

## Quantitativer Enzymtest mit Alkoholdehydrogenase (ADH) aus *D. melanogaster*

ADH ist für den Abbau und die Entgiftung des durch die Nahrung aufgenommenen Alkohols zuständig und gehört in *D. melanogaster* zu den höchstexprimierten Genen. Dies ist durch die Lebens- und Ernährungsweise der Fruchtfliege (gärendes und faulendes Obst) und die damit einhergehenden Mengen an aufgenommenen und abzubauenen Alkoholen zu erklären.

In der 3'UTR (*untranslated region*) des *Adh*-Gens verschiedener Fruchtfliegenarten wurde eine hochkonservierte 8-bp-Sequenz identifiziert, deren Anwesenheit einen Teil der posttranskriptionellen *Adh*-Genregulation erklärt. Dabei wurde festgestellt, dass eine Deletion ( $\Delta$ ) dieser 8-bp Sequenz zu einer durchschnittlichen Erhöhung der ADH-Aktivität um den Faktor 2 führt.

In natürlichen Populationen kommt ein Polymorphismus vor (Slow/Fast-Allele: ADH-S und ADH-F), der ebenfalls zu einer durchschnittlichen Verdopplung der Enzymaktivität führt. In diesem Fall liegt allerdings ein Aminosäureunterschied [Lysin (ADH-S) / Threonin (ADH-F)] im dritten Exon von *Adh* vor, der die Enzymaktivität verändert, während die o.g. 8-bp-Sequenz die Genaktivität durch eine Veränderung der Transkriptmenge variiert.

Die beobachteten Unterschiede im Phänotyp (Enzymaktivität) sind also in beiden Fällen gleich, die zugrunde liegenden genetischen Elemente unterliegen jedoch unterschiedlichen Formen der Selektion: der S/F Polymorphismus wird durch balancierte Selektion aufrecht erhalten, die Konservierung der 8-bp-Sequenz deutet dagegen darauf hin, dass deren Veränderung negativ selektiert wird. Experimente zeigen nämlich, dass die Deletion der 8-bp-Sequenz (ganz oder teilweise) auch zu einer Verlängerung der larvalen Entwicklungszeit führt. Dies zeigt insgesamt, dass natürliche Selektion in der Lage ist, zwischen alternativen Arten die Enzymaktivität zu erhöhen zu unterscheiden.

Im ersten Experiment werden wir Fliegen (*D. melanogaster*) untersuchen, die unterschiedliche Allele von *Adh* tragen. Bei ihrer Herstellung mittels transgener Methoden wurden dabei Fliegen als Ausgangspunkt verwendet, deren endogenes *Adh*-Gen inaktiviert ist. Somit beruht die Messung der enzymatischen Aktivität ausschließlich auf dem Vorhandensein und der Expression der experimentell in das Genom der Fliege integrierten Allele von *Adh*. Hierbei werden wir die Allele aller vier möglichen Kombinationen der jeweils zwei Polymorphismen untersuchen (*Adh-S*, *Adh-S- $\Delta$* , *Adh-F* und *Adh-F- $\Delta$* ) und ihre Enzymaktivität miteinander vergleichen.

## Experiment 1

### Proteinextraktion

1. Zu Beginn erhalten Sie auf Eis gelegte Fliegen (Proben A–F) in Eppendorfgefäßen. Halten Sie die Gefäße während der gesamten Extraktion so weit wie möglich auf Eis!
2. Pipettieren Sie nun in jedes Eppendorfgefäß 150  $\mu$ l des Puffers A.
3. Homogenisieren Sie die Fliegen mit einem Pistill. Mischen Sie das Homogenat durch leichtes Schwenken/Schütteln und inkubieren Sie die Proben für mindestens 20 Minuten auf Eis.
4. Zentrifugieren Sie die Proben bei 12000g für 15 Minuten.
5. Übertragen Sie den im Überstand befindlichen Proteinextrakt in ein neues, beschriftetes Eppendorfgefäß und halten Sie die Proben auf Eis.

### Photometrische Messung der Gesamtproteinmenge

Zur Messung der Proteinmenge werden wir den Lowry-Test verwenden. Dieser Test beruht auf einer Farbreaktion. Dabei bilden  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen mit den Peptidbindungen der Proteine einen quadratisch planaren, blauviolett Komplex. Nach Reduktion der Kupfer-Ionen durch bestimmte Aminosäurereste (vor allem Tyrosin und Tryptophan) dienen die entstandenen  $\text{Cu}^+$ -Ionen als Reduktionsmittel für im sog. Folin Ciocalteu-Phenol-Reagens (kurz: Folin-Phenol) enthaltene Molybdän- und Wolframat-Ionen. Dabei entsteht letztendlich Molybdänblau, dessen Intensität im Photometer bei 750 nm gemessen wird.

