

INHALTSVERZEICHNIS

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

12. Geräte	32
13. Verbrauchsmaterialien	34
IV METHODEN	35
1. Proteinanalytische Methoden	35
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
2. Arbeiten mit Bakterien.....	38
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 β , BL21(DE3) und ClearColi $^{\circ}$ Zellen.....	39
2.5. Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> DH10 β , BL21(DE3) und ClearColi $^{\circ}$ Zellen mit Arabinose	39
2.6. Zelllyse bakterieller Überstände unter IPTG Induktion	40
3. Arbeiten mit DNA.....	40
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>Dpn</i> 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
4. Zellkulturarbeiten	46

4.1. Kultivierung von Zelllinien	46
4.2. Manuelle Zellzählung in der Zählekammer	46
4.3. Induktion von HEK-293 Zellen durch BMV's	46
4.4. Induktion von HEK-Blue® Interleukin-1 β Reporter Zellen mit Überständen von mit BMV's induzierten HEK-293 Zellen	47
V ERGEBNISSE	48
1. Klonierungsarbeiten zur Steigerung der Vesikulation bakterieller Membranvesikel von Bakterien	48
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 β , BL21(DE3) und ClearColi®	50
1.4. Integration des Gens <i>hlyF</i> in die <i>E. coli</i> Stämme DH10 β , BL21(DE3) und ClearColi®	54
1.5. Herstellung der Kombinationsmutante <i>hlyF</i> , Δ <i>nlpI</i>	58
2. Charakterisierung der hergestellten Mutanten	61
2.1. Wachstumsverhalten der Ausgangsstämme und der hergestellten Mutanten	61
2.2. Untersuchung der Vesikulationsmengen der hergestellten Mutanten von ClearColi®	65
3. Einfluss von Glycin auf das bakterielle Wachstum und die Vesikelproduktion	66
4. Produktion der Spikeprotein-Untereinheit S1 von SARS-CoV-2 in Bakterienzellen	70
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
5. Anreicherung des SARS-CoV-2 S1 Proteins in den BMV's	77
6. Infektionsversuch an HEK-Blue® Interleukin-1β Reporter Zellen zur Bestimmung der relativen Interleukin-1β Induktion	79

VI DISKUSSION.....	83
1. Bewertung der Klonierungsarbeiten an den Stämmen DH10β, BL21(DE3) und ClearColi$^{\circledR}$	84
1.1. Bewertung des RED-Rekombinationssystems	84
1.2. Bewertung der $\Delta nlpI$ Klonierungen.....	85
1.3. Bewertung der <i>hlyF</i> Klonierungsarbeiten	85
2. Chromosomal Integration von <i>hlyF</i> und Deletion von <i>nlpI</i> in ClearColi$^{\circledR}$ und deren Einfluss auf die Vesikelproduktion in der Doppelmutante	86
3. Einfluss des Zeitpunktes der Abnahme des bakteriellen Überstandes während der exponentiellen Wachstumsphase auf die Vesikelmengen.....	87
4. Beeinflussung der Vesikelmengen durch Zugabe von 1 % Glycin während des Wachstums	89
5. Produktion des SARS-CoV-2 S1 Oberflächenproteins in ClearColi$^{\circledR}$ und dessen Nachweis in den BMV's	90
6. Anreicherung des SARS-CoV-2 S1 Proteins in den BMV's	91
7. Unterschiede in der Endotoxizität von bakteriellen Membranvesikeln	92
ZUSAMMENFASSUNG.....	94
SUMMARY	95
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	96
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	100
TABELLENVERZEICHNIS.....	109
LITERATURVERZEICHNIS.....	111
ANHANG	124
1. Plasmidkarten.....	124
2. Daten der Massenspektrometrie Analyse	130
ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION.....	138
DANKSAGUNG	139
LEBENSLAUF	140