

**Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg**  
**Fakultät Life Sciences**

Topologiestudien der subtelomeric variant open reading frame (STEVOR) Proteine basierend  
auf einem zellfreien Expressionssystem  
Bachelorarbeit  
im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von  
Laura-Isabell Ehnold  
Matrikelnummer: XXXXXXXXXX  
Hamburg  
am 22. November 2017

**Gutachter :** Prof. Dr. Stephan Noll (HAW Hamburg)  
**Gutachter :** Dr. Susanne Witt (Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor der parasitären Molekularbiologie  
des Bernhard Nocht Institut für Tropenmedizin

„Unsere größte Schwäche liegt im Aufgeben. Der sicherste Weg  
zum Erfolg ist immer, es doch noch einmal zu versuchen“

Thomas Alva Edison

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>4</b>
<b>II. Abbildungs/Tabellenverzeichnis</b>	<b>5</b>
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	6
<b>1. Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1 Malaria	8
1.1.1 Der Malariaparasit <i>Plasmodium</i>	8
1.1.2 Zytoadhäsion	9
1.1.3 STEVOR Protein	10
1.1.4 Genexpression	12
1.1.5 Glykosylierungsmapping zur Studie von Topologien	13
1.2 Zielsetzung	14
1.2.1 Ziel der Studie	14
1.2.2 Vorgehen	14
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1 Material	16
2.1.1 Geräte und Materialien	16
2.1.2 Restriktionsenzyme	18
2.1.3 Antikörper	19
2.1.4 Bakterienstämme	19
2.1.5 Lösungen und Puffer	19
2.2 Methoden	21
2.2.1 Klonierung	21
2.2.2 Zielgerichtete Mutagenese	25
2.2.3 <i>in vitro</i> Transkription und Translation System	28
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>32</b>
3.1 Topologie Vorhersage	32
3.2 Klonierung	34
3.3 <i>in vitro</i> Transkription/Translation	40

<b>4. Diskussion</b>	<b>48</b>
4.1 Topologie Vorhersagen	48
4.2 Klonierung	48
4.3 Genexpression	49
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>52</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>53</b>
<b>Danksagung</b>	<b>55</b>
<b>III Anhang</b>	<b>56</b>
A. Primer	56
B. Sequenzen der <i>stevor</i> Gene	58
C. Vektor Konstrukte	61

## I. Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
Bp	Basenpaare
CIP	Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Endo H	Endoglycosidase H
kDa	Kilo Dalton
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEXEL	<i>Plasmodium</i> Export Element Muster
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>PfEMP1</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> erythrozyten membran Protein 1
RIFIN	repetitiven interspersed family of polypeptides
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SDS PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophorese
STEVOR	subtelomeric variant open reading frame
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TBST	Tris gepufferte Kochsalzlösung mit 0,005% Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamid
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure

## II. Abbildungs/Tabellenverzeichnis

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 01: Aufbau des STEVOR Proteins nach bisherigen Kenntnissen	11
Abbildung 02: Darstellung der Lokalisation und Membrantopologien der RIFIN und STEVOR Proteine	11
Abbildung 03: Struktur für die Klonierung des Systems der <i>stevor</i> Gene	15
Abbildung 04: Potentielle Sequenz-Motive der fünf <i>stevor</i> : PFF1550w, PFC1105w, PFL2610w, PFC0025c, PFB0955w	32
Abbildung 05: Abbildung 05: Topologiemotive, mögliche Topologiemodelle des STEVOR-Gen PFB09955w und die entsprechenden SDS Banden, die dem jeweiligen Glykosylierungsstatus entsprechen	34
Abbildung 06: Schematische Darstellung der Ergebnisse der Klonierung des PFF1550w Gens in einen Vektor mit T7 Promotor	35
Abbildung 07: Schematische Darstellung der Ergebnisse der Klonierung des PFB0955w Gens in einen Vektor mit T7 Promotor	36
Abbildung 08: Schematische Darstellung der Ergebnisse der Klonierung des PFF1550w, sowie des PFB0995w Gens in einen Vektor mit SP6 Promotor	37
Abbildung 09: Ergebnisse des Restiktionsverdaus der Insert DNA der Ligationen 101-104	38
Abbildung 10: Ergebnisse des Restiktionsverdaus der Insert DNA der Ligationen 105 und 106 sowie deren Vektor	38
Abbildung 11: Ergebnisse des Kontrollverdaus der Mini Präparationen der Ligationen 101 – 106	39
Abbildung 12: Western Blot des SDS Gels der zellfrei hergestellten Proteine PLE01-PLE04 mit und ohne Verwendung von Mikrosomen (72kDa)	41
Abbildung 13: Western Blot des SDS Gels der zellfrei hergestellten Proteine PLE05-PLE08 mit und ohne Verwendung von Mikrosomen (62kDa)	42
Abbildung 14: Western Blot des SDS Gels der zellfrei hergestellten Proteine PLE22-PLE23 mit und ohne Verwendung von Mikrosomen (72kDa)	43
Abbildung 15: Western Blot des SDS Gels der zellfrei hergestellten Proteine PLE11-PLE14 mit und ohne Verwendung von Mikrosomen (PLE11/12 46kDa, PLE13/14 36kDa)	44

Abbildung 16: Western Blot des SDS Gels der zellfrei hergestellten Proteine PLE01, PLE12, PLE05, PLE13 mit und ohne Verwendung von Mikrosomen und die Proteine PLE09 und PLE15 nur ohne Verwendung von Mikrosomen	45
Abbildung 17: Western Blot des SDS Gels der zellfrei hergestellten Proteine PLE18 – PLE25, wobei das PLE18 ohne und mit Mikrosomen aufgetragen ist, PLE19 – PLE25 nur ohne Mikrosomen aufgetragen ist	46
Abbildung 18: T7-Vektor System mit PFF1550w	61
Abbildung 19: SP6-Vektor System	62

### Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Labor Equipment	16
Tabelle 2: Materialien	17
Tabelle 3: Chemikalien	17
Tabelle 4: Kits	18
Tabelle 5: Software	18
Tabelle 6: Restriktionsenzyme	18
Tabelle 7: Antikörper	19
Tabelle 8: Bakterienstämme	19
Tabelle 9: Antibiotika	19
Tabelle 10: Tris-Borat-EDTA Puffer	19
Tabelle 11: 10x Transferpuffer	19
Tabelle 12: Gebrauchsfertiger Transferpuffer	19
Tabelle 13: Sammelgelpuffer	20
Tabelle 14: Trenngelpuffer	20
Tabelle 15: 10x Laufpuffer	20
Tabelle 16: 2x Laemmli Ladepuffer	20
Tabelle 17: TRIS gepufferte Kochsalzlösung	20
Tabelle 18: TRIS gepufferte Kochsalzlösung mit 0,005%Tween	20
Tabelle 19: Komponenten einer PCR Reaktion	21
Tabelle 20: PCR Temperatur Profil	21
Tabelle 21: Komponenten des Restriktionsverdau eines Inserts	22
Tabelle 22: Komponenten des Restriktionsverdau eines Vektors	22
Tabelle 23: Komponenten der Behandlung mit CIP	22

Tabelle 24: Komponenten der Ligation	23
Tabelle 25: Komponenten des Kontrollverdaus	24
Tabelle 26: Komponenten der ersten Mixtur der Mutagenese	26
Tabelle 27: Komponenten der zweiten Mixtur der Mutagenese	26
Tabelle 28: Temperaturprofil der Mutagenese 5 Zyklen	26
Tabelle 29: Temperaturprofil der Mutagenese 18 Zyklen	27
Tabelle 30: Komponenten der Mutagenese unter Verwendung von <i>Phusion</i>	27
Tabelle 31: Temperaturprofil unter Verwendung von <i>Phusion</i>	28
Tabelle 32: Komponenten des Kaninchen Retikulozyten Lysats	29
Tabelle 33: Ansatz für zwei 10%ige SDS Gele	30
Tabelle 34: Auflistung der Primer	56



# 1. Einleitung

## 1.1 Malaria

### 1.1.1 Der Malariaparasit *Plasmodium*

Malaria stellt eine große Bedrohung für die Weltgesundheit dar. Laut dem Welt-Malaria-Report 2016 der WHO gab es im Jahr 2015 212 Millionen neue Malariafälle, bei denen rund 429.000 Menschen ihr Leben verloren. Die häufigsten Opfer sind Kinder unter fünf Jahren (<http://www.who.int/malaria/publications/world-malariareport-2016/report/en/>). Malaria wird von Parasiten der Gattung *Plasmodium* ausgelöst. *Plasmodien* sind einzellige Eukaryoten. Es gibt fünf verschiedene Arten der *Plasmodien*, die im Menschen Malaria auslösen können. Zwei dieser *Plasmodienarten*, *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax*, können im Menschen eine lebensbedrohliche Form der Malaria verursachen. Die schwerste Form der Malaria wird von *Plasmodium falciparum* (Pf) hervorgerufen. Diese Art durchläuft, wie alle *Plasmodien*, einen komplexen Lebenszyklus. Der eigentliche Wirt von *Plasmodium falciparum* ist die *Anopheles* Mücke. Die Mücke fungiert dann als Überträger (Vektor) des Parasiten auf den Menschen, der als Zwischenwirt dient. Durch den Stich der weiblichen Mücke gelangt der Parasit in die Blutbahn des Menschen. Der Parasit wandert zunächst zur Leber und vermehrt sich dort asexuell. Im Anschluss gelangt der Parasit in den Blutstrom und dringt dort in die Erythrozyten ein. Innerhalb der roten Blutkörperchen vermehrt sich der Parasit erneut asexuell und infiziert immer neue Erythrozyten. Der Parasit wandelt sich in die geschlechtlichen männlichen und weiblichen Formen um, die dann beim nächsten Stich der *Anopheles* Mücke von dieser aufgenommen werden. In der Mücke findet dann die sexuelle Vermehrung des Parasiten statt. Während der Phase der asexuellen Vermehrung in den roten Blutkörperchen des Menschen sind die eigentlichen klinischen Symptome der Malaria zu beobachten. Während dieser Phase gelingt es dem Parasiten, sich der Bekämpfung durch das menschliche Immunsystem weitgehend zu entziehen. Der Parasit verursacht das Anheften der infizierten Erythrozyten an die Rezeptoren des Endothels, wodurch die Erythrozyten nicht weiter in der Blutbahn mitgeführt werden (Zur Übersicht siehe: Wahlgren et al., 2017). Dieser als Zytoadhäsion bezeichnete Prozess wird von Proteinen vermittelt, die der Parasit bildet und dann in die Membran des roten Blutkörperchens einschleust. So werden parasitäre Proteindomänen auf der Oberfläche der infizierten Erythrozyten präsentiert, die dann mit den humanen Epithelrezeptoren wechselwirken können. Einen wichtigen Beitrag zur

Zytoadhäsion leisten die subtelomeric variant open reading frame (STEVOR) Proteine, die von den entsprechenden *stevor* Genen kodiert werden.

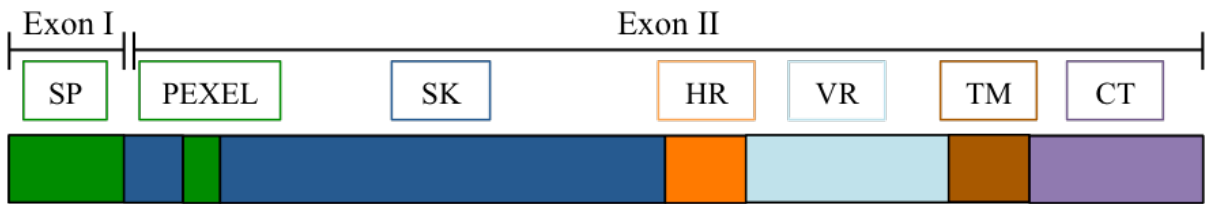
### 1.1.2 Zytoadhäsion

Neben den STEVOR Proteinen spielen auch die Proteinfamilien der *Plasmodium falciparum* Erythrozyten Membran Proteine 1 (*PfEMP1*), sowie der repetitive interspersed family of polypeptides (RIFINs) wichtige Rollen in der schweren Malaria. Es handelt sich bei allen drei Proteinfamilien um Membranproteine. Membranproteine zeichnen sich dadurch aus, dass sie mit der Membran assoziiert sind. Es wird zwischen peripheren Membranproteinen und integralen Membranproteinen unterschieden. Die peripheren Proteine sind an die Membranoberfläche gebunden, wohingegen integrale Membranproteine sich durch eine oder mehrere hydrophobe Transmembrandomänen auszeichnen, welche die Lipiddoppelschicht durchziehen. Wichtig für die Funktion von Transmembranproteinen ist ihre Topologie. Hierunter versteht man die Anzahl der im Protein enthaltenen Transmembrandomänen sowie die Lokalisation des N- und des C-Terminus relativ zur entsprechenden Membran (von Heijne, 2006). Alle oben vorgestellten Proteine (*PfEMP1*, STEVOR, RIFIN) werden auf der Oberfläche der befallenen Erythrozyten präsentiert. Beim Präsentieren zeigt der N-terminale Teil des Proteins in den extrazellulären Raum und kann mit den Rezeptoren des humanen Epithels wechselwirken. Diese Wechselwirkung führt zu Zytoadhäsion der befallenen Erythrozyten an das humane Epithel und an andere Erythrozyten (Rosetting) (zur Übersicht siehe: Yam et al., 2017). Durch die Zytoadhäsionen verbleiben die befallenen Erythrozyten in der Blutbahn und gelangen nicht zum Abbau in die Milz. Die Vermehrung des Parasiten im Erythrozyten bewirkt eine Veränderung von einer bikonkaven zu einer rundlicheren Form. Dies beeinflusst die Stabilität und die Permeabilität des Erythrozyten. Sobald eine kritische Anzahl an Erythrozyten an das humane Epithel oder andere Erythrozyten binden, kommt es zu einer Sauerstoff-Mangelversorgung im Gewebe. Dies führt zu einer starken Lactat Produktion, so dass der pH-Wert in Blut und Gewebe ansteigt. All diese Symptome können zu akuter Atemnot, Koma und schwerer Anämie führen. Während einer Schwangerschaft können die infizierten Erythrozyten an die Plazenta binden und so eine Anämie auslösen, die z.B. zu einem geringen Geburtsgewicht oder sogar zu einem Schwangerschaftsabbruch führen können (zur Übersicht siehe: Wahlgren et al., 2017).

### 1.1.3 STEVOR Protein

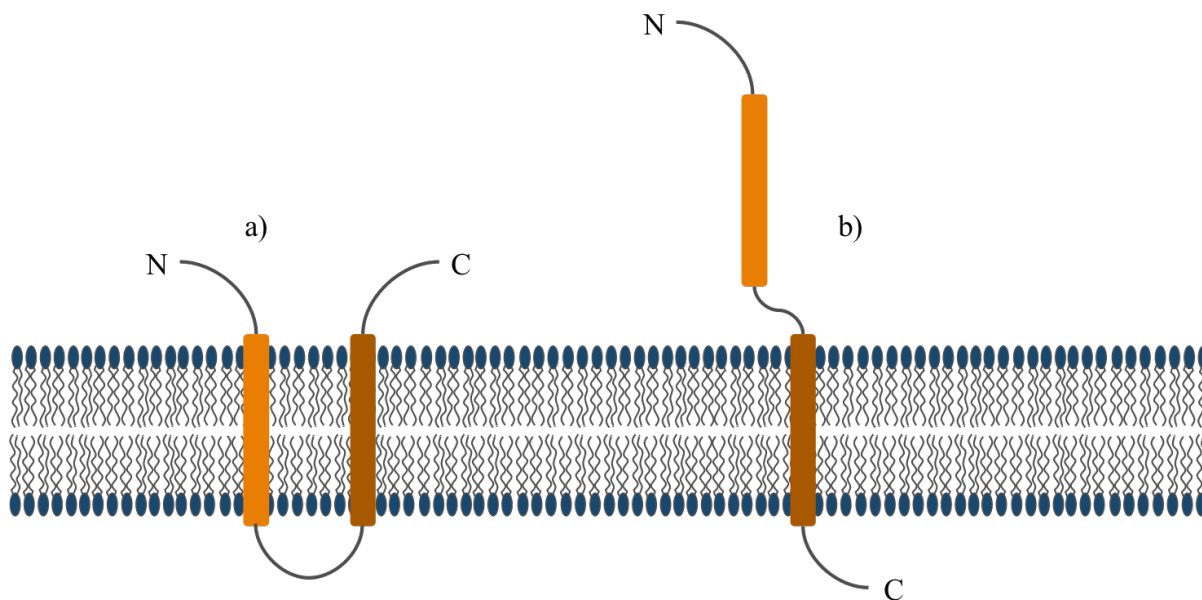
STEVOR Proteine spielen eine wichtige Rolle im Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*. Sie vermitteln vorrangig die Bindung von infizierten Erythrozyten an nicht infizierte Erythrozyten (Sanyal et al., 2012). Jedoch kommen sie nicht nur während der asexuellen Entwicklungsphase des Parasiten vor, sondern sind ebenso in den Gametozyten und in der sexuellen Entwicklung in der *Anopheles*-Mücke zu finden (Lavazec et al., 2007; McRobert et al., 2004).

STEVOR Proteine besitzen eine Größe von 30-40 kDa. *Stevor* Gene bestehen aus zwei Exonen. Das erste Exon ist relativ kurz (ca. 70 bp) und enthält das Startkodon und eine postulierte Signalsequenz. Das zweite Exon (ca. 840 bp) kodiert den Hauptteil des Proteins. Insgesamt besteht das Protein aus einer Signalsequenz, einem PEXEL-Motiv (*Plasmodium* Export Element), welches den Export der Proteine durch die Membran der parasitophoren Vakuole vermittelt (Hiller, 2004; Marti, 2004), einer semi-konservierten Region, einem hydrophoben Bereich, einer variablen Domäne, einer Transmembrandomäne und einem konservierten C-Terminus (Abbildung 1). Ursprünglich wurde aufgrund ihrer jeweiligen Primärsequenz für RIFIN- und STEVOR-Proteine die gleiche Topologie vorhergesagt. Dieses Topologiemodell ist charakterisiert durch eine von Transmembrandomänen umgebenen extrazellulär exponierten, hypervariablen Schleife (Cheng et al., 1998, Abbildung 2a). Dieses Modell wird gegenwärtig jedoch sowohl für die RIFINe als auch für die STEVORs in Frage gestellt (Bultrini et al., 2009; Joannin et al., 2008; Niang et al., 2009; Petter et al. 2008; Wahlgren et al., 2017). Kürzlich konnte für die RIFIN-Untergruppe A eine Ein-Transmembran-Topologie experimentell aufgezeigt werden (Bachmann et al., 2015; Wahlgren et al., 2017). Da für die semi-konservierte Region einiger STEVOR-Varianten experimentell gezeigt wurde, dass diese in den extrazellulären Raum ragt ist es wahrscheinlich, dass auch STEVOR Proteine eine Ein-Transmembran-Topologie (Abbildung 2b) annehmen (Bachmann et al., 2015; Niang et al., 2014; Niang et al., 2009). Gesicherte Topologie-Daten für die STEVOR-Familie fehlen jedoch bisher.



**Abbildung 01: Aufbau des STEVOR Proteins nach bisherigen Kenntnissen.**

Das Signalpeptid wird als SP in grün gekennzeichnet und gehört zum Exon I. Das PEXEL Motiv ist ebenso grün dargestellt und liegt in der semi-konservierten Region (SK). Die hydrophobe Region (HR) ist in orange gezeigt und die variable Domäne (VR) ist in hellblau zu sehen. Darauf folgt in braun die Transmembrandomäne (TM) und in lila dargestellt ist der konservierte C-Terminus (CT).



