und den WAX9/PPP-Proben dargestellt. Verdünnungsreihen von Proteinkonzentrationen wurden mit Probenlösung erstellt (Abb. 25).

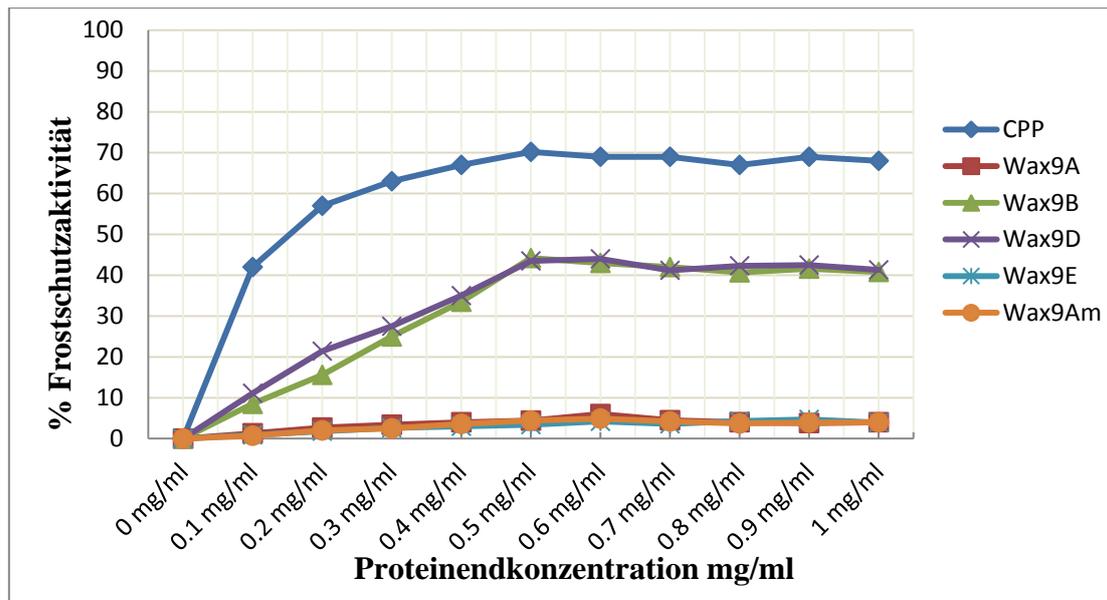


Abbildung 25: Frostschutzaktivität in Abhängigkeit mit der Proteinkonzentration

Die nach Amberlite XAD7-Matrix gesammelten WAX9-Proteine und CPP wurden nach der Verdampfung des Acetonitrils über Speed Vac mit der Probenlösung (10 mM Saccharose, 1 mM $MnCl_2$, 1 mM $CaCl_2$) resuspendiert und über NAP5-Säule entsalzt. Eine Proteinkonzentrationsreihe (0-1mg/ml) wurde genommen. 100 μ l Thylakoidsuspension (von 1 mg Chlorophyll/ml) wurden mit 100 μ l Proteinprobe 2 Stunden bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren, aufgetaut und die Frostschutzaktivität gemessen.

Bis zu 0.5 mg/ml zeigen die WAX9B und WAX9D ansteigende Beziehung zwischen den Proteinkonzentrationen und den gemessenen Frostschutzaktivitäten. Die Beziehung bleibt so stabil bis zu 0.7 mg/ml, dann beginnt die Sättigung. Der Konzentrationseffekt bei CPP-Proben steigt ebenfalls bis 0.5 mg/ml und ist stärker ausgeprägt als bei WAX9D/WAX9B. Bei allen niedrigen bzw. hohen Proteinkonzentrationen von WAX9E, WAX9A, und WAX9Am konnte keine oder nur sehr geringe kryoprotektive Aktivität nachgewiesen werden.

4.8 Lipidtransferaktivität von WAX9-Proteinen

Die in diesem Teil der Arbeit durchgeführten Experimente zeigen eine Lipidtransferaktivität bei WAX9- und CPP-Proben, die nach Reverse-Phase-Chromatographie über Amberlite XAD7-Matrix gesammelt wurden. Für die Durchführung des LTP-Tests wurden 10 μ l Donorvesikel, 10 μ l Akzeptorvesikel und 2 ml TES-Puffer in einer Messküvette gemischt. 50 μ l von der 1mg/ml Proteinstammlösung wurden zu der Mischung hinzugefügt (25 μ g Proteinkonzentration/ml), zusammen gemischt und mit Fluorimeter gemessen. Eine *Pichia pastoris* Wild Typ X33-Probe wurde als Negativkontrolle getestet. Nach der Messung wurde

der Unterschied $\Delta F/\text{min}$ zwischen dem ersten Wert (0 Sekunden) und dem letzten Wert (60 Sekunden) genommen. Ein hoher Wert für $\Delta F/\text{min}$ entspricht also einer hohen Lipid-Transfer-Aktivität. Die Lipidtransferaktivitätswerte sind in der Abbildung 26 dargestellt.

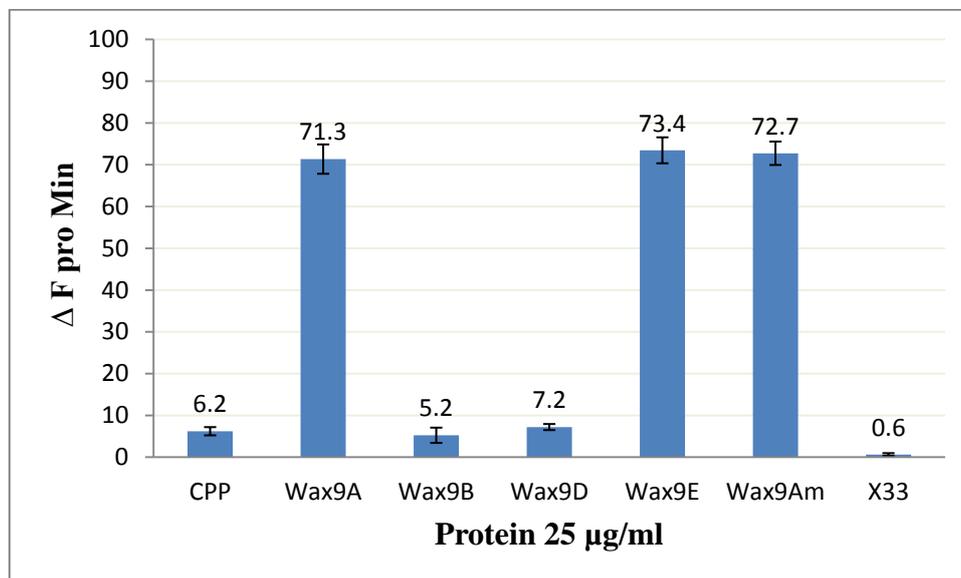


Abbildung 26: LTP-Test WAX9 und CPP-Proben

Die nach Amberlite XAD7-Matrix gesammelten WAX9-Proteine und CPP wurden nach der Neutralisierung in einer UNIVAPO150H Concentrator Zentrifuge unter Vakuum (ü. N) gehalten, um das CH_3CN zu verdampfen. Die getrockneten Protein-Proben wurden mit Probenlösung (10 mM Saccharose, 1 mM MnCl_2 , 1 mM CaCl_2) gelöst, über NAP5-Säulen entsalzt und mit LTP-Test geprüft. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert mit der Standardabweichung von drei getesteten Proben dar. $\Delta F \text{ pro Min}$ = Veränderung der Fluoreszenz pro Minute.

Die Abb. 26 zeigt die Lipidtransferaktivitätswerte der WAX9-Proben und CPP, die Bindungsaffinität zu der Amberlitematrix aufwiesen und mit dem Elutionspuffer eluiert wurden. Die Endkonzentration des Proteins betrug $25 \mu\text{g/ml}$. Die in *Pichia pastoris* überexprimierten WAX9A, WAX9E und WAX9Am besitzen die höchsten Lipidtransferwerte mit ca. $73 \Delta F \text{ pro min}$. Sie zeigen deutlich den Charakter der Lipidtransferproteine. Die WAX9D, WAX9B und CPP haben schwache Lipidtransfer-Aktivitätswerte von 5 bis $6 \Delta F \text{ pro min}$. Die Negativkontrolle (*Pichia pastoris* Wild Typ X33) wies keine Lipidtransferaktivität auf und dies zeigt, dass weder native Hefeproteine noch Proteine aus dem Kulturmedium die Messungen der WAX9-Proteinproben stören bzw. verfälschen.

Es wurde eine spezifische Lipidtransfer-Aktivität pro mg Proteinäquivalent berechnet, um die Proteinproben zu vergleichen.

Tabelle 14: Spezifische Lipidtransferaktivität der WAX9-Proteine und CPP

Protein	LTP 25µg/ml	LTP 1 mg/ml
CPP	6.2	248
WAX9A	71.3	2852
WAX9B	5.2	208
WAX9D	7.2	288
WAX9E	73.4	2936
WAX9Am	72.7	2908

Die Tab. 14 stellt die Werte der Lipidtransferaktivität der WAX9- und CPP-Proben pro Versuchansatz sowie die theoretischen spezifischen Lipidtransferaktivität $\Delta F/\text{min}$ pro mg Protein dar. Die verwendeten Konzentrationen der Proteine in den Versuchsansätzen betragen 0,025 mg/ml. Die 2. Spalte stellt die gemessenen Aktivitäten dar. Es wurden Lipidtransfer-Aktivitätswerte $\Delta F/\text{min}$ pro mg Protein berechnet (Spalte 3). Die Experimente zeigen bei WAX9E, WAX9A und WAX9Am den ungefähr gleichen Lipidtransferaktivitätswert (von 2850-2936 $\Delta F/\text{min}$ pro mg). Bei Schilling besitzen die in *E. coli* überexprimierten WAX9-Proteine eine ähnliche spezifische Aktivität von 2933 $\Delta F/\text{min}$ pro mg für WAX9E. WAX9A zeigte bei Schilling keine Lipidtransfer-Aktivität. Die in dieser Arbeit verwendeten WAX9B, WAX9D-Proteine zeigten mit 208-288 $\Delta F/\text{min}$ pro mg Protein eine nahe Aktivität zu der von dem isolierten Kryoprotektin (CPP) aus dem Kohlextrakt (248 $\Delta F/\text{min}$ pro mg Protein).

Tabelle 15: Lipidtransferaktivität von verschiedenen Molekülen

LTP 1 mg/ml	CPP	WAX9A	WAX9B	WAX9D	WAX9E
Schilling 2003		0	267	267	2933
De Oliveira-Funk	255			288	1800
In vorliegender Arbeit	248	2852	208	288	2936

Unter der Annahme des Einflusses der Proteinkonzentration auf die Wirksamkeit wurde eine Beziehung zwischen Lipidtransferaktivität und Proteinkonzentrationen der WAX9 und CPP-Proben dargestellt (Abb. 27). Die Verdünnungsreihen wurden mit Testpuffer erstellt.

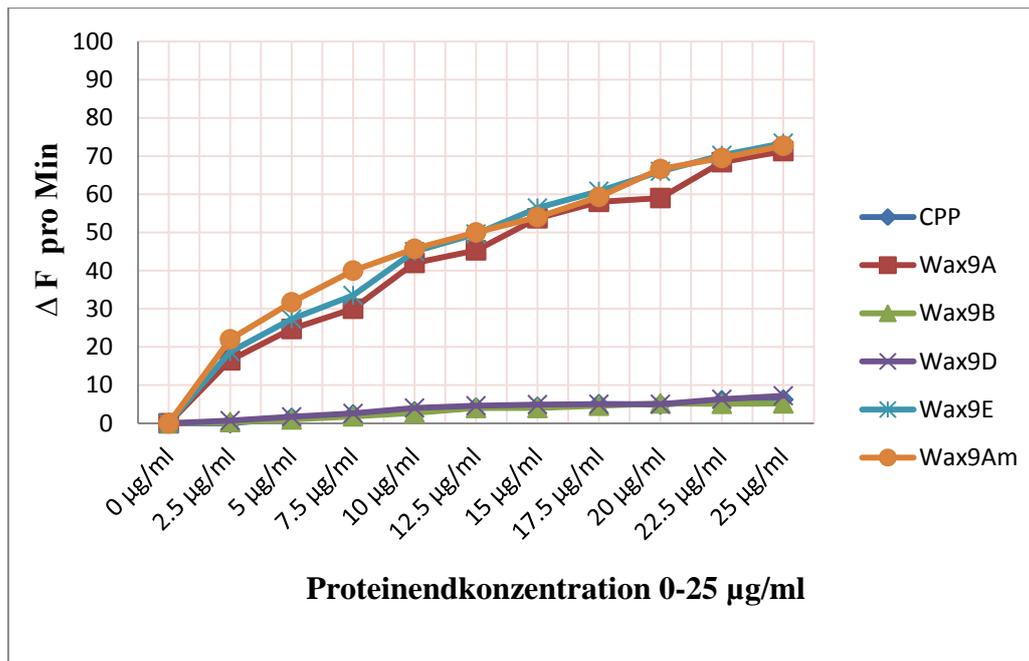


Abbildung 27: Lipidtransferaktivität in Abhängigkeit mit der Proteinkonzentration

Die nach Amberlite XAD7-Matrix gesammelten WAX9-Proteine und CPP wurden nach der Verdampfung des Acetonitrils über Speed Vac mit der Probenlösung (10 mM Saccharose, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂) resuspendiert, über NAP5-Säule entsalzt und für LTP geprüft. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert von drei getesteten Proben dar. ΔF pro Min = Veränderung der Fluoreszenz pro Minute.

Die Proteinendkonzentrationen wurden mit der Bradford-Methode ermittelt. Bei der gemessenen Lipidtransferaktivität von WAX9A, WAX9E und WAX9Am gab es einen deutlichen Anstieg bis zur letzten Konzentration. Bei allen Proteinkonzentrationen von WAX9B, WAX9D und CPP konnte keine oder nur sehr geringe Lipidtransfer-Aktivitäten (bis ca. 7 ΔF pro min) nachgewiesen werden.

4.9 Prüfung der Aktivitäten mit und ohne Calcium und Mangan-Ionen

(Sieg et al 1996) zeigten, dass Kryoprotektin kationenabhängig ist. Es benötigt zur Aktivität sowohl Calcium als auch Mangan und ist mit dieser Eigenschaft einigen Lektinen aus Leguminosen ähnlich, die ebenfalls Calcium- und manganabhängig sind. Die Frostschutzaktivität von CPP bzw. Wax9-Proteinen wurde in dieser Arbeit mit und ohne Kationen geprüft. Es konnte keine unterschiedliche Gefrierschutzaktivität von

kryoprotektiven WAX9-Proteinen und auch von CPP mit und ohne Calcium und Mangan-Ionen nachgewiesen werden (Abb. 28).

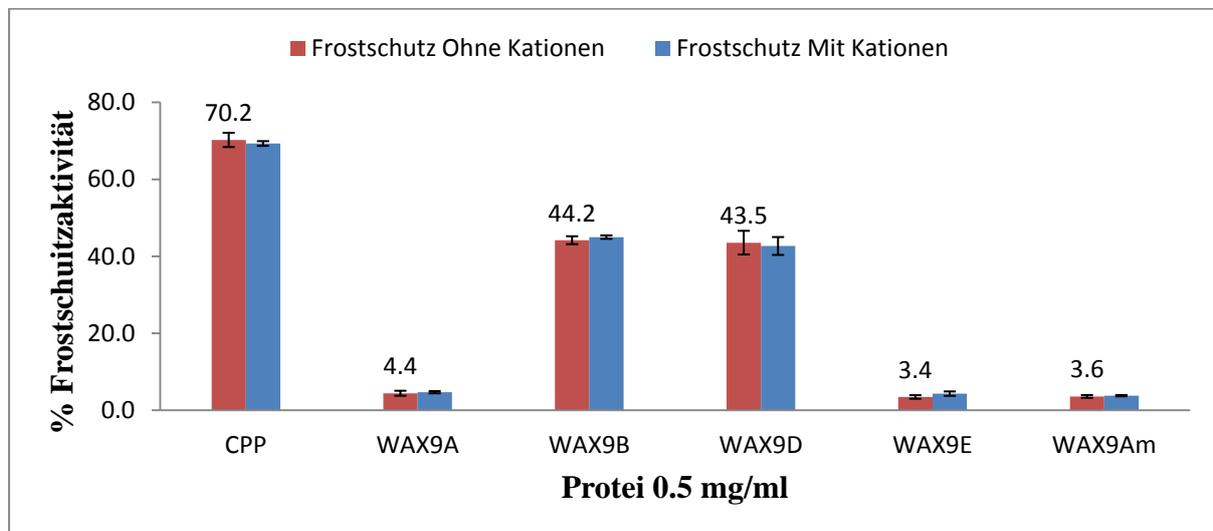


Abbildung 28: Die Frostschutzaktivität mit und ohne Kationen

Die nach Reverse-Phase-Chromatographie über Amberlite XAD7-Matrix gesammelten WAX9-Proteine und CPP wurden nach der Verdampfung des Acetonitrils über Speed Vac mit Probenlösung (ohne und mit Kationen) resuspendiert und über NAP5-Säule entsalzt. Die Proteinproben wurden von einer 1 mg/ml Proteinstammlösung genommen. 100 μ l Thylakoidsuspension (von 1 mg Chlorophyll/ml) wurde mit 100 μ l Proteinprobe 2-3 Stunden bei -20 °C eingefroren, so dass die Endkonzentration des getesteten Proteins 0.5 mg/ml betrug, aufgetaut und die Frostschutzaktivität gemessen. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert mit der Standardabweichung von drei getesteten Proben dar.

Die Lipidtransfer-Aktivität der WAX9-Proteine bzw. CPP in Gegenwart von Calcium und Mangan-Ionen wurde leicht verringert (Abb. 29).

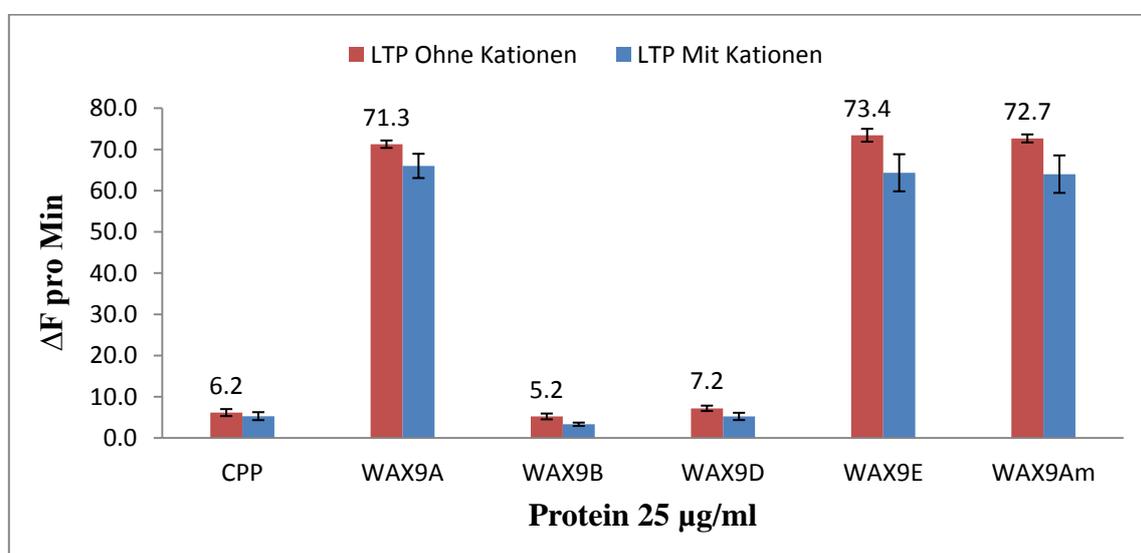


Abbildung 29: Lipidtransferaktivität mit und ohne Kationen

Die nach Amberlite XAD7-Matrix gesammelten WAX9-Proteine und CPP wurden nach der Neutralisierung in einer UNIVAPO150H Concentrator Zentrifuge unter Vakuum (ü. N) gehalten, um das CH₃CN zu verdampfen. Die getrockneten Protein-Proben wurden mit Probenlösung (ohne und mit Kationen) gelöst, über NAP5-Säulen entsalzt und mit LTP-Test geprüft. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert mit der Standardabweichung von drei getesteten Proben dar. ΔF pro Min = Veränderung der Fluoreszenz pro Minute.

