

# **Bakterielle Expression eines codon- optimierten Flotillin-1-Fusionsproteins**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Shams Ashaghi, Negin  
aus Gießen

Gießen 2025

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Biochemisches Institut des Fachbereichs Medizin

1. Gutachterin: Prof. Dr. Ritva Tikkanen
2. Gutachterin: PD Dr. Barbara Ahlemeyer

Tag der Disputation: 04.03.2026

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Die Flotillin-Proteinfamilie.....	1
1.1.1 Entdeckung und Vorkommen der Flotilline.....	1
1.1.2 Struktur der Flotilline.....	2
1.1.3 Funktionen der Flotilline.....	3
1.2. Der genetische Code und die Codon-Optimierung.....	5
1.3. Proteinexpression in E. coli-Bakterien.....	7
1.4 Ziele dieser Arbeit.....	9
<b>2. Materialien</b> .....	10
2.1 Materialien und Geräte.....	10
2.2 Chemikalien und Puffer.....	11
2.3 Selbsthergestellte Puffer und deren Zusammensetzung.....	12
2.4 Kits und Säulen.....	14
2.5 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe.....	14
2.6 Plasmide.....	15
2.7 Die verwendeten Primer.....	15
2.8 Bakterienstämme.....	15
<b>3. Methoden</b> .....	16
3.1 Molekularbiologische Standardmethoden.....	16

3.1.1	PCR.....	16
3.1.2	Gelelektrophorese und Aufreinigung.....	17
3.1.3	Verdau des Vektors.....	17
3.1.4	Verdau der PCR-Fragmente.....	17
3.1.5	Ligation und Transformation.....	18
3.1.6	Transformation chemisch kompetenter Zellen.....	19
3.1.7	Plasmidpräparation (Mini).....	19
3.1.8	Plasmidpräparation (Midi).....	20
3.1.9	DNA-Fällung.....	21
3.2.	Biochemische Standardmethoden.....	22
3.2.1	Induktion von Proteinexpression in Bakterien durch Isopropyl- Beta-D-Thiogalactopyranosid (IPTG).....	22
3.2.2	Proteinaufreinigung mithilfe der Affinitätschromatographie.....	22
3.2.3	SDS-Page.....	23
3.2.4	Western-Blot.....	23
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>25</b>
4.1	Vergleich der nicht-optimierten und der optimierten Flot-1 DNA-Sequenz..	25
4.2	Klonierung des optimierten Flotillin-1 in den Vektor pGEX-4T-1 .....	27

4.3 Detektion des expressionsstärksten Flotillin-1-Klons.....	28
4.4 Expressionsvergleich mit verschiedenen Induktionszeiten.....	29
4.5 Vergleich der Expression bei verschiedenen IPTG-Konzentrationen.....	31
4.6 Vergleich der Expression bei Veränderung der Induktionstemperatur.....	32
4.7 Vergleich der Expression bei unterschiedlichen Induktionszeiten.....	34
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>36</b>
5.1 Die Rolle des Protein-Tags und mögliche Auswirkungen einer anderen Tag-Wahl.....	36
5.2 Der Einfluss des Promotors.....	37
5.3 E. coli-Bakterien und die Codon-Optimierung.....	38
5.4 Kompetente E. coli-Zellen.....	39
5.5 Isolation von Flotillin-1 aus Inclusion bodies.....	41
5.6 Schlussfolgerung der Versuchsergebnisse und Ausblick.....	42
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>44</b>
<b>7. Summary.....</b>	<b>45</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>46</b>
<b>9. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>47</b>
<b>10. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>48</b>

<b>11. Literaturverzeichnis</b> .....	49
<b>12. Eidesstaatliche Erklärung</b> .....	55
<b>13. Danksagung</b> .....	56

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Flotillin-Proteinfamilie

### 1.1.1 Entdeckung und Vorkommen der Flotilline

Die Familie der Flotilline besteht aus 2 Mitgliedern. Da sie im Jahre 1997 von zwei unabhängig voneinander arbeitenden Arbeitsgruppen entdeckt wurden, hatten sie zunächst unterschiedliche Namen. Die Arbeitsgruppe Schulte et al.<sup>1</sup> nannte die Proteine „Reggies“, da sie herausfand, dass diese an der Regeneration von retinalen Ganglionzellen von Goldfischen nach einer Nervenläsion beteiligt sind. Die Arbeitsgruppe Bickel et al.<sup>2</sup> nannte ihre neuen Proteine, welche als im Gehirn exprimierte Komponenten von detergentenzresistenten Membranfraktionen beschrieben wurden, zunächst Flotillin-1 und ESA. Als sie feststellte, dass sich beide sehr ähnlich sind, nannte sie sie schließlich „Flotilline“. Hier zu beachten ist, dass Flotillin-1 dem Reggie-2 Protein entspricht und Flotillin-2 dem Reggie-1.

Flotilline sind homologe, hochkonservierte und membranassoziierte Proteine und wurden schon des Öfteren in Verbindung gebracht mit Vorgängen wie der Endozytose, der Signaltransduktion und der Regulation des Zytoskeletts. Gefunden wurden sie bisher in allen Säugetierzellen (Bickel et al., 1997<sup>2</sup>; Volonte et al.<sup>3</sup>, 1999; von Philipsborn et al., 2005<sup>4</sup>), in allen anderen Zelltypen wie zum Beispiel auch in der *D. melanogaster* (Galbiati et al., 1998<sup>5</sup>) und sind heute als ubiquitär exprimiert anerkannt, obwohl sie bisher noch nicht in *Caenorhabditis elegans* oder in knospenden *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen werden konnten (Edgar und Polak 2001<sup>6</sup>, Rivera-Milla et al. 2006<sup>7</sup>). Interessant ist, dass beide Flotilline sogar in bestimmten Blutzellen vorkommen - so zum Beispiel in Makrophagen, Erythrozyten, T- und auch B-Lymphozyten, sowie in Thrombozyten (Mairhofer et al. 2002<sup>8</sup>, Dermine et al. 2001<sup>9</sup>, Solomon et al. 2002<sup>10</sup>, Rajendran et al. 2003<sup>11</sup>, Salzer und Prohaska 2001<sup>12</sup>).

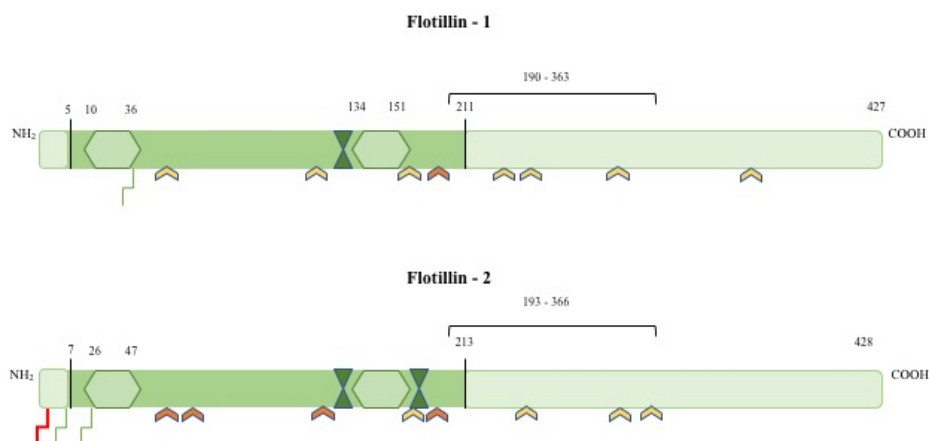
Jedoch ist sowohl ihre Lokalisation als auch ihr Vorkommen abhängig von Gewebe und Stoffwechsel. So kommen sie innerhalb einer Zelle u.a. auch an Oberflächen von vesikulären Kompartimenten vor, präferieren es jedoch, an der Plasmamembran lokalisiert zu sein (Review Langhorst et al 2005<sup>13</sup>).

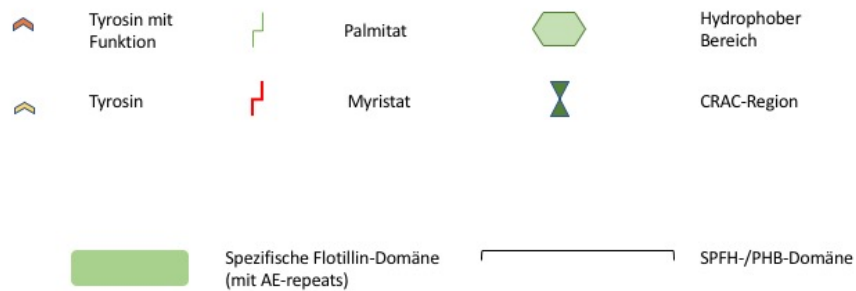
### 1.1.2 Struktur der Flotilline

Flotillin-1 und -2 haben zu ca. 50% eine sehr ähnliche Aminosäuresequenz und unterscheiden sich kaum in ihrer Größe. Das Flotillin-1 besteht aus 427 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 47 kDa, wohingegen das Flotillin-2 aus 428 Aminosäuren besteht und eine molekulare Masse von 48 kDa besitzt (Edgar und Polak 2001<sup>6</sup>). Charakteristisch ist die PHB- (Prohibitin-Homologie) bzw. SPFH- (Stomatin-Prohibitin-Flotillin-HfIK/C) Domäne am N-terminalen Ende beider Flotilline (Liu et al., 2005<sup>14</sup>; siehe Abb. 1). Durch gewisse Fettsäuremodifikationen ermöglichen diese den Flotillinen Interaktionen mit Mikrodomänen und beinhalten außerdem noch Cholesterol *recognition/interaction amino acid consensus* (CRAC)-Bereiche (siehe Abb. 1), welche die Funktion haben Cholesterol zu binden (Roitbak et al. 2005<sup>15</sup>).

Was das C-terminale Ende beider Flotilline angeht, so befindet sich auch hier eine spezielle Domäne, welche normalerweise alpha-Helices beinhaltet, die umeinandergewunden als coiled-coil-Strukturen vorliegen. Typisch dafür sind Repetitionen von Alanin- und Glutamat-Sequenzen (AE repeat). Die *coiled-coil*-Struktur hatten schon Bickel et al. 1997 bei ihrer Entdeckung festgestellt.

Während Solis et al. 2007<sup>16</sup> erklärten, dass das C-terminale Ende der Flotilline für die Oligomerisierung zuständig und die SPFH-Domäne überflüssig ist, vermuteten Bodin et al. 2014<sup>17</sup> auch die Beteiligung der SPFH-Domäne an der Oligomerisierung.





**Abb. 1 Schematische Darstellung der Molekularstruktur von Flotillinen, modifiziert nach Kühne 2015<sup>18</sup>**

Flotillin-1 und -2 weisen trotz ihres ähnlichen Aufbaus auch Unterschiede auf. Im N-terminalen Bereich sind die zur Membranassoziation notwendigen Acylierungen, die Myristin- und Palmitinsäure, erkennbar. Beide Flotilline sind palmitoyliert - wenn auch an unterschiedlichen Stellen. Jedoch ist nur Flotillin-2 zusätzlich auch myristyliert. Gemeinsam haben sie aber die markierten CRAC-Regionen, Tyrosine und hydrophoben Bereiche in der jeweiligen SPFH-(PHB-)Domäne, sowie die sich wiederholenden Alanin- und Glutamat-Sequenzen im C-terminalen Abschnitt.

### 1.1.3 Funktionen der Flotilline

Die Funktionen der Flotilline sind noch nicht im Gesamten erforscht und ergründet. Fest steht jedoch, dass sie an einer Vielzahl von zellulären Prozessen und Vorgängen beteiligt sind. So haben schon 1997 Bickel et al.<sup>2</sup> herausgefunden, dass Flotilline integrale Membranproteine sind und sich somit also u.a. auch an Membrantransportprozessen beteiligen. Es besteht beispielsweise eine konstitutive Assoziation beider Flotilline mit als *membrane rafts* bekannten Membran-Mikrodomänen, welche mit Cholesterol- und Sphingolipiden angereichert sind (Dermine et al. 2001<sup>9</sup>), weswegen Flotilline laut Morrow et al.<sup>19</sup> (2002) als Markerproteine für diese fungieren.

Wichtig ist auch, dass sie nicht ortsgebunden sind, sondern je nach Funktion auch translozieren (Langhorst et al. 2005<sup>13</sup>).

Eine weitere wichtige Funktion ist die Scaffolding-Aktivität der Flotilline innerhalb verschiedener Membrantransportprozesse. So wird ihnen zugeschrieben, raft-assoziierte

Proteine zu rekrutieren und somit Membraninteraktionen oder auch die Oligomerisierung zu katalysieren (Bodin et al. 2014<sup>17</sup>). Flotilline sind außerdem an molekularen Mechanismen von Wachstumsfaktoren und durch deren Stimulation auch am endosomalen Stoffwechsel beteiligt (Meister und Tikkanen 2014<sup>20</sup>).

In den letzten Jahren wurden Flotilline oft in Verbindung gebracht mit verschiedenen Tumorerkrankungen und deren Beteiligung an der Regulation von onkologischen Signalwegen, was oft mit einer schlechten Prognose des Krankheitsverlaufs verbunden und u.a. auf ihre Beteiligung an der Zellproliferation zurückzuführen ist (Santamaria et al. 2005<sup>21</sup>, Hazarika et al. 2004<sup>22</sup>, Lin et al. 2011<sup>23</sup>). Bei manchen Tumoren sind beide Flotilline beteiligt, bei anderen nur jeweils Flotillin-1 oder -2. Verschiedene Studien belegen, dass die Hochregulation der Flotilline durch eine Herunterregulation von microRNAs in Tumoren verursacht sein könnte (Gauthier-Rouvière et al. 2020<sup>24</sup>). So fanden Li et al. 2013<sup>25</sup> heraus, dass die microRNA-124 bei Brustkrebs-Patienten Flotillin-1 kontrolliert bzw. steuert und dieses signifikant inhibiert. Somit könnte, laut der Studie, das miR-124 durch die Regulation von Flotillin-1 als Tumorsuppressor bei Brustkrebs fungieren. Ein Beispiel für die Steuerung von Flotillin-2 durch micro-RNAs in Tumorgewebe ist die microRNA-133 bei Lungenkrebs (Wei et al., 2017<sup>26</sup>). In diesem Zusammenhang wird in der Studie von Gauthier-Rouvière (2020)<sup>24</sup> auch vom Upregulated Flotillin-induced Trafficking (UFIT-Signalweg) gesprochen, welches flotillin-induzierte Moleküle enthält, die ein invasives Verhalten hervorrufen und somit zur Metastasenbildung führen. Das invasive Verhalten dieses Signalwegs wird dadurch verursacht, dass eine Hochregulation der Flotilline u.a. Invaginationen der Plasmamembran induzieren kann und somit den endosomalen Transport von verschiedenen Molekülen begünstigt, die schließlich zur Tumorgenese führen.

Mehrere Studien stellten sogar einen Zusammenhang zwischen Flotillinen und Insulin fest. So fand die Arbeitsgruppe Fecchi et al.<sup>27</sup> im Jahre 2006 heraus, dass Flotillin-1 und der Glucosetransporter GLUT4 bei Insulinabwesenheit im perinukleären Raum von Muskelzellen kolokalisiert sind, jedoch durch Insulinstimulation gemeinsam zum Sarkolemm wandern. Um zu zeigen, was für eine Schlüsselrolle Flotillin-1 beim Transport von GLUT4 zur Plasmamembran hat, zerstörte Fecchi et al. die Flotillin-1-haltigen Domänen durch Methyl-beta-Cyclodextrin (MBCD), einem Cholesterin-Komplexbildner, was dazu führte, dass ein insulinstimulierter Transport von sowohl GLUT4 als auch Flotillin-1 zur

Plasmamembran der Muskelzellen unterblieb. Dies führte wiederum mithilfe von MBCD zur Verhinderung der Glucoseaufnahme.