**Abbildung 02: Darstellung der beiden möglichen Topologien der STEVOR Proteine.**

Zu sehen ist die Lipiddoppelschicht, mit der hydrophoben Region (orange) und der Transmembrandomäne (braun). Das N und das C stehen für die entsprechende Termini des Proteins.

Abbildung a) zeigt die Möglichkeit der Topologie des Proteins nach Primärsequenzanalyse bei der die hydrophobe Region als zweite Transmembrandomäne fungiert (Cheng et al., 1998).

Abbildung b) zeigt eine Topologie bei der die hydrophobe Region in den extrazellulären Raum ragt (Bachmann et al., 2015; Niang et al., 2014; Niang et al., 2009).

### 1.1.4 Genexpression

Als Genexpression bezeichnet man den Vorgang, bei dem die in der DNA gespeicherte genetische Information in Proteine oder bestimmte RNAs umgesetzt wird. Sollte das Genprodukt ein Protein sein, besteht sie aus zwei Schritten. Im ersten Schritt wird die DNA-Sequenz in eine RNA-Sequenz umgeschrieben. Diesen Vorgang bezeichnet man als Transkription. Die erstellte mRNA wird im zweiten Schritt, der Translation, an den Ribosomen in eine Aminosäuresequenz übersetzt. Normalerweise findet dieser Vorgang in der Zelle statt.

Die Expression von Genen ist zellfrei möglich, da zur Biosynthese von mRNA und Proteinen nicht die Integrität einer lebenden Zelle benötigt wird. So kann auch der Transkriptions- und Translationsapparat einer lysierten Zelle verwendet werden. Die verwendeten Vektoren müssen einen geeigneten Promoter enthalten, der durch die korrespondierende RNA-Polymerase erkannt werden kann. Im vorliegenden Fall werden die T7-RNA Polymerase und die SP6-RNA Polymerase verwendet und dem Lysat zugesetzt. Beide Polymerasen stammen aus einem Bakteriophagen (Phage T7 bzw. SP6) und sind unabhängig vom verwendeten Zelllysate aktiv. So kann ganz gezielt nur das Gen, das unter der Kontrolle des T7 bzw. SP6 Promoters steht, zu mRNA transkribiert werden und daher wird nur das Wunschprotein in der folgenden Translation hergestellt (Vektoraufbau siehe Anhang). Für die Translation in einem zellfreien, eukaryotischen System muss stromabwärts vom Promotor eine geeignete Kozak Sequenz vorhanden sein. Danach kann weiter stromabwärts das zu exprimierende Gen eingefügt werden, gefolgt von einem Stop-Transfer Motiv und einem Poly-A-Schwanz (A<sub>30</sub>). Da zellfrei gearbeitet wird, muss der Expressionsvektor Elemente enthalten, die sich positiv auf die Effizienz von Transkription und Translation auswirken. Um dies zu gewährleisten, werden diese beide Motive eingefügt und sind für eine optimale Ribosomenbindung wichtig. In der intakten Zelle finden auch posttranslationale Modifikationen statt, z.B die Glykosylierung. Wichtig für die Glykosylierung des Proteins ist das Vorhandensein des rauen endoplasmatischen Retikulums. Dies kann durch Mikrosomen zellfrei imitiert werden.

### 1.1.5 Glykosylierungsmapping zur Studie von Topologien

Die membrangebundenen Ribosomen des rauen Endoplasmatischen Retikulums bilden Proteine, die von der Zelle nach außen abgegeben werden. Im Inneren des rauen ERs wird neben der Translation der Proteine auch die Glykosylierung der Proteine vorgenommen (Brooks, 2006). Die Oligosaccharyl-Transferase, die im Inneren des ERs sitzt, erkennt bestimmte Sequenzmotive (NXT, NXS) und glykosyliert das Protein an dieser Stelle. Dieses Anhängen von Oligosacchariden wird als post-translationelle Modifikation des Proteins bezeichnet und hat Auswirkungen auf die Stabilität des Proteins (Brooks, 2006).

Die Glykosylierung machen wir uns zu Nutze, um die Topologie der STEVOR Proteine zu studieren. Die Glykosylierung des Proteins führt zu einem Anstieg der Größe des Proteins um 2-3 kDa, welche dann im Blot sichtbar wird. Dieser Größenunterschied lässt sich durch Polyacrylamid Elektrophorese detektieren. Um den Effekt der Glykosylierung in unserem Expressionssystem zu nutzen, werden Mikrosomen verwendet (van Geest & Lolkema, 2000). Bei den Mikrosomen handelt es sich um Membranbruchstücke aus dem rauen ER, welche meist aus dem Hundepankreas gewonnen und anschließend aufgereinigt werden. Durch diese Membranstücke werden alle notwendigen Faktoren für die Glykosylierung der Proteine eingefügt.

Es gibt zahlreiche Veröffentlichungen, in denen dieses System zur Untersuchung von Topologien von Membranproteinen verwendet wird. Dabei zeigte sich, dass ein gewisser Längenabstand der Glykosylierungsmotive zur Membran nötig ist, damit es zur Glykosylierung kommen kann (van Geest & Lolkema, 2000). Um dies zu gewährleisten, sind N- und C-terminale Sonden beschrieben, in die die Glykosylierungsmotive eingefügt werden können. Bei den Sonden am N- und am C-Terminus handelt es sich um ProW bzw. LepP2. ProW ist ein *E. coli* Protein, welches aus 7 Transmembrandomänen besteht. Es hat einen ca. 100 Aminosäuren langen N-terminus, der durch die innere *E. coli* Membran transloziert wird und sich daher im Periplasma der *E. coli* Zelle befindet. Studien zeigten, dass mit dem Einfügen eines zweiten *E. coli* Protein am C-terminus die Translokation deutlich effizienter wird. Hierzu wurde die leader peptidase P2 (LepP2) verwendet (Nilsson, Witt, Kiefer, Mingarro & Von Heijne, 2000).

Jede Glykosylierung, ob nativ oder konstruiert, führt zu einer Erhöhung des Molekulargewichtes der jeweiligen Proteine. Liegen die Glykosylierungsstellen auf der Lumenseite der mikrosomalen Membran, können sie nachgewiesen werden.

## 1.2 Zielsetzung

### 1.2.1 Ziel der Studie

Die am besten erforschten parasitären *Plasmodium falciparum* Proteine, welche an der Zytoadhäsion beteiligt sind, sind die PfEMP1. Obwohl STEVOR Proteine wie PfEMP1 in den Prozess der Zytoadhäsion involviert sind und damit wahrscheinlich auch zum klinischen Krankheitsbild der Malaria beitragen, ist unser Wissen zur exakten Funktion und Struktur der STEVOR Proteine noch lückenhaft. Das Ziel dieses Projektes ist es, die Topologien der STEVOR-Proteine in einem *in vitro* Transkriptions-/Translationssystem in Anwesenheit und Abwesenheit von Mikrosomen zu studieren.

### 1.2.2 Vorgehen

In dieser Studie wird mit fünf Proteinen der STEVOR Familie gearbeitet: PFF1550w, PFB0955w, PFC0025c, PFC1105w und PFL1260w.

Zunächst werden für die Topologie entscheidende Sequenzmotive, wie Signalpeptide, hydrophobe Regionen bzw. Transmembrandomänen und Stop-Transfer Motive, durch entsprechende Vorhersageprogramme *in silico* bestimmt. Die Topologien, die sich aus diesen Vorhersagen ergeben, müssen dann experimentell überprüft werden. Dazu wird in dieser Arbeit ein zellfreies *in vitro* Expressionssystem verwendet.

Um die beschriebenen Topologiestudien durchführen zu können, müssen die *stevor* Gene zunächst in geeignete Vektoren kloniert werden, die die zellfreie Expression ermöglichen. Die verwendeten Expressionsvektoren des *stevor* Gens werden so modifiziert, dass am N-Terminus und am C-Terminus der entsprechenden STEVOR Proteine je eine Proteinsonde angehängt wird (Abbildung 3). Diese Sonden enthalten dann die Sequenzmotive, die glykosyliert werden können. Durch Mutagenese können diese Sequenzmotive entfernt bzw. an anderer Stelle eingefügt werden, um die Lage und die Anzahl der potentiellen Glykosylierungsstellen definiert zu variieren. Durch Veränderungen der Proteinsonden (kürzen, entfernen) soll die effizienteste Variante entwickelt werden, die Proteine im *in vitro* System herzustellen. Eine Übersicht der Grundstruktur des Expressionssystems ist in Abbildung 03 zu sehen. Um diese Veränderungen leicht durchführen zu können, werden in den Vektorsystemen zusätzliche Restriktionsschnittstellen eingefügt, die die gezielte Manipulation auf DNA Ebene ermöglichen.



**Abbildung 03: Struktur für die Klonierung des Systems der *stevor* Gene.**

Das Protein codierende Sequenz Stück ist rot dargestellt. Die Sonde am N-terminus ProW ist blau und die Sonde am C-terminus LepP2 ist grün dargestellt. Zusehen sind neben den Restriktionsschnittstellen auch die Kozak-Sequenz, der A<sub>30</sub> Schwanz und der verwendete Promotor. Die in den Sonden durch Mutagenese eingefügten Glykosylierungsstellen sind durch ein rotes Y dargestellt.

Die diversen Fusionsproteine werden in einem zellfreien *in vitro* System der Firma Promega hergestellt. Es handelt sich hierbei um Kaninchen Retikulozyten Lysat. Die Topologiestudien werden in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Mikrosomen durchgeführt. Nur in Anwesenheit der Mikrosomen sind die entsprechenden Faktoren im Ansatz vorhanden, die das Glykosylieren des entsprechenden Sequenzmotives ermöglichen, wenn dieses Motiv sich entsprechend der Topologie auf der luminalen Seite der Mikrosomen befindet. In dem Fall kann dann der Größenunterschied der glykosylierten (in Gegenwart von Mikrosomen) und der nicht modifizierten Proteine, die in der Abwesenheit von Mikrosomen hergestellt worden sind, detektiert werden. Wenn sich die Sequenzmotive aufgrund der Topologie des zu untersuchenden Proteins nicht auf der luminalen Seite der Mikrosomen befinden, erfolgt keine Glykosylierung und es ist kein Größenunterschied detektierbar (van Geest & Lolkema, 2000). Für eine Detektion der Proteine auf einem späteren Western Blot werden biotinylierte Lysine in Form von tRNA hinzugegeben, um dann in das Protein eingebaut zu werden. Der Western Blot kann dann mit Streptavidin behandelt werden, was zu einer Bindung mit dem Biotin in den Proteinen führt und so durch Chemilumineszenz angeregt wird. So können aus dem Nachweis, welche Stellen im Protein glykosyliert werden können und welche nicht, Rückschlüsse gezogen werden auf welcher Seite der Membran sich dieser Teil des Proteins befindet. Somit kann die Topologie des Proteins experimentell nachgewiesen werden.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Materialien

Tabelle 1: Labor Equipment

Labor Equipment	Firma
Avanti J-26 XP Zentrifuge	Beckman Coulter, Brea, USA
Bottle Assembly, 250 ml	Beckman Coulter, Brea, USA
Zentrifuge 5424R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
ChemiDoc Touch Imaging System	Bio Rad, USA
Gelsystem Midi	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Heiz-und Trockenofen	Hereaus, Deutschland
IKAMAG Magnetrührer RCT	IKA, Staufen, Deutschland
Inkubator Lovibond	Tintometer, Deutschland
Inkubator shaker Innova 4400	New Brunswick Scientific, Hamburg, Deutschland
JA-14 Rotor	Beckman Coulter, Brea, USA
Megafuge 1.0R	Hereaus, Deutschland
Milli-Q Wasser System	Millipore, Billerica, USA
Mini MicroZentrifuge	Biozym, Deutschland
NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, USA
Power Pac Universal	Bio Rad, USA
Primus 25 Thermocycler	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Rotor FA-45-24-11	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermomixer C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio Rad, USA
Vakuumpumpe	GAST, UK
Vortexer	IKA, Staufen, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland

Tabelle 2: Materialien

Material	Firma
Biosphere ® Filter Tip 10,100,1000	Sarstedt, Deutschland
Costar ® Corning ® Stripette 5ml, 10ml, 25ml	Merck, USA
Falcon Tubes 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Deutschland
Gel Kassetten 1.0mm	Thermo Fisher Scientific, USA
Impfösen blau, gelb	Simport™ Scientific
Nitrocellulose Membrane 2µm	GE Healthcare, UK
PCR reaction tubes	Sarstedt, Deutschland
Reaction Cups 1.5 ml	Sarstedt, Deutschland

Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalien	Firma
Acrylamide-Solution (30%) 37,5:1	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ampicilin Natriumsalz	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, USA
Clarity Western ECL Blotting Substrat	Bio Rad, USA
Gene Ruler, 1 kb, DNA ladder	Thermo Fisher Scientific, USA
Color Prestained Protein Standard, broad Range	New England BioLabs, UK
DTT	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glycine	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
LB-Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Mikrosomen	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
SDS	MP Biomedicals, USA
TEMED	Sigma Aldrich, USA
TRIS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TWEEN ® 20	Sigma Aldrich, USA

Transcendend tRNA	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Whatmanpaper	GE Healthcare, UK

Tabelle 4: Kits

Name des Kits	Firma
DNA Ligation Kit Mighty Mix	TaKaRa, USA
Nucleo Bond, Xtra Midi	Macherey-Nagel, Deutschland
Nucleo Spin Plasmid	Macherey-Nagel, Deutschland
Nucleospin Gel and PCR Clean up	Macherey-Nagel, Deutschland
Phusion DNA Polymerase and PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, USA
Quick Change II XL, Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, USA
TnT Coupled Reticulocyte Lysate Systems	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland

Tabelle 5: Software

Software	Firma
Gel Doc	Bio Rad, USA
Image Lab	Bio Rad, USA
MacVector	MacVector, USA
Nano Drop 2000/2000c software	Thermo Fisher Scientific, USA

### 2.1.2 Restriktionsenzyme

Tabelle 6: Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme	Firma
AflII	New England BioLabs, UK
BamHI	New England BioLabs, UK
CutSmart (10x) buffer	New England BioLabs, UK
Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)	New England BioLabs, UK
DpnI	New England BioLabs, UK
KpnI	New England BioLabs, UK
MluI	New England BioLabs, UK
NcoI	New England BioLabs, UK
SmaI	New England BioLabs, UK
XbaI	New England BioLabs, UK

## 2.1.3 Antikörper

Tabelle 7: Antikörper

Antikörper	Firma
Streptavidin HRP	Thermo Fisher Scientific, USA

## 2.1.4 Bakterienstämme

Tabelle 8: Bakterienstämme

Bakterienstrang	Genotyp	Firma
TOP10	F- <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74 recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara leu</i> ) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i>	Thermo Scientific, USA

## 2.1.5 Lösungen und Puffer

Tabelle 9: Antibiotika

Reagenz	Konzentration	Lösungsmittel
Ampicillin	100 $\mu$ g/ml	ddH <sub>2</sub> O

Tabelle 10: Tris-Borat-EDTA Puffer

TBE Puffer, pH 8,0	
10,8 g/L	TRIS
5,5 g/L	Borsäure
0,7 g/L	EDTA

Tabelle 11: 10x Transferpuffer

10x Transferpuffer, pH 8,3	
144,12 g/L	autoklaviert
30,3 g/L	Glycine
3,7 g/L	TRIS
	SDS

Tabelle 12: Gebrauchsfertiger Transferpuffer

1x Transferpuffer Gebrauchslösung	
10%	10x Transferpuffer
20%	Methanol

Tabelle 13: Sammelgelpuffer

Sammelgel 4xTRIS/SDS, pH 6,8	sterilfiltriert, Lagerung 4°C
60,5 g/L	TRIS
4 g/L	SDS

Tabelle 14: Trenngelpuffer

Trenngel TRIS/SDS, pH 8,8	sterilfiltriert, Lagerung 4°C
303 g/L	TRIS
6,6 g/L	SDS

Tabelle 15: 10x Laufpuffer

10x Laufpuffer, pH 8,3	autoklaviert
30,3 g/L	TRIS
144,4 g/L	Glycine
10 g/L	SDS

Tabelle 16: 2x Laemmli Ladepuffer

2x Laemmli- Ladepuffer	
100 mL	TRIS-HCl 1M, pH 6,8
40 g/L	SDS
200 mL	Glycerol
0,2 g/L	Bromphenolblau

Tabelle 17: TRIS gepufferte Kochsalzlösung

TBS, pH 7,4	
2,4 g/L	TRIS
8,8 g/L	NaCl

Tabelle 18: TRIS gepufferte Kochsalzlösung mit 0,005%Tween

TBST, pH 7,4	
2,4 g/L	TRIS
8,8 g/L	NaCl
5 mL	Tween20

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Klonierung

#### **Polymerasekettenreaktion unter Verwendung von *Phusion Mastermix***

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifizierung des gewünschten Gens. Der folgende Ansatz wurde verwendet:

Tabelle 19: Komponenten einer PCR Reaktion

1 pg – 10 ng	Template DNA
2,5 µl	Primer vorwärts (10µM)
2,5 µl	Primer rückwärts (10µM)
0-6 µl	DMSO
25 µl	2x Phusion Mastermix
Σ 50 µl	Nuklease freies Wasser

Die PCR wurde schließlich in einem Thermocycler wie folgt durchgeführt:

Tabelle 20: PCR Temperatur Profil

Temperatur	Zeit	Zyklen
98°C	30 s	1
98°C	10 s	30
60°C	30 s	
72°C	30 s/kb der Plasmid Länge	
72°C	10 min	1
8°C	hold	

Bei weiterer Manipulation der PCR (wie einem Restriktionsverdau) wird der Ansatz mit Hilfe des Nucleospin Gel and PCR Clean up Kits von Macherey und Nagel aufgereinigt. Die Aufreinigung verläuft nach der Anleitung der Firma. Die DNA wird allerdings mit 90 µl Tris/HCl Puffer von den verwendeten Säulen eluiert.

## Restriktionsverdau

Sowohl das durch die PCR hergestellte Insert, als auch der Vektor für die Klonierung werden mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut. Die DNA wird bei 37°C für 2-4 h verdaut, um für die darauffolgende Ligation korrespondierende, kohäsive DNA Enden herzustellen. Um Dephosphorylierungen zu katalysieren und somit eine Religation des Vektors zu verhindern, ist die Verwendung der „calf intestinal Alkaline Phosphatase“ (CIP) von Nöten. Die folgenden Komponenten und Mengenangaben werden für den Restriktionsverdau eingesetzt.

### Restriktionsverdau Insert

Tabelle 21: Komponenten des Restriktionsverdau eines Inserts

82 µl	Plasmid PCR
4 µl	Restriktions Enzym I (10 U/µl)
4 µl	Restriktions Enzym II (10 U/µl)
10 µl	10x Cut Smart Puffer

### Restriktionsverdau Vektor

Tabelle 22: Komponenten des Restriktionsverdau eines Vektors

5 µg	Vektor DNA
5 µl	Restriktions Enzym I (10 U/µl)
5 µl	Restriktions Enzym II (10 U/µl)
10 µl	10x Cut Smart Puffer
∑ 100 µl	Nukleasefreies Wasser

### Behandlung mit CIP für 0,5 – 1 h

Tabelle 23: Komponenten der Behandlung mit CIP

100 µl	Verdauten Vektor DNA (siehe Tabelle 22)
2 µl	CIP (10 U/µl)
2 µl	10x Cut Smart Puffer
∑ 120 µl	Nuklease freies Wasser

### Agarose-Gel-Elektrophorese

Nach dem Restriktionsverdau wurden die Proben abhängig von ihrer Größe auf ein 0,8-1,2 %iges TBE Agarose Ethidium Bromid Gel gegeben. Hierbei handelt es sich um ein präparatives Gel. Zuerst wurden hierfür die Proben mit einem 6x Ladepuffer im entsprechenden Verhältnis vermengt und dann aufs Gel aufgetragen.

