



Doctoral Thesis

Teil 1: Einführung eines Anti-Frost-Proteingens in Pflanzen

Author(s):

Peterhans, Alexander

Publication Date:

1987

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000473100> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 8452

Teil I : EINFUEHRUNG EINES ANTI-FROST-PROTEINGENS IN PFLANZEN

Teil II: ETABLIERUNG VON TESTSYSTEMEN ZUR OPTIMIERUNG DER
PROTEINSEKRETION AUS HEFE

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

der

EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von

Alexander Peterhans

Dipl. Natw. ETH Zürich

geboren am 16. März 1959

von Fislisbach (Aargau)

Angenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. Klaus Mosbach, Referent

Prof. Dr. Ingo Potrykus, Korreferent

1987

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Einführung eines eukaryotischen Einzelgenes aus dem Winterflunder Pseudopleuronectes americanus, das für ein "Anti-Frost"-Protein (AFP) kodiert, welches für das Ueberleben des Fisches während den Wintermonaten essentiell ist, und das Verhalten dieses heterologen Proteines in Tabakpflanzen beschrieben. Dazu wurden Protoplasten steriler Sprosskulturen von Nicotiana tabacum cv. "Petit Havanna" SR1 mittels der Methode des direkten Gentransfers mit Plasmiden, die verschiedene Formen eines AFP-Genes aus dem Winterflunder unter Kontrolle von in pflanzlichen Systemen aktiven Expressionssignalen aus dem Cauliflower Mosaik Virus (CaMV; 35 S RNA Promotor und Transkriptionsterminator) enthalten, transformiert. Die Gentransfers wurden in sogenannten Co-Transformationsexperimenten durchgeführt. Dabei wurden Protoplasten jeweils zwei verschiedene Plasmide gleichzeitig offeriert. Eines enthielt die nicht-selektiven AFP-Gensequenzen, das andere das für Kanamycinresistenz kodierende Neomycin-PhosphotransferaseII-Gen aus E.coli ebenfalls unter Kontrolle von CaMV-Expressionssignalen. In ungefähr 50% aller Co-Transformanten wurde das vollständige AFP-Gen ins Genom integriert. In einigen davon regenerierten Tabakpflanzen konnte ebenfalls die zur AFP-Genprobe homologe mRNA (500±70 Basen) nachgewiesen werden. Jedoch in keinen der co-transformierten Pflanzen konnte mittels "Western blotting" und Immunnachweis die Expression des "Anti-Frost"-Proteines nachgewiesen werden. Um das Verhalten des heterologen AFPproteines in pflanzlichen Systemen weiter zu erforschen, wurde zusätzlich ein alternatives Gentransfersystem verwendet. Dazu wurden verschiedene Formen des AFP-Genes in das Genom des CaMV anstelle des für die Infektivität und die Vermehrung des CaMV nicht essentiellen GensII kloniert und die chimaere, virale DNA direkt dazu benutzt, ganze Rübsenpflanzen, Brassica rapa, cv. "Just Right", zu infizieren. Die chimaeren Viren, die das Fremdgen in der korrekten Orientierung relativ zu den viralen Genen enthielten, replizierten sich normal und breiteten sich systemisch über die ganze Wirtspflanze aus. Jedoch auch hier konnte in keinem Fall durch Western-Analyse und Immunnachweis Expression des "Anti-Frost"-Proteines nachgewiesen werden. Aus den vorliegenden Daten kann gefolgert werden, dass die AFPproteine in infizierten Rübsenpflanzen wohl produziert wurden, jedoch sehr instabil und/oder sehr anfällig für Degradation durch aktive, interne Proteinasen und daher mit dem hier verwendeten Analyseverfahren nicht nachweisbar waren. Ob die AFPproteine in trangen Tabakzellen synthetisiert werden oder nicht, darüber können zurzeit keine definitive Schlüsse gezogen werden.