4.10 Mischung aller WAX9-Proteine und Prüfung der Aktivitäten

Um zu sehen ob die Mischung von mehreren WAX9-Proteinen eine Rolle bei der Frostaktivität sowie bei der Lipidtransfer-Aktivität spielen, wurde dieser Test durchgeführt. Die kryoprotektiven WAX9B und WAX9D Proteine und die LTPs WAX9A und WAX9E wurden zusammengemischt und erst auf LTP-Tests getestet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung gezeigt.

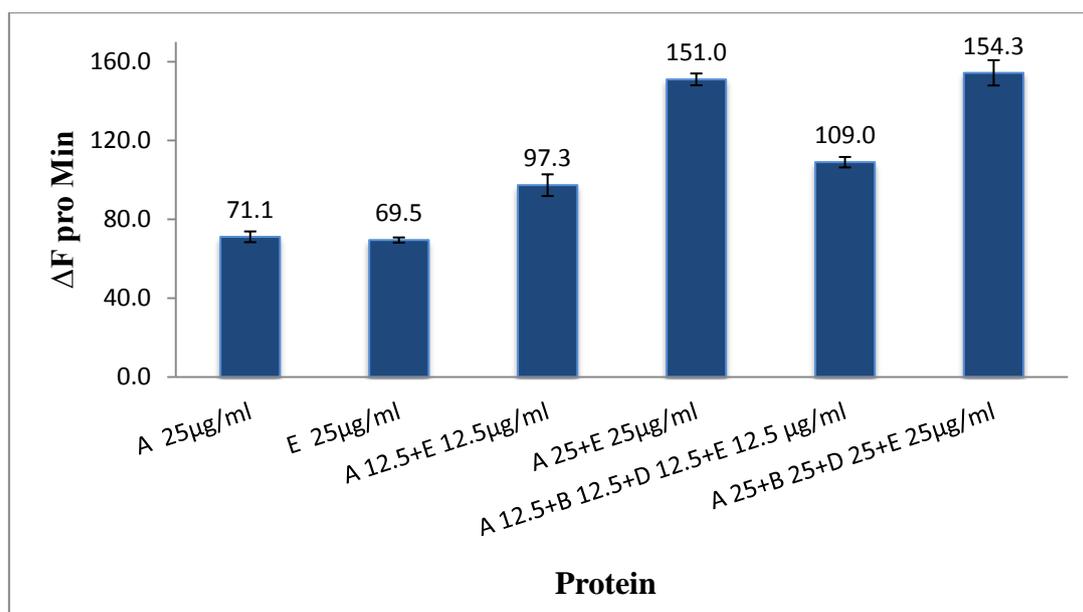


Abbildung 30: Lipidtransferaktivität der Mischung von WAX9-Proteinen

Die nach Amberlite XAD7-Matrix gesammelten WAX9-Proteine wurden nach der Neutralisierung in einer UNIVAPO150H Concentrator Zentrifuge unter Vakuum (ü. N) gehalten, um das CH₃CN zu verdampfen. Die gereinigten Proteinproben wurden mit Probenlösung (10 mM Saccharose, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂) gelöst, über NAP5-Säulen entsalzt und mit LTP-Test geprüft. Die WAX9-Proteine wurden zusammen und einzeln im LTP-Test geprüft. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert mit der Standardabweichung von drei getesteten Proben dar. ΔF pro Min = Veränderung der Fluoreszenz pro Minute.

Die Abbildung 30 zeigt, dass die Mischung von WAX9A und WAX9E eine höhere Lipidtransfer-Aktivität verglichen mit den einzelnen Proteinen aufweist. Zwischen der Mischung der beiden LTPs (WAX9A, WAX9E) und der Mischung aller WAX9-Vertreter gab es keinen oder nur einen geringen Unterschied in der Lipidtransfer-Aktivität, was uns zeigen kann, dass die kryoprotektiven WAX9B und WAX9D keine Beeinflussung auf die Lipidtransfer-Aktivität der LTPs WAX9A und WAX9E hatten.

Um zu sehen, ob die LTPs WAX9A und WAX9E die kryoprotektiven Proteine WAX9B und WAX9D ohne eigene kryoprotektive Aktivität beeinflussen oder nicht, wurde eine Mischung von beiden kryoprotektiven bzw. die LTPs herstellt und auf Frostschutzaktivität geprüft. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 31 gezeigt.

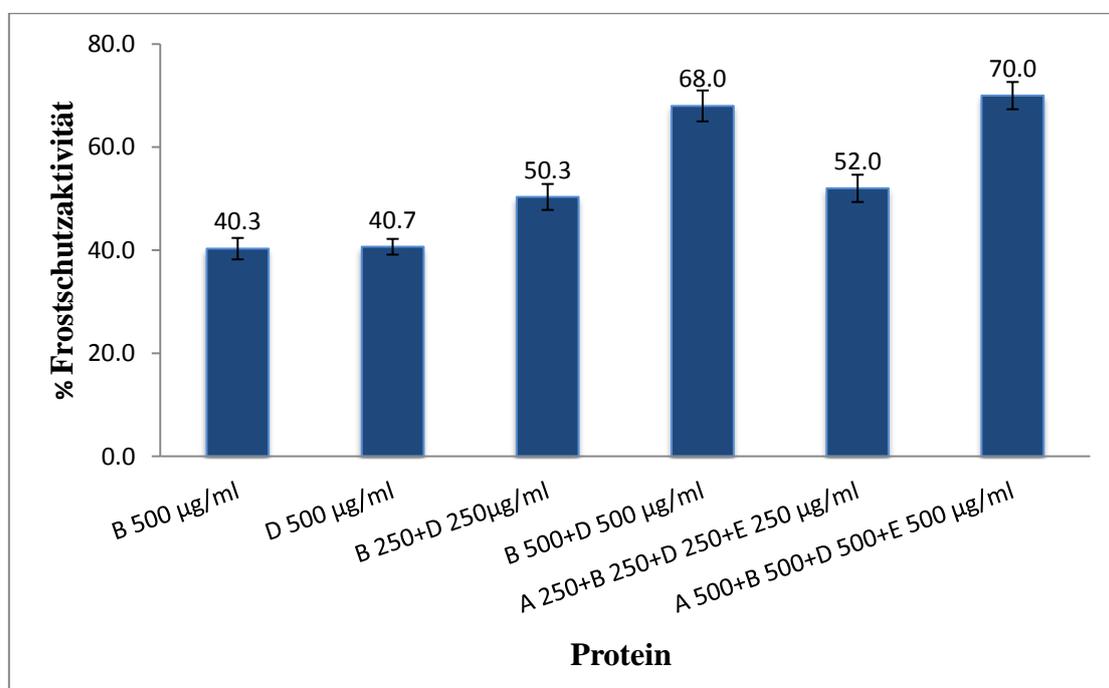


Abbildung 31: Frostschutzaktivität der Mischung von WAX9-Proteinen

Die nach Amberlite XAD7-Matrix gesammelten WAX9-Proteine wurden nach der Neutralisierung in einer UNIVAPO150H Concentrator Zentrifuge unter Vakuum (ü. N) gehalten, um das CH₃CN zu verdampfen. Die getrockneten Protein-Proben wurden mit Probenlösung (10 mM Saccharose, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂) gelöst, über NAP5-Säulen entsalzt und mit Frostschutztest geprüft. Die WAX9-Proteine wurden zusammen und einzeln im Frostschutz-Test geprüft. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert mit der Standardabweichung von drei getesteten Proben dar.

Die Abb. 31 zeigt, dass die Mischung von beiden kryoprotektiven Proteinen WAX9B und WAX9D eine höhere Frostschutzaktivität verglichen mit den einzelnen Proteinen besitzt.

Zwischen der Mischung der beiden kryoprotektiven Proteine (WAX9B und WAX9D) und der Mischung aller WAX9-Vertreter gab es keinen oder nur einen geringen Unterschied in der Frostschutzaktivität, was uns zeigen kann, dass die LTPs WAX9A und WAX9E keine Beeinflussung auf die kryoprotektive Aktivität der WAX9B und WAX9D hatten. Die Mischung von den beiden kryoprotektiven WAX9B und WAX9D Proteinen zeigte die gleiche Frostschutzaktivität wie CPP (ca. 70 %).

4.11 Bindungsstudien von WAX9 und CPP an den Thylakoidmembranen

Nach der Inkubation der WAX9-Proteine bzw. von Kohleextrakt (wie unter 3.6.12) mit den Thylakoiden wurde die Mischung mehrmals zentrifugiert und das Pellet gewaschen. Um das Protein zu konzentrieren und das Chlorophyll zu lösen, wurden die Proben vor der Elektrophorese mit dem vierfachen Volumen 100 % Aceton behandelt. Auf die Anwesenheit des Proteins im Pellet und auch im Überstand wurden die Proben mittels SDS-PAGE und Western-Blot getestet. Wenn das Protein im Überstand blieb, bedeutete dies, dass es nicht an die Thylakoide bindet. Wenn das Protein an den Thylakoidmembranen bindet, erscheint es auf den Pelletproben und nicht mehr in den Überstandproben (Abb. 32-36).

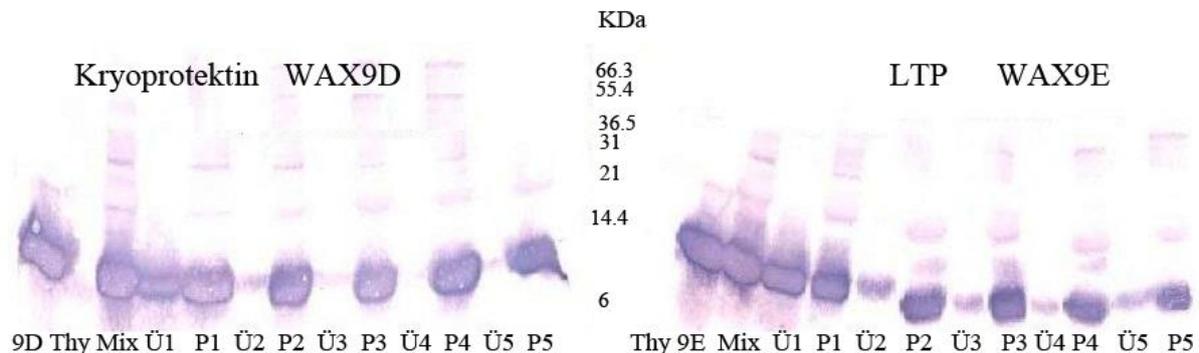


Abbildung 32: Bindungsversuch von WAX9D/WAX9E mit Thylakoidmembranen

Wie in 3.6.12 in Material und Methoden (Abbildung 3) wurde eine Mischung (500 µl) von WAX9D/WAX9E Proteinen (100µg) mit den Thylakoidmembranen (100 µg Chlorophyll) in 5x Eppies für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (14000 rpm für 5 min) wurden der Überstand und das Pellet eines Eppis bei SDS-PAGE und Western-Blot getestet. Die Überstände der anderen 4x Eppies wurden weggenommen und die Pellets mit 300 µl neuem Puffer gewaschen und nochmal zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde 4-5 Mal wiederholt. Die Proben wurden mit 1 ml 100 % Aceton für 1 Stunde in -20 °C inkubiert. Nach der Zentrifugation wurden die sedimentierten Proteine mit 50 µl Probenpuffer resuspendiert und für 10 min bei 100 °C inkubiert. Anschließend wurden 25 µl pro Geltasche aufgetragen, ca. 1 Stunde bei 150 V aufgetrennt und in einer Nitrocellose-Membran übertragen. 9D=WAX9D, 9E=WAX9E, Thy=Thylakoide, P=Pellet, Ü=Überstand, Mix = Mischung zwischen Protein und Thylakoiden.

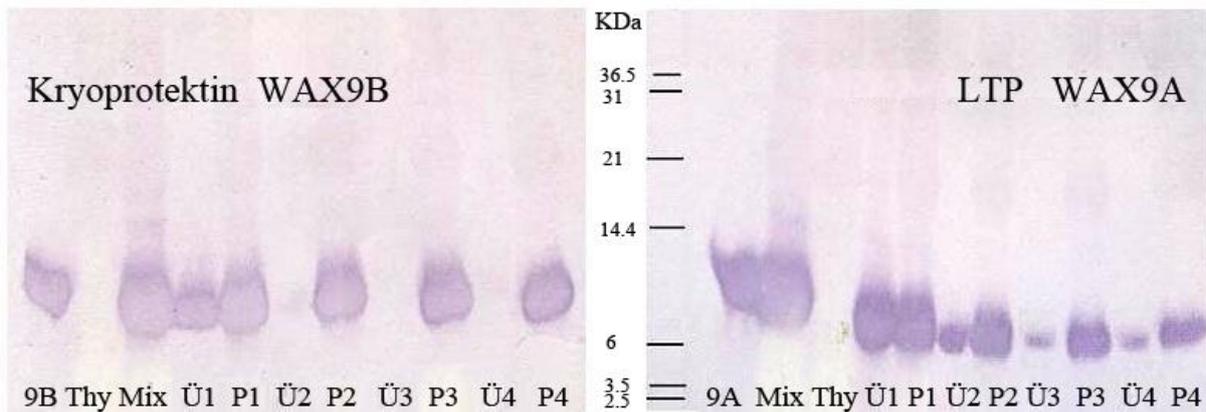


Abbildung 33: Bindungsversuch von WAX9B/WAX9A mit Thylakoiden

Wie in 3.6.12 in Material und Methoden (Abbildung 3) wurde eine Mischung (500 µl) von WAX9B/WAX9D Proteinen (100µg) mit den Thylakoidmembranen (100 µg Chlorophyll) in 4x Eppies für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (14000 rpm x 5 min) wurden der Überstand und das Pellet eines Eppies bei SDS-PAGE und Western-Blot getestet. Die Überstände der anderen 4x Eppies wurden weggenommen und die Pellets mit 300 µl neuem Puffer gewaschen und nochmal zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde 4-5 Mal wiederholt. Die Proben wurden mit 1 ml 100 % Aceton für 1 Stunde in -20 °C inkubiert. Nach der Zentrifugation wurden die sedimentierten Proteine mit 50 µl Probenpuffer resuspendiert und für 10 min bei 100 °C inkubiert. Anschließend wurden 25 µl pro Geltasche aufgetragen, ca. 1 Stunde bei 150 V aufgetrennt und in einer Nitrocellulose-Membran übertragen. 9B=WAX9B, 9A=WAX9A, Thy=Thylakoide, P=Pellet, Ü=Überstand, Mix=Mischung zwischen Protein und Thylakoiden.

Wie man in den Abbildungen 32 und 33 erkennen kann, wiesen bei den Banden, die bei einem Molekulargewicht von 6-14 KDa detektierbar sind, alle WAX9-Proteine eine Bindung an die Thylakoide auf. WAX9B und WAX9D erscheinen immer in Pellets und nicht mehr ab dem zweiten Waschschrift in Überständen, so dass die Proteine beim Waschen der Thylakoide nicht wieder entfernt wurden. WAX9A und WAX9E wurden beim Waschen entfernt und sind immer in Überständen bis zum letzten Waschschrift erschienen.

Der Kohlextrakt bleibt auch immer im Pellet und erscheint nicht ab dem zweiten Waschschrift im Überstand (Abb. 34). Das bestätigt, dass das Kryoprotektin CPP sich wie das WAX9D und WAX9B verhält und besser als die LTPs WAX9A und WAX9E an der Thylakoidmembranen bindet.

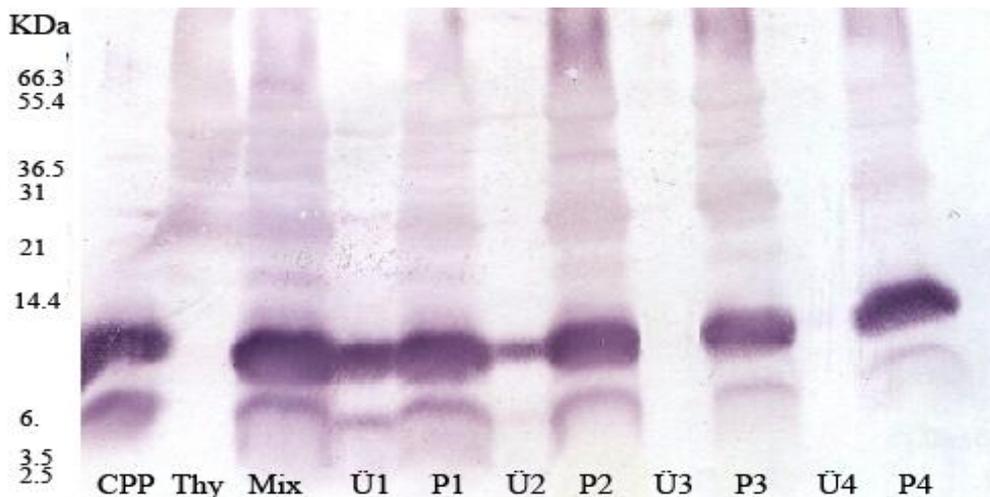


Abbildung 34: Bindungsversuch zwischen CPP und Thylakoidmembranen

Wie in 3.6.12 in Material und Methoden (Abbildung 3) würde eine Mischung (500 µl) von gereinigtem Kohlextrakt CPP (100µg) mit den Thylakoidmembranen (100 µg Chlorophyll) in 4x Eppies für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (14000 rpm x 5 min) wurden der Überstand und das Pellet eines Eppies bei SDS-PAGE und Western-Blott getestet. Die Überstände der anderen 4x Eppies würden weggenommen und die Pellets mit 300 µl neuem Puffer gewaschen und nochmal zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde 4-5 Mal wiederholt. Die Proben wurden mit 1ml 100 % Aceton für 1 Stunde in -20 °C inkubiert. Nach der Zentrifugation wurden die sedimentierten Proteine mit 50 µl Probenpuffern resuspendiert und für 10 min bei 100 °C inkubiert. Anschließend wurden 25 µl pro Geltasche aufgetragen, ca. 1 Stunde bei 150 V aufgetrennt und in einer Nitrocellulose-Membran übertragen. CPP=Kohlextrakt Thy=Thylakoide, P=Pellet, Ü=Überstand, Mix=Mischung zwischen CPP und Thylakoiden.

Bei einem anderen Versuch, der durchgeführt wurde, wurde jedes Mal eine neue Thylakoide nach der Zentrifugation zu dem Überstand hinzugefügt, um zu sehen, ob das übrige Protein im Überstand wieder an die neue Thylakoide bindet oder nicht.

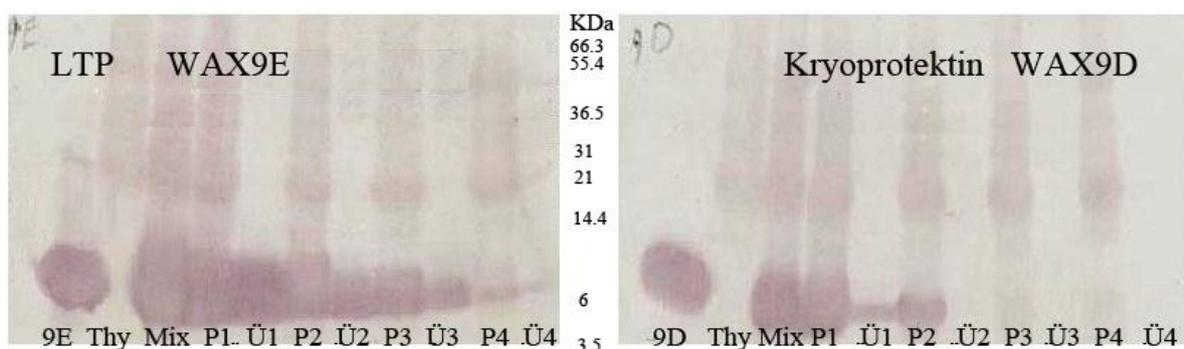


Abbildung 35: Zweite Bindungsversuch von WAX9E/D mit Thylakoiden

Eine Mischung (500 µl) von WAX9E/WAX9D-Proteinen (100 µg) wurde für 15 Minuten auf Eis mit den Thylakoidmembranen (100 µg Chlorophyll) inkubiert und bei 14000 rpm für 5 min zentrifugiert. Es wurden für jede Proteinprobe 4x Eppis eingesetzt (wie in Material und Methoden 3.6.12 Abbildung 4). Das gesamte Pellet und der gesamte Überstand eines Eppis wurden mit SDS-Gel und Western-Blot getestet. Die Überstände der anderen Eppies wurden genommen und jeweils neue Thylakoide (100 µg Chlorophyll) hinzugefügt und wieder zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde 3-4-mal wiederholt. Das gesamte Pellet und der gesamte Überstand der geprüften Eppis wurden jeweils mit 1ml 100 % Aceton für 1 Stunde in -20 °C inkubiert. Nach der Zentrifugation wurden die sedimentierten Proteine mit 100 µl Probenpuffer resuspendiert und für 10 min bei 100 °C inkubiert. Anschließend wurden 25 µl pro Geltasche aufgetragen, ca. 1 Stunde bei 150 V aufgetrennt und in einer Nitrocellulose-Membran übertragen. 9D=WAX9D, 9E=WAX9E, Thy=Thylakoiden, P=Pellet, Ü=Überstand, Mix=Mischung zwischen Protein und Thylakoiden.