Die Separation findet bei 100 V statt, bis die Lauffront ungefähr dreiviertel des Gels überschritten hat. Die Banden werden unter UV Licht detektiert und ausgeschnitten. Das ausgeschnittene Stück des Agarose Gels enthält das gewünschte DNA-Fragment. Die Aufreinigung aus dem Gel findet mit Hilfe eines von der Firma Macherey und Nagel gelieferten Nucleospin Gel and PCR Clean up Kits nach Anleitung des Herstellers statt. Eine Änderung zur Anleitung des Herstellers ist die Elution mit 50 µl Tris/HCl Puffer anstatt mit 15-30 µl. Die Konzentration der Proben werden unter Verwendung eines NanoDrop 2000/2000c bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

### Ligation

Um nun das Insert und den Vektor zu vereinigen, wird eine DNA Ligase verwendet, welche die Bildung einer Phosphordiesterbindung zwischen Insert und Vektor katalysiert. Für die Durchführung der Ligation wird ein "DNA ligation Kit Mighty Mix" verwendet. Das Mengen-Verhältnis von Vektor zu Insert sollte hierbei 1:1 - 1:10 betragen. Folgende Komponenten werden verwendet:

Tabelle 24: Komponenten der Ligation

x µl	Vektor DNA
y µl	Insert DNA
x+y µl	2x Mighty Mix

Nach dem Mischen der Komponenten wird die Reaktion für 30 Minuten bei 16°C inkubiert. Dann werden 5 µl zur Transformation (siehe nächster Schritt) entnommen und die restliche Reaktion bei 16°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag werden wieder 5 µl der Reaktion für die anschließende Transformation verwendet.



## Transformation

Um nun die Plasmid DNA in kompetente *E. coli* Zellen zu integrieren, wird das Hitzeschockverfahren einer Transformation angewandt. 100  $\mu\text{l}$  der aliquotierten kompetenten *E. coli* Zellen werden auf Eis aufgetaut und 5  $\mu\text{l}$  der Plasmid DNA hinzugegeben. Das Gemisch wird für 20 Minuten auf Eis gelagert und erhält dann den Hitzeschock. Hierfür wird die Reaktion für exakt 30 Sekunden bei 42°C geschockt und dann sofort wieder auf Eis inkubiert. Nach 5 Minuten wird 300  $\mu\text{l}$  LB Medium hinzugegeben und für eine Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Mischung wird nach der Stunde auf einer vorgewärmte Agarplatte ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

## Mini Präparation

3 ml LB-Medium werden mit einer empfohlenen Menge des gewünschten Antibiotikums versetzt und mit jeweils einer der auf der Agarplatte gezüchteten Kolonien angeimpft. Die Mischung wird bei 37°C für 16 Stunden in einem Inkubator geschüttelt. Die Isolation der Plasmide erfolgt mittels Nucleo Spin Plasmid der Firma Machery und Nagel nach Vorschrift. Das Elutionsvolumen des Tris/HCl Elutionspuffers wird jedoch auf 90  $\mu\text{l}$  angehoben. Ein Kontrollrestriktionsverdau wird wie folgt angesetzt:

Tabelle 25: Komponenten des Kontrollverdau

10 $\mu\text{l}$	Plasmid DNA
0,5 $\mu\text{l}$	Restriktionsenzym I (10 U/ $\mu\text{l}$ )
0,5 $\mu\text{l}$	Restriktionsenzym II (10 U/ $\mu\text{l}$ )
2 $\mu\text{l}$	10x Cut Smart Puffer
$\Sigma$ 20 $\mu\text{l}$	Nuklease freies Wasser

Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C werden zum gesamten Ansatz 3  $\mu\text{l}$  6x Ladepuffer hinzugegeben und der Verdau auf ein 0,8-1 %iges TBE Agarose Ethidium Bromid Gel gegeben. Die Separation findet bei 100 V statt, bis die Lauffront ungefähr dreiviertel des Gels überschritten hat. Die Banden werden unter UV Licht detektiert.

### **Midi Präparation**

Für die Midi Präparation werden 3 ml LB mit einer empfohlenen Menge des gewünschten Antibiotikums versetzt und mit jeweils einer auf einer Agarplatte gezüchteten Kolonie angeimpft. Die Mischung wird bei 37°C für 6 Stunden in einem Inkubator geschüttelt. 200 ml des LB Mediums werden ebenso mit einer empfohlenen Menge des gewünschten Antibiotikums versetzt und die 3 ml Vorkultur werden hinzugegeben. Die Mischung wird für 16 h bei 37°C geschüttelt. Die Aufreinigung der Plasmid DNA erfolgt über das Nucleo Bond - Xtra Midi Plus System der Firma Macherey und Nagel nach Vorgabe des Protokolls. Lediglich die Menge des TRIS Elutionspuffers wird auf 500 µl festgesetzt. Die Konzentrationsbestimmung der gewonnenen DNA erfolgt über das NanoDrop System 2000/2000c.

### **DNA Sequenzierung**

Die hergestellte DNA wird auf ihre Richtigkeit durch Sequenzierung bei der Firma SeqLab Sequence laboratories GmbH, Göttingen (URL:[www.seqlab.de](http://www.seqlab.de)) überprüft.

## 2.2.2 Zielgerichtete Mutagenese

### **Zielgerichtete Mutagenese unter Verwendung QuikChange II XL**

Die zielgerichtete Mutagenese ermöglicht spezifische Mutationen innerhalb einer DNA-Sequenz. Diese Mutation kann sowohl nur eine Aminosäure ändern, ohne dass ein großer Effekt im späteren Protein auftritt, als auch durch seine Änderung in der Sequenz des Gens zu einem anders aufgebauten Protein führen. Oligonukleotide, welche komplementär zur Matrizen-DNA sind aber die gewünschte Mutation enthalten, wirken als Ursprung der Extension für eine DNA-Polymerase. Die DNA-Polymerase verlängert dann diese Primer und synthetisiert so einen neuen, zur Template-DNA komplementären DNA-Strang. Für die zielgerichtete Mutagenese wird QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit mit PfuUltra HF DNA Polymerase verwendet. Zuerst werden zwei verschiedene Ansätze hergestellt, um die Primer zu verlängern:

## Mixtur 1

Tabelle 26: Komponenten der ersten Mixtur der Mutagenese

2,5 µl	10x Reaktions Puffer
0,2 µl	Template DNA (10 ng)
0,5 µl	Primer vorwärts
0,5 µl	dNTP Mix
1,5 µl	QuikSolution
Σ 50 µl	Nuklease freies Wasser

## Mixtur 2

Tabelle 27: Komponenten der zweiten Mixtur der Mutagenese

2,5 µl	10x Reaktions Puffer
0,2 µl	Template DNA (10 ng)
0,5 µl	Primer rückwärts
0,5 µl	dNTP Mix
1,5 µl	QuikSolution
Σ 50 µl	Nuklease freies Wasser

Zu den beiden Gemischen wird im Anschluss noch 0,5 µl *PfuUltra HF* DNA Polymerase (2,5U/µl) hinzugegeben und folgende Parameter werden dann im Thermocycler angewandt:

Tabelle 28: Temperaturprofil der Mutagenese 5 Zyklen

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	1min	1
95°C	50s	5
60°C	50s	
68°C	1min/kb der Plasmid Länge	
68°C	7min	1

25 µl jeder Reaktion werden anschließend in einem neuen PCR Reaktionsgefäß vereinigt und dann wird folgendes Programm im Thermocycler angewandt:

Tabelle 29: Temperaturprofil der Mutagenese 18 Zyklen

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	1min	1
95°C	50s	18
60°C	50s	
68°C	1min/kb der Plasmid Länge	
68°C	7min	1

Darauffolgend werden, um das Template aus der Reaktion zu entfernen, 1 µl des Restriktionsenzym DpnI (10U/µl) zu der Reaktion hinzugegeben. Es spaltet die methylierte Template DNA und das PCR Produkt verbleibt unverdaut. Vorsichtig wird die Reaktion durch Auf- und Abpipettieren mehrere Male durchmischt. Danach wird die Reaktion in einer Mikrozentrifuge für eine Minute zentrifugiert und bei 37°C für eine Stunde inkubiert.

Nach dem Verdau durch DpnI, der nach Vorgaben des Herstellerprotokolls durchgeführt wird, wird mit einer Menge von 5 µl die bereits beschriebene Hitzeschocktransformation durchgeführt. (Siehe **Transformation**)

### Zielgerichtete Mutagenese unter Verwendung des *Phusion* Mastermix

Die Theorie bei dieser Art der Zielgerichteten Mutagenese ist dieselbe. Der Unterschied ist hier die Verwendung des *Phusion* Mastermix. Bei diesem Verfahren können Vorwärts- und Rückwärtsprimer zusammen in den Ansatz gegeben werden. Die genauen Mengenangaben sind wie folgt:

Tabelle 30: Komponenten der Mutagenese unter Verwendung von *Phusion*

1 µl	Vektor DNA (mini oder midi, 5ng in total)
1 µl	vorwärts Primer (2 µM, 0,04µM in total)
1 µl	rückwärts Primer (2 µM, 0,04µM in total)
25 µl	<i>Phusion</i> Mastermix
∑ 50 µl	Nuklease freies Wasser

Der Ansatz wird dann im Thermocycler unter Verwendung des folgenden Programms behandelt:

Tabelle 31: Temperaturprofil unter Verwendung von *Phusion*

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	5min	1
95°C	1min	20
56°C	1min	
72°C	1min/kb der Plasmid Länge	
72°C	10min	1
8 °C	Halten	1

Auch der Verdau mit DpnI verläuft exakt wie oben beschrieben.

Nach dem Verdau mit DpnI werden ebenso 10 µl für die Transformation angesetzt und Verfahren wie im Kapitel **Transformation**

### 2.2.3 *in vitro* Transkription und Translation System

#### **TNT T7/SP6 Transcription/Translation System in Kaninchen Retikulozyten Lysat**

Für die Herstellung der STEVOR Proteine werden diese in einem zellfreien System der Firma Promega hergestellt. Dabei handelt es sich um Kaninchen Retikulozyten Lysat, zu welchem biotinylierte tRNA gegeben wird, um eine Detektion mit Streptavidin im Blot Verfahren zu ermöglichen. Für die Herstellung der Proteine werden die Reagenzien aus dem -70°C Gefrierschrank auf Eis aufgetaut und die gesamte Zeit des Mischens über auf Eis belassen. Für den Ansatz wird folgendes Rezept benötigt:

Tabelle 32: Komponenten des Kaninchen Retikulozyten Lysats

6,25 $\mu$ l	TNT Kaninchen Retikulozyten Lysat
0,25 $\mu$ l	TNT Reaktions-Puffer
0,25 $\mu$ l	Polymerase (SP6/T7) (200 U/ $\mu$ l)
0,25 $\mu$ l	1 mM Aminosäure Mixtur ohne Methionine
0,25 $\mu$ l	1 mM Methionine
x $\mu$ l	Template Plasmid DNA 0,5 $\mu$ g, max. 1,5 $\mu$ l
0,5 $\mu$ l	transzendierende Biotin-lysyl-t-RNA
(1 $\mu$ l	Mikrosomen)
$\Sigma$ 12,5 $\mu$ l	RNase freies Wasser

Die Reaktionen werden bei 30°C für 90 Minuten inkubiert und danach sofort wieder auf Eis gestellt. Von den Reaktionen werden entsprechend der gewünschten Menge an Gelen, pro Tasche 3  $\mu$ l Probe als Aliquot genommen und mit 7  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Dazu werden dann 10  $\mu$ l (2x Laemmli-Puffer + 100 mM dTT) gegeben und die Mixtur für fünf Minuten bei 95°C erhitzt. Nach dem Erhitzen werden die Proben für eine Minute bei 15.000rpm zentrifugiert und direkt auf das SDS Gel aufgetragen.

### SDS-PAGE

Die Natrium-Dodecyl-Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die Trennung von Proteinen abhängig von ihrem Molekulargewicht. Die Bindung zwischen SDS und den Proteinen ist nahezu unabhängig von der Primärstruktur der Proteine. Die Anzahl der sich an das Protein anlagernden SDS Moleküle ist linear vom Molekulargewicht der Proteine abhängig. Durch die angelegte Spannung wandern die durch die SDS Bindung negativ geladenen Proteine durch das Gel zum positiven Pol. Je größer das Protein ist, umso mehr SDS hat sich angelagert und umso langsamer wandert das Protein durch das Gel.

Die Gele bestehen aus einem Sammelgel und einem darunter liegenden Trenngel. Im Sammelgel wird eine Art Protein Front gebildet und im Trenngel findet dann die eigentliche Trennung der Proteine statt. Für die Versuche werden vorrangig 10%ige Trenngele verwendet und für die Herstellung von zwei Gelen ist folgendes Rezept zu befolgen:

Tabelle 33: Ansatz für zwei 10%ige SDS Gele

	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid 30% Bisacrylamid 0,8%	5 ml	1,3 ml
TRIS-CL/SDS pH 8,8	3,76 ml	-
TRIS-CL/SDS 4x pH 6,6	-	2,5 ml
H <sub>2</sub> O	6,2 ml	6,1 ml
APS 10%	125 µl	125 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Das Trenngel wird zu erst gegossen. Um eine gerade Kante zwischen Trenngel und Sammelgel erzielen zu können, wird eine kleine Menge Isopropanol auf das bereits in die Kassetten eingefüllte Trenngel gegeben und nach dem Aushärten wieder mit einem Tuch abgenommen. Die ausgehärteten Gele halten sich gut eingepackt für mindestens eine Woche. Die Kammern werden mit Laufpuffer gefüllt. Die Proteinproben werden wie bereits beschrieben mit 2x Laemmli-Puffer + 100 mM dTT vermennt und dann jeweils 15 µl auf die Taschen aufgetragen. Pro Gel in der Gekassette werden 25 mA eingestellt und das Gel läuft dann ca. 90 Minuten. Danach werden die Gele für den Western-Blot weiter verwendet.

### Western Blot

Die Proteinbanden werden im Falle von biotinmarkierten Proteinen durch Streptavidin nachgewiesen. Hierzu wird das SDS Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. In einem elektrischen Feld wandern die, durch die Bindung an SDS negativ geladenen, Proteine von der negativ geladenen Kathode zur positiv geladenen Anode. Für das semi-trockene Blotten über den Trans Blot Turbo wird ein Stapel aus Whatmanpapier, Gel und Membran in die dazugehörige Kassette gelegt und das systemeigene Programm "Standard" verwendet. Es benötigt 30 Minuten bei 25 V und 1 A. Es ist darauf zu achten, dass der Transfer ohne jegliche Luftblasen stattfindet. Die Membran wird nach dem Blotten über Nacht auf einem Schüttler in einer für Streptavidin passenden Blockierungsreagenz (TBS + 0,005% Tween20) blockiert.

Am folgenden Tag wird die Membran für eine Stunde mit Streptavidin inkubiert. Die entsprechende Verdünnung des jeweiligen Produktes wird den Anweisungen der Hersteller entnommen. Nach dieser Inkubationszeit wird zweimal 45 Minuten mit TBS + 0,005%

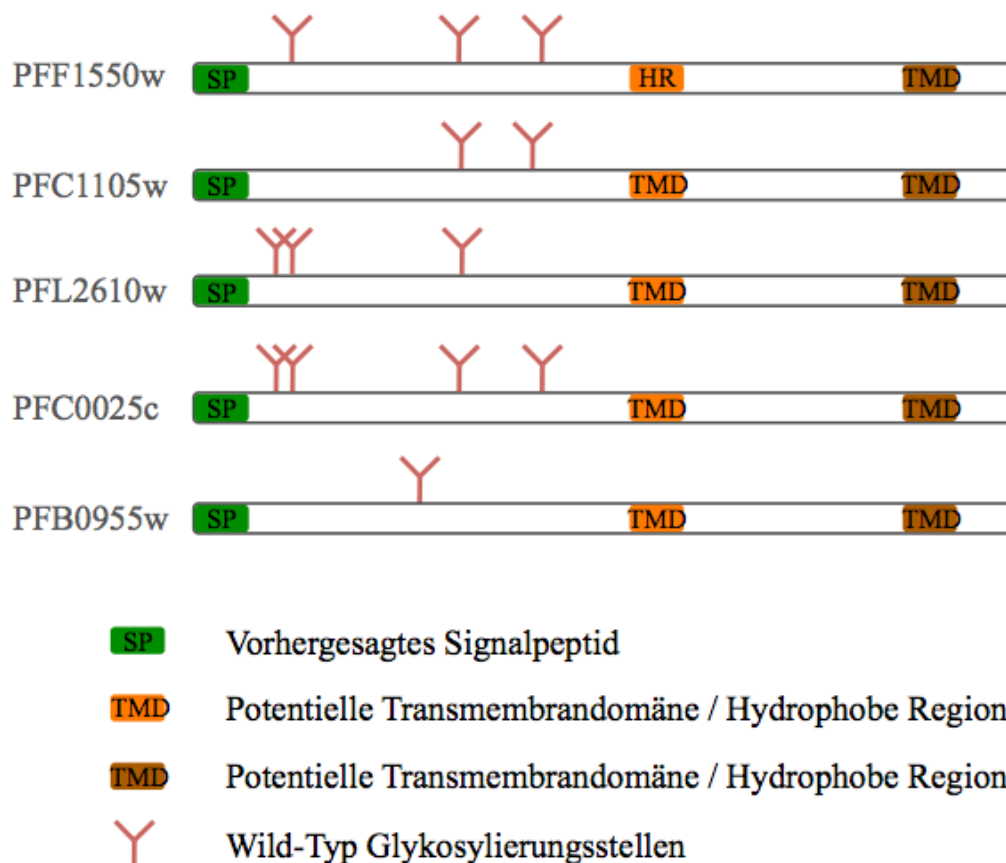
Tween20 und einmal mit TBS für 30 Minuten gewaschen. Vor der Entwicklung wird die Membran kurz in Wasser gewaschen. Für die Entwicklung wird eine Entwicklerlösung der Firma Biorad verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Lösung, die eine Chemilumineszenz auslöst, die dann in einem ChemiDoc Touch nachgewiesen werden kann. Die Lösungen werden entsprechend der Herstelleranweisungen verwendet. Bei der Arbeit mit Streptavidin ist darauf zu achten, dass die Einwirkzeit der Entwicklerlösung auf 30 Sekunden reduziert wird.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Topologie Vorhersage

