

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Bakterielle Membranvesikel (BMV's)</b> .....	<b>1</b>
1.1. Biogenese und Einteilung von BMV's .....	1
1.2. Membranvesikel gramnegativer Bakterien .....	4
1.3. Hämolsin F .....	7
1.4. Lipoprotein Nlpl.....	8
1.5. BMV's als Vakzinierungsstrategie .....	9
1.6. Immunmodulation durch BMV's .....	10
<b>2. <i>E. coli</i> BL21(DE3)</b> .....	<b>12</b>
2.1. ClearColi® BL21(DE3) Stamm sowie die Immunantwort auf BMV's dieses Stamms .....	12
2.2. DNA-Manipulation in <i>E. coli</i> mittels <i>Red</i> -Rekombinationssystem .....	14
<b>3. Coronaviren</b> .....	<b>15</b>
3.1. Etymologie, Aufbau und Verbreitung .....	15
3.2. SARS-CoV-2 .....	16
<b>II. ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b> .....	<b>19</b>
<b>III MATERIAL</b> .....	<b>20</b>
<b>1. Bakterienstämme, Konstrukte und Plasmide</b> .....	<b>20</b>
<b>2. Zelllinien</b> .....	<b>21</b>
<b>3. Antikörper</b> .....	<b>22</b>
<b>4. Primer</b> .....	<b>22</b>
<b>5. Gele und Puffer</b> .....	<b>23</b>
<b>6. Kits</b> .....	<b>27</b>
<b>7. Molekulargewichtsmarker</b> .....	<b>28</b>
<b>8. Antibiotika</b> .....	<b>28</b>
<b>9. Medien für die Anzucht von Bakterien</b> .....	<b>29</b>
<b>10. Chemikalien</b> .....	<b>29</b>
<b>11. Software</b> .....	<b>31</b>

<b>12. Geräte .....</b>	<b>32</b>
<b>13. Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>34</b>
<b>IV METHODEN .....</b>	<b>35</b>
<b>1. Proteinanalytische Methoden .....</b>	<b>35</b>
1.1. Isolierung von bakteriellen Membranvesikeln (BMV's).....	35
1.2. Bestimmung der Proteinkonzentration in BMV's nach der Bradfordmethode ..	36
1.3. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test.....	36
1.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	37
1.5. Western Blot-Analyse von BMV's.....	37
<b>2. Arbeiten mit Bakterien.....</b>	<b>38</b>
2.1. Herstellung von Glycerinkulturen .....	38
2.2. Messung des bakteriellen Wachstums.....	38
2.3. Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KbE) .....	38
2.4. Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> DH10 $\beta$ , BL21(DE3) und ClearColi <sup>®</sup> Zellen.....	39
2.5. Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i> DH10 $\beta$ , BL21(DE3) und ClearColi <sup>®</sup> Zellen mit Arabinose .....	39
2.6. Zellyse bakterieller Überstände unter IPTG Induktion .....	40
<b>3. Arbeiten mit DNA.....</b>	<b>40</b>
3.1. Isolierung von Plasmid-DNA.....	40
3.2. Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA .....	41
3.3. Aufreinigung von DNA-Fragmenten .....	41
3.4. Reinigung von PCR-Produkten mittels <i>DpnI</i> Restriktionsverdauung .....	41
3.5. Chemische Transformation von pKD46 in <i>E. coli</i> Zellen .....	42
3.6. Elektroporation.....	42
3.7. Polymerase-Ketten-Reaktion.....	42
3.8. Agarose-Gelelektrophorese.....	44
3.9. Blau-Weiß-Selektion von Bakterien.....	44
3.10. Genomsequenzierung .....	45
<b>4. Zellkulturarbeiten .....</b>	<b>46</b>

