

**Versuche zur Antibiotikawirkung von Daptomycin
und der Immunsuppression bei *Myasthenia gravis***

Vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern

zur Verleihung des akademischen Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

genehmigte

DISSERTATION

(D386)

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Sandra Theison

Betreuer: Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 19.10.2015

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 19.10.2015

Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. H. Sitzmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. E. Trommer

2. Berichterstatter: Junior Prof. Dr. S. Keller

Gewidmet ist diese Arbeit meiner Mutter Frau Iris Theison und meinem Großvater Prof. Dr. Dr. Erich Oberhausen, die mir immer ein wissenschaftliches Vorbild waren.

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen April 2007 und August 2015 im Fachbereich Chemie/Abteilung Biochemie der Technischen Universität Kaiserslautern.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer möchte ich für die freundliche Überlassung des sehr interessanten Themas danken. Ich bedanke mich außerdem für die Unterstützung, die Diskussionsbereitschaft und den überlassenen Freiraum bei der Durchführung.

Abstract

Versuche zur Antibiotikawirkung von Daptomycin und der Immunsuppression bei *Myasthenia gravis*

Daptomycin ist ein cyclisches Lipopeptidantibiotikum, das zur Behandlung schwerer gram-positiver Infektionen entwickelt wurde. Daptomycin weist in vitro eine schnelle Aktivität gegen klinisch signifikante Stämme gram-positiver Pathogene auf. Außerdem ist die Aktivität von Daptomycin abhängig von der physiologischen Calciumkonzentration. Es wird postuliert, dass in einem ersten Schritt die Calciumionen mit dem Antibiotikum interagieren und dieser Komplex dadurch positiv geladen ist. Somit kann es an negativ geladene Membranen, die Phosphatidylglycerol enthalten, binden. In einem nächsten Schritt interagiert der hydrophobe Schwanz des Daptomyocins als Anker, da dieser in wässriger Lösung einen hohen ΔG -Wert besitzt und dieser dadurch erniedrigt wird. Schließlich nimmt die Fluidität der Membran ab und durch den Kollaps des Membranpotentials findet ein Zusammenbruch verschiedener Zellfunktionen statt.

Die Versuche wurden zum größten Teil an Liposomen als Modelmembranen durchgeführt. Dabei wurden zwei Liposomensysteme genutzt. Einerseits Liposomen die aus Avanti Polar Lipid Mix bestanden und durch Behandlung mit Ultraschall hergestellt wurden. Andererseits wurden Liposomen aus Bakterien hergestellt. Zudem wurden kompetente Bakterienzellen untersucht.

Der bakterielle Wachstum wurde durch UV/VIS-Spektroskopie gemessen. Veränderungen in der Fluidität der Membran wurden mittels ESR-Spektroskopie festgestellt. Die Morphologie wurde mittels Elektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie aufgenommen. Zusätzlich wurde ein *Leakage Assay* durchgeführt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei den ESR-Untersuchungen eine Änderung der Fluidität gemessen wurde. Aufgrund der Ergebnisse verschiedener Spinlabel lag allerdings die Vermutung nahe, dass sich bei Daptomycin keine diskrete Pore ausbildet, sondern es zur Krümmung der Membran kommt was schließlich zum Aufplatzen der Zelle führt. Deshalb wurden im weiteren Messungen am Elektronenmikroskop sowie am Rasterkraftmikroskop durchgeführt, um Rückschlüsse auf die Morphologie machen zu können. Diese Messungen bestätigten die obige These, dass sich keine Pore ausbildet sondern es zur Krümmung der Membranoberfläche kommt.

Bei Autoimmunerkrankungen richtet der Körper Autoantikörper gegen körpereigene Strukturen. Bei *Myasthenia gravis* sind es Antikörper, die gegen Strukturen der postsynaptischen Membran im Bereich der neuromuskulären Endplatte gerichtet sind. Hierbei richten sich diese gegen Acetylcholinrezeptoren, die als Transmembrankanäle bei der Signalweiterleitung fungieren.

In früheren Arbeiten konnte unter anderem Hossann gentechnisch die α -Untereinheit des Acetylcholinrezeptors mit dem Ribosomeninaktivierenden Protein Gelonin koppeln, es lag hier allerdings eine niedrige Löslichkeit vor und das Fusionsprotein lies sich nur schwer zurückfalten.

In diesem Teil der Arbeit wurde die Cytotoxizität von Gelonin mittels Zellkulturexperimenten untersucht, ein von Li zur Verfügung gestelltes Plasmid mit der α -Untereinheit des Acetylcholinrezeptors, fusioniert an den der Löslichkeitstag MBP, überprüft. Außerdem sollte ein Plasmid kloniert werden, das für ein Fusionsprotein aus MBP-Gelonin-Achetylcholinrezeptor codiert. Hierbei versprach man sich durch den zusätzlichen MBP-Tag eine höhere Löslichkeit.

Der Cytotoxizitätstest wurde durchgeführt, da in der Literatur teils widersprüchliche Ergebnisse veröffentlicht wurden, bestätigte aber, dass Gelonin als ein Typ I RIP ohne Membrandomäne keine Cytotoxizität aufweist.

Das Plasmid MBP-Achetylcholinrezeptor wurde in *E. coli* Zellen transformiert, das Protein exprimiert und mittels Amylosesäule und HiTrap-Säule isoliert. Es besaß eine hohe Löslichkeit und lag in gefalteter Form in Lösung vor.

Die zur Synthese des MBP-Gelonin-Acetylcholinrezeptors-Konjugats notwendigen Plasmide waren im Arbeitskreis vorhanden. Das Plasmid pET-gel codierte für Gelonin und die DNA-Sequenz für die α -Untereinheit des Acetylcholinrezeptors war bereits in den pAChRex-Vektor inkloniert. Der Löslichkeitstag MBP war im Plasmid pmal-c5x enthalten.

Auf Basis dieser Plasmide wurde eine Klonierungsstrategie entwickelt und in Teilen durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Daptomycin	1
1.1.1	Biomembranen	1
1.1.1.1	Membranlipide	1
1.1.1.2	Membranbildung	1
1.1.1.3	Liposomen	2
1.1.1.4	Membranfluidität	3
1.1.2	Bakterienzellwand	3
1.1.3	Bakteriell verursachte Tumoren	3
1.1.4	Antibiotika	4
1.1.4.1	Daptomycin	4
1.1.5	ESR-Spektroskopie	6
1.1.5.1	Theoretische Grundlagen	6
1.1.5.2	Die Hyperfeinstruktur	8
1.1.5.3	ESR-Spektren immobilisierter Proben	9
1.1.5.4	Spinlabel-Phospholipide und ihre Membranfluidität	10
1.1.6	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	11
1.1.6.1	Grundlagen der DLS	11
1.1.7	Lumineszenz	12
1.1.7.1	Fluoreszenz	12
1.1.7.2	<i>Quenching</i>	12
1.1.8	<i>Scanning Electron Microscopy</i> (SEM)	13
1.1.9	<i>Atomic Force Microscopy</i> (AFM)	13
1.2	Immunsuppression bei <i>Myasthenia gravis</i>	15
1.2.1	Immunsystem	15

Inhaltsverzeichnis

1.2.2	<i>Myasthenia gravis</i>	16
1.2.2.1	Mechanismus.....	16
1.2.2.1.1	Ribosomen-inaktivierende Proteine (RIPs)	18
1.2.2.1.2	Gelonin	18
1.2.2.1.3	<i>Molecular mimicry</i> als mögliche Therapie gegen <i>Myasthenia gravis</i>	19
2	Problemstellung.....	22
2.1	Daptomycin	22
2.2	Immunsuppression	23
3	Ergebnisse	24
3.1	Daptomycin	24
3.1.1	Liposomenpräparation.....	24
3.1.1.1	Liposomen aus Lipid Mix	24
3.1.1.2	Liposomen aus Bakterien	25
3.1.2	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation</i> (MALDI).....	25
3.1.3	<i>Electron Spray Ionisation</i> (ESI).....	25
3.1.3.1	Neutraler pH-Wert: Ca^{2+}	27
3.1.3.2	Saurer pH-Wert: Ca^{2+}	28
3.1.3.3	Saurer pH-Wert: Mg^{2+}	29
3.1.4	Calciumbestimmung.....	29
3.1.5	<i>Differential Light Scattering</i> (DLS)	30
3.1.5.1	Liposomen aus Lipid Mix	30
3.1.5.2	Liposomen aus PG und PC.....	31
3.1.5.3	Liposomen aus gram-positiven Bakterien (<i>B. subtilis</i>)	31
3.1.5.4	Liposomen aus gram-negativen Bakterien (<i>E. coli</i>).....	32
3.1.6	Optische Dichtemessung mit verschiedenen Bakterienkulturen	32
3.1.7	Elektronenspin-Resonanzspektroskopie (ESR).....	35
3.1.7.1	Temperaturabhängigkeiten der Fluidität	35

Inhaltsverzeichnis

3.1.7.2	Messungen mit Lipid Mix von <i>Avanti Polar Lipids</i>	36
3.1.7.2.1	Messungen mit 12-Doxylphosphatidylcholin.....	36
3.1.7.2.2	Messungen mit 5-Doxylphosphatidylcholin.....	39
3.1.7.3	Messungen mit Liposomen aus Phosphatidylcholin und Phosphatidylglycerol	44
3.1.7.3.1	Liposomen aus Phosphatidylcholin und Phosphatidylglycerol bei 2 mM Calciumkonzentration	48
3.1.7.4	Messungen mit Liposomen aus Bakterien	50
3.1.7.4.1	Messungen mit Liposomen aus gram-negativen Bakterien.....	51
3.1.7.5	Messungen mit Liposomen aus gram-positiven Bakterien	52
3.1.7.6	Diskussion	54
3.1.8	<i>Scanning Electron Microscopy</i> (SEM)	55
3.1.8.1	Elektronenmikroskopische Messungen mit Liposomen aus Lipid Mix.....	56
3.1.8.2	Elektronenmikroskopische Messungen mit Liposomen aus <i>B. subtilis</i>	57
3.1.8.3	Elektronenmikroskopische Messungen mit Liposomen aus <i>E. coli</i>	57
3.1.8.4	Elektronenmikroskopische Messungen mit <i>B. subtilis</i>	58
3.1.8.5	Elektronenmikroskopische Messungen mit <i>E. coli</i>	59
3.1.8.6	Diskussion	59
3.1.9	<i>Atomic Force Microscopy</i> (AFM).....	60
3.1.9.1	Strukturaufklärungen an mit Daptomycin behandelten Bakterien von <i>Braga et al.</i>	60
3.1.9.2	Liposomen aus Lipid Mix	62
3.1.9.3	Liposomen aus <i>Bacillus subtilis</i>	63
3.1.9.4	Liposomen aus <i>E. coli</i>	63
3.1.9.5	<i>Bacillus subtilis</i>	64
3.1.9.6	<i>E. coli</i>	65
3.1.9.7	Diskussion	65