## 1.2 Der genetische Code und die Codon-Optimierung

Zur Translation und somit Proteinexpression werden bekanntlich mit dem genetischen Code - neben der mRNA und ihren Codons - die Transfer-RNAs (tRNAs) mit der zu codierenden Aminosäure und dem Anticodon, benötigt. Der Vorgang ist in Eu- und Prokaryoten im Grunde derselbe. Allerdings können speziell Bakterien zwar alle Codons erkennen, nutzen jedoch manche deutlich weniger, da Menschen und Bakterien, wie zum Beispiel *E. coli*, Codons unterschiedlich verwenden. Beispielsweise ist das Decodieren von bestimmten Codons für die Aminosäure Arginin bei der Expression von menschlichen Proteinen in Bakterien schwierig, da der Mensch gewisse Codons verwendet, welche die Bakterien aber nicht bevorzugen. Während Eukaryoten u.a. AGA und AGG zum Codieren von Arginin verwenden, bevorzugen die Prokaryoten CGU und CGC. Somit entsteht ein Mangel an tRNAs, die fähig sind, menschliche Codons abzulesen. Wenn derart schwierige Codons häufig in dem zu exprimierenden Protein vorhanden sind, wird die Translation gebremst und die Expression fällt schwer. Was da helfen kann, ist die Codon-Optimierung. Hierbei werden, beispielsweise zu pharmazeutischen Zwecken, rekombinante Proteine hergestellt, die häufiger genutzte und „einfachere“ Codons nutzen, um eine Steigerung der Proteinexpression zu erzielen. Es werden also solche Codons verwendet, die in Bakterien bevorzugt werden. Dies garantiert ein gutes Angebot an tRNAs und somit auch eine effiziente und ungebremste Translation. 2016 wurde von Zhou et al.<sup>28</sup> der Einfluss der Codonnutzung auf die Proteinexpression und die Auswirkungen einer Codon-Optimierung untersucht. Hierbei wurden 8 *Neurospora*-Gene und 2 heterologe Reportergene codon-optimiert. Dabei wurde ein deutlicher Anstieg sowohl des Protein- als auch des mRNA-Spiegels aller untersuchten Gene festgestellt. Bei den 8 *Neurospora*-Genen erzielte man einen 25fachen Anstieg des Proteinspiegels. Bei den 2 heterologen Reportergenen war der Wildtyp kaum nachweisbar, beim optimierten Typ stieg hingegen der Proteinspiegel auf das 70- bis 100-fache an. Somit konnten die Resultate zusammenfassend zeigen, dass die Codonnutzung eine sehr wichtige Rolle bei der Expression der Proteine spielt.

Die Codon-Optimierung wird mittlerweile durch diverse Optimierungssoftwares sehr vereinfacht. Ein Beispiel ist der Service der Firma „ThermoFisher Scientific“, deren *GeneOptimizer* Software (<https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cloning/gene-synthesis/geneoptimizer.html>)<sup>29</sup> auf Anfrage eine DNA-Sequenz generiert, welche der gewünschten Sequenz so gut wie möglich entspricht und alle relevanten Parameter berücksichtigt. Somit kann man durch das Hochladen einer Sequenz sowie die Auswahl eines geeigneten Expressionssystems, Vektors und Sequenzdetails ein eigenes synthetisches Gen designen. Raab et al.<sup>30</sup> präsentierten 2009 erstmals einen *GeneOptimizer* Algorithmus zur Codon-Optimierung. Basierend auf der Tatsache, dass jede Aminosäure von bis zu 6 verschiedenen Codons codiert werden kann und somit durch eine Optimierung, je nach Wirtszelle, die vorteilhafteren Codons ohne Veränderung der Aminosäuresequenz genutzt werden können, soll so ein Verlust der Proteinausbeute vermieden werden. Da sich die Codonnutzung und auch die Zahl der verfügbaren tRNAs je nach Wirt unterscheiden und diese für die Proteinexpression eine zentrale Rolle spielen, kann das Vorkommen von seltenen Codons in bspw. Bakterien zu einer verminderten Expression führen. Aus diesem Grund wurde u.a. die *Codon Usage* im Algorithmus mitberücksichtigt, genauso wie auch der GC-Gehalt, welcher u.a. Auskunft über die thermodynamische Stabilität gibt.

Der Algorithmus wurde zur Optimierung vieler verschiedener Gene mithilfe einer hausinternen Software bei Genart Corporation erfolgreich angewendet. Um die Software auch für andere Forscher zugänglich zu machen, wurde Mr. Gene entwickelt: eine assistentengesteuerte Website, die Schritt für Schritt vom Wildtyp zur optimierten Sequenz verhilft. Zwei Jahre später, im Jahre 2011, haben Fath et al.<sup>31</sup> genau diese Software für die erste Großstudie angewandt, um den Einfluss von Multiparameter-Optimierung humaner Proteinexpression in Säugetierzellen zu untersuchen. Dazu wurden 50 Proteine ausgewählt, welche 5 wichtige Proteinklassen- Transkriptionsfaktoren, Ribosomale Proteine, Proteinkinasen, Membranproteine und Immunmodulatoren- beinhalteten. Unter Berücksichtigung bestimmter Parameter und versehen mit einem 3'-histidine<sub>6</sub>-tag bzw. 3x-Flag-tag wurden diese in der humanen Zelllinie HEK293T erfolgreich exprimiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Codon-Optimierung einen durchaus positiven Einfluss auf die Proteinausbeute hatte und fast alle optimierten Proteine mindestens so gute Ergebnisse brachten, wie ihr Wildtyp-Pendant. Außerdem wurde anhand weiterer Untersuchungen festgestellt, dass der hier angewandte Multiparameter-Algorithmus, basierend auf Mr. Gene, auch für eine bessere Proteinexpression in Insektenzellen verwendet werden

kann. Genutzt wurde hierfür die Insekten-Zelllinie Sf-9. Eine weitere Überlegung vieler Forscher zur gesteigerten Proteingewinnung war außerdem die Co-Expression seltener tRNAs durch die Wirtszelle. Nachdem sich einige Studien mit diesem Thema befassten und auch gute Ergebnisse erzielten (Del Tito et al. 1995<sup>32</sup>, Kane et al. 1995<sup>33</sup>), konnten Maertens et al. 2010<sup>34</sup> durch eine Gegenüberstellung der Expression von codon-optimierten Sequenzen und co-exprimierten tRNAs in *E. coli* feststellen, dass die Proteinausbeute mit den optimierten Sequenzen ohne zusätzliche tRNAs höher war. Bereits 2004 waren Zhou et al.<sup>35</sup> zu dieser Erkenntnis gekommen. Laut Maertens et al.<sup>34</sup> sollte eine Optimierungsstrategie folgende Voraussetzungen erfüllen, um eine erhöhte Ausbeute rekombinanter Proteine zu erzielen:

- eine gute Auswahl an geeigneten Codons
- ein ausgeglichener GC-Gehalt
- die Vermeidung von Sequenzwiederholungen
- die Vermeidung von mRNA Sekundärstrukturen- v.a. in der Initiationsregion der Translation

### 1.3 Proteinexpression in *E. coli*-Bakterien

Die Expression rekombinanter Proteine kann, so leicht die Theorie sein mag, viele Probleme mit sich bringen. So kann man es mit dem schlechten bzw. langsamen Wachstum des Wirts zu tun haben, mit der Bildung von *inclusion bodies* oder einer Inaktivität der exprimierten Proteine. Als Wirt können dabei Bakterien, unizelluläre Algen, fadenförmige Pilze und Hefe fungieren, welche alle Vor- und Nachteile haben (Rosano et al. 2014<sup>36</sup>). Ebenfalls genutzt werden können Säugetierzellen. Um sich für den richtigen Wirt entscheiden zu können, ist außerdem zum einen die Größe und zum anderen der Nutzen des Proteins wichtig. So werden große Proteine normalerweise in eukaryotischen Systemen exprimiert und kleinere in prokaryotischen (Demain and Vaishnav, Review 2009<sup>37</sup>). Werden eukaryotische, posttranslationale Modifikationen wie die Protein-Glykosylierung gebraucht, so ist eine Expression in Prokaryoten nur wenig hilfreich (Sahdev et al. 2008<sup>38</sup>). Die Proteine zur Herstellung von Impfstoffen, zur Humantherapie, Diagnostik und zur Herstellung von Medikamenten mit rekombinanten Proteinen werden zu 70% in Säugetierzellen exprimiert (Wurm et al. 2004<sup>39</sup>). Neben allen möglichen Wirtszellen haben die *E. coli*- Bakterien, welche 1885 von dem deutschen Kinderarzt Theodor Escherich<sup>40</sup> entdeckt wurden und gram-negative, fakultativ-anaerobe Bakterien sind

(Feng et al. 2002<sup>41</sup>), besonders herausragende Eigenschaften, welche sie zu den wichtigsten Wirten in der Gentechnik machen. Sie sind am besten erforscht und werden schon seit Jahren zur Proteinexpression und zu pharmazeutischen Zwecken eingesetzt. So waren E. coli-Bakterien 1982 die ersten Wirte, die durch den Pharmakonzern Eli Lilly zur Herstellung von humanem Insulin mit rekombinanter DNA und überhaupt Medikamenten mit rekombinanter DNA verwendet wurden (Schwartz 2001<sup>42</sup>). Durch sie konnte u.a. eine kosteneffiziente und effektive Produktion gewährleistet werden. Ihr ökonomisches Potenzial ist u.a. ihrem schnellen Wachstum zu verdanken. Außerdem ist ihre Genetik gut erforscht und bietet eine große Ausstattung an gentechnischen Möglichkeiten (Maertens et al. 2010<sup>34</sup>).

Doch nicht alle E. coli-Bakterien eignen sich zur Expression von Fusionsproteinen. Die Arbeitsgruppe Hayat et al. hat 2018<sup>43</sup> in einem Review alle üblichen E. coli-Stämme, die als Expressionswirt genutzt werden, mit ihren Eigenschaften und Vorteilen tabellarisch zusammengefasst. Zu diesen gehören u.a. die in dieser Arbeit verwendeten Stämme BL21 und Rosetta. BL21 wird hier beschrieben als ein für nicht-toxische Gene geeigneter Wirt, während über Rosetta geschrieben wird, dass es generell zur Expression rekombinanter Proteine genutzt werden kann. Andere Stämme, wie zum Beispiel Lemo21 (DE3) und Tuner (DE3), eignen sich u.a. eher für toxische Proteine. So muss also zwischen den verschiedenen Typen unterschieden werden.

## 1.4 Ziele dieser Arbeit

Das humane Flotillin-1-Protein ließ sich bislang in Prokaryoten nicht gut exprimieren. Der Grund könnte die unterschiedliche Codonnutzung in Pro- und Eukaryoten sein. Um für Forschungszwecke mehr lösliches Flotillin-1 als GST-Fusionsprotein zu gewinnen, war das Ziel dieser Arbeit, „codon-optimierte“ Flotillin-1 Expressionsplasmide zu generieren und diese hinsichtlich Expression und Kulturbedingungen zu untersuchen.

Die Zielsetzung besteht im Einzelnen darin

1. das Leseraster des humanen Flotillin-1 für die bakterielle Expression zu optimieren.
2. die Expression des optimierten Flot-1-GST Fusionsproteins mit dem nicht-optimierten Flotillin-1 zu vergleichen.
3. die Expression des optimierten Flot-1-GST durch Veränderung von Parametern, wie Temperatur und Induktionszeit, zu vergleichen und zu optimieren.

## 2 Materialien

*In den folgenden Tabellen sind alle für diese Doktorarbeit verwendeten Geräte und Materialien sowie die Hersteller dieser aufgeführt.*

### 2.1 Materialien und Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	Neolab, Heidelberg (DE)
Entwickler Maschine (Curix 60)	AGFA, Düsseldorf (DE)
Filter-Papier	Whatman, Dassel (DE)
Glas-Pasteurpipetten (230 mm)	VWR International, Darmstadt (DE)
Glaskolben	Schott- AG, Mainz (DE)
Heizblock	Laborgeräte München, München (DE)
Inkubator	Sanyo, München (DE)
Nitrocellulose-Membran	Whatman, Dassel (DE)
Pipetten versch. Größen	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf (DE)
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Röntgenfilm	FUJIFILM, Düsseldorf (DE)
Schwenktisch (WS-10)	Edmund Bühler GmbH, Hechingen (DE)
Schüttler (KS-15)	Edmund Bühler GmbH, Hechingen (DE)
SDS-PAGE Kammer	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
SDS-Gel-Gießkammer	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
Spannungsquelle (Elektrophorese Power Supply, EPS 301)	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
Tecan infinite M200	TECAN, Crailsheim (DE)
Vortex Bio Vortex V1	PEQLAB, Erlangen (DE)
Western-Blotsystem Criterion Blotter	Bio Lab Laboratories GmbH, München (DE)
Zentrifuge, Heraeus Biofuge pico	Thermo Scientific, St. Leon-Rot (DE)
Zentrifuge, Universal 32 R	Hettich, Kirchlingern (DE)
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	15 ml von Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (DE), 50 ml von Falcon

## 2.2 Chemikalien und Puffer

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe (DE)
Agarose	Roth, Karlsruhe (DE)
Ampicillin	Roth, Karlsruhe (DE)
Aprotinin	Roth, Karlsruhe (DE)
Cumarinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Digitonin	Sigma Aldrich, Taufkirchen (DE)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) high glucose	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe (DE)
DNA-Ladepuffer	Sigma Aldrich, Taufkirchen (DE)
DNA-Marker	New England BioLabs, Frankfurt am Main (DE)
DTT (Dithiothreitol)	Appllichem, Darmstadt (DE)
EDTA	Roth, Karlsruhe (DE)
EGTA	Appllichem, Darmstadt (DE)
Essigsäure	Roth, Karlsruhe (DE)
Ethanol	Sigma Aldrich, Taufkirchen (DE)
Ethidiumbromid	Appllichem, Darmstadt (DE)
FCS (fötales Kälberserum)	Life Technologies, Darmstadt (DE)
Glutathione-Sepharose beads 4B	GE Healthcare, München (DE)
Glycerin	Roth, Karlsruhe (DE)
Glycin	Appllichem, Darmstadt (DE)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
IPTG (Isopropyl-β-D- thiogalactopyranosid)	Roth, Karlsruhe (DE)
LB-Medium	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Luminol	Fluka, Buchs (CH)
Leupeptin	Roth, Karlsruhe (DE)
Lysozym	Roth, Karlsruhe (DE)

Magnesiumchlorid	Applichem, Darmstadt (DE)
Magnesiumsulfat	Applichem, Darmstadt (DE)
Methanol	Roth, Karlsruhe (DE)
Milchpulver	Roth, Karlsruhe (DE)
Natriumacetat	Applichem, Darmstadt (DE)
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe (DE)
PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung)	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Pepstatin A	Roth, Karlsruhe (DE)
PFA (Paraformaldehyd)	Roth, Karlsruhe (DE)
PIPES	Roth, Karlsruhe (DE)
PMFS	
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma Aldrich, Taufkirchen (DE)
Proteinmarker	BioRad, München (DE)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
TEMED (Tetramethylethyldiamin, 1,2-Bis (dimethylamino)- ethan)	Roth, Karlsruhe (DE)
Tris	Applichem, Darmstadt (DE)
Tris-Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe (DE)
Triton X-100	Sigma Aldrich, Taufkirchen (DE)
Tween-20	Roth, Karlsruhe (DE)

### 2.3 Selbsthergestellte Puffer und deren Zusammensetzung

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Blockierungspuffer	TBST (tris buffered saline & Tween 20) 5% Milchpulver
Blottingpuffer	192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 10% MeOH
DMEM++	10% fötales Kälberserum 1% Penicillin/ Streptomycin

ECL-Lösung	100 mM Tris HCl (pH 8.5) 1,25 mM Luminol 0,2 mM Cumarinsäure 1:1000 10% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Fixierungspuffer	80 mM Pipes (pH 6.8) 2 mM MgCl <sub>2</sub> 5 mM EGTA (pH 8) 4% PFA
Glycerol-Stock-Puffer	65% Glycerol 0,1 M MgSO <sub>4</sub> 25 mM Tris-HCl (pH 8)
GST-Lyse-Puffer	50 mM Hepes pH 7.5 150 mM NaCl 1mM EDTA 5% Glycerol 0,1% NP-40 <u>frisch dazu:</u> 1,5 µM Aprotinin 23 µM Leupeptin 1,5 µM Pepstatin A 1 mM PMSF 1 mM DTT
Lämmli-Gelelektrophorese-Laufpuffer	12 mM Glycin 25 mM Tris-Base 0,1% SDS
LB-Agar	15 g Agar-Pulver 1 l LB Medium
LB (Luria/Miller) – Medium	20 g LB broth 1 l dd H <sub>2</sub> O
PBS 1x (Phosphat gepufferte Saline)	150 mM NaCl 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b><u>SDS-Polyacrylamidgel:</u></b>	

