

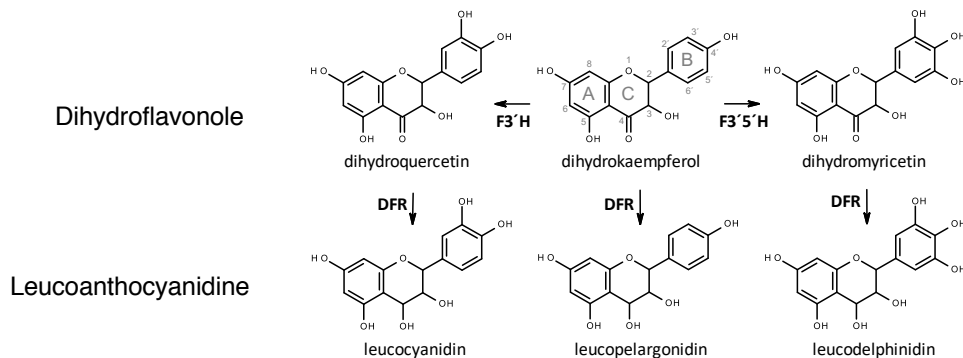
Substratspezifität von rekombinant exprimierten Dihydroflavonol-4-Reduktasen

(Corona-Version 2021, Einzelpersonen statt 2er-Gruppen)

Die NADPH-abhängige Oxidoreduktase DFR (Dihydroflavonol-4-Reduktase) kann Selektivität bezüglich des Hydroxylierungsmusters ihrer Substrate aufweisen. Basierend auf Sequenzvergleichen von natürlich vorkommenden DFRs wurden Mutationen von Aminosäuren innerhalb der Substratbindungsstelle von zwei Isoenzymen (Wildtypen G1, G2) vorgenommen, die aus der Erdbeere (*Fragaria*) stammen. Zuerst werden zwei unterschiedliche GST-DFR Fusionsproteine (1 Wildtyp, 1 Mutante) heterolog in *E. coli* exprimiert und isoliert und mittels Affinitätschromatographie sowie Größenausschlusschromatographie gereinigt (**Teil A**).

Ziel des **Teils B** dieser Übung ist es, herauszufinden, ob durch die Mutation eine Änderung der **Substratspezifität** hervorgerufen wird und wenn ja, in welcher Weise. Zu diesem Zweck werden mit ¹⁴C-markierten Substraten Aktivitätstests der zuvor hergestellten Enzyme durchgeführt. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wird eine Wertung abgegeben, ob die Mutation ggf. Unterschiede in der Substratspezifität hervorruft.

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



Die Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR) katalysiert die Reduktion der Dihydroflavonole zu den Leucoanthocyanidinen. Die DFR kann Selektivität bezüglich des Hydroxylierungsmusters im B-Ring ihrer Substrate aufweisen. F3'H: Flavonoid-3'-Hydroxylase; F3'5'H: Flavonoid 3'5'-Hydroxylase

Hinweise:

* wird von dem/r Betreuer/in ausgegeben

(A) befindet sich im Abzug

(BT) befindet sich am Betreuer/innentisch

(EB) befindet sich im allgemeinen Entnahmebereich auf RT

(GS) befindet sich im der Gefrierschrank

(I) befindet sich im Isotopenarbeitsbereich

(KS) befindet sich im Kühlschrank

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

Gerahmte Teile: es ist unter sterilen Bedingungen zu arbeiten!

Grau unterlegte Teile: es wird mit radioaktiven Substanzen (¹⁴C-markiert) gearbeitet. Daher ist mit besonderer Sorgfalt zu arbeiten!

Abkürzungen:

AK, Antikörper

DHK, Dihydrokämpferol

DHM, Dihydromyricetin

DHQ, Dihydroquercetin

dpm, Disintegrations per minute

GST, Glutathion-S-Transferase

GSB, Glutathion-Sepharose beads

h, Stunde(n)

LT, Protein LoBind Tubes

min, Minute(n)