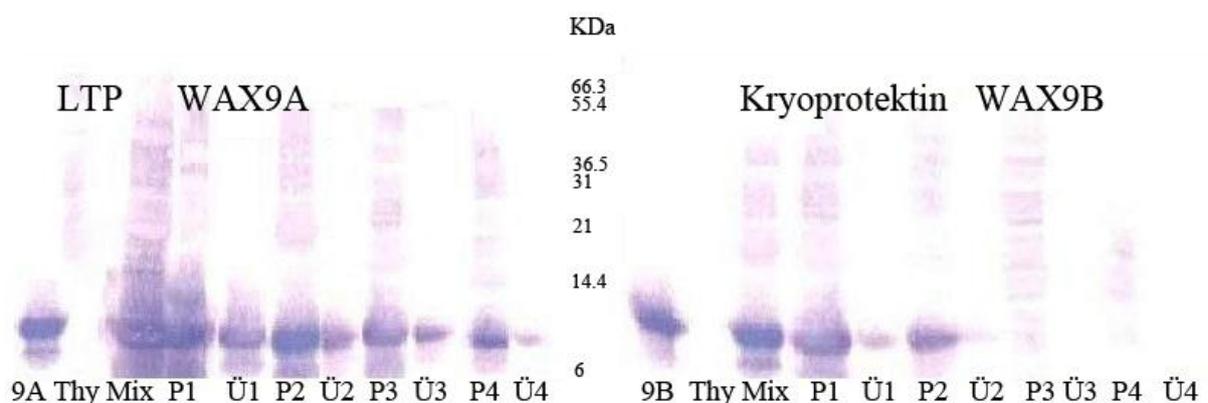


Abbildung 36: Zweite Bindungsversuch von 9A/9B mit Thylakoiden

Eine Mischung (500 µl) von WAX9A/WAX9B-Proteinen (100 µg) wurde für 15 Minuten auf Eis mit den Thylakoidmembranen (100 µg Chlorophyll) inkubiert und bei 14000 rpm für 5 min zentrifugiert. Es wurden für jede Proteinprobe 4x Eppis eingesetzt (wie in Material und Methoden 3.6.12 Abbildung 4). Das gesamte Pellet und der gesamte Überstand eines Eppis wurden mit SDS-Gel und Western-Blot getestet. Die Überstände der anderen Eppies wurden genommen und jeweils neue Thylakoide (100µg Chlorophyll) hinzugefügt und wieder zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde 3-4-mal wiederholt. Das gesamte Pellet und der gesamte Überstand der geprüften Eppis wurden jeweils mit 1ml 100 % Aceton für 1 Stunde in -20 °C inkubiert. Nach der Zentrifugation wurden die sedimentierten Proteine mit 100 µl Probenpuffer resuspendiert und für 10 min bei 100 °C inkubiert. Anschließend wurde 25 µl pro Geltasche aufgetragen, ca. 1 Stunde bei 150 V aufgetrennt und in einer Nitrocellulose-Membran übertragen. 9A=WAX9A, 9B=WAX9B, Thy=Thylakoiden, P=Pellet, Ü=Überstand, Mix=Mischung zwischen Protein und Thylakoiden.

Die Abbildungen 35 und 36 zeigen, dass WAX9B, WAX9D ab dem zweiten Waschschrift nicht in den Überständen vorhanden waren. Während WAX9A, WAX9E immer in den Überständen bis zum letzten Waschschrift blieb. Das heißt: WAX9B und WAX9D, die

kryoprotektive Wirkung zeigten, wiesen eine stabile Membranbindung mit den Thylakoidmembranen auf und WAX9A und WAX9E, die Lipidtransferaktivität hatten, zeigten keine stabile Membranbindung mit den Thylakoiden. Srór hat experimentell eine Membranbindung gefunden und zeigte, dass die kryoprotektive Wirkung sich als resistent gegen die Waschschrítte erwies (Srór et al 2003).

Es wurde die Bindungsfähigkeit zwischen den WAX9E/WAX9D-Proteinen und Thylakoidmembranen mit und ohne Calcium und Mangan geprüft. Nach der Inkubation der WAX9-Proteine und mit den Thylakoiden wurde die Mischung zentrifugiert und das Pellet gewaschen. Die Proben wurden mittels SDS-Gelen und Western-Blot wie in der nächsten Abbildung geprüft.

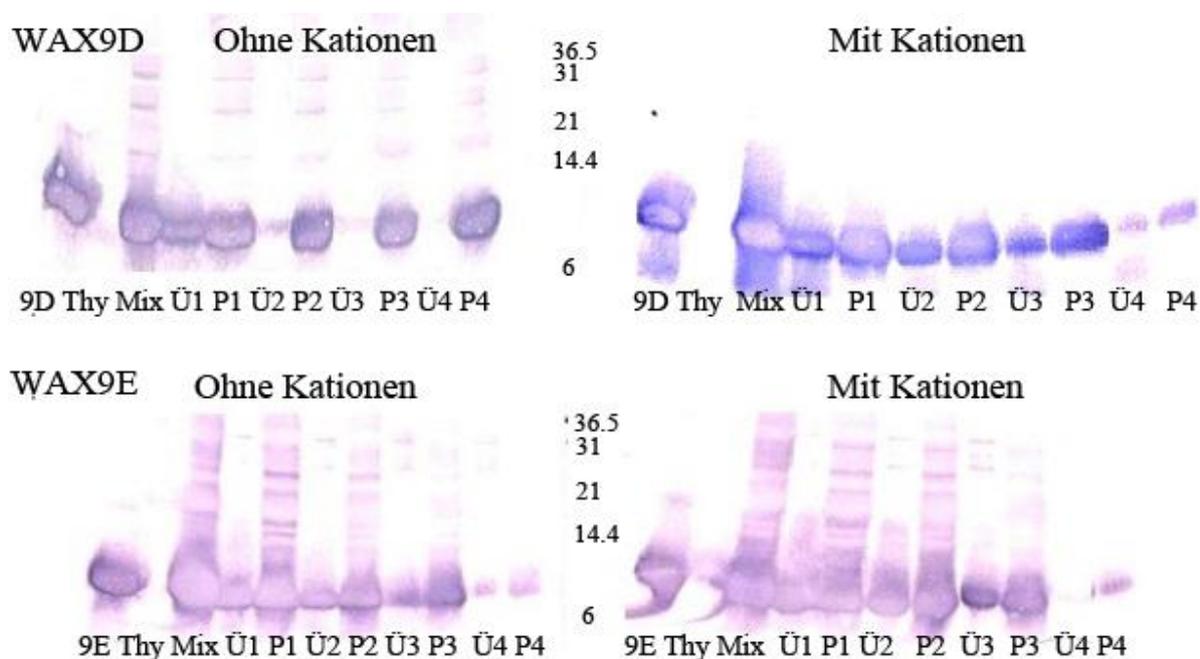


Abbildung 37: Bindungsversuch von 9E/9D mit Thylakoiden mit und ohne Kationen

Wie in 3.6.12 in Material und Methoden (Abbildung 3) wurde eine Mischung (500 µl) von WAX9D/WAX9E-Proteinen (100µg) mit den Thylakoidmembranen (100 µg Chlorophyll) in 4x Eppies für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (14000 rpm für 5 min) wurden der Überstand und das Pellet eines Eppis mit SDS-PAGE und Western-Blot getestet. Die Überstände der anderen 4x Eppies wurden weggenommen und die Pellets mit 300 µl neuem Puffer gewaschen und nochmal zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde 4-5 Mal wiederholt. Die Proben wurden mit 1 ml 100 % Aceton für 1 Stunde in -20 °C inkubiert. Nach der Zentrifugation wurden die sedimentierten Proteine mit 50 µl Probenpuffer resuspendiert und für 10 min bei 100 °C inkubiert. Anschließend wurden 25 µl pro Geltasche aufgetragen, ca. 1 Stunde bei 150 V aufgetrennt und in einer Nitrocellulose-Membran übertragen. 9D=WAX9D, 9E=WAX9E, Thy=Thylakoide, P=Pellet, Ü=Überstand, Mix=Mischung zwischen Protein und Thylakoiden.

Wie die Abbildung 37 zeigt, blieb das lipidtransferaktive WAX9E immer in Überständen bis zum letzten Waschschriff und zeigte auf den Membranen ein starkes Signal in den Proben, die Kationen enthalten, verglichen mit den anderen, die keine Kationen hatten. Während das kryoprotektive WAX9D ohne Kationen ab dem zweiten Waschschriff nicht im Überstand vorhanden war, blieb das mit Kationen immer in geringen Mengen bis zum letzten Waschschriff im Überstand. Das heißt: Das kryoprotektive WAX9D wies ohne Kationen eine stabile Membranbindung mit den Thylakoiden auf. Es könnte sein, dass die Ladungen von Thylakoiden eine wichtige Rolle bei der Bindung an den Membranen spielen.

4.12 Prüfung der Aktivitäten nach dem Bindungsversuch

Bei der Bindung von Protein an die Thylakoidmembranen bleibt das Protein entweder beim Pellet oder beim Überstand. Um die Frage, wie viel Proteinmoleküle an die Membranen (gemessen über die Chlorophyllmenge) binden zu beantworten, wurde eine bestimmte Proteinkonzentration bei steigender Chlorophyllkonzentration (steigender Thylakoidmengen) hinzugefügt, inkubiert und abschließend zentrifugiert. Die Frostschutzaktivität und Lipidtransferaktivität des Überstands wurden geprüft (Abb. 38 und 39).

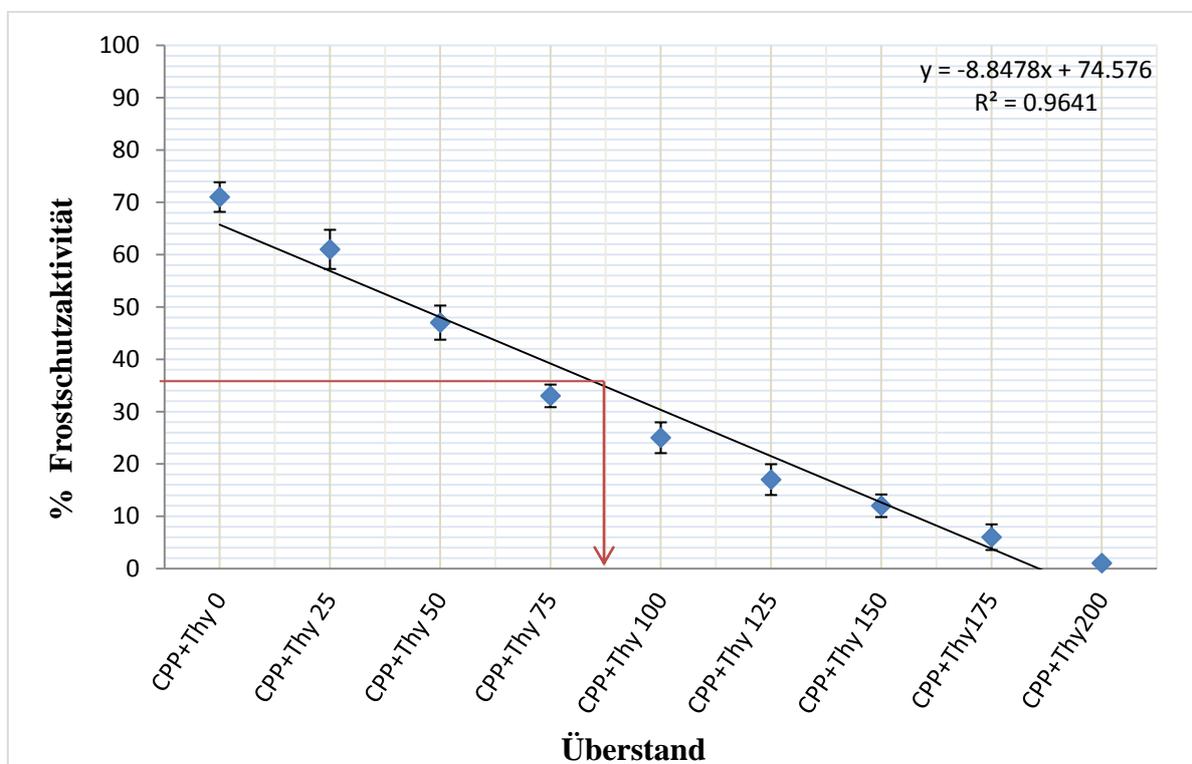


Abbildung 38: Frostschutztest von CPP nach Bindungsversuch

Wie in 3.6.12 in Material und Methoden (Abbildung 5) wurden 100 µg Protein mit den unterschiedlichen Thylakoidmengen (0-200 µg Chlorophyll) für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Das Endvolumen war 200 µl. Nach einer Zentrifugation (14000 rpm x 5 min) wurden die Überstände auf Frostschutzaktivität geprüft. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert mit der Standardabweichung von drei getesteten Proben dar.

Die höchste Frostschutzaktivität von CPP war ca. 70 %. Nach der Mischung des CPP mit Thylakoidmembranen, Inkubation und der Zentrifugation wurden die Überstände auf Frostschutzaktivität getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass die die restliche Frostschutzaktivität des geprüften Überstands umso geringer ist, je größer die Konzentration der Thylakoidmembranen (Chlorophyll) ist. Bei der Mischung 100 µg CPP mit 100 µg Chlorophyll blieb ein Überstand von CPP, der eine Frostschutzaktivität von 25 % anzeigte. Mit 200 µg Chlorophyll/ml blieb gar nichts von CPP im Überstand. Man kann von dem Grafik ablesen, dass man ca. 85-90 µg Chlorophyll (Thylakoide) braucht, um die halbe Aktivität des Proteins (entspricht ca. 35 %) zu entfernen. Um die ganze Aktivität des CPP zu entfernen, braucht man ca. 200 µg Chlorophyll.

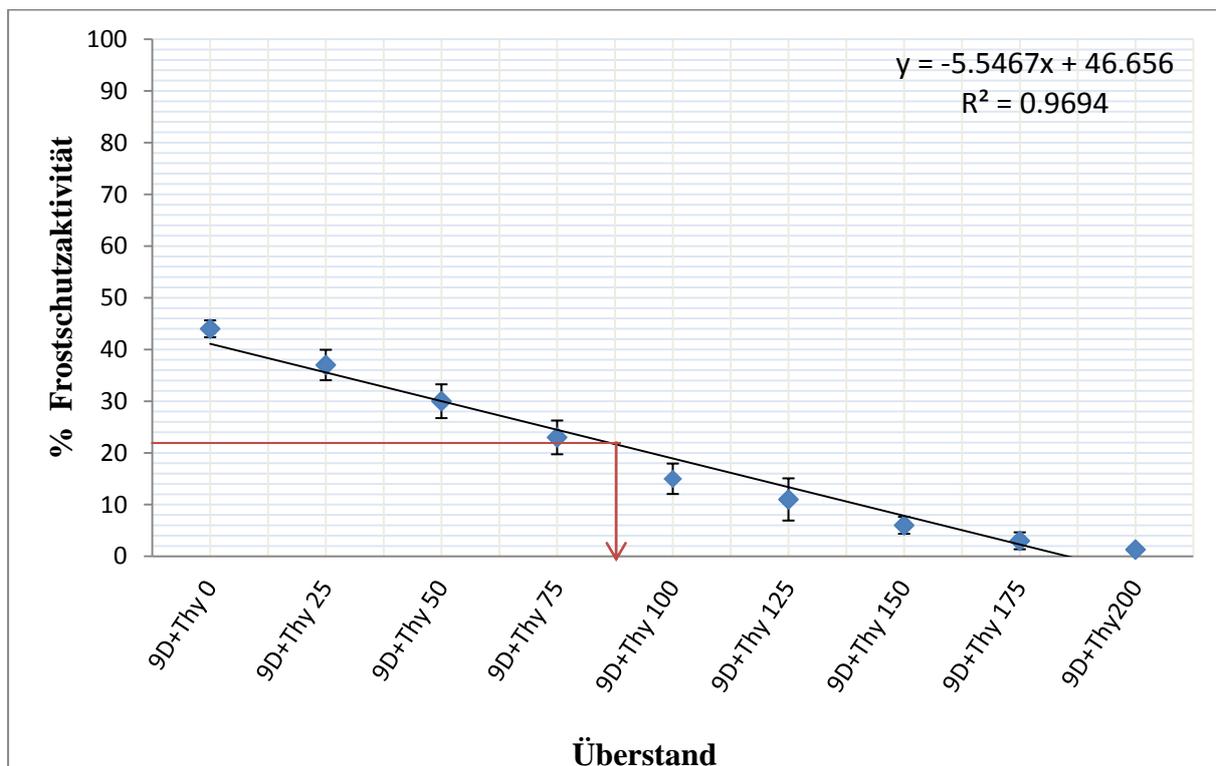


Abbildung 39: Frostschutztest von WAX9D nach Bindungsversuch

Wie in 3.6.12 in Material und Methoden (Abbildung 7) wurden 100 µg Protein mit den unterschiedlichen Thylakoidmengen (0-200 µg Chlorophyll) für 15 Minuten auf Eis inkubiert

(das Endvolumen 500 μ l). Nach einer Zentrifugation (14000 rpm x 5 min) wurden die Überstände auf Frostschutzaktivität geprüft.

Bei WAX9D war die höchste Frostschutzaktivität von ca. 44 %. Die Aktivität sinkt mit dem Steigen der Chlorophyllkonzentration. Je größer die Konzentration von Chlorophyll (Thylakoidmembranen) ist, desto geringer ist die restliche Frostschutzaktivität des geprüften Überstands. Die abnehmende Frostschutzaktivität in den untersuchten Überstandproben ist ein klarer Beweis für die schwindende Menge an Protein im Überstand und ist somit ein Maß für eine Bindung von WAX9D-Protein an die Thylakoidmembranen. Nach der Mischung 100 μ g WAX9D mit 100 μ g Chlorophyll und Zentrifugation blieb ein Überstand von WAX9D, der eine Frostschutzaktivität von 15 % anzeigte. Mit 175-200 μ g Chlorophyll blieb gar nichts von WAX9D im Überstand. Man kann von der Grafik schließen, dass man ca. 85-90 μ g Chlorophyll (Thylakoide) braucht, um die halbe Aktivität des WAX9D-Proteins (entspricht ca. 22 %) zu entfernen. Um die ganze Aktivität des WAX9D zu entfernen, braucht man ca. 180-200 μ g Chlorophyll.

Die Überstände wurden auch nach der Mischung des lipidtransferaktiven WAX9E mit Thylakoidmembranen mit LTP-Test getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass es keinen oder nur kleinen Unterschied in Lipidtransfer-Aktivität zwischen den WAX9E-Proben gab, was bestätigt, dass das WAX9E immer im Überstand bleibt und schwach an die Thylakoidmembranen bindet.

