

Heterologe Expression von putativen Transportproteinen der „Solute-carrier“- Familie 2 aus *Chrysomela populi* in Säugerzellen

Bachelorarbeit

vorgelegt an der Ernst-Abbe-Hochschule Jena am 18.09.2018
dem Fachbereich Medizintechnik und Biotechnologie

Hochschulbetreuer: Prof. Dr. Antje Burse

Betrieblicher Betreuer: Lydia Schmidt

Firma/Institut: Max-Planck-Institut für chemische Ökologie

Bearbeitet von: Fabian Göx

Matrikelnummer: 640276

Studiengang: Biotechnologie

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	i
2	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	ii
3	Einleitung.....	1
3.1	Allgemeine Verteidigungsstrategien der Käfer.....	1
3.2	Chemische Verteidigungsstrategie von Blattkäfern.....	1
3.3	Chemische Verteidigungsstrategie <i>Chrysomela populi</i>	3
3.4	„Solute-carrier“-Familie 2.....	6
3.5	Expressionssysteme für Membranproteine	7
4	Zielstellung	8
5	Materialien.....	9
5.1	Chemikalien	9
5.2	Oligonukleotide.....	9
5.3	Plasmide	10
5.4	Zelllinien	10
5.5	Nährmedien	11
5.6	Antibiotikum	11
5.7	Enzyme.....	11
5.8	Antikörper	12
5.9	Kits	12
5.10	Standards	13
5.11	Puffer und Zusätze	13
5.12	Puffer und Lösungen	13
5.13	Geräte	14
5.14	Materialien	15
5.15	Software	16
6	Methoden.....	17
6.1	Molekularbiologische und Biochemische Methoden.....	17

6.1.1	Polymerase-Kettenreaktion.....	17
6.1.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	17
6.1.3	DNA-Gelextraktion.....	18
6.1.4	Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung.....	18
6.1.5	Klonierung des PCR-Produktes in pcDNA™3.1D/V5-His-TOPO®-Vektor.....	18
6.1.6	Transformation in <i>E. coli</i>	19
6.1.7	<i>E. coli</i> Flüssigkultur	19
6.1.8	Plasmid-Präparation.....	19
6.1.9	Restriktionsverdau	19
6.1.10	Sequenzierung.....	20
6.1.11	Zellkultivierung/Passage.....	20
6.1.12	Transfektion	20
6.1.13	Differentielle Zentrifugation.....	21
6.1.14	Bradford-Assay.....	21
6.1.15	SDS-PAGE	22
6.1.16	Western Blot	22
6.1.17	RNA-Isolation.....	22
6.1.18	qRT-PCR.....	23
6.2	Bioinformatische Methoden.....	23
7	Ergebnisse.....	25
7.1	Bioinformatische Ergebnisse.....	25
7.2	Amplifizierung des SLC2_9048-Gens über PCR und deren Extraktion aus dem Gel... 27	
7.3	TOPO-Klonierung und Transformation in One Shot TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	29
7.4	Sequenzierung	31
7.5	Transfektion und Kontrolle der Expression von SLC2_9048 -S	31
7.6	Transfektion und Kontrolle der Expression von SLC2_9048 +S	33
7.7	qRT-PCR zur Kontrolle der Transkription von SLC2_9048 +/- S	36

8	Diskussion	38
9	Ausblick.....	42
10	Zusammenfassung.....	43
11	Literaturverzeichnis	I
12	Anhang.....	III
12.1	cDNA Sequenz des SLC2_9048-Gens.....	III
12.2	Codierende Aminosäuren des SLC2_9048-Gen	IV
12.3	Bioinformatisch nachgewiesene Phosphorylierungsstellen des vermeintlichen SLC2-Transporters	V
12.4	Vektorkarte des pcDNA TM 3.1D/V5-His-TOPO [®] +SLC2_9048 (pSLC2_9048).....	VI
12.5	Agarosegele.....	VII
12.6	Western Blots	VIII
13	Danksagung.....	X
14	Selbstständigkeitserklärung	XI

1 Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP-Binding-Cassette
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHO	Chinese Hamster Ovary
CpMRP	<i>Chrysomela populi</i> Multidrug Resistance-associated Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
fwd	Vorwärts
GLUT	Glucose-Facilitator
HBMEC	Human Brain Microvascular Endothelial Cells
HEK	Human Embryonic Kidney
HRP	Meerrettich-Peroxidase
LB	Luria-Bertani
mRNA	messenger RNA
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Real-Time PCR
rev	Rückwärts
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SLC	Solute carrier
U	Einheit

2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: <i>Chrysomela populi</i> . A: Larve mit Sekrettropfen. B: Wehrdrüse mit Sekret. ...	2
Abbildung 2: Phylogentische Unterteilung von Chrysomelina im Bezug auf die Synthesestrategie in den Wehrdrüsen der Larven.....	3
Abbildung 3: <i>Chrysomela populi</i> im adulten Stadium.	4
Abbildung 4: Strukturformel des Salicin.....	4
Abbildung 5: Transport des Salicin von der Hämolymphe über die sekretorische Zelle ins Drüsen-Reservoir.	5
Abbildung 6: Syntheseweg der Sequestrierung von Salicin in das Wehrsekretreservoir.....	6
Abbildung 7: Grafische Darstellung der Transmembrananalyse der DTU des TMHMM Server v. 2.0.....	25
Abbildung 8: Hierarchischer Verteilungsbaum zur Vorhersage des Aufenthaltsortes des putativen SLC2-like-Transporters.	26
Abbildung 9: 1%iges Agarosegel der PCR zur Amplifizierung des SLC2_9048-Gens.	27
Abbildung 10: 1%iges Agarosegel zur Bestätigung der Gelextraktion.....	28
Abbildung 11: 1%iges Agarosegel des Restriktionsendonukleasenverdaus der Plasmide pSLC2_9048 +S1 bzw. 2 und –S1 bzw. 2 mit <i>Bam</i> HI und <i>Xba</i> I.	30
Abbildung 12: 1%iges Agarosegel des Restriktionsendonukleasenverdaus der Plasmide pSLC2_9048 +S1 bzw. 2 und –S1 bzw. 2 mit <i>Bam</i> HI.	30
Abbildung 13: Exemplarische Darstellung der HEK293-Zellen kultiviert in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS, Glutamin und 0,2 mg/ml Gentamicin , 24 h nach durchgeführter Transfektion mit ScreenFect®A. Vergrößerung 200-fach, Maßstab 300 µm.	33
Abbildung 14: Western Blot der entnommenen Proben während der differentiellen Zentrifugation der HEK293-Zellen mit pSLC2_9048 +S (ScreenFectA).....	34
Abbildung 15: Western Blot der entnommenen Proben während der differentiellen Zentrifugation der HEK293-Zellen mit pSLC2_9048 +S (Elektroporation) und Inkubation mit dem primären Antikörper VPE (A) und EKE (B).	35
Abbildung 16: Negativer Anstieg der Relativ Fluoreszierenden Einheiten (RFU) in Abhängigkeit von der Temperatur.....	37

Abbildung 17: Relativ Fluoreszierende Einheiten in Abhängigkeit von der Anzahl der Zyklen.....	37
Abbildung 18: Vektorkarte des pcDNA™3.1D/V5-His-TOPO®+SLC2_9048 (pSLC2_9048).	VI
Abbildung 19: 1%iges Agarosegel zur Bestätigung der Gelextraktion.	VII
Abbildung 20: 1%iges Agoresgel zum doppelten Restriktionsendonukleasenverdau der Plasmide pSLC2_9048 +S1 bzw. 2 und -S1 bzw. 2 mit <i>Bam</i> HI und <i>Xba</i> I.....	VII
Abbildung 21: 1%iges Agoresgel zum Restriktionsendonukleasenverdau der Plasmide pSLC2_9048 +S1 bzw. 2 und -S1 bzw. 2 mit <i>Bam</i> HI.....	VIII
Abbildung 22: Westernn Blot der entnommenen Proben während der differentieller Zentrifugation der HBMEC-Zellen mit pSLC2_9048 -S.	VIII
Abbildung 23: Western Blot der entnommenen Proben während der differentieller Zentrifugation der HEK293-Zellen mit pSLC2_9048 -S.	IX
Tabelle 1 : Verwendete Chemikalien.....	9
Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide.....	9
Tabelle 3: Verwendete Plasmide.	10
Tabelle 4: Verwendete Zelllinie.	10
Tabelle 5: Verwendete Nährmedien.	11
Tabelle 6: Verwendete Antibiotika.....	11
Tabelle 7: Verwendete Enzyme.....	11
Tabelle 8: Verwendete Antikörper.	12
Tabelle 9: Verwendete Kits.	12
Tabelle 10: Verwendete Standards.	13
Tabelle 11: Verwendete Puffer und Zusätze.....	13
Tabelle 12: Verwendete Puffer und Lösungen.	13
Tabelle 13: Verwendete Geräte.	14
Tabelle 14: Verwendete Materialien.....	15
Tabelle 15: Verwendete Software.....	16

Tabelle 16: Zyklus-Parameter der Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung der Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase.	17
Tabelle 17: Übersicht zur Zusammensetzung TOPO® Cloning Reaction	18
Tabelle 18: Übersicht über die verwendeten Server verschiedener Institutionen	23
Tabelle 19: DNA-Konzentrationen und Reinheiten der Gelextrakte.....	28
Tabelle 20: Anzahl der <i>E.coli</i> -Kolonien nach erfolgter Transformation mit dem jeweiligen Plasmid und Ausplattierung auf LB-Agar mit 50 µg/ml Carbenicillin.	29
Tabelle 21: Plasmid-Konzentrationen und Reinheiten der positiven Klone.....	30
Tabelle 22: Proteinkonzentrationen der während der differentiellen Zentrifugation entnommenen Proben der transfizierten HBMEC-Zellen mit pSLC2_9048 -S.	31
Tabelle 23: Proteinkonzentrationen der während der differentiellen Zentrifugation entnommenen Proben der transfizierten HEK293-Zellen mit pSLC2_9048 -S.	32
Tabelle 24: Proteinkonzentrationen der während der differentiellen Zentrifugation entnommenen Proben der transfizierten HEK293-Zellen mit pSLC2_9048 +S.	34
Tabelle 25: Signifikante Werte der qRT-PCR mit RNA transfizierter HEK293-Zellen mit pSLC2_9048 + bzw. -S, untransfizierter HEK293-Zellen und einer Negativ-Kontrolle ohne RNA.	36

3 Einleitung

3.1 Allgemeine Verteidigungsstrategien der Käfer

Die Insekten gehören zu der artenreichsten Gruppe des Tierreichs, worunter die Käfer (Coleoptera) die größte Ordnung bilden. Aufgrund der pflanzlichen Abwehr und der Gefahr von Prädatoren wie Spinnen, Vögeln oder Ameisen mussten sie eine komplexe Anpassung zur Abwehr vollziehen [1].

Primäre Abwehrmechanismen existieren unabhängig davon, ob ein Prädatör anwesend ist oder nicht. Dazu gehören Formen der versteckten Lebensweise, Tarnung (Krypsis und Mimese), Mimikry (Imitation eines anderen Organismus), Warnfarben, -gerüche, oder -geräusche [2].

Abgrenzend dazu setzen sekundäre Abwehrmechanismen aktiv ein, sobald eine Begegnung mit dem Feind stattfindet und gelten als deutlich energieaufwändiger. Dazu gehören der Todstellreflex (Thanatose), Flucht (Blattkäfer nutzen die Form des Fallenlassens vom Blatt), Kampf, mechanische, optische, akustische und chemische Abwehr [2].

3.2 Chemische Verteidigungsstrategie von Blattkäfern

Circa 3500 Arten aus 40 Familien der Coleoptera gelten als phytophage Käfer [3], wobei seit dem mittleren Jura Käfer der Familien Curculionidae (Rüsselkäfer) und Chrysomelidae (Blattkäfer) als Fraßfeinde bei Pflanzen nachweisbar sind. Eine weit verbreitete Abwehrstrategie unter Chrysomelidae im larvalen und adulten Stadium gegen Prädatoren ist die Synthese eines Abwehrsekretes. Innerhalb der Chrysomelidae konnten vier Stoffgruppen nachgewiesen werden: Aldehyde, cyclopentanoide Monoterpene, Ester und Naphtochinone [4]. Diese Stoffe werden dann in speziellen Strukturen des Körpers gespeichert.

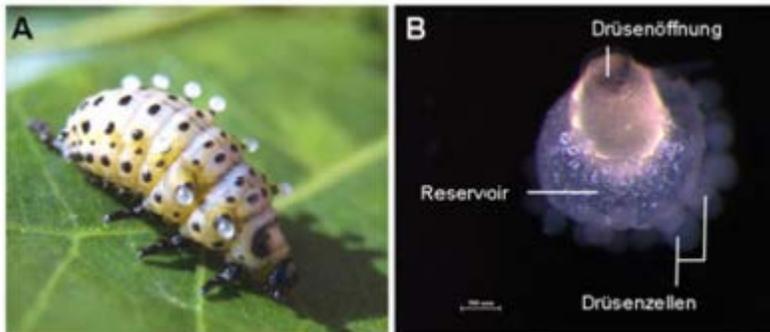


Abbildung 1: *Chrysomela populi*. A: Larve mit Sekretropfen. B: Wehrdrüse mit Sekret. Max -Planck - Institut für chemische Ökologie /Kirsch; Burse.

Die Larven besitzen auf jeder Seite der neun Abdominalsegmenten je eine Wehrdrüse, welche mit vielen sekretorischen Zellen verknüpft durch Kanäle zu einem kutikulären Reservoir gebunden sind (s. Abbildung 1). Besteht Gefahr, wird das Verteidigungssekret durch Muskelkontraktion exponiert [5]. Sobald die Gefahr vorüber ist, wird das Sekret zurück in das Reservoir gezogen [6].

Über phylogenetische Untersuchungen konnten drei verschiedene Synthesewege innerhalb der Chrysomelidae beschrieben werden [7].

Die *de novo*-Synthese von Iridoiden beschreibt die jüngste Form, wobei alle Stoffe für das Sekret selbst gebildet werden [8]. Somit ist keine Bindung an eine Pflanzenart nötig [6]. Hierzu zählt *Phaedon cochleariae* (s. Abbildung 2A).

Daraus entwickelte sich die Methode der Sequestrierung (s. 3.3) [8]. Vorteil dieser Vorgehensweise ist ein geringerer Energieaufwand, jedoch ist die Wirtsauswahl der Weidengewächse beschränkt. Ein Vertreter dieser Strategie ist *Chrysomela populi* (s. Abbildung 2 B) [6].

Chrysomela lapponica vollzieht eine Kombination aus *de novo*-Synthese und Sequestrierung und zählt damit zu den am weitesten entwickelten Arten. Ein interner Pool an Carbonsäuren der *de novo*-Synthese werden mit Glykosiden aus verschiedensten Blatt-Alkoholen verestert. So entsteht ein Wehrsekret aus mindestens 70 Estern (s. Abbildung 2C) [6].

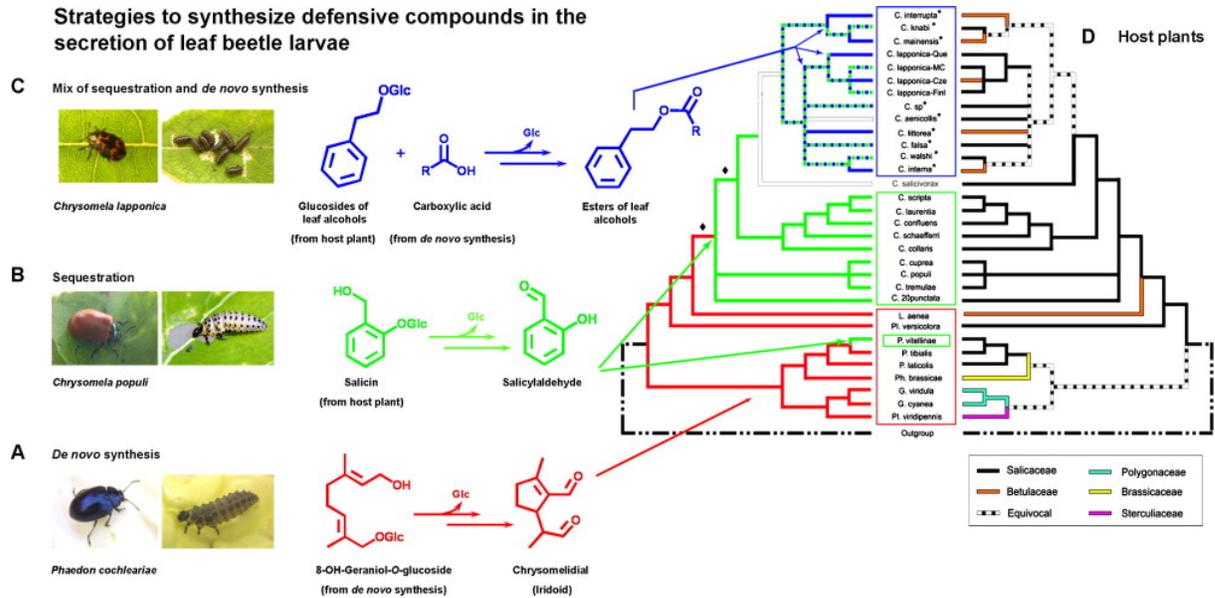


Abbildung 2: Phylogentische Unterteilung von *Chrysomelina* im Bezug auf die Synthesestrategie in den Wehrdrüsen der Larven. Modifiziert nach Termonia et al. [7].

3.3 Chemische Verteidigungsstrategie *Chrysomela populi*

C. populi gehört zu den vielen Arten der Familie der Chrysomelidae, welche im Imago- und Larvenstadium phytophag sind [3, 9], wobei der Fraß bis auf die Rippen des Blattes reicht [9]. Der Käfer ist circa 10-12 mm lang mit stark gewölbten Habitus, die Flügeldecken sind gelb-rot und besitzt hinten an der Naht eine schwarze Spitze [9, 10]. Körper, Beine, Halsschild, Kopf und Beine sind schwarzblau (s. Abbildung 3) [11]. Die Larve ist weiß-grülich und schwarz gepunktet (s. Abbildung 1).