Inhaltsverzeichnis

3.1.10	<i>Leakage Assay</i>	66
3.1.10.1	Synthese des 5(6)-Carboxyfluorescein-Mono-Natriumsalzes	66
3.1.10.2	Präparation der farbstoffhaltigen Liposomen.....	66
3.1.10.3	<i>Leakage Assay</i> mit 5(6)-Carboxyfluorescein	67
3.2	Immunsuppression	68
3.2.1	Parallelveröffentlichung	68
3.2.2	Cytotoxizität	69
3.2.3	Isolation von rekombinantem Gelonin aus <i>E. coli</i>	70
3.2.3.1	Expression von Gelonin und Zellaufschluss	70
3.2.3.2	Isolation von Gelonin mittels Nickel-Affinitätschromatographie.....	70
3.2.3.3	SDS-PAGE.....	71
3.2.3.4	ELISA.....	71
3.2.3.5	Bestimmung der Proteinkonzentration	72
3.2.3.6	SRB-Test	72
3.2.4	Isolierung des Acetylcholinrezeptors aus <i>Torpedo californica</i>	72
3.2.4.1	Durchführung der Isolierung	73
3.2.4.2	Charakterisierung des isolierten AChRs	74
3.2.5	Isolierung von MBP- α AChR ₄₋₂₀₈	75
3.2.5.1	Expression und Isolierung von MBP- α AChR ₄₋₂₀₈	75
3.2.5.1.1	Expression	75
3.2.5.1.2	Lyse der Zellen und Aufarbeitung der <i>inclusion bodies</i>	76
3.2.5.1.3	Isolierung mittels Amylose-Affinitätschromatographie.....	77
3.2.5.1.4	Isolierung mit Hilfe der Gelfiltrations-Chromatographie.....	77
3.2.5.1.4.1	Abspaltung des MBP- <i>Tags</i> vom Fusionsprotein	79
3.2.5.1.5	Charakterisierung.....	82
3.2.5.1.5.1	MALDI-Massenspektrometrie.....	82
3.2.5.1.5.2	ELISA	82

Inhaltsverzeichnis

3.2.5.1.5.3	Sequenzierung	83
3.2.5.1.6	Diskussion der Expression und Isolierung von MBP- α AChR ₄₋₂₀₈	84
3.2.6	Klonierung von MBP-Gelonin- α Acetylcholinrezeptor ₄₋₂₀₈	85
3.2.6.1	Klonierungsstrategie.....	85
3.2.6.1.1	Klonierung der α AChR ₄₋₂₀₈ -DNA in den Vektor pUC18.....	86
3.2.6.1.2	Klonierung der Gelonin-DNA in den Vektor pUCACHR	87
3.2.6.1.3	Deletion des Stopcodons und Aminosäureshifts sowie einer <i>EcoRI</i> -Schnittstelle durch gezielte Mutagenese	89
3.2.6.1.4	Klonierung der Gelonin- α AChR ₄₋₂₀₈ -DNA in den Vektor pmal-c5x ..	92
3.2.6.2	Plasmidisolation	94
3.2.6.3	Klonierung des α AChR-Fragments in den Vektor pUC18	94
3.2.6.4	Verdau der isolierten Plasmide pUC18AChRex und pET-gel.....	95
3.2.6.5	Agarose-Gelelektrophorese der verdauten Plasmide	97
3.2.6.6	Ligation der Gelonin-DNA in den Vektor pUCACHR.....	98
3.2.6.7	Transformation der Ligationsprodukte.....	98
3.2.6.8	Agarose-Gelelektrophorese der Ligation und Transformation	98
3.2.6.9	Erste gezielte Mutagenese	99
3.2.6.10	Verdau der mutierten Plasmid-DNA.....	101
3.2.6.11	Agarose-Gelelektrophorese zur Kontrolle der Mutagenese	102
3.2.6.12	Zweite gezielte Mutagenese	102
3.2.7	Diskussion	105
4	Experimenteller Teil.....	108
4.1	Daptomycin	108
4.1.1	Verwendete Chemikalien	108
4.1.2	Bakterienstämme	109
4.1.3	Geräte	109
4.1.4	Verwendete Puffer.....	111

Inhaltsverzeichnis

4.1.5	Säulenmaterial	111
4.1.6	Probenpräparation MALDI	111
4.1.7	Probenpräparation ESI	112
4.1.8	Herstellung des LB-Mediums	113
4.1.9	Anzucht der Bakterienkulturen	113
4.1.10	Synthese von Liposomen	113
4.1.10.1	Liposomen aus Lipidgemischen	114
4.1.10.2	Herstellung von Liposomen mit 0,1 mol/L CF-Lösung	115
4.1.10.2.1	Über Nacht in NaCl dialysierte Liposomen	115
4.1.10.3	Liposomen aus Zellen	115
4.1.11	Probenpräparation für die ESR-Spektroskopie	116
4.1.12	Probenpräparation für die Elektronenmikroskopiemessungen	116
4.1.13	Probenpräparation für die Rasterkraftmikroskopiemessungen	117
4.1.13.1	Liposomen aus Lipid Mix	117
4.1.13.2	Liposomen aus <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i>	117
4.1.13.3	<i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i> Zellen	117
4.1.14	<i>Leakage Assay</i>	118
4.1.14.1	Herstellung des 5(6)-Carboxyfluorescein-Mono-Natriumsalzes	118
4.1.14.2	5(6)-Carboxyfluorescein-Verdünnungsreihe	118
4.1.14.3	Calcium- und Daptomycin-Verdünnungsreihe	119
4.2	Immunsuppression	120
4.2.1	Verwendete Geräte	120
4.2.2	Verwendete Chemikalien	122
4.2.3	Verwendete Kits	124
4.2.4	DNA- und Proteinmarker	124
4.2.5	Säulenmaterial	124
4.2.6	<i>E. coli</i> -Stämme und Plasmide	124

Inhaltsverzeichnis

4.2.7	Restriktionsenzyme und Ligase	125
4.2.8	Antikörper	125
4.2.9	Oligonukleotide	125
4.2.10	Konzentrationsbestimmungen	126
4.2.10.1	BCA-Test	126
4.2.10.2	TCA-Fällung	126
4.2.11	Allgemeine Arbeitsmethoden	127
4.2.11.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	127
4.2.11.2	Dialyse.....	128
4.2.11.3	Aufkonzentration mit Amicon-Konzentratoren	128
4.2.11.4	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	128
4.2.11.5	Sterilisation von Geräten	129
4.2.11.6	Kulturbedingungen	129
4.2.11.6.1	Wachstumsbedingungen	129
4.2.11.6.2	Wachstumsmessungen	129
4.2.11.6.3	Glycerinkulturen	130
4.2.12	Plasmidisolierung	130
4.2.12.1	Mini-Präparation	130
4.2.12.2	Maxi-Präparation.....	130
4.2.13	Restriktionsverdau.....	131
4.2.14	Agarose-Gelelektrophorese	131
4.2.14.1	Gelextraktion	131
4.2.14.2	Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA-Lösungen.....	131
4.2.15	DNA-Ligation	132
4.2.16	Transformation und Kompetenztest	132
4.2.17	Gezielte Mutagenese	132
4.2.18	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	133

Inhaltsverzeichnis

4.2.19	Proteinexpression in <i>E. coli</i> -Zellen	133
4.2.19.1	Zellyse	133
4.2.19.2	Proteinisolierung	134
4.2.19.2.1	Isolierung von rekombinantem Gelonin (His ₆ -Gelonin ₁₋₂₅₁)	134
4.2.19.2.1.1	Isolierung mit Nickel-Affinitätschromatographie (Elution mit Imidazol)	134
4.2.19.2.1.2	Abspaltung des His-Tags von His ₆ -Gelonin ₁₋₂₅₁	136
4.2.19.2.2	Isolierung des MBP-AChR Fusionsproteins	136
4.2.19.2.2.1	Isolierung mit Amylose-Affinitätschromatographie.....	136
4.2.19.2.2.2	Isolierung mit Gelfiltrations-Chromatographie	137
4.2.19.2.2.3	Proteolytische Spaltung des Fusionsproteins MBP- α AChR ₄₋₂₀₈	139
4.2.20	Spezielle Arbeitsmethode: Isolierung des AChR aus dem Zitterrochen	140
4.2.21	Immunologische Methode: ELISA	141
4.2.22	Massenspektrometrische Charakterisierung: MALDI	143
4.2.22.1	Geextraktion	144
4.2.22.2	Vorbereiten der Proben für Massenspektrometrie	145
4.2.23	Säugerzellkultivierung: Cytotoxizitätstest von Gelonin	146
4.2.23.1	Kultivierungsbedingungen	146
4.2.23.2	Mediumswechsel bei Monolayerkulturen	146
4.2.23.3	Subkultivierung von Monolayerkulturen	146
4.2.23.4	Zellzahlbestimmung mittels Hämocytometer	147
4.2.23.5	SRB-Test zur Untersuchung der Cytotoxizität von Gelonin.....	147
4.2.23.5.1	Vortest zur Ermittlung einer auswertbaren Mindestzellzahl	148
4.2.23.5.2	SRB-Test nach Inkubation mit Gelonin	148
5	Fazit.....	150
6	Anhang	154
6.1	Anhang 1	154

Abbildungsverzeichnis

6.2	Anhang 2	154
-----	----------------	-----

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell eines Phospholipids (Alberts 2011).....	1
Abbildung 2: Lipiddoppelschichten und Micellen (Alberts 2011)	2
Abbildung 3: Vesikelbildung in wässriger Umgebung (Alberts 2011).....	2
Abbildung 4: Gram-negative und gram-positive Bakterienmembranen (Janeway 2009).....	3
Abbildung 5: Strukturformel des Daptomycins (Rybak, 2004; eigene Abbildung)	5
Abbildung 6: Daptomycinbindung an Membranen (Muriah 2011)	6
Abbildung 7: Aufspaltung entarteter Energienivaus bei Anlegen eines externen Magnetfeldes (Atkins 2013).....	7
Abbildung 8: Absorption und erste Ableitung eines ESR-Signals (Atkins 2013)	8
Abbildung 9: Hyperfeinaufspaltung (Wertz und Bolton 1972).....	9
Abbildung 10: Anisotrope Bewegung einer Lipidradikalsonde in einer Lipidmembran um die Normale zur Membranoberfläche (Knowles 1976).....	9
Abbildung 11: Achsensystem in einer Stearinsäure-Radikalsonde (Galla 1988)	10
Abbildung 12: Verwendete Spinlabelfettsäuren (eigene Abbildung)	10
Abbildung 13: 5-Doxylphosphatidylcholin (eigene Abbildung)	11
Abbildung 14: 12-Doxylphosphatidylcholin (eigene Abbildung)	11
Abbildung 15: Schematischer Aufbau eines AFM (JPK 2015)	14
Abbildung 16: Reizübertragung an gesundem Muskel (Janeway 2009).....	17
Abbildung 17: Darstellung des Acetylcholinrezeptors (Janeway 2009)	17
Abbildung 18: Reizübertragung bei <i>Myasthenia gravis</i> (Janeway 2009)	18
Abbildung 19: Gelonin (TARGA 2011)	19
Abbildung 20: Mechanismus des Systems (eigener Arbeitskreis).....	20
Abbildung 21: Erste Versuche an Lewis-Ratten (Hossann 2004).....	21
Abbildung 22: Mechanismus der Liposomenformation (Avanti Polar Lipids, 2015)	24
Abbildung 23: MADLI-Messung von Daptomycin mit HCCA als Matrix	25
Abbildung 24: 2Azz-Werte von <i>E. coli</i> Lipid Mix Liposomen mit unterschiedlichen Kationen	