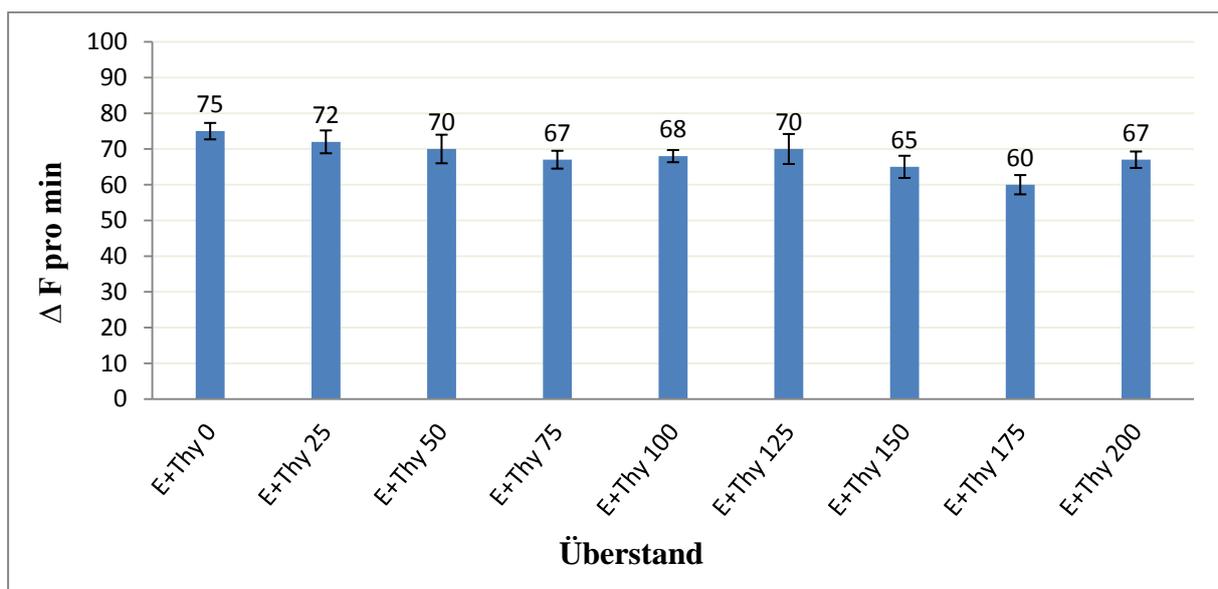


Abbildung 40: LTP-Test von WAX9E nach der Bindung an die Thylakoiden

Wie in 3.6.12 in Material und Methoden (Abbildung 5) wurden 100 µg WAX9E-Protein mit den unterschiedlichen Thylakoidmengen (0-200 µg Chlorophyll) für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (14000 rpm x 5 min) wurden die Überstände auf Lipidtransferaktivität geprüft. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert mit der Standardabweichung von drei getesteten Proben dar. ΔF pro Min =Veränderung der Fluoreszenz pro Minute.

4.13 Test zum Nachweis von modifizierten Proteinen

Dr. De Lamotte aus Frankreich hat durch die Computersimulation der Bindung von Proteinen an die Membranen vorhergesagt, dass das kryoprotektive WAX9D Protein an die Membranen mit höherer Affinität verglichen zu lipidtransferaktiven WAX9E bindet, was mit den Ergebnissen dieser vorliegenden Arbeit übereinstimmt. Er hat vorhergesagt, dass die Bindung mit den Membranen auf bestimmten Aminosäuren basiert. Auf diesem Weg schützt das Protein die Membranen vor Frostschädigungen. Durch die gerichtete Mutagenese in diesen Aminosäuren könnte möglicherweise klären, welcher Teil der Moleküle Lipidtransfertätigkeit oder kryoprotektiven Aktivität angibt bzw. erzeugt.

Bei dem kryoprotektiven WAX9D findet man an Position 27 des reifen Proteins ein Threonin (T) und an Position 35 ein Serin (S). Nach der Computer-Simulation und der molekularen Modellierung von Fred De Lamotte sind hauptsächlich diese beiden Aminosäuren für die Bindung an die Thylakoidmembranen wichtig. Diese beiden Aminosäuren wurden einzeln und zusammen von Dr. Silke Schilling verändert. Diese Veränderung wurde mittels codon usage von *Pichia pastoris* durchgeführt, wobei die Aminosäuresequenz von WAX9D erhalten blieb. Es wurden 3 unterschiedliche Konstrukte wie folgt generiert:

- 1- WAX9DE-T27R - Austausch der Aminosäure T (Position 27 WAX9D) nach R (Position 27 WAX9E).
- 2- WAX9DE-S35K - Austausch der Aminosäure S (Position 35 WAX9D) nach K (Position 35 WAX9E).
- 3- WAX9DE-T27R-S35K (Doppelmutante) Austausch der Aminosäuren S (Position 35) nach K (WAX9E) und T (Position 27) nach R (WAX9E).

```

WAX9D           ...ALSCGTVSGYVAPCIGYLAQNAPAVPTACCSGVTSLNNMARTTPDRQQACRCLVGAAN..
WAX9D/E27      ...ALSCGTVSGYVAPCIGYLAQNAPAVPRACCSGVTSLNNMARTTPDRQQACRCLVGAAN..
WAX9D/E35      ...ALSCGTVSGYVAPCIGYLAQNAPAVPTACCSGVTSLNNMARTTPDRQQACRCLVGAAN..
WAX9D/E27.35  ...ALSCGTVSGYVAPCIGYLAQNAPAVPRACCSGVTSLNNMARTTPDRQQACRCLVGAAN..
                *****_*****_*****

```

Abbildung 41: Aminosäuresequenz der einzelnen und doppelten Mutanten

Der Vergleich ist nur bei dem reifen Protein ohne Leadersequenz. Die identischen Bereiche in den Aminosäuresequenzen sind unter der Sequenz mit einem * gekennzeichnet. Bei den einzelnen Mutanten sind die unterschiedlichen Aminosäuren mit blauem Hintergrund gedruckt. Bei der doppelten Mutante sind die unterschiedlichen Aminosäuren mit gelbem Hintergrund gedruckt.

Alle drei modifizierten Proteine wurden nochmal in *Pichia pastoris* kloniert, überexprimiert und mittels SDS-PAGE und Western-Blot geprüft.

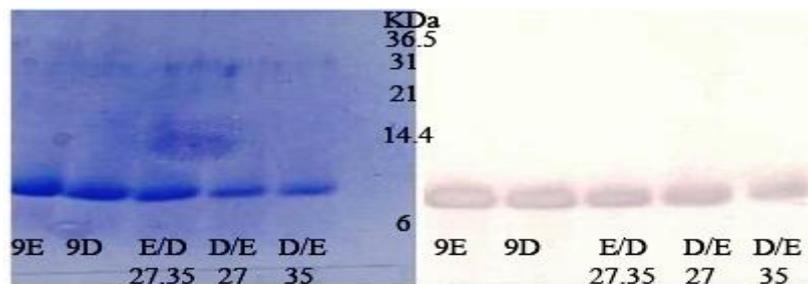


Abbildung 42: Coomassie-Gel und Westernanalyse von modifizierten Proteinen

Für alle drei Mutanten wurde ein Frost-Test durchgeführt, um zu sehen, ob die Modifizierung eine Wirkung bei der Frostaktivität hat (Abb. 43).

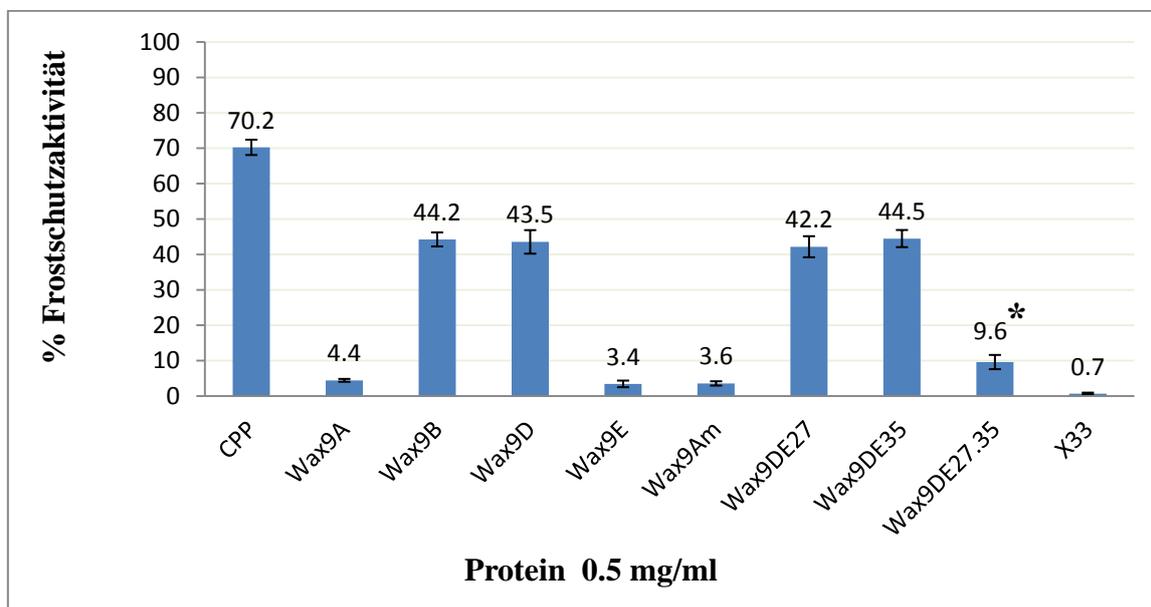


Abbildung 43: Frostschutz der modifizierten bzw. originalen WAX9-Proteine

Die nach Reverse-Phase-Chromatographie über Amberlite XAD7-Matrix gesammelten und neutralisierten Proteine wurden nach der Verdampfung des Acetonitrils über Speed Vac mit der Probenlösung (10 mM Saccharose, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂) resuspendiert und über NAP5-Säule entsalzt. Die Proteinproben wurden von einer 1 mg/ml Proteinstammlösung genommen. 100 µl Thylakoidsuspension (von 1 mg Chlorophyll/ml) wurde mit 100 µl Proteinlösung 2 Stunden bei -20 °C eingefroren, aufgetaut und die Frostschutzaktivität

gemessen. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert mit der Standardabweichung von drei getesteten Proben dar. * Die Wertänderung bei der doppelten Mutante WAX9D/E27.35 ist nach dem T-Test signifikant verglichen mit dem WAX9D Protein.

Die Beziehung zwischen den Proteinkonzentrationen und der Frostschutzaktivität wurde auch in der Abbildung 44 dargestellt: Eine Verdünnungsreihe von Proteinkonzentrationen wurde mit Probenlösung erstellt.

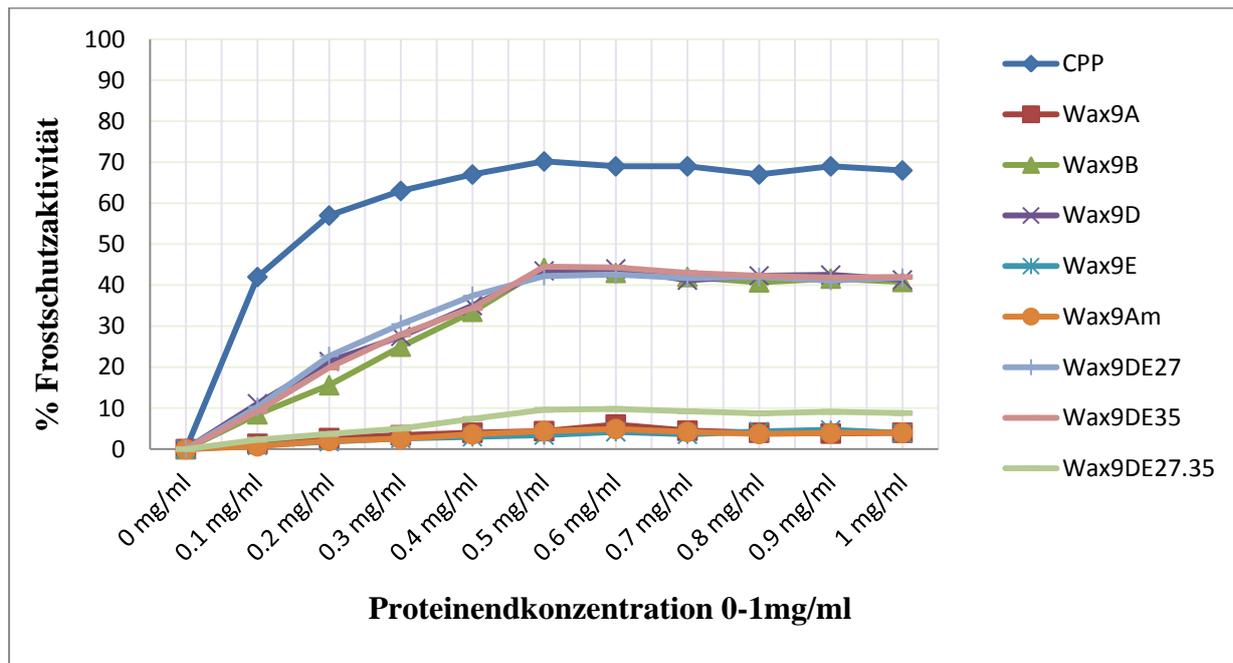


Abbildung 44: Frostschutzaktivität in Abhängigkeit von Proteinkonzentrationen

Die nach Amberlite XAD7-Matrix gesammelten WAX9-Proteine und CPP wurden nach der Verdampfung des Acetonitrils über Speed Vac mit der Probenlösung (10 mM Saccharose, 1 mM $MnCl_2$, 1 mM $CaCl_2$) resuspendiert und über NAP5-Säule entsalzt. Die Proteinproben wurden von einer Konzentrationsreihe (0-1mg/ml) genommen. 100 μ l Thylakoidsuspension (von 1 mg Chlorophyll/ml) wurden mit 100 μ l Proteinprobe 2-3 Stunden bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren, aufgetaut und die Frostschutzaktivität gemessen.

Wie aus der Abbildung 44 klar ersichtlich ist, bleibt die Frostschutzaktivität der einzelnen modifizierten Proteine WAX9D/E27 und WAX9D/E35 gleich wie bei WAX9D und es gab keine große Änderung. Bei dem doppelten modifizierten Protein WAX9DE27.35 sieht man ganz klar, dass sich die Frostschutzaktivität bis ca. 9 % senkt. Das bedeutet: das neue doppelte modifizierte Protein WAX9DE27.35 verliert seine Frostschutzaktivität. Ein LTP-Test wurde auch durchgeführt, um zu sehen, ob die Modifizierung eine Wirkung bei der Lipidtransfer-Aktivität hat. Der LTP-Test wurde in der Abbildung 45 dargestellt.

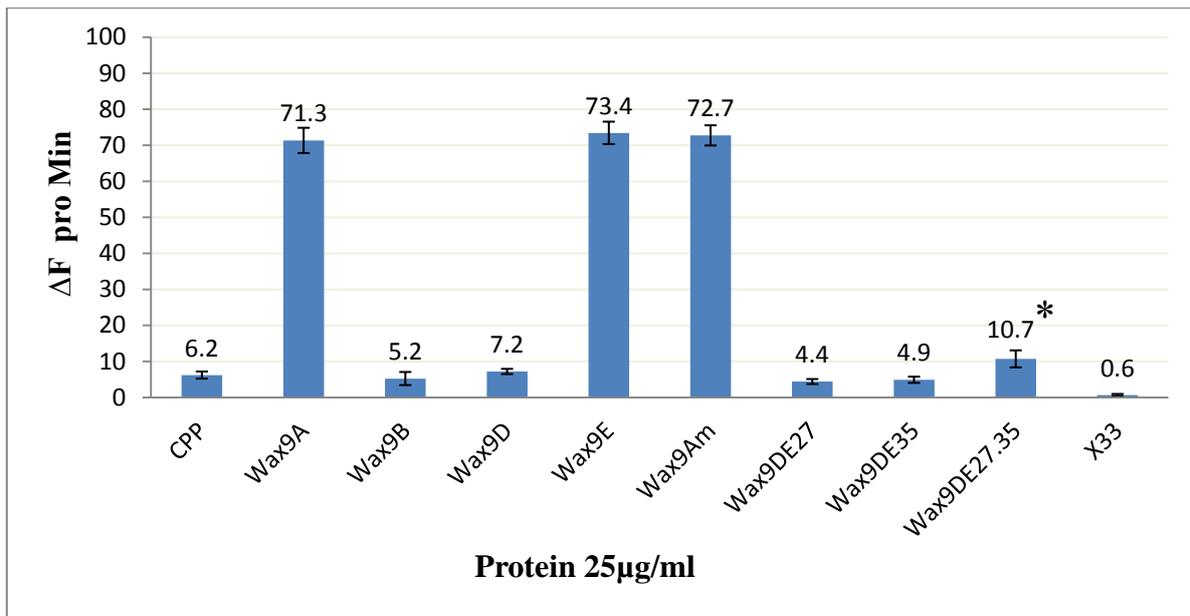


Abbildung 45: Lipidtransferaktivität bei verschiedenen Proteinen

Die nach Amberlite-Säule gesammelten WAX9 bzw. CPP-Proben wurden nach Neutralisierung in einer UNIVAPO150H Concentrator Zentrifuge unter Vakuum ü. N gehalten, um die CH₃CN zu verdampfen. Die getrockneten Proteine-Proben wurden mit Probenlösung (10 mM Saccharose, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂) gelöst, über NAP5-Säulen entsalzt und wie in Material und Methoden 3.6.10 mit LTP-Test geprüft. 50 μl 1mg/ml Proteinprobe wurden zu dem Testansatz von 2ml hinzugefügt (Endkonzentration 25 μg Protein /ml). Die Ergebnisse stellen den Mittelwert mit der Standardabweichung von drei getesteten Proben dar.* Die Wertänderung bei der doppelten Mutante ist nach dem T-Test signifikant verglichen mit dem originalen Protein WAX9D. ΔF pro Min =Veränderung der Fluoreszenz pro Minute.

Die Beziehung zwischen den Proteinkonzentrationen und der Lipidtransfer-Aktivität wurde auch in der Abbildung 46 dargestellt. Eine Verdünnungsreihe von Proteinkonzentrationen wurde mit Probenlösung erstellt.

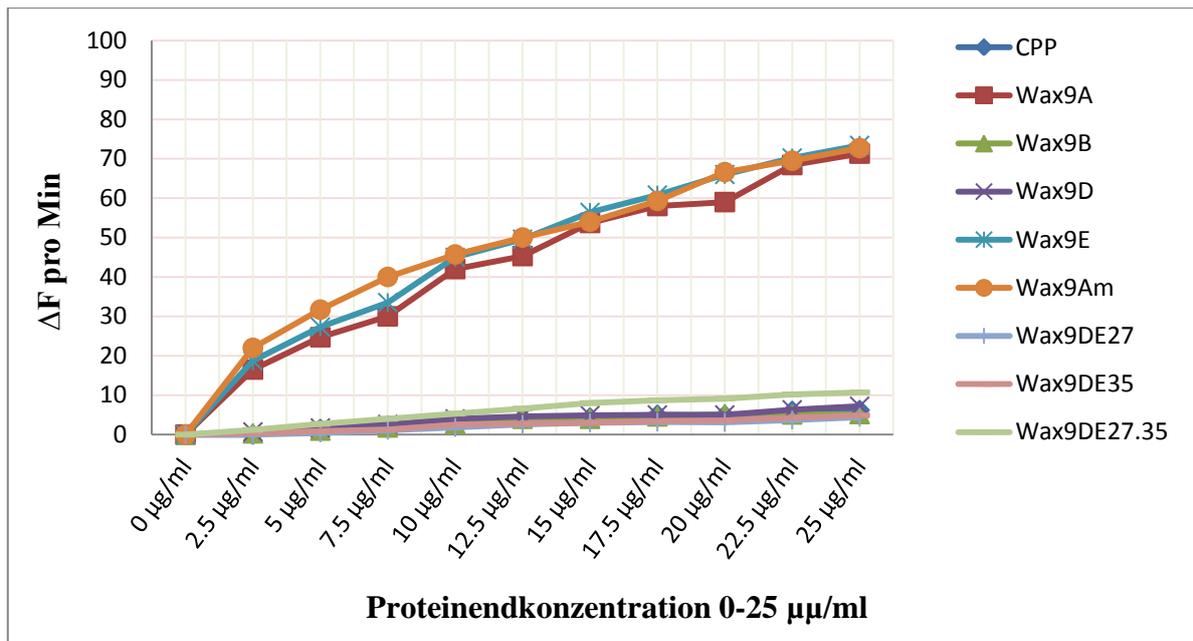


Abbildung 46: Lipidtransferaktivität in Abhängigkeit von Proteinkonzentrationen

Die nach Amberlite XAD7-Matrix gesammelten WAX9-Proteine und CPP wurden nach Neutralisierung und Verdampfung des Acetonitrils über Speed Vac mit der Probenlösung (10 mM Saccharose, 1 mM $MnCl_2$, 1 mM $CaCl_2$) resuspendiert und über NAP5-Säule entsalzt. Die Proteinproben wurden von einer Konzentrationsreihe (0-25 $\mu\text{g/ml}$) genommen und auf LTP geprüft. ΔF pro Min = Veränderung der Fluoreszenz pro Minute.