Sammelgel (4%)	4,2% Tris (pH 6.8) 0,1% SDS 4% Acrylamid 0,1% TEMED
Trenngel (10%)	0,5% TEMED 12,5% Tris (pH 8) 0,1% SDS 10% Acrylamid
Lysepuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 0,15 M NaCl 2 mM EDTA 1% NP-40
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	40 mM Tris (pH 8) 1 mM EDTA
TBST (Tris buffered saline + Tween 20)	10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 150 mM NaCl 0,05% Tween
SOC-Medium	LB-Medium, substituiert mit 20 mM Glucose

## 2.4 Kits und Säulen

Bezeichnung	Hersteller
NucleoSpin® Plasmid DNA purification (Mini-Prep.)	Macherey Nagel GmbH & Co
NucleoBond Xtra DNA purification (Midi-Prep.)	Macherey Nagel GmbH & Co

## 2.5 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

*Hier aufgeführt sind alle Antikörper und Farbstoffe, welche für diese Doktorarbeit zum Einsatz gekommen sind:*

## Antikörper

**Primary-Flot1-Antibody** Anti-Flotillin-1, mouse

BD 610821

**Secondary-Antibody** polyclonal Goat Anti-Mouse Immunglobulins / HRP, Dako P0447

## Farbstoffe

**Ethidiumbromid**

Firma: Dako, Wiesentheid (DE)

## 2.6 Plasmide

<i>Konstrukt</i>	<i>Resistenz</i>	<i>Restriktions-enzyme</i>	<i>Ursprung</i>
<i>pEX-A2-Flot1-NT-bact</i>	<i>Ampicillin</i>	<i>BamHI, HindIII</i>	<i>EurofinsGenomics</i>
<i>pEX-A2-F1+F2-hybrid</i>	<i>Ampicillin</i>	<i>XhoI, EcoRI</i>	<i>Eurofins Genomics</i>
<i>pGEX-4T-1</i>	<i>Ampicillin</i>		

## 2.7 Die verwendeten Primer

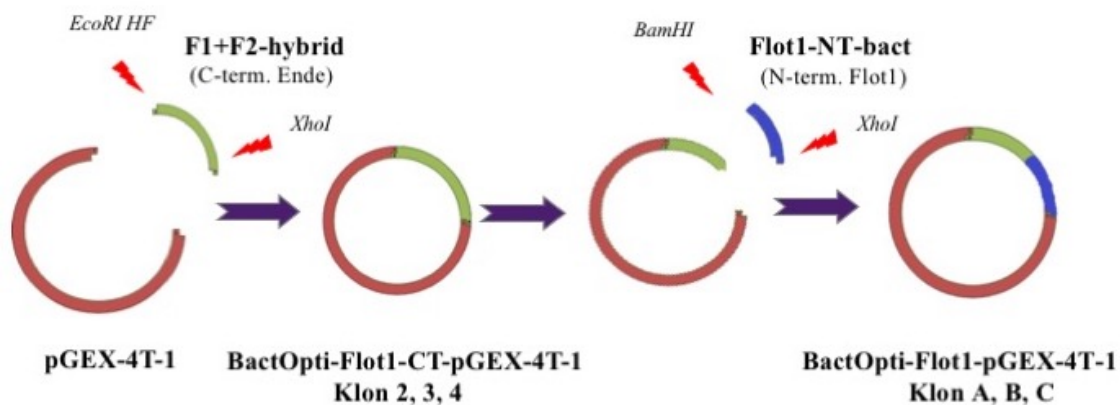
<i>Primer</i>	<i>Sequenz 5'-3'</i>
EcoRI-bactOpti-F1-CT-fwd	CTATA GAATTC GCTGAAGCTTTT-GCAATCG
XhoI-bactOpti-F1-CT-rev	CTATA CTCGAG TTAAGCGGTACGCAG-TGG
BamHI-BactOpti-F1-NT-start	CTATA GGATCC ATGTTCTTCAC-CTGTGGCC
BactOpti-F1-NT-Rev	TTGCAA AAGCTT CAGCTTCGC

## 2.8 Bakterienstämme

<i>Bezeichnung</i>	<i>Organismus</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Quelle</i>
XL-1-Blue	E. coli	DNA-Amplifikation	Agilent/ Stratagene, La Jolla, Vereinigte Staaten
Rosetta DE3	E. coli	Proteinexpression	Novagen, Darmstadt, Deutschland
BL-21 DE3	E. coli	Proteinexpression	Novagen, Darmstadt, Deutschland

### 3 Methoden

Das codon-optimierte Flotillin-1 wurde aus Kostengründen in 2 Stücken (jeweils etwa 1 kbp) von Eurofins Genomics synthetisiert und in 2 getrennten pEx-A2-Vektoren geliefert. Die Flotillin-1-Anteile sollten zunächst in den Vektor pGEX-4T-1 zusammengesetzt werden (Abbildung 5), um Expressionsversuche zu starten.



**Abb. 2 Ligation der separat synthetisierten C- und N-terminalen Bereiche des codon-optimierten Flotillin-1 in den Vektor pGEX-4T-1**

Bevor Expressionsversuche durchgeführt werden konnten, wurde zuerst das C-terminale und dann das N-terminale Ende des optimierten Flotillin-1 mit PCR amplifiziert und in den vorgesehenen Vektor pGEX-4T-1 ligiert. Für die Klonierung der PCR-Produkte wurden beim C-terminalen Ende die Restriktionsenzyme EcoRI und XhoI und beim N-terminalen Ende BamHI und XhoI verwendet.

#### 3.1 Molekularbiologische Standardmethoden

##### 3.1.1 PCR

Mittels Polymerase-Kettenreaktion, kurz PCR, wurden jeweils das C-terminale und das N-terminale Ende des hier vorliegenden Flotillin-1 mit den entsprechenden Primern (s. 4.7) aus den Plasmiden pEx-A2-F1+F2-hybrid und pEx-A2-Flot1-NT-bact amplifiziert.

Die PCR-Ansätze des pEx-A2-F1+F2-hybrid und des pEx-A2-Flot1-NT-bact beinhalten 40 ng der Template-DNA, 10 pmol Primer fwd, 10 pmol Primer rev, 8 nmol (0,2 mM) Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), 27,8 µl DEPC-Wasser, sowie 8 µl 5xPhusion-Buffer und 0,8 µl Phusion-Polymerase. Gemäß der Abfolge einer PCR wurde die Template-DNA zunächst einmalig bei 98°C für 30 s und in der darauffolgenden Denaturierungsphase für 30 s bei 98°C erneut denaturiert. Anschließend fand die Annealingphase für 20 s bei 60°C und die Synthese für 15 s bei 72°C statt. Nach insgesamt 30 Zyklen erfolgte eine finale Elongation für 5min bei 72°C, wodurch für eine vollständige Elongation der DNA-Produkte gesorgt wurde.

### **3.1.2 Gelelektrophorese und Aufreinigung**

Nach Amplifikation der C- und N-terminalen Enden des Flotillin-1 wurde die Größe der PCR-Fragmente mittels Gelelektrophorese bestimmt. Mithilfe eines Standards mit bekannten Größen konnte die Größe der Fragmente auf einem 2%igen Agarosegel ermittelt werden. Anschließend wurden sowohl die DNA als auch der Vektor mithilfe des NucleoSpin-Purification Kits von Macherey Nagel aufgereinigt. Das CT-Fragment von Flotillin-1 wurde auf 15 µl, das NT-Fragment auf 22 µl und der Vektor auf 30 µl eluiert.

### **3.1.3 Verdau des Vektors**

Für den pGEX-4T1-Vektor wurde der Verdau folgendermaßen angesetzt:

3 µg Vektor-DNA, 5 µl CutSmart-Puffer, je 20 U pro Restriktionsenzym (EcoRI und XhoI) in einem 50-µl-Ansatz.

Nach einer Stunde im Brutschrank bei 37°C wurden dem Verdau 3 µl Shrimp-Alkaline-Phosphatase hinzugegeben und erneut für eine Stunde im Brutschrank verdaut. Das SAP hat die Funktion nach Restriktion des Vektors durch Dephosphorylierung eine Religation der linearisierten 5'-Enden zu verhindern, um somit eine Rekombination mit den Flotillin-PCR-Fragmenten zu ermöglichen.

### **3.1.4 Verdau der PCR-Fragmente**

Der Verdau der jeweiligen PCR-DNAs wurde wie folgt angesetzt und durchgeführt:

F1-CT:

22 µl Insert-DNA, 5 µl CutSmart-Puffer, 22 µl Wasser und 5 U pro Restriktionsenzym

(EcoRI + XhoI).

F1-NT:

15 µl Insert-DNA, 5 µl CutSmart-Puffer, 29 µl Wasser und 5 U pro Restriktionsenzym (BamHI + HindIII).

Beide wurden nach dem Verdau erneut mit dem NucleoSpin-Kit aufgereinigt.

### **3.1.5 Ligation und Transformation**

Die beiden amplifizierten DNA-Inserts F1-CT-bact und Flot1-NT-bact wurden nacheinander in den Vektor pGEX-4T1 ligiert. Die Ligation des F1-CT-Fragments in pGEX-4T1 wurde mit folgendem Ansatz durchgeführt:

1 µl Vektor-DNA, 4 µl Insert-DNA, 1 µl 10xLigase-Puffer, 0,3 µl Ligase und 3,7 µl Wasser.

Nach dieser Ligation erfolgte die Transformation des neu gebildeten Vektors in die kompetenten *E. coli*-XL-1-Blue-Zellen im Sinne einer Hitzeschock-Transformation. Hierbei wurden auf Eis 10 µl des Ligationsansatzes für 20 min in 120 µl XL-1-Blue gegeben, dann für 2 min auf 45°C und 2 min auf Eis. Daraufhin wurde 1 ml SOC-Medium hinzugefügt, welches aus 9,8 ml LB-Medium und 20 mM Glucose besteht.

Daraufhin wurde der Ansatz für ca. eine Stunde bei 37°C geschüttelt, auf einem Amp<sup>+</sup>Tet-LB-Medium ausplattiert und bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Am nächsten Tag wurden die entstandenen Kolonien gepickt und Mini-Präparationen hergestellt.

Nach dieser erfolgreichen Transformation, die durch Verdau mit BamHI und HindIII festgestellt werden konnte, wurde das bereits verdaute und gereinigte F1-NT-bact in den neu gewonnenen Vektor F1-CT-bact-pGEX-4T1 ligiert.

Die zweite Ligation wurde folgendermaßen durchgeführt:

5 µl des Vektors, 2,5 µl des PCR-Fragments F1-NT-bact, 1 µl des 10xLigasepuffers, 0,2 µl Ligase und 1,3 µl Wasser.

Auch nach dieser Ligation wurde die rekombinante DNA in XL-1-Blue, wie oben beschrieben, transformiert. Nach erfolgreicher Klonierung, die wieder mittels Verdau und Gelelektrophorese überprüft wurde, wurden die richtigen Klone zum Sequenzieren geschickt und auf ihre Richtigkeit überprüft.

### **3.1.6 Transformation chemisch kompetenter Zellen**

Um neue Vektoren in kompetente E. coli-Stämme wie XL-1-Blue, Rosetta und BL21 zu transformieren, wurde vom Verfahren der Hitzeschock-Transformation Gebrauch gemacht.

Hierbei wurden für 20 min 5 µl der DNA bzw. des Ligationsansatzes (10 ng/µl) in 120 µl der kompetenten Bakterien auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Vektor-E. coli-Gemisch für 2 min einem Hitzeschock bei 45°C versetzt und anschließend für weitere 2 min auf Eis gekühlt.

Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml SOC-Medium. Das Ganze wurde für 45 min und bei 37°C geschüttelt und inkubiert.

Zum Nachweis der erfolgreichen Transformation und für weitere Versuche wurden zum Schluss etwa 100 µl der transformierten Zellen auf eine LB-Agarplatte mit Ampicillin ausplattiert und im Brutschrank über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **3.1.7 Plasmidpräparation (Mini)**

Zur Herstellung von Mini-Plasmidpräparationen wurden nach erfolgreicher Transformation Kolonien gepickt und in Bakterienröhrchen mit 5 ml LB-Medium mit Ampicillin gegeben, welche anschließend über Nacht bei 37°C geschüttelt wurden. Am Folgetag wurden 2 ml des gut durchmischten Inhalts der Röhrchen in Eppendorfgefäße gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur (RT) und 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und erneut wurden 2 ml der Bakterienkultur dem Pellet hinzugefügt. Auch hier wurde abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Um die Plasmid-DNA zu isolieren wurde ein Plasmid-DNA-Purification-Kit von Macherey Nagel eingesetzt. Die Reinigung wurde gemäß der Anleitung wie folgt durchgeführt:

Das Pellet wurde mit einem Resuspensionpuffer resuspendiert. Dazu wurde ein Lysepuffer addiert, welcher für 5 min inkubiert. Im Anschluss wurde der Neutralisationspuffer dazugemischt. Nachdem die Suspension 10 min bei Raumtemperatur (RT) und 14000 rpm zentrifugiert wurde, um eine Klärung des Lysats zu erreichen, wurden Eppendorfgefäße mit NucleoSpin®Plasmid-Säulen aufgestellt, in welche der Lysat-Überstand hineingegeben wurde.

Es folgte erneut eine Zentrifugation bei 11000 rpm für eine Minute, wonach der Durchlauf verworfen wurde. Die gesammelte DNA wurde in 2 Gängen mittels Waschpuffer gewaschen. Nach jedem Waschgang wurde, wie oben bereits beschrieben, zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Anschließend wurden für 2 min bei 11000 rpm die Säulen zum Trocknen zentrifugiert. Zum darauffolgenden Eluieren wurden die NucleoSpin-Säulen in neue Eppendorfgefäße gesteckt und mit dem Elutionspuffer des Kits versetzt, welches für 1 min einwirkte und das Lösen der DNA aus dem Filter zur Folge hatte. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Durchlauf dieses Mal in ein neues Gefäß umpipettiert und die vollständig eluierte DNA somit festgehalten. Um die DNA-Konzentration des Eluats zu bestimmen, wurde zur spektralphotometrischen Messung der Mikroplattenleser Infinite M200 von Tecan eingesetzt.

### **3.1.8 Plasmidpräparation (Midi)**

Zur Herstellung einer Plasmidpräparation größeren Volumens, sprich einer s.g. Midi-Präparation des hergestellten pGEX-4T1-Vektors, wurden die transformierten E. coli-Bakterien mit 100 ml LB-Medium inklusive eines selektiven Antibiotikums (hier: Ampicillin) in einen Erlenmeyerkolben gegeben und bei 37°C und 220 rpm über Nacht geschüttelt.

Die Isolierung des Plasmids erfolgte am folgenden Tag mithilfe des „NucleoBond Xtra DNA Purification-Kit (Midi-Prep.)“ von Macherey-Nagel gemäß der Anleitung. Hierbei wurden, nach Messung der optischen Dichte, die Zellen durch Zentrifugation bei 4°C für 5 min pelletiert und der Überstand verworfen. Daraufhin wurde das Pellet mit 20 ml des Resuspensionspuffers RES + RNase A (Buffer RES) durch Vortexen oder Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Der Suspension wurde anschließend 20 ml des Lysepuffers (Buffer LYS) hinzugegeben. Das Gemisch wurde anschließend 5 Mal invertiert, bevor die Mixtur bei Raumtemperatur für 5 min inkubierte. Darauf folgte die Neutralisation mit 20 ml des Neutralisationspuffers (Buffer NEU), welche 5 min dauerte und auf Eis erfolgte. Zur vollständigen Benetzung der Säulen wurden außerdem 12 ml des Equilibrationspuffers (Buffer EQU) auf den Filterrand der Säulen hinzugegeben. Die Lysate wurden dann in die Säulen gegeben, nachdem sie noch 3 Mal invertiert wurden. Die vorher eingebrachten Filter wurden nach der Waschung mittels 5 ml Waschpuffer (Fil-EF) entfernt. Anschließend wurde die Säule hintereinander mit den Waschpuffern ENDO-EF (35 ml)

und WASH-EF (15 ml) befüllt. Um nun die DNA aus der Säule herauszulösen, wurde diese mit 5 ml des Elutionspuffers (ELU-EF) befüllt. Die ausgewaschene DNA wurde dann in einem frischen Röhrchen aufgenommen und mit 3,5 ml Isopropanol bei Raumtemperatur gemixt. Es folgte die Zentrifugation der entstandenen Lösung für 30 min bei 4°C und 15000 g. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen. Es erfolgte eine weitere 5-minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur, nachdem 2 ml 70%iges Ethanol hinzugegeben wurden. Nachdem das Ethanol mittels Pipette entfernt und das vorliegende Pellet für ca. 15 Minuten luftgetrocknet wurde, wurde es letztendlich in 100 µl TE-EF-Puffer gelöst. Auch hier erfolgte im Anschluss eine Konzentrationsmessung mithilfe des Infinite M200 von Tecan.