Abbildungsverzeichnis

(10 mM) als Gegenionen zu Daptomycin (5mM)	26
Abbildung 25: ESI-Spektrum von 5 mM Daptomycin und 10 mM Ca ²⁺ bei neutralem pH-Wert	27
Abbildung 26: ESI-Spektrum von 5 mM Daptomycin und 10 mM Ca ²⁺ bei saurem pH-Wert	28
Abbildung 27: ESI-Spektrum von 5 mM Daptomycin und 10 mM Mg ²⁺ bei saurem pH-Wert	29
Abbildung 28: DLS-Messung der Liposomen aus Lipid Mix	30
Abbildung 29: DLS-Messung der Größe von Liposomen aus PG und PC	31
Abbildung 30: DLS-Messung der Größe von Liposomen aus gram-positiven Bakterien	31
Abbildung 31: DLS-Messung der Größe von Liposomen aus gram-negativen Bakterien	32
Abbildung 32: OD-Verlauf gram-negativer Zellen über einen Zeitraum von 21 h: ohne Daptomycin (schwarz), 3 µg/mL Daptomycin (rot) und 10 µg/mL (blau)	33
Abbildung 33: OD-Verlauf gram-positiver Zellen über einen Zeitraum von 21 h: ohne Daptomycin (schwarz), 3 µg/mL Daptomycin (rot) und 10 µg/mL (blau)	34
Abbildung 34: Temperaturabhängigkeit der Fluidität in Liposomen aus <i>E. coli</i> Lipid Mix 5-Doxylphosphatidylcholin als Spinlabel im Bereich von 298 K bis 310 K	35
Abbildung 35: 2Azz-Werte der Messungen von <i>E. coli</i> Lipid Mix Liposomen mit 12-Doxylphosphatidylcholin: zweifache Ca ²⁺ -Konzentration (schwarz), Daptomycinkonzentration mit einem Äquivalent Ca ²⁺ (rot) und Daptomycinkonzentration mit zwei Äquivalenten Ca ²⁺	37
Abbildung 36: 2Azz-Werte der Messungen von <i>E. coli</i> Lipid Mix Liposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 298 K: zweifache Ca ²⁺ -Konzentration (schwarz), Daptomycinkonzentration mit einem Äquivalent Ca ²⁺ (rot) und Daptomycinkonzentration mit zwei Äquivalenten Ca ²⁺	39
Abbildung 37: 2Azz-Werte der Messungen von <i>E. coli</i> Lipid Mix Liposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 310 K: zweifache Ca ²⁺ -Konzentration (schwarz), Daptomycinkonzentration mit einem Äquivalent Ca ²⁺ (rot) und Daptomycinkonzentration mit zwei Äquivalenten Ca ²⁺	41
Abbildung 38: 2Azz-Werte der Messungen von <i>E. coli</i> Lipid Mix Liposomen mit	

Abbildungsverzeichnis

5-Doxylphosphatidylcholin bei 298 K: Daptomycinkonzentration mit 2mM Ca ²⁺	43
Abbildung 39: 2Azz-Werte der Messungen von Phosphatidylcholinliposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 298 K: Daptomycinkonzentration mit zwei Äquivalenten Ca ²⁺	44
Abbildung 40: 2Azz-Werte der Messungen von PC/PG Liposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 298 K: zweifache Ca ²⁺ -Konzentration (schwarz) und Daptomycinkonzentration mit zwei Äquivalenten Ca ²⁺ (rot)	45
Abbildung 41: 2Azz-Werte der Messungen von PC/PG Liposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 310 K: zweifache Ca ²⁺ -Konzentration (schwarz) und Daptomycinkonzentration mit zwei Äquivalenten Ca ²⁺ (rot)	47
Abbildung 42: 2Azz-Werte der Messungen von PC/PG Liposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 298 K: Daptomycinkonzentration mit 2 mM Ca ²⁺	48
Abbildung 43: 2Azz-Werte der Messungen von PC/PG Liposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 310 K: Daptomycinkonzentration mit 2 mM Ca ²⁺	49
Abbildung 44: 2Azz-Werte der Messungen von Liposomen aus gram-negativen Bakterien mit 5-Doxylphosphatidylcholin in FCS bei 298 K bei verschiedenen Daptomycinkonzentrationen	51
Abbildung 45: 2Azz-Werte der Messungen von Liposomen aus gram-positiven Bakterien mit 5-Doxylphosphatidylcholin in FCS bei 298 K bei verschiedenen Daptomycinkonzentrationen	53
Abbildung 46: cryo-EM Messungen von Liposomen aus Lipid Mix ohne Daptomycin (links) und 5 mM Daptomycin (rechts)	56
Abbildung 47: cryo-EM Messungen von Liposomen aus <i>B. subtilis</i> ohne Daptomycin (links) und 5 mM Daptomycin (rechts)	57
Abbildung 48: cryo-EM Messungen von Liposomen aus <i>E. coli</i> ohne Daptomycin (links) und 5 mM Daptomycin (rechts)	58
Abbildung 49: cryo-EM Messungen von <i>B. subtilis</i> ohne Daptomycin (links) und 5 mM Daptomycin (rechts)	58
Abbildung 50: cryo-EM Messungen von <i>E. coli</i> ohne Daptomycin (links) und 5 mM Daptomycin (rechts)	59

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 51: AFM-Aufnahmen von Bakterienzellen die mit 4 MIC90 (A) und 8 MIC90 (B) Daptomycin behandelt wurden (Braga 2002)	62
Abbildung 52: AFM-Messungen von Liposomen aus Lipid Mix ohne Daptomycin (links) und 5 mM Daptomycin	62
Abbildung 53: AFM-Messungen von Liposomen aus <i>B. subtilis</i> ohne Daptomycin (links) und 5 mM Daptomycin	63
Abbildung 54: AFM-Messungen von Liposomen aus <i>E. coli</i> ohne Daptomycin (links) und 5 mM Daptomycin	64
Abbildung 55: AFM-Messungen von <i>B. subtilis</i> ohne Daptomycin (links) und 5 mM Daptomycin, fixiert mit Glutaraldehyd	64
Abbildung 56: AFM-Messungen von <i>E. coli</i> ohne Daptomycin (links) und 5 mM Daptomycin, fixiert mit Glutaraldehyd	65
Abbildung 57: <i>Leakage Assay</i> Liposomen aus Lipid Mix bei 298 K mit verschiedenen Daptomycinkonzentrationen bei jeweils zwei Äquivalenten Ca^{2+}	67
Abbildung 58: SDS-PAGE der Fraktionen der Nickelsäule	71
Abbildung 59: ELISA des isolierten Gelonins.....	71
Abbildung 60: Graphische Auftragung der Mittelwerte des SRB-Tests nach 24 h Inkubation mit rekombinantem Gelonin.....	72
Abbildung 61: Proteinanreicherung in einem 50-25% Sucrosegradienten nach erfolgter Zentrifugation.....	73
Abbildung 62: Analyse des aus <i>Torpedo californica</i> isolierten und aufgereinigten AChRs durch SDS-PAGE.....	74
Abbildung 63: SDS-PAGE der aufgetrennten Proteinlösung mit MBP- α AChR ₄₋₂₀₈ aus inclusion bodies.....	76
Abbildung 64: SDS-PAGE der Elutionsfraktionen mit MBP- α AChR ₄₋₂₀₈ nach Amylosesäule.	77
Abbildung 65: Elutionsdiagramm der Gelfiltrations-Chromatographie	78
Abbildung 66: SDS-PAGE der Elutionsfraktionen nach der Gelfiltrations-Chromatographie	78
Abbildung 67: SDS-PAGE der Spaltung von MBP- α AChR ₄₋₂₀₈ mit der Protease Xa.....	81

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 68: ELISA mit monoklonalen anti-AChR-Antikörpern (1:1.000).....	83
Abbildung 69: Schema der Sequenz der α -Untereinheit des AChRs auf dem Expressionsplasmid pmal- α AChR ₄₋₂₀₈ im Überblick	84
Abbildung 70: Klonierungsstrategie für das Plasmid pmalGelAChR (1): Synthese von pUCACHR durch Umklonieren der DNA für α -AChR in den <i>high copy</i> Vektor pUC18.....	87
Abbildung 71: Klonierungsstrategie für das Plasmid pmalGelAChR (2): Synthese von pUCGelAChR durch Umklonieren der DNA von Gelonin in den Vektor pUCACHR.....	89
Abbildung 72: Klonierungsstrategie für das Plasmid pmalGelAChR (3): Synthese des Vektors pUCGelAChRm1 durch eine Deletion der Base an Position 944.....	90
Abbildung 73: Klonierungsstrategie für das Plasmid pmalGelAChR (4):Synthese des Vektors pUCGelAChRm2 durch eine Punktmutation an Position 949.....	91
Abbildung 74: Klonierungsstrategie für das Plasmid pmalGelAChR (5) Synthese des Vektors pmalGelAChR durch umklonieren der DNA des Fusionsproteins GelAChR in den Vektor pmal-c5x.....	93
Abbildung 75: Charakterisierung des pUC18-Vektors	95
Abbildung 76: Agarose-Gelelektrophorese der verdauten pET-gel- und pUC18AChRex-Plasmide	97
Abbildung 77: Überprüfung der Klonierung von pUCACHRex und Gelonin	99
Abbildung 78: Kontrollgel der ersten Mutagenese	102
Abbildung 79: Kontrollgel der zweiten Mutagenese	104
Abbildung 80: pUC18-Vektor.....	105
Abbildung 81: pUC18-Vektor mit AChRex und Galaktosidase-Rest	106
Abbildung 82: pUC18AChRex mit Gelonin.....	106
Abbildung 83: pUC18-Vektor mit Gel-AChR-Konjugat ohne Stopcodon	107
Abbildung 84: Liposomen aus gram-negativen Bakterien in Tris-Puffer (links) und FCS ...	113
Abbildung 85: Liposomen aus Lipid Mix (links) und PC/PG in Tris-Puffer.....	114
Abbildung 86: Sequenzierung pmalAChR.....	154