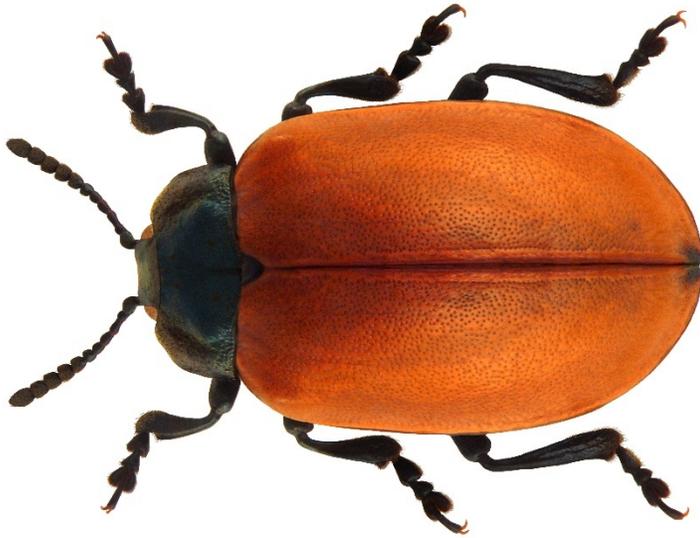
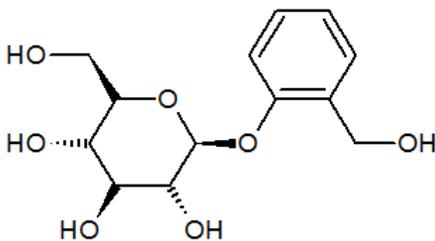


Abbildung 3: *Chrysomela populi* im adulten Stadium. U.Schmidt, 2011.

Die Synthesestrategie des Abwehrsekretes von *C. populi* beruht auf der ko-evolutionären Entwicklung mit den Weidengewächsen. Dieser kann somit Habitate kolonialisieren, welche für andere Organismen nicht attraktiv sind [6], da Pappel- und Weidenarten die quantitative chemische Abwehr durch die Synthese des Sekundärmetabolites Salicin nutzen. Salicin gehört dabei zu der Gruppe der phenolischen Glykoside (s. Abbildung 4) und besteht aus dem Aglykon Salicylalkohol und Glukose, welche über eine β -glykosidische Bindung verknüpft sind. Durch die Glykosilierung ist Salicylalkohol für die Pflanze selbst nicht toxisch, da die Reaktivität herabgesetzt und die Wasserlöslichkeit erhöht wird, wodurch ATP-abhängige Transportvorgänge in Apoplasten oder Vakuolen ermöglicht werden [12, 13]. Nach Blattfraß des Insektes wird jedoch das Aglykon enzymatisch freigesetzt, welches auf den unangepassten Organismus toxisch wirken kann, indem essentielle Stoffwechselreaktionen blockiert werden [14].



Salicin

Abbildung 4: Strukturformel des Salicin

C. populi Larven können hingegen das Salicin der Pappel- und Weidengewächse sequestrieren und in Form von Salicylaldehyd für ihre eigene chemische Verteidigung nutzen.

Die Nährstoff- und Substrataufnahme durch den Darm ist dabei zunächst sehr unspezifisch ist. Verschiedene Transporter des Darmgewebes nehmen ein breites Spektrum an Glykosiden, ungeachtet deren weiteren Funktion in die Hämolymphe auf. Der Transport von der Hämolymphe in die sekretorischen Zellen der Wehrdrüsen ist jedoch sehr selektiv, da nur Salicin aufgenommen wird (s. Abbildung 5) [6]. Der entsprechende Transporter konnte jedoch noch nicht identifiziert werden. Der Transport folgt einem Gradienten in Richtung der sekretorischen Zellen, welcher durch den ABC-Transporter (CpMRP) in den Vesikeln der sekretorischen Zellen aufrechterhalten wird.

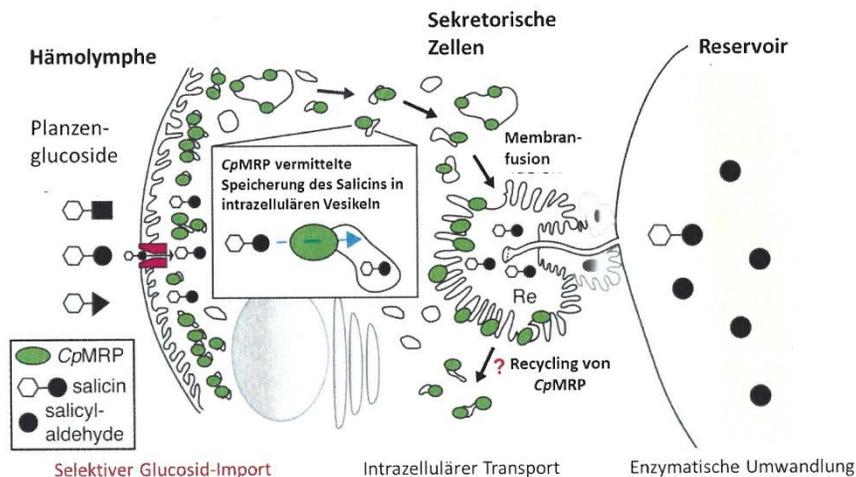


Abbildung 5: Transport des Salicin von der Hämolymphe über die sekretorische Zelle ins Drüsen-Reservoir. Modifiziert nach Strauss et al.

Das in den Vesikeln eingeschlossene Salicin wird durch Membranfusion mit der apikalen Plasmamembran in das Wehrsekretreservoir entlassen. Im Reservoir kommt es zur enzymatischen Umwandlung von Salicin in Salicylaldehyd (s. Abbildung 6). Im ersten Schritt wird Salicin durch die β -Glucosidase aktivierend hydrolysiert. Vom entstandenen Salicylalkohol wird Wasserstoffperoxid abgespalten. Es entsteht das biologisch aktive Salicylaldehyd, welches als flüchtiger Abwehrstoff zur finalen Verteidigung dient (s. 3.2).

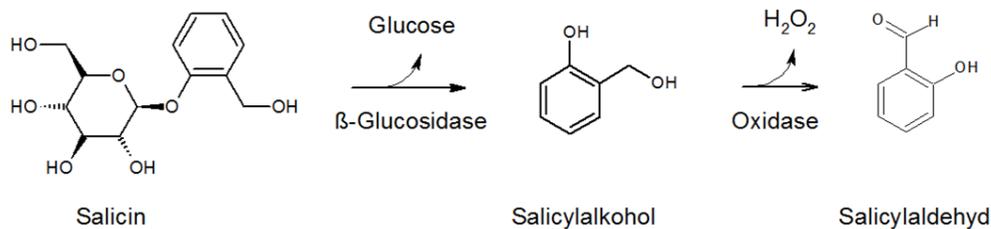


Abbildung 6: Syntheseweg der Sequestrierung von Salicin in das Wehrsekretreservoir.

Unbrauchbare Glykoside und Überschüsse des Salicin werden durch die Malphigischen Gefäße und den Darm exkretiert [6].

3.4 „Solute-carrier“-Familie 2

Aufgrund der strukturellen Gegebenheiten des Salicin ist es denkbar, dass Zuckertransporter am spezifischen Transport von der Hämolymphe in die sekretorischen Zellen der Wehrdrüsen beteiligt sind.

Die ausgeprägteste Erforschung sekundärer Glukose-Transporter fand bisher am menschlichen Organismus statt, wobei drei Familien der SLC-Transporter identifiziert werden konnten: Der Glukosetransporter GLUT (Gen SLC2), der Natrium-Glukose-Symporter SGLT (Gen SLC5) und der Zuckertransporter SWEET (Gen SLC50) [15]. Die Expression dieser Proteine ist gewebespezifisch und abhängig von metabolischer und hormoneller Regulation. Die Einteilung dieser Transporter ist für den Menschen klassifiziert, weshalb strukturell ähnliche Transporter bei Insekten als SLC-like Proteine bezeichnet werden müssen. Alle bisher funktionell charakterisierten Zucker-Transport-Proteine in Insekten zeigen die höchste strukturelle Ähnlichkeit zu SLC-Transportern der Familie 2, mit Ausnahme des SCRT, welcher der SLC49 Familie zuzuordnen ist [16].

Insgesamt wurden im Menschen 14 verschiedene GLUT-Transporter nachgewiesen, welche Hexosen, Polyole und andere Kohlenstoffverbindungen transportieren können. Die primären physiologischen Substrate dieser Transporter sind jedoch bisher weitestgehend unbekannt. Bei den GLUT-Transportern handelt es sich um integrale Membranproteine, die 12 Transmembrandomänen besitzen, wobei N- und C-Terminus im Cytoplasma lokalisiert sind. Außerdem bestehen sie aus circa 500 Aminosäuren [17]. GLUTs eines Typs unterscheiden sich in konservierten Sequenzen zu anderen dieses Typs, gibt aber keine Aussagen über die Substratspezifität [18].

SLC2-Transporter sind ATP-unabhängig und funktionieren über erleichterte Diffusion, welche den Transport (Uniport) von Glukose ermöglicht [16]. Der Transport kann durch eine sich ständig ändernde Konformation beschrieben werden. Er besitzt dementsprechend Bindungsstellen an der extrazellulären und intrazellulären Seite, jedoch ist die Bindungsaffinität dieser asymmetrisch [15, 18]. Wird das Substrat gebunden, kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch es auf die andere Seite der Membran transportiert wird.

In Bezug auf das integrierte Transportsystem für Salicin zur Gewährleistung der Wehrstrategie in *C. populi* (s. 3.3) liefert der erzeugte Glukose-Konzentrationsgradient des ABC-Transporters die benötigte Energie für den Transport des Salicins.

Mit einer Aufstellung eines Transkript-Katalogs in *P. cochleariae* wurden 68 Proteine als Mitglieder der SLC2 Familie oder Trehalose Transportern erkannt. Durch einzelnes *Silencing* ausgewählter SLC2-Kandidaten über RNAi kam es in zwei Fällen zu einer Verringerung der Produktion des Wehrsekretes, in weiteren Fällen jedoch ohne Auswirkung bzw. mit geringer Wirkung. Das gibt Verdacht zur Annahme, dass die Produktion des Wehrsekretes auf ein adaptives System verschiedener SLC2-like-Transportern zurückgreifen kann, um die Zucker-Konzentration aufrechtzuerhalten. Im Kontrast dazu führte das *Silencing* des ABC-Transporters zu einem kompletten Verlust der Wehrsekretion. Diese Möglichkeit der Kompensation hat eine wichtige ökologische Bedeutung für das Überleben des Käfers in deren direkter Interaktion mit dem Wirt [16].

3.5 Expressionssysteme für Membranproteine

Zur Erforschung der Substrate eines Transporters wird dieser zunächst heterolog exprimiert. Da Proteine in ihren strukturellen und physico-chemischen Eigenschaften eine große Diversität aufweisen, ist es unmöglich vorherzusagen, ob ein Protein exprimiert und in seiner aktiven Form aufgereinigt werden kann. Die Proteine können für den Wirt toxisch sein, falsch bis gar nicht gefaltet werden oder das Expressionslevel kann zu gering sein [19]. Folglich ist es oft notwendig, verschiedene Expressionssysteme zu testen, um ausreichende Mengen aktiver Transporter für funktionelle Studien sicherzustellen. In Bezug auf eukaryotische Membran-Proteine wie das SLC2-like-Protein kann v.a. auf drei verschiedene etablierte Expressionssysteme zurückgegriffen werden: das Baculovirus-System für Insektenzellen (wie Sf9, Sf21 oder High Five), die Transfektion in Säugerzellen (wie HBMEC, HEK293 oder CHO) oder Mikroinjektionen in *Xenopus*-Oozyten. Diese genannten Systeme versprechen die gewünschten Faltungsprozesse durch Post-

translationale Modifikationen wie N-Glykosylierungen und die Anwesenheit molekularer Chaperone. Außerdem ist die grundlegend geforderte eukaryotische Membranzusammensetzung gegeben, wobei das Verhältnis der Phospholipide und Sterole die aktive Form eines Membranproteins beeinflussen kann, da diese mit dem Membranprotein interagieren [20]. Jedoch hat jede Methode seine eigenen Vor- und Nachteile. Insektenzellen weisen die nativste Membranzusammensetzung für den SLC2-like-Transporter aus *C. populi* auf und die Kulturbedingungen sind relativ robust, jedoch braucht es viel Zeit Bacmid-DNA zu generieren. Im Vergleich dazu ist eine Expression in Säugerzellen relativ schnell, aber mit aufwendigeren Kulturbedingungen verbunden [21]. Die Mikroinjektion in *Xenopus*-Oozyten verspricht jedoch die schnellste Durchführung mit moderaten Kulturbedingungen und ein Transport-Assay kann direkt an den Zellen durchgeführt werden [22].

4 Zielstellung

Über eine Membranproteomanalyse konnte ein möglicher SLC2-like-Transporter mit der Gen-Bezeichnung SLC2_9048 identifiziert werden. Er zeigte eine spezifische und hohe Expression in den Wehrdrüsen auf. Das *Silencing* dieses Gens mittels RNAi führte dazu, dass Salicylaldehyd aus dem Sekret verschwand und die Larven letztendlich kein Sekret mehr produzierten (Daten nicht publiziert). Da Salicin ein Glykosid ist, ist die Annahme berechtigt, es als mögliches Substrat zu nennen und dem zu untersuchenden SLC2-like-Transporter eine wichtige Rolle im Transport des Salicin in die Wehrdrüsen zu geben.

Um die Hypothese zu bestätigen muss dieser funktionell charakterisiert werden. Der erste Schritt dieses Vorhabens ist es, das Protein heterolog zu exprimieren und folglich zu isolieren. Ein Versuch im *Xenopus*-Oozyten-Expressionssystem war nicht erfolgreich [23]. Ziel dieser Arbeit ist es, den putativen SLC2-like-Transporter mit der Gen-Bezeichnung SLC2_9048 nun in Säugerzellen heterolog zu exprimieren, über differentieller Zentrifugation in Mikrosomen zu isolieren. Folglich müssen verschiedene Substrate getestet werden, um das Substrat bzw. die Substratspezifität festzulegen.

5 Materialien

5.1 Chemikalien

Tabelle 1 : Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
2-Propanol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Coomassie Protein Assay Reagent	Thermo Scientific™ (Darmstadt)
DTT	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
Dikaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
EDTA	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Glycerol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Kaliumacetat	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Natriumlaurylsulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Protease Inhibitor Mix M	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
TRIS	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
TRIS-HLC	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
Tween20	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)

5.2 Oligonukleotide

Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide. Hersteller Eurofins (Ebersberg)

Oligoname	Sequenz (5'-3'-Richtung)
BGH rev	TAGAAGGCACAGTCGAGG

Cp_eIF4a_fwd	TTTGTAATACCCGCCGCAAG
Cp_eIF4a_rev	TCCATGCATCGCAGAAACAG
CpSLC2 fwd pCDNA	CACCATGGGCGACCAGTACGAT
CpSLC2 rev+S pCDNA	TTATTTTCTCAGAATCTCTTGAATT
CpSLC2 rev-S pCDNA	TTTTCTCAGAATCTCTTGAATT
Fwd primer_SLC2_9048_8	ACCAGTACGAAGCAGTGGTG
Fwd primer_SLC2_9048_1052	TGCTGCTCGTGTCTTCTCTG
Rev primer_SLC2_9048_103	TACTTTTCGGTGCCCCATCC
Rev primer_SLC2_9048_1131	GGTCGTGTCGAACTTGAGGT
T7 promotor	TAATACGACTCACTATAGGG

5.3 Plasmide

Tabelle 3: Verwendete Plasmide.

Bezeichnung	Hersteller
Cp-SLC2_9048 + Stop piB/V5-His 1-5	aus eigenem Bestand vom Nov. 2015, 229 ng/μl (Ansprechpartner: Lydia Schmidt)
pcDNA TM 3.1D/V5-His-TOPO [®] -Vektor	Thermo Scientific TM (Darmstadt)
YFP CAAX pcDNA3.1	Bestand der EAH Jena

5.4 Zelllinien

Tabelle 4: Verwendete Zelllinie.

Bezeichnung	Hersteller
One Shot [®] TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	Thermo Scientific TM (Darmstadt)
HBMEC	Bestand der EAH Jena des Fachbereichs Biotechnologie
HEK-293	Bestand des MPI für chemische Ökologie der Abteilung Evolutionäre Neuroethologie; Bestand des CMB Jena der Abteilung

5.5 Nährmedien

Tabelle 5: Verwendete Nährmedien.

Bezeichnung	Hersteller
LB-Agar (Lennox)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
LB-Medium (Lennox)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
S.O.C. Medium	Thermo Scientific™ (Darmstadt)

5.6 Antibiotikum

Tabelle 6: Verwendete Antibiotika.

Bezeichnung	Hersteller
Carbenicillin (50 mg/ml)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Gibco™ Gentamicin (10 mg/mL)	Thermo Scientific™ (Darmstadt)

5.7 Enzyme

Tabelle 7: Verwendete Enzyme.

Bezeichnung	Hersteller
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	Thermo Scientific™ (Darmstadt)
Go Taq G2 DNA-Polymerase	Promega GmbH (Mannheim)
RNase A	Thermo Scientific™ (Darmstadt)
Trypsin-EDTA 10x	BioWest (Nuaille)

5.8 Antikörper

Tabelle 8: Verwendete Antikörper.

Bezeichnung	Antigen-Sequenz	Hersteller
Anti-Rabbit IgG Peroxidase Antibody	-	Sigma-Aldrich Co. LLC (St.Louis)
Anti-V5-HRP Antibody	GKPIPPELLGLDST	Thermo Scientific™ (Darmstadt)
EKE	EKEDAEDYHLRQWTVDVKDGA	Davids Biotechnologie GmbH
VPE	VPETKGR TSAQIQEILRK	Davids Biotechnologie GmbH

5.9 Kits

Tabelle 9: Verwendete Kits.

Bezeichnung	Hersteller
Brilliant III Ultra-Fast QRT-PCR Master Mix Kit	Aligent Technologies (USA,Santa Clara)
Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit	Thermo Scientific™ (Darmstadt)
GenElute™ Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich Co. LLC (St.Louis)
pcDNA™3.1 Directional TOPO® Expression Kit	Thermo Scientific™ (Darmstadt)
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH (Düsseldorf)
RNAquous™ Total RNA Isolation Kit	Thermo Scientific™ (Darmstadt)
ScreenFect®A	InCella GmbH (Eggenstein-Leopoldshafen)
SuperSignal™ West Femto Trial Kit	Thermo Scientific™ (Darmstadt)

5.10 Standards

Tabelle 10: Verwendete Standards.

Bezeichnung	Hersteller
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Scientific™ (Darmstadt)
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Scientific™ (Darmstadt)
Bovine Serum Albumin (BSA) Protease Free Powder	Thermo Scientific™ (Darmstadt)

5.11 Puffer und Zusätze

Tabelle 11: Verwendete Puffer und Zusätze.