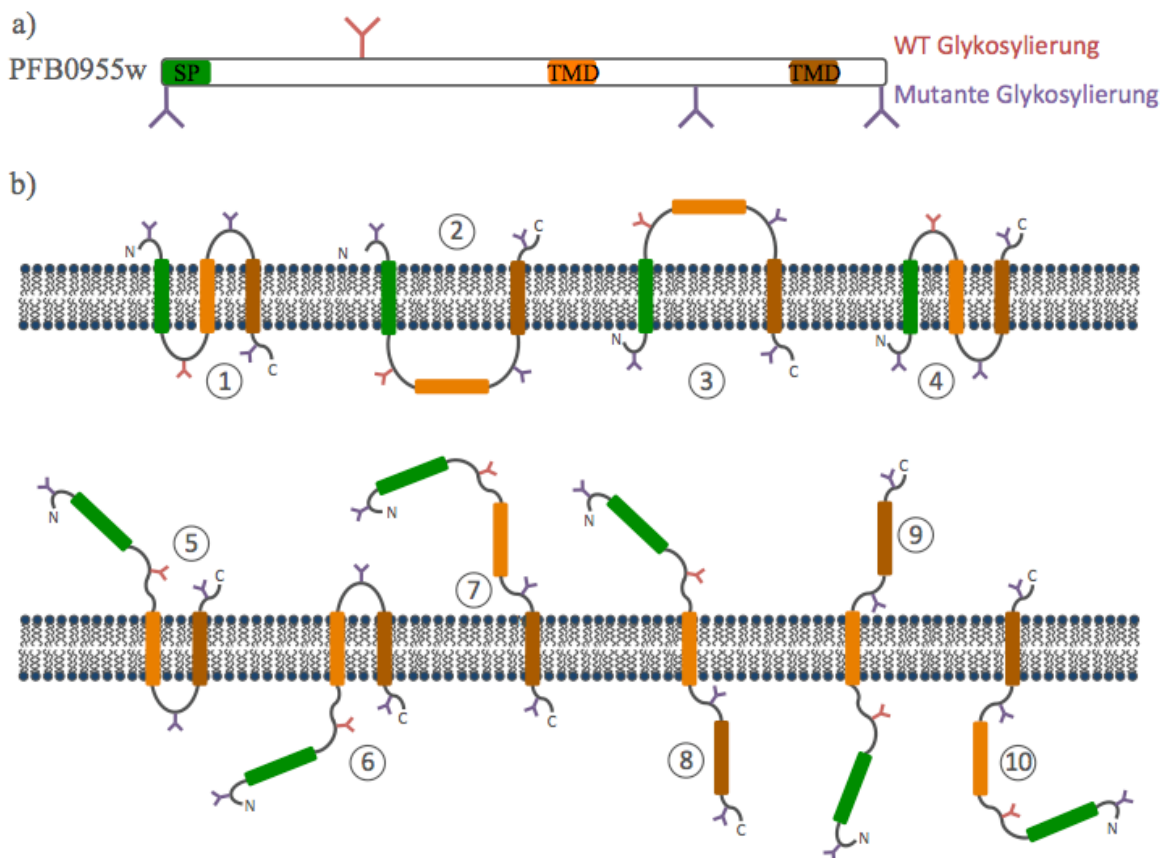
Zunächst wurden die Sequenzen der fünf zu untersuchenden STEVOR Proteine PFF1550w, PFB0955w, PFC0025c, PFC1105w, PFL1260w mittels des Programms TOPCONS (www.topcons.cbr.su.se) auf das Vorhandensein von potentiellen Topologiemotiven untersucht. Das TOPCONS Programm speist die Sequenz in die Programme OCTOPUS, Philius, PolyPhobius, SCAMPI (multiple sequence mode) und SPOCTOPUS ein, so dass man gleichzeitig die Ergebnisse verschiedener Vorhersagealgorithmen bekommt. Das Ergebnis dieser Vorhersagen ergab, dass das STEVOR Protein ein N-terminales Signalpeptid enthält, auf das eine schleifenbildende Domäne und dann eine hydrophobe Region folgen. Diese hydrophobe Region könnte eine Transmembrandomäne bilden. Darauf folgen eine weitere schleifenbildende Domäne und eine zusätzliche potentielle Membrandomäne (Abbildung 4).

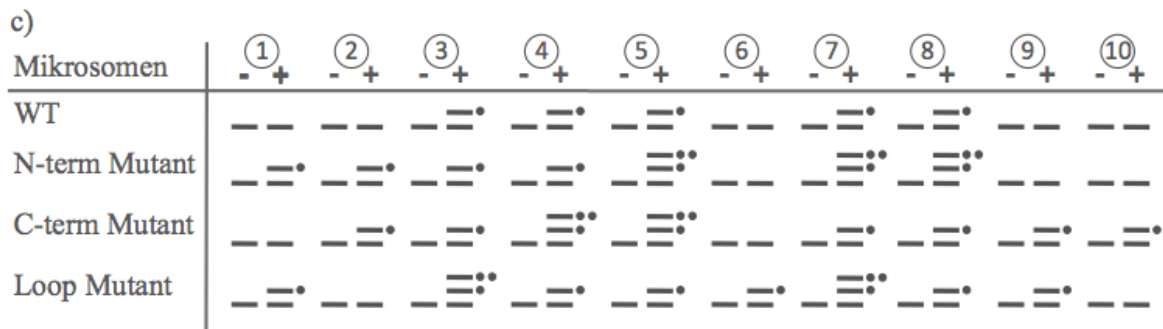


**Abbildung 04: Potentielle Sequenz-Motive der fünf *stevor* Proteine: PFF1550w, PFC1105w, PFL2610w, PFC0025c, PFB0955w.**

Das vorhergesagte Signalpeptid ist grün dargestellt. Die mutmaßlichen Transmembran-Domänen sind in orange und braun dargestellt und die natürlich vorkommenden Glykosylierungsstellen sind in rot dargestellt.

Auf Basis dieser Vorhersage gibt es zehn verschiedene potentielle Topologien, welche die STEVOR Proteine annehmen könnten. Die in Abbildung 05 dargestellten Topologien sind für das Protein PFB0995w exemplarisch. Arbeitet man lediglich mit dem Wild-Typ Protein in dem *in vitro* Transkriptions/ Translations – Glykosylierungs-Assay, ist eine eindeutige Identifizierung der Topologien nicht zu gewährleisten. Durch drei Mutanten, bei denen eine zusätzliche Glykosylierung entweder am N-terminus, dem C-Terminus oder innerhalb der Schleifenregion zwischen den beiden potentiellen Transmembrandomänen erstellt wird, ist eine genauere Identifizierung möglich. Die Kombination aus den drei Mutationen und dem Wild-Typ soll individuelle Muster der Größenverteilung ergeben, welche auf spezifische Glykosylierungsmuster basieren (Abbildung 5b). Es gibt zehn mögliche Topologiemodelle des PFB0995w. Die Auflistung der erzielbaren SDS-Banden (Abbildung 5c) zeigt, wie die theoretischen Ergebnisse im Blot zu den unterschiedlichen Topologie aussehen könnten. Aus diesen Ergebnissen kann dann Rückschluss auf die Topologie gezogen werden.





**Abbildung 05: Topologiemotive, mögliche Topologiemodelle des STEVOR-Gen PFB0995w und die entsprechenden SDS Banden, die dem jeweiligen Glykosylierungsstatus entsprechen.**

a) Darstellung der potentiellen Topologiemotive des PFB0995w. Das mutmaßliche Signalpeptid ist grün dargestellt, die mutmaßlichen Transmembrandomänen sind in orange und braun dargestellt, die natürlich vorkommende Glykosylierungsstellen ist rot dargestellt und die konstruierten Glykosylierungsstellen sind in lila dargestellt.

b) Die 10 möglichen Varianten des Topologiemodells des STEVOR Gens PFB0995w mit Angaben des N- und C-terminus. Aufbau des Proteins siehe a)

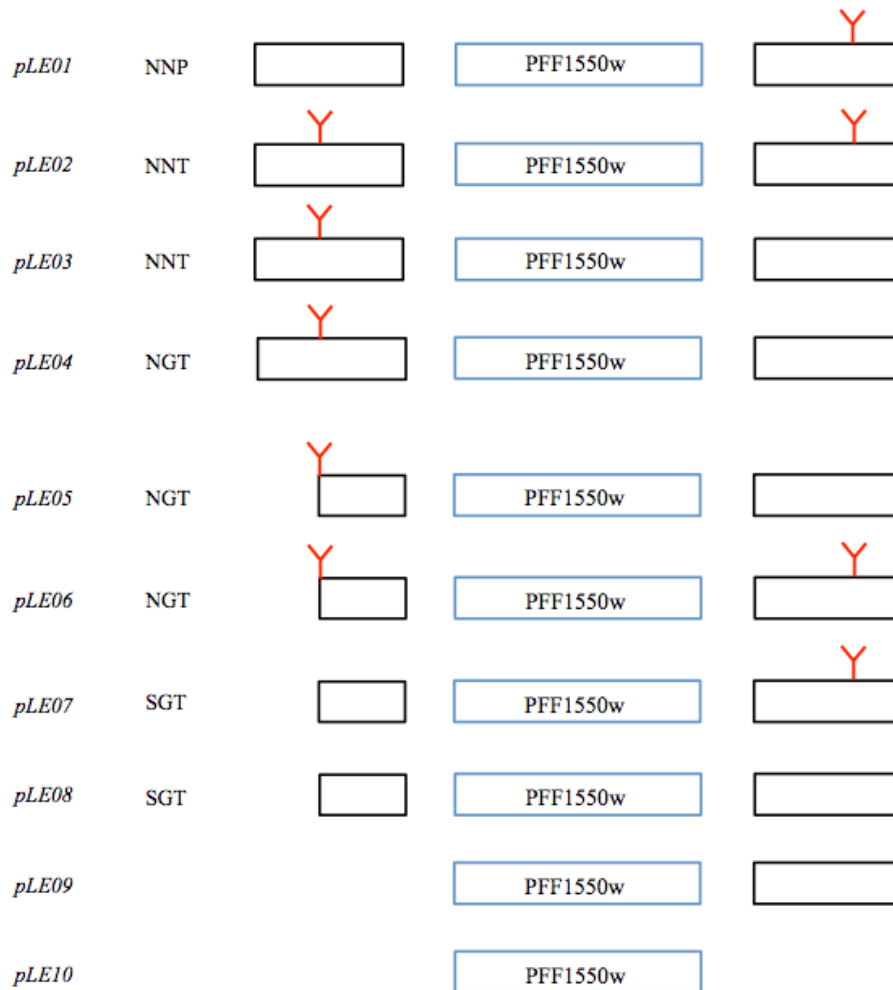
c) Auflistung der erzielbaren SDS Banden, die glykosylierte Proteinvarianten darstellen. Sie sind mit einem oder zwei Punkten in Abhängigkeit von der Anzahl der für die Verschiebung des Molekulargewichts verantwortlichen Glykosylierungsstellen markiert. Bei (-) wird ohne Mikrosomen gearbeitet, bei (+) wird das Protein mit dem Einsatz von Mikrosomen hergestellt. Darstellung des Vergleichs zwischen Wild-Typ, N-terminus Mutation, C-terminus Mutation und Mutation im Loop. Die dargestellten SDS Banden sind entsprechend den 10 Möglichen Topologiemodellen gezeigt.

### 3.2 Klonierung

Zum Zwecke eines sehr vielseitigen Testsystems habe ich vor Beginn der eigentlichen Topologiestudien eine Vielzahl von Klonierungen durchgeführt. Das Ziel dieser Klonierungen ist, wie in 1.2.2 Vorgehen beschrieben und in Abbildung 03 sichtbar, das Protein in eine optimale Umgebung zu klonieren und durch eine große Anzahl an Schnittstellen das schnelle Umklonieren von weiteren Testproteinen zu ermöglichen. Um die STEVOR Proteine in dem zellfreien Expressionssystem herstellen zu können, werden die entsprechenden Gene in dieses optimale Vektorsystem kloniert.

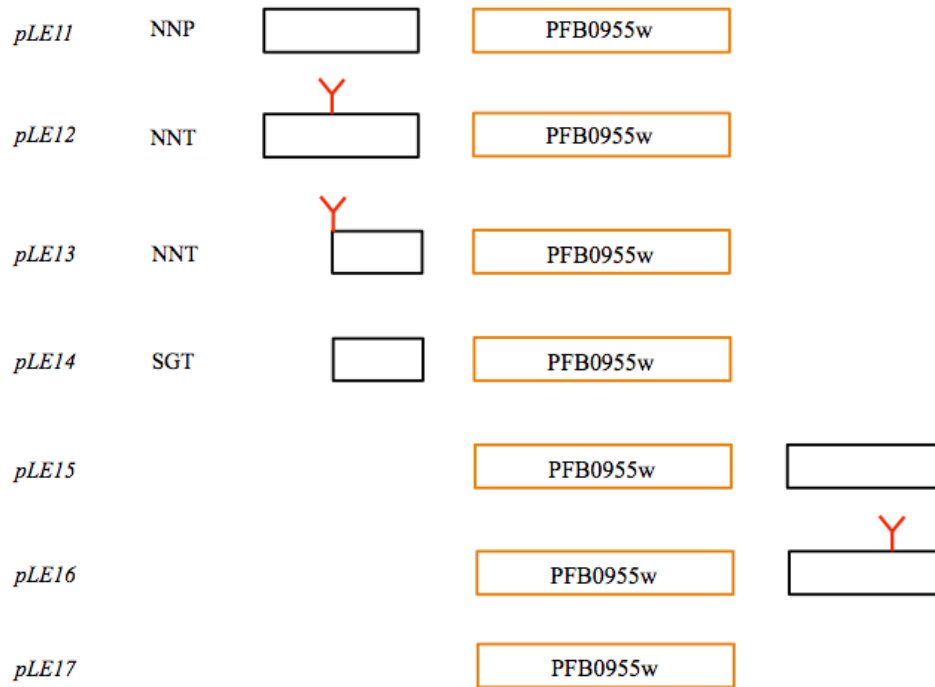
Um die verschiedenen Expressionsplasmide zu generieren und die entsprechenden Proteine zu testen, arbeitete ich zunächst exemplarisch mit den zwei STEVOR Proteine PFF1550w und PFB0995w. Die Klonierungen hierbei umfassten die Glykosylierungen an den Sonden, sowie das Einsetzen der Gene in den gewünschten Vektor. Zudem arbeitete ich ebenso an der Größe der Sonden, beziehungsweise an dem Vorhandensein der Sonden. Die folgenden Abbildungen 06, 07 und 08 zeigen eine schematische Übersicht der Proteine PFF1550w und PFB0995w, die durch die verschiedenen mutierten Genkonstrukte kodiert werden. Ich arbeitete hierbei sowohl mit einem System aus einem SP6 Promotor als auch einem System aus einem T7 Promotor. Der Einbuchstabencode der Aminosäuren vor den jeweiligen Klonen zeigt, ob eine Glykosylierung vorhanden ist oder nicht. Da eine Glykosylierung nur in dem Sequenzmotiv

NXT/S stattfinden kann, ist bei einem NNT oder NGT eine Glykosylierung im ProW vorhanden. Bei dem Einbuchstabencode NNP oder SGT ist keine Glykosylierung eingebaut. Die Klonierungen wurden von mir für eine bessere Übersicht durchnummeriert und erhielten vor ihrer Nummer den Namen *pLE*. Das jeweilige Protein, welches durch die entsprechende Klonierung exprimiert wird, erhält den Namen PLE. Die Methodik der zielgerichteten Mutagenese ist in Abschnitt 2.2.2 Zielgerichtete Mutagenese und die Methodik der Klonierung in Abschnitt 2.2.1 Methodik der Klonierung genauer erklärt.



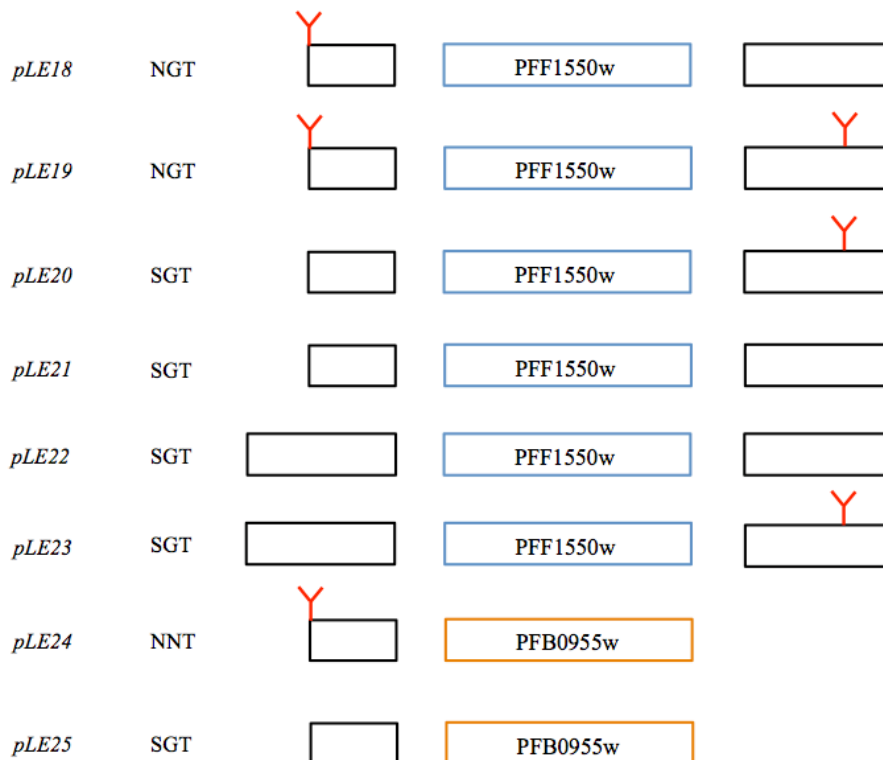
**Abbildung 06: Schematische Darstellung der Ergebnisse der Klonierung des PFF1550w Gens in einen Vektor mit T7 Promotor.**

Das STEVOR Protein codierende Gen ist in blau dargestellt. Die durch Mutagenese eingebauten Glykosylierungsstellen sind in rot gezeigt. Abhängig der Mutationen sind die Aminosäurecodes vorangestellt. Bei NGT und NNT ist eine Glykosylierungsstelle vorhanden, bei SGT und NNP ist keine Glykosylierungsstelle vorhanden. Angelehnt an Abbildung 01 stellt die vordere schwarze Box das ProW dar und die Hintere das LepP2. Der PFF1550w Teil wird durch eine blaue Box dargestellt.



**Abbildung 07: Schematische Darstellung der Ergebnisse der Klonierung des PFB0955w Gens in einen Vektor mit T7 Promotor.**

Das STEVOR Protein codierende Gen ist in orange dargestellt. Die durch Mutagenese eingebauten Glykosylierungsstellen sind in rot gezeigt. Abhängig der Mutationen sind die Aminosäurecodes vorangestellt. Bei NGT und NNT ist eine Glykosylierungsstelle vorhanden, bei SGT und NNP ist keine Glykosylierungsstelle vorhanden. Angelehnt an Abbildung 01 stellt die vordere schwarze Box das ProW dar und die Hintere das LepP2. Das PFB0995w wird durch eine gelbe Box dargestellt.

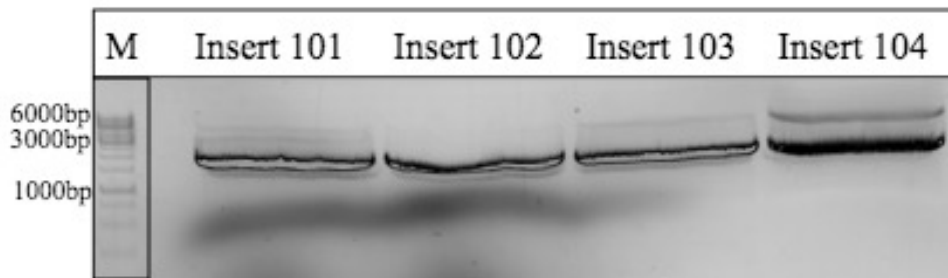


**Abbildung 08: Schematische Darstellung der Ergebnisse der Klonierung des PFF1550w, sowie des PFB0995w Gens in einen Vektor mit SP6 Promotor.**

Das STEVOR PFF1550w Protein codierende Gen ist in blau dargestellt. Das PFB0995w codierende Gen ist in orange dargestellt. Die durch Mutagenese eingebauten Glykosylierungsstellen sind in rot gezeigt. Abhängig der Mutationen sind die Aminosäurecodes vorangestellt. Bei NGT und NNT ist eine Glykosylierungsstelle vorhanden, bei SGT und NNP ist keine Glykosylierungsstelle vorhanden. Angelehnt an Abbildung 01 stellt der vordere schwarze Kasten das ProW dar und der Hintere das LepP2. Das PFF1550w ist durch einen blauen Kasten, das PFB0995w durch einen gelben Kasten dargestellt.