### **3.1.9 DNA-Fällung**

Die Extraktion der Plasmid-DNA mittels DNA-Fällung wurde mit Isopropanol durchgeführt.

Hierbei wurde die DNA-Lösung in ca. 300 mM NaAC/HAc mit einem pH von 5,2 gemischt (benötigt wurden dafür 3 M NaAC, 2 M Essigsäure, 80% EtOH und TE) und 0,7 Volumen Isopropanol dazugegeben.

Das fertige Gemisch wurde auf Eis für mindestens 5 Minuten gekühlt.

Danach wurde es für ca. 20 min bei 4°C und bei 13000 U/min zentrifugiert.

Das entstandene Pellet wurde anschließend mit 70%igem Isopropanol gewaschen, getrocknet und anschließend in TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O aufgenommen.

## **3.2 Biochemische Standardmethoden**

### **3.2.1 Induktion von Proteinexpression in Bakterien durch Isopropyl-Beta-D-thiogalactopyranosid (IPTG)**

Zunächst wurde eine 2,5 ml-Übernacht-Kultur mit selektivem LB-Medium (+ 100 µg/ml Ampicillin) angesetzt und bei Raumtemperatur geschüttelt. Da dies vor dem Wochenende erfolgte, wurden anschließend 50 µl der Übernacht-Kultur in 2,5 ml LB-Medium verdünnt und bei 37°C geschüttelt, bis ein OD600 von 0,5 erreicht wurde.

Daraufhin wurden 0,2 mM IPTG hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt.

Im Anschluss erfolgte eine Pelletierung durch Zentrifugation und die Lösung des Pellets in 2xSDS-Ladepuffer, welches für 5 min auf ca. 92°C erhitzt und erneut zentrifugiert wurde.

### **3.2.2 Proteinaufreinigung mithilfe der Affinitätschromatographie**

Die mittels IPTG-Induktion exprimierten Proteine wurden gemäß der vorgegebenen Anleitung aufgereinigt. Die zuvor induzierte Bakteriensuspension wurde abzentrifugiert. Dem hierbei entstandenen Pellet wurde anschließend ein vorbereiteter GST-Puffer hinzugegeben. Das Pellet wurde resuspendiert. Diesem Puffer wurden zuvor Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin A, DTT (alle 1:1000) und PMSF (1:100) frisch dazugegeben. Anschließend wurde, um eine vollständige Zelllyse zu erreichen, Lysozym (30 ml/ml in 1x PBS; 1:150) hinzugegeben. Die Suspension inkubierte für 15 min auf Eis und wurde danach 2 x 30 s einer Ultraschallbehandlung (Amplitude 95%) unterzogen, um anschließend bei 4°C für 30 min bei 16000 rpm zentrifugiert zu werden. Sowohl das Pellet als auch ein Teil des Überstands wurden mit Ladepuffer versetzt und für die anschließende SDS-PAGE verwendet.

Die Aufreinigung des Fusionsproteins wurde mit der Verwendung von Gluthathion-Sepharose-Beads fortgesetzt. Hierbei wurden zunächst die Beads nacheinander mit jeweils 1 ml H<sub>2</sub>O, 1x PBS und dem GST-Lysepuffer gewaschen und bei 4°C und 2000 rpm für 2 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Beads in 100 µl mit Proteinaseinhibitoren (PI) ergänztes GST-Lysepuffer resuspendiert und zu dem Lysat hinzugegeben. Daraufhin

wurde die Suspension zum Binden der Proteine an die Beads für 2 h bei 4°C auf einem Rotationsrad geschüttelt und anschließend für 2 min bei gleicher Temperatur und 2000 rpm pelletiert. Das entstandene Pellet wurde 3-mal mit PBS + 0,1% Triton X-100 und anschließend 3-mal mit PBS gewaschen und in PBS + 10% Glycerol resuspendiert und anschließend zur SDS-PAGE verwendet.

### **3.2.3 SDS-PAGE**

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein biochemisches Verfahren um Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen. Die Gelelektrophorese erfolgte mithilfe von Sammel- und Trenngelen nach Lämmli. Die mit dem 2xSDS-Ladepuffer versetzten und für 5 min bei 92°C denaturierten Proben wurden in die Taschen des 10%igen SDS-Gels gegeben. Als Referenz diente ein Proteinmarker.

Die Funktion des Natriumdodecylsulfats (SDS) ist hierbei, sich an die Proteine anzulagern, diese zu denaturieren und ihnen somit eine negative Ladung zu geben, wodurch sie dementsprechend zur Anode wandern.

Die SDS-Protein-Komplexe wurden ca. 20 min bei 15 mA und ab 20 min bei 20 mA pro Gel aufgetrennt. Insgesamt liefen die SDS-PAGE etwa 45 min lang.

### **3.2.4 Western-Blot**

Bei einem Western Blot werden die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend mit Antikörpern visualisiert.

#### **Transfer**

Zunächst wurde das Polyacrylamid-Gel mit den nach ihrer Größe aufgetrennten Proteinen einem hierzu senkrecht gerichteten elektrischen Feld angelegt, wodurch die aufgetrennten Proteine im selben Muster von dem Gel auf die Membran wanderten. Durch hydrophobe Wechselwirkungen kann die Proteinhftung an der Membran stattfinden. Dem hier benötigten und geöffneten Blotting-Gitter wurde Folgendes aufgelegt: ein angefeuchteter Schwamm, Filterpapier, das Gel aus der Elektrophorese-Kammer, eine Nitrozellulosemembran und erneut Filterpapier sowie ein angefeuchteter Schwamm. Nach Verschluss

des Gitters wurden diese in eine Blotkammer gesetzt, welche anschließend mit 1x Blotsalz aufgefüllt wurde.

Der Transfer wurde für 1 h mit 400 mA durchgeführt.

### **Detektion**

Nach dem Transfer wurde die Membran aus der Blotkammer herausgenommen, in eine Schale mit Milchpulver + TBST transferiert und für 30 min geschwenkt, wodurch es zu einer Blockade unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran kommen sollte.

Danach wurde die Milch verworfen und die Membran 2x mit TBST gewaschen. Anschließend wurde die Schale mit 10 ml-Antikörper-TBST-Lösung aufgefüllt, erneut ca. 5 min geschwenkt und dann über Nacht bei ca. 4°C inkubiert. Die Antikörper-Lösung wurde wie folgt angesetzt: 10 ml TBST + 10 µl Maus Anti-Flot1-Antikörper + 50 µl Na-acid zum Konservieren. Am Folgetag wurde die Antikörper-Lösung abpipettiert und für weitere Verwendungen aufgefangen und die Membran 3x für 10 min auf dem Schwenktisch mit TBST gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper versetzt. Es wurden 2 µl des Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelten Anti-Maus-Sekundärantikörpers 1:5000 in 10 ml TBST verdünnt. Dieser Antikörper wirkte 1 h auf dem Schwenktisch bei Raumtemperatur ein. Nach dreimaligem Waschen mit TBST für je 10 min wurde die Membran mit Papiertüchern getrocknet. Anschließend wirkten für 3 min die ordentlich verteilte und aus 2 Komponenten (1 zu 1 gemischt) bestehende ECL-Lösung und 1 µl 10%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per ml auf die Membran ein, wodurch die Peroxidase-reaktion initiiert wurde. Abschließend wurde die Membran erneut getrocknet, in Frischhaltefolie gewickelt und in einer Röntgenkassette fixiert- bereit zum Entwickeln eines Röntgenbildes, um die Proteine zu visualisieren.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Vergleich der nicht-optimierten und der optimierten Flot-1 DNA-Sequenz

Die Optimierung des Flotillins war eine nötige Voraussetzung, da somit das Leseraster für die bakterielle Expression optimiert wurde, um eine möglichst hohe Ausbeute an löslichem Protein für Forschungszwecke zu erzielen. Ein Grund für die unterschiedliche Expression eines Proteins in Pro- und Eukaryoten ist die Codierung der Aminosäure Arginin. Manche Codons, welche Arginin codieren, werden in Eukaryoten häufiger genutzt als in Prokaryoten, die andere Arginin-Codons bevorzugen. In der folgenden Abbildung sind alle veränderten Codons erkennbar markiert. Es wurden von 428 Codons des nicht-optimierten humanen Flot-1 insgesamt 256 Codons, also ca. 60,7 %, verändert. Von diesen codieren wiederum 24 Arginin, weswegen all diese durch für Prokaryoten einfachere Codons ersetzt wurden. Die Codons wurden 18 Mal durch CGT und 6 Mal durch CGC ersetzt. Von den insgesamt 15 vorkommenden Aminosäuren mit ausgetauschten Codons wurden allerdings am häufigsten die Codons der Aminosäure Alanin verändert. Hier sind von den insgesamt 46 veränderten Codons die häufigsten GCT und GCA. Leucin wurde ausschließlich durch CTG codiert, was eindeutig zeigt, dass dieses ein für Prokaryoten viel einfacher umzusetzendes Codon ist. Dasselbe gilt auch für die Glutaminsäure, bei welcher von insgesamt 25 Codons GAG 23 Mal gegen GAA ausgetauscht wurde. Somit ist GAG offensichtlich ein für Eukaryoten einfacheres Codon, wohingegen GAA von Prokaryoten bevorzugt wird. Auch für Lysin wurde von 23 Codons ganze 21 Mal AAA verwendet.

Orig	165	ATG <b>TTTTT</b> CT <b>ACT</b> TTGTGGCC <b>CAAAT</b> GAG <b>GCC</b> ATG <b>GTGGTCTCCGGG</b> TTCTG <b>CCGAAG</b> CCCC	224
Opti	1	ATG <b>TTCTT</b> CT <b>ACC</b> TGTGGCC <b>CGAAC</b> GAG <b>GCG</b> ATG <b>TTGTATCTGGC</b> TTCTG <b>CGT</b> CT <b>CCG</b>	60
Orig	225	CCAG <b>TC</b> ATGGTGG <b>CTGGAGGG</b> CGT <b>GTCTTTT</b> GT <b>CCTGCC</b> CTGC <b>ATCCAAC</b> AGATCCAG <b>AGG</b>	284
Opti	61	CCAG <b>TG</b> ATGGTGG <b>CAGGTGG</b> CCGT <b>GTGTTT</b> GT <b>GCTGCC</b> GTGC <b>ATTCAAC</b> AGATCCAG <b>CGT</b>	120
Orig	285	ATCTCT <b>CTCAAC</b> CA <b>CTG</b> ACC <b>CTCAAT</b> GT <b>CAAGAGT</b> GAAA <b>AGGTTT</b> CA <b>CTCGCC</b> ATGGG	344
Opti	121	ATCTCT <b>CTGAAC</b> ACC <b>CTGACTCT</b> GAACGT <b>CAATCCGAGAA</b> AGT <b>GTATACCC</b> GCC <b>ACGGT</b>	180
Orig	345	<b>GTCC</b> CATCT <b>TCAGTCACTGGC</b> ATTGCC <b>CAGGTA</b> AAAATCCAG <b>GGG</b> CAGAAC <b>AA</b> GGAGATG	404
Opti	181	<b>GTAC</b> CGAT <b>CAGCGTAACCGGTAT</b> CGCC <b>CAAGTGA</b> AGATCCAG <b>GGT</b> CAGAAC <b>AAAGAA</b> ATG	240
Orig	405	<b>TTGG</b> CGG <b>CCGCC</b> TGT <b>CAG</b> ATGTT <b>CCTGGG</b> GAAG <b>ACGGAGGCTGAGATTGCC</b> CAC <b>ATTGCC</b>	464
Opti	241	<b>CTGG</b> CAG <b>CAGCGTGTCAA</b> ATGTT <b>CCTGGT</b> AAA <b>ACCGAAGCAGAAATCGCTC</b> AC <b>ATCGCT</b>	300



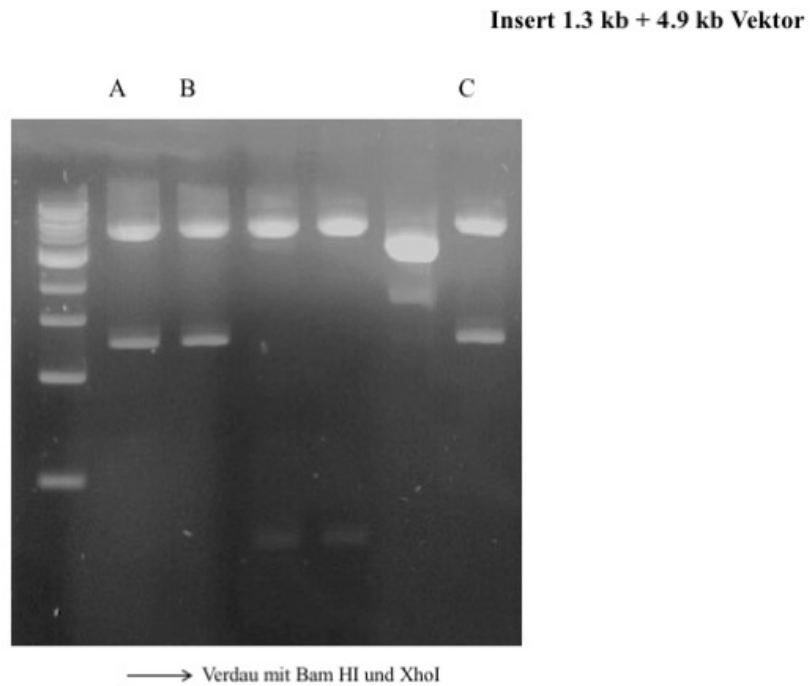
Von den 422 Codons des nicht-optimierten humanen Flotillin-1 wurden insgesamt 256 Codons im optimierten Flotillin-1 verändert. 24 dieser Codons codieren die Aminosäure Arginin. Um die Expression in den *E. coli* zu vereinfachen bzw. um die Codons zu optimieren- da das Codieren bestimmter Codons mit Arginin in Prokaryoten schwerfällt- wurden die Arginin-Codons 18-mal durch das von Prokaryoten bevorzugte CGT ersetzt (rot hinterlegt) und 6-mal durch CGC (gelb hinterlegt). Die nicht-veränderten 6 Codons am 3'-Ende sind nicht angezeigt.

Um nun wiederum die Expression des optimierten Flotillin-1 in *E. coli*-Bakterien weiter zu optimieren bzw. um die besten Bedingungen zu schaffen und somit die höchstmögliche Menge an Flotillin-1 zu gewinnen, wurden in der Induktionsphase der Proteinexpression verschiedene Temperaturen, Induktionszeiten und IPTG-Konzentrationen ausprobiert und untersucht. Hierzu wurde zunächst die optimierte, kodierende Sequenz des Flotillin-1 als Fusionsprotein mit GST in den Vektor pGEX-4T-1 kloniert und in kompetente *E. coli* transformiert, um im Anschluss die Expression unter verschiedenen Bedingungen zu optimieren.

#### **4.2 Klonierung des optimierten Flot-1 in den Vektor pGEX-4T-1**

Nach vorangegangener Amplifikation via PCR und Restriktionsanalysen der optimierten Sequenzen der C- und N-terminalen Enden des Flotillin-1 (aus synthetisch hergestellten Sequenzen, kloniert in pEX-A2) wurden diese nacheinander in den Vektor pGEX-4T1 ligiert. Als Wirtszelle dienten hier die kompetenten *E. coli*-Zellen XL-1-Blue. Der Kontrollverdau nach Ligation des C-terminalen Flot-1-Fragments in den bekannten Vektor, wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI HF und XhoI durchgeführt; für den Restriktionsverdau des N-terminalen Flot-1-Fragments wurden die Enzyme BamHI und XhoI eingesetzt (siehe Seite 19, Abbildung 5).

Aus beiden Ligationen konnten jeweils 3 richtige Klone gewonnen werden (siehe Abbildung 2), die zur Sequenzierung geschickt und auf ihre Richtigkeit überprüft wurden. Am Ende entstand ein endgültiges DNA-Konstrukt für das GST-Fusionsprotein BactOpti-Flot1-pGEX-4T1.