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: 2Azz-Werte von <i>E. coli</i> Lipid Mix Liposomen mit unterschiedlichen Kationen (10 mM) als Gegenionen zu Daptomycin (5mM).....	26
Tabelle 2: Masse der gemessenen Signale einer 5mM Daptomycinlösung mit 10 mM Ca ²⁺ ..	28
Tabelle 3: Masse der gemessenen Signale einer 5 mM Daptomycinlösung mit 10 mM Ca ²⁺ .	29
Tabelle 4: Ca ²⁺ Konzentration in FCS	30
Tabelle 5: OD-Verlauf gram-negativer Zellen über einen Zeitraum von 21 h: ohne Daptomycin (schwarz), 3 µg/mL Daptomycin (rot) und 10 µg/mL (blau)	33
Tabelle 6: OD-Verlauf gram-positiver Zellen über einen Zeitraum von 21 h: ohne Daptomycin (schwarz), 3 µg/mL Daptomycin (rot) und 10 µg/mL (blau)	34
Tabelle 7: Temperaturabhängigkeit der Fluidität in Liposomen aus <i>E. coli</i> Lipid Mix 5-Doxylphosphatidylcholin als Spinlabel im Bereich von 298 K bis 310 K	36
Tabelle 8: 2Azz-Werte der Messungen von <i>E. coli</i> Lipid Mix Liposomen mit 12-Doxylphosphatidylcholin bei 298 K: zweifache Ca ²⁺ -Konzentration (schwarz), Daptomycinkonzentration mit einem Äquivalent Ca ²⁺ (rot) und Daptomycinkonzentration mit zwei Äquivalenten Ca ²⁺	38
Tabelle 9: 2Azz-Werte der Messungen von <i>E. coli</i> Lipid Mix Liposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 298 K: zweifache Ca ²⁺ -Konzentration (schwarz), Daptomycinkonzentration mit einem Äquivalent Ca ²⁺ (rot) und Daptomycinkonzentration mit zwei Äquivalenten Ca ²⁺	40
Tabelle 10: 2Azz-Werte der Messungen von <i>E. coli</i> Lipid Mix Liposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 310 K: zweifache Ca ²⁺ -Konzentration (schwarz), Daptomycinkonzentration mit einem Äquivalent Ca ²⁺ (rot) und Daptomycinkonzentration mit zwei Äquivalenten Ca ²⁺	42
Tabelle 11: 2Azz-Werte der Messungen von <i>E. coli</i> Lipid Mix Liposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 298 K: Daptomycin mit 2 mM Ca ²⁺	43
Tabelle 12: 2Azz-Werte der Messungen von Phosphatidylcholinliposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 298 K: und Daptomycinkonzentration mit zwei Äquivalenten Ca ²⁺ Messungen mit Liposomen aus Phosphatidylcholin	44
Tabelle 13: 2Azz-Werte der Messungen von PC/PG Liposomen mit 5-	

Tabellenverzeichnis

Doxylphosphatidylcholin bei 298 K: zweifache Ca^{2+} -Konzentration (schwarz) und Daptomycinkonzentration mit zwei Äquivalenten Ca^{2+} (rot)	46
Tabelle 14: 2Azz-Werte der Messungen von PC/PG Liposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 310 K: zweifache Ca^{2+} -Konzentration (schwarz) und Daptomycinkonzentration mit zwei Äquivalenten Ca^{2+} (rot)	47
Tabelle 15: 2Azz-Werte der Messungen von PC/PG Liposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 298 K: Daptomycinkonzentration mit 2 mM Ca^{2+}	49
Tabelle 16: 2Azz-Werte der Messungen von PC/PG Liposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 310 K: Daptomycinkonzentration mit 2 mM Ca^{2+}	50
Tabelle 17: 2Azz-Werte der Messungen von Liposomen aus gram-negativen Bakterien mit 5-Doxylphosphatidylcholin in FCS bei 298 K bei verschiedenen Daptomycinkonzentrationen	52
Tabelle 18: 2Azz-Werte der Messungen von Liposomen aus gram-positiven Bakterien mit 5-Doxylphosphatidylcholin in FCS bei 298 K bei verschiedenen Daptomycinkonzentrationen	53
Tabelle 19: <i>Leakage Assay</i> Liposomen aus Lipid Mix bei 298 K mit verschiedenen Daptomycinkonzentrationen bei jeweils zwei Äquivalenten Ca^{2+}	67
Tabelle 20: Tabellarische Auflistung der Veröffentlichungen von Gelonin unter dem Namen Gelonin und GAP31	69
Tabelle 21: Proteolytische Spaltung des Fusionsproteins – modifizierte Zusammensetzung des Reaktionsgemischs	80
Tabelle 22: Konzentration der Plasmid-DNA	96
Tabelle 23: Pipettierschema des Verdaus der isolierten Plasmide	96
Tabelle 24: Konzentrationen der extrahierten DNA	98
Tabelle 25: Ligationsansätze	98
Tabelle 26: Primer erste gezielte Mutagenese	100
Tabelle 27: Ansatz der ersten PCR	100
Tabelle 28: Verlauf der ersten PCR (Sambrook 2006)	101
Tabelle 29: Pipettierschema des Verdaus der mutierten Plasmid-DNA	101

Tabellenverzeichnis

Tabelle 30: Primer zweite gezielte Mutagenese.....	103
Tabelle 31: Ansatz der zweiten PCR.....	103
Tabelle 32: Verlauf der zweiten PCR (Sambrook, 2006)	103
Tabelle 33: Angesetzte Puffer	111
Tabelle 34: Mess- und Geräte-Parameter <i>Leakage Assay</i>	115
Tabelle 35: Mess- und Geräte-Parameter ESR-Spektroskopie	116
Tabelle 36: Konzentrationen der CF-Probelösungen	118
Tabelle 37: Mess- und Geräte-Parameter <i>Leakage Assay</i> Verdünnungsreihe	119
Tabelle 38: Konzentrationen der Ca ²⁺ - und Daptomycin-Verdünnungsreihen.....	119
Tabelle 39: Mischungsschema zur Herstellung des diskontinuierlichen NaCl-Gradienten...	139
Tabelle 40: Angesetzte Zellkonzentrationen	148
Tabelle 41: Eingesetzte Geloninmengen.....	149

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

A	Hyperfeinkopplungskonstante
A_{xx}	Hyperfeinkopplungskonstante in x-Richtung
A_{yy}	Hyperfeinkopplungskonstante in y-Richtung
A_{zz}	Hyperfeinkopplungskonstante in z-Richtung
aa	Aminosäuren
AChR	Acetylcholinrezeptor
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>
A-Kette	Toxinkomponente bei RIPs
Äq.	Äquivalent
B	Magnetfeld
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
B-Kette	Membrankomponente bei RIPs
B-Zellen	benannt nach dem <i>bursa fabricii</i> , einem lymphatischen Organ bei Vögeln, in dem B-Zellen das erste Mal entdeckt wurden.
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure
bp	Basenpaar
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C	Celsius
D	Diffusionskoeffizient
Dap	Daptomycin
DLS	<i>Differential Light Scattering</i>
d.h.	das heißt

Abkürzungsverzeichnis

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
EAMG	<i>Experimental Autoimmune Myasthenia gravis</i>
EARSS	Europäisches Antimikrobielles Resistenzüberwachungssystem
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMA	Europäische Medizin Agentur
ESI	<i>Electron Spray Ionisation</i>
ESR	<i>Electron Spin Resonance</i>
etc.	<i>et cetera</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
g	Gramm
g-Faktor	gyromagnetischer Faktor
gel, Gel	Gelonin
GAP31	Nolansequenz von Gelonin
GISA	Glykopeptid-beständige <i>S. aureus</i>
GRE	Glykopeptid-resistente Enterococci
h	Stunde
HCCA	4-Hydroxy- α -cyanozimtsäure
His	Histidin
I	Kernspin
<i>in situ</i>	an Ort und Stelle
<i>in vitro</i>	im Reagenzglas
<i>in vivo</i>	im Organismus
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside

Abkürzungsverzeichnis

k	Hyperfeinaufspaltungsdifferenz
k	Boltzmannkonstante
K	Kelvin
kDa	kiloDalton
l	Hyperfeinaufspaltungsdifferenz
L	Liter
L-forms	Bakterien ohne Peptidoglykan, benannt nach dem Ort der Entdeckung, dem <i>Lister Institute</i>
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LIS	Lithiumdijodosalicylat
LMV	<i>Large multilamellar vesicles</i>
m	Hyperfeinaufspaltungsdifferenz
mM	millimolar
m_s	Magnetisches Moment des Elektronenspins im Magnetfeld
M*	angeregtes Molekül
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionisation</i>
Maxi	Plasmidisolierungskit Maxi
MBP	Maltose-bindendes Protein
MCF	<i>Michigan Cancer Foundation</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MIC	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i>
min	Minute
Mini	Plasmidisolierungskit Mini
mL	Milliliter
mRNA	messenger RNA
MRSA	Methicillinresistente <i>S. aureus</i>

Abkürzungsverzeichnis

MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NK	<i>Natural Killer</i>
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Salzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PG	Phosphatidylglycerol
pH	<i>Potentia Hydrogenium</i>
PNAG	Polynukleoid-Adenosin-Glykosidasen
pBR322	Plasmid Bolivar Rodriguez 322
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pET	Plasmid zur Expression in <i>E. coli</i> , gesteuert durch den T7-promotor
pmal	Plasmid mit MBP-Gen
pUC	<i>Plasmid Univeristy of California</i>
Q	Löschermolekül
R_h	hydrodynamischer Radius
RIP	Ribosomen-inaktivierendes Protein
s	Sekunde
S	Elektronenspin
S	Sedimentationskoeffizient
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>Scanning Electron Microscope</i>

Abkürzungsverzeichnis

SRB	Sulforodamin B
SSTI	<i>Soft skin and tissue infections</i>
SUV	<i>Small unilamellar vesicles</i>
T-Zellen	Thymuszellen
T	Temperatur
UV	ultraviolett
VIS	sichtbar
v/v	Volumen/Volumen
w/w	Masse/Masse
α -Untereinheit	Teil des Acetylcholinrezeptors
β	halber Öffnungswinkel
β -Untereinheit	Teil des Acetylcholinrezeptors
γ_ϵ	gyromagnetisches Verhältnis
γ -Untereinheit	Teil des Acetylcholinrezeptors
δ -Untereinheit	Teil des Acetylcholinrezeptors
ΔE	Energiedifferenz
η_0	Lösungsmittelviskosität
μ_B	Bohrsches Magneton
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μM	mikromolar
ν	Frequenz
σ	Abschirmkonstante

1 Einleitung

1 Einleitung

1.1 Daptomycin

1.1.1 Biomembranen

Biologische Membranen sind die natürlichen Grenzen der Zellen. Sie bestehen überwiegend aus Lipiden und Proteinen. Eine Phospholipid-Doppelschicht mit Proteinen, die sich lateral innerhalb der Membran bewegen können, wird durch das *Lipid-Raft*-Modell beschrieben. Aufgrund der selektiven Permeabilität der Biomembranen ist ein kontrollierter Stoffaustausch durch diese möglich (Alberts 2011).