Um die Bindungstheorie zu bestätigen oder zu widerlegen wurden die neuen Mutanten auch auf ihre Bindungsfähigkeit an die Thylakoidmembranen getestet.

Während die einzelnen modifizierten Proteine WAX9D/E27 und WAX9D/E35 gleich wie WAX9D waren, war es klar, dass das doppelte modifizierte WAX9D/E 27.35 Protein seine Bindungsfähigkeit verringert hatte, was das vorherige Ergebnisse bestätigt, dass die kryoprotektive Eigenschaft mit einer Bindung des Kryoprotektins an die Membranen korreliert ist (Abb. 47).

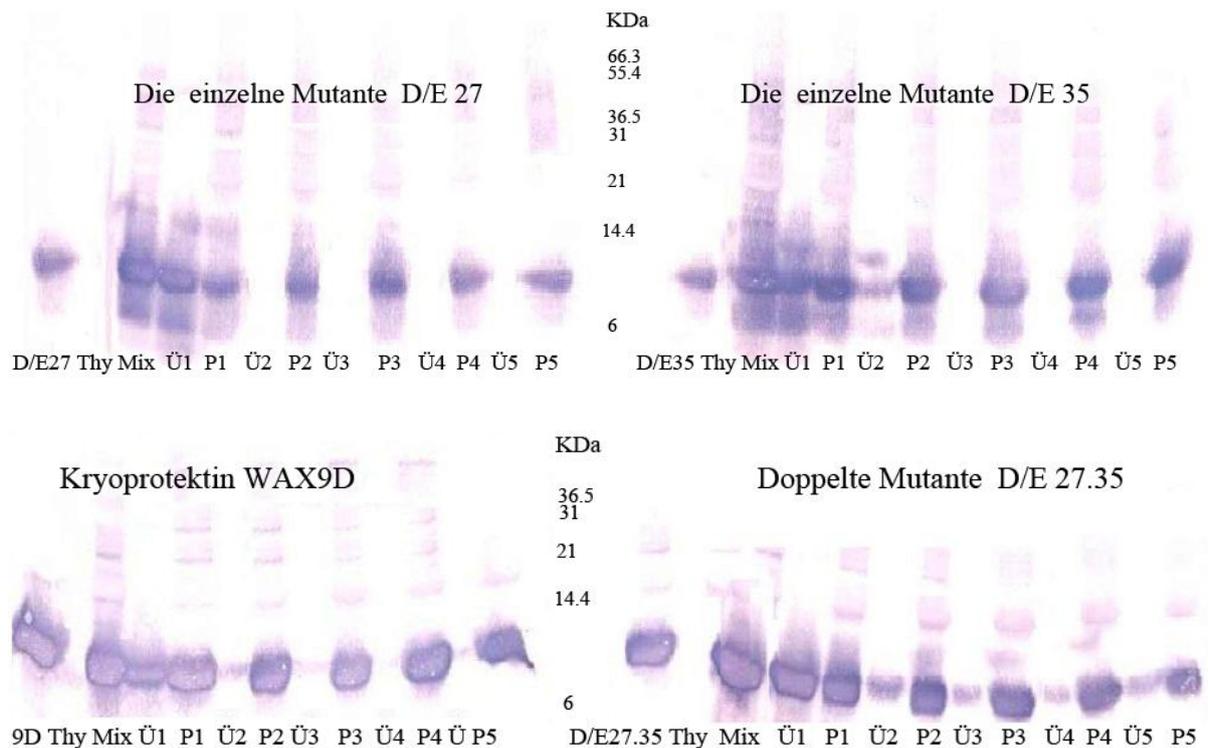


Abbildung 47: Bindungsversuch von modifizierten WAX9-Proteinen mit Thylakoiden

Wie in 3.6.12 in Material und Methoden (Abbildung 3) wurde eine Mischung (500 µl) von den neuen Mutanten WAX9D/E27, WAX9D/E35 und WAX9D/E27.35-Proteinen bzw. von WAX9D (100 µg) mit den Thylakoidmembranen (100 µg Chlorophyll) in 5x Eppies für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (14000 rpm x 5 min) wurden der Überstand und das Pellet eines Eppies bei SDS-PAGE und Western-Blot getestet. Die Überstände der anderen 4x Eppies wurden weggenommen und die Pellets mit 300 µl neuem Puffer gewaschen und nochmal zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde 5 Mal wiederholt. Die Proben wurden mit 1 ml 100 % Aceton für 1 Stunde in -20 °C inkubiert. Nach der Zentrifugation wurden die sedimentierten Proteine mit 50 µl Probenpuffer resuspendiert und für 10 min bei 100 °C inkubiert. Anschließend wurden 25 µl pro Geltasche aufgetragen, ca. 1 Stunde bei 150 V aufgetrennt und in einer Nitrocellulose-Membran übertragen. 9D=WAX9D, D/E27=WAX9D/E27, D/E35=WAX9D/E35, D/E27.35=WAX9D/E27.35, Thy=Thylakoide, P=Pellet, Ü=Überstand, Mix=Mischung zwischen Protein und Thylakoiden.

5 Diskussion

5.1 Klonierung und Expression und von WAX9-Proteinen

Trotz des Erfolgs der Klonierung und der einfachen Expression aller *wax9*-Gene in *E. coli* war die bisherige Ausbeute der Proteine sehr gering (Schilling 2003). Darüber hinaus gab es viele Schwierigkeiten, um die exprimierten Proteine in löslicher Form zu bekommen. Da die exprimierten Proteine in „inclusion bodies“ in der bakteriellen Zelle angereichert wurden, mussten diese unlöslichen Einschlusskörper am Ende der Induktionszeit per Ultraschall zerstört werden. Ein Fusionsteil wurde mitexprimiert, um die Löslichkeit der Proteine in den Einschlusskörpern zu erhöhen. Um diesen Fusionsteil zu entfernen, wurde dann eine Enterokinase eingesetzt. Nach dem Entfernen des Fusionsteils neigen die WAX9-Proteine zu präzipitieren. Deswegen wurden infolgedessen die *in vitro* durchgeführten Frostschutz- und LTP-Test modifiziert. Das Enterokinase wird in einem Glycerin-Puffer, das häufig als Cryoprotektant verwendet, gelagert, was möglicherweise die Messungen der Frostschutzexperimente beeinflusst. Außerdem wurden die Proteine nach der Enterokinasebehandlung mittels verschiedener Methoden konzentriert, um die anschließende Experimenten durchzuführen (Schilling 2003). Neben den vorherigen Schwierigkeiten und der geringen Proteinausbeute bei der *E. coli*-Klonierung- und Expressionssystem befindet sich normalerweise das Zytoplasma von *E. coli* in einem reduzierten Zustand und enthält reduzierende Komponenten, die die Bildung von den 4 stabilen Disulfidbrücken -als Merkmal aller unspezifischen Lipidtransferproteine sowie die WAX9-Proteine- verhindern oder nicht zulassen (Stewart et al 1998). Deswegen müssen *E. coli*- Mutanten, die sich das Zytoplasma in einem oxidierenden Zustand befindet und die Bildung von Disulfidbrücken ermöglicht, bei der *E. coli*-Klonierung- und Expressionssystem verwendet werden (Prinz et al 1997).

Um alle diese Schwierigkeiten zu überwinden und die Ausbeute von klonierten Proteinen zu verbessern wurde daher in dieser Arbeit das eukaryotische Expressionssystem in *Pichia pastoris* verwendet.

Wie im Abschnitt Ergebnisse gezeigt wurde, konnten wegen der Ähnlichkeit der kodierenden Sequenzen der *wax9*-Gene keine Primer gewählt werden, die innerhalb der kodierenden Sequenz binden. Deswegen konnte keine spezifische einzelne Amplifikation für die *wax9*-Gene durchgeführt werden. Die Nucleotidsequenzen aller *wax9*-Gene im 5'- und 3'-untranslatierten Bereich unterscheidet sich sichtlich voneinander. Durch diese Unterscheidung

war es möglich, entsprechende Primer zu wählen und die einzelne *wax9*-Gene durch zwei Amplifikationsschritte zu amplifizieren (Schilling 2003).

Als Template für den ersten PCR-Schritt wurde die genomische DNA aus *Brassica oleracea* verwendet. Aufgrund des einfachen Unterschieds zwischen *wax9A* und *wax9E* von zwei Nucleotidsequenzen im Leaderbereich konnten der genspezifischen Forward-Primer von diesem Bereich bzw. der Reverse-Primer aus dem 3'-UTS-Bereich eine Amplifikation des einzelnen *wax9a*-Gens mit Intron gewährleisten. Die kodierenden Sequenzen des *wax9a*-Gens sollte ohne Leadersequenz und Intron benutzt werden, um einen Expressionskonstrukt herzustellen. Deswegen war es notwendig für die weitere PCR-Amplifikation, die entsprechenden Forward und Reverse Expressionsprimern so zu wählen, dass die Schnittstellen für Expressionsvektor enthalten. Durch diese zweite PCR-Amplifikation wurde das *wax9A*-Gen mit der korrekten Sequenz ohne Leaderbereich und Intron amplifiziert (Abb. 9 und 10).

Bei der Klonierung vom *wax9A*-Gen gab es in der Sequenz eine Mutante mit zwei Aminosäuren (in Position 33 von Serin nach Cystein und in Position 62 von Asparagin nach Serin) verglichen mit dem originalen *wax9A* aus der Genbank. Trotz der Mutante gab es keine ausgewiesene Beeinflussung auf die Wirkungen des Proteins, da es keine Unterschiede zwischen dem originalen und dem klonierten WAX9Am-Protein in Bezug auf ihre Lipidtransfer- und Frostschutz-Aktivität gab. Es könnte sein, dass diese Mutante eine natürliche Mutante ist und diese Aminosäuren nicht wichtig sind, so dass der Austausch zwischen diesen Aminosäuren keinen erheblichen Einfluss auf das Protein oder seine Wirksamkeit hat.

Mit Hilfe des Expressionsvektor *pPICZα* wurden die WAX9-Proteine in der Hefe *Pichia pastoris* exprimiert. Da dieser Vektor zusätzlich eine Signalsequenz enthält, welche die Sekretion des Proteins in das Expressionsmedium ermöglicht, wird die Schwierigkeit überwunden, das Protein aus den produzierenden Zellen zu isolieren. Das aus den produzierenden Zellen gewonnene Protein liegt in relativ reiner Form vor, weil die Hefe insgesamt nur recht wenig zelleigenes Protein in diese Expressionsmedien sezerniert. Für die Expression von WAX9-Proteinen in *Pichia pastoris* wurde in der vorliegenden Arbeit das Minimalmedium (wie in 3.5.9) verwendet. Bei allen WAX9-Proteinen konnte nach der Induktion mit diesem Medium eine verstärkte Expression festgestellt werden. Die

entsprechende Größe von den exprimierten Proteinen konnte per SDS-PAGE festgestellt werden.

5.2 Struktur- und Sequenzanalysen von WAX9-Proteine

5.2.1 Nucleotidsequenzen

Die *wax9*-Gene aus *Brassica oleracea* wiesen einen hohen Grad an Ähnlichkeit auf (Abb. 48). Neben den Basenaustauschen betreffen die Unterschiede in den Nucleotidsequenzen zwischen allen fünf *wax9*-Vertretern eine geringe Anzahl von kurzen Einschüben. Die Unterschiede betragen nur ca. 32 %, da von ca. 357 Nucleotiden nur 118 Nucleotide bzw. Einschüben unterschiedlich sind. Alle *wax9*-Gene weisen einen Sequenzabschnitt von 75 bp auf, der für die Leadersequenz der Proteine kodiert. Die Leadersequenz wird nach dem Transport der Proteine in die unterschiedlichen Kompartimente der Zelle, bzw. in den Interzellularräumen wieder entfernt (Schilling 2003). In den Datenbanken für das *wax9E* ist nur die cDNA-Sequenz dargestellt. Es ist das einzige, das mittels RT-PCR amplifiziert werden konnte (Schilling 2003). Die Größe des kodierenden Bereiches sowie des Introns der *wax9*-Gene ist unterschiedlich (Tab. 16).

Tabelle 16: Das Intron und der kodierende Bereich der *wax9*-Gene

WAX9-Gene	Kodierende Bereich mit Leder ohne Intron	Intron
<i>wax9A</i>	357 bp	241 bp
<i>wax9B</i>	354 bp	271 bp
<i>wax9C</i>	363 bp	165 bp
<i>wax9D</i>	357 bp	269 bp
<i>wax9E</i>	357 bp	--

Die *wax9-A/B/C/D*-Gene enthalten jeweils ein Intron. Hinter dem Intron befinden sich 9 Nucleotide. Abweichend von den anderen vier Genen besitzt *wax9C* ein TAA statt einem TGA als Stoppkodon und einen zusätzlichen Sequenzabschnitt an den Positionen -317 bis -228 (Abb.48).

```
wax9A      ATGGCCGGTGTGATGAAGTTGGCATGCTTGGTCTTGGCCTGCATGATTGTGGCAGGTCCC
wax9E      ATGGCCGGGGTGTGATGAAGTTGGCATGCTTGGTCTTGGCCTGCATGATTGTGGCAGGTCCC
wax9C      ATGGCCGGTCTAATGAAGTTGGCATGCTTGGTCTTGGCCTGCATGATTGTGGCAGGTCCA
wax9B      ATGGCTGGTCTAGTGAAGTTGTGCATGCTTGGTCTTGGCCTGCATGATTGTGGCCGGTCCA
wax9D      ATGGCTGGTCTAATGAAGTTGGCATGCTTGATCTTCGCCTGCATGATCGTGGCCGGTCCA
          ***** ** * ***** ***** ***** ***** ***** *****
Konsensus  ATGGCCcGGTcTaaTGAAGTTGgCATGCTTgTCTTgGCCTGCATGATtGTGGCaGGTCCa
```

wax9A **ATCACAGCGAACCGA**AGCTCTGACCTGTGGCACCGTTAACAGCAACGTGGCACCGTGCATT
 wax9E **ATCACAGCGAACCGCA**AGCTCTGACCTGTGGCACCGTTAACAGCAACGTGGCACCGTGCATT
 wax9C **ATCACATCAAAGGCG**GCTTTTGTAGCTGTGGCACGGTTAACACCAACGTGGCGGCATGCATT
 wax9B **ATAGCAACGAACGCG**GCTCTAAGCTGTGGAACCGTTAGCGGTAATTTGGCAGCATGCATT
 wax9D **ATCACATCGAACGCG**GCTCTGAGTTGTGGCACCGTTAGCGGCTACGTGGCACCTTGCATT
 ** *

Konsensus ATcaCAgCgAAcgcgGCTcTgAgcTGTGGcACcGTTAaCagcaAcgTGGCacCgTGCATT

wax9A GGCTACATAACCCAAGGTGGAAC---CCTTCCCAGGAGCGTGTGCACCGGTGTTAGTAAG
 wax9E GGCTACATAACCCAAGGTGGACC---CCTTCCCAGAGCGTGTGCACCGGTGTTAGTAAG
 wax9C GGCTACTTGACCGTGGGCG---C---CCTTCCCAGAGCGTGTGCACCGGTGTTAGTAAG
 wax9B GGCTACTTAAACCAAAATGGGCC---TCTTCCCAGAGGGTGTGCACCTGGCGTTACTAAT
 wax9D GGCTACCTGGCCCAGAATGCGCCGGCCGTTCCACAGCGTGTGCAGCGGCGTTACTAGT
 ***** * ** * * ***** ** ***** * * * * * *

Konsensus GGCTACaTaaCCaaggtGgacC ccTTCCCagAGcGTGTGCACcGGtGTTAgTAag

wax9A CTTAACAGTATGGCCCCTACAACCCCCGGACCGGCAGCAAGCTTGCCGTTGCCCTTGAACT
 wax9E CTTAACAGCATGGCCCCTACAACCCCCGGACCGTCAGCAAGCTTGTTCGTTGCCCTTAAACT
 wax9C CTTAACAGTATTGCCCGTACAACCTCCCGACCGTCAGCAAGCTTGTTCGTTGCCCTTAAACT
 wax9B CTAACAACATGGCCCCTACAACCCCCGGACCGTCAGCAAGCTTGCCGTTGCCCTTGTAAGGA
 wax9D CTAACAACATGGCCCCTACAACCCCCAGACCGTCAGCAAGCTTGCCGTTGCCCTTGTAAGGA
 ** *

Konsensus CTtAACAgcATgGCCCGTACAACcCCgGACCGtCAGCAAGCTTgCgGTTGCCCTTgaAact

wax9A GCTGCTAGAGCCTTAGGCCCTAATCTCAACGCTGGCCGTGCAGCTGGAATTTCCCAAGGCA
 wax9E GCTGCAAGCGCCTTAGGCCCTAATCTCAACGCTGGCCGTGCAGCTGGAATTTCCCAAGGCA
 wax9C GCTGCAAGCGCCTTAGGCTCTGGTCTCAACGCTGGCCGGGCGAGCTGGACTTCCTAAGGCA
 wax9B GCCGCTAACTCCTT---CCCTACTCTCAACGCTGCCCGTGTGCTGGACTTCCTAAGGCA
 wax9D GCCGCTAACGCCTT---GCCTACTATCAACGTTGCCCGTGCAGCTGGACTTCCTAAGGCA
 ** *

Konsensus GcTgCtAgcgCCTTaggccCTaaTcTCAACGcTGgCCGtGCaGCTGGAcTTcCtAAGGCA

wax9A TGTGGAGTCAGTGTTCCTTTCCCAATCAGC--ACCAACAC-----CAACTGCAACAAC
 wax9E TGTGGAGTCAGTGTTCCTTTCCCAATCAGC--ACCAACAC-----CAACTGCAACAAC
 wax9C TGTGGAGTCAATGTTCCTTTCCCCATTAGCTTACTAACACGGTGCATCAACTGCAACAGC
 wax9B TGTGGAGTCAATATTTCCTTACAAAATCAGC--AAAAGCAC-----CAACTGCAACAGC
 wax9D TGTGGAGTCAACATTTCCTTACAAGATCAGC--AAAACCAC-----CAACTGCAACAGT
 ***** *

Konsensus TGTGGAGTCAatgTTcCCTTtCccaATcAGC AccAaCAC CAACTGCAACAAC

wax9A GTGAAATGA
 wax9E GTGAAATGA
 wax9C GTGAAATAA
 wax9B GTTAGATGA
 wax9D GTGAAATGA
 ** * * * *

Konsensus GTgAaaTgA

Abbildung 48: Vergleich der Nucleotidsequenzen der wax9-Gene

Die identischen Bereiche in den Sequenzen sind unter der Sequenz mit einem * gekennzeichnet, die Start- und Stoppkodons sind unterstrichen, die Leadersequenz ist rot, Die unterschiedlichen Nucleotide sind unter der Sequenz ohne * gedruckt. Die Konsensussequenz ist blau gedruckt.