Eine erste Voraussetzung für Experimente, die Hefesekretion entweder durch Selektion geeigneter Mutanten oder durch Hinzugeben von geeigneten Stimulatoren zu verbessern, ist die Verfügbarkeit von geeigneten Messsystemen, welche eine schnelle und zumindest semiquantitative Abschätzung der Menge eines von Hefe sekretierten Peptides erlauben. Um dieses Problem zu lösen,

wurden zwei verschiedene Wege eingeschlagen, nämlich: Die Entwicklung eines einfachen, billigen und direkten Sekretionsmesssystems für Hefe und die Entwicklung eines schnellen und einfachen modifizierten kompetitiven ELISA-Testsystems.

Ein direktes Sekretionsmesssystem wurde folgendermassen entwickelt. Hefezellen wurden mit einem Plasmid transformiert, das ein Hybridgen enthält, in welchem das N-terminale Genfragment der β -Galactosidase aus E.coli, genannt α -Peptid oder α -Donor, unmittelbar hinter die Prozessierungsstelle der Preprosequenz des α -"mating"-Faktors fusioniert wurde. Dies ermöglichte eine Freisetzung des α -Peptides ins zellfreie Kulturmedium. Die Menge an sekretiertem α -Peptid konnte direkt mittels der α -Komplementierungsreaktion der β -Galactosidase gemessen werden, wobei der dazu erforderliche α -Akzeptor aus einer E.coli lacZM15 Mutante stammte. Der Einfluss verschiedener Inhibitoren der Proteinglykosylierung und Glykoproteinprozessierung auf die von α -Faktor Promotor und Preprosequenz gesteuerte α -Peptidsekretion wurde ebenfalls untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die α -Peptidsekretion aus Hefe einerseits durch das Antibiotikum Tunicamycin vollständig abgeblockt wurde, andererseits durch Inhibitoren der Glucosidase-I-Reaktion (1-Deoxynojirimicin und Castanospermin) induziert wurde.

Immuntestsysteme mit Enzymmarker (ELISAs) sind ein häufig verwendetes Werkzeug in der klinischen und biochemischen Analyse geworden. Gewöhnlich erfordern kompetitive ELISA Experimente eine chemische Kopplung eines sehr reinen Markerenzymes an ein sehr reines Antigen, was die Methode relativ aufwendig und teuer macht; kommt hinzu, dass diese Kopplung derart erfolgen muss, dass weder die enzymatische Aktivität des Markerenzymes gehemmt, noch die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung gestört wird. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurde eine billige und einfache Alternative zur chemischen Kopplung von Markerenzymen an Proteinantigene für kompetitive ELISAs entwickelt, indem das Proteinantigen, in diesem Fall das menschliche $\alpha 2$ -Interferon, im richtigen Leseraster an das 5'-Ende der β -Galactosidase auf DNA-Ebene zu einem funktionsfähigen Antigen- β -Galactosidase-Hybridprotein fusioniert wurde. Die Expression eines korrekten Fusionsproteins in E.coli Zellextrakten wurde durch Western-Analyse mit polyklonalen anti- β -Galactosidase- und monoklonalen anti- $\alpha 2$ -Interferon-Antikörper bestätigt. Mit Hilfe von spezifisch gegen die N-terminale Region des $\alpha 2$ -Interferons gerichteten monoklonalen Antikörper und von das $\alpha 2$ -Interferon- β -Galactosidase-Hybridprotein enthaltenden zellfreien E.coli Proteinextrakten, wurde ein einfaches ELISA-Testsystem für das menschliche $\alpha 2$ -Interferon entwickelt. Das in der vorliegenden Arbeit beschriebene Testsystem war linear bis zu einer unteren Nachweisgrenze von 1000 Einheiten respektive 5 ng $\alpha 2$ -Interferon.