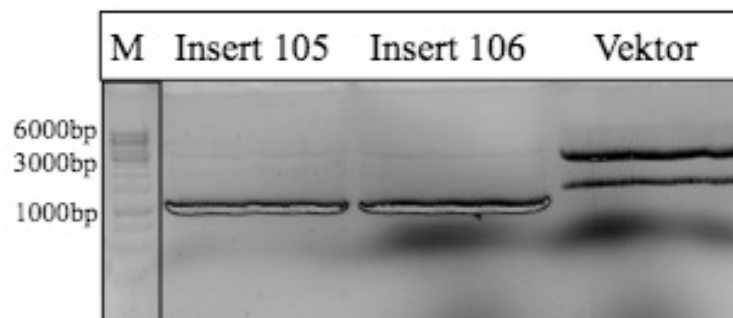
Die Ergebnisse für eine Klonierung sind neben den Kontrollverdauen aus der Mini Präparation noch die Ergebnisse aus dem Agarose Gel nach dem Verdau. In den Abbildungen 09 und 10 sind, beispielhaft für alle Klonierungen, der Verdau der Inserts und des Vektors sechs verschiedener Klonierungen zu sehen. Alle Ligationen werden im Labor für eine bessere Übersicht aufsteigend durchnummeriert. Ich trug den Verdau auf ein 1 %-iges, präparatives TBE Agarose Gel auf. In Ligation 101-104 klonierte ich das Gen PFF1550w mit einem verkürzten ProW in einen Vektor mit SP6 Promotor. Die unterschiedlichen Klone unterscheiden sich in der Anwesenheit bzw. Abwesenheit eines Sequenzmotives, dass in den entsprechenden Proteinsonden ProW und LepP2 eine Glykosylierung ermöglicht. Eine Glykosylierung ist möglich, wenn das Glykosylierungsmotiv NXT/S vorliegt. Die Ligationen 105-106 klonieren das Gen PFB0995w in den gleichen SP6 Vektor. Auch hier ist die Sonde ProW verkürzt und die beiden Klonierungen unterscheiden sich in der Anwesenheit bzw. der Abwesenheit von Sequenzmotiven, die Glykosylierungsstellen in der Sonde ProW kodieren.

(Siehe Abbildung 08 *pLE18 – pLE21* für die Ligationen 101-104 und *pLE24 – pLE25* für die Ligation 105 und 106)



**Abbildung 09: Ergebnisse des Restriktionsverdaus der Insert DNA der Ligationen 101-104.**

1%iges präparatives TBE Agarose Gel. Marker (M) GeneRuler 1 kb DNA Ladder (250 bp-10000 bp); Darstellung des Restriktionsverdaus des *stevor* Gens PFF1550w mit unterschiedlichen Sequenzmotiven, die Glykosylierungsstellen an den Sonden kodieren (Ligation 101-104; 2000 bp). Spur 2 zeigt das verdaute Insert zur Ligation 101, Spur 3 das Insert zur Ligation 102, Spur 4 zeigt das Insert der Ligation 103 und Spur 5 die 104.



**Abbildung 10: Ergebnisse des Restriktionsverdaus der Insert DNA der Ligationen 105 und 106 sowie deren Vektor.**

1%iges präparatives TBE Agarose Gel. Marker (M) GeneRuler 1kb DNA Ladder (250 bp-10000 bp); Darstellung des Restriktionsverdaus des *stevor* Gens PFB0955w mit unterschiedlichen Sequenzmotiven, die Glykosylierungsstellen an der ProW Sonde kodieren (Ligation 105-106; 1100 bp) sowie deren Vektor (3000 bp + 2000 bp). Spur 2 zeigt das verdaute Insert zur Ligation 105, Spur 3 das Insert zur Ligation 106, Spur 4 zeigt den verdauten SP6 Vektor.

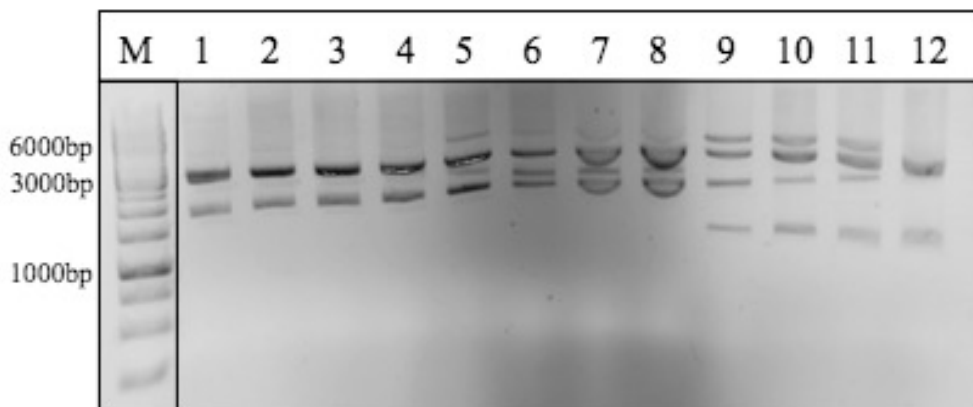
Die in den Abbildungen 09 und 10 gezeigten Ergebnisse stellen den Restriktionsverdau der Klonierung des PFF1550w und PFB0995w Gens in ein Vektorsystem aus SP6 dar. Ich trug die Proben auf ein präparatives, 1%iges TBE Agarose Gel auf. Den Restriktionsverdau führte ich mit den Enzymen *NcoI* und *SacI* durch. Anhand des Inserts 101 erläutere ich im Folgenden den Ablauf zur Auswahl der richtigen Banden für einen erfolgreichen Verdau und an Insert 104 für einen fehlgeschlagenen Verdau. Auf Abbildung 09 ist eine Bande auf der Höhe des Markers bei 2000 bp in der Spur des Inserts 101 zu sehen. Dies entspricht der Größe des Fragmentes, das amplifiziert werden sollte. Somit ging ich davon aus, dass es sich um das richtige Insert handelte und arbeitete mit diesem nach dem Ausschneiden weiter. Die Bande für das Insert 104 läuft zu groß. Sie läuft auf einer Größe von 3000 bp und hat somit die falsche Größe, so dass dieser Verdau der PCR Amplifikation wiederholt werden musste. Nach dem Ausschneiden der gewünschten Banden aus dem Agarose Gel reinigte ich diese mittels

Nucleospin Gel and PCR Clean up Kits nach Angaben des Herstellers auf und ligierte sie im nächsten Schritt.

Die in Abbildung 09 und 10 gezeigten Agarose Gele zeigen, dass alle amplifizierten und verdauten DNA Fragmente entsprechend der erwarteten Größe liefen. Eine Ausnahme bildeten lediglich die DNA Fragmente zur Ligation 103 und 104. Sie zeigten eine deutlich größere Bande.

Zur Verifikation der Klonierungen pickte ich einzelne Klone und die präparierte Plasmid DNA unterzog ich einem Kontrollverdau. Hierbei wurden die gleichen Restriktionsenzyme verwendet, mit denen auch die Klonierung durchgeführt wurde.

So kann kontrolliert werden, ob die Ligation und anschließende Transformation erfolgreich war und ob die sich ergebenden Banden die richtigen Größen von Vektor und Insert aufweisen.



**Abbildung 11: Ergebnisse des Kontrollverdaus der Mini Präparationen der Ligationen 101 – 106.**

1%iges TBE Agarose Gel. Marker (M) GeneRuler 1kb DNA Ladder (250 bp-10000 bp); Darstellung des Restriktionsverdaus der *stevor* Gene PFF1550w und PFB0955w mit unterschiedlichen Sequenzmotiven die Glykosylierungsstellen der Sonden kodieren (Ligation 101-104; 3000 bp + 2000 bp und Ligation 105-106; 3000 bp + 1100 bp). Spur 1-2 zeigen die Ergebnisse des Kontrollverdaus der Mini Präparation zur Ligation 101, Spur 3-4 zur Ligation 102, Spur 5-6 zur Ligation 103, Spur 7-8 zur Ligation 104, Spur 9-10 zur Ligation 105 und Spur 11-12 zur Ligation 106.

In Abbildung 11 ist das Agarose Gel der Kontrollverdaue der Mini Präparationen der Klonierung der PFF1550w- und PFB0995w-Gene in ein Vektorsystem mit SP6-Promotor gezeigt. Die Proben trug ich auf ein 1%iges TBE Agarose Gel auf. Der Kontrollverdau der Ligationen 101-104 (durch die Enzyme *Nco*I und *Sac*I) soll eine Größe von 3000 bp und 2000 bp aufweisen. Bei den Ligationen 105 und 106 soll der Kontrollverdau eine Größe von 3000 bp und 1100 bp zeigen. Erst nach erfolgreichem Kontrollverdau konnten die Proben zum Sequenzieren verschickt werden. Allgemein zeigten alle Ergebnisse des Kontrollverdaus die Banden auf Höhe der gewünschten Größen und konnten somit zum Sequenzieren verschickt werden.



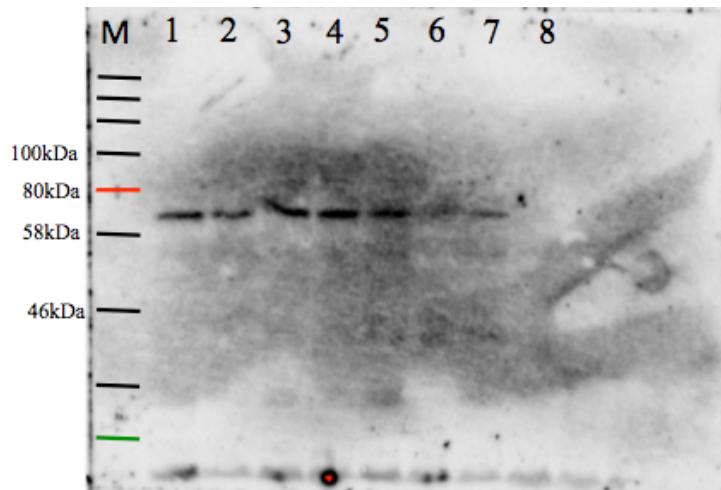
Zusammenfassend lässt sich über diese Ergebnisse sagen, dass alle 25 Klonierungen erfolgreich waren und somit ein umfangreiches Testsystem zur Proteinproduktion in dem zellfreien Kaninchen Retikulozyten Lysat erstellt wurde.

#### 3.3 *in vitro* Transkription/Translation

Ziel des in dieser Arbeit konstruierten und klonierten *in vitro* Transkription/Translation Systems war es, die entsprechenden Proteine zellfrei herzustellen und diese durch SDS Gel und Western Blot zu detektieren. Der Unterschied des Bandenmusters, der sich daraus ergibt, ob die Versuche in An- bzw. Abwesenheit von Mikrosomen durchgeführt werden, lässt Rückschlüsse auf die Topologie der getesteten Proteine zu. Die Vielfältigkeit des Systems erlaubt es, für die Herstellung verschiedener Proteine das jeweils beste Vektorsystem zu identifizieren.

Die durch Klonierung erstellten Plasmide exprimierten sich in einem *in vitro* Transkriptions/Translationssystem. Hierbei werden die Proteine zellfrei in einem Kaninchen Retikulozyten Lysat hergestellt und durch biotinylierte Lysine in Form von tRNA markiert. Dies erlaubt die Detektion der hergestellten Proteine durch Streptavidin im späteren Blotverfahren. Durch das Einsetzen von Mikrosomen sollen, wie bereits in 1.2.2 beschrieben, die Glykosylierungen im Protein gezeigt werden, sodass eine Annahme über die Topologie der STEVOR Proteine gemacht werden kann.

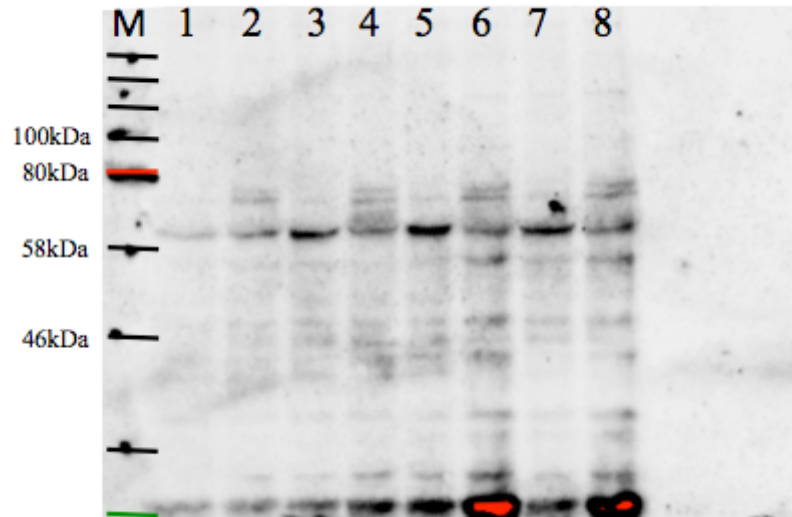
Die *in vitro* hergestellten Proteine trug ich auf ein 10%iges SDS Gel auf und durch das semitrockene Verfahren wurde das SDS Gel geblottet und im Anschluss entwickelt. (Für Methodik siehe Abschnitt 2.2.3 *in vitro* Transkription und Translation System)



**Abbildung 12: Western Blot des SDS Gels der zellfrei hergestellten Proteine PLE01-PLE04 mit und ohne Verwendung von Mikrosomen (72 kDa).**

Blot auf Nitrozellulosemembran eines SDS Gels, der über biotinylierte Lysine im Protein mit Streptavidin als Antikörper entwickelt wurde. Marker (M) Color Prestained Protein Standard (Broad Range) 11-245 kDa; in Spur 1 und 2 ist das PLE01 ohne (1) und mit (2) Mikrosomen aufgetragen. In Spur 3 und 4 ist das PLE02 ohne (3) und mit (4) Mikrosomen, in Spur 5 (ohne) und 6 (mit) das PLE03 und in Spur 7 (ohne) und 8 (mit) das PLE04 aufgetragen.

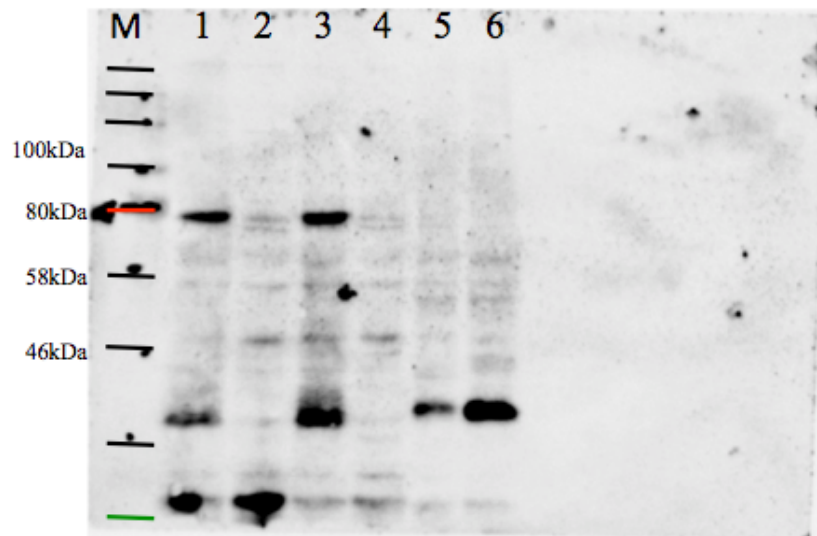
Abbildung 12 zeigt den Western Blot eines SDS Gels, auf das die zellfrei hergestellten Proteine PLE01 – PLE04 mit und ohne Mikrosomen aufgetragen worden sind. Alle Proteine sollten eine Größe von 72 kDa aufweisen. Außer in Spur 8 sind Banden auf der richtigen Größe zu detektieren und somit konnten die Proteine erfolgreich hergestellt werden. In Anwesenheit von Mikrosomen konnte keine Bande detektiert werden, die auf glykosylierte Proteine schließen lässt. Der Versuch, das Protein PFF1550w im T7 Vektorsystem mit vollständigen Sonden sichtbar zu machen, konnte erfolgreich durchgeführt werden und zeigt die erwarteten Proteine. Glykosylierungen konnten nicht detektiert werden.



**Abbildung 13: Western Blot des SDS Gels der zellfrei hergestellten Proteine PLE05-PLE08 mit und ohne Verwendung von Mikrosomen (62 kDa).**

Blot auf Nitrozellulosemembran eines SDS Gels, der über biotinylierte Lysine im Protein mit Streptavidin als Antikörper entwickelt wurde. Marker (M) Color Prestained Protein Standard (Broad Range) 11-245 kDa; in Spur 1 und 2 ist das PLE05 ohne (1) und mit (2) Mikrosomen aufgetragen. In Spur 3 und 4 ist das PLE06 ohne (3) und mit (4) Mikrosomen, in Spur 5 (ohne) und 6 (mit) das PLE07 und in Spur 7 (ohne) und 8 (mit) das PLE08 aufgetragen.

Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse der Tests der STEVOR Proteine mit verkürztem ProW. Hierbei wurden die Plasmide *pLE05* – *pLE08* verwendet. Auch hier blottete ich das SDS Gel auf eine Nitrozellulosemembran und entwickelte diesen Blot mit Streptavidin als Antikörper. Aufgetragen habe ich die Proteine PLE05 – PLE08 mit und ohne Mikrosomen. Alle Proteine sollten eine Größe von 62 kDa haben. In allen Spuren der Abbildung 11 sind Banden auf der richtigen Größe zu finden. Die Banden der Proteine mit Mikrosomen sind im Vergleich deutlich schwächer. Die einzige Ausnahme ist hierbei das Protein PLE05, bei dem die Bande mit Mikrosomen stärker zu sehen ist. Ebenso ist eine Doppel-Bande bei ca. 80 kDa in den Spuren, in denen mit Mikrosomen gearbeitet wurde (Spuren 2,4,6,8) zu sehen. Der Versuch, das Protein PFF1550w im T7 Vektorsystem mit verkürzter ProW Sonde sichtbar zu machen, war erfolgreich. Durch die detektierten Banden auf Höhe der richtigen Größe kann gezeigt werden, dass die Proteine PLE05 – PLE08 exprimiert wurden. Auch in den Spuren der Proteine mit Zugabe der Mikrosomen sind Banden zu sehen, die auf eine Glykosylierung des Proteins hindeuten.