Bezeichnung	Hersteller
5x Green GoTaq® Reaction Buffer	Promega GmbH (Mannheim)
6x DNA Gel Loading Dye	Thermo Scientific™ (Darmstadt)
Midori Green Advance	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf)
Non-fat skimmed milk powder	Biomol GmbH (Hamburg)
Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated)	Thermo Scientific™ (Darmstadt)
Rotiphorese® 50x TAE Puffer	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)

5.12 Puffer und Lösungen

Tabelle 12: Verwendete Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
5x SDS-Ladepuffer	250 mM TrisHCl, 10 % SDS, 30 % Glycerol, 5% β -Mercaptoethanol, 0,02% Bromphenolblau
10x TBS-Puffer	200 mM TrisHCl, 1500 mM Natriumchlorid, pH 7,5

Glycerol-Lösung	50% Glycerol
Hypotonischer Puffer	20 mM TRIS, 5 mM EDTA, 1mM DTT, 1x Protease Inhibitor, pH 7,5
Lyse-Puffer (Alkalische Lyse)	200 mM Natriumhydroxid, 1% SDS
Neutralisationspuffer (Alkalische Lyse)	3 M Kaliumacetat, pH 5,5
PBS-Puffer	137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 2 mM Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7,4
Kalium-Phosphat-Puffer	0.1 M Dikaliumhydrogenphosphat, 0.1 M Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7,4
Resuspensionspuffer (Alkalische Lyse)	50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, RNase A (finale Konz. 100µg/ml), pH 8
Saccharose-Puffer	20 mM TRIS, 5 mM EDTA, 1mM DTT, 500 mM Sacchrose , 1x Protease Inhibitor, pH 7,5
SDS-Laufpuffer	192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0.1 % SDS
TBS-T	1x TBS, 0,05 % Tween20

5.13 Geräte

Tabelle 13: Verwendete Geräte.

Bezeichnung	Hersteller
Balance BP2100S	Sartorius (Göttingen)
Balance PB3002-S DeltaRange	Mettler Toledo (Greifensee)
Balance XS205DU	Mettler Toledo (Greifensee)
BioDocAnalyse	Biometra GmbH (Göttingen)
Centrifuge 5424R	Eppendorf AG (Hamburg)
Casting System Compact	Biometra GmbH (Göttingen)
Dark Reader™ transilluminator	Clare Chemical Research (Dolores, USA)
Eppendorf Research®	Eppendorf AG (Hamburg)

Ergo One®	Starlab International GmbH (Hamburg)
GeneAmp® PCR System 2700	Applied Biosystems (Foster City, USA)
inoLab pH Level 2	WTW GmbH + Co. KG (Weilheim)
KS 130 basic	IKA GmbH + Co. KG (Staufen im Breisgau)
Mastercycler® pro	Eppendorf AG (Hamburg)
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories (München)
NanoDrop™ One	Thermo Scientific™ (Darmstadt)
Optima MAX-E Ultracentrifuge	Beckman Coulter (Brea, USA)
RM 5	Ingenieurbüro CAT M. Zipperer GmbH (Ballrechten-Dottingen)
Rotilabo®-mini-centrifuge "Uni-fuge"	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
RZR 2020	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG (Schwabach)
Shaking Incubator CERTOMAT® BS-1	B.Braun Biotech International (Melsungen)
SpectraMax® 250	Molecular Devices, LLC. (San Jose, USA)
Standard Power Pack 25	Biometra GmbH (Göttingen)
Stirrer RCT basic	IKA WERKE (Staufen im Breisgau)
Techne® Dri-Block 3-DB	Cole-Parmer (Staffordshire, UK)
TKA-Gen-Pure xCAD UF UV-TOC/UF	TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH (Niederelbert)
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories (München)
Ultra Low Temperature Freezer MDF- U76V	Sanyo (Osaka) Systec GmbH (Wettenberg)

5.14 Materialien

Tabelle 14: Verwendete Materialien.

Bezeichnung	Hersteller
5 ml Tissue Grinder, Potter-ELV	DWK Life Sciences GmbH (Wertheim)
15 ml Zentrifugen-Tubes mit Schraubdeckel	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)

50 ml Zentrifugen-Tubes mit Schraubdeckel	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Alufolie	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
CL-XPosure™ Film 5 x 7 inches	Thermo Scientific™ (Darmstadt)
Deckgläschen (18x18mm)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Safe-Lock Tubes, 1,5 mL	Eppendorf AG (Hamburg)
Safe-Lock Tubes, 2 mL	Eppendorf AG (Hamburg)
Filter tips CLEARLine®	Biosigma (Cona)
Glasperlen Ø 2,85-3,45 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
MicroWell™ 96-Well Mikrotiterplatten	Thermo Scientific™ (Darmstadt)
Parafilm	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Petrischalen (94mm x 16 mm)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Strip of 8 0,2 ml PCR tubes with optically clear flat caps	4titude Ltd. (Surrey, UK)
Trans-Blot® Mini Protean Precast Gels	Bio-Rad Laboratories (München)
Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDF Transfer Packs	Bio-Rad Laboratories (München)
Polycarbonate Centrifuge Tubes (13x51 mm)	Beckman Coulter (Brea, USA)

5.15 Software

Tabelle 15: Verwendete Software.

Bezeichnung	Hersteller
Geneious R11	Biomatters Ltd (Auckland, New Zealand)
SeqBuilder Pro	DNASTAR, Inc. (Madison, USA)
SofTMaxPro	Molecular Devices, LLC. (San Jose, USA)

6 Methoden

6.1 Molekularbiologische und Biochemische Methoden

6.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde mithilfe der Phusion DNA-Polymerase durchgeführt. Das Plasmid Cp-SLC2_9048 + Stop piB/V5-His 1-5 diente als Template. Insertspezifische Primer (s. Tabelle 2) wurden zur Amplifizierung des SLC2_9048 genutzt. Dabei wurde sich nach den vom Hersteller empfohlenen Zyklus-Parametern entsprechend der verwendeten Polymerase (s. Tabelle 16) und Primern gerichtet. Es wurden 0,1 μ M Primer, 114,5 ng Template und 1 U Phusion DNA-Polymerase verwendet.

Tabelle 16: Zyklus-Parameter der Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung der Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase.

PCR-Phase	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	98	0:30	1
Denaturierung	98	0:10	30
Hybridisierung	X*	0:30	
Elongation	72	0:23	
Finale Elongation	72	10:00	1
Halten	4	∞	-

* Die Hybridisierungstemperatur wurde entsprechend der verwendeten Primer spezifisch ausgerechnet: CpSLC2 fwd pCDNA mit CpSLC2 rev+S pCDNA 61,6 °C; CpSLC2 fwd pCDNA mit CpSLC2 rev-S pCDNA 59,8 °C

6.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Nukleinsäuren wurden in einem 1%igen Agarose-Gel unter Zugabe von 4 μ l Midori Green Advance pro 100 ml Agarosegellösung bei 120 V für 35 min aufgetrennt. Als Größenmarker diente Genruler 1 kb Plus DNA Ladder und als Ladepuffer 6x DNA Loading Dye.

6.1.3 DNA-Gelextraktion

Die gewünschte Bande wurde auf einem UV-Tisch bei 420 nm detektiert und aus dem Gel ausgeschnitten. Fortwährend wurde das QIAquick Gel Extraction Kit entsprechend des Herstellerprotokolls genutzt. Jedoch ließ man die Säule nach Zugabe des PE-Puffers 5 min stehen, bevor diese gewaschen wurde.

6.1.4 Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der RNA- und DNA-Konzentration wurde die Absorption bei 260 nm entsprechend der Bedienungsanleitung von NanoDrop One gemessen. Das Messvolumen betrug 1 μ l. Die Reinheiten wurden über den Quotienten der Absorption $\frac{260\text{ nm}}{280\text{ nm}}$ (reine DNA $\geq 1,8$ bzw. RNA $\geq 2,0$) und $\frac{260\text{ nm}}{230\text{ nm}}$ (reine DNA bzw. RNA $\geq 2,0$) bestimmt.

6.1.5 Klonierung des PCR-Produktes in pcDNATM3.1D/V5-His-TOPO[®]-

Vektor

Für die Klonierung wurde sich nach dem Protokoll zur TOPO[®] Cloning Reaction des pcDNATM3.1 Directional TOPO[®] Expression Kits gerichtet, wobei die Reaktion 30 min inkubierte. Folgender Ansatz wurde verwendet.

Tabelle 17: Übersicht zur Zusammensetzung TOPO[®] Cloning Reaction

Reagenz	Volumen [μ l]
PCR-Produkt (5 ng/ μ l)	1
Salzlösung	0,5
Nuklease freies Wasser	1
TOPO [®] -Vektor	0,5
Endvolumen	3

6.1.6 Transformation in *E. coli*

Die Transformation der TOPO® Cloning Reaction geschah in One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*. Dabei wurden die 3 µl der TOPO-Klonierungsreaktion zu 25 µl der kompetenten Zellen gegeben und entsprechend des Herstellerprotokolls gearbeitet. Fortwährend wurden jeweils ca. 130 µl der Bakteriensuspension auf LB-Agar-Petrischalen mit 50 µg/ml Carbenicillin mit Glaskugeln ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

6.1.7 *E. coli* Flüssigkultur

Es wurde jeweils eine Kolonie der Übernachtskultur mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in 3 ml LB-Flüssigmedium mit 50 µg/ml Carbenicillin versetzt und über Nacht inkubiert.

6.1.8 Plasmid-Präparation

Nachdem eine geeignete Zelldichte in der Flüssigkultur erreicht wurde, wurden 2 ml der Suspension zur Anwendung des Gen-Elute Plasmid Miniprep™ Kits verwendet. Mit Zunahme der Probenzahl wurde auf die Alkalische Lyse zurückgegriffen. 1,5 ml der *E. coli* Flüssigkultur wurden bei 12100 x g für 2 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 200 µl Resuspensionspuffer homogenisiert. Folglich wurden 200 µl des Lyse-Puffers hinzugegeben und dreimal invertiert. Das gleiche Volumen des Neutralisationspuffers wurde darauf gegeben und dreimal invertiert. Die Probe wurde 15 min bei 12100 x g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde dekantiert und in ein neues Gefäß mit 800 µl vorgelegtem Isopropanol (100%ig) gegeben und mehrfach invertiert. Das nach einer Zentrifugation für 30 min unter gleichen Parametern entstandene Pellet wurde mit 300 µl Ethanol überschichtet und erneut für 3 min zentrifugiert. Abschließend wurde der Alkohol abgenommen und das Pellet 25-40 min bei 37°C getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 30 µl nukleasefreien Wasser resuspendiert und die Konzentration dieser bestimmt (s. 6.1.4).

6.1.9 Restriktionsverdau

Ein Aliquot des isolierten Plasmides wurde entsprechend des Herstellerprotokolls einfach mit *Bam*HI und doppelt mit *Bam*HI und *Xba*I verdaut. Es wurden für einen 20 µl Ansatz

200 ng Plasmid-DNA verwendet. Die DNA-Fragmente sollten über eine Agarose-Gelelektrophorese bestätigt werden (s. 6.1.2).

6.1.10 Sequenzierung

Die Orientierung des Inserts im Vektor und deren Sequenz wurde über die Sanger Sequenzierung bestimmt. Dabei wurde entsprechend der Herstellerangaben eine definierte Konzentration Plasmid-DNA und Primer in einem Volumen an Eurofins Genomics (Ebersberg) eingeschickt.

6.1.11 Zellkultivierung/Passage

Es wurden HBMEC-Zellen bzw. HEK293-Zellen in T75 Flaschen kultiviert. 12 ml RPMI 1640 Medium mit 10% FCS, Glutamin und 0,2 mg/ml Gentamicin wurden pro Flasche verwendet. Das Kultivierungsmedium wurde abgesaugt und die adhärennten Zellen vorerst mit 1 ml Trypsin/EDTA gewaschen und anschließend mit 0,5 ml Trypsin/EDTA 2 bis 5 min inkubiert und mit einem leichten Schlag auf die Kulturflasche abgelöst. Danach wurden die Zellen in 5 ml Medium gründlich suspendiert, der Kulturflasche entnommen und mit einem Verdünnungsfaktor von 1:10 ausgesät und bei einer Konfluenz von 90 % erneut passagiert.

6.1.12 Transfektion

Nach Bestimmung der Zellzahl einer 60-80% konfluenten T75-Flasche in einer Neubauer-Zählkammer über Trypanblaufärbung wurden 2 ml mit $4,5 \times 10^5$ Zellen pro Well in eine 6-Well-Platten eingesät und die Transfektion entsprechend des Herstellerprotokolls des ScreenFect A Kits durchgeführt. 24 bis 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet (s. 6.1.13). Als Positiv-Kontrolle diente das YFP CAAX pcDNA3.1 Plasmid, mit welcher die Transfektionseffizienz zur Ernte berechnet wurde. Es wurde an drei zufällig gewählten Positionen des Wells mit Vergrößerung 20x die fluoreszierenden Zellen ins Verhältnis zur totalen Anzahl der Zellen des Sichtbereiches gestellt. Diese Art der Transfektion wurde im Zellbiolabor der EAH Jena durchgeführt. Transfektionen wurden bis zu einer Passagenzahl von 20 durchgeführt.

Bestand nicht die Möglichkeit Transfektionen an der EAH Jena durchzuführen, wurden Zellen am CMB der Abteilung Biophysik durch Elektroporation transfiziert. Auf eine Positivkontrolle wurde dabei verzichtet. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion geerntet (s. 6.1.13).

6.1.13 Differentielle Zentrifugation

Zur Lokalisierung des exprimierten Transporters wurde eine differentielle Zentrifugation durchgeführt, mit welcher unterschiedliche Kompartimente der Zelle isoliert werden konnten. Den verwendeten Puffern wurde vor der Durchführung 1x Protease Inhibitor und 1 mM DTT zugegeben.

Transfizierte Zellen einer 6-Well-Platte wurden entsprechend 6.1.11 gelöst sowie in 5ml Kultivierungsmedium resuspendiert und folgend immer auf Eis gehalten. Die Zellen wurden für 10 min bei 500 x g, 4 °C pelletiert und in 1 ml 1x PBS resuspendiert und erneut mit gleichen Parametern pelletiert. Der Waschschrift mit 1x PBS wurde noch einmal wiederholt. Nachfolgend wurden die Zellen in 0,75 ml hypotonischen Puffer resuspendiert und 20 min inkubiert. Nach 10 min Inkubation wurden 2 µl Probe genommen und die zu erwartende Zellschwellung kontrolliert. Eine Homogenisierung unter Verwendung eines Potter-Stabes mit dreimal 10 auf- und ab Bewegungen folgte. Dazwischen wurde die Probe ca. 1 min auf Eis gehalten. Nach der Homogenisierungsprozedur wurde die mechanische Lyse der Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert (15 µl Probe wurde genommen). Das gleiche Volumen Saccharose Puffer wurde der Proben-Volumen hinzugegeben und 10 min bei 1200 x g, 4 °C mit einem Ausschwing-Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem separaten 15 ml Zentrifugationsröhrchen gesichert (15 µl Probe wurde genommen) und die Homogenisierungsprozedur mit dem Pellet erneut durchgeführt, wobei an gleicher Stelle jeweils eine Probe genommen wurde.

Anschließend wurden beide Überstände vereint (15 µl Probe wurde genommen) und 15 min bei 10000 x g, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde gesichert (15 µl Probe wurde genommen) und 1 h bei 100000 x g, 4 °C in einem 5 ml Zentrifugengefäß zentrifugiert. Das Austarieren erfolgte bis auf 10 µg genau. Der Überstand (Cytosol) wurde gesichert (15 µl Probe wurde genommen) und das Pellet (Mikrosomen) in 0,5 ml Potassium-Phosphat-Puffer mit einem Potter-Stab resuspendiert (15 µl Probe wurde genommen).

6.1.14 Bradford-Assay

Mittels des Bradford-Assays wurden die Proteinkonzentrationen der genommenen Proben (s. 6.1.13) bestimmt. Es wurde sich nach dem Protokoll des Coomassie (Bradford) Protein Assay Kits für Mikroplatten gerichtet, wobei als Standard konventionelles BSA Pulver diente. Zur Messung der beladenen 96-Well-Platte erfolgte im SpectraMax® 250 bei 595 nm. Die Standardkurvenfunktion wurde über Lineare Regression aufgestellt.

6.1.15 SDS-PAGE

Die fraktionierten Proteine (s. 6.1.13) wurden entsprechend ihrer Molekülgröße im elektrischen Feld aufgetrennt. Dafür wurden sie zunächst 15 min bei 70 °C im 5x SDS-Ladepuffer denaturiert. Anschließend wurde das Polyacrylamid-Gel mit den Proben beladen und für 30 min bei 200 V in der Elektrophoresekammer aufgetrennt.

6.1.16 Western Blot

Die mit der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels des Trans-Blot® Turbo™ Transfer Systems mit dem Programm „Turbo Mini“ (25 V, 7 min) auf die PVDF-Membran übertragen und für 1 h bei Raumtemperatur in 5 % fettloses Milchpulver in 1x TBS-T (0,05% Tween20) blockiert.

Die Membran wurde mit Anti-V5-HRP Antikörper (1:5000 verdünnt, für Transfektionen mit pSLC2_9048 -S) bzw. mit spezifischen primären Antikörpern EKE bzw. VPE (1:5000 verdünnt, für Transfektionen mit pSLC2_9048 +S) in 10 ml 1x TSB-T mit 0,25 % fettlosem Milchpulver über Nacht bei 4 °C auf einem Rolltisch inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran drei mal 10 min mit 1x TBS-T gewaschen. Die primären Antikörper wurden 1 h in 10 ml 1x TSB-T mit 0,25 % fettlosem Milchpulver mit sekundären peroxidase-gekoppelten Antikörpern bei Raumtemperatur inkubiert und nochmals drei mal 10 min mit 1x TBS-T gewaschen. Schließlich wurde die Membran für 2 min mit Chemilumineszenz-Substrat inkubiert und über einen Röntgen-Film detektiert.

War das Ergebnis nicht ausreichend wurde die Membran in 1x TBS-T erneut drei mal 10 min gewaschen und ein zweites Mal über Nacht mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert.