4.1. Kultivierung von Zelllinien .....	46
4.2. Manuelle Zellzählung in der Zählkammer .....	46
4.3. Induktion von HEK-293 Zellen durch BMV's .....	46
4.4. Induktion von HEK-Blue® Interleukin-1 $\beta$ Reporter Zellen mit Überständen von mit BMV's induzierten HEK-293 Zellen .....	47
<b>V ERGEBNISSE .....</b>	<b>48</b>
<b>1. Klonierungsarbeiten zur Steigerung der Vesikulation bakterieller Membranvesikel von Bakterien .....</b>	<b>48</b>
1.1. Klonierungsstrategie zur Integration von <i>hlyF</i> und Deletion von <i>nlpI</i> .....	48
1.2. Integration des RED-Rekombinationssystems in die Bakterienzellen als Vorbereitung der Klonierungsarbeiten zur Steigerung der Vesikelproduktion .....	49
1.3. Deletion des Gens <i>nlpI</i> in den <i>E. coli</i> Stämmen DH10 $\beta$ , BL21(DE3) und ClearColi® .....	50
1.4. Integration des Gens <i>hlyF</i> in die <i>E. coli</i> Stämme DH10 $\beta$ , BL21(DE3) und ClearColi® .....	54
1.5. Herstellung der Kombinationsmutante <i>hlyF</i> , $\Delta$ <i>nlpI</i> .....	58
<b>2. Charakterisierung der hergestellten Mutanten .....</b>	<b>61</b>
2.1. Wachstumsverhalten der Ausgangsstämme und der hergestellten Mutanten .....	61
2.2. Untersuchung der Vesikulationsmengen der hergestellten Mutanten von ClearColi® .....	65
<b>3. Einfluss von Glycin auf das bakterielle Wachstum und die Vesikelproduktion .....</b>	<b>66</b>
<b>4. Produktion der Spikeprotein-Untereinheit S1 von SARS-CoV-2 in Bakterienzellen .....</b>	<b>70</b>
4.1. Einfluss des transformierten SARS-CoV-2 S1 sequenzhaltigen Plasmids pCI- neo-S1/SARS-CoV-2 auf das bakterielle Wachstum .....	72
4.2. Einfluss des transformierten SARS-CoV-2 S1 sequenzhaltigen Plasmids pCI- neo-S1/SARS-CoV-2 auf die Vesikulationsmengen .....	73
4.3. Nachweis des SARS-CoV-2 S1 Oberflächenproteins in den BMV's .....	73
<b>5. Anreicherung des SARS-CoV-2 S1 Proteins in den BMV's .....</b>	<b>77</b>
<b>6. Infektionsversuch an HEK-Blue® Interleukin-1<math>\beta</math> Reporter Zellen zur Bestimmung der relativen Interleukin-1<math>\beta</math> Induktion .....</b>	<b>79</b>

<b>VI DISKUSSION</b> .....	<b>83</b>
<b>1. Bewertung der Klonierungsarbeiten an den Stämmen DH10<math>\beta</math>, BL21(DE3) und ClearColi®</b> .....	<b>84</b>
1.1. Bewertung des RED-Rekombinationssystems .....	84
1.2. Bewertung der $\Delta nlp$ Klonierungen.....	85
1.3. Bewertung der <i>hlyF</i> Klonierungsarbeiten .....	85
<b>2. Chromosomale Integration von <i>hlyF</i> und Deletion von <i>nlp</i> in ClearColi® und deren Einfluss auf die Vesikelproduktion in der Doppelmutante</b> .....	<b>86</b>
<b>3. Einfluss des Zeitpunktes der Abnahme des bakteriellen Überstandes während der exponentiellen Wachstumsphase auf die Vesikelmengen</b> .....	<b>87</b>
<b>4. Beeinflussung der Vesikelmengen durch Zugabe von 1 % Glycin während des Wachstums</b> .....	<b>89</b>
<b>5. Produktion des SARS-CoV-2 S1 Oberflächenproteins in ClearColi® und dessen Nachweis in den BMV's</b> .....	<b>90</b>
<b>6. Anreicherung des SARS-CoV-2 S1 Proteins in den BMV's</b> .....	<b>91</b>
<b>7. Unterschiede in der Endotoxizität von bakteriellen Membranvesikeln</b> .....	<b>92</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>94</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>95</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>96</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>100</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>109</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>111</b>
<b>ANHANG</b> .....	<b>124</b>
1. Plasmidkarten.....	124
2. Daten der Massenspektrometrie Analyse .....	130
<b>ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION</b> .....	<b>138</b>
<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>139</b>
<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>140</b>