RG, Reaktionsgefäß

RT, Raumtemperatur

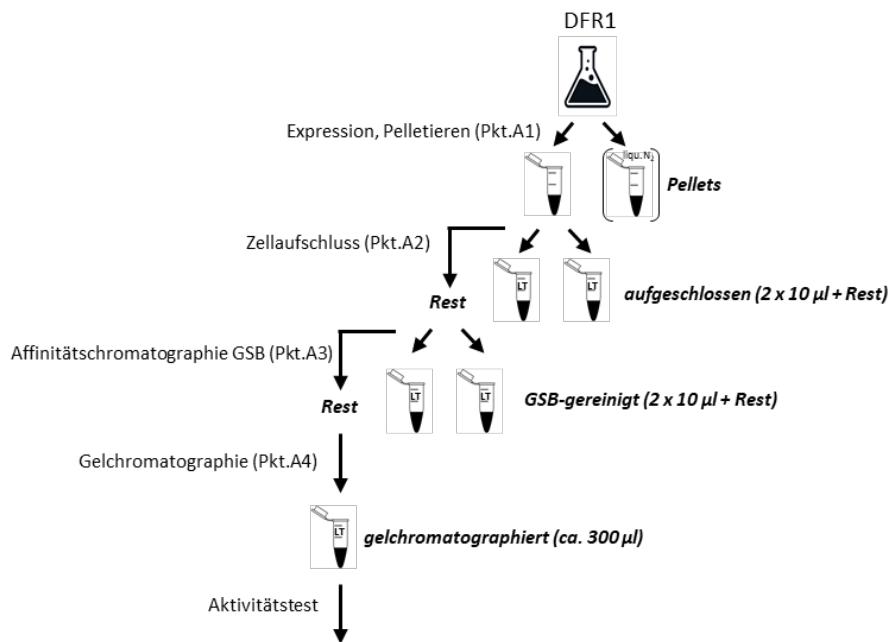
s, Sekunde(n)

SDS-PAGE, Natrium dodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese

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

Reservierung des Mini-PROTEAN Tetra Cell Systems ist möglich!

TEIL A: Enzymexpression und -reinigung



Übersicht über die Isolierungs- und Reinigungsschritte der DFR

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

Lösungen: 1 M MgSO₄ (KS)
Ampicillin (Stammlösung 100 mg/mL) (KS)
50 % (v/v) Glycerin (KS)
1 M IPTG (GS)
NaOH (pH-Meter)

Feststoffe: Pepton (EB)
Hefeextrakt (EB)
NaCl (EB)

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

Durchführung:

- 250 mL Expressionsmedium herstellen (Angaben für 1 L): 10 g Pepton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
4 mL 50%iges Glycerin
1 mL MgSO₄
pH-Wert auf 7,5 einstellen (NaOH)
- in zwei 250-mL-Erlenmeyerkolben je 100 mL Expressionsmedium füllen
- vom restlichen Medium in 2 Epruvetten je 5 mL aliquotieren (Dispenser bei Betreuer/in erhältlich)
- zusätzlich 1 Epruvette mit ca. 15-20 mL Medium als Blank für die OD₆₀₀-Messung bzw. als Reserve für nicht angewachsene Übernachtskulturen befüllen
- Epruvetten mit Metallkappen verschließen, in Korb oder Becherglas stellen, mit Alufolie (EB) abdecken
- alles autoklavieren
- auf RT lagern
- die Ihnen zugewiesenen zwei *E. coli*-DFR-Klone entnehmen

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

- bei 37 °C und 200 rpm über Nacht inkubieren

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

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

- 100 µL IPTG-Lösung (1 mM Endkonzentration) hinzufügen. IPTG wieder in GS zurückstellen.

- bei 28 °C und 160 rpm für 3 h inkubieren
- finale Zelldichte (OD₆₀₀) bestimmen (1:10 verdünnt)
- Volumen ermitteln, das benötigt wird, um eine rechnerische Zelldichte von OD₆₀₀ = 12 zu erhalten (z.B. bei einer OD₆₀₀ der 1:10-Verdünnung von 0,2 beträgt das Volumen 12 : 2 = 6 mL)
- das jeweilige Volumen in mehreren Schritten in 2-mL-RG überführen und zentrifugieren: 14000 x g, 4 °C, 3 min (2 RG je Probe, **je 1 davon bleibt als Reserve (=> liqu. N₂) und wird nicht weiterverwendet, außer Sie müssen das Beispiel wiederholen!**)
- Überstände verwerfen
- Zwei Pellets (je 1 Pellet pro Probe) weiterverwenden oder bis zum Zellaufschluss zwischenlagern (liqu. N₂).