Summary

Transgenic tobacco plants containing DNA sequences encoding the alanine-rich antifreeze protein (AFP) from the winter flounder, Pseudopleuronectes americanus, fused to the strong cauliflower mosaic virus (CaMV) 35 S RNA promoter and transcription terminator were obtained by transforming protoplasts from Nicotiana tabaccum using the direct gene transfer method. Gene transfers were carried out in co-transformation experiments of non-selectable antifreeze protein gene and selectable kanamycin resistance gene offered to tobacco protoplasts as naked DNA on separate plasmids. After co-transformation in about 50% of the kanamycin resistant cell clones the whole antifreeze protein gene could be detected. A 500.70 bases RNA homologous to an AFP probe could be isolated from some engineered tobacco plants. However, in non of the co-transformed kanamycin resistant tobacco plants the presence of the antifreeze protein could be demonstrated by Western blotting. To explore the behavior of the antifreeze protein in plants further, an alternate approach for expressing this AFP in plants was tried where the cDNA sequence was inserted into the cauliflower mosaic virus genome and the chimeric viral DNA was used to infect turnip plants. Although a systemic infection was supported by this construct once again there was no evidence of antifreeze protein accumulation in the plant tissues. Since Western blotting followed by immunoreaction did not give evidence for the presence of the antifreeze protein in infected turnip plants, from these data can be supposed that the AFP is produced in turnip plants, but is very instable and/or susceptible to degradation and therefore not detectable with our detection system. No conclusions can be drawn at this time as whether the AFP is synthesized in the engineered tobacco cells.

A first prerequisite for any attempts to improve secretion from yeast by either selecting appropriate mutants or by adding suited stimulants to the medium is the availability of a simple assay system, which permits a rapid and at least semiquantitative estimation of the amount of a peptide secreted from yeast. We approached that problem in two ways, namely by developing a direct assay for secretion and by developing a rapid and simple standard competitive ELISA assay.

Any assay which permits a direct estimation of the extend of secretion would be of enormous help (I) to optimize culture conditions for secreted products, (II) to control continuous production and (III) to screen for high secretion mutants. We approached this problem by transforming Saccharomyces cerevisiae cells with a plasmid containing a hybrid gene, in which the sequences encoding the N-terminal peptide fragment of β -galactosidase (named α -peptide) was fused immediately downstream to a sequence encoding the leader region (prepro-segment) of the precursor of the yeast mating pheromone α -factor. The yeast cells processed the hybrid protein and secreted the α -peptide into the culture fluid. The amount of the secreted α -peptide could be

quantitatively assayed by mixing the culture fluid with extracts from lacZ M15 mutants of E.coli which resulted in restoration of the enzymatically active β -galactosidase tetramer in a process called α -complementation. The secretion of α -peptide was inhibited by tunicamycin. In contrast, secretion seemed to be rather stimulated in the presence of the glucosidase inhibitors castanospermine and 1-deoxynojirimycin.

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) are a common tool in clinical and biochemical analysis. This has led to the development of a wide spectrum of ELISA variants. However, they all require the covalent coupling of an enzyme to antigen or antibody by chemical means. This requires highly purified enzymes, antigens, or antibodies, thus rendering the essential reagents relatively expensive. Moreover, chemical coupling always bears the danger of generating artifacts. On the other hand, in frame fusions of peptide antigens with marker enzymes such as β -galactosidase in E.coli should be easily constructed. We therefore tested in a model system whether such fusions can be used for a competitive ELISA. For that purpose the N-terminal 461 bp of the human interferon- α 2 (INF) were fused in frame to the 5' end of the β -galactosidase gene from E.coli. The presence of the expected DNA sequence was shown by restriction mapping and DNA sequencing. A fusion protein was demonstrated in crude extracts of E.coli by Western blots using polyclonal anti- β -galactosidase and monoclonal anti-INF antibodies. Using monoclonal antibodies specific for the N-terminal region of INF- α 2 and cell-free extracts from an E.coli strain containing the fusion protein, we set up a simple competitive enzyme-linked immunosorbent assay for human interferon. The test described here was linear down to a lower detection limit of at least 1000 Units, or 5 ng human INF- α 2.