5.2.2 Struktur und Aminosäuresequenzen der WAX9-Proteine

Da die Aminosäuresequenz der WAX9-Proteine zu ca. 50 % identisch zu der von nicht spezifischen pflanzlichen Lipidtransfer Proteine mit nachgewiesener Lipidtransfer Aktivität war, wurde die WAX9-Proteinfamilie in der Klasse der Lipidtransfer Proteine eingeordnet (Pyee et al 1994).

In der Abbildung 49 ist die 3D-Struktur eines Lipidtransfer Proteins aus *Z. mays* dargestellt. Das LTP besteht aus 4 α -Helices (H), die untereinander mit 3 flexiblen Loops (L) verbunden sind. In der dreidimensionalen Struktur von LTPs unterscheiden sich drei Domänen Regionen. Die äußerst hydrophobe N-Terminal Region, die durch Wechselwirkung an Membranen bindet, die in der Mitte stark geladene Region und die hydrophile C-Terminal Region (Tchang et al 1988).

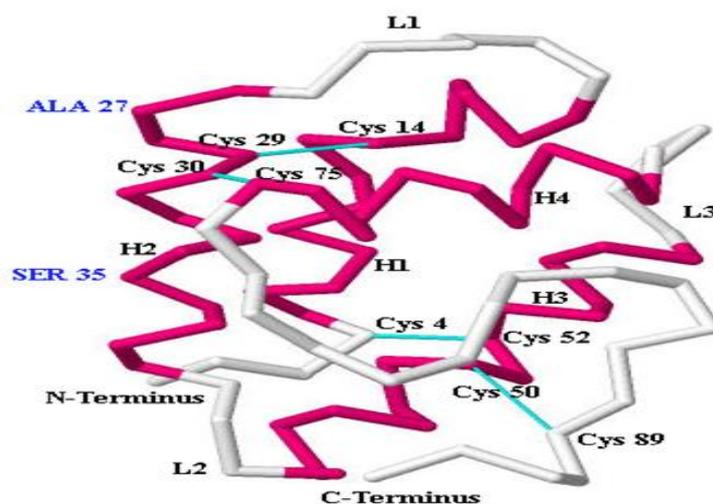


Abbildung 49: Darstellung (3D) ein Maize Nonspecific LTP

Die 3D-Abbildung wurde aus PDB, Date Bank entnommen. Die 4 Disulfidbrücken sind mit blauem, die konservierten Pentapeptide mit gelbem, die 4 α -Helices mit grauem und die 3 Loops sind mit hellblauem Hintergrund gezeichnet.

In den kodierenden Bereich weisen WAX9-Proteine als Merkmal aller unspezifischen Lipidtransferproteine 8 hochkonservierte Cysteine (Abb. 50) auf, die während der Proteinfaltung 4 Disulfidbrücken bilden und die 4 α -Helices stabilisieren. Bei der Reduktion der Disulfidbrücken wurde für das LTP von Mais eine Inhibition der Lipidtransferaktivität festgestellt (Grosbois et al 1993). Aufgrund der Faltung wird eine hydrophobe Furche durch die 4 α -Helices gebildet, die sich durch das gesamte Protein zieht. Durch das C-Terminal

hochkonservierte Pentapeptide wird diese hydrophobe Furche abgedeckt. Die Aminosäuren, die sich an der Bildung dieser Furche beteiligen, sind in fast allen LTPs vorhanden. Durch diese Furche binden die LTPs unterschiedliche Lipide. In den Sequenzbereichen von drei Loops befinden sich die dazwischenliegenden hydrophileren Aminosäuren (Kader 1996).

Eine spezifische Eigenschaft von Lipidtransfer Proteinen und auch WAX9-Proteinen sind ein Mangel an aromatischen Aminosäuren, insbesondere (W) Tryptophan (Kader 1996). Die 25 Aminosäuren der Leadersequenz sind bei allen WAX9-Proteinen in ihrer Summe überwiegend hydrophobe Aminosäuren. Durch diese Transitsequenz besitzen die WAX9-Proteine eine extrazelluläre Lokalisation (Vergnolle et al 1988).

Bei der Sequenz von reifen Proteinen befinden sich besondere konservierte Aminosäuren wie z.B die konservierte phenolische Aminosäure (Y) Tyrosin (Position 17) in der Nähe vom N-Terminus, die möglicherweise essentiell für die biologische Aktivität von Proteinen sind. Ebenfalls spielen die beiden hochkonservierten Pentapeptide, die von Douliez 2000 als Sequenzmotive vorgeschlagen wurden, eine entscheidende Rolle bei der Ligandenbindung. Das erste Sequenzmotiv konnte innerhalb der WAX9-Proteine vollständig identifiziert werden (innerhalb der Erkennungssequenz des Anti-WAX9-Antikörpers). Bei dem zweiten Sequenzmotiv findet man die phenolische Aminosäure Tyrosin Y wie bei Douliez auch in WAX9B und WAX9D. Wogegen bei WAX9A, WAX9E und WAX9C die Aminosäure Phenylalanin F zu finden ist.

Die Aminosäure Prolin (P) und Glycin (G), die hoch konserviert und an der Bildung der Loops beteiligt sind, befinden sich in den meisten Lipidtransfer Proteine. Sie spielen neben den anderen hochkonservierten Aminosäuren Asparagin (N), Arginin (R), und Tyrosin (Y) eine große und entscheidende Rolle bei der Ligandenbindung (Douliez et al 2000).

```

WAX9A      MAGVMKLACLVLACMIVAGPITANRALTCCGTVNSNVAPCIGYITQ-GGTLPGACCTGVSK
WAX9E      MAGVMKLACLVLACMIVAGPITANAALTCCGTVNSNVAPCIGYITQ-GGPLPFRACCTGVSK
WAX9C      MAGLMKLACLVLACMIVAGPITSKAALSCGTVNTNVAACIGYLTQ-G-ALPRACCTGVSK
WAX9B      MAGLVKLSCLVLACMIVAGPIATNAALSCGTVSGNLAACIGYLTQNG-PLPRGCTGVTN
WAX9D      MAGLMKLACLLIFACMIVAGPITSNAALSCGTVSGYVAPCIGYLAQNAPAVPTACCSGVTS
***:***:***:*****:***: **:*****. :*.*****:~ . .:* .**:*~:~

```

Konsensus **MAGlmKLaCLvlACMIVAGPitsnaALsCGTVnsnvApCIGYltqnggalPraCCTGVsk**

```

WAX9A      LNSMARTTPDRQQACRCLETAAARALGPNLNAGRAAGIPKACGVSVPFPISTNTNCNNVK-
WAX9E      LNSMARTTPDRQQACRCLKTAAASALGPNLNAGRAAGIPKACGVSVPFPISTNTNCNNVK-
WAX9C      LNSIARTTPDRQQACRCLKTAAASALGSGLNAGRAAGLPKACGVNVVPFPISELLTRCINCNS
WAX9B      LNNMARTTPDRQQACRCLVGAANSFPT-LNAARAAGLPKACGVNIPYKLSKSTNCNSVR-
WAX9D      LNNMARTTPDRQQACRCLVGAANALPT-INVARAAGLPKACGVNIPYKLSKTTNCNSVK-
**:******:***** ** :~ . :*.*****:*****:~* ** *.*~.~

```

Konsensus **LNSmARTTPDRQQACRCLvtAAsalgpnlNagRAAGlPKACGVnvPfpIStnTnCNNvk**

WAX9A --
WAX9E --
WAX9C VK
WAX9B --
WAX9D --
Konsensus vk

Abbildung 50: Vergleich der Aminosäuresequenzen der WAX9-Proteine

Die identischen Bereiche in den Sequenzen sind unter der Sequenz mit einem * gekennzeichnet. Die 8 Cysteine sind mit grauem Hintergrund gedruckt, die Leadersequenz ist rot, die Konsensussequenz ist blau gedruckt. Die 4 α -Helices sind mit ... unterstrichen. Die Aminosäuren, die an der Bildung der hydrophoben Furche beteiligen sind, sind dick unterstrichen. Die Aminosäuren in Position 27 und 35 bei WAX9E und WAX9D sind mit hellblauem Hintergrund gedruckt. Das C-Terminal hochkonservierte Pentapeptid ist mit gelbem Hintergrund gedruckt. Die Tyrosine (Y) am Anfang und am Ende der Furche sind dick und lila gedruckt. Die Erkennungssequenz für den Anti-WAX9-Antikörper ist in der Konsensussequenz kursiv-rot gedruckt. Die beiden hochkonservierten Sequenzmotive sind in der Konsensussequenz doppelt unterstrichen.

In einigen Positionen kann in der Aminosäuresequenz ein deutlicher Unterschied zwischen allen WAX9-Proteinen gesehen werden. In der Erkennungssequenz des Anti-WAX9-Antikörpers findet man bei WAX9B und WAX9D ein Asparagin N statt einem Serin S. Bei WAX9C findet man anstelle eines Methionin M ein Isoleucin I. Dieser Austausch verhindert bei WAX9C die Bindung mit dem Antikörper (Schilling 2003). Dies führt möglicherweise bei WAX9D und WAX9B zu einer schwächeren Bindung.

In der extrem hydrophoben Region z.B in der Anfangsnähe bzw. Endesnähe des ersten Helices H1 des reifen Proteins (Ab. 50) befinden sich bei den LTPs unterschiedliche Aminosäuren, die möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Ligandenbindung oder bei den biologischen Aktivitäten spielen. In Position 27 ist bei *Z. mays* ein (A) Alanin, bei WAX9A ein (G) Glycin, bei WAX9E/WAX9C/WAX9B ein (R) Arginin und bei WAX9D ein (T) Threonin. In Position 35 bei *Z. mays* und WAX9D ist ein (S) Serin, bei WAX9A/WAX9E/WAX9C ein Lysin (K) und bei WAX9B ein (N) Asparagin. Die Aminosäuren in diesen beiden Positionen führen vermutlich zu der unterschiedlichen kryoprotektiven bzw. lipidtransferaktiven Wirkung der WAX9-Proteine. Um diese Vermutung zu bestätigen wurden von Schilling die beiden Aminosäuren durch die gerichtete Mutagenese in den beiden Positionen 27 und 35 einzeln und zusammen durchgeführt. Die spezifische Funktion wurde in dieser Arbeit getestet.

Nach Schilling 2003 zeigt die Stammbaumanalyse auf der Grundlage der kombinierten Aminosäuresequenzen, dass die WAX9-Proteine eine Gruppe bilden. WAX9A, WAX9E und WAX9C bilden eine eigene Untergruppe. Diese drei Proteine sind deutlich von den anderen WAX9-Proteinen getrennt. WAX9A und WAX9E weisen eine engere genetische Beziehung zueinander auf als jeweils zu WAX9C. WAX9B und WAX9D bilden ebenfalls nach der Stammbaumanalyse eine eigene Untergruppe mit einer geringeren genetischen Beziehung (Schilling 2003). Diese Analyse basiert auf Ähnlichkeiten in der Proteinsequenz basiert.

Ein Vergleich der Nucleotidsequenzen bzw. der Aminosäuresequenzen der kodierenden Bereiche von WAX9A und WAX9E mit Leadersequenz bestätigt, dass die beiden Gene sehr identisch (ca. 96 %) sind und erklärt die Ähnlichkeit in den Fähigkeiten von beiden Proteinen. Von 357 Nucleotide waren nur 11 Nucleotide unterschiedlich, die nur 5 Aminosäuren in den Aminosäuresequenzen entsprechen (Abb. 51).

```

WAX9A      MAGVMKLACLVLACMIVAGPITANEALTCGTVNSNVAPCIGYITQGGTLPGACCTGVSKL
WAX9E      MAGVMKLACLVLACMIVAGPITANAALTCGTVNSNVAPCIGYITQGGELPRACCTGVSKL
*****
          40      50      60      70      80      90
WAX9A      NSMARTTPDRQQACRCLETAARALGPNLNAGRAAGIPKACGVSVPFPISTNTNCNNVK
WAX9E      NSMARTTPDRQQACRCLKTAASALGPNLNAGRAAGIPKACGVSVPFPISTNTNCNNVK
*****:***
    
```

Abbildung 51: Vergleich der Aminosäuresequenzen der WAX9A und WAX9E

Die identischen Bereiche in den Sequenzen sind unter der Sequenz mit einem * gekennzeichnet, die Leadersequenz ist rot. Die unterschiedlichen Aminosäuren sind mit blauem Hintergrund gedruckt.

Der Vergleich von Nucleotidsequenzen bzw. der Aminosäuresequenzen der kodierenden Bereiche von WAX9B und WAX9D zeigt, dass die beiden Gene bei ca. 81 % nahezu identisch sind (Abb. 52).

```

WAX9B      MAGLVKLSCLVLACMIVAGPIATNAALSCGTVSGNLAACIGYLTQNGP-LPRGCCTGVTN
WAX9D      MAGLMKLACLIFACMIVAGPITSNAALSCGTVSGYVAPCIGYLAQNAPAVPTACCSGVTS
****:***:***:*****:*****:*.*****:*. .:* .**:*
          40      50      60      70      80      90
WAX9B      LNNMARTTPDRQQACRCLVGAANSFPTLNAAARAAGLPKACGVNIPYKISKSTNCNSVR
WAX9D      LNNMARTTPDRQQACRCLVGAANALPTINVARAAGLPKACGVNIPYKISKTNCNSVK
*****:***:*.*****:*****:*****:
    
```

Abbildung 52: Vergleich der Aminosäuresequenzen der WAX9B und WAX9D

Die identischen Bereiche in den Sequenzen sind unter der Sequenz mit einem * gekennzeichnet, die Leadersequenz ist rot. Die unterschiedlichen Aminosäuren sind mit blauem Hintergrund gedruckt.

Die Leadersequenz ist rot, Die 23 Aminosäuren N-Terminus des Kryoprotektin sind dick gedruckt, die erste tryptische Peptid ist blau und die zweite tryptische Peptid ist grün. Die identischen Bereiche in den Sequenzen sind mit blauem Hintergrund gedruckt. *Das N-Terminus und die beiden der tryptischen Spaltung des 7 KDa Kryoprotektins Peptide sind von (Sieg 1995) sequenziert. Die beiden hochkonservierten Sequenzmotive sind in der WAX9D-Sequenz doppelt unterstrichen.

Das erste Peptid (23 Aminosäuren) ist ca. 91 % identisch zu WAX9E (nur eine Aminosäure unterschied) und nur 60 % zu WAX9D. Bei dem zweiten Peptid ist die Identität zu WAX9E ca. 86 % (4 Aminosäuren Unterschied) und zu WAX9D nur ca. 36 %. Während es zwischen dem dritten Peptid und WAX9E drei Aminosäure unterschied gab, war die Identität zu WAX9D 100 %. Von diesem Vergleich können wir schließen, dass die zufällig von Sieg 1995 sequenzierten Bereiche des Kryoprotektins mehr identisch zum lipidtransferaktiven WAX9E als zum kryoprotektiven WAX9D ist.

Es ist wichtig zu bemerken, dass das von Sieg 1995 sequenzierte Bereich des Kryoprotektins kürzer ist als die untersuchten WAX9 Proteine. Daher endet dieser Bereich am Anfang der hydrophoben Furche der WAX9 Proteine (Abb. 54). Auch die nach Fred De Lamotte für die WAX9-Membran-Bindung identifizierten Aminosäuren an Position 27 und 35 fehlen dem sequenzierten Bereich des Kryoprotektins. Dies zeigt einen kritischen Punkt im Vergleich der WAX9-Proteine zum CPP.

Es könnte sein, dass die für kryoprotektive Aktivität verantwortlichen Aminosäuren in den noch nicht sequenzierten Bereich des Kryoprotektins vorliegen. Es könnte auch sein, dass die Identität des zweiten tryptischen Peptids mit WAX9D insbesondere mit dem Teil des zweiten hochkonservierten Sequenzmotivs, eine wichtige Rolle bei der kryoprotektiven Aktivität spielt.

5.3 Entwicklung einer Reinigungsmethoden der WAX9-Proteinen und CPP

Für die Reinigung der in *Pichia pastoris* überexprimierten WAX9-Proteine wurden verschiedene Methoden, die in der Literatur bereits zur Reinigung der lipidtransferaktiven sowie kryoprotektiven Proteine beschrieben sind, durchgeführt. Für die Reinigung eines Proteins über Kationsaustauschchromatographie (CM52 oder SP-Sepharose) ist auf alle Fälle vorher ein Entsalzungsvorgang nötig. Die Reinigung über den Kationenaustauscher SP-Sepharose ohne Entsalzung zeigt einen starken Verlust an Protein. Da der Entsalzungsschritt

des Proteinkulturüberstands über Sephadexsäule im Labormaßstab nur in der geringen Menge von 100 ml durchgeführt werden konnte, sollte dieser Schritt mehrmals wiederholt werden, um eine ausreichende Menge des Proteins zu erhalten. Die Ausbeute des gereinigten Proteins über CM52-Kationsaustauscher war gut, die Methode jedoch aufwendig.

In dieser Arbeit erfolgte die Aufreinigung der isolierten bzw. exprimierten Proteine mit der Reverse-Phase-Chromatographie über Amberlite XAD7 Matrix, deren Verlauf in Abbildungen 15 und 16 gezeigt ist. Diese Methode wurde bereits von (Buhot et al 2004) zur Reinigung von pflanzlichen Lipidtransfer-Proteinen aus Tabak verwendet, wurde aber in dieser Arbeit modifiziert, um die Arbeitsschritte zu verkürzen und den Verlust des Proteins zu reduzieren. Die Entwicklung dieser Methode wurde in der Abbildung 2 erklärt.

Bei der originalen Methode wurden die Proteinfractionen, nach der Verdunstung des Acetonitrils unter Vakuum resuspendiert, auf pH 7 eingestellt, auf der Ionenaustauschsäule (Trisacryl SP) aufgetragen und nochmal gereinigt. Dieser Schritt wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Nach dem Eluat der Proteine mit Acetonitril und der Neutralisierung mit Tris-Base wurde das Acetonitril in einer Speed Vac verdampft und das Protein in einer getrockneten Form erhalten, was eine große Rolle in der Lagerung und Aufbewahrung spielt. Die über Amberlite XAD7 gereinigten Proteine konnten bis 4 Monate im Kühlschrank ohne große Beeinflussung ihrer Aktivität aufbewahrt werden. Bei anderen Methoden sollte man die gereinigten Proteinproben in den meisten Fällen in zwei Tagen für Frost- und LTP-Tests verwenden, um eine Aktivität beizubehalten.

Neben der großen verwendeten Menge (bis 1.5 L) des Proteinkulturüberstands, die auf einmal auf eine kleine Säule von ca. 5 ml Bettvolumen aufgetragen werden kann, was Zeit und Material spart, wurde auch in dieser Methode der Entsalzungsschritt gespart. Der wichtige Grund für die Benutzung der Reverse-Phase-Chromatographie über Amberlite XAD7 Matrix ist auch die große Ausbeute des gereinigten Proteins, verglichen mit den anderen Methoden (Tab.10). Gegenüber der Reinigung nach z.B Kationenaustauschchromatographie über CM52 wurde die Ausbeute von 6 mg/L auf 11 mg/L gesteigert.

Schilling hat berichtet, dass bei der Expression von WAX9-Proteine in *E. coli* Proteinbanden von 3-6 KDa in der SDS-PAGE auftreten wurden, die sehr verstärkt werden, wenn die Proteine einer starken Präzipitation unterlagen (Schilling 2003). Nach dieser

Reinigungsmethode über Amberlite XAD7 wurden in der vorliegenden Arbeit diese Proteinbanden in der SDS-PAGE nicht beobachtet.

Insgesamt zeigt diese Arbeit dass die Reverse-Phase-Chromatographie über Amberlite XAD7 Matrix eine geeignete Aufreinigungsmethode ist, um gute Proteinkonzentrationen von WAX9 zu erreichen.

5.4 Molekulargewicht von CPP und WAX9-Proteinen

Die Molekulargewichtbestimmung des CPPs bzw. der rekombinanten WAX9-Proteine wurden im nativen Zustand über die Gelfiltrationschromatographie (Fractogel-Säule) und unter denaturierten Bedingungen über SDS-PAGE und Western-Blot durchgeführt.