2 Zellaufschluss

Lösungen: Lysispuffer (50 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.0) (KS)
10 mg/mL Lysozym*
1 M MgCl₂ (EB)
1 mg/mL DNase-Lösung: (GS)

Durchführung:

- Zwei tiefgefrorene Zellpellets (je 1 Pellet pro Probe. **Reserve-Pellets nicht aufschließen!**) auf Eis mit 230 µl Lysispuffer und 50 µl Lysozymlösung (1 RG/Gruppe) vollständig (kann mehrere Minuten dauern) resuspendieren (mit der Pipette; Schaumbildung möglichst vermeiden)
- restliches Lysozym verwerfen
- 45 min auf Eis inkubieren und alle 15 min resuspendieren (Pipette)
- 5 µL MgCl₂-Lösung zugeben und resuspendieren (Pipette)
- 10 µL DNase-Lösung zugeben, resuspendieren (Pipette)
- ca. 20 min auf Eis inkubieren
- zentrifugieren: 14000 x g, 4 °C, 10 min
- Überstand weiterverwenden
- 2 mal 10 µL jeder Probe in ein LT überführen und bei +4 °C für den Western Blot aufbewahren
- Rest für Affinitätschromatographie einsetzen

3 Affinitätschromatographie im Batch Verfahren

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

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

Durchführung:

- GSB äquilibrieren (1 GSB-Aliquot pro Zellaufschluss): die in 1 mL Lysispuffer gelagerten GSB zentrifugieren (500 x g, 5 min, 4 °C)
- Überstand vorsichtig mit der Pipette abziehen und verwerfen
- nachfolgende Schritte 3 x durchführen: 1 mL Lysispuffer zugeben und durch schwaches (ca. Stufe 2-3) Schütteln resuspendieren, zentrifugieren (500 x g, 5 min, 4 °C) und Überstand vorsichtig mit der Pipette abziehen und verwerfen
- Bindung der GST-DFR-Fusionsproteine an die GSB: Überstand vom Zellaufschluss (Pkt. 2) auf die äquilibrierten GSB geben und durch schwaches (ca. Stufe 2-3) Schütteln resuspendieren
- jedes Proben-RG in ein mit Eis gefülltes, 50-mL-RG geben
- im Überkopfschüttler 30 min inkubieren
- RGs zentrifugieren: 500 x g, 5 min, 4 °C
- Überstand verwerfen
- GSB waschen (nachfolgende Schritte 3 x durchführen): 1 mL Lysispuffer zugeben und durch schwaches (ca. Stufe 2-3) Schütteln resuspendieren, zentrifugieren (500 x g, 5 min, 4 °C) und den Überstand verwerfen
- Kompetitive Elution der GST-DFR-Fusionsproteine von den GSB mit Hilfe von Glutathion: 1 RG (500 µl) Elutionspuffer (Betreuer/in) auftauen. Zu den GSB 80 µL Elutionspuffer geben und durch schwaches (ca. Stufe 2-3) Schütteln resuspendieren
- 5 min auf Eis inkubieren
- zentrifugieren: 500 x g, 5 min, 4 °C
- Überstand in ein LT überführen
- Elutionsschritte 2 x wiederholen und die Überstände in die jeweiligen LT überführen
- restlichen Elutionspuffer verwerfen
- 2 mal 10 µL jeder Probe in ein LT überführen und auf +4 °C für den Western Blotaufbewahren
- Restliches Probenmaterial für die Größenausschlusschromatographie verwenden
- GSB regenerieren (nachfolgende Schritte 3 x durchführen): 1 mL Lysispuffer zugeben und durch schwaches (ca. Stufe 2-3) Schütteln resuspendieren, zentrifugieren (500 x g, 5 min, 4 °C) und den Überstand vorsichtig mit der Pipette abziehen und verwerfen; Lysispuffer nach dem letzten Regenerieren nicht mehr abpipettieren
- regenerierte GSB auf Eis oder im Kühlschrank zwischenlagern und zum Aktivitätstest (TEIL B) ins Isotopenlabor mitnehmen!

4 Größenausschlusschromatographie (Gelchromatographie)

Lösungen: Lagerungspuffer (100 mM KPi, 200 mM NaCl, pH 6.2) (KS)

Materialien: Sephadex G-25 medium Säulchen (KS)
Ständer/Halterung für Sephadex G-25 medium Säulchen (EB)
LT (BT)

Durchführung:

- ein Sephadex Säulchen pro Proteinprobe in den Säulchenständer geben und äquilibrieren: 3 x 1 mL Lagerungspuffer auf die Säule pipettieren und durchfließen lassen
- Durchfluss verwerfen
- Proteinproben (Eluate aus Pkt. 2; je ca. 200 – 240 μ L) auftragen
- Durchfluss verwerfen
- warten bis die überstehende Lösung in das Säulenbett gewandert ist
- LT unter die Säule geben
- mit 300 μ L Lagerungspuffer eluieren
- alle Proteinproben auf 4 °C lagern und für die Aktivitätstests verwenden
- gebrauchte Säulchen verwerfen