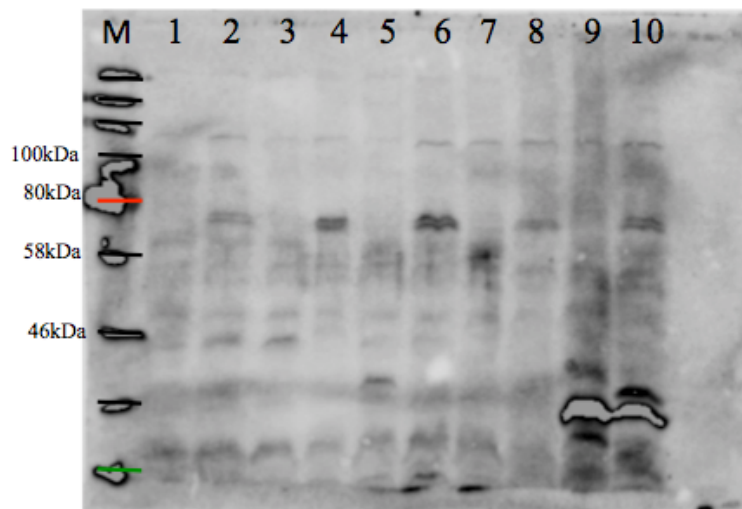
**Abbildung 14: Western Blot des SDS Gels der zellfrei hergestellten Proteine PLE22-PLE23 mit und ohne Verwendung von Mikrosomen (72 kDa).**

Blot auf Nitrozellulosemembran eines SDS Gels, der über biotinylierte Lysine im Protein mit Streptavidin als Antikörper entwickelt wurde. Marker (M) Color Prestained Protein Standard (Broad Range) 11-245 kDa; in Spur 1 und 2 ist das PLE22 ohne (1) und mit (2) Mikrosomen aufgetragen. In Spur 3 und 4 ist das PLE23 ohne (3) und mit (4) Mikrosomen, in Spur 5 (ohne) und 6 (mit) ein Kontrollprotein (35 kDa) aufgetragen, bei dem die Bindung an Mikrosomen schon Ergebnisse lieferte.

Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der Tests der STEVOR Proteine aus dem Vektorsystem mit einem SP6 Promotor. Es handelt sich hierbei um die Plasmide *pLE22* und *pLE23*, welche ich für die Produktion der Proteine sowohl ohne als auch mit Mikrosomen verwendete. Das 10%ige SDS Gel blottete ich auf eine Nitrozellulosemembran und entwickelte den Blot mit Streptavidin als Antikörper. Für eine Kontrolle der Glykosylierungsbindungen an die Mikrosomen wurde ebenso eine Kontrolle in dem *in vitro* System hergestellt. Bei der Kontrolle ist bekannt, dass die Glykosylierungsstelle durch die Mikrosomen erstellt und somit im Blot sichtbar wird. Die Proteine der Plasmide *pLE22* und *pLE23* sollen eine Größe von 72 kDa haben. Proteine, welche ich ohne die Zugabe von Mikrosomen herstellte sind im Blot durch Banden auf der richtigen Größe sichtbar. In Anwesenheit von Mikrosomen konnten keine spezifischen Proteinbanden detektiert werden. Lediglich die unspezifischen Doppelbanden bei einer Größe von 80 kDa sind zu sehen. Das Kontrollprotein zeigte die gewünschten Ergebnisse durch Proteinbanden bei 35 kDa und eine breitere Bande bei der Zugabe durch Mikrosomen.

Der Versuch, das Protein PFF1550w im SP6 Vektorsystem mit vollständigen Sonden sichtbar zu machen, konnte nicht ganz erfolgreich durchgeführt werden. Die STEVOR Proteine konnten nur in Abwesenheit von Mikrosomen detektiert werden. Da die Positivkontrolle in An- und Abwesenheit von Mikrosomen detektiert werden konnten und da in Anwesenheit von

Mikrosomen eine Bande detektiert wurde, die von glykosylierten Proteinen stammen könnte, konnte gezeigt werden, dass das SP6 Testsystem grundsätzlich geeignet ist.

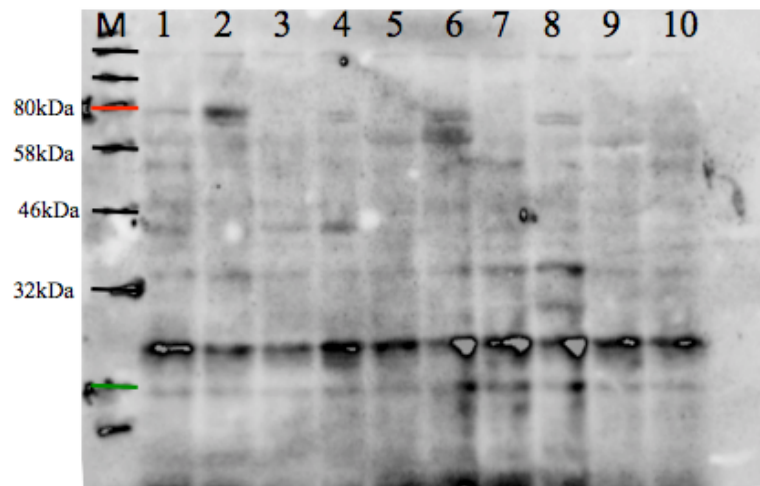


**Abbildung 15: Western Blot des SDS Gels der zellfrei hergestellten Proteine PLE11-14 mit und ohne Verwendung von Mikrosomen (*pLE11/12* 46 kDa, *pLE13/14* 36 kDa).**

Blot auf Nitrozellulosemembran eines SDS Gels, der über biotinylierte Lysine im Protein mit Streptavidin als Antikörper entwickelt wurde. Marker (M) Color Prestained Protein Standard (Broad Range) 11-245 kDa; in Spur 1 und 2 ist das PLE11 ohne (1) und mit (2) Mikrosomen aufgetragen. In Spur 3 und 4 ist das PLE12 ohne (3) und mit (4) Mikrosomen, in Spur 5 (ohne) und Spur 6 (mit) das PLE13 aufgetragen. Das PLE14 ist in Spur 7 (ohne) und in Spur 8 (mit) aufgetragen und in Spur 9 (ohne) und 10 (mit) ein Kontrollprotein (35 kDa), bei dem die Bindung an Mikrosomen schon Ergebnisse lieferte.

Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse des SDS Gels, welches von mir auf eine Nitrozellulosemembran geblottet wurde. Ich trug auf dem SDS Gel die Proteine auf, die unter der Verwendung der Plasmide *pLE11* – *pLE14* zellfrei in An- und Abwesenheit von Mikrosomen hergestellt wurden. Zudem arbeitete ich auch hier mit dem bereits beschriebenen Kontrollprotein. Die Proteine der Plasmide *pLE11* und *pLE12* sollen eine Größe von 46 kDa aufweisen, die Plasmide *pLE13* und *pLE14* lediglich eine Größe von 36 kDa. In dieser Abbildung sind die Banden schwierig zu erkennen. Die Banden der Proteine PLE11 und PLE12 sind auf der Größe von 46 kDa schwach zu erkennen. Die Proteine der Plasmide *pLE13* und *pLE14* sind teilweise gar nicht zu erkennen. Die Banden in der Spur des Kontrollproteins sind deutlich zu erkennen (Spur 9 und 10). Die Doppelbanden auf Höhe der 80 kDa in allen Spuren der Proteine mit Mikrosomen sind wiederkehrend zu erkennen.

Die Ergebnisse dieses Versuchs, das Protein PFB0995w im T7 Vektorsystem mit unterschiedlichem Aufbau der Sonden sichtbar zu machen, sind nicht zufriedenstellend. Es war neben dem Kontrollprotein nur möglich, die Proteine PLE11 und PLE12 zu detektieren. Die Darstellung der STEVOR Proteine mit Zugabe von Mikrosomen war in diesem Versuch nicht möglich. Lediglich die Positivkontrolle zeigte die gewünschten Ergebnisse.

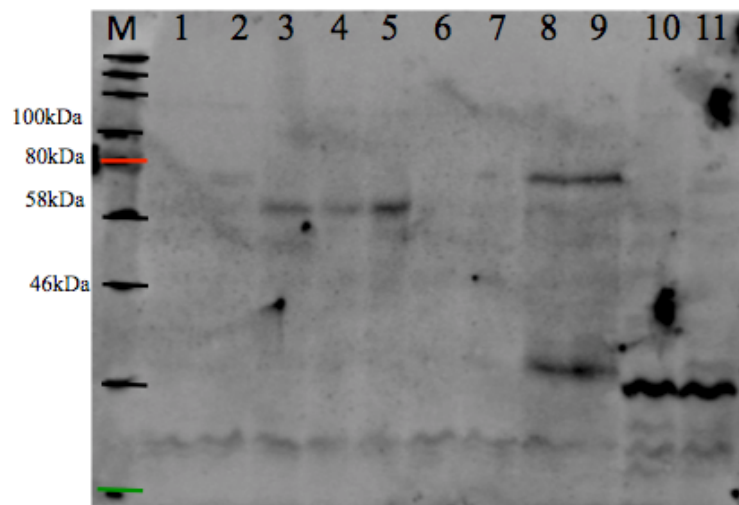


**Abbildung 16: Western Blot des SDS Gels der zellfrei hergestellten Proteine PLE01, PLE12, PLE05, PLE13 mit und ohne Verwendung von Mikrosomen und die Proteine PLE09 und PLE15 nur ohne Verwendung von Mikrosomen**

(PLE01 72 kDa, PLE12 46 kDa, PLE05 62 kDa, PLE13 36 kDa, PLE09 61 kDa, PLE15 62 kDa). Blot auf Nitrozellulosemembran eines SDS Gels, der über biotinylierte Lysine im Protein mit Streptavidin als Antikörper entwickelt wurde. Marker (M) Color Prestained Protein Standard (Broad Range) 11-245 kDa; in Spur 1 und 2 ist das PLE01 ohne (1) und mit (2) Mikrosomen aufgetragen. In Spur 3 und 4 ist das PLE12 ohne (3) und mit (4) Mikrosomen, in Spur 5 (ohne) und Spur 6 (mit) das PLE05 aufgetragen. Das PLE13 ist in Spur 7 (ohne) und in Spur 8 (mit) aufgetragen und in Spur 9 das PLE09 ohne Mikrosomen und in Spur 10 das PLE15 ebenso ohne Mikrosomen.

Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der Tests in denen verschiedene PFF1550w und PFB0995w Konstrukte verwendet wurden. Es sollte getestet werden, ob der Einfluss verschiedener Sonden auf die Darstellung und Glykosylierung der STEVOR Proteine spezifisch für ein bestimmtes STEVOR Protein ist. Die Plasmide *pLE01*, *pLE12*, *pLE05*, *pLE13* wurden sowohl mit als auch ohne Mikrosomen, die Plasmide *pLE09* und *pLE15* nur ohne Mikrosomen von mir getestet. Zu sehen ist die entwickelte Nitrozellulosemembran, die von mir von einem 12%igen SDS Gel geblottet wurde. Die Proteine haben alle eine unterschiedliche Größe. PLE01 ist 72 kDa groß, PLE12 46 kDa, PLE05 62 kDa, PLE13 36 kDa, PLE09 61 kDa und PLE15 62 kDa groß. Ebenso wie in Abbildung 15 sind auch in Abbildung 16 die Banden schwer zu erkennen. Die erfolgreiche Expression der Plasmide *pLE01*, *pLE12*, *pLE05*, *pLE09* und *pLE15* konnte durch die Detektion von schwachen Banden gezeigt werden. Die Verwendung des Plasmids *pLE13* führte nicht zu im Blot nachweisbaren Banden. Alle exprimierten Proteinen sind ebenso als glykosylierte Proteine sichtbar. Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, sind auch in diesem Blot die Banden dieser Proteine durch den Einbau der Glykosylierungen breiter. Ebenso wie in den bisherigen Abbildungen, zeigt sich auch bei Abbildung 16 wieder die Doppelbande bei 80 kDa in den Spuren, in denen mit Mikrosomen gearbeitet wurde.

Der Versuch, die Proteine PFF1550w und PFB0995w aus dem T7 Vektorsystem, im Vergleich zueinander darzustellen war teilweise erfolgreich. Es war nicht möglich, alle Proteine zu detektieren. Die Verbreiterung der Banden in den Tests, in denen Mikrosomen zugesetzt wurden, spricht dafür, dass Glykosylierungen der Proteine detektierbar waren. Das Protein PFB0995w PLE13, welchem die LepP2 Sonde fehlt, konnte nicht exprimiert werden, wohingegen das Protein PFB0995w PLE12, welchem ebenso die LepP2 Sonde fehlt, exprimiert werden konnte.



**Abbildung 17: Western Blot des SDS Gels der zellfrei hergestellten Proteine PLE18 – PLE25, wobei das PLE18 ohne und mit Mikrosomen aufgetragen ist, PLE19 – PLE25 nur ohne Mikrosomen aufgetragen ist.** (PLE18 – PLE21 62 kDa, PLE22 – PLE23 72 kDa, PLE24 – PLE25 36 kDa) Blot auf Nitrozellulosemembran eines SDS Gels, der über biotinylierte Lysine im Protein mit Streptavidin als Antikörper entwickelt wurde. Marker (M) Color Prestained Protein Standard (Broad Range) 11-245 kDa; In Spur 1 (ohne Mikrosomen) und Spur 2 (mit Mikrosomen) ist das PLE18, in Spur 3 das PLE19, in Spur 4 das PLE20, in Spur 5 das PLE21 aufgetragen. In Spur 6 ist das PLE24, in Spur 7 das PLE25, in Spur 8 das PLE22, in Spur 9 das PLE23 und in Spur 10 (ohne) und 11 (mit) ein Kontrollprotein (35 kDa) aufgetragen, bei dem die Bindung an Mikrosomen schon Ergebnisse lieferte.

Abbildung 17 zeigt den Testversuch der Proteine PFF1550w und PFB0995w im SP6 Vektorsystem im Vergleich zueinander. Beim Einsatz der Plasmide *pLE18* – *pLE25* im Testansatz wurden keine Mikrosomen zugesetzt. Nur bei der Verwendung des Plasmids *pLE18* wurde der Test sowohl mit als auch ohne Mikrosomen durchgeführt. Ich trug alle hergestellten Proben auf ein SDS Gel auf. In Abbildung 17 ist die entwickelte Nitrozellulosemembran zu sehen, die von mir von einem 10%igen SDS Gel geblottet wurde. Die Proteine haben alle eine unterschiedliche Größe. Proteine, die mittels der Plasmide *pLE18* – *pLE21* hergestellt werden, sind 62k Da groß und die, die mittels der Plasmide *pLE24* – *pLE25* hergestellt worden, sind 36 kDa groß. Die Plasmide *pLE22* – *pLE23* sollten zur Herstellung von Proteinen einer Größe von 72 kDa führen. Auch auf diesem Blot sind die Proben aufgetragen, in denen das Kontrollprotein (35 kDa) sowohl in Anwesenheit als auch in

Abwesenheit von Mikrosomen, hergestellt wurde. Es konnten auf dem Blot Banden nachgewiesen werden, die dafür sprechen, dass die Proteine, die von den Plasmiden *pLE19*, *pLE20*, *pLE21*, *pLE22* und *pLE23* kodiert werden, erfolgreich im zellfreien System hergestellt wurden. Die Proteine, die durch die Plasmide *pLE24* und *pLE25* kodiert werden, zeigten keine Banden im Blot. Die Banden des Kontrollproteins sind wie in jedem bisherigen Blot deutlich zu erkennen. Der Versuch die Proteine PFF1550w und PFB0995w in dem SP6 Vektorsystem herzustellen und zu vergleichen war nur bedingt erfolgreich. Die Proteine, denen das LepP2 als Sonde fehlt (PLE24, PLE25), konnten nicht detektiert werden.



## 4. Diskussion

### 4.1 Topologie Vorhersagen

Die bisherigen Ergebnisse aus vorliegenden Studien zur Topologie der STEVOR Proteine sind noch begrenzt und widersprechen sich teilweise. Die aktuellsten Ergebnisse zeigen, dass die semi-konservierte Region in den extrazellulären Raum ragt und somit eine Ein-Transmembran-Topologie wahrscheinlich ist (Bachmann et al., 2015; Niang et al., 2014; Niang et al., 2009).

Die Vorhersage der bioinformatischen Programme erzielt ein widersprüchliches Ergebnis im Vergleich zu den aktuellen Theorien von lediglich einer Membrandomäne und stimmt mit den Ergebnissen von Cheng et al. (1998) überein. Die Programme schlagen eine Zwei-Transmembran-Topologie vor, die in Abbildung 04 schematisch dargestellt ist. In diesem Modell bildet der Teil des Proteins, der bisher als hydrophobe Region beschrieben wurde (Abbildung 1), ebenso eine Transmembrandomäne. Neben dem generellen Aufbau des Proteins zeigen die bioinformatischen Ergebnisse auch die Anordnung und Anzahl an Wild-Typ Glykosylierungen im Protein. Die Ergebnisse der Topologievorhersagen habe ich versucht mit der von mir überlegten Methodik, durch das Zugeben von Mikrosomen und das daraus folgende glykosylieren der Proteine, zu verifizieren. Durch die bereits erwähnte Mutagenese von zusätzlichen Glykosylierungen erhalten wir unterschiedliche Varianten. Durch diese Variation soll dann im Ausschlussverfahren der Aufbau der STEVOR Proteine entweder nach meinen Annahmen bestätigt oder widerlegt werden.

### 4.2 Klonierung

Da die Topologie der STEVOR Proteine experimentell noch nicht eindeutig bestimmt worden ist, ist die Idee dieser Studie, mit zusätzlichen Sonden an beiden Seiten des Proteins zu arbeiten. Hierbei habe ich nach Studien von (Nilsson et al., 2000) das *E. coli* Protein ProW am N-terminus des Proteins und die den C-terminalen Loop der leader peptidase 2 (LepP2) am C-terminus angebaut. Aus den Studien ist bekannt, dass sich diese beiden Proteine bei Vorhandensein von potentiellen Glykosylierungsmotiven auch in Gegenwart von Mikrosomen glykosylieren lassen. ProW hat das Potential den folgenden N-terminalen Teil des Proteins auf die luminaire Seite zu ziehen. Durch die Klonierungen wurden nun für die zu testenden STEVOR Proteine PFF1550w und PFB0995w eine Vielzahl von Plasmiden

erzeugt, die die STEVOR Proteine mit verschiedenen langen N- und C-terminalen Sonden mit ProW bzw. LepP2 kodieren. Es wurden auch Konstrukte generiert, die zu Proteinen führen, welche keine N- oder C-terminalen Fusionen tragen.

Alle Klonierungen zeigten den erwünschten Erfolg (Abbildung 06, 07, 08). Sollten Klonierungen nicht im ersten Durchgang die gewünschten Ergebnisse bringen, optimierte ich die PCR. Durch die Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO) wird die Schmelztemperatur der verwendeten Oligos erniedrigt und somit das erfolgreiche Binden der Primer an das Template weniger stringent. Ebenso kann die Änderung der Temperatur während der PCR zu einer spezifischeren Primer-Template Bindung führen und somit die Qualität des PCR Produkts verbessern. Durch diese feinen Einstellungen konnten alle Klonierungen erfolgreich durchgeführt werden.

### 4.3 Genexpression

Die STEVOR Proteine habe ich in einem zellfreien Expressionssystem aus Kaninchen Retikulozyten Lysat hergestellt. Generell lässt sich feststellen, dass sich dieses System für das Projekt geeignet hat, jedoch durch seine schwere Reproduzierbarkeit deutliche Schwachstellen mit sich bringt.

In diesem Projekt sollte durch Glykosylierungen die Topologie der STEVOR Proteine untersucht werden. Die gezeigten Blots zeigen, dass die einzelnen STEVOR Proteine im gewählten System hergestellt werden können. Es ist jedoch nicht möglich einzelne oder mehrfache Glykosylierungsbanden der Proteine zweifelsfrei zu detektieren. Je nach Größe und Aufbau ist ebenso die Darstellung der Proteine im zellfreien System schwierig und nicht immer reproduzierbar. Die Abbildungen 12 und 13 zeigen deutlich Banden auf den gewünschten Größen der Proteine. Hierbei handelt es sich um das Protein PFF1550w mit komplettem, bzw. verkürztem ProW. Jedoch ist in diesem Blots nicht die durch Glykosylierung hervorgerufene, doppel- bzw. dreifach Bande in der Spur mit den Mikrosomen zu sehen. Auffällig ist hier, ebenso wie in allen anderen Blots, dass die Bande des Proteins schwächer wird und höher liegt, bzw. deutlich breiter wird. Die Konturen dieser Banden zerfließen in allen Fällen und sind nicht genauso klar zu erkennen, wie die Banden des Proteins ohne die Zugabe von Mikrosomen. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass das Protein in die Mikrosomen eingebaut wurde. Die von mir gewünschte deutliche Identifikation von unterschiedlich vielen Banden ist jedoch nicht möglich. Die Doppelbanden, die z.B. in

Abbildung 13 sehr deutlich zu sehen sind, lassen eher darauf schließen, dass es sich hierbei um unspezifische Banden durch den Einsatz der Mikrosomen handelt.