6.1.17 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation aus den HEK293-Zellen wurde das RNAqueous™ Total RNA Isolation Kit verwendet. Das in PBS-Puffer zweimal gewaschene Pellet von 2 Millionen Zellen wurde mit 700 µl Lysis/Binding-Buffer homogenisiert und folgend entsprechend des Handbuchs die Isolation durchgeführt. Anschließend wurde die RNA-Konzentration bestimmt (s. 6.1.4), um mit der qRT-PCR fortfahren zu können

6.1.18 qRT-PCR

Mit der qRT-PCR sollte die Transkription des SLC2_9048 Gens mit und ohne Tag in den HEK293-Zellen nachgewiesen werden. Es wurde entsprechend des Handbuchs des Brilliant III Ultra-Fast QRT-PCR Master Mix Kits gearbeitet. Als Template dienten jeweils 10 und 100 ng RNA der transfizierten HEK293-Zellen sowie 400 nM genspezifische Primer* (s. Tabelle 2). Verwendet wurde das qRT-PCR-Programm für Bio-Rad CFX96, welches im Handbuch aufgelistet ist. Als Positivkontrolle wurden 100 ng RNA *C. populi* mit Primern (400 nM) für das *eIF4a*-Gens, welches als Housekeeping-Gen kontinuierlich transkribiert werden muss verwendet. Als Negativkontrollen dienten ein Ansatz ohne RNA und untransfizierte HEK293-Zellen.

* Fwd primer_SLC2_9048_8 und Rev primer_SLC2_9048_103, Fwd primer_SLC2_9048_1052 und Rev primer_SLC2_9048_1131

6.2 Bioinformatische Methoden

Für die bioinformatische Auswertung der vorgegebenen Gen-Sequenz wurden verschiedene Server des *Center for biological sequence analysis* (CBS, Technische Universität Dänemark), *ExpASY Bioinformatics Resources Portal* (Swiss Institute of Bioinformatics) und des *Basic Local Alignment Search Tools* (National Center for Biotechnology Information) verwendet (s. Tabelle 18)

Tabelle 18: Übersicht über die verwendeten Server verschiedener Institutionen

Servername	Aufgabe/Vorhersage	Link
<i>Center for biological sequence analysis</i>		
DeepLoc-1.0	Subzelluläre Lokalisation eukaryotische Proteine	http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc/
SignalIP 4.1 Server	Signalpeptid und Spaltungsstellen Gram+, Gram- und eukaryotischen Aminosäuresequenzen	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
DictyOGlyc 1.1	O-(alpha)-N-Acetylglucosamin Glykosilierungsstellen	http://www.cbs.dtu.dk/services/DictyOGlyc/

NetAcet 1.0 Server	N-terminale Acetylierung in eukaryotischen Proteinen	http://www.cbs.dtu.dk/service/s/NetAcet/
NetCGlyc 1.0 Server	C-Mannosylierungsstellen in Säugerproteinen	http://www.cbs.dtu.dk/service/s/NetCGlyc/
NetNGlyc 1.0 Server	N-Glykosylierungsstellen menschlicher Proteine	http://www.cbs.dtu.dk/service/s/NetNGlyc/
NetOGlyc 4.0 Server	O-N-Acetylgalatosamin Glykosylierungsstellen in Säugerprotein	http://www.cbs.dtu.dk/service/s/NetOGlyc/
NetPhos 3.1 Server	Phosphorylierungsstellen in eukaryotischen Proteinen	http://www.cbs.dtu.dk/service/s/NetPhos/
TMHMM Server v. 2.0	Transmembrane Helices in Proteinen	http://www.cbs.dtu.dk/service/s/TMHMM/
<i>ExpASY Bioinformatics Resources Portal</i>		
ScanProsite	Motifs	https://prosite.expasy.org/scanprosite/
SWISS-Model	Protein-Struktur Homologie	https://swissmodel.expasy.org/interactive
<i>Basic Local Alignment Search Tools</i>		
blastx	Proteinsequenz aus Nucleotidsequenz	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
blastp	Proteinsequenz Homologie	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

7 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das SLC2_9048-Gen aus *C. populi* welches für einen putativen SLC2-like-Transporter codiert heterolog in Säugerzellen exprimiert werden und über Differentielle Zentrifugation isoliert werden.

7.1 Bioinformatische Ergebnisse

Um eine Vorstellung zu bekommen, wie das Protein aufgebaut ist, wurde zunächst eine bioinformatische Analyse durchgeführt.

Die cDNA codiert für ein Protein mit 489 Aminosäuren (s. 12 und 12.2). Das native Protein hat eine Molekülmasse von 54,36 kDa, unter Verwendung eines Protein-Tags (s. 7.2) 57,96 kDa. Außerdem konnten 12 Transmembrandomänen (s. Abbildung 7) hervorgesagt werden.

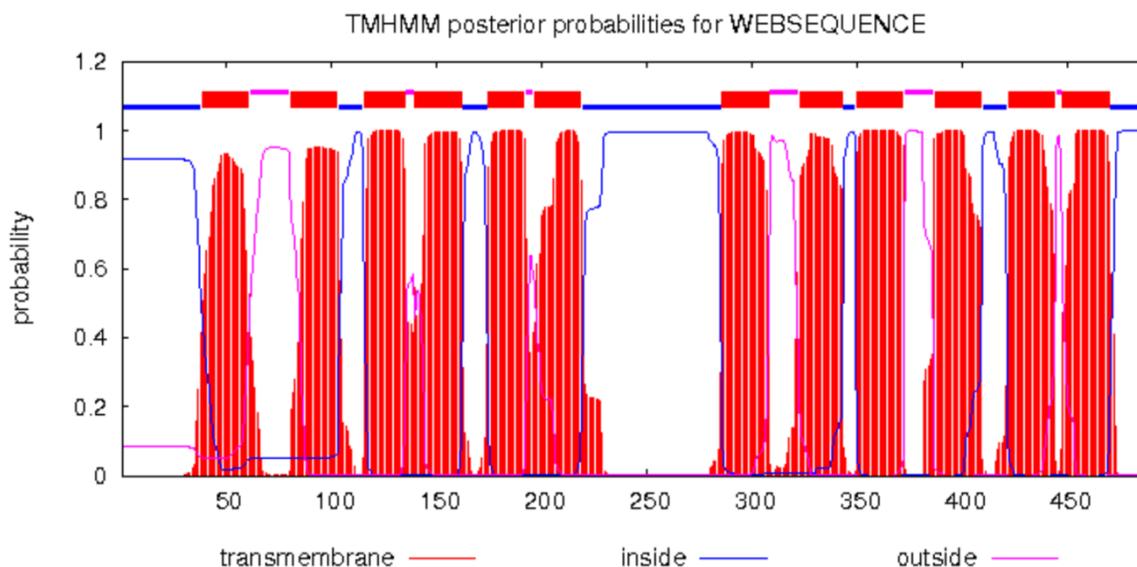


Abbildung 7: Grafische Darstellung der Transmembrananalyse der DTU des TMHMM Server v. 2.0

Mit dem SignalIP 4.1 Server konnte kein Signalpeptid nachgewiesen werden. Acetylierungen, C-Mannosylierungen und O-Glykosylierungen konnten nicht vorhergesagt werden. Mit dem ScanProsite Server konnte das Motiv der Major facilitator superfamily (MFS) von Aminosäure 39 bis 476 nachgewiesen werden. Als mögliche posttranslationale Modifikationen konnten Phosphorylierungen und N-Glykosylierungen vorhergesagt werden. Eine Auflistung der möglichen Phosphorylierungsstellen über den NetPhos 3.1

Server befindet sich im Anhang 12.3. Über den NetNGlyc 1.0 Server konnten N-Glykosylierungen an Asn35 mit einem Potential von 0,7352 und an Asn272 mit einem Potential von 0,5633 berechnet werden. An Asn170 konnte mit einem Potential von 0,4936 nahe dem Schwellenwert von 0,5 eine weitere Modifikation nachgewiesen werden.

Unter Verwendung des Protein Blast Tools des NCBI konnte im Taxa der Insecta der facilitated trehalose transporter Tret1-like in *Leptinotarsa decemlineata* (Accession XP_023015627.1) als bestes Ergebnis mit einer Identität von 45 % berechnet werden.

Über das SWISS-MODEL konnte als bestes Ergebnis die strukturelle Homologie zum SLC2-Transporter des Typs 3 mit folgenden Werten berechnet werden. Der QMEAN4-Wert betrug -5,04. Die Sequenz Gleichheit betrug 32 % und die Sequenz Identität 23,76 %.

Für eine Vorhersage des möglichen Aufenthaltsortes des Transporters wurde das Programm DeepLoc-1.0 verwendet. Mit höchster Wahrscheinlichkeit befindet er sich in der Zellmembran (s. Abbildung 8).

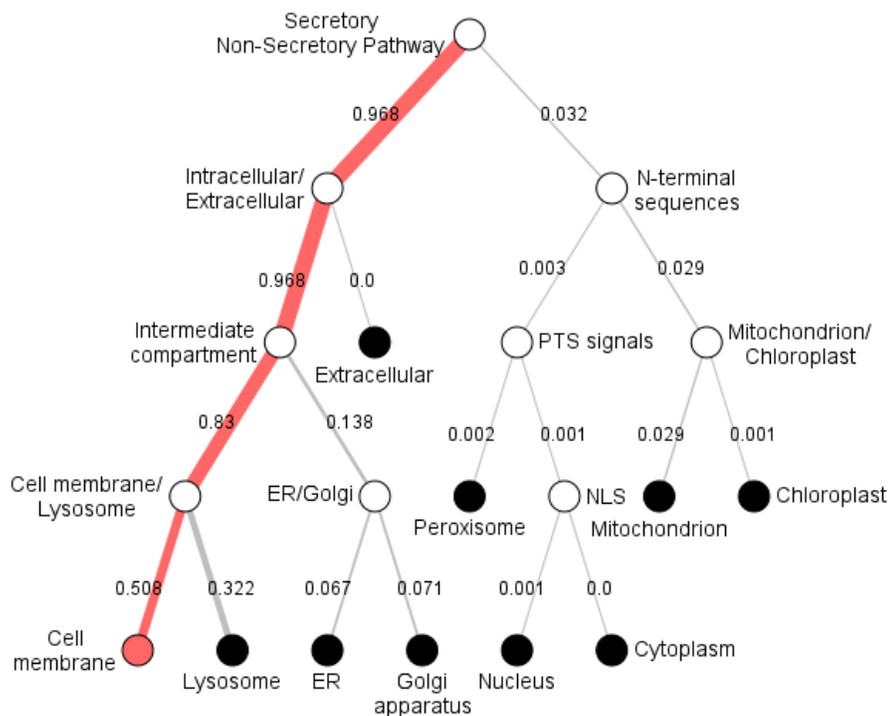


Abbildung 8: Hierarchischer Verteilungsbaum zur Vorhersage des Aufenthaltsortes des putativen SLC2-like-Transporters.

7.2 Amplifizierung des SLC2_9048-Gens über PCR und deren

Extraktion aus dem Gel

Zur Amplifizierung des SLC2_9048-Gens wurde eine PCR durchgeführt (s. 6.1.1). Als Template diente dabei das bereits vorliegende Cp-SLC2_9048 + Stop piB/V5-His 1-5 Plasmid, welches für die Transfektion in Insektenzellen Verwendung findet. Entsprechend der verwendeten Primer konnte über den sense Primer das spezifische 5'-Ende (5'-CCAC-3') des Gens für eine *blunt end* Klonierung und die Kozak-Sequenz (5'-ATGG-3') gewährleistet werden. Primer CpSLC2 rev+S pCDNA diente für das herkömmliche Gen ohne Tag, weshalb ein Stop-Codon mit amplifiziert wurde (in folgenden SLC2_9048 +S). Primer CpSLC2 rev-S pCDNA diente für das Gen mit Tag und wurde ohne Stop-Codon amplifiziert wurde (im Folgenden SLC_9048 -S). Das in Tabelle 16 verwendete Programm erzielte die gewünschte Amplifizierung des Gens bzw. der modifizierten Variante ohne Stop-Codon. Als Kontrolle diente die im pcDNA™3.1 Directional TOPO® Expression Kit beigelegte Kontrolle.

Das herkömmliche Gen hat eine Länge von 1470 bp. Spur 2A, 3A, 3B und 4B (Amplifizierung SLC2_9048 +S) und Spur 5A, 6A, 6B und 7B (Amplifizierung SLC2_9048 -S) weisen eine signifikante Bande bei einer Länge von etwa 1500 bp auf. Die Kontrolle in Spur 7A und 8A weist auch die zu erwartende Bande von 750 bp auf (s. Abbildung 9). Insgesamt wurden pro PCR-Produkt vier Gel-Taschen beladen, um eine erfolgreiche Gel-Extraktion zu gewährleisten.

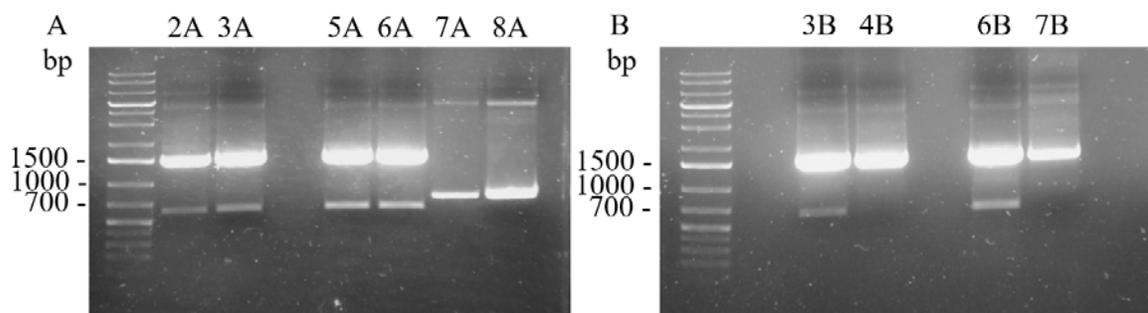


Abbildung 9: 1%iges Agarosegel der PCR zur Amplifizierung des SLC2_9048-Gens. Spur 2A, 3A, 3B und 4B zeigen die Amplifizierung des SLC2_9048 +S und Spur 5A, 6A, 6B und 7B die Amplifizierung SLC2_9048 -S. Spur 7A und 8A zeigen die Kontrolle. Als Größen-Standard diente GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. bp, Basenpaare.

Da neben der gewünschten Bande von 1500 bp und 750 bp der Kontrolle noch weitere Banden (s. Abbildung 9) zu sehen waren, führte man eine Gel-Extraktion durch (s. 6.1.3),

wovon die DNA-Konzentration und Reinheit bestimmt wurde (s. Tabelle 19). Über eine weitere Gel-Elektrophorese konnten die Extraktion der gewünschte PCR-Produkte bestätigt werden (s. Abbildung 10).

Tabelle 19: DNA-Konzentrationen und Reinheiten der Gelextrakte.

	DNA-Konzentration [ng/ μ l]	A $\frac{260}{280}$	A $\frac{260}{230}$
SLC2_9048 +s	150,5	1,84	0,77
SLC2-9048 -s	151,2	1,85	0,30
Kontrolle	35,6	1,89	0,20

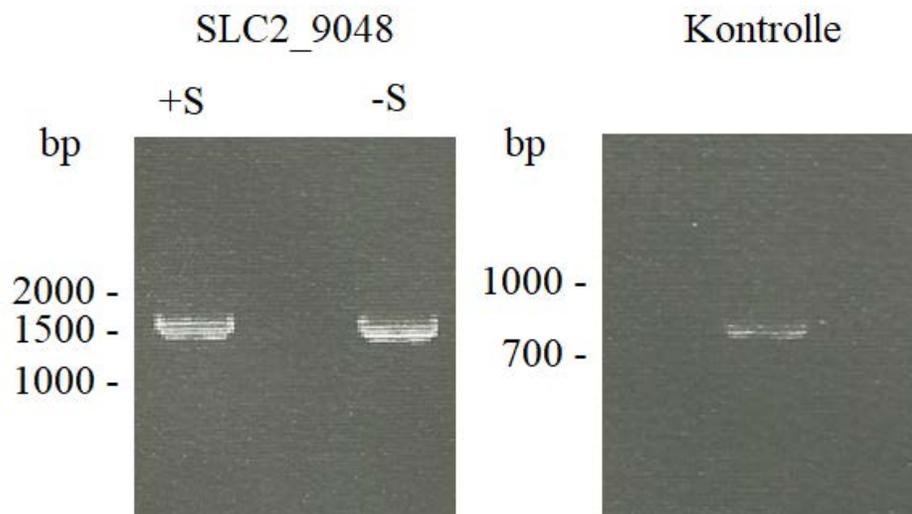


Abbildung 10: 1%iges Agarosegel zur Bestätigung der Gelextraktion. Es wurden jeweils vier Banden bei 1500 bp des jeweiligen Genkonstruktes und zwei Banden der Kontrolle bei 750 bp extrahiert. Als Größen-Standard diente GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. bp, Basenpaare; +/-S SLC2_9048 mit bzw. ohne Stop-Codon.

7.3 TOPO-Klonierung und Transformation in One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli*

Das extrahierte PCR-Produkt wurde nun in pcDNA™3.1D/V5-His-TOPO® kloniert (s. 6.1.5; Vektorkarte s.12.4) und anschließend in One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* transformiert. Erfolgreiche Klonierungen zeigten sich in erster Linie anhand der Anzahl der Kolonien (s. Tabelle 20). Die Transformationseffizienz betrug $0,85 \times 10^9$.

Tabelle 20: Anzahl der *E.coli*-Kolonien nach erfolgter Transformation mit dem jeweiligen Plasmid und Ausplattierung auf LB-Agar mit 50 µg/ml Carbenicillin.

Plasmid	pSLC2_9048 +S	pSLC2_9048 -S	Positiv-Kontrolle	pUC 19
Anzahl der Kolonien	44	22	69	85

Es wurden jeweils acht Kolonien der LB-Agar-Platten mit dem transformierten pSLC2_9048 +S bzw. -S in eine Übernacht-Kultur in Suspension gebracht (s. 6.1.7) und nachfolgend eine Plasmid-Präparation durchgeführt (s. 6.1.8).

Die Plasmide wurden darauffolgend doppelt mit *Bam*HI und *Xba*I verdaut, um zwei Fragmente zu erhalten (s. 6.1.9). Zu erwarten waren eine Bande bei 1539 bzw. 1542 bp und 5445 bp. Lediglich jeweils zwei Kolonien wiesen nach dem Verdau Banden bei 6500 bp und 1600 bp auf (s. Abbildung 11). Ein einfacher Verdau mit *Bam*HI sollte das Plasmid linearisieren (s. 6.1.9). Zu erwarten war eine Bande bei 6984 bp. pSLC2_9048 +S1 wies eine Bande bei 16000 bp und +S2 eine Bande bei 10000 bp auf. pSLC2_9048 –S1 und 2 wiesen jeweils eine Bande bei der zu erwartenden Basenpaarlänge auf (s. Abbildung 12). Abschließend wurde Plasmid-Konzentration der positiven Klone gemessen (s. Tabelle 21).