TEIL B: Bestimmung der Substratspezifität

5. Aktivitätstest

=>Isotopenlabor, Bauteil BZ, 3. Stock: Proteinproben und regenerierte GSB auf Eis mitbringen

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

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

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

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

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

DHK- und DHQ-Reaktionen:

- Reaktion durch Zugabe von 10 μL Eisessig stoppen
- 70 μL Ethylacetat zugeben
- ca. 5 sec schütteln
- zentrifugieren: 3 min bei 14000 x g
- obere (organische) Phase in ein frisches Reaktionsgefäß pipettieren
- die organischen Phasen der Reaktionen von DHK und DHQ werden auf Cellulose-Dünnschichtplatten aufgetragen
- DHK- und DHQ-Standards ebenfalls auftragen

DHM-Reaktionen:

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

6. Auswertung

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

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

8. Western Blot

Lösungen: Anodenpuffer I (25 mM Tris/HCl, 20 % (v/v) Methanol, pH 10,4) (KS)
Anodenpuffer II (300 mM Tris/HCl, 20 % (v/v) Methanol, pH 10,4) (KS)
Kathodenpuffer (25 mM Tris/HCl, 40 mM 6-Aminocaprinsäure, 20 % (v/v) Methanol, pH 9,4) (KS)

Materialien: zugeschnittene PVDF-Membran*
Whatman Filterpapier (EB)

Geräte: Semi-Dry-Blotter*

Durchführung:

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

9. Western Blot Analyse

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

Materialien: Magermilchpulver (EB)

Geräte: ChemiDoc Imager (Bio-Rad)

Durchführung:

- der/die erste Teilnehmer/in stellt 500 mL 10x PBS her (bei Bedarf weitere 500 mL herstellen)

- der/die erste Teilnehmer/in stellt aus 250 mL 10x PBS durch Zugabe von Tween 20 10x PBS-T her (bei Bedarf weitere 250 mL herstellen)
- Reaktivieren der Membran durch Schwenken in Methanol für 10 - 15 s
- Equilibrieren der Membran durch Schwenken in 1x PBS für 5 - 10 min
- Membran in 5 % Magermilchpulver (in 1x PBS) für 1 h bei RT blockieren
- Membran weiterverwenden oder über Nacht in der Blockierungslösung aufbewahren
- Membran zweimal mit ca. 20 mL 1x PBS-T für 5 - 10 min waschen
- Membran in 4 mL der ersten AK-Lösung bei RT für 1 h schwenken
- Die AK-Lösung **möglichst vollständig** in ein 15-mL-RG rückführen und bei 4 °C zur Wiederverwendung aufbewahren.
- Membran dreimal mit ca. 20 mL 1x PBS-T für 5 - 10 min waschen
- Membran in 4 mL der zweiten AK-Lösung bei RT für 1 h schwenken
- Die AK-Lösung **möglichst vollständig** in ein 15-mL-RG rückführen und bei 4 °C zur Wiederverwendung aufbewahren.
- Membran zweimal mit ca. 20 mL 1x PBS-T für 5 - 10 min waschen
- Membran zweimal mit ca. 20 mL 1x PBS für 5 - 10 min waschen
- PBS sorgfältig entfernen
- je 1 mL von den beiden SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substraten auf die Membrane geben (darauf achten, dass die Membran bis zur Detektion mit dem Substrat überzogen bleibt)
- Detektion am ChemiDoc Imager (dazu Betreuer/in kontaktieren)
- "Blot", "Chemic highest sensitivity", "signal accumulation mode 1- 30s, 30 images" auswählen
- auf "Position gel" klicken, die Position des Gels ev. ausrichten, ev. zoomen
- auf "Run protocol" klicken
- Daten speichern unter "Transfer" / "LU BMB" / "2021" / "Übung 5"

10. Abgabe der Ergebnisse

Laden Sie die Ergebnisse termingerecht **als pdf-Datei** auf die Plattform TUWEL hoch:

1. Name, ggf. Gruppennummer, Matrikelnummer, Datum
2. OD der Kulturen zum Zeitpunkt der IPTG Zugabe und finale OD
3. Relative Umsatzraten der beiden Enzyme (18 Werte)
4. Davon Auswahl aussagekräftiger Ergebnisse/Umsatzraten treffen (6 Werte).
5. Interpretation: Bewirkt die Mutation eine/keine Änderung der Substratspezifität der DFR. Wenn ja, welche? Auf welche Aminosäuren würden Sie das zurückführen?
6. Beschriftete Bilder des gefärbten Gels und der Western Blot Analyse.
7. Einschätzung des Erfolges der Proteinexpression.