**Ergebnis: BactOpti-Flot1-pGEX-4T-1, Klon A, B, C**

**Abb. 4** Der Restriktionsverdau der Klone mit den Enzymen BamHI und XhoI nach vorangegangener Ligation der C- und N-terminalen Enden in pGEX-4T-1: Die 3 korrekten Vektor-Klone BactOpti-Flot1-CT-pGEX-4T-1 wurden als Klon A, B und C bezeichnet.

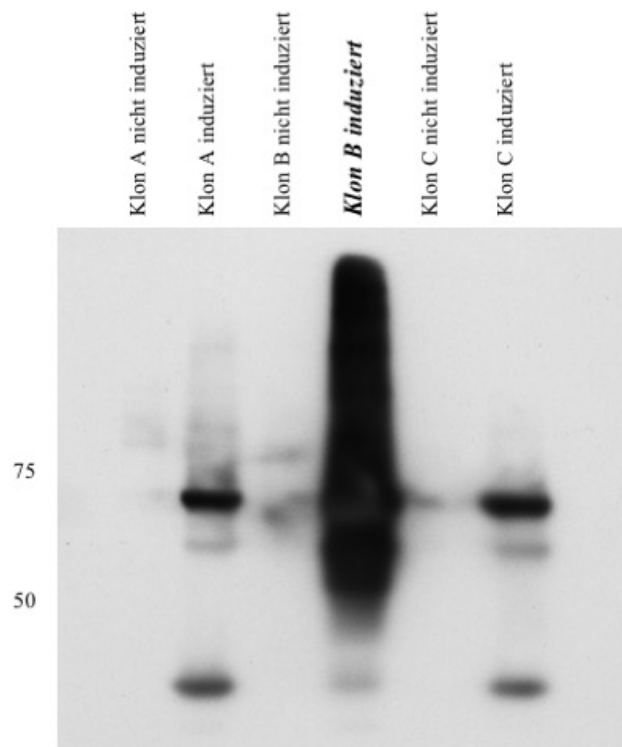
### 4.3 Detektion des expressionsstärksten Flotillin-1-Klons

Um einen Klon ausfindig zu machen, der die größte Menge an löslichem Flotillin-1 exprimiert, mit welchem die folgenden Expressionsversuche erfolgen sollten, wurde ein erster Expressionsversuch und Western Blot mit allen 3 Klonen durchgeführt.

Hierfür wurde eine 2,5 ml Kultur angesetzt. Unter folgenden Bedingungen wurde das optimierte Flotillin-1 Protein induziert:

- 0,2 mM IPTG
- über Nacht-Induktion
- bei Raumtemperatur

Nach der IPTG-Induktion konnte BactOpti-Flot1-pGEX-4T-1 Klon B mittels SDS-Gel-elektrophorese und Western Blot als expressionsstärkster Klon detektiert werden (Abbildung 8). Infolgedessen wurden alle folgenden Versuche mit dem Klon B durchgeführt.



**Abb. 5 Western Blot der 3 untersuchten Klone des optimierten Flot-1-GST mit und ohne IPTG-Induktion:** Es sollte unter den 3 Klonen der expressionsstärkste Klon ausgewählt werden. Die erwartete Größe des Fusionsproteins betrug etwa 70 kDa. Das Ergebnis lässt vermuten, dass Klon 2 am meisten Flot-1-GST exprimiert, obwohl das sehr starke Signal auf eine Überladung des Gels hindeutet. Es ist außerdem zu erkennen, dass alle induzierten Proben deutlich mehr Flot-1-GST exprimieren als die nicht induzierten.

#### 4.4 Expressionsvergleich mit verschiedenen Induktionszeiten

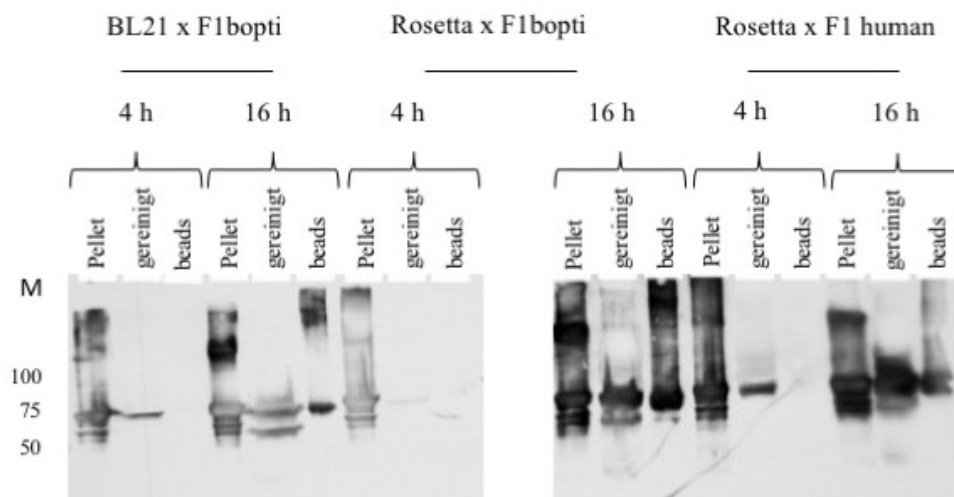
Nach Verifizierung des am besten exprimierenden Klons wurde die Expression des BactOpti-Flot1-pGEX-4T-1 Klon B in den E. coli-Stämmen Rosetta DE3 und BL21 DE3 verglichen und zusätzlich dem nicht-optimierten humanen Flotillin-1 in Rosetta-Zellen

gegenübergestellt (Abbildung 9). Hierbei handelte es sich um einen einmaligen Vorversuch, um lediglich eine Tendenz zur stärkeren Expression des optimierten Flotillin-1 festzustellen.

Für diesen Versuch wurde eine 10 ml Kultur angesetzt.

Unter folgenden Bedingungen wurden die Proteine induziert:

- 0,2 mM IPTG
- 4 h und 16 h- Induktion
- bei Raumtemperatur



**Abb. 6 Western Blot zum Vergleich der Expression des optimierten Flotillin-1, exprimiert in BL21 DE3 oder Rosetta DE3, sowie des nicht optimierten humanen Flotillin-1 in Rosetta DE3 (1 Versuch):** Ein Expressionsvergleich des optimierten Flotillin-1 in den Stämmen BL21 DE3 und Rosetta DE3 mit dem nicht-optimierten humanen Flotillin-1 in Rosetta DE3 wurde durchgeführt. Bei diesem Versuch wurde untersucht, ob auch die Induktionszeit Auswirkungen auf die Expression hat. Es wurden jeweils 3 Proben untersucht: 1. Die nach der Protein-Induktion lysierten Bakterien im Pellet, markiert als „Pellet“; 2. Das nach der Protein-Aufreinigung entstandene Eluat, markiert als „gereinigt“; 3. Die bei der Aufreinigung zusätzlich mit Glutathion-Seapharose-Beads versetzten Proben, markiert als „beads“.

Eine längere Induktionszeit stellte sich als durchaus einflussreich dar: die Banden der 4 h-induzierten Proteine sehen schwach aus, wohingegen die Banden der 16 h-induzierten

Proteine stärker sind. Ein Unterschied zwischen dem optimierten und dem nicht-optimierten humanen Flotillin-1 in Rosetta DE3 konnte allerdings nicht festgestellt werden. Die Signale bei 16 Stunden sind ähnlich stark.

Da das optimierte und das nicht-optimierte Flotillin-1 in Rosetta DE3 bis zu diesem Punkt recht ähnliche Ergebnisse hervorbrachten, wurden die Expressionsversuche mit dem optimierten Flotillin-1 nur in BL21 DE3 fortgesetzt, um zu prüfen, ob die Expression in diesen noch optimiert werden kann.

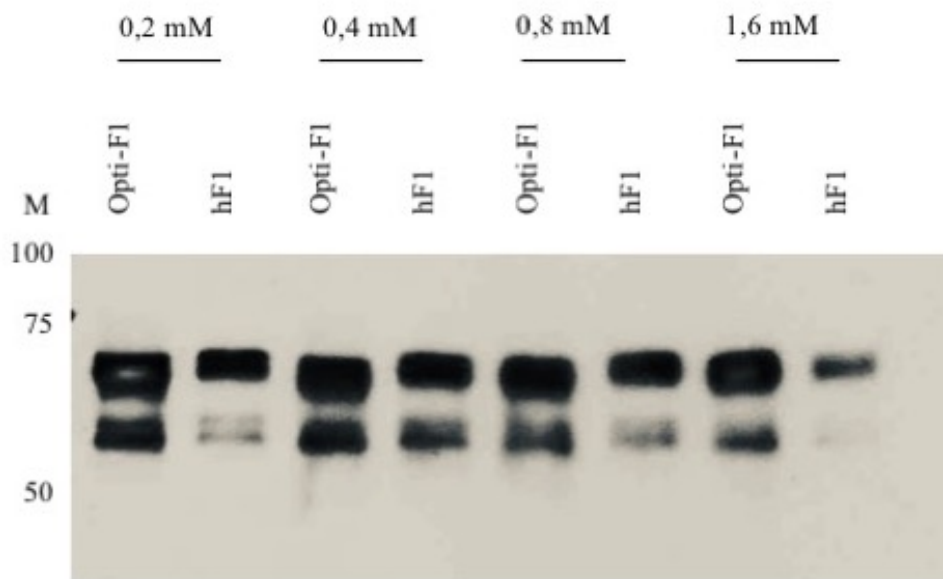
#### **4.5 Vergleich der Expression bei verschiedenen IPTG-Konzentrationen**

Nach den vorangegangenen Versuchen wurde die Expression des optimierten Flotillin-1 in BL21 DE3-Zellen und die des nicht-optimierten Flotillin-1 in Rosetta DE3-Zellen bei unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen verglichen. Da bereits der erste Versuch eindeutig zeigte, dass verschiedene IPTG-Konzentrationen keinen ausschlaggebenden Einfluss auf die Expression und Proteinausbeute haben, wurde kein weiterer Versuch für diesen Vergleich durchgeführt.

Hierfür wurden 2,5 ml Kulturen angesetzt. Unter folgenden Bedingungen wurden die Proteinproben induziert:

- *0,2 mM/ 0,4 mM/ 0,8 mM/ 1,6 mM IPTG*
- *über Nacht-Induktion*
- *bei 15°C*

Durch diesen Expressionsversuch konnte festgestellt werden, dass die Veränderung der IPTG-Konzentration keine ausschlaggebende Auswirkung auf die Expression des optimierten Flot-1-GST-Proteins im BL21 DE3-Stamm hat. In Abbildung 10 ist deutlich erkennbar, dass unabhängig von der IPTG-Konzentration eine ähnliche Menge des Proteins exprimiert wird. Folglich konnte für den nächsten Versuch, zum Vergleich des optimierten Flotillin-1 mit dem Wildtyp, eine IPTG-Konzentration gewählt werden.



**Abb. 7 Western Blot mit dem optimierten Flotillin-1 in BL21 DE3 und dem nicht optimierten Flotillin-1 in Rosetta DE3 mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen (1 Versuch):** Untersucht wurde der Einfluss der IPTG-Konzentration, bei Induktion der Proteine, auf die Expression. Die Ausbeute war bei allen Proben ähnlich. Die verwendete IPTG-Konzentration schien keinen ausschlaggebenden Einfluss auf die Expression des Flotillin-1 zu haben- weder auf das optimierte, noch auf das nicht optimierte. Die Expression beim Letzteren nimmt im Vergleich zum optimierten Flotillin-1 ab. Im direkten Vergleich erscheinen die Banden des optimierten Flotillin-1 tendenziell stärker als die des nicht optimierten.

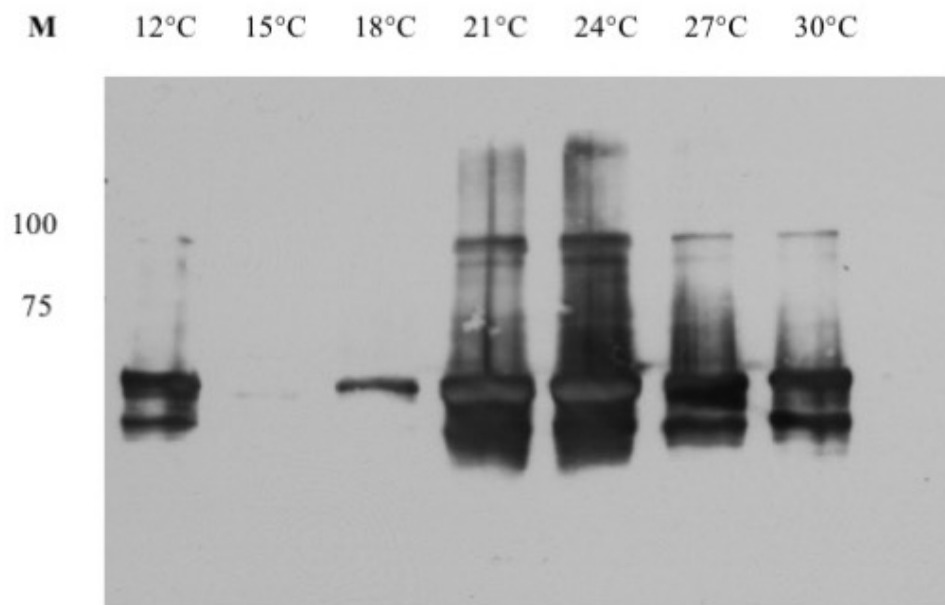
#### 4.6 Vergleich der Expression bei Veränderung der Induktionstemperatur

Auf dem Weg zur Findung der optimalen Bedingungen zur Expression der höchstmöglichen Menge an Flotillin-1, wurde als nächstes im Rahmen eines Vorversuchs zur Erfassung eines geeigneten Zeitpunkts der Parameter Temperatur verändert. Es sollte festgestellt werden, ob es durch Veränderung der Temperatur während der Induktion zur besseren Expression des optimierten Proteins BactOpti-Flot1-pGEX-4T-1 Klon B in BL-21 DE3 kommt.

Hierfür wurden 2,5 ml Kulturen angesetzt. Das Protein wurde unter folgenden Bedingungen induziert:

- 1,6 mM IPTG
- Über Nacht-Induktion
- bei 12°C/ 15°C/ 18°C/ 21°C/ 24°C/ 27°C/ 30°C

Durch diesen Versuch konnten erste Optimierungserfolge erzielt werden. Es stellte sich heraus, dass die Wahl der richtigen Induktionstemperatur tatsächlich Auswirkungen auf die Proteinexpression hat. Die Gegenüberstellung der verschiedenen Temperaturen lässt erkennen, dass die optimale Temperatur für die Proteinexpression des optimierten Flotillin-1 zwischen 21°C und 24°C liegt (Abbildung 11).




---

**Abb. 8 Western Blot des optimierten Flotillin-1 mit verschiedenen Induktionstemperaturen (1 Versuch):** Es wurde getestet, ob die Temperatur während der Induktion einen Einfluss auf die Proteinexpression nehmen kann. Es ist zu erkennen, dass bei 21°C und 24°C am meisten Flotillin-1 produziert wurde.

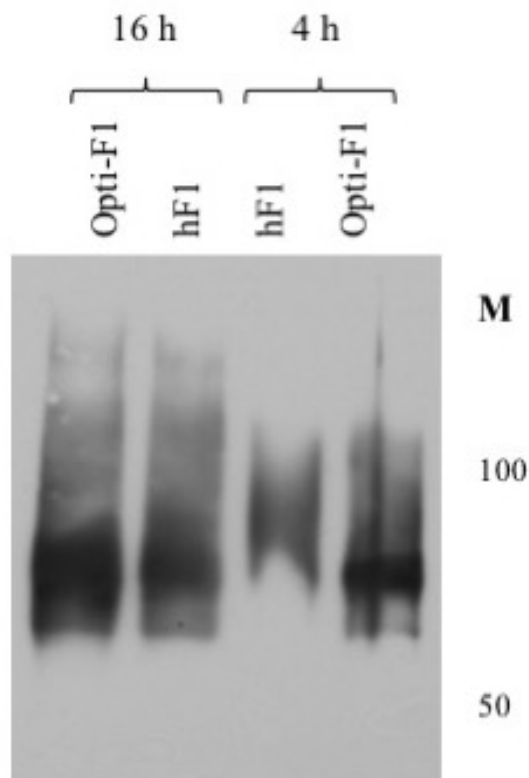
#### 4.7 Vergleich der Expression bei unterschiedlichen Induktionszeiten

Als einen möglichen zu verändernden Parameter wurde die Induktionszeit nochmal getestet. Zusätzlich wurden bei diesem Versuch wieder das nicht-optimierte Flotillin-1 in Rosetta DE3-Zellen dem optimierten Protein in BL21 DE3-Zellen gegenübergestellt. Um eine erste Tendenz festzustellen, wurde hier ein Vorversuch durchgeführt.