Die Gelfiltrationschromatographie (Abb. 19) zeigte, dass das CPP im nativen Zustand drei verschiedene Molekulargewichte von ca. 35 KDa, ca. 28 KDa und von 7-8 KDa aufwies. Bei allen drei Peaks des Kryoprotektins liefen die Banden im denaturierten Zustand in den SDS-Page auf ca. 7-9 KDa.

Heber berichtete, dass das Kryoprotektin ein höheres Molekulargewicht als 7 KDa hat (Heber & Kempfle 1970). In nativen Zustand gab es Hinweise darauf, dass das Kryoprotektin zur Bildung von Aggregaten neigt (Sieg 1995). Die Molekulargewichtbestimmung über Gelfiltrationschromatographie ist daher geeignet, das Aggregationsverhalten des Kryoprotektins zu bestätigen. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Aggregationsneigung von dem nativen Kryoprotektin, das einem erhöhten Molekulargewicht deutlich zeigt. Es könnte sein, dass das CPP ein Pentamerprotein oder Tetramerprotein ist, so dass jede Untereinheit ca. 7 KDa betrug. Nach dieser Analyse stellt die kleinste Größe des CPP ein Monomer, die zweite ein Tetramer von 4 Untereinheiten und das Größte ein Pentamer von 5 Untereinheiten dar.

Durch die Gelfiltration über Sephacryl S-200 zeigte Hinch 1989, dass das CPP ein Molekulargewicht von 28 KDa besitzt (Hinch et al 1989a), exakt das Vierfache von 7KDa, das Molekulargewicht des Kryoprotektins im denaturierten Zustand.

Nach Durchführung der Frostschutztestes zeigten alle drei Fraktionen eine Frostschutzaktivität von 24-36 %, welche gering ist, verglichen mit den 70 % Frostschutzaktivität des CPP (Abb. 20). Sieg hat in seiner Arbeit während der Gelfiltration über Superose 12-Matrix gezeigt, dass das CPP bei zwei Größen von 26 KDa und 7 KDa

detektiert werden konnte. Die Frostschutzaktivität wurde nur bei 7 KDa detektiert (Sieg 1995).

Aufgrund seiner Ähnlichkeit in der Sequenz und in der Aktivität zu pflanzlichen Lipidtransferproteinen insbesondere WAX9-Proteinen könnte es sein, dass das aus Wirsingkohlblättern isolierte kryoprotektive Protein CPP zur WAX9-Proteinfamilie oder mindestens zu den LTPs gehört. Es handelt sich hierbei um eine Mischung aus mindestens drei Proteinen (Hincha et al 2001).

Alle WAX9-Proteine besitzen ein errechnetes niedriges Molekulargewicht zwischen 9.38 - 9.56 KDa (Schilling 2003). Unter denaturierten Bedingungen lokalisieren alle WAX9-Proteine auf den Gelen und Membranen in dem Bereich zwischen 6-14 KDa (Abb. 21-24), welches mit dem errechneten Molekulargewicht übereinstimmt.

Bei den WAX9-Proteinen konnten in nativen Zustand zwei Größen von 14-18 KDa und 7-11 KDa detektiert werden. Es könnte sein, dass jedes WAX9-Protein ein Dimerprotein ist, so dass jede Untereinheit ein Molekulargewicht von ca.7-9 KDa besitzt. Dr. De Lamotte hat durch die Computersimulationsstudien gezeigt, dass WAX9D und WAX9E Dimerproteine sind.

5.5 Analyse der Aktivitäten von WAX9-Proteinen und CPP

Trotz der hohen Sequenzähnlichkeit der vier untersuchten WAX9-Proteine (A, B, D und E), konnten *in vitro* unterschiedliche Aktivitäten nachgewiesen werden.

Wie schon erwartet (Pyee & Kolattukudy 1995) zeigen einige WAX9-Proteine eine starke Fähigkeit, Lipide zwischen Membranen zu transportieren. Es konnte auch in dieser Arbeit die neue Eigenschaft des kryoprotektiven Effekts der *wax9*-Genfamilie bestätigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen ohne Zweifel die Ergebnisse von Schilling und Hincha, dass das WAX9E, das aus der Cuticula von *Brassica oleracea* isoliert wurde, ein LTP und das WAX9D ein Kryoprotektin ist. Aber in Bezug auf die anderen Protein WAX9A und WAX9B waren die Ergebnisse ganz anders.

Trotz der Sequenzähnlichkeit zwischen WAX9A und WAX9E, die nach der Stammbaumanalyse von Schilling zur gleichen Untergruppe gehören, berichtete Schilling, dass das WAX9A, im Gegenteil von WAX9E, eine Frostschutzaktivität von 27 % und keine

Lipidtransferaktivität aufweist. WAX9E zeigte nach Schilling eine Lipidtransferaktivität von nur 44 ΔF /Min (Schilling 2003).

De Oliveira-Funk hat nur WAX9D und WAX9E geprüft und gefunden, dass WAX9E ein LTP, WAX9D ein Kryoprotektin ist (De Oliveira-Funk 2005).

Es konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass die beiden Proteine WAX9A und WAX9E sich neben der Ähnlichkeit bei den Aminosäuresequenzen wie ein typisches LTP verhielten. Die beiden Proteine besaßen in dieser Arbeit ungefähr die gleiche Lipidtransferaktivität von ca. 70 ΔF /Min. Es konnte keine Frostschutzaktivität bei den beiden Proteinen festgestellt werden. Diese Ergebnisse wurden unterstützt durch die Ergebnisse des Bindungsversuches an Thylakoidmembranen.

In Bezug auf das WAX9B wurde in allen vorherigen Arbeiten (Hincha, Schilling, Srór) gezeigt, dass das WAX9B ein LTP ist und keine Frostschutzfähigkeit besitzt. Im Gegensatz dazu zeigte sich in dieser Arbeit, dass das in *Pichia pastoris* überexprimierte WAX9B neben der Sequenzähnlichkeit zu dem WAX9D eine Ähnlichkeit bei den getesteten Aktivitäten hatte. Die beiden Proteine WAX9B und WAX9D waren im Frostschutztest deutlich aktiv und zeigten eine Aktivität von ca. 40-44 %, jedoch zeigten keine oder nur geringe Lipidtransferaktivität von 5-6 ΔF /Min. Diese gemessenen Frostschutzwirkungen der WAX9B und WAX9D waren gering verglichen mit CPP (70 %).

Die Beobachtung, dass die WAX9-Proteine offensichtlich nur jeweils eine dieser Aktivitäten besitzen, konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden (Srór, Schilling und Hincha). Das Vorhandensein von beiden Eigenschaften in einem Protein konnte nicht beobachtet werden. Diese Ergebnisse führen zu einer klaren funktionalen Unterscheidung von Kryoprotektin und LTPs. Deswegen musste die ursprüngliche Arbeitshypothese aufgegeben werden, dass kryoprotektive Aktivität eine pleiotrope Eigenschaft von LTPs ist (Hincha et al 1996). Es wurde vermutet, dass sich Kryoprotektin als eine Spezialisierung aus dem Lipidtransport entwickelt hat. Nach diesen Ergebnissen gehören die beiden Mitglieder der WAX9-Proteinfamilie WAX9B und WAX9D aus *Brassica oleracea*, die vorher nur als LTP identifiziert wurden, zur kryoprotektiven Proteinfamilie.

In Bezug auf die Fähigkeit, lässt sich schließen, dass die WAX9-Familie die beiden Fähigkeiten, Phosphatidylcholin zwischen Liposomen auszutauschen und Frostschutzaktivität unter in dieser Arbeit gewählten Bedingungen, besitzt.

Die Sequenzanalyse des Kryoprotektins CPP, das von Wirsingkohlblättern *Brassica oleracea* isoliert wurde, zeigt, dass es homolog zu den Sequenzen von WAX9-Proteinen ist und zur Klasse der Lipidtransfer Proteine LTPs gehört (Sieg 1995). Neben der Sequenzhomogenität zu den WAX9-Proteinen besitzt das aus Wirsingkohlblättern isolierte Kryoprotektin CPP eine hohe Frostschutzaktivität von 70 % und keine Lipidtransferaktivität. Diese Eigenschaften unterstützen die Vermutung, dass das CPP zu den LTPs gehört. Aufgrund seiner Sequenz und seiner Nähe zu pflanzlichen Lipidtransferproteinen kann man annehmen, dass die Struktur des Kryoprotektins CPP von vier Disulfidbrücken geprägt ist.

Neben dem Unterschied im Verhalten der *in vitro* in dieser Arbeit untersuchten WAX9-Proteinen und dem CPP, die natürlich *in vivo* auch eine voneinander verschiedene Rolle in Pflanzen spielen, sind die Expression und die Lokalisation der Proteine im pflanzlichen Organismus auch unterschiedlich. Die Lokalisation der WAX9-Proteine wurde in Chloroplasten, Cytosol, Mitochondrien und den Zellkern von kälteakklimatisierten Kohlpflanzen nachgewiesen (Schilling et al 2003b). Die WAX9-Proteine exprimieren offensichtlich auch in wachsenden Blättern ungehärteten Pflanzen (Pyee et al 1994). Das CPP bildet sich durch die Härtungsprozesse. Unter Betrachtung der Reinigungsprozedur kann angenommen werden, dass es nicht in der Wachsschicht lokalisiert ist.

5.6 Bindungsstudien an den Thylakoidmembranen

Hincha (1996) zeigte, dass für die Schutzwirkung eine Interaktion von Kryoprotektin mit den Membranen eine notwendige Bedingung ist. Bindungsstudien wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob die rekombinanten WAX9-Proteine bzw. CPP mit den Thylakoidmembranen eine Bindung eingehen. Die Ergebnisse der Bindungsstudien erlaubten ebenfalls eine funktionale Unterscheidung von Kryoprotektin und LTP.

Es konnte nachgewiesen werden, dass zwei Vertreter der WAX9-Genfamilie stabil, die andere zwei instabil an die *in vitro* isolierten Thylakoidmembranen binden. Für die lipidtransferaktiven Proteine WAX9A und WAX9E war die Bindung an die Thylakoidmembranen instabil und sie wurden bei den Waschschrritten wieder entfernt. Im Gegensatz dazu konnte eine stabile Bindung von beiden kryoprotektiven WAX9B und WAX9D bzw. von CPP gezeigt werden.

Sieg hat berichtet, dass in Anwesenheit von Calcium- und Mangan-Ionen der Schutz der Thylakoidmembranen vor Frostschäden erhöht wird (Sieg 1995). Dies konnte in dieser Arbeit

nicht bewiesen werden. Mit und ohne Calcium und Mangan-Ionen konnte keine unterschiedliche Gefrierschutzaktivität von beiden kryoprotektiven WAX9-Proteinen und auch von CPP nachgewiesen werden (Abb.28). Im Gegenteil dazu gab es einen Rückgang in der Bindungsfähigkeit von beiden lipidtransferaktiven und auch von beiden kryoprotektiven WAX9-Proteinen an der Thylakoidmembranen mit dem Vorhandensein von Calcium- und Mangan-Ionen (Abb. 37). Die Lipidtransfer-Aktivität der WAX9-Proteine in Gegenwart von Calcium und Mangan-Ionen wurde auch leicht verringert (Abb. 29).

Einige Autoren beschrieben die Möglichkeit, dass die Lipidtransferaktivität von pflanzlichen lipidtransferaktiven Proteinen in Gegenwart bestimmter Metallionen vermindert wird, da die Ionen möglicherweise die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen LTP und Membranen verhindert (Kader 1996). Auf diese Weise wurden möglicherweise auch die Bindungsfähigkeiten von WAX9-Proteinen an die Thylakoidmembranen in Anwesenheit von Ionen verringert.

5.7 Prüfung der modifizierten Proteine

Die Molekularmodellung und die Computersimulation der Bindung von Proteinen an die Membranen haben vorhergesagt, dass das kryoprotektive WAX9D an die Membranen mit höherer Affinität bindet, verglichen mit dem lipidtransferaktiven WAX9E. Durch bestimmte Aminosäuren erfolgt die Bindung und auf diese Weise schützt möglicherweise das verbundene Protein die Membranen vor Frostschädigungen.

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen von WAX9-Proteinen zeigte, dass nur ein prägnanter Austausch einiger Aminosäuren zwischen den lipidtransferaktiven und den kryoprotektiven WAX9-Proteinen existiert. Das reife WAX9E besitzt in der hydrophoben Furche in der Position 27 ein Arginin (R) und in Position 35 ein Lysin (K). Beim WAX9D findet man an Position 27 des reifen Proteins ein Threonin (T), was möglicherweise essentiell für die biologische Aktivität ist, und an Position 35 ein Serin (S). In diesen beiden Aminosäuren war die Affinität von lipidtransferaktiven WAX9E bzw. von kryoprotektiven WAX9D an die Membranen unterschiedlich. Es wurde auch vermutet, dass die *in vitro* unterschiedlichen Aktivitäten von WAX9-Proteinen auf diesem Austausch in bestimmten Orten zurückführen ist.

Durch die gerichtete Mutagenese in den beiden Positionen 27 und 35 konnte diese Vorhersage bestätigt werden. Diese beiden Aminosäuren wurden einzeln und zusammen von Dr. Silke

Schilling mittels codon usage von *Pichia pastoris* verändert, wobei die Aminosäuresequenz von WAX9D erhalten blieb. Bei den zwei einzelnen Mutanten gab es keinen Unterschied in ihrer Frostschutz- und Lipidtransferaktivität. Bei der doppelten Mutante in beiden Aminosäuren war es ganz klar, dass die Frostschutzaktivität verloren ging. Dies kann erklären, dass der *in vitro* Unterschied in den Aktivitäten der WAX9-Proteine möglicherweise zu diesem bestimmten Austausch der Aminosäuren gehört.

Eine Unterstützung der Bindungshypothese konnte durch Bindungsstudien mit den modifizierten Proteinen gezeigt werden. Nach der Inkubation der modifizierten WAX9-Proteine mit den Thylakoidmembranen zeigten die einzelnen Mutanten (WAX9D/E27 und WAX9D/E35) keinen Unterschied in ihrer Bindungsfähigkeit verglichen mit dem originalen WAX9D. Die doppelte Mutante (WAX9D/E27.35) hat ihre Bindungsfähigkeit an die Thylakoidmembranen verloren, welches klar zeigt, dass die beiden Aminosäuren in Positionen 27 und 35 und möglicherweise andere bestimmte Aminosäuren bei dem WAX9D für die Bindung an die Thylakoidmembranen wichtig sind, und die Bindungshypothese unterstützen.

6 Zusammenfassung

Kryoprotektine sind Polypeptide, die zur LTP-Proteinfamilie gehören. Diese Proteinfamilie besteht bei *B. oleracea* aus fünf Polypeptiden, die als WAX9-Protein bezeichnet werden. Von diesen fünf Proteinen wurden in dieser Arbeit vier Proteine auf ihre LTP- bzw. Frostschutz-Eigenschaften, ihre Bindungsfähigkeiten an die Thylakoidmembranen und ihr Molekulargewicht hin untersucht. Neben den WAX9-Proteinen wurde das aus gehärteten Wirsingkohlblättern gewonnene CPP mitgeprüft.

Wegen der auftretenden Schwierigkeiten und der geringen erhaltenen Proteinausbeute mit der Verwendung von prokaryotischen *E. coli*-Expressionssystem habe ich in dieser Arbeit das eukaryotische Expressionssystem in *Pichia pastoris* verwendet.

Nach der Entwicklung des Reinigungsvorgangs über eine Amberlitesäule konnte ich die rekombinanten WAX9-Protein bzw. das aus Wirsingkohlblättern isolierte CPP in trockener und löslicher Form erhalten, die bis 4 Monate aktiv bleiben können.

In Rahmen dieser Arbeit könnte ich *in vitro* zeigen, dass neben der Ähnlichkeit in der Sequenz die beiden WAX9A und WAX9E sehr ähnlich in ihren Aktivitäten waren. Beide zeigten eine hohe Lipidtransfer-Aktivität und besaßen keine Frostschutzaktivität. Die Bindungsfähigkeit von beiden lipidtransferaktiven Proteinen an die Thylakoidmembranen war schwach.

Ebenfalls verhielten sich die weiteren Proteine WAX9B und WAX9D, die in der Nucleotidsequenzen auch ähnlich sind, wie die Kryoprotektine und zeigten im Gegensatz zu den vorherigen Proteinen keine Lipidtransferaktivität. Diese beiden kryoprotektiven Proteine zeigten *in vitro* eine starke Bindung an die Thylakoidmembranen sowie eine Resistenz gegen die Waschungsschritte.

Das CPP zeigt einen hohen Schutz von 70 % der Thylakoidmembranen gegen Frost und auch eine deutliche starke Bindung an die Thylakoidmembranen, besitzt aber *in vitro* keine Lipidtransferaktivität.

Es konnte kein Mitglied der WAX9-Proteine identifiziert werden, das die beiden Eigenschaften von Kryoprotektion und Lipidtransferaktivität besitzt, was zu einer klaren funktionalen Unterscheidung von Kryoprotektin und LTP führt.

Durch die Computersimulation der Bindung von Proteinen an die Membranen konnte Herr Dr. De Lamotte vorhersagen, dass zwei Aminosäuren bei der kryoprotektiven WAX9D (an Position 27 des reifen Proteins ein Threonin (T) und an Position 35 ein Serin (S)) eine vermutete Rolle bei der Bindung an die Membranen spielen können. Diese beiden Aminosäuren würden einzeln und zusammen durch die gerichtete Mutagenese zwischen dem kryoprotektiven WAX9D und lipidtransferaktiven WAX9E vertauscht und geprüft, wobei die Aminosäuresequenz von WAX9D erhalten blieb.

Es wurden 3 unterschiedliche Konstrukte wie folgt generiert:

- 1- WAX9DE-T27R - Austausch der Aminosäure T (Position 27 WAX9D) nach R (Position 27 WAX9E).
- 2- WAX9DE- S35K - Austausch der Aminosäure S (Position 35 WAX9D) nach K (Position 35 WAX9E).
- 3- WAX9DE-T27R-S35K (Doppelmutante) Austausch der Aminosäuren S (Position 35) nach K (WAX9E) und T (Position 27) nach R (WAX9E).

Die beiden einzelnen Mutanten zeigten keinen Unterschied in ihrer Frostschutz- und Lipidtransferaktivität sowie in ihrer Bindungsfähigkeit an die Thylakoidmembranen, verglichen mit dem kryoprotektiven WAX9D. Eine deutliche Änderung zeigte die doppelte Mutante in beiden Aminosäuren. Sie hat deutlich ihre Frostschutzaktivität sowie ihre Bindungsfähigkeit an die Thylakoidmembranen verloren und hat eine schwache Lipidtransfer-Aktivität gewonnen.

Summary

Cryoprotectins are polypeptides that belong to the lipid transfer protein family (LTP). This protein family consists from five polypeptides in *B. oleracea*, which are called WAX9 protein. Of these five proteins in this work four proteins were tested for lipid transfer or cryoprotective properties, their binding abilities to the thylakoid membranes and their molecular weight. Cryoprotectin (CPP) isolated from hardened cabbage leaves was used as a positive control.

WAX9 proteins were expressed in *Pichia pastoris* and purified by reverse phase chromatography. The purified proteins remained active for at least 4 months.

In this work, I could show *in vitro* that in addition to the similarity in the nucleotide sequence the two WAX9A and WAX9E proteins were very similar in their activities. Both showed a high degree of lipid transfer activity and had no cryoprotective activity. The binding capacity of two lipid transfer proteins to the thylakoid membranes was weak. The other two proteins WAX9B and WAX9D, which are similar in nucleotide sequence, behaved as cryoprotectins and showed no lipid transfer activity. These two cryoprotective proteins showed *in vitro* strong binding to the thylakoid membranes.

The WAX9 proteins studied had either lipid transfer or cryoprotective activity but not both activities, resulting in a clear functional distinction between cryoprotection and lipid transfer.

Molecular modelling of the binding of proteins to the membranes (Dr. De Lamotte, personal communication) predicted that two amino acids in the cryoprotective WAX9D (position T₂₇ and S₃₅ of the mature protein) play a crucial role in the binding to the membranes. These two amino acids were exchanged individually and together by directed mutagenesis.