1.1.1.1 Membranlipide

Die Lipide der Membran werden als amphipathische Moleküle bezeichnet, d.h. sie verfügen über einen hydrophilen und einen hydrophoben Teil. Dies lässt sich am besten am Kalottenmodell eines Phosphoglycerids veranschaulichen. Man erkennt, dass die beiden hydrophoben Fettsäuren fast parallel zueinander verlaufen, während der hydrophile Anteil in die entgegengesetzte Richtung zeigt (Stryer, 2012).



Abbildung 1: Modell eines Phospholipids (Alberts 2011)

1.1.1.2 Membranbildung

In wässriger Lösung bilden sich aufgrund der amphipathischen Natur der Lipide spontan Micellen oder Lipiddoppelschichten. Bevorzugte Struktur der meisten Phospho- und Glykolipide in wässrigen Medien ist, aufgrund der räumlichen Struktur, die Lipiddoppelschicht. Diese bildet sich in Wasser als Folge des hydrophoben Effektes aus (Stryer 2012).

1 Einleitung

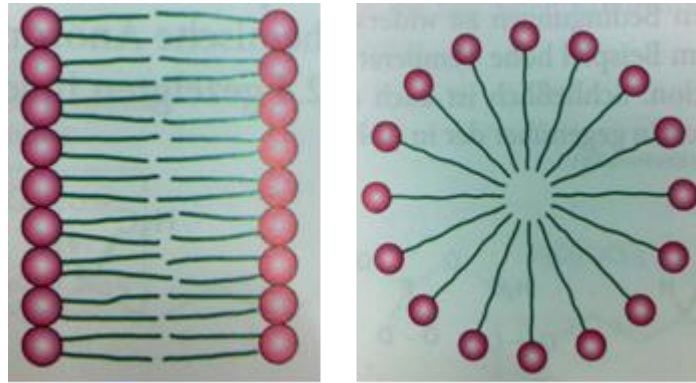


Abbildung 2: Lipiddoppelschichten und Micellen (Alberts 2011)

1.1.1.3 Liposomen

Lipiddoppelschichten schließen sich aufgrund der hohen freien Energie an den hydrophoben Rändern automatisch zu Liposomen zusammen, was auf die Polarität der Lipide zurückzuführen ist. Der hydrophile Teil des Lipids richtet sich zum Wasser hin aus, da dieses ein polares Lösungsmittel ist. Der Schwanz ist hydrophob und sucht daher die Nachbarschaft von anderen hydrophoben Molekülen. Ihre Herstellung erfolgt durch Suspension eines geeigneten Lipidgemisches in einem wässrigen Medium. Unilamellare Vesikel entstehen durch Behandlung mit Ultraschall (Stryer 2012).

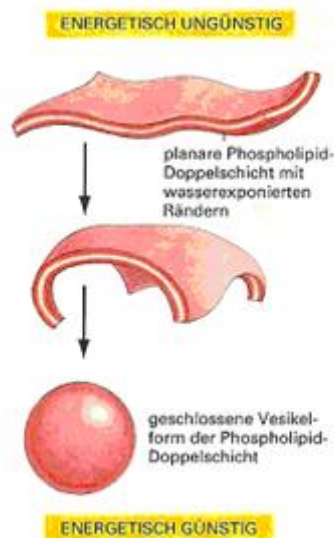


Abbildung 3: Vesikelbildung in wässriger Umgebung (Alberts 2011)

1 Einleitung

1.1.1.4 Membranfluidität

Die Phospholipid-Doppelschicht spielt bei der Stabilisierung der Membranstruktur eine wichtige Rolle und bleibt dennoch sehr elastisch. Durch die Stärke der Wechselwirkungen ist die Membran in gewissem Maße flüssig. Aufgrund dieser Membranfluidität sind Moleküle in der Lage sich lateral in der Membran zu bewegen. So ist es möglich, dass ein Phospholipidmolekül innerhalb von wenigen Sekunden von einem Ende der Zelle zum anderen gelangen kann. Die Fluidität hängt von der Lipidzusammensetzung und der Temperatur ab, d.h. länger-kettige, gesättigte Fettsäuren liegen dicht nebeneinander und schränken somit die Bewegung ein. Niedrige Temperaturen vermindern die Fluidität, was durch Veränderung der Lipidzusammensetzung behoben werden kann, d.h. durch eine Verkürzung der Fettsäuren etc. (Purves 2011).

1.1.2 Bakterienzellwand

Bakterien werden in zwei Klassen eingeteilt: gram-positive und gram-negative. Ihnen sind Zellwände aus einer Matrix von wiederholt vorkommenden Lipiden, Proteinen und Kohlenhydraten gemeinsam. Gram-positive Bakterien besitzen eine Zellwand, deren äußere Schicht aus einer Matrix von Peptidoglykanmolekülen besteht. Die Zellwand gram-negativer Bakterien hingegen besteht aus einer inneren dünnen Matrix aus Peptidoglykan und zwei äußeren Lipidmembranen (Janeway 2009).

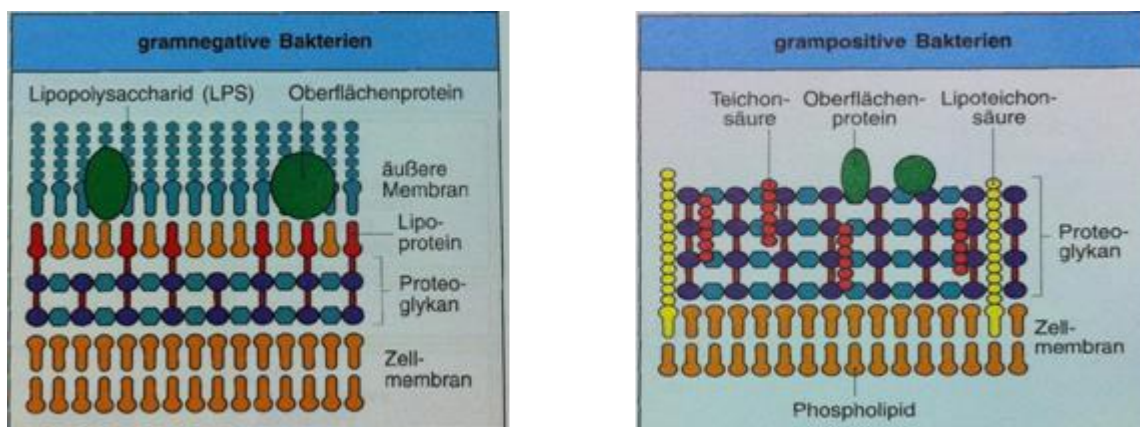


Abbildung 4: Gram-negative und gram-positive Bakterienmembranen (Janeway 2009)

1.1.3 Bakteriell verursachte Tumoren

Unter Tumoren versteht man eine Vielzahl verschiedener Erkrankungen; sie können beispielsweise durch Genmutationen verursacht werden. Sie können allerdings auch auf bakterielle oder virale Infektionen zurückgeführt werden. Tumorerkrankungen, die auf

1 Einleitung

bakteriellen Infekten basieren, beruhen auf gram-negativen oder gram-positiven Keimen. Da die meisten Medikamente die Hülle einer Zelle angreifen, ist die Behandlung jeweils unterschiedlich. Zu den bakteriellen Tumoren zählt man unter anderem Erkrankungen, die auf eine Infektion mit Streptokokken oder Staphylokokken zurückzuführen sind.

Speziell die meisten Haut- und Weichteilinfektionen (*soft skin and tissue infections* SSTIs) werden häufig durch *Staphylococcus aureus* oder β -hämolytische *Streptococci* hervorgerufen. Von SSTIs ist bekannt, dass sie Komplikationen hervorrufen, wenn sie sich auf tiefer liegende Gewebestrukturen wie Bindegewebe oder Muskelschichten ausbreiten. Eine Behandlung erfordert dann einen chirurgischen Eingriff oder eine Erhöhung der eingesetzten Wirkstoffkonzentration.

Der kontinuierliche Anstieg von Bakterienresistenzen seit ca. 1940 bedroht den therapeutischen Nutzen mancher Antibiotika. Infektionen durch gram-positive Keime sind im Moment in vielen Kliniken ein sehr dringendes Problem. Methicillinresistente *S. aureus* (MRSA), Glykopeptid-beständige *S. aureus* (GISA) und Glykopeptid-resistente *Enterococci* (VRE oder GRE), zum Teil auch *E. faecium* sind von Interesse. So hat zum Beispiel die Studie des Europäischen Antimikrobiellen Resistenzüberwachungssystems (EARSS) ergeben, dass vor allem die Multiresistenzen stark zugenommen haben.

Zusätzlich zur existierenden antibiotischen Aufrüstung besteht deshalb Bedarf an einem Wirkstoff, der klinisch aktiv gegen diese schwer zu behandelnden Erreger ist. Diese Rolle hat Daptomycin als Wirkstoff eingenommen (EMA 2015).

1.1.4 Antibiotika

Antibiotika sind Wirkstoffe, die zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen eingesetzt werden. Sie werden von Mikroorganismen wie bestimmten Bakterien oder Pilzen produziert, um konkurrierende Mikroorganismen in eukaryotischen Systemen am Wachstum zu hemmen oder abzutöten. Aus den natürlichen Antibiotika lassen sich auch die sogenannten halbsynthetischen Antibiotika ableiten, welche im Labor strukturell verändert wurden, um ihre Wirksamkeit zu erhöhen oder zu verschieben (Janeway 2009).

1.1.4.1 Daptomycin

Daptomycin ist ein Antibiotikum aus der Klasse der cyclischen Lipopeptide. Dieses leitet sich von einem Fermentationsprodukt von *Streptomyces roseosporus* ab und wurde Anfang der 1980er Jahren von *Eli Lilly and Company* entdeckt. Daptomycin besteht aus einem Ring

1 Einleitung

aus 13 Aminosäureresten (blau), welcher mit dem N-terminalen Tryptophan von drei Aminosäureresten (gelb), welche mit einer lipophilen Decansäureseitenkette (rot) verbunden sind. Die Strukturformel von Daptomycin, welches ein Molekulargewicht von 1620,67 g/mol hat, ist in folgender Abbildung dargestellt.