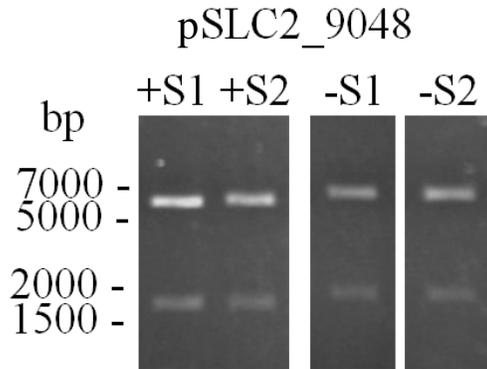


Abbildung 11: 1%iges Agarosegel des Restriktionsendonukleasenverdaus der Plasmide pSLC2_9048 +S1 bzw. 2 und -S1 bzw. 2 mit *Bam*HI und *Xba*I. Gezeigt sind die entstandenen DNA-Fragmente nach Inkubation mit *Bam*HI und *Xba*I. Als Größen-Standard diente GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. bp, Basenpaare; pSLC2_9048 +/-S mit bzw. ohne Stop-Codon.

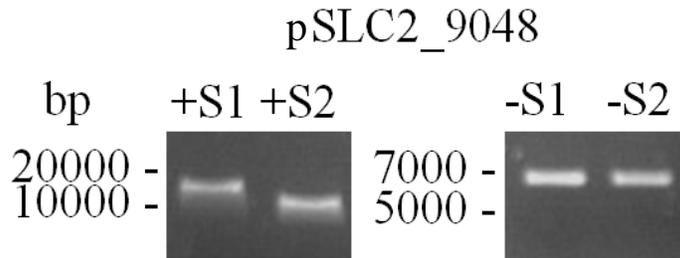


Abbildung 12: 1%iges Agarosegel des Restriktionsendonukleasenverdaus der Plasmide pSLC2_9048 +S1 bzw. 2 und -S1 bzw. 2 mit *Bam*HI. Gezeigt ist das jeweils entstandene linearisierte Plasmid nach Inkubation mit *Bam*HI. Als Größen-Standard diente GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. bp, Basenpaare; pSLC2_9048 +/-S mit bzw. ohne Stop-Codon.

Tabelle 21: Plasmid-Konzentrationen und Reinheiten der positiven Klone.

	DNA-Konzentration [ng/ μ l]	A $\frac{260}{280}$	A $\frac{260}{230}$
pSLC2_9048 +S1	1396,3	1,92	2,38
pSLC2_9048 +S2	2323,9	1,92	2,50
pSLC2-9048 -S1	1823,3	1,86	2,37
pSLC2-9048 -S2	1551,4	1,87	2,40

7.4 Sequenzierung

Die Banden beider Verdaue von pSLC2_9048 +S widersprachen sich. Eine Überprüfung der Orientierung des Inserts über Kolonie- und Plasmid-PCR schlug aufgrund der zu niedrigen Annealing Temperaturen und Differenz dieser fehl. Aus diesem Grund wurden pSLC2_9048 +/-S 1/2 sequenziert (s. 6.1.10). Damit konnte ebenfalls die Übereinstimmung der Sequenz mit dem ausgehenden Gen des Cp-SLC2_9048 + Stop piB/V5-His 1-5 Plasmid überprüft werden. Die Unterschiede der Basensequenz zum SLC2_9048 +/- S Template sind bei allen Plasmiden gleich, weshalb im Folgenden lediglich pSLC2_9048 +/- S verwendet wird. An vierter Position befindet sich durch die Kozak-Sequenz ein Guanin anstatt eines Adenins, was zu Glycin anstatt Serin codiert. An 396. und 498. Position steht ein Thymin anstatt eines Cytosins, was in beiden Fällen aber weiterhin zu Alanin bzw. Serin codiert. Somit ergab sich bei jedem sequenzierten Plasmid eine prozentuale Übereinstimmung von 99,796% zum ursprünglichen Template der PCR.

7.5 Transfektion und Kontrolle der Expression von SLC2_9048 -S

Zunächst wurden HBMEC Zellen kultiviert und das pSLC2_9048 -S in diese transfiziert (s. 6.1.11, 6.1.12). Über die Positivkontrolle konnte eine Transfektionseffizienz von 49 % (nach 24 h) berechnet werden. Die Expression des Proteins sollte über einen Western Blot mit Anti-V5-HRP Antikörper nachgewiesen werden, wobei die Zellen zunächst differentiell zentrifugiert wurden (s. 6.1.13). Der Bradford-Assay zeigte die Proteinkonzentrationen einer transfizierten 6-Well-Platte in den unterschiedlichen Fraktionen (s. Tabelle 22).

Tabelle 22: Proteinkonzentrationen der während der differentiellen Zentrifugation entnommenen Proben der transfizierten HBMEC-Zellen mit pSLC2_9048 -S. 1 Nach Zugabe des hypotonischen Puffers und Homogenisierung; Zellysat, 2 Überstand nach erster Homogenisierung, 3 Zweite Homogenisierung, 4 Überstand nach zweiter Homogenisierung, 5 Überstände aus 2 und 4 gepoolt, 6 Überstand aus 5, 7 Überstand nach erster Ultrazentrifugation (Cytosol), 8 resuspendiertes Mikrosomen-Pellet.

Probennummer	1	2	3	4	5	6	7	8
Protein-konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	2172	1087	524	205	580	527	119	341

Der darauf folgende Western Blot zeigte in keiner der Fraktionen ein Signal. Lediglich die mitgeführte Positivkontrolle wies ein Signal bei der gewünschten Proteingröße auf (s. Abbildung 22).

Da HEK293-Zellen die beste Effizienz und Verträglichkeit bei Transfektionen und heterologen Expressionen von Proteinen aufweist [24], wurde die gleiche Prozedur mit dieser Zelllinie durchgeführt. Es wurde die gleiche Positivkontrolle wie bei der Transfektion mit HBMEC-Zellen verwendet. Es zeigte sich eine Transfektionseffizienz von 52 % (nach 24 h) und eine Abnahme der Anzahl fluoreszierender Zellen um 4,66 % nach 48 h. Die Positivkontrolle wies eine geringe Adhärenz im Gegensatz zu den mit pSLC2_9048 -S transfizierten Zellen auf (s. Abbildung 13). Gleiche Beobachtungen wurden auch bei den HBMEC-Zellen gemacht.

Der Bradford-Assay zeigte die Proteinkonzentrationen einer transfizierten 6-Well-Platte in den unterschiedlichen Fraktionen (s. Tabelle 23).

Tabelle 23: Proteinkonzentrationen der während der differentiellen Zentrifugation entnommenen Proben der transfizierten HEK293-Zellen mit pSLC2_9048 -S. 1 Nach Zugabe des hypotonischen Puffers und Homogenisierung; Zellysat, 2 Überstand nach erster Homogenisierung, 3 Zweite Homogenisierung, 4 Überstand nach zweiter Homogenisierung, 5 Überstände aus 2 und 4 gepoolt, 6 Überstand aus 5, 7 Überstand nach erster Ultrazentrifugation (Cytosol), 8 resuspendiertes Mikrosomen-Pellet.

Probennummer	1	2	3	4	5	6	7	8
Protein-konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	2160	990	525	652	775	680	175	305

Der darauffolgende Western Blot wies kein Signal bei den Proben auf, jedoch bei der Positivkontrolle (s. Abbildung 23).

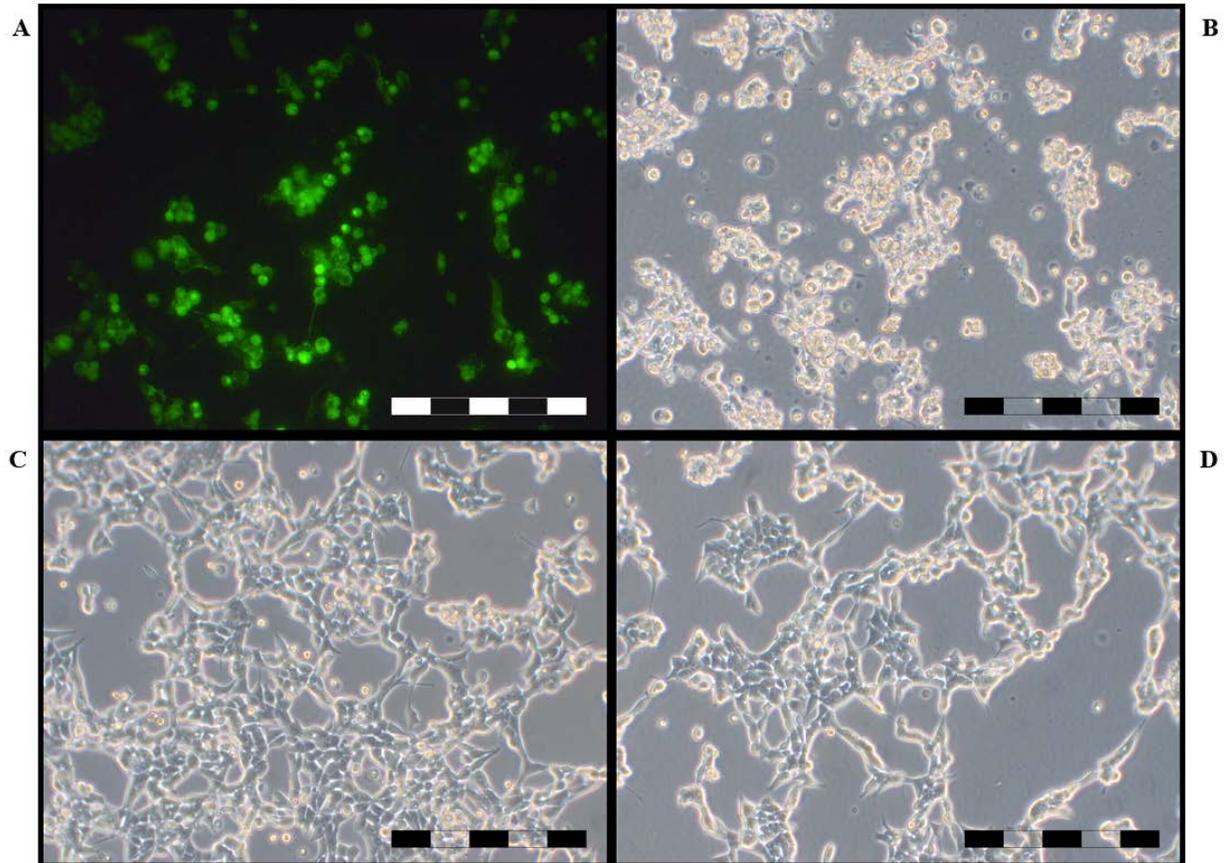


Abbildung 13: Exemplarische Darstellung der HEK293-Zellen kultiviert in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS, Glutamin und 0,2 mg/ml Gentamicin, 24 h nach durchgeführter Transfektion mit ScreenFect®. Vergrößerung 200-fach, Maßstab 300 µm. Die HEK293-Zellen wurden transfiziert mit, (A) YFP CAAX pcDNA3.1 Plasmid (Positivkontrolle, unter Fluoreszenzfilter), (B) YFP CAAX pcDNA3.1 Plasmid (Positivkontrolle, an gleicher Stelle wie (A)). C und D pSLC2_9048 -S

7.6 Transfektion und Kontrolle der Expression von SLC2_9048 +S

Da es bei der Verwendung des Proteins mit Tag zu keiner nachweisbaren Expression kam, wurde auf primäre Antikörper gegen das native Protein zum Nachweis der Expression zurückgegriffen. Es standen zwei Antikörper EKE und VPE (s. 5.8) zur Verfügung. Dabei wurde eine Transfektion in HEK293-Zellen über Elektroporation am CMB durchgeführt und die Prozedur entsprechend 7.5 fortgeführt.

Tabelle 24: Proteinkonzentrationen der während der differentiellen Zentrifugation entnommenen Proben der transfizierten HEK293-Zellen mit pSLC2_9048 +S. 1 Nach Zugabe des hypotonischen Puffers und Homogenisierung; Zellysate, 2 Überstand nach erster Homogenisierung, 3 Zweite Homogenisierung, 4 Überstand nach zweiter Homogenisierung, 5 Überstände aus 2 und 4 gepoolt, 6 Überstand aus 5, 7 Überstand nach erster Ultrazentrifugation (Cytosol), 8 resuspendiertes Mikrosomen-Pellet.

Probennummer	1	2	3	4	5	6	7	8
Protein-konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	1280	777	631	377	584	582	603	741

Zu erwarten war eine Bande bei 54 kDa in der Probenfraktion 8 beider Blots (s. Abbildung 15). Die Inkubation mit dem primären Antikörper EKE wies das stärkste Signal auf. Antikörper VPE hatte ein hohes Rausch-Signal-Verhältnis. Probe 3 und 4 in Abbildung 15A und Probe 7 in Abbildung 15B wiesen kein Signal auf. Alle anderen genommenen Proben der transfizierten Zellen zeigen unerwartete Banden, die auch in den Negativ-Kontrollen zu sehen sind. Diese Banden können somit als unspezifische Bindungen gewertet werden, wodurch keine erwarteten spezifischen Banden übrigbleiben.

Ein Western Blot transfizierter Zellen mit ScreenFectA des Zellysates (s. Abbildung 14) zeigte eine ähnliche Bandenstruktur zu dem Zellysate der Negativkontrollen aus Abbildung 15, was ebenfalls für unspezifische Bindungen spricht.

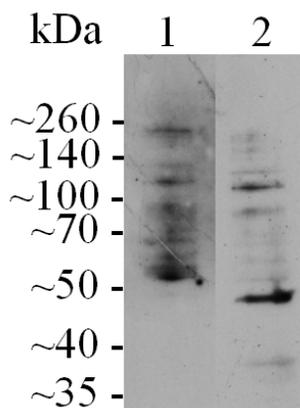


Abbildung 14: Western Blot der entnommenen Proben während der differentiellen Zentrifugation der HEK293-Zellen mit pSLC2_9048 +S (ScreenFectA). Belichtungszeit 30 sec. 1 und 2 nach Zugabe des hypotonischen Puffers und Homogenisierung; Zellysate, wobei 1 mit dem primären Antikörper VPE und 2 mit dem primären Antikörper EKE inkubiert wurde. Als Größen-Standard diente Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder. kDa, kiloDalton.

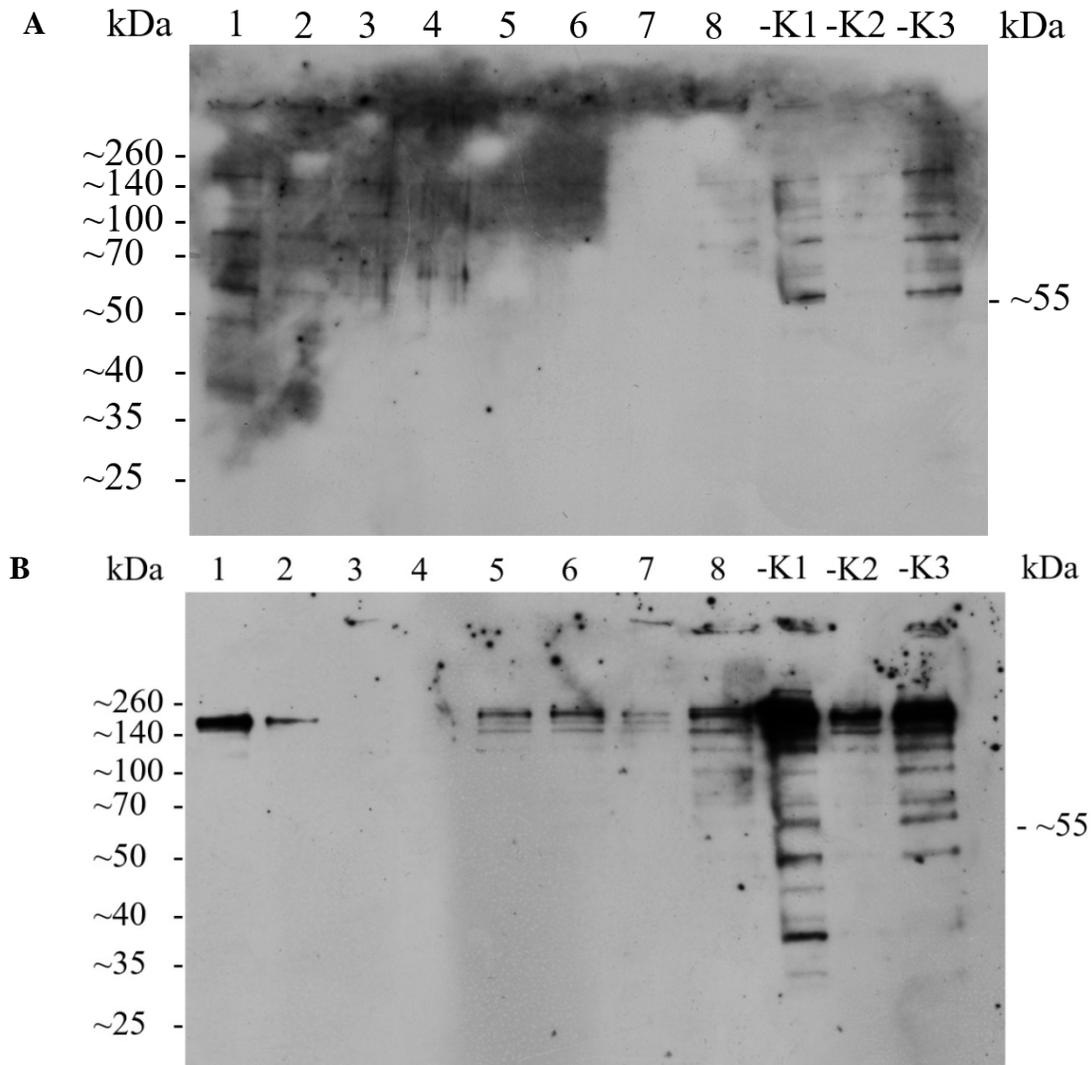


Abbildung 15: Western Blot der entnommenen Proben während der differentiellen Zentrifugation der HEK293-Zellen mit pSLC2_9048 +S (Elektroporation) und Inkubation mit dem primären Antikörper VPE (A) und EKE (B). Belichtungszeit 1,5 min. 1 Nach Zugabe des hypotonischen Puffers und Homogenisierung; Zelllysate, 2 Überstand nach erster Homogenisierung, 3 Zweite Homogenisierung, 4 Überstand nach zweiter Homogenisierung, 5 Überstände aus 2 und 4 gepoolt, 6 Überstand aus 5, 7 Überstand nach erster Ultrazentrifugation (Cytosol), 8 resuspendiertes Mikrosomen-Pellet. -K untransfizierte Zellen - K1 Nach Zugabe des hypotonischen Puffers und Homogenisierung, -K2 Überstand nach erster Ultrazentrifugation (Cytosol), -K3 resuspendiertes Mikrosomen-Pellet. Als Größen-Standard diente Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder. kDa, kiloDalton.