6. Bereiten Sie für die Standardkurve 6 Eppendorfgefäße mit den folgenden Verdünnungen bovines Serumalbumins (BSA) vor:

Beschriftung	Wasser ( µl)	0.5 mg/ml BSA (µl)	[Protein] mg/mg (relativ zu Proben)
0	200	0	0
5	195	5	0.25
10	190	10	0.50
15	185	15	0.75
20	180	20	1.00
25	175	25	1.25

7. Bereiten Sie für jede Ihrer 6 Proben (A-F) ein Eppendorfgefäß mit 190 µl Wasser und 10 µl des Proteinextraktes vor.
8. Fügen Sie zu jedem der 12 Reaktionsgefäße (Proben der Standardkurve und Proben A-F) 200 µl CTC-Lösung hinzu, mischen Sie die Lösung und inkubieren Sie die Proben für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Achtung: Nach Zugabe der CTC-Lösung sollten die Proben nicht mehr auf Eis stehen.
9. Fügen Sie 100 µl 20%iges Folin-Phenol hinzu, mischen Sie sofort die Lösung und lassen Sie sie für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen.
10. Messen Sie nun die Extinktion (750 nm) jeder Probe inklusive der Eichkurvenproben. Erstellen Sie eine Eichkurve und bestimmen Sie die Gesamtproteinkonzentrationen Ihrer Proben in der Einheit „mg/ml“. (Hinweis: die Formel kann mit einer linearen Regression in Excel oder R berechnet werden)

## Photometrische Messung der Enzymaktivität

Das uns interessierende Enzym ADH ist in der Lage, Alkohole zu dehydrogenieren und damit zu oxidieren. Primäre Alkohole werden dabei zu Aldehyden (alcoholus dehydrogenatus) umgesetzt, welche weiter oxidiert werden können zu Carbonsäuren. Sekundäre Alkohole oxidieren zu Ketonen, deren weitere Oxidation zur Säure nicht möglich ist. Wir verwenden als Substrat für die Oxidation Isopropanol (syn. 2-Propanol), das durch die Reaktion zu Aceton (syn. 2-Propanon) umgesetzt wird.

Als Coenzym/-substrat dient der Reaktion NAD<sup>+</sup> (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid), das im Gegenzug der Oxidation von Isopropanol selbst reduziert wird (zu NADH). Der Vorteil einer Kopplung des eigentlich zu messenden Reaktionsverlaufs von Isopropanol zu Aceton mit dem NAD<sup>+</sup>/NADH-System liegt darin, dass die Umsetzung von NAD<sup>+</sup> zu NADH einfach photometrisch mitverfolgt werden kann (Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 340 nm, dem zweiten, im Vergleich zu NAD<sup>+</sup> verschiedenen, Absorptionsmaximum von NADH).

11. Bereiten Sie für jede Ihrer Proben A-F eine Plastikkuvette vor, indem Sie 450 µl des ADH-Testpuffers hinein pipettieren.
12. Pipettieren Sie nun 50 µl des Proteinextraktes Ihrer ersten Probe in die Küvette, warten Sie eine Minute, bis die Lösung Raumtemperatur erreicht hat, und stecken Sie die Küvette in das Photometer. Messen Sie zu Beginn den Nullwert, und schreiben Sie im Folgenden den Extinktionswert [340 nm; auch optische Dichte (OD) Genannt] einer alle 10 Sekunden erfolgenden Messung auf, dies für insgesamt 2 Minuten.
13. Wiederholen Sie Schritt 12 für alle weiteren Proben.
14. Berechnen Sie die ADH-Aktivität jeder Probe in ADH-Einheiten

$$\text{ADH Einheiten} = (\text{OD-Einheiten pro Minute} / \text{mg\_Protein}) * 48$$

### Hinweise:

$$\text{mg\_Protein} = \text{mg/ml\_Protein} * 0.05 \text{ ml}$$

OD-Einheiten pro Minute kann mit einer linearen Regression in Excel oder R berechnet werden.

$$\text{schnelle Berechnung} = \text{OD}_{[120 \text{ Sek.}]} - \text{OD}_{[60 \text{ Sek.}]}$$

## Experiment 2

### **Qualitativer Enzymtest mit $\beta$ -Galaktosidase (Bgal)**

Das Gen *lacZ*, das für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase kodiert, ist bakteriellen Ursprungs, wird jedoch in der Molekularbiologie gerne als Reporter gen verwendet. Als solches kann man es durch transgene Methoden beispielsweise in das Genom von *D. melanogaster* einschleusen, um dessen Anwesenheit durch eine einfache Farbreaktion zu verifizieren. Hierbei wird dem Enzym als Substrat das farblose ONPG (o-Nitrophenyl- $\beta$ -D galactopyranosid) angeboten, von welchem hydrolytisch gelbgefärbtes o-Nitrophenol abgespalten wird.