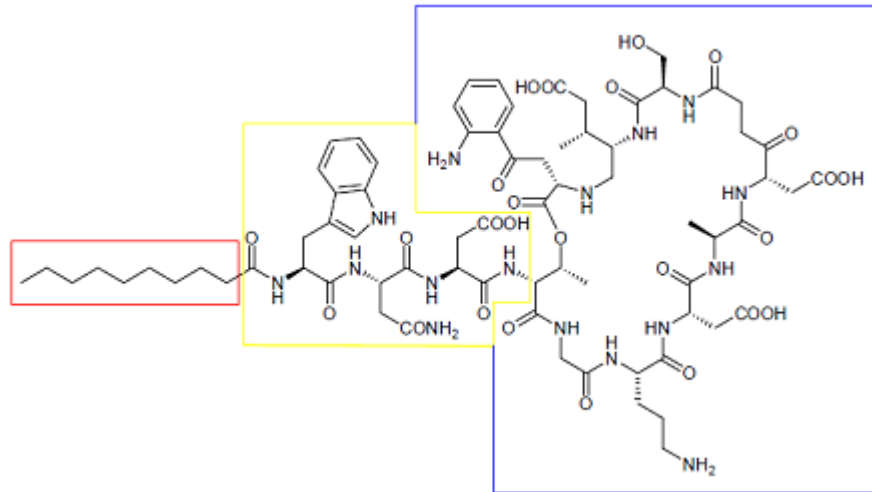


Abbildung 5: Strukturformel des Daptomycins (Rybak, 2004; eigene Abbildung)

Der genaue Wirkmechanismus ist nach heutigem Kenntnisstand noch nicht vollständig geklärt. Man ist sich aber sicher, dass der Lipidschwanz hierbei eine wichtige Rolle spielt (Silverman 2005). In wässriger Lösung bindet Calcium an Daptomycin, was zu einer konformativen Veränderung führt. Bei hoher Konzentration an Calcium ermöglicht es eine Oligomerisierung in wässriger Lösung (Muriah 2011). Die Wechselwirkung von Daptomycin und Calcium mit negativ geladenen Kopfgruppen von Phosphatidylglycerin bewirkt sowohl bei künstlichen PC/PG-Membranen als auch bei bakteriellen eine zweite Konformation, welche eine Oligomerisierung und ein tieferes Eindringen in die Membran nach sich zieht. In Abbildung 6 ist der postulierte Mechanismus veranschaulicht (Muriah 2011).

1 Einleitung

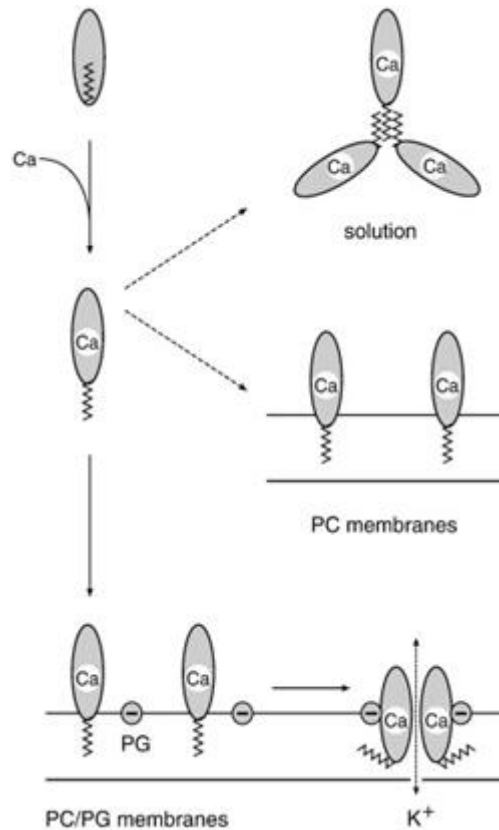


Abbildung 6: Daptomycinbindung an Membranen (Muriah 2011)

1.1.5 ESR-Spektroskopie

Voraussetzung zur Anwendung der ESR-Spektroskopie (*electron spin resonance*) in biologischen Systemen ist das Vorhandensein von ungepaarten Elektronen bzw. paramagnetischen Verbindungen. In vielen Fällen, z.B. bei der Untersuchung von biologischen Membranen oder Lipidvesikeln als Modelle biologischer Membranen, kann auf einen natürlichen Paramagnetismus nicht zurückgegriffen werden. Es müssen deshalb geeignete Radikale als Sonden in das System eingeführt werden. Solche stabilen organischen Radikalsonden bezeichnet man als Spinsonden oder Spinlabel.

1.1.5.1 Theoretische Grundlagen

Unter Elektronenspinresonanzspektroskopie versteht man die Absorption von elektromagnetischer Strahlung durch paramagnetische Substanzen in einem äußeren Magnetfeld, wobei Übergänge zwischen verschiedenen Energieniveaus der Elektronenspins induziert werden. Bei den Spins handelt es sich um den quantenmechanischen Eigendrehimpuls, für den es kein klassisches Analogon gibt.

Bringt man ein Radikal mit einem als frei zu betrachtenden Elektron in ein zeitlich konstantes

1 Einleitung

homogenes Magnetfeld B , so stellt sich das vom Eigendrehimpuls bzw. Spin des Elektrons herrührende magnetische Moment parallel oder antiparallel zur Magnetfeldrichtung. Somit kann bei der Anlegung eines äußeren Magnetfeldes ein ungepaartes Elektron zwei Energiezustände besetzen, deren Differenz

$$\Delta E = \gamma_{\varepsilon} \cdot \mu_B \cdot B$$

von der Stärke des äußeren Magnetfeldes abhängt. Diese Aufspaltung entarteter Energiezustände durch ein äußeres Magnetfeld wird, nach ihrem Entdecker, als Zeemann-Effekt bezeichnet. Wird dem System Energie

$$\Delta E = h \cdot \nu$$

in Form von elektromagnetischer Strahlung zugeführt, so kann ein Absorptionsprozess stattfinden, der einen Übergang vom energetisch tieferen zu dem höheren Niveau bewirkt, wobei die Resonanzbedingung

$$h \cdot \nu = \gamma_{\varepsilon} \cdot \mu_B \cdot B$$

erfüllt sein muss.

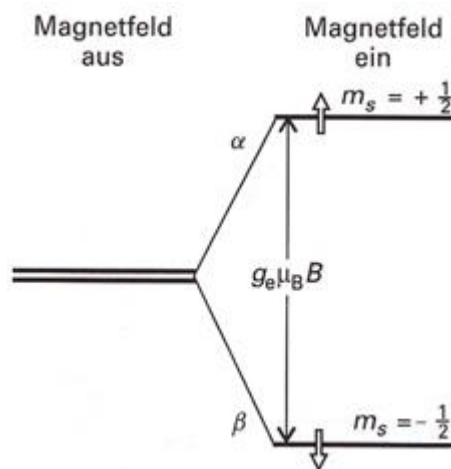


Abbildung 7: Aufspaltung entarteter Energieniveaus bei Anlegen eines externen Magnetfeldes (Atkins 2013)

Das magnetische Moment eines Elektronenspins tritt mit dem lokalen Magnetfeld in Wechselwirkung, so dass die Resonanzbedingung besser als

$$h \cdot \nu = \gamma_{\varepsilon} \cdot \mu_B \cdot B_{\text{lokal}} = \gamma_{\varepsilon} \cdot \mu_B \cdot (1 - \sigma) \cdot B$$

beschrieben wird. Hierbei ist es üblich

$$\gamma = (1 - \sigma) \cdot \gamma_{\varepsilon}$$

1 Einleitung

zu setzen, um die Resonanz eines Moleküls mit der des freien Elektrons in Beziehung zu setzen und um Abweichungen auszugleichen; a ist die Abschirmkonstante. Diese Abweichungen können durch Spin-Bahn-Kopplungen verursacht werden. Der g-Faktor ist das Verhältnis des gemessenen magnetischen Moments zu dem magnetischen Moment, das bei dem vorliegenden Drehimpuls nach der klassischen Physik theoretisch zu erwarten wäre. Dieser ist von der Orientierung der Spinsonde im äußeren Magnetfeld abhängig, d.h. je nach Richtung der Molekülachsen zum äußeren Magnetfeld erhält man unterschiedliche Werte für g .

Bei einem *continuous-wave*-Experiment wird mit konstanter Mikrowelle eingestrahlt und das Magnetfeld moduliert. Um ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten, wird die Messung als erste Ableitung registriert.

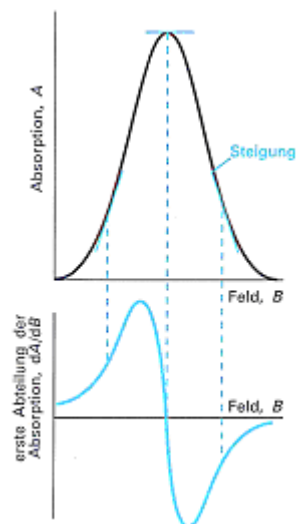


Abbildung 8: Absorption und erste Ableitung eines ESR-Signals (Atkins 2013)

1.1.5.2 Die Hyperfeinstruktur

Eine wichtige Eigenschaft des ESR-Spektrums ist die Hyperfeinstruktur. Darunter versteht man die Aufspaltung einzelner Resonanzlinien in mehrere Komponenten. Die Ursache der Hyperfeinstruktur in ESR-Spektren ist die Wechselwirkung zwischen dem Elektronenspin und den magnetischen Dipolmomenten der Kerne. Ein Atomkern mit dem Kernspin I kann $2I+1$ Einstellungen zum externen Magnetfeld annehmen, wodurch er selbst ein lokales Magnetfeld erzeugt, welches das externe Magnetfeld verstärkt oder abschwächt. So ergibt eine paramagnetische Substanz mit dem Elektronenspin S und dem Kernspin I ein ESR-Spektrum mit $2I+1$ Linien. Im Fall des Nitroxylradikals erhält man also eine Hyperfeinstruktur von 3 Linien (Berliner 1979).

1 Einleitung

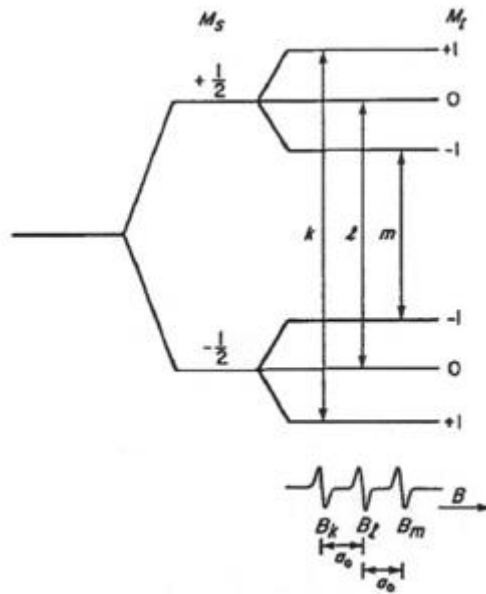


Abbildung 9: Hyperfeinaufspaltung (Wertz und Bolton 1972)

1.1.5.3 ESR-Spektren immobilisierter Proben

Befindet sich der Spinlabel in verdünnter Lösung, so ist das Molekül frei drehbar und die Anisotropie von a , der Hyperfeinkopplungskonstanten, und von g mittelt sich heraus. Durch zunehmende Einschränkungen der Radikalbeweglichkeit, z.B. durch Viskositätsänderung, Temperaturänderung, Bindungsänderungen, zeigen sich Anisotropieeffekte, die in der Asymmetrie der ESR-Spektren zum Ausdruck kommen. Solche anisotropen Spektren können unter anderem Informationen über die Wechselwirkung eines Spinlabels mit seiner Umgebung liefern. Die Fettsäureketten können in der fluiden Phase einer Membran Segmentbewegungen ausführen; diese werden durch einen Kegel mit dem Öffnungswinkel 2β begrenzt.