Hierfür wurde erneut eine 2,5 ml Kultur angesetzt. Die Proteinproben wurden unter folgenden Bedingungen induziert:

- 0,8 mM IPTG
- 4 h- und 16 h-Induktion
- bei 24°C

Durch diesen Versuch konnte festgestellt werden, dass sich eine längere Induktionszeit in der optimalen Temperatur positiv auf die Expression des optimierten Flotillin-1 auswirkt (Abbildung 12).



**Abb. 9 Western Blot und Direktvergleich zwischen dem optimierten und dem nicht optimierten Flotillin-1 nach vorheriger Untersuchung der Optimalbedingungen für die Expression des optimierten Flotillin-1 (1 Versuch):** Nachdem die optimalen Bedingungen für die Expression des optimierten Flotillin-1 untersucht und festgestellt wurden, folgte zuletzt noch der Vergleich zu dem nicht optimierten humanen Flotillin-1. Es wurden die Induktionszeiten von 4 h und 16 h gegenübergestellt. Es konnte festgestellt werden, dass eine längere Induktionszeit positiven Einfluss auf die Expression hat.

Was den Vergleich des optimierten mit dem nicht optimierten Flotillin-1 angeht, so konnte festgestellt werden, dass das optimierte Protein zwar etwas länger braucht, jedoch am Ende das expressionsstärkere Protein ist. Besonders in großen Mengen kann das optimierte Flotillin-1 durchaus von Vorteil sein, jedoch bringt das nicht optimierte Flotillin-1 auch gute und zufriedenstellende Ergebnisse bei optimierten Expressionsbedingungen (Temperatur, IPTG-Konzentration und Zeit).

## 5 Diskussion

Für die Expressionsversuche wurde das codon-optimierte Flotillin-1 aus Teilstücken kloniert. Die Sequenzen wurden synthetisiert und im Rahmen meiner Arbeit in den Vektor pGEX-4T-1 zusammengesetzt. Zum Zeitpunkt der Versuchsreihe, im Jahre 2014, war die Klonierung aus Teilstücken deutlich günstiger als die Synthese der kompletten Sequenz von ca. 1300 bp an einem Stück. Mittlerweile sind die Techniken so weit fortgeschritten, dass eine Synthese von Fragmenten über 1000 bp deutlich günstiger als damals wäre.

### 5.1 Die Rolle des Protein-Tags und mögliche Auswirkungen einer anderen Tag-Wahl

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, sowohl durch Codon-Optimierung des Flotillin-1 als auch durch Optimierung von expressionsbeeinflussenden Parametern, wie Induktionszeit, Temperatur und IPTG-Konzentration, die optimalen Bedingungen für eine möglichst hohe Proteinausbeute von löslichem Flot-1-GST zu schaffen. Vergleichbar ist diese Versuchsreihe mit der Arbeit von Ding et. al.<sup>44</sup>. Hier wurde erstmals die Expression von rekombinantem Flotillin-1 in E. coli-Bakterien beschrieben und eine hohe Reinheit und große Expressionsmenge erreicht. Einen entscheidenden Einfluss könnte das genutzte Protein-Tag gehabt haben. Während in meiner Arbeit von Glutathion-S-Transferase (GST) als Protein-Tag Gebrauch gemacht wurde, untersuchten Ding et. al. verschiedene Protein-Tags und entschieden sich letztendlich für den Thioredoxin-Tag, welcher sich als expressionsstärkstes Tag herausstellte. Eine weitere Publikation beschäftigte sich mit verschiedenen Protein-Tags und damit, wann welches eingesetzt werden sollte<sup>45</sup>. Getestet wurden folgende Tags:

- Polyhistidin-Tag (6xHis tag)
- GST
- HaloTag®-Protein
- HiBiT Peptide Tag
- NanoLuc® Luciferase

Das 6xHis-Tag und das GST-Tag werden zur Reinigung von Proteinen, die in E. Coli-Bakterien exprimiert wurden, eingesetzt. Das 6xHis-Tag kann aber auch, genauso wie das Halo-Tag, sowohl für in Bakterien als auch in Säugetierzellen exprimierte Proteine genutzt werden. Das nur 11 Aminosäuren lange HiBiT Peptide-Tag eignet sich gut als

Proteinmarker, während das 19 kDa große Reporterenzym NanoLuc® Luciferase helfen kann, die zelluläre Lokalisation eines Fusionsproteins zu erkennen und den Weg des Proteins zu verfolgen. Somit ist das Fazit von Klink et al.<sup>45</sup>, dass nicht alle Proteine mit allen Tags exprimierbar sind. Die Auswahl des Tags ist abhängig von dem zu exprimierenden Protein und von dem jeweiligen Zweck.

In meiner Arbeit wurde GST als Protein-Tag für die Aufreinigung und Interaktionsanalyse genutzt. Harper und Speicher<sup>46</sup> berichteten über die Vorteile des 26 kDa großen GST als Protein-Tag. GST als Fusionstag kann wie eine Art Chaperon agieren und für eine vereinfachte Proteinfaltung sorgen, wodurch eher lösliche Proteine resultieren sollten, als sogenannte Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*), welche gänzlich synthetisierte, aber nur teilweise gefaltete und aggregierte Proteine sind und durch Färbung lichtmikroskopisch visualisiert werden können. Die richtige Faltung ist natürlich zur Forschung an Flotillin-1-Funktionen oder Interaktionspartnern unerlässlich und notwendig. Sollte eine Spaltung des GST vom Fusionsprotein gewünscht sein, so ist dies durch eine Erkennungssequenz möglich, die sich zwischen dem GST-Tag und dem Zielprotein befindet. Aus diesen Gründen und auch aufgrund der Tatsache, dass GST v.a. für in *E. coli*-Bakterien exprimierte Proteine genutzt wird, ist es also naheliegend, dass auch Kurrle et al. 2013<sup>47</sup> Flot-1-GST nutzte, um u.a. die direkte Interaktion von Flotillinen mit  $\gamma$ -Catenin zu beweisen. Auch Tomasovic et al. nutzte im Jahre 2011<sup>48</sup> Flot-1-GST, um Flotillin-1 und CAP (C-Cbl associated protein) als neue Interaktionspartner von FRS2 (Fibroblast growth factor receptor substrate) zu identifizieren. Die Expressionen erfolgten in beiden Studien immer in *E. coli*-Stämmen. Trotzdem besteht aufgrund der Ergebnisse von Ding et al. die Möglichkeit, dass bei Nutzung eines anderen Protein-Tags, zum Beispiel des Thioredoxin-Tags, eine höhere Proteinausbeute hätte erreicht werden können. Dies kann Gegenstand zukünftiger Forschungen sein.

## 5.2 Der Einfluss des Promotors

Die Proteinexpression in *E. coli*-Bakterien funktioniert nach dem Prinzip des lac-Operons: Ein Repressor-Protein sitzt am Operator und verhindert das Passieren der RNA-Polymerase und somit auch die Expression des Proteins, in diesem Fall des Flotillin-1. Die in dieser Arbeit verwendeten kompetenten Zellen BL21 DE3 und Rosetta DE3 von

Novagen besitzen eine chromosomale Kopie der T7-RNA-Polymerase (<https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/mm/69450m> und <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/mm/70954>)<sup>49</sup>. Als Promotor, passend zur Polymerase, wird das lacUV5 verwendet, der das Lactose-Analogon IPTG als Induktor reguliert. So kann bei einer Induktion das IPTG an den Repressor binden, die T7-RNA-Polymerase den lacUV5-Promotor lesen und den Operator passieren, damit das gewünschte Flotillin-1-mRNA transkribiert werden kann. Wie Casali im Jahre 2003<sup>50</sup> erklärte, brauchen E. coli-Bakterien u.a. hochaktive und induzierbare Promotoren, welche für eine gute Genregulation sorgen sollen. Oftmals werden der lac-, tac-, oder lacUV5-Promotor verwendet. Laut Estrem et al. (1999)<sup>51</sup> bestehen bakterielle Promotoren aus 3 RNA-Polymerase-Erkennungssequenzen, welche von diversen Untereinheiten erkannt werden. Bakterielle Promotoren unterscheiden sich in ihrer Nukleotidsequenz eher weniger voneinander, ganz im Gegensatz zu den eukaryotischen Promotoren. Natürlich ist der Promotor ein unerlässlicher Bestandteil der Genregulation, jedoch scheint aufgrund ihrer sehr ähnlichen Sequenz die Auswahl des richtigen Promotors nicht unbedingt kritisch zu sein. Laut Zhang et al.<sup>52</sup> ist das Ersetzen des Promotors der T7-RNA-Polymerase durch andere Arten ein effektiver Weg, um das Transkriptionslevel zu regulieren. So haben Du et al. 2021<sup>53</sup> die 3 Promotoren ParaBAD, PrhaBAD und Ptet an der T7-RNA-Polymerase getestet. Auch wenn alle 3 gute Ergebnisse hervorbrachten, so konnten 2 der getesteten Promotoren, PrhaBAD und Ptet, die Transkription der T7-RNA-Polymerase viel präziser regulieren und sogar mehr Optionen für die Expression verschiedener rekombinanter Proteine bereitstellen, insbesondere toxische Proteine.

### **5.3 E. coli-Bakterien und die Codon-Optimierung**

E. coli-Bakterien haben sich als Goldstandard und- aufgrund ihrer Eigenschaften- als sehr vorteilhaft für Expressionsversuche herausgestellt. Wie Casali<sup>50</sup> erklärte, werden E. coli-Bakterien u.a. gerne wegen ihrer hohen Wachstumsrate, sowie ihrer Fähigkeit in mikrobiologischen Medien zu wachsen, genutzt. Als mögliche Wirtsstämme werden u.a. auch die in dieser Arbeit verwendeten BL21 DE3 und Rosetta DE3 genannt. Problematisch wird die Arbeit mit E. coli-Bakterien allerdings, wenn es um die Codonnutzung geht. Wie Fu et al.<sup>54</sup> zum Thema Codon-Optimierung erklärten, korreliert das Expressionslevel des Zielproteins stark mit der Codon-Präferenz des Wirts. Seltene Codons können die Ex-

pressionsrate dämpfen oder sogar zu Translationsfehlern führen. Somit ist bei der Nutzung von *E. coli*-Bakterien als Wirtszelle eine Codon-Optimierung unerlässlich, um zum einen den Verlust des Expressionslevels zu vermeiden und zum anderen um nicht auf die Vorteile der *E. coli*-Bakterien verzichten zu müssen. Wichtig ist, dass bei der Codon-Optimierung die DNA-Sequenz einer Spezies in zu einer anderen besser passenden Sequenz konvertiert wird, aber nur die Problemstellen verändert werden, ohne dabei die Aminosäuresequenz zu verändern. Es werden also selten genutzte Codons durch die vom Wirt präferierten Codons ersetzt, die aber für dieselben Aminosäuren stehen. Fu et al. stellten in ihrer Arbeit die Methode des Deep Learnings- eine Art der Codon-Optimierung mittels sogenannter Codon-Boxen- vor und verglichen sie mit den mittlerweile gängigen Optimierungsprogrammen, wie ThermoFisher und Genewiz, die mit gewissen Codon-Optimierungsalgorithmen arbeiten. Hierbei liegt eine Tabelle mit Codon-Boxen (eingeteilt in 3 Typen), Aminosäuren und Codons vor. Die zu optimierende, ursprüngliche Codonsequenz wird hier also zunächst in eine Aminosäuresequenz dekodiert. Die optimierten Codons werden dann, laut Fu et al., durch eine Eins-zu-Eins-Zuordnung der Aminosäuren und Codon-Boxen mit Codons, aus der erwähnten Tabelle, ermittelt. Aufgrund solcher Entwicklungen wäre es also interessant, die traditionell optimierte und die AI-optimierte Sequenz in Bezug auf Kosten, Aufwand und Erfolgsrate/-unterschiede zu vergleichen. Die Optimierung der zugrundeliegenden Arbeit erfolgte bereits vor über 10 Jahren, sodass heutzutage möglicherweise bessere Ergebnisse erzielt werden könnten.

#### **5.4 Kompetente *E. coli*-Zellen**

Sowohl bei der Klonierung als auch bei den Expressionsversuchen wurde in dieser Arbeit von kompetenten Zellen Gebrauch gemacht. Für die Expressionsversuche wurden BL21 DE3 und Rosetta DE3, welches auch ein BL21-Derivat ist und für tendenziell schwächere Signale in den Western Blots sorgte, verwendet. Obwohl der Fokus dieser Arbeit viel mehr auf der Beeinflussung der Proteinexpression in der Induktionsphase liegt, wäre es interessant gewesen, bei den Expressionsversuchen andere kompetente Zellen zu vergleichen oder weitere Derivate der genannten *E. coli*-Stämme zu nutzen, um auch hier den Einfluss auf die Flotillin-1-Expression zu untersuchen (Tegel et al., 2010)<sup>55</sup>. Interessant wäre der Vergleich verschiedener Stämme, da diese trotz ihrer Ähnlichkeit doch auch Unterschiede aufweisen. So sprechen auch hier Tegel et al. zum Beispiel davon, dass der

Rosetta-Stamm u.a. auch für seltene Codons codiert und erklären weiter, dass der Gehalt rarer Codons trotzdem einen bedeutenden Effekt auf die Proteinreinheit hinterlässt.

Zum Thema „Vergleich kompetenter Zellen“ veröffentlichte die Arbeitsgruppe von Fathi-Roudsari et al.<sup>56</sup> eine Studie, in der die Expression des rekombinanten Proteins Retenonase in den E. coli-Stämmen BL21, Rosetta-gami und Shuffle T7 verglichen wurde. Bei Shuffle T7 handelt es sich um einen E. coli-Stamm, welcher darauf spezialisiert ist Disulfid-enthaltende, rekombinante Proteine aus einem Plasmid mit einem T7-Promoter zu exprimieren. Der Rosetta-gami-Stamm wiederum wurde entwickelt, um die Expression von eukaryotischen Proteinen in E. coli-Bakterien zu verbessern, indem er die Codon-Präferenz der Prokaryoten überwindet. Als Induktor wurde ebenfalls IPTG verwendet. Wie auch in dieser Arbeit, erzielten die Forschenden in der Studie die höchste Ausbeute in Form von Einschlusskörperchen mit BL21, gefolgt von Rosetta-gami und Shuffle T7. Außerdem wurde festgestellt, dass mit BL21 die maximale Rückgewinnung an aktivem und löslichem Protein aus Einschlusskörperchen möglich war. Diese Studie bestätigt also die Erkenntnis meiner Arbeit, dass BL21 häufig am besten geeignet ist für die Expression von rekombinanten Proteinen. Jeder Stamm hat jedoch seine Vorzüge, je nach Eigenschaft des vorliegenden Proteins- also ob es Disulfid-Brücken beinhaltet, wenn es sich bspw. um ein eukaryotisches Protein handelt.