When the corresponding amino acids from the lipid transfer protein WAX9E were inserted at positions 27 and 35 of the cryoprotective WAX9D protein, the single amino acid substitutions did neither change the cryoprotective behavior of WAX9D, nor did they increase the residual lipid transfer activity. The double mutant, however, lost cryoprotective activity and gained a weak lipid transfer activity.

The experimental results confirmed the prediction from molecular modelling about the strength of membrane binding of the WAX9 proteins and also showed the close correlation between weak membrane binding and lipid transfer activity versus strong membrane binding and cryoprotective activity.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des in vitro Gefrier-/Auftauvorganges	6
Abbildung 2: Aufreinigung über Amberlite XAD7	37
Abbildung 3: Bindungsversuch 1	48
Abbildung 4: Bindungsversuch 2	49
Abbildung 5: LTP – und Frostschutz-Test nach Bindungsversuch.....	50
Abbildung 6: Die Nukleotid und Aminosäuresequenzen der <i>wax9A/E</i> -Gene aus <i>B. oleracea</i> 53	
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Amplifikationsvorgangs von <i>wax9A</i> -Gen.....	55
Abbildung 8: Die Nukleotidsequenzen des originalen <i>wax9A</i> -Gens	55
Abbildung 9: Nukleotidsequenzen des klonierten <i>wax9Am</i> -Gens	57
Abbildung 10: Aminosäuresequenz der WAX9A und WAX9Am-Proteine	58
Abbildung 11: Prüfung der Überexpression von WAX9Am	59
Abbildung 12: die Entsalzung über Sephadex-Säule und die Leitfähigkeitsmessung	60
Abbildung 13: Auftrennung mit dem Kationenaustauscher CM52 und SDS-Gel	61
Abbildung 14: Auftrennung mit dem Kationenaustauscher SP-Sepharose und SDS-Gel.....	63
Abbildung 15: Auftrennung mit der Reverse-Phase-Matrix Amberlite XAD7	65
Abbildung 16: Reinigung der CPP über Amberlite XAD7-Säule und das Coomassie Gel.....	66
Abbildung 17: Darstellung der Standardproteine nach Fractogel-Säule.....	67
Abbildung 18: Eichkurve der Fractogel-TSK HW-50(S)-Säule	68
Abbildung 19: CPP nach Fractogel und Coomassie Gel.....	69
Abbildung 20: Molekulargewichtsbestimmung von WAX9E über Fractogelsäule.....	71
Abbildung 21: Molekulargewichtsbestimmung von WAX9A über Fractogelsäule	72
Abbildung 22: Molekulargewichtsbestimmung von WAX9B über Fractogelsäule	72
Abbildung 23: Molekulargewichtsbestimmung von WAX9D über Fractogelsäule	73
Abbildung 24: Frostschutzaktivität des CPP und von WAX9-Proteinen	74
Abbildung 25: Frostschutzaktivität in Abhängigkeit mit der Proteinkonzentration	77
Abbildung 26: LTP-Test WAX9 und CPP-Proben	78
Abbildung 27: Lipidtransferaktivität in Abhängigkeit mit der Proteinkonzentration.....	80
Abbildung 28: Die Frostschutzaktivität mit und ohne Kationen.....	81
Abbildung 29: Lipidtransferaktivität mit und ohne Kationen.....	82
Abbildung 30: Lipidtransferaktivität der Mischung von WAX9-Proteinen	82
Abbildung 31: Frostschutzaktivität der Mischung von WAX9-Proteinen.....	83
Abbildung 32: Bindungsversuch von WAX9D/WAX9E mit Thylakoidmembranen.....	84

Abbildung 33: Bindungsversuch von WAX9B/WAX9A mit Thylakoiden.....	85
Abbildung 34: Bindungsversuch zwischen CPP und Thylakoidmembranen.....	86
Abbildung 35: Zweite Bindungsversuch von WAX9E/D mit Thylakoiden	86
Abbildung 36: Zweite Bindungsversuch von 9A/9B mit Thylakoiden.....	87
Abbildung 37: Bindungsversuch von 9E/9D mit Thylakoiden mit und ohne Kationen	88
Abbildung 38: Frostschutztest von CPP nach Bindungsversuch	89
Abbildung 39: Frostschutztest von WAX9D nach Bindungsversuch.....	90
Abbildung 40: LTP-Test von WAX9E nach der Bindung an die Thylakoiden.....	91
Abbildung 41: Aminosäuresequenz der einzelnen und doppelten Mutanten.....	92
Abbildung 42: Coomassie-Gel und Westernanalyse von modifizierten Proteinen.....	93
Abbildung 43: Frostschutz der modifizierten bzw. originalen WAX9-Proteine	93
Abbildung 44: Frostschutzaktivität in Abhängigkeit von Proteinkonzentrationen	94
Abbildung 45: Lipidtransferaktivität bei verschiedenen Proteinen.....	95
Abbildung 46: Lipidtransferaktivität in Abhängigkeit von Proteinkonzentrationen	96
Abbildung 47: Bindungsversuch von modifizierten WAX9-Proteinen mit Thylakoiden.....	97
Abbildung 48: Vergleich der Nucleotidsequenzen der <i>wax9</i> -Gene	101
Abbildung 49: Darstellung (3D) ein Maize Nonspecific LTP.....	102
Abbildung 50: Vergleich der Aminosäuresequenzen der WAX9-Proteine	104
Abbildung 51: Vergleich der Aminosäuresequenzen der WAX9A und WAX9E.....	105
Abbildung 52: Vergleich der Aminosäuresequenzen der WAX9B und WAX9D.....	105
Abbildung 53: Vergleich der Aminosäuresequenzen der WAX9D und WAX9E.....	106
Abbildung 54: Vergleich der Aminosäuresequenzen von WAX9D/E und CPP	106

8 Tabelleverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete <i>Wax9</i> -Gene.....	13
Tabelle 2: Verwendete Antikörper	13
Tabelle 3: Verwendete Enzyme bei der Klonierung	25
Tabelle 4: Gel-, Kathoden- und Anodenpuffer	40
Tabelle 5: Coomassie-Färbelösung und –Entfärbelösung.....	41
Tabelle 6: MPT-, Blockierung-, und AP- Puffer.....	42
Tabelle 7: Wasch-, Proben- und Testlösungen.....	45
Tabelle 8: Puffer und Liposomen für LTP-Test.....	46
Tabelle 9: Primer für die PCR-Amplifikation des <i>wax9A</i> -Gens	54
Tabelle 10: Die Proteinausbeute	67
Tabelle 11: Molekulargewicht und Elutionsvolumen verschiedener Proteine.....	68
Tabelle 12: Spezifische Frostschutzaktivitäten der WAX9-Proteine und CPP.....	75
Tabelle 13: Frostschutzaktivitäten von verschiedenen Molekülen	76
Tabelle 14: Spezifische Lipidtransferaktivität der WAX9-Proteine und CPP	79
Tabelle 15: Lipidtransferaktivität von verschiedenen Molekülen.....	79
Tabelle 16: Das Intron und der kodierende Bereich der <i>wax9</i> -Gene	100

9 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
A. Bidest	Zweifach destilliertes Wasser
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BMGH	Buffered Glycerol-Minimal Medium
BMMH	Buffered Methanol-Minimal Medium
BSA	Bovine Serum Albumin
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
cDNA	komplementäre DNA
C- Terminal	Carboxyterminal
CPP	Kryoprotektin Protein
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EPC	Egg Phosphatidylcholin
EPG	Egg Phosphatidylglycerol
Eppi	Eppendorfgefäß
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	Fluoreszenz
EtOH	Ethanol
et al	und andere
h	Stunde/Stunden
kb	Kilobasenpaare
KDa	Kilodalton
LB	L-Broth Vollmedium
LTP	Lipid Transfer Protein
L	Liter
mA	Milliampere
mM	Millimolar
M	Molar
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute/Minuten

ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
MOPS	3-Morpholino-Propan-Sulfonsäure
mRNA	Messenger RNA
NBD-C12-HPC	2-(12-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino) dodecanol-hexadecanoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine.
nm	Nanometer
Nr	Nummer
NBT	p-Nitrotetrazoliumblausäurechlorid
N-Terminal	Aminoterminal
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglycol
pI	Isoelektrische Punkt
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotation per Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium- Dodecyl-Sulfat
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus (thermophiler Prokaryot)
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N, N Tetramethyldiamin
TES	N-Tris [Hydroxymethyl]-methyl-2-aminoethane Sulfonic Acid
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1.3- propandiol
U	Units (Einheiten)
UTS	Untranslatierten Seite
ü. N	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volume per Volume
w/v	Masse per Volume
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPD	Yeast extract-Pepton-Dextrose
z.B	Zum Beispiel
z. T	Zum Teil

10 Literaturverzeichnis

- Arnon D. 1949. Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta Vulgaris. *Plant physiology* 24: 1-15
- Barr K, Hopkins S, Sreekrishna K. 1992. Protocol for efficient secretion of HSA developed from *Pichia pastoris*. *Pharm. Eng* 12: 48 - 51
- Boyer J. 1982. Plant productivity and environment. *Science* 218: 443-8
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248-54
- Brauer H, Kofler R. 1987. Photosynthesis in frost-hardened and frost-stressed leaves of *Herea helix* L. *Plant Cell Environ* 10: 339-46
- Buhot N, Gomes E, Milat M, Ponchet M, Marion D, Lequeu J, Delrot S, Coutos-Thevenot P, Blein J. 2004. Modulation of the biological activity of a tobacco LTP1 by lipid complexation. *Molecular biology of the cell* 15: 5047-52
- Cregg J, Cereghino J, Shi J, Higgins D. 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular biotechnology* 16: 23-52
- Cregg J, Vedvick T, Raschke W. 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N Y)* 11: 905-10
- De Oliveira-Funk A. 2005. *Überexpression in Pichia pastoris, Aufreinigung und Messung der Lipidtransfer- und Frostschutzaktivität von WAX9D- und WAX9E-Proteinen*. DIPLOMARBEIT: Fu-Berlin.
- Douliez J, Michon T, Elmorjani K, Marion D. 2000. Structure, biological and technological functions of lipid transfer protein and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels. *cereal Science* 32: 1-20
- Dowgert M, Steponkus P. 1984. Behavior of the Plasma Membrane of Isolated Protoplasts during a Freeze-Thaw Cycle. *Plant physiology* 75: 1139-51
- Ellis S, Brust P, Koutz P, Waters A, Harpold M, Gingeras T. 1985. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and cellular biology* 5: 1111-21
- Fabrie C, de Kruijff B, de Gier J. 1990. Protection by sugars against phase transition-induced leak in hydrated dimyristoylphosphatidylcholine liposomes. *Biochimica et biophysica acta* 1024: 380-4
- Feeney R, Burcham T, Yeh Y. 1986. Antifreeze glycoproteins from polar fish blood. *Annu Rev Biochim Biophys Chem* 15: 59-78
- Geldwerth D, de Kermel A, Zachowski A, Guerbette F, Kader J, Henry J, Devaux P. 1991. Use of spin-labeled and fluorescent lipids to study the activity of the phospholipid transfer protein from maize seedlings. *Biochimica et biophysica acta* 1082: 255-64

- Grosbois M, Guerbette F, Jolliot A, Quintin F, Kader J. 1993. Control of maize lipid transfer protein activity by oxido-reducing conditions. *Biochimica et biophysica acta* 1170: 197-203
- Guy C, Huber J, Huber S. 1992. Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. *Plant physiology* 100: 502-8
- Guy C, Kaplan F, Kopka J, Selbig J, Hinch D. 2008. Metabolomics of temperature stress. *Plant physiology* 132: 220-35
- Haehnel W. 1984. Photosynthetic electron transport in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 659-963
- Hannah M, Heyer A, Hinch D. 2005. A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 1(2): e26
- Heber U, Kempfle M. 1970. Proteine als Schutzstoffe gegenüber dem Gefriertod der Zelle. *Z. Naturforsch.* 25b: 834-42
- Heyer A. 2005. Fliehen, vermeiden oder einfach durchhalten! In *Frosttoleranz bei Pflanzen*: <http://www.uni-stuttgart.de/wechselwirkungen/ww2005/Arnd%20G.%20Heyer.pdf>.
- Higgins D, Cregg J. 1998. Introduction to *Pichia pastoris*. *Methods in Molecular Biology. Humana Press Totowa New Jersey* 103: 1-15
- Higgins D, Cregg J. 1998b. *Pichia* protocols. *Methods in Molecular Biology. Humana Press Totowa New Jersey* 103
- Hinch D. 1986. Sucrose influx and mechanical damage by osmotic stress to thylakoid membranes during an in-vitro freeze-thaw cycle. *Biochimica Biophysica Acta* 861: 152-58
- Hinch D. 1992. Mechanismen des Gefrierschutzes von Thylakoidmembranen durch spezifische wirkende Zucker und Proteine In *Zusammenfassung wissenschaftlicher Publikationen an Stelle einer Habilitationsschrift gemäß §154 Abs.2PKt. 1 BerlHG*, pp. 76. Berlin: Freie Universität
- Hinch D. 2002. Cryoprotectin: a plant lipid-transfer protein homologue that stabilizes membranes during freezing. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 357: 909-16
- Hinch D, Heber U, Schmitt J. 1985. Antibodies against individual thylakoid membrane proteins as molecular probes to study chemical and mechanical freezing damage in vitro. *Biochimica Biophysica Acta* 809: 337-44
- Hinch D, Heber U, Schmitt J. 1989a. Osmotic stress causes mechanical freeze-thaw damage to thylakoids in vitro and in vivo. In: *Environmental Stress in Plants. NATO ASI Series, Cherry JH. Springer, Berlin, New York, London, Paris, Tokyo*, G19: 303-15
- Hinch D, Heber U, Schmitt J. 1989b. Freezing ruptures thylakoid membranes in leaves and rupture can be prevented in vitro by cryoprotective proteins *Plant Physiol. Biochem.* 27: 795-801

- Hincha D, Heber U, Schmitt J. 1990. Proteins from frost-hardy leaves protect thylakoids against mechanical freeze-thaw damage in vitro. *Planta* 180: 416-19
- Hincha D, Neukamm B, Srer H, Sieg F, Weckwarth W, Ruckels M, Lullien-Pellerin V, Schröder W, Schmitt J. 2001. Cabbage cryoprotectin is a member of the nonspecific plant lipid transfer protein gene family. *Plant physiology* 125: 835-46
- Hincha D, Schmitt J. 1985. Mechanical and chemical injury to thylakoid membranes during freezing in-vitro. *Biochim. Biophys Acta* 812: 173-80
- Hincha D, Schmitt J. 1988a. Mechanical freeze-thaw damage and frost hardening in leaves and isolated thylakoids from spinach. I. Mechanical freeze-thaw damage in an artificial stroma medium. *Plant, Cell & Environment*. 11: 41- 46
- Hincha D, Schmitt J. 1988b. Mechanical freeze-thaw damage and frost hardening in leaves and isolated thylakoids from spinach. II. Frost hardening reduces solute permeability and increases extensibility of thylakoid membranes. *Plant, Cell & Environment*. 11: 47-50
- Hincha D, Schmitt J. 1992. Freeze-thaw injury and cryoprotection of thylakoid membranes. In: Water and Life: Comparative analyse of water relationships at the organismic, cellular and molecular levels. Somero GN. Osmond CB. and Bolis CL. *Springer, Berlin, Heidelberg, New York*: 316-37
- Hincha D, Schmitt J. 1992a. Cryoprotective leaf proteins: assay methods and heat stability. *J. Plant Physiol.* 140: 236-40
- Hincha D, Schmitt J. 1992b. Freeze-thaw injury and cryoprotection of thylakoid membranes. In: Water and Life: Comparative analyse of water relationships at the organismic, cellular and molecular levels. Somero GN. Osmond CB. and Bolis CL. *Springer, Berlin, New York*: 316-37
- Hincha D, Sieg F, Bakaltcheva I, Köth H, Schmitt J. 1996. Freeze-Thaw damage to thylakoid membranes: specific protection by sugars and proteins. In: Advances in low-Temperatures Biology . Steponkus PL. (ed.). *JAI Press, London* 3: 141-83
- Kader J. 1996. Lipid-Transfer Proteins in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 47: 627-54
- Koutz P, Davis G, Stillman C, Barringer K, Cregg J, Thill G. 1989. Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast* 5: 167-77
- Krause G, Grafflage S, Rumich-Bayer S, Somersalo S. 1988. Effects of freezing on plant mesophyll cells. *Symp Soc Exp Biol.* 42: 311-27
- Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5
- Levitt J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Volume I: Chilling, freezing and high temperature stresses. *Academic Press, Orlando*

-
- Meryman H, Williams R, Douglas M. 1977. Freezing injury from "solution effects" and its prevention by natural or artificial cryoprotection. *Cryobiology* 14: 287-302
- Prinz W, Aslund F, Holmgren A, Beckwith J. 1997. The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *The Journal of biological chemistry* 272: 15661-7
- Pyee J, Kolattukudy P. 1995. The gene for the major cuticular wax-associated protein and three homologous genes from broccoli (*Brassica oleracea*) and their expression patterns. *Plant*. 7: 49-59
- Pyee J, Yu H, Kolattukudy P. 1994. Identification of a lipid transfer protein as the major protein in the surface wax of broccoli (*Brassica oleracea*) leaves. *Arch Biochem. Biophys.* 311: 460-8
- Sakai A, Larcher W. 1987. *Frost survival of plants responses and adaptation to freezing stress*. pp. 321. Berlin: Springer Verlag.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 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. *Analytical biochemistry* 166: 368-79
- Schilling S. 2003. *Klonierung, Expression und Charakterisierung der Lipidtransferprotein-Genfamilie wax9 aus Brassica oleracea*. Dissertation Biologie: FU-Berlin.
- Schilling S, Hinch D, Schmitt J, Köhn C, Tischendorf G. 2003b. Intracellular localization of lipid transfer proteins in *Brassica oleracea*. In *Proc. of the XII International Congress on Genes, Gene Families, and Isozymes* (Schnarrenberger C. and Wittmann-Liebold B., eds) Bologna: Monduzzi
- Schmidt J, Schmitt J, Kaiser W, Hinch D. 1986. Salt treatment induces frost hardiness in leaves and isolated thylakoids from spinach. *Plant* 168: 50-55
- Sieg F. 1995. *Isolierung und Charakterisierung eines kryoprotektiven Proteins aus Brassica oleracea-Blättern*. Dissertation Biologie: FU-Berlin.
- Sieg F, Schröder W, Schmitt J, Hinch D. 1996. Purification and Characterization of a Cryoprotective Protein (Cryoprotectin) from the Leaves of Cold-Acclimated Cabbage. *Plant physiology* 111: 215-21
- Sror H, Tischendorf G, Sieg F, Schmitt J, Hinch D. 2003. Cryoprotectin protects thylakoids during a freeze-thaw cycle by a mechanism involving stable membrane binding. *Cryobiology* 47: 191-203
- Steponkus P, Uemura M, Webb M. 1993. A contrast of the cryostability of the Plasma membran of winter rye and spring oat: tow species that widely differ in their freezing tolerance and plasma membran lipid composition. In: Steponkus PL. (ed): *Advances in Low-Temperatur Biology*. JAI Press, London 2: 183-210

- Stewart E, Aslund F, Beckwith J. 1998. Disulfide bond formation in the Escherichia coli cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *The EMBO journal* 17: 5543-50
- Tchang F, This P, Stiefel V, Arondel V, Morch M, Pages M, Puigdomenech P, Grellet F, Delseny M, Bouillon P. 1988. Phospholipid transfer protein: full-length cDNA and amino acid sequence in maize. Amino acid sequence homologies between plant phospholipid transfer proteins. *The Journal of biological chemistry* 263: 16849-55
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Science USA* 76: 4350-4
- Veenhuis M, Van Dijken J, Harder W. 1983. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. *Adv Microb. Physiol.* 24: 1-82
- Vergnolle C, Arondel V, Tchang F, Grosbois M, Guerbette F, Jolliot A, Kader J. 1988. Synthesis of phospholipid transfer proteins from maize seedlings. *Biochemical and biophysical research communications* 157: 37-41
- Wirtz K. 1991. Phospholipid transfer proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 60: 73-99