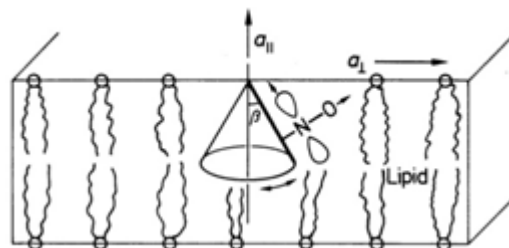


Abbildung 10: Anisotrope Bewegung einer Lipidradikalsonde in einer Lipidmembran um die Normale zur Membranoberfläche (Knowles 1976)

Hierbei handelt es sich um ein Beispiel für eine anisotrope Bewegung mit begrenzter Amplitude. Lipidsonden sind so konstruiert, dass die Achsen der Nitroxidgruppe eine

1 Einleitung

definierte Orientierung im molekularen Achsensystem haben. Hier ist die z-Achse als Richtung von \vec{B}_0 der Längsachse des Moleküls und gibt die Richtung der maximalen Hyperfeinaufspaltung A_{zz} an. Das am Nitroxidstickstoff lokalisierte p-Orbital ist in z-Richtung orientiert; A_{xx} und A_{yy} liegen senkrecht zur Längsachse des Moleküls. In einer Membran orientiert sich eine Sonde normalerweise parallel zur Membrannormalen.

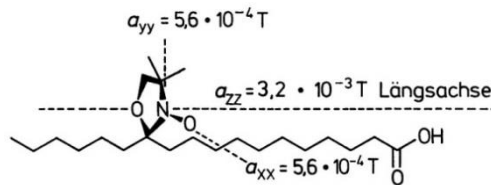
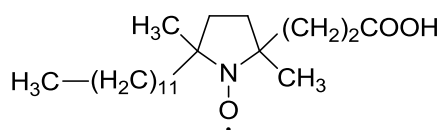


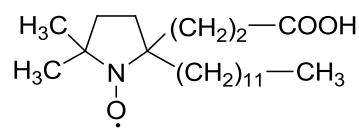
Abbildung 11: Achsensystem in einer Stearinsäure-Radikalsonde (Galla 1988)

1.1.5.4 Spinlabel-Phospholipide und ihre Membranfluidität

Um die Fluidität von Membranen zu untersuchen, greift man oftmals auf künstliche Liposomen zurück, die man mit Hilfe von Spinlabelverbindungen ESR-spektroskopisch untersuchen kann. Die Fluidität lässt sich mittels des A_{zz} -Wertes bestimmen und aus den Differenzen die Fluiditätsänderung. In dieser Arbeit werden sowohl Spinlabel-Fettsäuren als auch Spinlabellecithine herangezogen. Die in dieser Arbeit verwendeten Spinlabel-Fettsäuren sind in Position 4 markiert, die Lecithine in Position 5 und 12. Es handelt sich um die Verbindungen 4-Azetoxypalmitinsäure, 4-Proxypalmitinsäure, 5-Doxylphosphatidylcholin und 12-Doxylphosphatidylcholin.



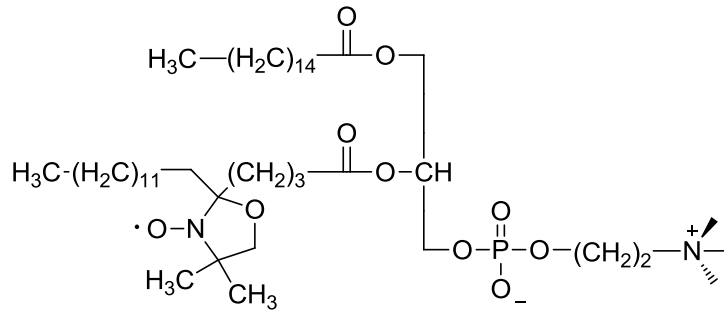
4-Azetoxypalmitinsäure



4-Proxypalmitinsäure

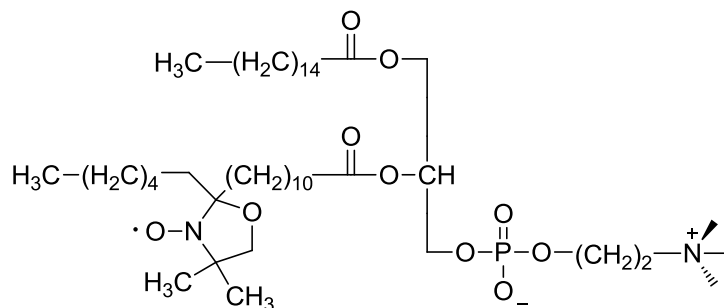
Abbildung 12: Verwendete Spinlabelfettsäuren (eigene Abbildung)

1 Einleitung



5-Doxylphosphatidylcholin

Abbildung 13: 5-Doxylphosphatidylcholin (eigene Abbildung)



12-Doxylphosphatidylcholin

Abbildung 14: 12-Doxylphosphatidylcholin (eigene Abbildung)

1.1.6 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die dynamische Lichtstreuung (*differential light scattering*) ist eine Methode, die sich polarisiertes Licht zu Nutze macht, bei der das Streulicht an einer gelösten bzw. suspendierten Probe analysiert wird. Diese Technik wird am häufigsten bei Polymeren und Biopolymeren angewandt, um den hydrodynamischen Radius der Moleküle zu bestimmen. Ein weiteres großes Anwendungsgebiet für die dynamische Lichtstreuung ist die Nanotechnologie. Hierbei ist die schnelle und präzise Größenbestimmung von Nanopartikeln verschiedenster Materialform und Herkunft möglich (Lottspeich 2012).

1.1.6.1 Grundlagen der DLS

Die dynamische Lichtstreuung bedient sich des an gelösten Makromolekülen und suspendierten Nanopartikeln gestreuten polarisierten Lichts. Hierbei kommt es aufgrund der Brownschen Molekularbewegung zu zeitlichen Änderungen bzw. Fluktuationen der

1 Einleitung

Streulichtintensität. Moderne Instrumente messen in sehr kurzen Zeitabständen die Streulichtintensität einer Probe und korrelieren die Messwerte miteinander. Eine definierte Korrelationsfunktion entsteht durch die unterschiedlich schnellen Bewegungen von großen und kleinen Makromolekülen. Über einen mathematischen Fit des Diffusionskoeffizienten D kann wiederum der hydrodynamische Radius R_h der gelösten Probe ermittelt werden:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta_0 R_h}$$

dabei ist k die Boltzmann-Konstante, T die absolute Temperatur und η_0 die dynamische Viskosität des Lösungsmittels. Ein großer Vorteil der DLS-Technik besteht darin, dass abgesehen von der Viskosität des Lösungsmittels und dessen Brechungsindex, keine weiteren Parameter für die Messung benötigt werden.

1.1.7 Lumineszenz

1.1.7.1 Fluoreszenz

Fluoreszenz ist neben der Phosphoreszenz eine Form der Lumineszenz. Bei Lumineszenz-Prozessen wird durch Lichtabsorption aufgenommene Energie durch spontane Emission wieder abgegeben. Bei der Fluoreszenz kehrt ein angeregtes Molekül unter Abgabe eines Photons in den Grundzustand zurück. Die Fluoreszenz unterscheidet sich von der Phosphoreszenz dadurch, dass sie in der Regel sehr viel schneller abklingt. Dies lässt sich dadurch erklären, dass es sich im Gegensatz zur Phosphoreszenz um einen spinerlaubten Übergang zwischen Zuständen gleicher Multiplizität handelt. Es können auch verzögerte Fluoreszenzen auftreten, aber auch diese finden zwischen Zuständen gleicher Multiplizität statt. Ob Fluoreszenz stattfindet, hängt von der Wechselwirkung des angeregten Moleküls mit seiner Umgebung ab. Ist die Wechselwirkung mit der Umgebung stark, dominiert der strahlungslose Zerfall der Anregungsenergie. Kann die Umgebung den aufgenommenen Betrag wegen schwächerer Wechselwirkungen aber nicht schnell genug abführen, wird die verbleibende Energie durch Emission abgegeben. Die Energie des emittierten Photons ist um den Betrag der Schwingungsenergie geringer als die des eingestrahlt Lichts, da die Schwingungsenergie durch Schwingungsrelaxation an die Umgebung abgegeben wird. Deshalb weist die Fluoreszenzstrahlung eine größere Wellenlänge auf als die einfallende Strahlung (Klessinger 1995).

1.1.7.2 Quenching

1 Einleitung

Bei der Emission handelt es sich um einen monomolekularen Deaktivierungsprozess. Aber auch bimolekulare Prozesse können eine wichtige Rolle bei der Deaktivierung von angeregten Zuständen spielen. Man spricht hierbei von Anregungslöschung (*quenching*), wobei speziell die Unterdrückung der Emission durch Energieübertragungsprozesse als Strahlungslöschung bezeichnet wird. Fluoreszenzlöschung ist ein sehr verbreitetes Phänomen und es gibt zahlreiche verschiedene Mechanismen der Strahlungslöschung. Bei den zwischenmolekularen Deaktivierungsprozessen spielen vielfach Stöße zwischen einem angeregten Molekül M^* und einem Löschermolekül Q eine wichtige Rolle. Bei fluoreszierenden Stoffen beobachtet man häufig mit zunehmender Konzentration eine Abnahme der Quantenausbeute der Fluoreszenz. Dieses Phänomen wird als Selbstlöschung (*self-quenching*) bezeichnet (Klessinger 1995).

1.1.8 *Scanning Electron Microscopy (SEM)*

Ein Elektronenmikroskop bildet die Oberfläche eines Objekts mit Hilfe von Elektronen ab. Da schnelle Elektronen eine sehr viel kleinere Wellenlänge als sichtbares Licht haben und das Auflösungsvermögen eines Mikroskops durch die Wellenlänge begrenzt ist, kann mit einem Elektronenmikroskop eine deutlich höhere Auflösung erreicht werden als mit einem Lichtmikroskop. Hierbei wird der Elektronenstrahl mit Hilfe einer Glühkathode und einer Lochanode erzeugt. Zwischen diesen besteht eine Potentialdifferenz von etwa 100 Volt. Die Kondensorlinse fokussiert den Elektronenstrahl in der Objektebene, wo er das Präparat durchdringt und anschließend von der Objektivlinse aufgeweitet wird (Lottspeich 2012).

1.1.9 *Atomic Force Microscopy (AFM)*

Mittels Rasterkraftmikroskopie ist es möglich, Strukturen zu erkennen, die mit herkömmlichen optischen Mikroskopen aufgrund der Welleneigenschaften des Lichtes und der damit verbundenen Auflösungsgrenze nicht mehr differenziert darstellbar sind. Neben dem Elektronenmikroskop ist Rasterkraftmikroskopie damit eines der wichtigsten Werkzeuge in der Oberflächenchemie und dient der Abtastung von Oberflächen auf Nanometerskala. Im Vergleich zur Elektronenmikroskopie kann bei der Rasterkraftmikroskopie eine quantitativere Aussage über die Oberfläche gemacht werden, allerdings ist die Auflösung dieser bei handelsüblichen Geräten geringer.