Im Vergleich der beiden Promotoren aus SP6 und T7 zeigt sich ein eindeutiges Ergebnis. Die Proteine, die unter der Kontrolle des T7 Promotors hergestellt wurden, sind häufiger und deutlicher zu sehen, als die Proteine unter der Kontrolle des SP6 Promotors. Es ist fraglich, ob die Sonden einen Vorteil für die zellfreie Darstellung der Proteine mit sich bringen, oder ob diese zu groß sind und das Bilden des Proteins erschweren. Im Vergleich der unterschiedlichen Größen der Proteine zeigt sich, dass in allen Fällen mit vollständigem bzw. verkürztem ProW und LepP2 Sonde die Proteine deutlich zu erkennen sind (Abbildung 12). Die STEVOR Proteine ohne LepP2- und bzw. oder ProW-Fusionspartner sind nur sehr schwer im Blot detektierbar. (Abbildung 15 und 16).

Ein weiterer Punkt der auffällt ist, dass das Protein PFF1550w im Gegensatz zu PFB0995w deutlich häufiger auf den Blots zu erkennen ist. Nach Rücksprache mit Dr. Anna Bachmann (BNITM, Hamburg), stellte sich heraus, dass Ihre Testversuche ein ähnliches Ergebnis ergaben. Sie arbeitet vorrangig mit den Proteinen PFC0025c, PFC1105w und PFL2610w, welche bessere Ergebnisse erzielten als die von mir untersuchten Proteine. Dies ist ein Ansatzpunkt für die weitere Forschung. Es sollten die anderen Proteine in dem am besten funktionierenden System untersucht werden und ein Vergleich erstellt werden. Als bestes funktionierendes System empfehle ich an dieser Stelle, wie oben beschrieben, die vollständigen Sonden ProW bzw. die verkürzte ProW und LepP2.

Die Qualität meiner Ergebnisse hinsichtlich der Spezifität und Signalstärke der Blots ist mit der von Blots vergleichbar, die bereits in Veröffentlichungen zu ähnlichen Fragestellungen gezeigt wurden. Die Proteine mit Glykosylierungen sichtbar zu machen, ist unter anderem in der Veröffentlichung von Goel et al. (2015) am Beispiel der RIFINs gezeigt. Die Qualität dieser Ergebnisse liegt auf einem ähnlichen Level wie meine Ergebnisse. Jedoch arbeite ich mit einem nicht radioaktiven System, wohingegen alle vergleichbaren Veröffentlichungen mit Radioaktivität arbeiteten (Goel et al., 2015). Somit habe ich im Rahmen dieser Bachelorarbeit die nicht-radioaktive Detektion der Produkte der zellfreien Herstellung von Proteinen etabliert.

Das System aus Kaninchen Retikulozyten Lysat ist, wie bereits beschrieben, kein stabiles System, da die Ergebnisse nicht reproduzierbar sind und durch viele Faktoren beeinflusst werden. Die gezeigten Ergebnisse sind nur mit komplett sauberen Arbeiten, dem Anfertigen von SDS Gelen noch am selben Tag, Sterilfiltrieren des Antikörpers und deutlich längeren Waschzeiten verbunden. Selbst dann sind die Ergebnisse nicht reproduzierbar und die

Wahrscheinlichkeit von unbrauchbaren Blots ist gegeben. In früheren Forschungen aus meinem Praxissemester in diesem Labor hat sich gezeigt, dass kein anderes auf dem Markt zur Verfügung stehende System die von uns gewünschten Proteine herstellen kann. Die einzige Möglichkeit eines stabileren Systems wäre ein System aus humanen Zellen, welches sehr teuer ist. Eine andere Überlegung wäre es, die Proteine mit fluorophore BODIPY®-FL getaggtter tRNA herzustellen. Der Fluoreszenzfarbstoff kann dann direkt angeregt werden und die Proteine können ohne die Notwendigkeit eines Blots im SDS Gel sichtbar gemacht werden. Eine weitere Möglichkeit, um bessere Ergebnisse der Glykosylierungen der Proteine zu erlangen, wäre der Verdau mit der Endoglycosidase H (Endo H). Diese baut die Glykosylierungen am Protein wieder ab, so dass, sollte es zu Glykosylierungen durch die Zugabe der Mikrosomen gekommen sein, diese wieder abgebaut werden und dieser Unterschied würde dann im Vergleich im Blot, über eine 1-2 kDa kleinere Bande, zu sehen sein.

Die von mir gewünschten Aussagen über die Topologie der STEVOR Proteine können nicht gemacht werden. Es ist möglich, die Glykosylierungen durch Bandenveränderungen im Blot sichtbar zu machen. Die bisher erzielten Ergebnisse sind jedoch noch nicht ausreichend, um Rückschlüsse auf die Topologie der STEVOR Proteine zu ziehen. Somit war der technische Teil der Studie teilweise erfolgreich, ohne dass eine biologische Fragestellung beantwortet werden konnte. Da eine vollständige Methode entwickelt werden konnte, kann mit dieser in Zukunft weiter geforscht werden, um das Potential der Methode zur Untersuchung der Topologien der STEVOR Proteine erfolgreich zu nutzen.

## 5. Zusammenfassung

Malaria ist auch heute noch eine ernsthafte Erkrankung und die Funktionsweisen der Parasiten im Menschen sind immer noch nicht vollständig erforscht. Um den Mechanismus des *Plasmodium falciparum* und seiner Bindung der von ihm infizierten Erythrozyten mit den humanen Rezeptoren zu verstehen, bedarf es intensiver Forschung. Meine Studie beschäftigte sich mit den STEVOR Proteinen, die neben den PfEMP1 und den RIFIN eine wichtige Rolle in dieser Interaktion spielen. Die Topologie der STEVOR Proteine ist noch nicht gänzlich erforscht. Experimentelle und theoretische Ergebnisse weichen voneinander ab und so ist noch nicht zweifelsfrei geklärt, ob ein- oder zwei Transmembrandomänen in den Proteinen vorliegen.

Das Ziel meiner Studie war es, die STEVOR Proteine in einem *in vitro* Transkriptions/Translationssystem herzustellen und durch die Durchführung der Experimente in Gegenwart von Mikrosomen aus dem sich ergebenden Glykosylierungsmuster Rückschlüsse auf die Topologie der STEVOR Proteine ziehen zu können.

Die Ergebnisse meiner Studie zeigen, dass es möglich ist, die STEVOR Proteine in einem *in vitro* Transkriptions/Translationssystem herzustellen. Es gibt jedoch Abweichungen zwischen den Proteinen, dem Aufbau des Vektorsystems, sowie dem Vorhandensein der Sonden. Die Ergebnisse zeigen hier, dass die Sonden für die Expression benötigt werden und dass sowohl das SP6-, als auch das T7 Vektorsystem geeignet sind. Es ist möglich die Proteine ohne Radioaktivität zu detektieren. Die Glykosylierungen der Proteine können teilweise sichtbar gemacht werden. Eine genaue Aussage über die Anzahl der Glykosylierungen kann nicht getroffen werden und somit kann keine Einschätzung zur Topologie der STEVOR Proteine gegeben werden.

In Zukunft ist eine Weiterarbeit an dieser Studie denkbar. Das von mir entwickelte System und der aus dieser Studie gezeigte optimale Aufbau des Vektorsystems bieten Grund für weitere Forschung. Die Klonierung der fehlenden STEVOR Proteine, das Weiterentwickeln der Methode, so dass die Notwendigkeit des Blottens entfällt, sowie der Verdau der durch die Mikrosomen glykosylierten Proteine mit Endo H wäre nun der nächste Schritt.

## Literaturverzeichnis

- Bachmann, A., Scholz, J. A. M., Janßen, M., Klinkert, M.-Q., Tannich, E., Bruchhaus, I., & Petter, M. (2015). A comparative study of the localization and membrane topology of members of the RIFIN, STEVOR and PfMC-2TM protein families in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Malaria Journal*, *14*(1), 274. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0784-2>
- Brooks, S. a. (2006). Protein glycosylation in diverse cell systems: implications for modification and analysis of recombinant proteins. *Expert Review of Proteomics*, *3*(3), 345–359. <https://doi.org/10.1586/14789450.3.3.345>
- Bultrini, E., Brick, K., Mukherjee, S., Zhang, Y., Silvestrini, F., Alano, P., & Pizzi, E. (2009). Revisiting the *Plasmodium falciparum* RIFIN family: from comparative genomics to 3D-model prediction. *BMC Genomics*, *10*, 445. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-445>
- Cheng, Q., Cloonan, N., Fischer, K., Thompson, J., Waine, G., Lanzer, M., & Saul, A. (1998). *stevor* and *rif* are *Plasmodium falciparum* multicopy gene families which potentially encode variant antigens. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *97*(1–2), 161–176. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(98\)00144-3](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(98)00144-3)
- Goel, S., Palmkvist, M., Moll, K., Joannin, N., Lara, P., R Akhouri, R., ... Wahlgren, M. (2015). RIFINs are adhesins implicated in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature Medicine*, *21*(4), 314–317. <https://doi.org/10.1038/nm.3812>
- Hiller, N. L. (2004). A Host-Targeting Signal in Virulence Proteins Reveals a Secretome in Malarial Infection. *Science*, *306*(5703), 1934–1937. <https://doi.org/10.1126/science.1102737>
- Joannin, N., Abhiman, S., Sonnhammer, E. L., & Wahlgren, M. (2008). Sub-grouping and sub-functionalization of the RIFIN multi-copy protein family. *BMC Genomics*, *9*, 19. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-19>
- Lavazec, C., Sanyal, S., & Templeton, T. J. (2007). Expression switching in the *stevor* and *Pfmc-2TM* superfamilies in *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology*, *64*(6), 1621–1634. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05767.x>
- Makhtar Niang, Amy Kristine Bei, Kripa Gopal Madnani, Shaaretha Pelly, Selasi Dankwa, Usheer Kanjee, Karthigayan Gunalan, Anburaj Amaladoss, K. P. Y., & Ndeye Sakha Bob, Benoit Malleret, , Manoj Duraisingh, and P. R. P. (2014). The variant STEVOR protein of *Plasmodium falciparum* is a red cell binding protein important for merozoite invasion and rosetting. *Cell Host Microbe*, *16*(1), 81–93.

- <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.06.004>. The
- Marti, M. (2004). Targeting Malaria Virulence and Remodeling Proteins to the Host Erythrocyte. *Science*, *306*(5703), 1930–1933. <https://doi.org/10.1126/science.1102452>
- McRobert, L., Preiser, P., Sharp, S., Jarra, W., Kaviratne, M., Taylor, M. C., ... Sutherland, C. J. (2004). Distinct trafficking and localization of STEVOR proteins in three stages of the Plasmodium falciparum life cycle. *Infection and Immunity*, *72*(11), 6597–6602. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.11.6597-6602.2004>
- Niang, M., Xue, Y. Y., & Preiser, P. R. (2009). The Plasmodium falciparum STEVOR multigene family mediates antigenic variation of the infected erythrocyte. *PLoS Pathogens*, *5*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000307>
- Nilsson, I., Witt, S., Kiefer, H., Mingarro, I., & Von Heijne, G. (2000). Distant downstream sequence determinants can control N-tail translocation during protein insertion into the endoplasmic reticulum membrane. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(9), 6207–6213. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.9.6207>
- Petter, M., Bonow, I., & Klinkert, M. Q. (2008). Diverse expression patterns of subgroups of the rif multigene family during Plasmodium falciparum gametocytogenesis. *PLoS ONE*, *3*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003779>
- Sanyal, S., Egeé, S., Bouyer, G., Perrot, S., Safeukui, I., Bischoff, E., ... Lavazec, C. (2012). Plasmodium falciparum STEVOR proteins impact erythrocyte mechanical properties. *Blood*, *119*(2). <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-370734>
- van Geest, M., & Lolkema, J. S. (2000). Membrane topology and insertion of membrane proteins: search for topogenic signals. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : *MMBR*, *64*(1), 13–33. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.1.13-33.2000>
- von Heijne, G. (2006). Membrane-protein topology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *7*(12), 909–918. <https://doi.org/10.1038/nrm2063>
- Wahlgren, M., Goel, S., & Akhouri, R. R. (2017). Variant surface antigens of Plasmodium falciparum and their roles in severe malaria. *Nature Reviews Microbiology*, *15*(8), 479–491. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.47>
- Yam, X. Y., Niang, M., Madnani, K. G., & Preiser, P. R. (2017). Three Is a Crowd – New Insights into Rosetting in Plasmodium falciparum. *Trends in Parasitology*, *33*(4), 309–320. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.12.012>

## Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlichst bei allen beteiligten dieser Bachelorarbeit bedanken.

Das größte Dankeschön geht an Frau Dr. Susanne Witt, die mich herzlich in Ihrer Laborgruppe aufgenommen hat und mir die Chance gab, meine Tätigkeiten im Labor, sowie mein fachliches Wissen deutlich zu verbessern. Ich danke für Ihr Vertrauen in meine Arbeit und die dauerhafte Unterstützung, sowie den anhaltenden Spaß bei der Arbeit. Bei Problemen konnte ich mich stets an Sie wenden und wir entwickelten zusammen neue Strategien. Zudem bedanke ich mich für die Übernahme der Rolle der Zweitgutachterin.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. Stephan Noll. Er war bereit die Rolle des Erstgutachters für mich als erste Bachelorarbeit anzunehmen, obwohl die Übernahme des Fachbereiches der Mikrobiologie viel Zeit und Arbeit in Anspruch nahm. Bei Fragen und Problemen fand sich stets Zeit für ein persönliches Gespräch.

Für die anfängliche Einarbeitung und die freundliche Betreuung bei Problemen bedanke ich mich herzlich bei Frank Geisinger und Nikolas Mohr. Zudem danke ich ebenso der Praktikantin Melina Fonfara, für die fortwährende gute Laune und den Spaß im Labor. Die gesamte Laborgruppe sorgte für eine angenehme Laboratmosphäre. Ein weiteres Dankeschön möchte ich an dieser Stelle auch an Frau Dr. Anna Bachmann ausrichten, für die Bereitstellung der DNA der STEVOR Proteine und Ihre Beratung bei Fragen zum Protein aller Art.

Meine tiefste Verbundenheit möchte ich an dieser Stelle ebenso meiner Familie und meinen Freunden für die andauernde Motivation und das vertreiben von Zweifeln, während des gesamten Studiums, aussprechen.



## III Anhang

## A. Primer

Tabelle 34: Auflistung der Primer

Name	Primer 5'-3'
Delete_EcoRI_in LepP2_f	GAAACCAAAGAAAATGGGATTCGTCTTTCCGAGCGTAAAGAG ACACTG
Delete_EcoRI_in LepP2_r	CAGTGTCTCTTTACGCTCGGAAAGACGAATCCCATTTTCTTTGG TTTC
ProW_Kozak_Xb aI_f	GAGAGATCTAGAAATAATTTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATA CCACCATGGCTGATCAAATAATCCGTGGGATACC
ProW_Bam_Kpn I_r	TCTCTCGGTACCTCCGGATCCACCGTTGAGGATATAATCAACC GG
LepP2_EcoRI_S ma_f	GAGAGAGAATTCGGGCCC GGTTCCAGATCCCGTCAGGTTCGA TG
LepP2_A30_Mlu I_r	TCTCTCACGCGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAT GGATGCCGCCAATGCGAC
PFF1550w_in_N NT_Konstrukt_f	CCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAAACACCACCAT GGCTGATCAAATAATACGAAGATGTATTACCTTAAAATGTTA TTGTTTAAAC
PFF1550w_in_N NT_Konstrukt_r	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACTTACATAAATGTT TCTTGCATTCATG
PFF1550w_in_S NT_Konstrukt_f	CCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAAACACCACCAT GGCTGATCAAAGTAATACGAAGATGTATTACCTTAAAATGTTA TTGTTTAAAC
PFF1550w_in_S NT_Konstrukt_r	CCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAAACACCACCAT GGCTGATCAAATAATACGAATTATCAAATAACCATTATAAC ATAAGG
Glyc_ProW_tail_ f	CCACCATGGCTGATCAAATAATACGTGGGATAACCACGC
Glyc_ProW_tail_ r	GCGTGGTATCCCACGTATTATTTTGATCAGCCATGGTGG
KpnI_Glyc_Pro W_tail_f	GGAGATACCACCATGGCTGATCAAATGGTACCTGGGATACCA CGCCAG
KpnI_Glyc_Pro W_tail_r	CTGGCGTGGTATCCCAGGTACCATTTTGATCAGCCATGGTGGT ATCTCC
KpnI_noGlyc_Pr oW_tail_f	GGAGATACCACCATGGCTGATCAAAGTGGTACCTGGGATACC
KpnI_noGlyc_Pr oW_tail_r	GGTATCCCAGGTACCACTTTGATCAGCCATGGTGGTATCTCC
PFF1550w_glyc_ loop2_f	CTCCAGTTCATTATTTTCATATATTTTCATGGTGGTTCAAACACTA CAGCTCTTAAAGCAAC
PFF1550w_glyc_ loop2_r	GTTGCTTTAAGAGCTGTAGTGTGTTGAACCACCATGAAATATAT GAAATAATGAACTGGAG
PFB0995w_degly c_f	GAAGAAAGAATTAATAAATATATAGAGACTAAAATTCTTTTG AAGAATTACACGGATTATTAGTG
PFB0995w_degly	CACTAATAATCCGTGTAATTTCTCAAAGAATTTTTAGTCTCTA

c_r	TATATTTTTTAATTCTTTCTTC
PFB0995_Kpn_f	GAGAGAGGTACCATGAATATATATTACATTAATATGTTAGTAA TG
PFB0995_StopAf III_r	TCTCTCCTTAAGTTAGGTGCTTAAATGTTTCTTGCATT
PFF1550w_NcoI f	GAGAGACCATGGCTAAGATGTATTACCTTAAAATGTTATTG
PFF1550w_SmaI r	TCTCTCCCCGGGCTTACATAAATGTTTCTTGCATTCATG
IVT_Konstrukte XbaI Sp6 f	GATTTAGGTGACACTATAGAGGAAACAGGAGGAGACCACAAC GGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTG
IVT_Konstrukte SacI Sp6 r	TCTCTCGAGCTCGTTAGCAGCCGGATCACGCG
PFB0995w_NcoI f	GAGAGACCATGGCTAATATATATTACATTAATATGTTAGTAAT G
PFB0995w_SmaI r	TCTCTCCCCGGGGGTGCTTAAATGTTTCTTGCATTC
PFB0995w_glyc_ loop2_f	CGGTTTGTATTCTTTAGATATTGCTAATAATTTTACGAAGGCGC TTGC
PFB0995w_glyc_ loop2_r	GCAAGCGCCTTCGTAAAATTATTAGCAATATCTAAAGAATACA AACCG
IVT_Konstrukte verkürzt_XbaI_S p6_f	GGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTG
IVT_Konstrukte verkürzt_SacI_Sp 6_r	TCTCTCGAGCTCGGGACTTGGCCC GGTTACTTTGTTAGCAGCC GGATCACG
PFF1550w_NcoI f	GAGAGACCATGGCTAAGATGTATTACCTTAAAATGTTATTG
PFF1550w_AflII r	TCTCTCCTTAAGTTACTTACATAAATGTTTCTTGCATTCATG
PFB0995w_NcoI f	GAGAGACCATGGCTAATATATATTACATTAATATGTTAGTAAT G
PFB0995w_AflII r	TCTCTCCTTAAGTTAGGTGCTTAAATGTTTCTTGCATTC