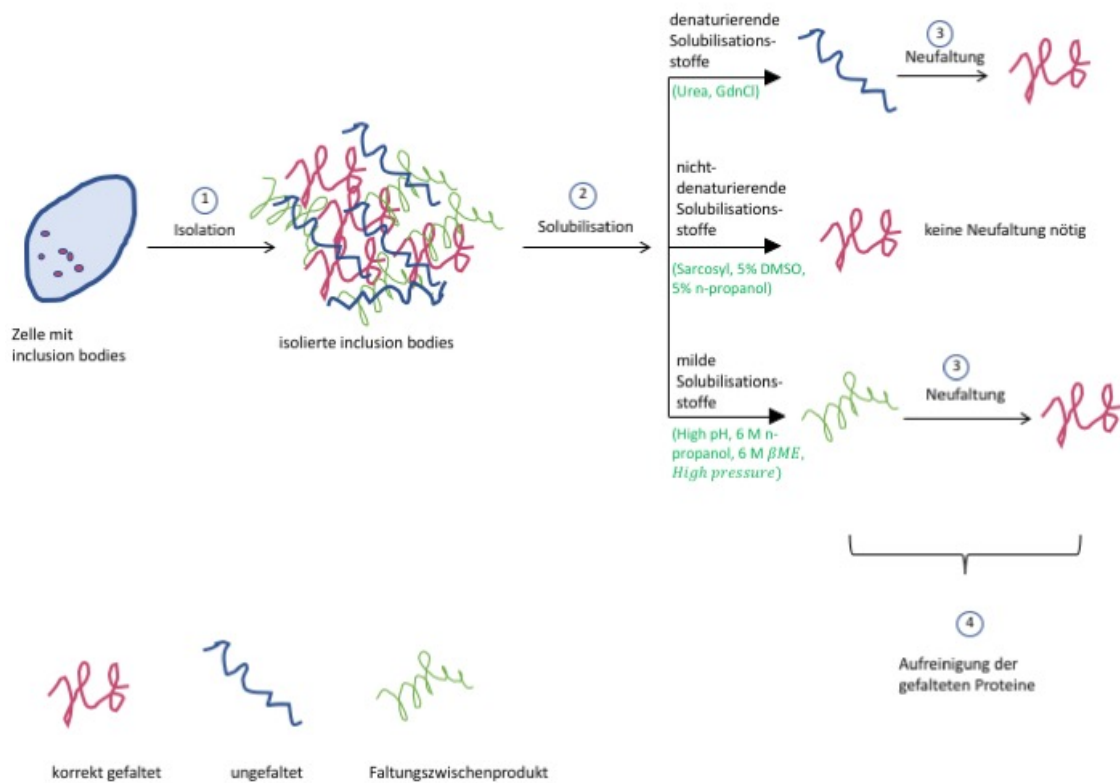
Doch gibt es neben dem Goldstandard „E. coli“ auch noch andere Möglichkeiten, um vielleicht sogar die Bildung von *inclusion bodies* zu umgehen? Schein et al.<sup>57</sup> diskutierten in ihrem Review das Problem der Produktion löslicher, rekombinanter Proteine in Bakterien. Das Hauptproblem stellte auch damals die Bildung von *inclusion bodies* dar. Diese bilden sich hauptsächlich bei Induktionstemperaturen von über 30°C und sorgen dafür, dass die Proteine unlöslich werden. Bei Temperaturen unter 30°C sind jedoch die meisten Proteine aktiv und löslich. Der einfachste Weg, um überhaupt die Bildung von *inclusion bodies* zu vermeiden bzw. zu reduzieren, ist die Wachstumstemperatur zu senken. So brachte das Technologieunternehmen Agilent Technologies, basierend auf der Studie von Ferrer et al.<sup>58</sup>, ihre *ArcticExpress Cells*<sup>59</sup> heraus. In diesen Zellen werden Chaperone exprimiert, welche bei 10-13°C arbeiten und zur korrekten Faltung der exprimierten Proteine führen. In Anbetracht dessen, dass im Rahmen meiner Arbeit u.a. herausgefunden wurde, dass die optimale Temperatur der Wirtszellen, wie BL21 DE3, zur Expression von Flotillin-1 zwischen 21 und 24°C, und somit weit über der optimalen Temperatur der Arctic Express-Zellen liegt, wird eine Flotillin-Expression in eben diesen Zellen vermut-

lich nicht erfolgreich sein. Dies könnte durch einen Expressionsvergleich, zwischen ArcticExpress-Zellen und den in meiner Arbeit etablierten Bedingungen bzgl. optimaler Expression, untersucht werden.

### **5.5 Isolation von Flotillin-1 aus Inclusion bodies**

Wie von Villaverde et al.<sup>60</sup> erklärt, führt thermischer Stress zu einer Überexpression von Hitzeschockproteinen (Hsp) und zu Proteinaggregationen im Sinne von *inclusion bodies*. Nachdem Einschlusskörperchen bei Proteinfaltungserkrankungen, wie bspw. Chorea Huntington oder Alzheimer, festgestellt wurden und auch in der Pharmakologie Therapieansätze gegen Faltungsfehler und Aggregation entwickelt werden, findet der Nachweis von *inclusion bodies* auch Gebrauch in der Gentechnik - zum Beispiel zur Isolierung von rekombinanten Proteinen. Durch die Nutzung von *inclusion bodies* zur Gewinnung rekombinanter Proteine wird u.a. der Gebrauch chromatographischer Techniken reduziert. Eine Studie von Singh et. al.<sup>61</sup> zu dem Thema „Proteinrückgewinnung aus Einschlusskörperchen von *Escherichia coli* mithilfe eines milden Solubilisierungsverfahrens“ erklärte, dass wenn das Expressionslevel von Proteinen über 2% der gesamten zellulären Proteine liegt, dies häufig zur Bildung von *inclusion bodies* führt. Außerdem wird berichtet, dass durch die milde Solubilisation und Neufaltung der Proteinaggregate aus *inclusion bodies* die Ausbeute und die Qualität der gewonnenen Proteine erhöht werden können. Wie in der Abbildung 13 schematisch dargestellt, sind im Allgemeinen 4 Schritte nötig, um Proteine mittels *inclusion bodies* aus *E. coli*- Bakterien zu gewinnen.

Obwohl in der Abbildung 9 zu sehen ist, dass sich in den Pellets viel Flotillin-1 in scheinbar unlöslicher Form befindet, welche möglicherweise als *inclusion bodies* vorliegen, wurde die hier beschriebene Art der Proteingewinnung aus *inclusion bodies* im Rahmen dieser Arbeit aber nicht durchgeführt, da dies für Flotillin-1 erfahrungsgemäß nicht funktioniert (nicht-veröffentlichte Daten der AG Tikkanen).



**Abb. 10 Schematische Darstellung der Proteingewinnung aus *inclusion bodies*, modifiziert nach Singh et al. 2015:** Für die Proteingewinnung aus Einschlusskörperchen sind 4 Schritte unerlässlich: 1. Die Isolierung der gereinigten *inclusion bodies*. 2. Die Solubilisierung der *inclusion bodies*. 3. Die Faltung der solubilisierten Proteine, sofern nötig. 4. Die Aufreinigung der gefalteten Proteine. Besonders entscheidend sind hierbei die Schritte 2 und 3.

## 5.6 Schlussfolgerung der Versuchsergebnisse und Ausblick

Nach den vorangegangenen Versuchen, welche den Einfluss von Induktionszeit, Induktionstemperatur und IPTG-Konzentration untersuchten, kann geschlussfolgert werden, dass mit dem Wissen, dass vom Wirt selten genutzte Codons zu Translationsfehlern führen können, die Optimierung auf jeden Fall sinnvoll war. Trotz der unsauberen Signale in den Blots hat das optimierte Flotillin-1 im Vergleich zum nicht optimierten zumindest tendenziell bessere Ergebnisse hervorgebracht, was auf große Mengen betrachtet sicherlich auch etwas ausmacht, jedoch bringt das nicht-optimierte Flotillin-1 auch gute Ergebnisse. Die Signale in den Western Blots waren trotz des wiederholten Versuchs mit einer

höheren Verdünnung immer noch nicht sauber, weshalb ich mich letztlich auch gegen eine Quantifizierung entschieden habe. Die Proben hätten ggf. noch viel mehr verdünnt werden müssen, um saubere Banden zu erzielen. Dies hätte jedoch die Genauigkeit der Quantifizierung negativ beeinflusst.

Es konnte festgestellt werden, dass eine längere Induktionszeit für eine deutlich bessere Proteinexpression des optimierten Flot-1-GST sorgt. Der Einfluss der Induktionstemperatur ist allerdings recht deutlich sichtbar. So kam ich zu der Erkenntnis, dass die optimale Temperatur zur Expression des optimierten Fusionsproteins zwischen 21- 24°C liegt.

Durch diese Versuchsreihe kristallisierten sich somit also folgende Bedingungen zur Expression einer höchstmöglichen Menge löslichem Flotillin-1, als optimal heraus:

1. Nutzung des für bakterielle Expression optimierten Flotillin-1
2. Induktion und Expression bei Temperaturen zwischen 21°C und 24°C
3. Über Nacht-Induktion (16 h)

Was nun für zukünftige Optimierungsversuche interessant wäre, ist nicht die Veränderung der genannten Parameter, sondern die der grundlegenden Bestandteile der Expression, wie die Protein-Tags, die kompetenten Zellen und die Verfahrenstechniken. Flotilline kommen in detergenzienresistenten Mikrodomänen- kurz DRMs- vieler Organismen wie Pflanzen, Pilze und der sozialen Amöbe *Dictyostelium discoideum* vor<sup>25</sup>. Da diese also offensichtlich fähig sind Flotilline zu produzieren, wäre eine Versuchsreihe mit der Expression von Flotillin in den Zellen dieser Organismen von großem Interesse, wenn auch der Goldstandard nicht ohne Grund die *E. coli*-Bakterien sind. Ein weiterer Punkt ist die Wahl des optimierten Klons. In der vorliegenden Arbeit wurde der Klon B als expressionstärkster Klon detektiert. Zukünftig könnten noch mehr Klone untersucht werden, um möglicherweise stärkere Klone identifizieren zu können. Somit besteht also die Möglichkeit, eine neue Expressionsreihe mit anderen Tags, anderen kompetenten Zellen und weiteren Klonen, sowie auch Zellen anderer Organismen zu starten und diese dann mit der vorliegenden Arbeit zu vergleichen.

## 6 Zusammenfassung

Das humane Flotillin-1-Protein ließ sich bislang in Prokaryoten nicht gut exprimieren. Der Grund könnte die unterschiedliche Codonbenutzung in Pro- und Eukaryoten sein. Um für Forschungszwecke mehr lösliches Flotillin-1 als GST-Fusionsprotein zu gewinnen, war das Ziel dieser Arbeit „codon-optimierte“ Flotillin-1 Expressionsplasmide zu generieren, diese hinsichtlich Expression und Kulturbedingungen zu untersuchen und zu optimieren, sodass die höchstmögliche Proteinausbeute geschaffen wird. Dabei sollten, nach Optimierung des Leserasters des humanen Flotillin-1 für die bakterielle Expression, die Parameter Temperatur, Induktionszeit und -konzentration untersucht und optimiert, sowie die Expression des optimierten Flot-1-GST Fusionsproteins mit der nicht optimierten Sequenz verglichen werden.

Für die Expressionsversuche wurde das codon-optimierte Flotillin-1 als GST-Fusion in den Vektor pGEX-4T-1 kloniert. Nach ersten Expressionsversuchen mit einer 0,2 mM IPTG-Induktion über Nacht und bei Raumtemperatur in den dafür geeigneten kompetenten Zellen BL21, konnte mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot das expressionsstärkste Klon detektiert werden. Mit diesem wurden alle folgenden Versuche durchgeführt. Es wurden lediglich Vorversuche durchgeführt, um zunächst eine Tendenz zu ermitteln, ob die Optimierung gewinnbringend ist. Als Wirte für das Fusionsprotein dienten BL21-Zellen, nachdem zwischen der Expression in Rosetta DE3 und BL21 DE3 kein deutlicher Unterschied festgestellt werden konnte. Das humane Flotillin-1 wurde in Rosetta DE3-Zellen exprimiert.

Im Rahmen der Expressionsversuche konnte festgestellt werden, dass die IPTG-Konzentration keinen ausschlaggebenden Unterschied bei der Proteinexpression zeigte. Die Untersuchung der Induktionstemperatur konnte aber recht deutlich zeigen, dass die optimale Temperatur zwischen 21°C und 24°C liegt. Was den Vergleich des optimierten mit dem nicht-optimierten Flotillin-1 angeht, so konnte festgestellt werden, dass das optimierte Protein zwar etwas länger braucht, jedoch am Ende das expressionsstärkere Protein ist. Besonders in großen Mengen kann das optimierte Flotillin-1 durchaus von Vorteil sein, jedoch bringt das nicht-optimierte Flotillin-1 auch gute und zufriedenstellende Ergebnisse bei optimierten Expressionsbedingungen (Temperatur, IPTG-Konzentration und Zeit).

## 7 Summary

The human flotillin-1 protein is difficult to express in prokaryotes, most likely due to the different codon usage in pro- and eukaryotes. To obtain more soluble flotillin-1 as a GST fusionprotein for research purposes, the aim of this work was to generate codon-optimized flotillin-1 expression plasmids, and to investigate them with regard to expression and culture conditions and to optimize these parameters to maximize protein yield. After optimizing the codons of the reading frame of human flotillin-1 for bacterial expression, the parameters temperature, induction-time and -concentration were investigated and optimized. In addition, expression of the optimized Flot-1-GST fusion protein was compared with that of the non-optimized sequence.

The codon-optimized flotillin-1 was cloned for the expression experiments in the vector pGEX-4T-1. After initial expression experiments with 0.2 mM IPTG induction overnight and at room temperature in the competent BL21 cells, the strongest expression clone was chosen by means of SDS-gel electrophoresis and Western Blot. All subsequent experiments were carried out with this clone. Only preliminary tests were carried out in order to establish a trend whether or not optimization is profitable. BL21 DE3 cells served as hosts for the fusion protein, because no clear difference between the expression in Rosetta DE3 and BL21 DE3 could be detected in the preliminary experiments. The human flotillin-1 was expressed in suitable Rosetta DE3 cells.

In the context of the expression experiments, I showed that the IPTG-concentration does not play a major role in protein expression. However, the induction temperature optimum was found to be between 21°C and 24°C. Regarding the comparison of the optimized with the non-optimized flotillin-1, it was found that the optimized protein needs a little longer to be expressed, but at the end, it is the most expressive protein. The optimized flotillin-1 may be beneficial especially in large quantities, but the non-optimized flotillin-1 also yields good and satisfactory results under optimized expression conditions (temperature, IPTG concentration and time).

## 8 Abkürzungsverzeichnis

cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
DTT	1,4-Dithio-D, L-threitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GST	Glutathion-S-Transferase
IF	Immunfluoreszenz
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kbp	Kilo-Basenpaare
LB	engl. lysogeny broth, dt. Luria-Bertani-Medium
N-Terminus	Amino-Terminus
NaAc	Natriumacetat
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
Rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Laurylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
TBST	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween20 (tris buffered saline Tween)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
WB	Western Blot

## 9 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b>	Schematische Darstellung der Molekularstruktur von Flotillinen, modifiziert nach Kühne 2015.....	2
<b>Abbildung 2</b>	Ligation der separat synthetisierten C- und N-terminalen Bereiche des codon-optimierten Flotillin-1 in den Vektor pGEX-4T-1.....	16
<b>Abbildung 3</b>	Vergleich der Codons des nicht-optimierten und des optimierten humanen Flot-1.....	25
<b>Abbildung 4</b>	Der Restriktionsverdau der Klone mit den Enzymen BamHI und XhoI nach vorangegangener Ligation der C- und N-terminalen Enden in pGEX-4T-1.....	28
<b>Abbildung 5</b>	Western Blot der 3 untersuchten Klone des optimierten Flot-1-GST mit und ohne IPTG-Induktion.....	29
<b>Abbildung 6</b>	Western Blot zum Vergleich der Expression des optimierten Flotillin-1, exprimiert in BL21 DE3 oder Rosetta DE3, sowie des nicht optimierten humanen Flotillin-1 in Rosetta DE3 (1 Versuch).....	30
<b>Abbildung 7</b>	Western Blot mit dem optimierten Flotillin-1 in BL21 DE3 und dem nicht optimierten Flotillin-1 in Rosetta DE3 mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen (1 Versuch).....	32
<b>Abbildung 8</b>	Western Blot des optimierten Flotillin-1 mit verschiedenen Induktionstemperaturen (1 Versuch).....	33
<b>Abbildung 9</b>	Western Blot und Direktvergleich zwischen dem optimierten und dem nicht optimierten Flotillin-1 nach vorheriger Untersuchung der Optimalbedingungen für die Expression des optimierten Flotillin-1 (1 Versuch)	34
<b>Abbildung 10</b>	Schematische Darstellung der Proteingewinnung aus <i>inclusion bodies</i> , modifiziert nach Singh et al. 2015.....	42

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Materialien und Geräte.....	10
Tabelle 2	Chemikalien und Puffer.....	11
Tabelle 3	Selbthergestellte Puffer und deren Zusammensetzung.....	12
Tabelle 4	Kits und Säulen.....	14
Tabelle 5	Plasmide.....	15
Tabelle 6	Die verwendeten Primer.....	15
Tabelle 7	Bakterienstämme.....	15

## 11 Literaturverzeichnis

1. Thomas Schulte, Katja A. Paschke, Ute Laessing, Friedrich Lottspeich, Claudia A. O. Stuermer (1997): Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration 124 (2): 577–587.
2. Perry E. Bickel,<sup>a,b,c</sup> Philipp E. Scherer,<sup>a,d</sup> Jan E. Schnitzer,<sup>e,f</sup> Phil Oh,<sup>e</sup> Michael P. Lisanti,<sup>a,g</sup> and Harvey F. Lodish<sup>a,h,i</sup> Flotillin and Epidermal Surface Antigen Define a New Family of Caveolae-associated Integral Membrane Proteins (1997) Vol. 272, No. 21, Issue of May 23, pp. 13793–13802
3. Daniela Volonte, Ferruccio Galbiati, Shengwen L, Kazutoshi Nishiyama, Takashi Okamoto, and Michael P. Lisanti (1999): Flotillins/Cavatellins Are Differentially Expressed in Cells and Tissues and Form a Hetero-oligomeric Complex with Caveolins in Vivo Vol. 274, No. 18, Issue of April 30, pp. 12702–12709
4. PHILIPSBORN, FERRER-VAQUER, RIVERA-MILLA, STUERMER, LAGATRILLO (2005): Restricted Expression of *Reggie* Genes and Proteins during Early Zebrafish Development *The-Journal-of-Comparative-Neurology-1096-9861*
5. Galbiati, F., Volonte, D., Goltz, J.S., Steele, Z., Sen, J., Jurcsak, J., Stein, D., Stevens, L., and Lisanti, M.P. (1998). Identification, sequence and developmental expression of invertebrate flotillins from *Drosophila melanogaster*. *Gene* 210, 229-237.
6. Edgar, A. J. & Polak, J. M. Flotillin-1: gene structure: cDNA cloning from human lung and the identification of alternative polyadenylation signals. *The international journal of biochemistry & cell biology* **33**, 53–64 (2001).
7. Rivera-Milla, E., Stuermer, C. A. O. & Malaga-Trillo, E. Ancient origin of reggie (flotillin), reggie-like, and other lipid-raft proteins: convergent evolution of the SPFH domain. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **63**, 343–357 (2006).
8. Mairhofer, M., Steiner, M., Mosgoeller, W., Prohaska, R., and Salzer, U. (2002). Stomatin is a major lipid-raft component of platelet alpha granules. *Blood* 100, 897-904.