7.7 qRT-PCR zur Kontrolle der Transkription von SLC2_9048 +/- S

Da über den Western Blot das gewünschte Protein sowohl mit als auch ohne Tag nicht nachgewiesen werden konnte, wurde eine qRT-PCR durchgeführt, um die Transkription des transfizierten Gens zu überprüfen. Es wurden zwei genspezifische Primerpaare getestet, wobei Fwd primer_SLC2_9048_1052 und Rev primer_SLC2_9048_1131 (s. 5.2) die besseren Ergebnisse erzielten und folgend verwendet wurden. Tabelle 25 zeigt die signifikanten Werte welche in Abbildung 16 und Abbildung 17 dargestellt sind.

RNA transfizierter Zellen weisen eine niedrigere Schmelztemperatur und Cq-Wert im Vergleich zu den untransfizierten Zellen auf, was den Erwartungen entspricht.

Tabelle 25: Signifikante Werte der qRT-PCR mit RNA transfizierter HEK293-Zellen mit pSLC2_9048 + bzw. -S, untransfizierter HEK293-Zellen und einer Negativ-Kontrolle ohne RNA. Der Cq-Wert beschreibt den Zyklus, an dem ein Schnittpunkt mit dem Schwellenwert der nachweisbaren fluoreszierenden Einheiten entsteht. Die Schmelztemperatur beschreibt die Temperatur an der $-d(RFU)/dT$ sein Maximum erreicht.

Probe	RNA-Masse [ng]	Cq-Wert	Schmelztemperatur
pSLC2_9048 -S transfiziert	100	16,68	79,50
pSLC2_9048 +S transfiziert	100	15,54	80,00
untransfiziert	100	21,70	84,50
Negativ-Kontrolle ohne RNA	-	32,66	-

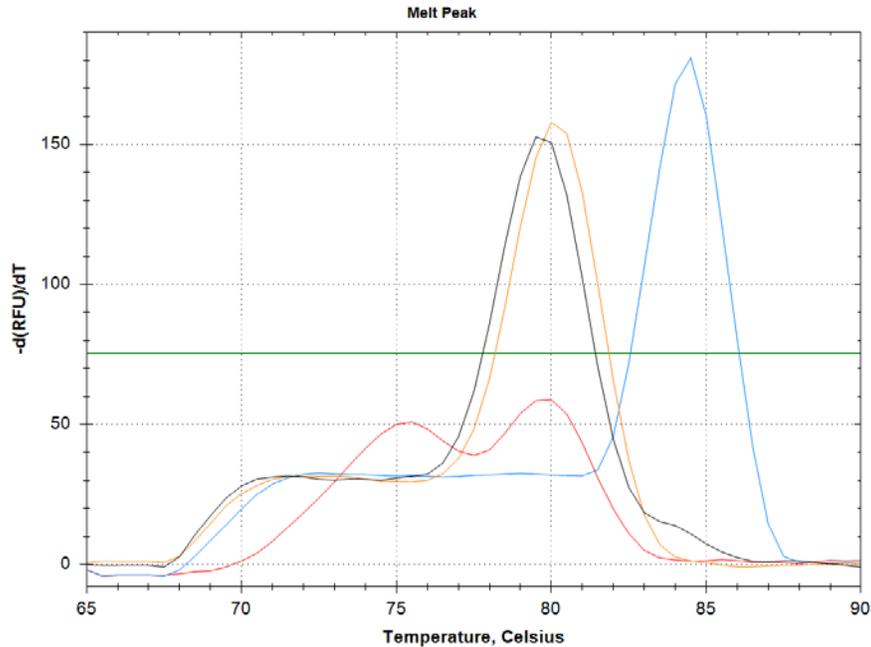


Abbildung 16: Negativer Anstieg der Relativ Fluoreszierenden Einheiten (RFU) in Abhängigkeit von der Temperatur. Rot: Negativ-Kontrolle ohne RNA. Schwarz: HEK293 pSLC2_9048 -S transfiziert (100 ng RNA). Gelb: HEK293 pSLC2_9048 +S transfiziert (100 ng RNA). Blau: HEK293 untransfiziert (100 ng RNA)

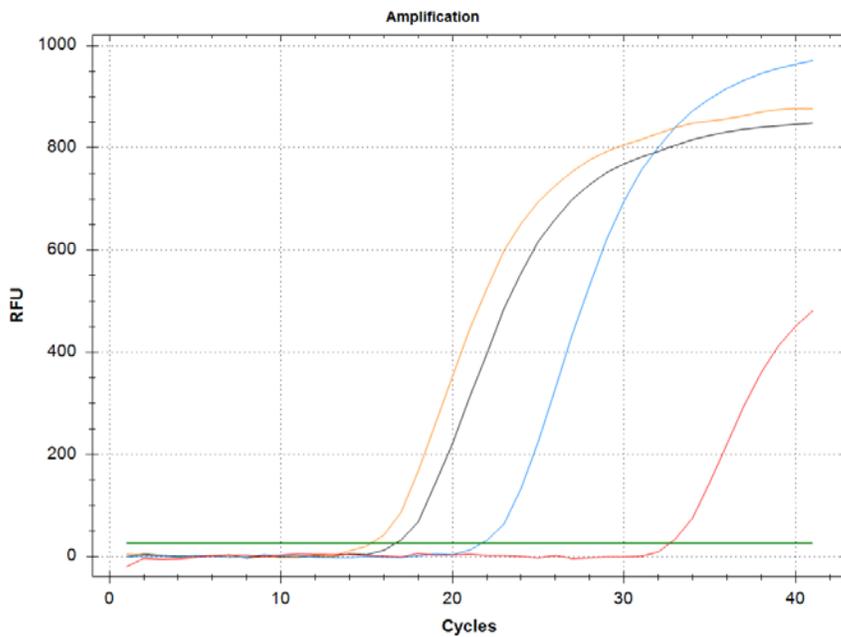


Abbildung 17: Relativ Fluoreszierende Einheiten in Abhängigkeit von der Anzahl der Zyklen. Rot: Negativ-Kontrolle ohne RNA. Schwarz: HEK293 pSLC2_9048 -S transfiziert (100 ng RNA). Gelb: HEK293 pSLC2_9048 +S transfiziert (100 ng RNA). Blau: HEK293 untransfiziert (100 ng RNA)

8 Diskussion

C. populi nutzt die Strategie der Sequestrierung von Salicin für die eigene chemische Abwehr. Dazu muss Salicin unter anderem durch die basolaterale Plasmamembran der sekretorischen Zellen transportiert werden. Aufgrund vorheriger Untersuchungen des Transportsystems *C. populi* (Daten nicht publiziert), konnte eine spezifische Expression von Proteinen der SLC2-Familie in den Wehrdrüsen nachgewiesen werden, worunter auch das untersuchte SLC2_9048-Gen fällt. Durch *Silencing* des SLC2_9048-Gens mittel RNAi produzierten die Larven kein Wehrsekret mehr, was den Hinweis darauf gibt, dass Salicin ein mögliches Substrat sein kann, weshalb dem SLC2_9048-Gen eine bedeutende Rolle als Glucosidtransporter zugeordnet wird.

Die Nukleotid-Sequenz des Gens codiert für 489 Aminosäuren, welche sich in 12 Transmembranhelices strukturieren, wobei N- und C-Terminus und eine relativ große zentrale Linker-Domäne sich auf der cytoplasmatischen Seite befinden. Die vorhergesagte Protein-Masse beträgt 54,36 kDa. Außerdem wurde kein Signalpeptid gefunden. Aminosäuren 39 bis 476 weisen das Motiv der Major facilitator superfamily (MFS) auf. Diese Eigenschaften entsprechen denen eines SLC2-Transporters [17, 25]. Eine weitere Eingrenzung in die Isoformen 1-4, 5, 7, 9 oder 11 ist möglich, da die größte extrazelluläre Schleife sich zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne befindet, welche ein potentieller Träger für N-Glykane ist [26]. Mögliche N-Glykosylierungen befinden sich - entsprechend der Konsensus-Sequenz NXS/T (X ist jede Aminosäure außer Prolin) [26] - jedoch intrazellulär an Asn35, Asn272 oder Asn170 (Ergebnis knapp unter dem Schwellenwert). Sowohl die Abfrage struktureller als auch sequenzieller Homologien ergaben nur geringe Übereinstimmungen, was ein Hinweis darauf gibt, dass der SLC2-like-Transporter verschiedene Substrate – denkbar sind Glykoside - transportieren kann. Durch eine bioinformatische Modellierung könnten mögliche Substrate hervorgesagt werden.

Um die vermutete Funktion zu bestätigen, sollte das codierende Protein zunächst heterolog in HEK- bzw. HBMEC-Zellen exprimiert und isoliert werden, um nachfolgend eine funktionelle Charakterisierung vornehmen zu können. Ein Versuch das *Xenopus*-Oozyten-Expressionssystem dafür zu nutzen, war nicht erfolgreich [23]. Als weitere Option hätte das Baculoviren-System in Insektenzellen Verwendung finden können, welches jedoch erst aufgebaut werden müsste. Da Säugerzellen als etabliertes Expressionssystem für Transmembranproteine dienen und im Gegensatz zum Baculoviren-System einen geringeren Zeitaufwand erfordert, fiel die Entscheidung zunächst darauf.

Die Amplifizierung des SLC2_9048-Gens aus dem piB/V5-His 1-5 Plasmid konnte über die Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase realisiert werden. Jedoch musste man aufgrund der geringen Ausbeute des QIAquick Gel Extraction Kits Banden mehrere PCR-Ansätze verwenden.

Das extrahierte SLC2_9048-Gen konnte in der richtigen Orientierung, aber nicht identischen Sequenzabfolge in den in pcDNA™3.1D/V5-His-TOPO®-Vektor kloniert werden. An vierter Position folgte ein Guanin anstatt eines Adenins, da für die Expression des SLC2_9048-Gens in Säugerzellen die Kozak-Sequenz benötigt wurde. In Folge dessen codierte das Triplet zu Glycin anstatt Serin. Andere Abweichungen codierten zur gleichen Aminosäure (s. 7.4). Entsprechend der bioinformatischen Auswertung würde Serin als zweite Aminosäure intrazellulär liegen und als potentielle Phosphorylierungsstelle dienen. Beide Aminosäuren gehören zu den kleinen Aminosäuren und können dadurch strukturell flexibel in der Konformationsbildung sein. Da Glycin jedoch über keine Hydroxy-Gruppe verfügt, ist eine mögliche Wasserstoffbrückenbindung zum Proteinrückgrat oder zur Lipid-Doppelschicht nicht möglich, was ggf. zu Fehlern im Faltungsprozess führen kann [27]. Der Effekt des Aminosäureaustausches sollte geprüft werden, indem die Sequenz ohne Aminosäurewechsel geändert und die Transfektion wiederholt wird.

Der SLC2-Transporter gehört zur Helix-Bündel Klasse und ihre Architektur beschreibt sich durch eng gepackte Transmembran-alpha-Helices. Die meisten Proteine dieser Klasse werden durch ihre naszierende Polypeptidkette co-translational zum Translocon der Membran Endoplasmatischen Retikulums geleitet. Hydrophobe Aminosäuren-Bereiche beschreiben die Transmembran-Domänen, wobei flankierende Aminosäuren wie Trp, Tyr, Ser, Asn, Lys und Pro essentiell für eine Protein-Lipid-Interaktion sind und somit die Erkennung der Transmembran-Helices durch das Translocon ermöglichen [28]. Die entstehende Polypeptidkette wird durch das Translocon erkannt und veranlasst die Freigabe in das Endoplasmatische Retikulum mit folgenden Faltungsprozessen entsprechend Aminosäure-Bereiche. Weitere posttranslationale Modifikationen folgen und das Protein wird final in der Plasmamembran lokalisiert. Da die entstehende Polypeptidkette bereits an zweiter Stelle eine andere Aminosäure besitzt, kann das Translocon an dieser Stelle die Freigabe in das Endoplasmatische Retikulum verhindern. Außerdem kann der Faltungsprozess fehlschlagen, was beides zu einer Degradation des Proteins führen würde. [29].

Mit der Transfektion des pSLC2_9048 –S in HBMEC bzw. HEK293-Zellen sollte das exprimierte Protein zunächst über differentielle Zentrifugation und Western Blot über V5-Epitop-Antikörper lokalisiert werden, um fortwährend eine Isolation des nativen Proteins in

der bestätigten Fraktion zu gewährleisten. Als Positivkontrolle wurde ebenfalls ein pcDNA3.1-Vektor mit dem YFP CAAX-Gen verwendet. Somit ist ein Vergleich der Transfektionseffizienz berechtigt. Entsprechend der exemplarischen Abbildung 13 wird davon ausgegangen, dass die Zellen mit einer Effizienz von ca. 52 % das Plasmid aufnehmen konnten. Nach erfolgter Transfektion ist zu erwarten, dass die Zellen am Boden adhären und proliferieren. Tritt dies nicht auf, hatte die Transfektion eine cytotoxische Wirkung auf die Zellen [30]. Solch eine Beobachtung konnte lediglich in der Positivkontrolle gemacht werden, welche abgerundet wirkten. Zellen, welche mit dem pSLC2_9048 -S transfiziert wurden, adhärten erwartungsgemäß und die Konfluenz nahm zu. Für die Methode der Elektroporation wurde keine Positivkontrolle verwendet. Proben der differentiellen Zentrifugation (s. 6.1.13) beider Transfektionsmethoden ließen v.a. in der Mikrosomen-Fraktion ein Signal bei 58 kDa erwarten, jedoch konnte in keiner der Fraktionen ein Nachweis erbracht werden (s. 7.5). Lediglich die Positivkontrolle zeigte eine Bande bei der zu erwartenden Molekülgröße von 60 kDa, was für eine richtige Durchführung spricht.

Als weitere Variante des Protein-Nachweises wurden primäre Antikörper gegen das native Protein (SLC2_9048 +S-Gen) verwendet. Beide Transfektionsmethoden wurden angewendet. Eine Bande bei 54 kDa war zu erwarten. Auch hier entstand keine Bande in dem zu erwartenden Bereich, stattdessen sind unspezifische Banden bei beiden Antikörpern zu erkennen, die in deren Struktur - v.a. die des VPE-Antikörpers - ähnlich der untransfizierten Zellen sind. Da sich die Banden in deutlich größeren Molekülgrößenbereichen befinden, kann davon ausgegangen werden, dass es zur einer Aggregation der Proteine kam. Darauf folgend wurde die Methode der SDS-PAGE und Western Blot optimiert. 2x SDS-Ladepuffer und TBS-T (0,1% Tween20) wurden verwendet, um die Proteine stärker zu denaturieren [31]. Außerdem wurde die Milchpulverkonzentration von 5% auf 2,5 % herabgesetzt, da das Milchpulver das zu detektierende Protein maskieren kann, v.a. wenn es nicht abundant ist [32]. Keiner dieser Optimierungen brachte eine erwartete Verbesserung des Blots.

Jaspreet Kaur und Anhand K. Bachhawat (2008) [33] inkubierten die Membran nach dem Transfer der Proteine, für 15 min bei 55 °C in SDS/ β -Mercaptoethanol-Lösung (100 mM β -Mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.7) und es wurde ein deutlich stärkeres Signal beobachtet bzw. wurden nun erwartete Banden sichtbar. Mögliche Gründe für wenig bis gar kein Signal sahen sie darin, dass sich das Protein während/nach dem Transfer auf die Membran partiell renaturiert hat, da die SDS-Konzentration des Transfer-Puffers sank. Außerdem kann das Protein an hydrophoben Stellen mit anderen Proteinen interagieren. Dadurch könnte das Epitop maskiert werden. Dementsprechend sind die

Epitope für den Epitop-Antikörper (V5-,EKE- , VPE-Antikörper) nicht nur sequenz-, sondern auch konformationsabhängig [34]. Somit muss als mögliche Optimierung des Western Blots versucht werden, die Renaturierung des Proteins v.a. während der Inkubation mit dem Antikörper zu verhindern.

Des Weiteren aggregieren Membran-Proteine verstärkt, wenn sie gekocht werden, gleichzeitig ist es durch ihre hydrophobe Natur schwer, sie trotz eines starken Detergens wie SDS zu entfalten. Eine nächste Optimierung wäre deshalb, die Inkubationstemperatur der Proteinfraktion mit dem SDS-Ladepuffer in 10°C Intervallen bis zu einem Minimum von 37°C herabzusetzen.

Die Konzentration aktiver Transporter ist zu gering, um sie nachzuweisen oder es finden Fehler in der Translation statt. Da auch kein Nachweis in den nativen Proteinen gebracht werden konnte, kann man davon ausgehen, dass der Fehlschlag der Translation nicht an dem Protein-Tag liegt.

Entsprechend der Proteinkonzentrationen der Bradford-Assays (s. 7.5 und 7.6) konnte lediglich mit dem Zellysate eine optimale Beladung der SDS-PAGE mit 20 µg Proteinen gewährleistet werden. Für weitere differentielle Zentrifugationen muss somit auf eine höhere Proteinkonzentration in den verschiedenen Fraktionen Wert gelegt werden, indem die Volumina verringert bzw. mehr Zellen lysiert werden.

Um die Transkription des SLC2_9048 +/-S-Gens in den HEK293-Zellen zu bestätigen, wurde eine qRT-PCR durchgeführt. RNA transfizierter Zellen erwiesen einen deutlich niedrigeren C_q-Wert (HEK293 pSLC2_9048 -S 16,68, +S 15,54) als die der untransfizierten (21,70). Es wurde also deutlich früher ein Produkt gebildet, da die Primer mit höherer Spezifität binden konnten. Die Schmelzkurve der untransfizierten Zellen ist um 5 °C bzw. 4,5 °C höher als die der transfizierten Zellen, was darauf hindeutet, dass eine längere Sequenz unspezifisch amplifiziert wurde. Eine Auftrennung der PCR-Produkte in einer Agarose-Gelelektrophorese würde Aufschluss darüber geben. Ein Blast der Primersequenzen mit dem menschlichen Transkriptom zeigte, dass keine der Primer an der gleichen Sequenz unspezifisch bindet. Außerdem konnte nie eine 100%ige Sequenzübereinstimmung gefunden werden. Die Transkription des Gens konnte unter Vorbehalt nachgewiesen werden, dementsprechend kann das Problem in der Translation beider Genkonstrukte liegen. Endgültige Aussagen können jedoch erst getroffen werden, wenn der Versuch mit einem vorliegenden Housekeeping-Gen als Referenz nochmals wiederholt wird. Werte der Negativ-Kontrolle ohne RNA bewiesen eine Durchführung ohne Kontaminationen.