B. Sequenzen der *stevor* GenePFB0995w:

ATGAATATATATTACATTAATATGTTAGTAATGTCCATTTTATTGATTGTTTTATTT  
 TTATCATATAATGTAAATAATCATAATAAAAAATATAATGTAGGCTATATTCAA  
 ATAACAGACAAATGATAATGATGAAATCAAGACGTTTAGCTGAAATTCAATTGCC  
 TAAGTGTCCACACTATAACAATGATCCAGAGCTTAAAAAATAATTGACAAATTG  
 AATGAAGAAAGAATTAATAATATATAGAGACTAATAATTCTTTTGAAGAATTAC  
 ACGGATTATTAGTGAAAGAAAGAACCAAATCTTTATATGAGAATGGTATGAAGA  
 AATCCTCGAATATGGAAAAGGAATTATTGAAAAAATATGATGATTCAATTCGTGA  
 TGAACATAATGTTATCTCAAATCAGGAATTTACACAAGTGATTATAGAAAATTA  
 TATGATAAATCTTGTGATTATCAAATCAAAGATATTGAGAGATGAATTGGCTT  
 CATGCTGTAAGGTACATGATAATTATTAGATAATTTAAAAAAGGGTTGCTTTGG  
 AGGTGTAGGTATATGTACATTGTGCTCTCTTCTTGTGAGCAATATTGGTATTGGAT  
 ATGCTGTGACTGCTGCTAAAGAGGTAATTACCGGTTTGTATTCTTTAGATATTGCT  
 AATAAATTTACGAAGGCGCTTGCTGGTATCTATTTCTTTTTTAGTTCTTCAATCGA  
 GAATGCTGGTGTCTCTGGTGTACTATTTTTTATTGGGATTCTATGAGAATGGCTA  
 GTATTGCGAGTTCTACTATTAATCCTTATGGTATTGCAGCTCTGGTATTAATTGTA  
 TTAGTTGTTGTACTIONTATAGTATTATATATATGGTTGTATAGAAGACGAAAAAAT  
 CATGGAAACATGAATGCAAGAAACATTTAAGCACCTAA

PFF1550w:

ATGAAGATGTATTACCTTAAAATGTTATTGTTTAACTTTTTAATAAATGTTTTAGT  
 ATTACCACATTATGAAAATTATCAAATAACCATTATAACATAAGGCTCATACCA  
 AATAACACATACAGAATAACGATAAAATCAAGACTCTTAGCACAAACCCAAATC  
 CATAATCCACATTATCATAATGATCCAGAACTCAAAGAAATAATTGATAAATTGA  
 ACGAAGACGCAATAAAGAAATACCAACAAACTCATGATCCATATGAACAATTAC  
 AAGAAGTAGTAGAAAAAATGGAACAAAATATAAAGGTGGTAATGATGCAGAA  
 CCTATGTCAACGCTAGAAAAAGAATTATTGCAAACATATGAAGAAGTGTGGTA  
 ACGAAAGTGATATGTTGAAGTCGGGAATGAATACAAATGTTGATGAAAAATCTTC  
 AACATGTGGATGTACTGATATTAATGGTGTGAAATTAGCAAAAACAAAAGGAAG  
 AGATAAGTATTTAAAACACTTAAAACATAGATGTACCCGTGGTATATGTTTTTGC  
 TCAGTTGGTAGTGCATTGTTAACTATGTTTCGGTTTGGCAGTTGCAAAAAAAGCTG  
 CCGTTGATGCCATCCTTCCTGTATATGTAGCAGCGATTA AAAAGTGTGTATCCTCC

AGTTCATTATTTTCATATATTTTCATGGTGGTTCATTAACACTACAGCTCTTAAAGCAAC  
 CGAAGCGTGTGCAAGTGTTGCAGGTCCAGATATAGTCATACCTGCTACAGGTGCT  
 GCTATAGGTGCATTTCCCCCTTATGGTATTGCAGCTTTAGTACTACTTATATTAGC  
 TGTTCTACTTATAATATTATACATATGGTTATATAGAAGAAGAAAAAATTCATGG  
 AAACATGAATGCAAGAAACATTTATGTAAGTAA

PFC1105w:

ATGAAGATGTATAACCTTAAAATGTTATTGTTTACCTTTTTAATAAATACATTAGC  
 ATTACCACATTATGATAATTATCAAAAATAGCCATTATAATATAAACCTAATACAA  
 TATAGAGCACAAAGAACAACGATAAATTCAAGATTATTAGCACAAACAAAAAAT  
 CATAATCCGCATTATCATAATGACCCAGAACTCAAAGAAATAATTGATAAAAATGA  
 ACGAGGAAGCAATCAAAAAATACCAACAAACTCATGATCCATATAAACAATTGA  
 AAGATGTAGTAGAAAAAATGGAACAAAATATACAGGTGGTAAAGATGCAGAAC  
 CTATGTCAACGCTAGAAAAAGAATTATTGGAAACATATGAAGAAATGTTTGGTAA  
 CGAAAGTGATATGTTGAAGTCGGGAATGAGTCCAAATGTTGATGAAAAATCTTCA  
 ACATGTGAATGTAAGTACTGATATTAATGGTGTGAAATTAGCAAAAACAAAAGGAAGA  
 GATAAGTATTTAAAACACCTAAAACACAGATGTATAGGTGGAATATGTTCTTGTT  
 CAGTAGGTAGTTTCCCTATTAACAATGTTCCGGTTTGCATGCTGCTAAAGTTGCTGCT  
 GTTGCTGCCGTCCTTTCTACCTATGGAAAACTTCAACTTGTTTCATCAGTTCTTTC  
 TATAACTAATATGTTTAATCCTGCTACATTACAGTCAGTTCTTTGTGCAACCAATG  
 GTTGTACTATTGGTGCTTCTGATGTAGTATTACCTGCTACAAGTGCTGCTATGGGA  
 ACATTTCAACCTTGTTGGTATTGCAGCTTTGGTTCTGCTTATATTAGCTGTTGTACTT  
 ATAATATTATATATATGGTTGTATAGGAGAAGAAAAAATTCGTGGAAACATGAAT  
 GCAAGAAACATTTATGCAAGTAA

PFC0025c:

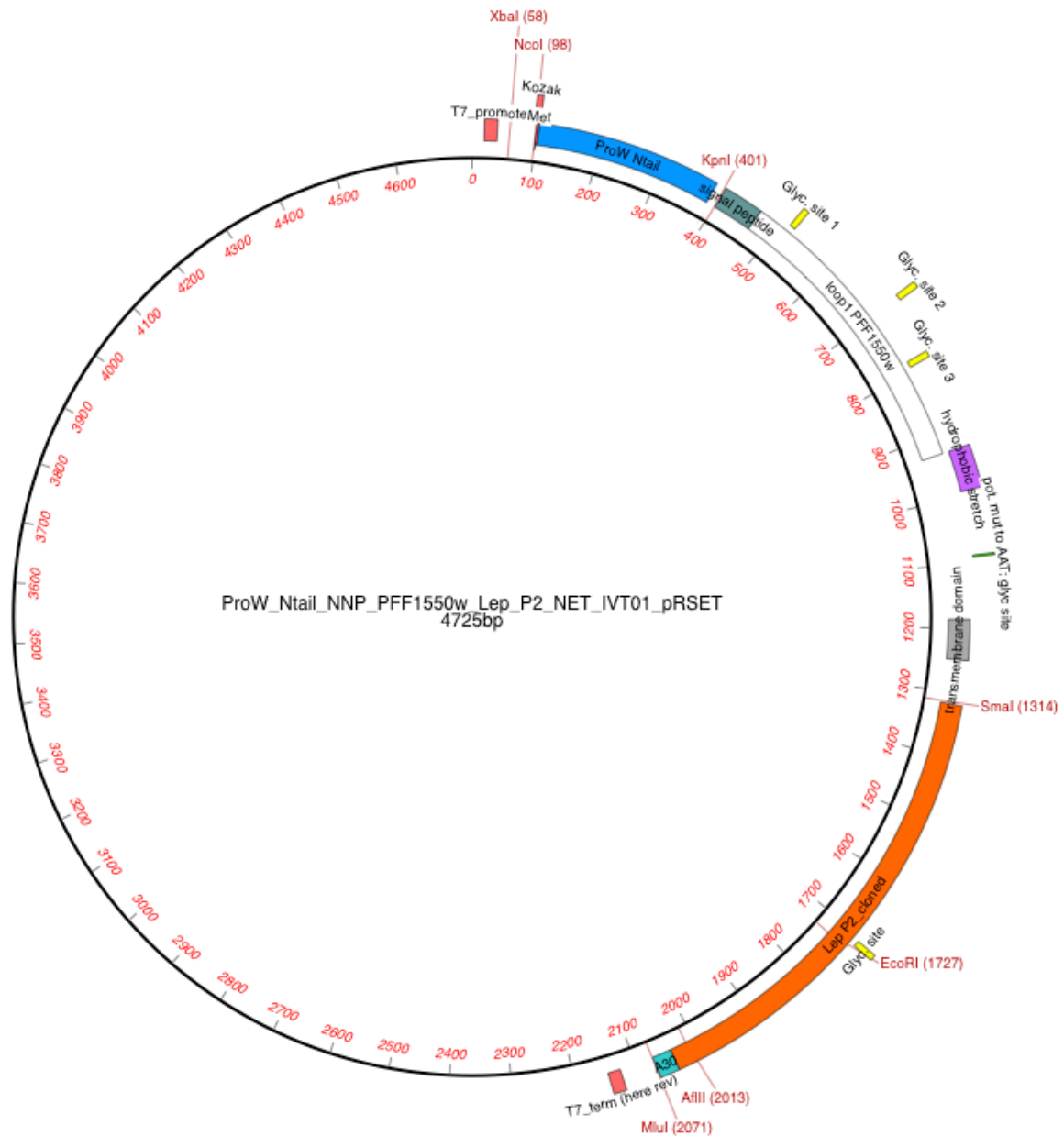
ATGAAGATGTATTATCTAAAAATGTTATTGTTTACCTTTTTAATAAATACATTAAT  
 ATTACCACATTATGAGAATTATCTAAATAATGATTATAATGTAAGTTTCATTCAAA  
 ACAACACCAAAAAGAACAACGATAAAAATCAAGACTCTTAGCACAAACCCAAATCC  
 ATAATCCGCATTATCATAATGATCCAGAACTCAAAGAAATAATTGATAAAAATGAA  
 CGAGGAAGCAATCAAAAAATATCAACAAACTCATGATCCATATGAACAATTGAA  
 AGAAGTAGTAGAAAAAATGGAACAAAATATTCAGGTGGTAATGATGCAGAACCC  
 TATATCAACGCTAGAAAAAGAATTATTGGAAACATATGAAGAAATTTTTGGTAAAC  
 GAAAGTGATATGTTGAAGTCGGGCATGAGTCCAAATGTTGATGAAAAATCTTCAA

CATTTGAATGTACTGATATTAATGGAGTGAAGTTAGCAAAAACAAAAGGAAGAG  
ATAAGTATTTAAAACACTTAAAAGGGAGATGTACCCGTGGTATATATTTTTGCTC  
ACTTGGTAGTGTAATCTTAACATATATAGGTACGACCGCTGCAAAAGGTGCTGCT  
ATTTCTACCGCGGGTGCTGGGTCTAAGAACTGTATATACGCTATATCTATATTTCA  
TATGCTTAATCATAAATCTATGTCTTCAGCTCTTACAGCATTAGGTACAGTAGGTT  
GTGCTGCTGATTACGCATCAGGTGCAACTTCTGCTAGTGCAATTTTTCTGCCTTGT  
GGTATTGCAGCTTTGGTTCTGCTTATATTAAGTGTCTACTTATAATATTATATATA  
TGGTTATATAGAAGAAGAAAAAGATCATGGAAACATGAATGCAAGAAACATTTA  
TGTAAGTAA

PFL2610w:

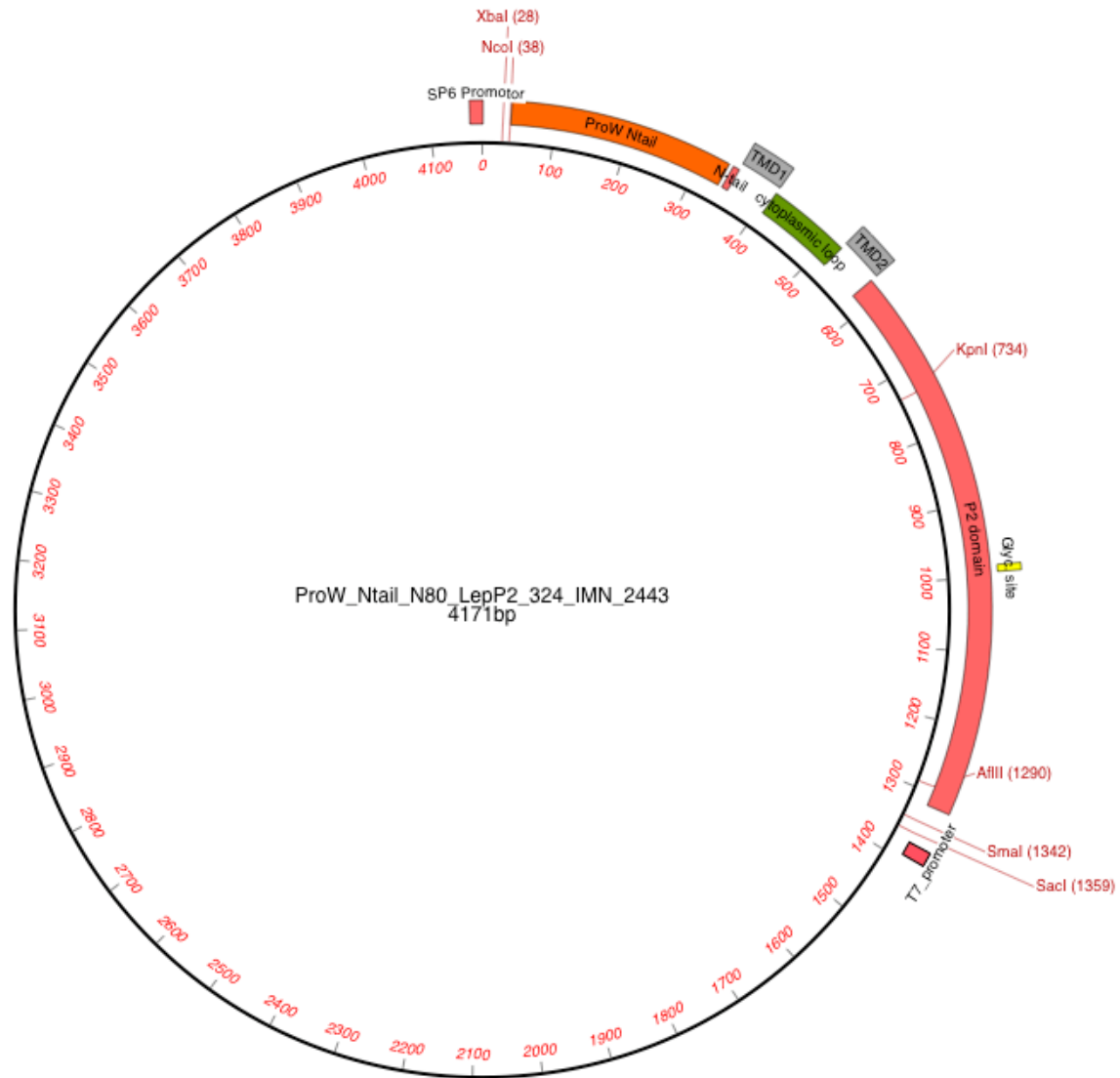
ATGAATATGTATTACCTAAATATGTTATTGTTTACCTTTTTAATAAATACATTAGT  
ATTACCACATTATGAGAATTATCTAAATAACCATTATAATGTAAGTCTTATTCAAA  
ACAAGACCAAAGAGCAACGATAAATTCAAGATTATTAGCACAAACAAAAAATC  
ATAATCCGCATTATCATAATGACCCAGAACTCAAAGAAATAATTGATAAATTGAA  
CGAGGAAGCAATAAAAAAATACCAGCAAACCTCATGATCCATATGAACAATTGAA  
AGATGTAGTAGAAAAAATGGAACAAAATATACAGGTGGTAATGATGCAGAACC  
TAGGTCAACGCTGGAAAAAGAATTATTGGAAACATATGAAGAAATGTTTGGTGA  
CGAATGTCATATGTTGAAGTCGGGTAAGTACCAAATGTTGATGAAAAATCTTCA  
ACATGTGAATGTACTGATATTAATGGTGGGAAATTATCAAAAACAAAAGGAAGA  
GATAAGTATTTAAAAAACTAAAACACAGATGTATAGGTGGGATATGTTCTTGCT  
CAGTAGGTAGTTTTCTCTTAACAATGTTTCGGTTTGCATGCTGCTAAAGCTGCTGCC  
CTTGCTGAGTTTACTAAATATGGAACAACCTTATAGTGCGTGCAAATCCTCTATCA  
CTATATATAGTATGCTTAGTAGTGATTCTATGATTGCAGGTAGTACAGCTTGTTTT  
ACTGATTTAACAGTACCTGCTGCAACTTCTGCTGGTGCAATTTTTGATCCTTGTGG  
TATTACAGCTTTAGTTCTACTTATATTAGCTGTTATACTTATAATATTATATATAG  
GTTGTATAGAAGAAGAAAAAATTCATGGAAACATGAATGCAAGAAACATTTATG  
TAAGTAA

## C. Vektor Konstrukte



**Abbildung 18: T7-Vektor System mit PFF1550w**

Vektor für die Klonierung der STEVOR Proteine in ein System mit T7 Promotor. In diesem Vektor ist das PFF1550w bereits integriert. Der Vektor hat eine Länge von 4725 Basenpaaren. Nach dem T7 Promotor (rot) liegt stromabwärts die beschriebene Kozak-Sequenz (rot), gefolgt von dem ProW Linker (blau). Weiter folgt das Protein PFF1550w mit seinem eigenen Signalpeptid (dunkelgrün) und den enthaltenen Glykosylierungsstellen (gelb). Ebenso zum PFF1550w gehört die Hydrophobe Region (lila) und die Transmembrandomäne (grau). Nach dem Protein folgt das LepP2 als Linker (orange), mit einer potentiellen Glykosylierungsstelle und dann am Ende der A30-Schwanz (türkis).



#### Abbildung 19: SP6-Vektor System

Vektor für die Klonierung der STEVOR Proteine in ein System mit Sp6 Promotor. Dieser Vektor wurde vom Department der Biochemie, Stockholm University, Stockholm, Schweden zur Verfügung gestellt.

In diesem Vektor ist das PFF1550w nicht integriert. Der Vektor hat eine Länge von 4171 Basenpaaren. Nach dem SP6 Promotor (rot) liegt stromabwärts der ProW Linker (orange), darauf folgend liegt eine zytoplasmatische Schleife (grün), welche von zwei Transmembrandomänen umgeben ist (grau). Weiter folgt die P2 Domäne, mit einer potentiellen Glykosylierungsstelle und ein T7 Promotor.