9. Dermine, J. F. *et al.* Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *The Journal of biological chemistry* **276**, 18507–18512 (2001).
10. Solomon, S., Masilamani, M., Rajendran, L., Bastmeyer, M., Stuermer, C.A., and Illges, H. (2002). The lipid raft microdomain-associated protein reggie-1/flotillin-2 is expressed in human B cells and localized at the plasma membrane and centrosome in PBMCs. *Immunobiology* **205**, 108-119.
11. Rajendran, L., Masilamani, M., Solomon, S., Tikkanen, R., Stuermer, C.A., Plattner, H., and Illges, H. (2003). Asymmetric localization of flotillins/reggies in pre-assembled platforms confers inherent polarity to hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8241-8246.
12. Salzer, U., and Prohaska, R. (2001). Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. *Blood* **97**, 1141-1143.
13. M. F. Langhorst\*, A. Reuter and C. A. O. Stuermer (2005): Review Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins pp. 2228-2240
14. Liu, J., Deyoung, S. M., Zhang, M., Dold, L. H. & SALTIEL, A. R. The stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C domain of flotillin-1 contains distinct sequences that direct plasma membrane localization and protein interactions in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry* **280**, 16125–16134 (2005).
15. Roitbak, T., Surviladze, Z., Tikkanen, R. & Wandinger-Ness, A. A polycystin multiprotein complex constitutes a cholesterol-containing signalling microdomain in human kidney epithelia. *The Biochemical journal* **392**, 29–38 (2005).
16. Solis, G.P., Hoegg, M., Munderloh, C., Schrock, Y., Malaga-Trillo, E., Rivera-Milla, E. and Stuermer, C.A. (2007) Reggie/flotillin proteins are organized into stable tetramers in membrane microdomains. *Biochem J*, **403**, 313-322.
17. Bodin S, Planchon D, Rios Morris E, Comunale F, Gauthier-Rouvière C (2014) Flotillins in intercellular adhesion - from cellular physiology to human diseases. *Journal of Cell Science* **127**: 5139–5147, doi:10.1242/jcs.159764
18. Kühne, Sina (2015) Die Flotillin-Proteinfamilie: Rolle bei der cholinergen EGFR-Transaktivierung und beim Arf-vermittelten Membrantransport
19. Morrow, I. C. *et al.* Flotillin-1/reggie-2 traffics to surface raft domains via a novel golgi-independent pathway. Identification of a novel membrane targeting domain and a role for palmitoylation. *The Journal of biological chemistry* **277**, 48834–48841 (2002).

20. Melanie Meister and Ritva Tikkanen Review Endocytic Trafficking of Membrane-Bound Cargo: A Flotillin Point of View *Membranes* 2014, 4, 356-371; doi:10.3390/membranes4030356
21. Santamaria, A. *et al.* PTOV1 enables the nuclear translocation and mitogenic activity of flotillin-1, a major protein of lipid rafts. *Molecular and cellular biology* **25**, 1900–1911 (2005).
22. Hazarika, P. *et al.* Up-regulation of Flotillin-2 is associated with melanoma progression and modulates expression of the thrombin receptor protease activated receptor 1. *Cancer research* **64**, 7361–7369 (2004).
23. Lin, C. *et al.* Knockdown of FLOT1 impairs cell proliferation and tumorigenicity in breast cancer through upregulation of FOXO3a. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**, 3089–3099 (2011).
24. Cécile Gauthier-Rouvière, Stéphane Bodin, Franck Comunale & Damien Planchon Flotillin membrane domains in cancer *Cancer and Metastasis Reviews* (2020) 39:361–374 <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09873-y>
25. Li, L., Luo, J., Wang, B. *et al.* Microrna-124 targets flotillin-1 to regulate proliferation and migration in breast cancer. *Mol Cancer* **12**, 163(2013). <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-163>
26. Wei G, Xu Y, Peng T, Yan J. miR-133 involves in lung adenocarcinoma cell metastasis by targeting FLOT2. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018 Mar;46(2):224-230. doi: 10.1080/21691401.2017.1324467. Epub 2017 May 14. PMID: 28503944.
27. Fecchi, K., Volonte, D., Hezel, M.P., Schmeck, K. and Galbiati, F., (2006). 'Spatial and temporal regulation of GLUT4 translocation by flotillin-1 and caveolin-3 in skeletal muscle cells'. *FASEB J*, 20 (6):705-707.
28. Zhou Z, Dang Y, Zhou M, Li L, Yu CH, Fu J, Chen S, Liu Y. Codon usage is an important determinant of gene expression levels largely through its effects on transcription. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016 Oct 11;113(41):E6117-E6125. doi: 10.1073/pnas.1606724113. Epub 2016 Sep 26. PMID: 27671647; PMCID: PMC5068308.
29. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cloning/gene-synthesis/geneoptimizer.html>

30. Raab, D., Graf, M., Notka, F. *et al.* The GeneOptimizer Algorithm: using a sliding window approach to cope with the vast sequence space in multiparameter DNA sequence optimization. *Syst Synth Biol* **4**, 215–225 (2010). <https://doi.org/10.1007/s11693-010-9062-3>
31. Fath S, Bauer AP, Liss M, Spriestersbach A, Maertens B, et al. (2011) Correction: Multiparameter RNA and Codon Optimization: A Standardized Tool to Assess and Enhance Autologous Mammalian Gene Expression. *PLOS ONE* **6**(3): 10.1371/annotation/039deb02-bbe7-406c-a876-341cc4f3fefa.
32. Del Tito Jr, Benjamin J., et al. "Effects of a minor isoleucyl tRNA on heterologous protein translation in Escherichia coli." *Journal of bacteriology* **177.24** (1995): 7086-7091.
33. KANE, James F. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in Escherichia coli. *Current opinion in biotechnology*, 1995, 6. Jg., Nr. 5, S. 494-500.
34. Maertens, B., Spriestersbach, A., von Groll, U., Roth, U., Kubicek, J., Gerrits, M., ... & Schäfer, F. (2010). Gene optimization mechanisms: a multi-gene study reveals a high success rate of full-length human proteins expressed in Escherichia coli. *Protein Science*, *19*(7), 1312-1326.
35. Zhou Z, Schnake P, Xiao L, Lal AA (2004) Enhanced expression of a recombinant malaria candidate vaccine in Escherichia coli by codon optimization. *Protein Expr. Purif.* **34**:87–94.
36. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *Recombinant protein expression in microbial systems*, 2014; 7.
37. Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv.* 2009 May-Jun; **27**(3):297-306. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.01.008. Epub 2009 Jan 31. PMID: 19500547.
38. SAHDEV, Sudhir; KHATTAR, Sunil K.; SAINI, Kulvinder Singh. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Molecular and cellular biochemistry*, 2008, **307**. Jg., S. 249-264.
39. WURM, Florian M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature biotechnology*, 2004, **22**. Jg., Nr. 11, S. 1393-1398.

40. Escherich, T. (1885) Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. Fortschritte der Medizin, 3, 515-522.
41. FENG, Peter, et al. BAM: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria. *Bacteriological analytical manual*, 2002, 13. Jg., Nr. 9, S. 1-13.
42. Swartz JR. Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol.* 2001 Apr;12(2):195-201. doi: 10.1016/s0958-1669(00)00199-3. PMID: 11287237.
43. Hayat SMG, Farahani N, Golichenari B, Sahebkar A. Recombinant Protein Expression in Escherichia coli (E. coli): What We Need to Know. *Curr Pharm Des.* 2018;24(6):718-725. doi: 10.2174/1381612824666180131121940. PMID: 29384059.
44. DING, Yu, et al. Expression, purification, and characterization of recombinant human flotillin-1 in Escherichia coli. *Protein expression and purification*, 2005, 42. Jg., Nr. 1, S. 137-145.
45. **Sara Klink** Promega Corporation, Publication Date: Revised 4/23; tpub\_215
46. Harper S, Speicher DW. Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. *Methods Mol Biol.* 2011;681:259-80. doi: 10.1007/978-1-60761-913-0\_14. PMID: 20978970; PMCID: PMC3584333.
47. Kurrle N, Ockenga W, Meister M, Völlner F, Kühne S, John BA, Banning A, Tikkanen R. Phosphatidylinositol 3-Kinase dependent upregulation of the epidermal growth factor receptor upon Flotillin-1 depletion in breast cancer cells. *BMC Cancer.* 2013 Dec 5;13:575. doi: 10.1186/1471-2407-13-575. PMID: 24304721; PMCID: PMC4235219.
48. Tomasovic A, Traub S, Tikkanen R. Molecular networks in FGF signaling: flotillin-1 and cbl-associated protein compete for the binding to fibroblast growth factor receptor substrate 2. *PLoS One.* 2012;7(1):e29739. doi: 10.1371/journal.pone.0029739. Epub 2012 Jan 3. PMID: 22235335; PMCID: PMC3250484.
49. <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/mm/69450m> und <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/mm/70954>
50. Casali N. Escherichia coli host strains. *Methods Mol Biol.* 2003;235:27-48. doi: 10.1385/1-59259-409-3:27. PMID: 12904643.
51. Estrem ST, Ross W, Gaal T, Chen ZW, Niu W, Ebright RH, Gourse RL. Bacterial promoter architecture: subsite structure of UP elements and interactions with the carboxy-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit. *Genes Dev.* 1999

- Aug 15;13(16):2134-47. doi: 10.1101/gad.13.16.2134. PMID: 10465790; PMCID: PMC316962.
52. Zhang M, Jia C, Li F, Li C, Zhu Y, Akutsu T, Webb GI, Zou Q, Coin LJM, Song J. Critical assessment of computational tools for prokaryotic and eukaryotic promoter prediction. *Brief Bioinform.* 2022 Mar 10;23(2):bbab551. doi: 10.1093/bib/bbab551. PMID: 35021193; PMCID: PMC8921625.
53. Du, F., Liu, YQ., Xu, YS. *et al.* Regulating the T7 RNA polymerase expression in *E. coli* BL21 (DE3) to provide more host options for recombinant protein production. *Microb Cell Fact* **20**, 189 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01680-6>
54. Fu Y, Lei Y, Wang T, Curran WJ, Liu T, Yang X. Deep learning in medical image registration: a review. *Phys Med Biol.* 2020 Oct 22;65(20):20TR01. doi: 10.1088/1361-6560/ab843e. PMID: 32217829; PMCID: PMC7759388.
55. TEGEL, Hanna, et al. Increased levels of recombinant human proteins with the Escherichia coli strain Rosetta (DE3). *Protein expression and purification*, 2010, 69. Jg., Nr. 2, S. 159-167.
56. Fathi-Roudsari M, Akhavian-Tehrani A, Maghsoudi N. Comparison of Three Escherichia coli Strains in Recombinant Production of Reteplase. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2016 Jan-Mar;8(1):16-22. PMID: 26855731; PMCID: PMC4717461.
57. Schein, Catherine. (1989). Production of Soluble Recombinant Proteins in Bacteria. *Nature Biotechnology.* 7. 1141-1149. 10.1038/nbt1189-1141.
58. Ferrer M, Chernikova TN, Yakimov MM, Golyshin PN, Timmis KN. Chaperonins govern growth of Escherichia coli at low temperatures. *Nat Biotechnol.* 2003 Nov;21(11):1266-7. doi: 10.1038/nbt1103-1266. PMID: 14595348.
59. <https://www.agilent.com/library/usermanuals/public/230191.pdf>
60. Villaverde A, Carrió MM. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol Lett.* 2003 Sep;25(17):1385-95. doi: 10.1023/a:1025024104862. PMID: 14514038.
61. Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A.K. *et al.* Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb Cell Fact* **14**, 41 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0222-8>

## 12 Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 13 Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei einigen Personen herzlich bedanken.

Als Erstes möchte ich mich ganz herzlich und besonders bei Frau Prof. Dr. Ritva Tikkanen bedanken, die in Ihrer Hilfsbereitschaft und Unterstützung als Doktor Mutter nicht zu übertreffen ist. Vielen Dank für die Zeit und die Geduld.

Auch bei Frau Dr. Antje Banning möchte ich mich herzlich dafür bedanken, dass Sie sich immer für mich Zeit genommen und mich unterstützt hat.

Ein besonderer Dank gilt natürlich auch Ralf Füllkrug. Danke für die Unterstützung, die liebe Betreuung und die schönen und lustigen Stunden im Labor.

Danke auch an meine Freunde, die mich während dieser Zeit, und auch darüber hinaus, begleitet haben. Danke vor allem an Anam, Alex, Pedro, Ramona und Christina.

Ich möchte hier auch unserer lieben Frau Lewandowski gedenken, die viel mehr war als einfach nur eine Nachbarin. Ich denke an Sie.

Ein riesiger Dank gilt natürlich meiner unfassbar wundervollen Familie, die immer an mich geglaubt hat und die mir immer zur Seite steht. Nicht oft hat man die Möglichkeit sich auf solchem Wege zu bedanken. Darum möchte ich die Gelegenheit nutzen und euch sagen, dass ich wirklich großes Glück habe euch meine Familie nennen zu dürfen. Worte können nicht beschreiben, wie sehr ich euch liebe. Danke Mamanam, für dein großes Herz, deine immer klugen Worte und deine Stärke.

Du bist mein Fels in der Brandung.

Danke Baba, dass du immer ein offenes Ohr für mich hast, mich unterstützt und für mich da bist.

Danke Nuschin, dass du so eine Klasse Schwester bist und ich mit dir meine verrückte Seite ausleben kann.

Auch wenn sie leider nicht mehr unter uns weilen, so möchte ich mich hiermit auch bei meinen Großeltern bedanken. Als ich mit den Laborversuchen begann, waren sie gerade aus dem Iran zu Besuch gekommen. Trotz, dass ich sehr dankbar für die Doktorarbeit war, so fiel es mir doch schwer die kostbare Zeit, die ich mit ihnen hätte verbringen können, im Labor zu arbeiten. Doch sie bestärkten und unterstützen mich sehr darin meinen Weg zu gehen.

Ich möchte diese Arbeit meinem Onkel Dian widmen.

Auch er weilt nicht mehr unter uns, lebt in meinem Herzen aber für immer weiter.