9 Ausblick

Die heterologe Expression von Membran-Proteinen stellt immer wieder eine große Herausforderung dar, v.a. mit Zunahme der Anzahl der Transmembrandomänen. Die Auswahl des Expressionssystems muss dem des ursprünglichen Organismus nahekommen, um eine korrekte Faltung und Modifikation des Proteins zu gewährleisten.

Da das derzeitige Problem an der Detektion des Proteins oder Translation liegt, müssen hier weitere Optimierungen vorgenommen werden.

Wird der Transporter nachgewiesen, kann er funktionell untersucht werden, um die mögliche Bedeutung im Transportsystem *C. populi* zu bestätigen.

Es könnte für eine funktionelle Charakterisierung des Proteins ein vorläufiges Protokoll unter Verwendung der Methoden nach S. Baldwin (2000) [35] und L. Eriksson et al. (1978) [36] und M. Csala, et al. (2007) [37] erstellt werden.

Die isolierte Mikrosomen-Fraktion der differentiellen Zentrifugation (s. 6.1.13) wird durch eine 25-gauge Nadel gebracht, um Bläschenbildungen zu verhindern. 100-200 µg werden auf den Boden eines 5 ml Zentrifugenröhrchens pipettiert und 20 µl Transport-Puffer (10 mM Hepes/Tris pH 7.5, 150 mM NaCl mit 1, 10 und 100 µM Salicin) auf die Innenseite des Röhrchens gebracht. Die Verwendung modifizierter Substrate kann außerdem Aufschluss über die Substratspezifität geben. Folgend wird der Transport durch mehrfaches Vortexen mit kurzen Pausen initiiert. Um eine weitere Translokation des Salicins zu verhindern, wird nach optimierter Aufnahmezeit 1 ml eiskalte Stop-Lösung (100 mM Mannitol, 200 mM NaCl, 1mM Hepes/Tris pH 7.5, 1mM Phloridzin oder Cytochalasin B) hinzugegeben und 1 h bei 100 000 x g 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird in 1 ml Stop-Lösung resuspendiert und nochmals unter den gleichen Parametern zentrifugiert. Das gewaschene Pellet wird mit 0,025 -0,05 %igem nichtionischem Detergens (Tween20, TritonX-100 oder Deoxycholate) bedeckt und 30 min bei 0 °C inkubiert. Schließlich werden 1 ml 50 %iges Acetonitril hinzugegeben, um eine Messung über LC-MS zu gewährleisten. Es wird stets eine Kontrolle ohne Mikrosomen, mit Mikrosomen aber ohne Substrat und Mikrosomen untransfizierter Zellen gemacht. Um die Nachweisgrenze zu verbessern, kann das Substrat nach dem Assay derivatisiert werden und in GC-MS untersucht werden.

10 Zusammenfassung

C. populi besetzt eine ökologische Nische im Ökosystem, indem er die Fähigkeit besitzt, das von der Pflanze synthetisierte Sekundärmetabolit Salicin, welches zur chemischen Verteidigung der Pflanze genutzt wird, ohne toxische Wirkung aufzunehmen und einem Transportersystem folgend in den Wehrdrüsen zu Salicylaldehyd umzuwandeln. Das Transportersystem besteht aus einer Reihe spezifischer und unspezifischer Transporter, wobei sich der putative SLC2-Transporter wohlmöglich in der basolateralen Membran der sekretierenden Zellen befindet und das Glykosid Salicin einem Gradienten folgend in die Zelle transportiert. Das vorliegende Gen sollte genutzt werden, um über eine heterologe Expression in Säugerzellen den Grundstein für eine funktionelle Charakterisierung des Proteins zu legen. Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen die herausfordernde Komplexität der Aufgabenstellung dar. Das Gen konnte erwartungsgemäß über eine PCR amplifiziert werden und über eine TOPO-Klonierung in der richtigen Orientierung mit einer signifikanten Änderung des zweiten Basen-Triplett, welches für Glycin anstatt Serin codiert in den pcDNATM3.1D/V5-His-TOPO[®]-Vektor kloniert werden. Die Transformation in *E. coli* brachte ausreichend Plasmid-DNA für eine Transfektion in HBMEK/HEK293-Zellen. Der zur Kontrolle der Expression durchgeführte Western Blot zeigte bei Protein mit Tag keine Bande und für primäre Antikörper unspezifische Bindungen. Durch mitgeführte Kontrollen konnte die richtige Durchführung des Blots bestätigt werden. Derzeit existieren noch keine Untersuchungen zu SLC2-Transportern in Blattkäfern. Dies erschwerte den Abgleich mit bestehender Literatur zur Problemlösung. Als initiiender Schritt zur genaueren Kontrolle des Fehlschlages der Detektion wurde eine qRT-PCR durchgeführt, welche eine Transkription des Gens unter Vorbehalt bestätigen konnte. Mit dieser Arbeit konnte keine heterologe Expression des putativen SLC2-Transporters in Säugerzellen nachgewiesen werden. Vermutungen liegen in Fehlern in der Translation oder in der Methode des Western Blots.

11 Literaturverzeichnis

1. Tolzin-Banasch, K., *Wehrchemie in Blattkäfern Aufklärung eines neuen Acylierungskomplexes in Insekten am Beispiel von Chrysomela lapponica ; Dissertation.* 2009.
2. Dettner, K., *Lehrbuch der Entomologie Teil 1.* 2. Aufl. ed, ed. W. Peters. 2010, Heidelberg u.a.: Spektrum Akad. Verl.
3. Remane, A., *Systematische Zoologie.* 5., bearb. und erw. Aufl ed, ed. V. Storch and U. Welsch. 1997, Stuttgart u.a.: G. Fischer.
4. Pasteels, J.M., S. Duffey, and M. Rowell-Rahier, *Toxins in chrysomelid beetles Possible evolutionary sequence from de novo synthesis to derivation from food-plant chemicals.* Journal of Chemical Ecology, 1990. **16**(1): p. 211-222.
5. Noirot, C., *Fine Structure of Insect Epidermal Glands.* Annual Review of Entomology, 1974. **19**(1): p. 61-80.
6. Burse, A., et al., *Always being well prepared for defense: The production of deterrents by juvenile Chrysomelina beetles (Chrysomelidae).* Phytochemistry, 2009. **70**(15): p. 1899-1909.
7. Termonia, A., et al., *Feeding specialization and host-derived chemical defense in Chrysomelina leaf beetles did not lead to an evolutionary dead end.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(7): p. 3909-3914.
8. Kuhn, J., et al., *Selective transport systems mediate sequestration of plant glucosides in leaf beetles: A molecular basis for adaptation and evolution.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(38): p. 13808-13813.
9. Jacobs, W., *Biologie und Ökologie der Insekten ein Taschenlexikon.* 3. Aufl. / überarb. von Klaus Honomichl ed, ed. M. Renner and K. Honomichl. 1998, Stuttgart u.a.: G. Fischer.
10. Brauns, A., *Taschenbuch der Waldinsekten Grundriß einer terrestrischen Bestandes- und Standort-Entomologie.* 4., neubearb. Aufl. ed. Gustav-Fischer-Taschenbücher. 1991, Stuttgart u.a.: G. Fischer.
11. http://naturspaziergang.De/kaefer/chrysomelidae/chrysomela_populi.htm. 09.07.2018.
12. <https://de.naturalproducts.wiki/glycoside>. 09.07.2018.
13. Shitan, N., *Secondary metabolites in plants: transport and self-tolerance mechanisms.* Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2016. **80**(7): p. 1283-1293.
14. Lüttge, U., *Botanik die umfassende Biologie der Pflanzen,* ed. M. Kluge and G. Thiel. 2010, Weinheim u.a.: Wiley-VCH.
15. Deng, D. and N. Yan, *GLUT, SGLT, and SWEET: Structural and mechanistic investigations of the glucose transporters.* Protein Science : A Publication of the Protein Society, 2016. **25**(3): p. 546-558.

16. Stock, M., et al., *Putative Sugar Transporters of the Mustard Leaf Beetle *Phaedon cochleariae*: Their Phylogeny and Role for Nutrient Supply in Larval Defensive Glands*. PLoS ONE, 2013. **8**(12): p. e84461.
17. Mueckler, M. and B. Thorens, *The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters*. Molecular Aspects of Medicine, 2013. **34**(2): p. 121-138.
18. Uldry, M. and B. Thorens, *The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters*. Pflügers Archiv, 2004. **447**(5): p. 480-489.
19. Bernaudat, F., et al., *Heterologous Expression of Membrane Proteins: Choosing the Appropriate Host*. PLoS ONE, 2011. **6**(12): p. e29191.
20. Opekarová, M. and W. Tanner, *Specific lipid requirements of membrane proteins—a putative bottleneck in heterologous expression*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2003. **1610**(1): p. 11-22.
21. Midgett, C.R. and D.R. Madden, *Breaking the bottleneck: Eukaryotic membrane protein expression for high-resolution structural studies*. Journal of Structural Biology, 2007. **160**(3): p. 265-274.
22. Markovich, D., A. Werner, and H. Murer, *Expression Cloning with *Xenopus* Oocytes*, in *Techniques in Molecular Medicine*, F. Hildebrandt and P. Igarashi, Editors. 1999, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 310-318.
23. Schuck, N., *Funktionelle Charakterisierung von Glukosidtransportern der "Solute carrier"-Familien 2 und 50 aus dem Pappelblattkäfer, *Chrysomela populi**. Bachelorarbeit, Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, 2017.
24. Ooi, A., et al., *A Guide to Transient Expression of Membrane Proteins in HEK-293 Cells for Functional Characterization*. Frontiers in Physiology, 2016. **7**: p. 300.
25. Mueckler, M., et al., *Sequence and structure of a human glucose transporter*. Science, 1985. **229**(4717): p. 941-5.
26. Pedersen, N.B., M.C. Carlsson, and S.F. Pedersen, *Glycosylation of solute carriers: mechanisms and functional consequences*. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology, 2016. **468**(2): p. 159-176.
27. Barnes, *Bioinformatics for Geneticists*. Hierarchical Exotoxicology Mini Series. 2003: Wiley-Blackwell.
28. Hessa, T., et al., *Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon*. Nature, 2005. **433**: p. 377.
29. Grisshammer, R., *Understanding recombinant expression of membrane proteins*. Current Opinion in Biotechnology, 2006. **17**(4): p. 337-340.
30. Thomas, P. and T.G. Smart, *HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins*. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2005. **51**(3): p. 187-200.
31. <https://ptglab.com/news/blog/7-tips-for-optimizing-your-western-blotting-experiments/>. 19.08.2018.
32. <https://advansta.com/wikis/high-background-in-western-blotting-causes-and-solutions-2/>, 19.08.2018.

33. Kaur, J. and A.K. Bachhawat, *A modified Western blot protocol for enhanced sensitivity in the detection of a membrane protein*. Analytical Biochemistry, 2009. **384**(2): p. 348-349.
34. Zhou, Y.-H., et al., *Positive reactions on Western blots do not necessarily indicate the epitopes on antigens are continuous*. Immunology and Cell Biology, 2007. **85**(1): p. 73-78.
35. Baldwin, S.A., *Membrane transport a practical approach*. The practical approach series. 2000, Oxford u.a.: Oxford Univ. Press.
36. Eriksson, L.C., J.W. DePierre, and G. Dallner, *Preparation and properties of microsomal fractions*. Pharmacology & Therapeutics. Part A: Chemotherapy, Toxicology and Metabolic Inhibitors, 1978. **2**(2): p. 281-317.
37. Csala, M., et al., *Evidence for multiple glucuronide transporters in rat liver microsomes*. Biochemical Pharmacology, 2004. **68**(7): p. 1353-1362.

12 Anhang

12.1 cDNA Sequenz des SLC2_9048-Gens

ATGAGCGACCAGTACGAAGCAGTGGTGAATGAAAAAGAAGATGCCGAGGACT
 ACCATCTGAGACAGTGGACTGTAGACGTGAAGGATGGGGCACCGAAAAGTAAC
 GTCACCTTTCATGTACATCTCGGCGGTCACAGCCAATCTGCTGCTCTTCTCCTGCA
 CCAGCTGCCTGGGGTGGTCCAGCCCCGTCATCCCTTCCTTGGAGAGCCACGACC
 CCCTCGTCAACCCCTGGGCCGACCTGTCACCCCTTGGAGACGTCCTGGATCG
 CCTCGCTGCTTGTCTCGGAGCGAGCTTCAGCCCCCTCGTAACCGCCAAGGTAG
 GCGATCTGTTTCGGCAGAAAGAGGGCCTTGATCGTCATCTCCCTCCCCACATAC
 TCTCCCTCCTGGTCCTGGCCTTCGCGACCGACGTGTGGATCTACTACGTCAGCA
 GGTTCGTGACCGGCTTGGTCATGGGCAACGTGATGGGCCTGCTGCCCGTTTATC
 TGTCGGAGATCTCCGAGATGCGCAACAGGAGCACCACGGGGGCGCTGATATCC
 ATCTCGCTCACCTCGGGCCTCCTGTACTCCTTCGTCATAGGCCCCCTGGTGTCG
 GTGAGGGTCCCTCACCTTGTGCTGCGCAGCCCCGGCAGTCCTCTTCTCGTCGTG
 TTCGGCCTGTTTCATGCCCGAGTCGCCGGTGCATTTGGTGGCCCAGGGGGACGTG
 AGGGCAGCCTCGAGGGTGCTGAGGAAGCTGAGGCGGCAGACCGACCAGCAGG
 TGCAGCAGGAGCTGAGGCTCATCATGCGGACCATCGAGAAGGAGCGGCAGGA
 GAGCCAAGGCAACTGGACGGAAGTGTCCGAGACGTGGGCCTGAGGAGATCCC
 TGGTCATCTCCCTCGGGCTGTTTCGTTTTTCATGCAGTTGTCCGGCATCAACCCTCT
 AACAGCCTTCCTGGAAAAGATAATCCTGGCTCAGGGGATCAGCATCTCGAGAT
 ACGTGTCCACCAATATGGTGATGGTTACGCAGATCGTGAGCTCGTTTCTGACCA
 TAACCATAGTGGAGAGGTTACCAAGCGGGTGTGCTGCTCGTGTCTTCTCTGG
 GCTCTTCCGCGTCTCTCATTGCGCTGTCCATATACTTGTACCTCAAGTTCGACAC

GACCTACAACGTGGATTTCTTTTTCTGGTTTCCCATCGCGTCCATCATATCGTTC
TTCCTCCTGATCAACATTGGCATGATGATTTTGCCCTGGGGTTTGACCAGCGAG
ATGTTCCCGACCGCGTTCAGATCCACGGCTGTCTCGCTGGCTTCGTTTACTTGTT
TTTTCAATTCATTTGTTATGACGCTCGGATATCCGTTGGTGCAGCAAGCCTTAGG
GTTGACCTATTGTTTCTTGTTTTCTGCTGGTAGTTTGCTGCTATGCGCCCTTTTAA
TATACTGCTTGGTTCCGGAAACCAAGGGAAGAACGTCTGCTCAAATTCAAGAG
ATTCTGAGAAAATAA

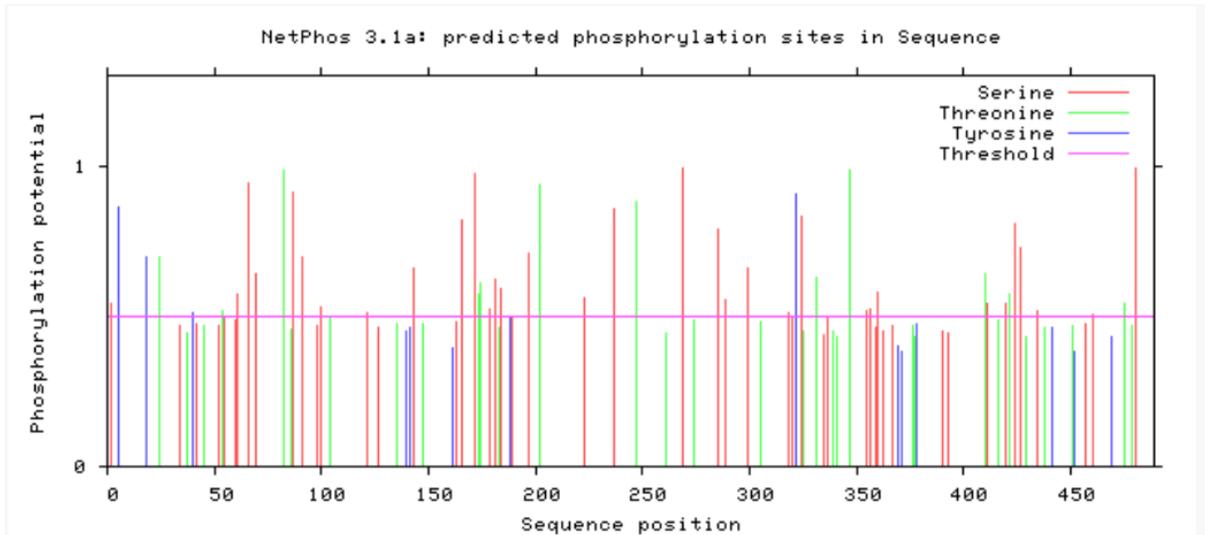
Rot markierte Basen entsprechen den Stellen der Abweichungen zum SLC2_9048-Insert nach der Sequenzierung. Adenin (4. Stelle) änderte sich zu Guanin und Cytosin (396. und 498. Stelle) mutierte zu Thymin.