### **Proteinextraktion und Bgal-Test**

1. Sie erhalten Eppendorfgefäße mit Fliegen (Proben B1-B6). Halten Sie die Proben so weit wie möglich auf Eis.
2. Pipettieren Sie 40  $\mu$ l des Puffers A in das Gefäß.
3. Homogenisieren Sie die Fliege möglichst vollständig mit einem Pistill.
4. Befüllen Sie für jede Probe ein 0,5ml-Eppendorfgefäß mit 25  $\mu$ l des Bgal-Testpuffers. Beschriften Sie die Gefäße!
5. Pipettieren Sie dann 25  $\mu$ l jeder Probe in das der Probe zugeordnete Eppendorfgefäß.
6. Verfolgen Sie im Verlauf der nächsten Stunde eine eventuell eintretende Gelbfärbung. Bestimmen Sie, welche Proben Bgal-positiv und welche Bgal-negativ sind.

### **Fliegen (*D. melanogaster*):**

A = ADH-null Fliegen (negative Kontrolle)

B = wild-typ Fliegen (positive Kontrolle)

C = *Adh-S* transgenische Fliegen

D = *Adh-S- $\Delta$*  transgenische Fliegen

E = *Adh-F* transgenische Fliegen

F = *Adh-F- $\Delta$*  transgenische Fliegen

B1 = wild-typ Fliegen (negative Kontrolle)

B2 = *Bgal* transgenische Fliegen (positive Kontrolle)

B3 = ????

B4 = ????

B5 = ????

B6 = ????

### **Verwendete Reagenzien:**

#### Puffer A

0,1 M Tris-HCl

1 mM EDTA

7 mM 2-Mercaptoethanol

#### ADH-Test-Puffer

Puffer A mit:

0,1 M Isopropanol

1,4 mM NAD<sup>+</sup>

#### CTC-Lösung

0,025 % Kupfersulfat

0,025 % Kaliumtartrat

2,5 % Natriumcarbonat

0,2 N NaOH

2,5 % SDS

#### Bgal-Test-Puffer

200 mM NaPO<sub>4</sub>

2 mM MgCl<sub>2</sub>

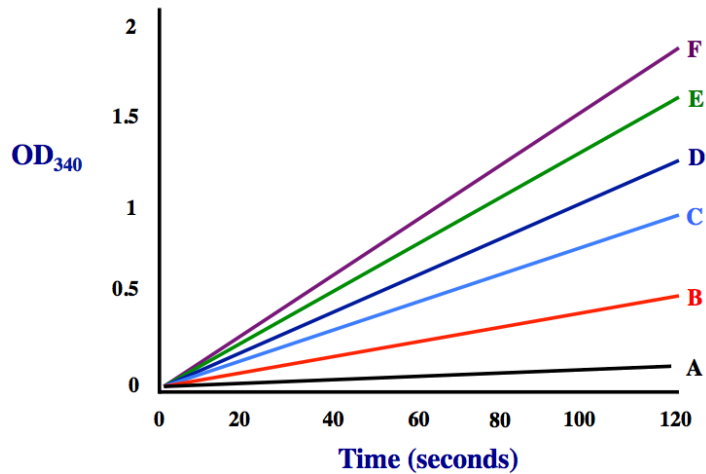
100 mM 2-Mercaptoethanol

1,33 mg/ml ONPG

**Für die Protokolle:**

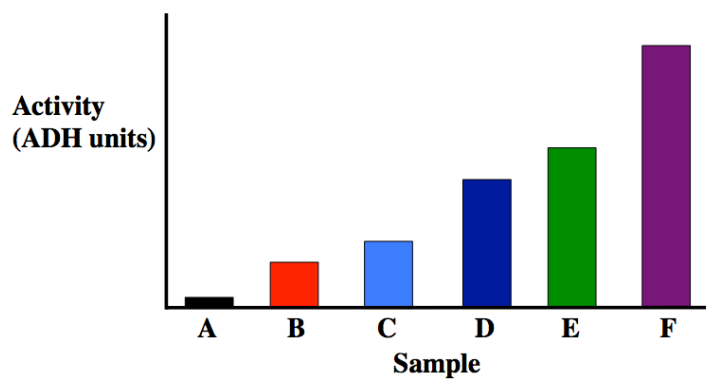
- 1) Tabelle: OD<sub>750</sub>-Werte der Standard-Proben und Proben A-F (Daten von Ihrer Gruppe)
- 2) Berechnung: Proteinkonzentration von Proben A-F in mg/ml
- 3) Diagramm: „Time course“ von Proben A-F

Beispiel



- 4) Berechnung: ADH-Aktivität von Proben A-F in ADH-Einheiten
- 5) Diagramm: ADH-Aktivität von Proben A-F in ADH-Einheiten

Beispiel



- 6) Tabelle: Bgal-Aktivität von Proben B1-B6

Beispiel

	Sample					
	B1	B2	B3	B4	B5	B6
Bgal Activity	-	+	?	?	?	?