12.2 Codierende Aminosäuren des SLC2_9048-Gen

MSDQYEAVVNEKEDAEDYHLRQWTVDVKDGAPKSNVTFMYISAVTANLLLFSC
SCLGWSSPVIPSLESHDPLVNPLGRPVTPLETSWIASLLVLGASFSPLVTAKVGDLE
RKRALIVISLPHILSLLVLA FATDVWIYYVSRFVTGLVMGNVMGLLPVYLSEISEMR
NRSTTGALISISLTS GILYSFVIGPLVSVRVLTLC CAAPAVLFLVVFGLFMPESPVHLV
AQGDVRAASRVLRLRRQTDQQVQQELRLIMRTIEKERQESQGNWTELF RDVGLR
RSLVISLGLFVFMQLSGINPLTAFLEKIILA QGISISRYVSTNMVMVTQIVSSFLTITIV
ERFTKRVLVVSSLGSSASLI ALSIYLKFDTTYNVDFFFWFPIASIISFLLINIGMM
ILPWGLTSEMFP TAFRSTAVSLASFTCF FIFVMTLGYPLVQQALGLTYCFLFSAGSL
LLCALFIYCLVPETKGR TSAQIQEILRK

Die rot markierte Aminosäure änderte sich im heterolog zu exprimierenden SLC_9048-Gen in der Translation zu Glycin, aufgrund der Kozak-Sequenz.

12.3 Bioinformatisch nachgewiesene Phosphorylierungsstellen des vermeintlichen SLC2-Transporters



	MSDQYEAVVNEKEDAEDYHLRQWTVDVKDGAPKSNVTFMYISAVTANLLL	#	50
	FSCTSCLGWSSPVIPSLESHDPLVNPLGRPVTPLETSWIASLLVLGASFS	#	100
	PLVTAKVGDLFGRKRALIVISLPHILSLLVLA FATDVWIYYVSRFVTGLV	#	150
	MGNVMGLLPVYLSEISEMRNRSTTGALISISLTSGILYSFVIGPLVSVRV	#	200
	LTLCCAAPAVLFLVVFGLFMPESPVHLVAQGDVRAASRVLRLKLRQTDQQ	#	250
	VQQLRLIMRTIEKERQESQGNWTELF RDVGLRRSLVISLGLFVFMQLSG	#	300
	INPLTAFLEKIILAQGISISRYSVTNMVMVTQIVSSFLTITIVERFTKRV	#	350
	LLLVSSLGSSASLI ALSIYLYLKFDTTYNVDFFFWFPIASII SFFLLINI	#	400
	GMMILPWGLTSEMFP TAFRSTAVSLASF TCF FIFVMTLGYPLVQQALGL	#	450
	TYCF LFSAGSLLL CALFIYCLVPETKGR TSAIQEILRK	#	500
%1	.S..Y.....Y.....T.....Y.....	#	50
%1	...T.....S...S..S.....T...S...S.....S	#	100
%1S.....S.....S.....S.....	#	150
%1S.....STT...S.S..S.....S...	#	200
%1	.T.....S.....S.....S.....T...	#	250
%1S.....S.....S.....S.....S...	#	300
%1S...Y.S.....T.....T...	#	350
%1	...SS...S.....S.....S.....S.....	#	400
%1TS.....ST..S..S.....S.....	#	450
%1S.....T...S.....		

12.4 Vektorkarte des pcDNATM3.1D/V5-His-TOPO[®]+SLC2_9048

(pSLC2_9048)

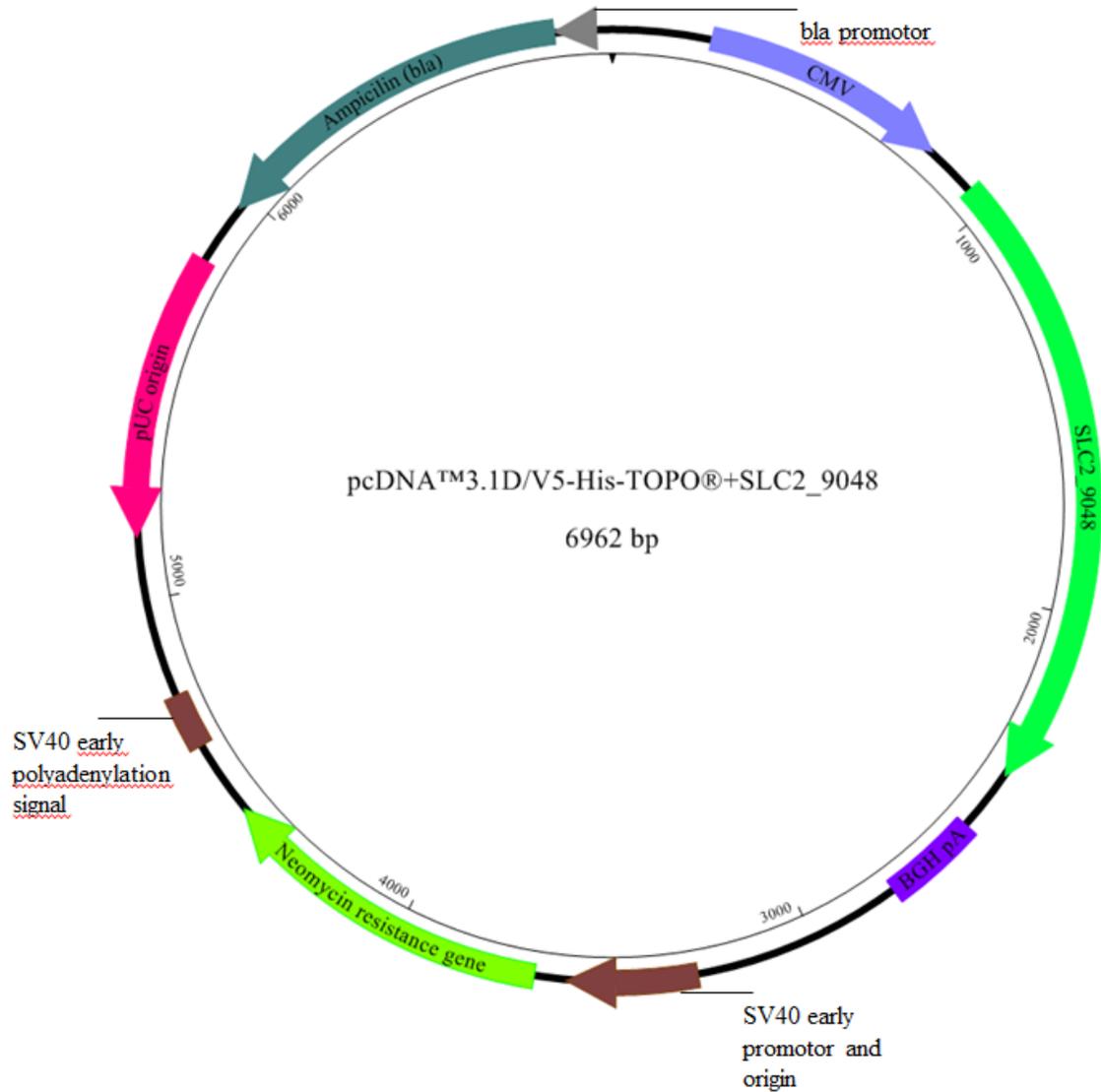


Abbildung 18: Vektorkarte des pcDNATM3.1D/V5-His-TOPO[®]+SLC2_9048 (pSLC2_9048). Erstellt mit SeqBuilder Pro

12.5 Agarosegele

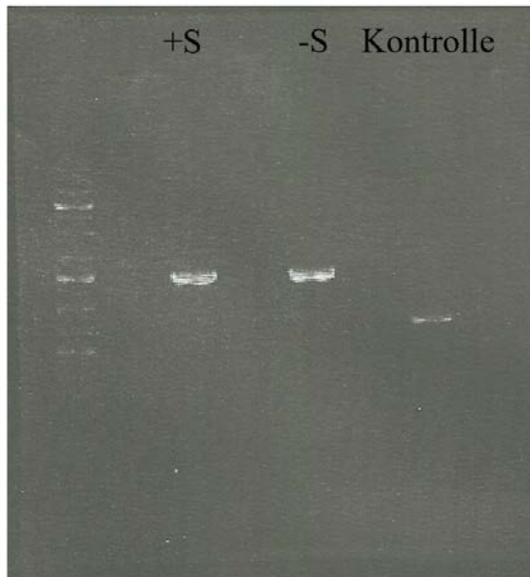


Abbildung 19: 1%iges Agarosegel zur Bestätigung der Gelextraktion. Als Größen-Standard diente GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder.

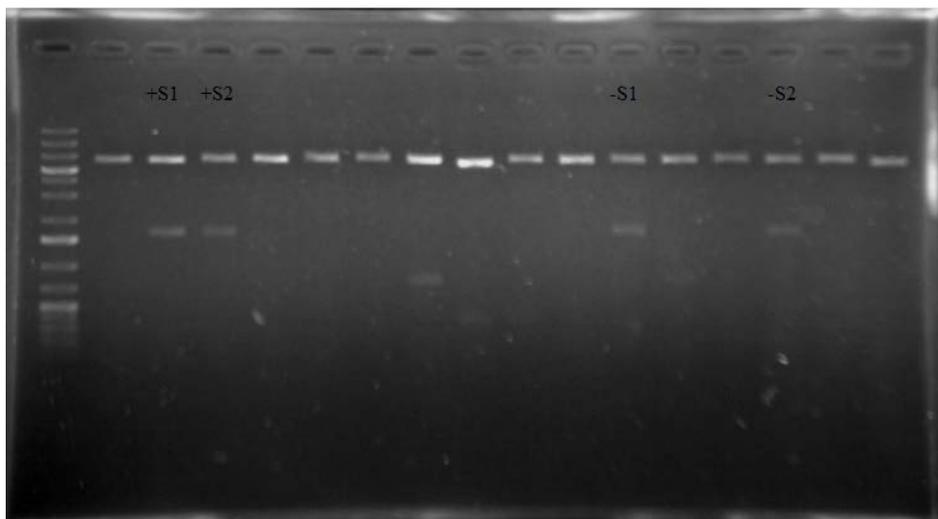


Abbildung 20: 1%iges Agoresgel zum doppelten Restriktionsendonukleasenverdau der Plasmide pSLC2_9048 +S1 bzw. 2 und -S1 bzw. 2 mit *Bam*HI und *Xba*I. Als Größen-Standard diente GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder.

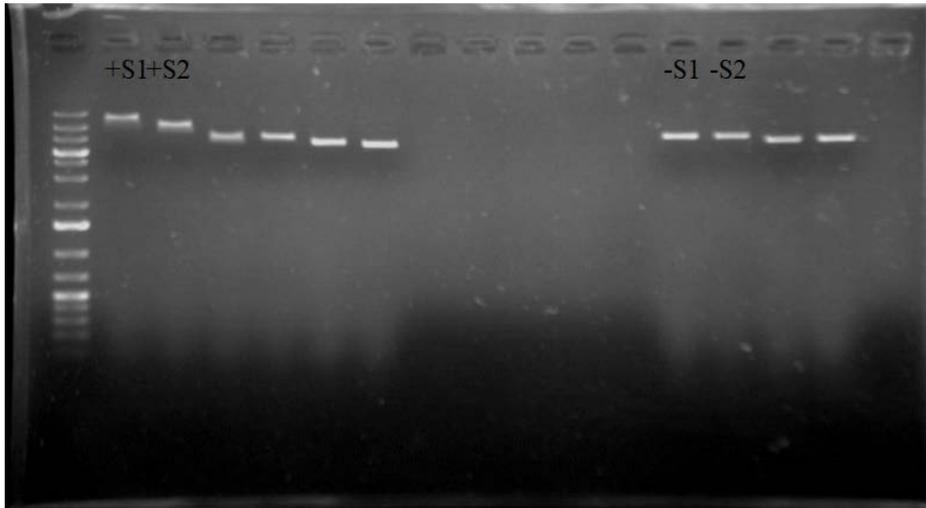


Abbildung 21: 1%iges Agoresgel zum Restriktionsendonukleasenverdau der Plasmide pSLC2_9048 +S1 bzw. 2 und -S1 bzw. 2 mit *Bam*HI. Als Größen-Standard diente GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder.

12.6 Western Blots

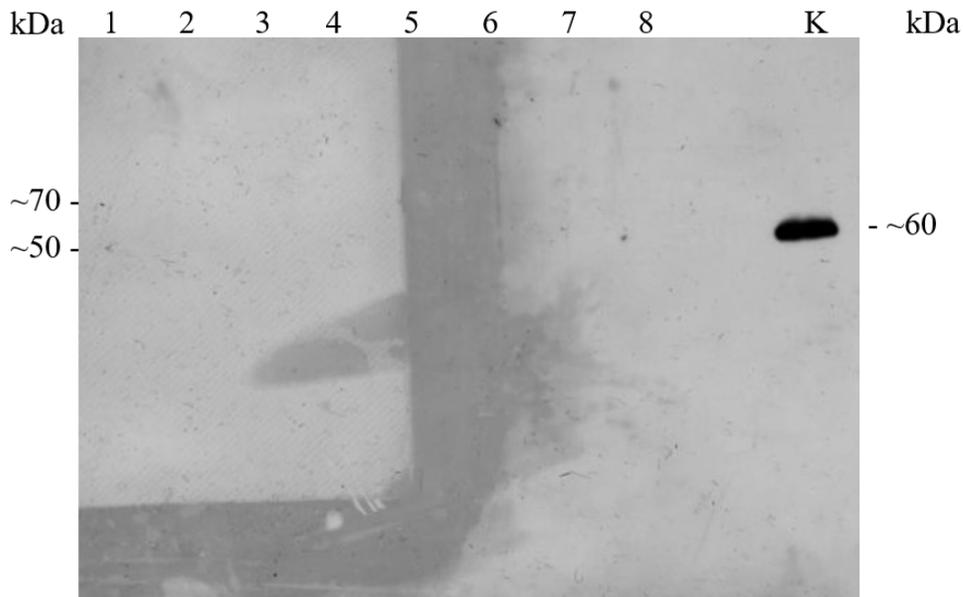


Abbildung 22: Westernn Blot der entnommenen Proben während der differentieller Zentrifugation der HBMEC-Zellen mit pSLC2_9048 -S. 1 Nach Zugabe des hypotonischen Puffers und Homogenisierung, Zelllysate. 2 Überstand nach erster Homogenisierung. 3 Zweite Homogenisierung. 4 Überstand nach zweiter Homogenisierung. 5 Überstände aus 2 und 4 gepoolt. 6 Überstand nach erster Ultrazentrifugation (Cytosol). 7 Überstand nach zweiter Ultrazentrifugation. 8 resuspendiertes Mikrosomen-Pellet. K, Kontrolle. Als Größen-Standard diente Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder. kDa, kiloDalton.

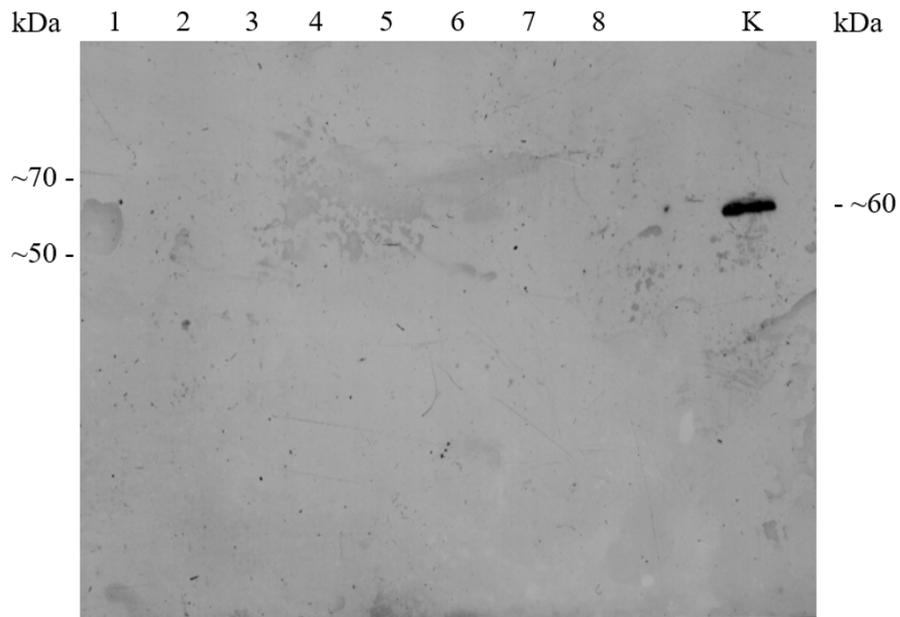


Abbildung 23: Western Blot der entnommenen Proben während der differentieller Zentrifugation der HEK293-Zellen mit pSLC2_9048 -S. 1 Nach Zugabe des hypotonischen Puffers und Homogenisierung; Zellysat, 2 Überstand nach erster Homogenisierung, 3 Zweite Homogenisierung, 4 Überstand nach zweiter Homogenisierung, 5 Überstände aus 2 und 4 gepoolt, 6 Überstand aus 5, 7 Überstand nach erster Ultrazentrifugation (Cytosol), 8 resuspendiertes Mikrosomen-Pellet.M, K, Kontrolle. Als Größen-Standard diente Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder. kDa, kiloDalton.

13 Danksagung

Hiermit möchte ich in erster Linie Herrn Prof. Dr. Wilhelm Boland danken, welcher mir die Möglichkeit gab, in seiner Abteilung der „Bioorganischen Chemie“ am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie die Bachelorarbeit anzufertigen.

Des Weiteren ist Frau Prof. Dr. Antje Burse zu danken, in Ihrer Arbeitsgruppe der „chemischen Verteidigung der Blattkäfer“ das vorliegende Thema zu bearbeiten. Sie gab mir konstruktive Kritik an meinem Vorhaben, welche maßgeblich den Progress beeinflusste. Ihre und Lydia Schmidts Korrekturlesung ist außerdem große Bedeutung zu geben.

Besonderen Dank schulde ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung „Bioorganische Chemie“, welche mir bei Fragen immer weiterhalfen und mir ein tolles Arbeitsumfeld gaben.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Kaltoven der Abteilung „Evolutionäre Neuroethologie“ für die Bereitstellung der HEK293-Kulturen, Frau Roßner des Lehrstuhls für „Biophysik“ des CMBs für die Elektroporation und Frau Dr. Jana Pieper für Antworten bei Unklarheiten zur Transfektion bedanken.

Allen weiteren Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts für chemische Ökologie ist, für die angenehme Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft zu danken.

14 Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die inhaltlich oder wörtlich aus Veröffentlichungen stammen, sind kenntlich gemacht. Diese Arbeit lag in der gleichen oder ähnlichen Weise noch keiner Prüfungsbehörde vor und wurde bisher noch nicht veröffentlicht.

Hiermit erkläre ich mich mit der Einsichtnahme in meine Abschlussarbeit im Archiv der Bibliothek der EAH Jena einverstanden / nicht einverstanden.

Ort, Datum

Unterschrift