Hierbei wird eine nanoskopisch kleine Nadel, die an einer Blattfeder, dem sogenannten *cantilever*, befestigt ist, in Interaktion mit der Probe gebracht. Durch Messung und Kontrolle dieser Wechselwirkung der Nadel mit der Probenoberfläche ist es möglich, ein dreidimensionales Bild ihrer Morphologie zu erstellen, ohne sie dabei zu beschädigen.

1 Einleitung

Das Mikroskop besteht dabei, wie in Abbildung 15 zu erkennen, aus folgenden Bauteilen: einem Scanner, auf dem die Probe in einem Probenhalter fest positioniert wird und der so die Anordnung von Nadel und Probe relativ zueinander definiert. Darüber befindet sich die Nadel am Ende des flexiblen *cantilevers*. Zur Messung der Ablenkung der Nadel wird ein Laserstrahl auf das hintere Ende des *cantilevers* gerichtet. Der dort reflektierte Laserstrahl wird durch Spiegel auf einen aus vier Photodioden aufgebauten positionssensitiven Photodetektor gelenkt, auf dem er zu Beginn der Messung zentriert wurde. So lässt sich auf der Photodiode die Auslenkung des *cantilevers* und somit der Nadel auf der Probenoberfläche detektieren (Lottspeich 2012).

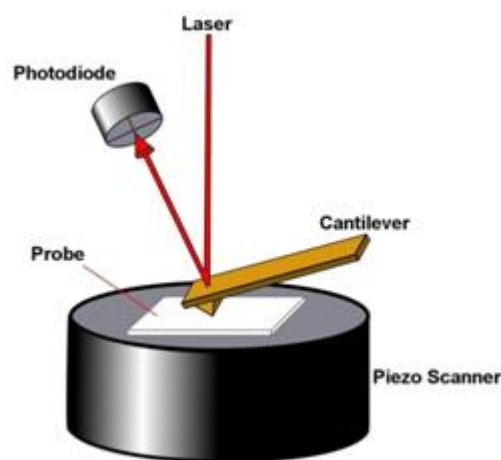


Abbildung 15: Schematischer Aufbau eines AFM (JPK 2015)

Primär wird bei der Messung zwischen bildgebenden und spektroskopischen Verfahren unterschieden.

Mit ersteren lässt sich die Beschaffenheit der Oberfläche, ihre Topographie, darstellen. Hierbei kann die Nadel entweder in direktem Kontakt mit der Oberfläche stehen (*contact mode*), so dass durch ihre Auslenkung auf Unebenheiten der Probenoberfläche rückgeschlossen werden kann. Oder der *cantilever*, an dessen Unterseite sich die Nadel befindet, wird durch eine externe Kraft in periodische Schwingung versetzt und kontaktlos in die Nähe der Probe gebracht (*non-contact mode*). Um so ein Bild der Oberflächenmorphologie zu erhalten, werden Frequenzänderungen in der Schwingung des *cantilevers* gemessen, die durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit der Probenoberfläche zustande kommen.

Mittels AFM lassen sich außer Informationen über die reine Topographie der Probe durch spektroskopische Messverfahren zusätzlich sogenannte Kraft-Kurven gewinnen. Diese geben Aufschluss über die konkrete Interaktion von Probe und Nadel und führen zu Erkenntnissen

1 Einleitung

über mechanische und chemische Eigenschaften der Probe, wie zum Beispiel deren Elastizität, Plastizität und Leitfähigkeit (Manual Nanowizzard III, JPK).

1.2 Immunsuppression bei *Myasthenia gravis*

1.2.1 Immunsystem

Das Immunsystem ist das Verteidigungssystem des Körpers. Bakterien, Viren, andere Pathogene oder auch entartete Zellen, die im Organismus entstehen, werden vom Immunsystem erkannt und vernichtet. Man unterscheidet dabei zwei Systeme.

Das erste System bildet die unspezifische Immunabwehr. Sie ist angeboren und unterscheidet nicht zwischen den einzelnen infektiösen Partikeln. Innerhalb dieses Systems lassen sich zwei Verteidigungslinien abgrenzen.

Die erste Abwehrlinie besteht aus der Haut und den Schleimhäuten, die den Körper nach außen gegen die Umwelt und ihre Krankheitserreger abgrenzen und eine natürliche physikalische Barriere bilden.

Die zweite unspezifische Verteidigungslinie befindet sich im Körperinneren. Sie beruht hauptsächlich auf Phagozytose, also der Aufnahme von Keimen in bestimmte Typen von weißen Blutkörperchen (Leukozyten). Dabei gibt es verschiedene Klassen von Phagozyten.

Neutrophile machen den größten Teil der Leukozyten aus und können gezielt in infiziertes Gewebe vordringen.

Einen weitaus geringeren Teil ergeben die Monozyten, die in ein Gewebe einwandern und dort zu Makrophagen, großen Fresszellen, heranreifen.

Ebenfalls zur unspezifischen Immunantwort zählen auch die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Sie greifen allerdings nicht direkt Mikroorganismen an, sondern zerstören infizierte und entartete Zellen des eigenen Körpers.

Das zweite System ist die spezifische Immunabwehr. Sie besteht nicht von Geburt an, sondern muss im Laufe der Zeit erworben werden. Gebildet wird das spezifische Abwehrsystem von den Lymphozyten. Sie erkennen und eliminieren bestimmte Mikroorganismen und körperfremde Stoffe und reagieren entsprechend spezifisch.

Die Lymphozyten werden nach dem Ort der Prägung unterteilt. B-Zellen werden im Knochenmark (*bone marrow*, ursprünglich *bursa fabricii* bei Vögeln), T-Zellen im Thymus gebildet. Bei Antigenkontakt profilieren sie und differenzieren zu den endgültigen

1 Einleitung

Effektorzellen. Aus den B-Zellen werden Antikörper-produzierende Plasmazellen. Die wichtigsten T-Effektorzellen sind die T-Killerzellen und die T-Helferzellen. Die T-Killerzellen töten körpereigene Zellen, an denen sich Fremddantigene befinden (wie z.B. nach einer Virusinfektion), direkt ab. Die T-Helferzellen spielen eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen (Janeway 2009).

1.2.2 *Myasthenia gravis*

Myasthenia gravis (schwere Muskelschwäche) ist eine Autoimmunkrankheit mit Störung der neuromuskulären Reizübertragung. Dabei zerstört das Immunsystem das eigene Nervensystem, indem körpereigene Antikörper die nikotinergen Acetylcholinrezeptoren im synaptischen Spalt der motorischen Endplatten angreifen und somit die Reizweiterleitung blockieren (Pschyrembel 2013). Es kommt zu Störungen der Motorik und im Endstadium der Krankheit wird die Muskulatur derart beeinflusst, dass es zum Tod durch Atem- oder Herzstillstand kommen kann.

1.2.2.1 Mechanismus

Die Skelettmuskulatur des Körpers wird von Motoneuronen innerviert, die ihren Ursprung in den Spinalnerven des Rückenmarks haben. Die Motoneurone münden an den Muskelzellen in die motorische Endplatte und bilden dort eine Synapse. Diese Synapse wird in drei Bereiche unterteilt. Der erste Bereich ist der präsynaptische Anteil, der das Ende des Neurons darstellt, der zweite ist der postsynaptische Anteil, der bereits zum innervierten Muskel gehörig ist und der dritte ist der synaptische Spalt, der den Raum zwischen prä- und postsynaptischer Struktur darstellt.

Der präsynaptische Anteil enthält Vesikel, die mit Acetylcholin gefüllt sind. Gelangt nun ein Nervenimpuls in diese präsynaptische Endigung, verschmelzen die Vesikel mit der präsynaptischen Membran und das Acetylcholin wird in den synaptischen Spalt ausgeschüttet. Diese Transmittermoleküle binden dann an die in der postsynaptischen Membran befindlichen Acetylcholinrezeptoren. Diese Bindung hat zur Folge, dass sich der Ionenkanal im Rezeptor öffnet, Natriumionen einströmen und der Muskel kontrahiert (Janeway 2009).

1 Einleitung

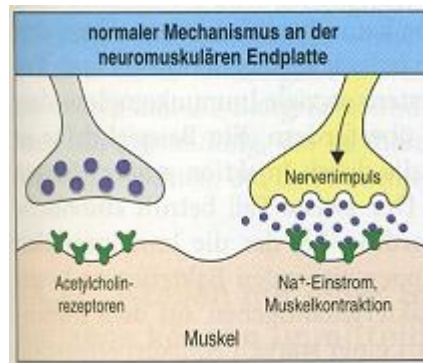


Abbildung 16: Reizübertragung an gesundem Muskel (Janeway 2009)

Der Acetylcholinrezeptor ist ein Transmembranprotein und besteht aus fünf Untereinheiten: zwei identischen α -Untereinheiten und je einer β -, γ - und δ -Untereinheit (Alberts 2012).

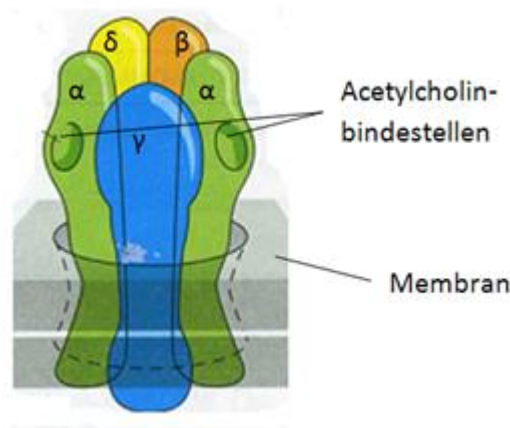


Abbildung 17: Darstellung des Acetylcholinrezeptors (Janeway 2009)

Myasthenia gravis wird dadurch verursacht, dass Autoantikörper an die α -Untereinheit des Acetylcholinrezeptors binden. Dadurch wird der Rezeptor blockiert und für Acetylcholin unzugänglich gemacht. Darüber hinaus wird der Rezeptor in die Zelle aufgenommen und dort intrazellulär abgebaut. Aus diesem Grund wird die Anzahl der Acetylcholinrezeptoren in der postsynaptischen Membran immer weiter verringert und der Muskel reagiert immer schlechter auf das vom Motoneuron ausgeschüttete Acetylcholin, bis schließlich keine Kontraktion mehr ausgelöst werden kann und Muskellähmung auftritt (Janeway 2009).

1 Einleitung

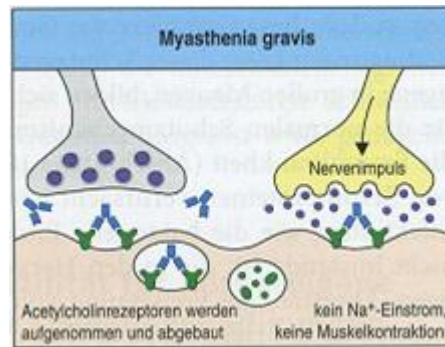


Abbildung 18: Reizübertragung bei *Myasthenia gravis* (Janeway 2009)

1.2.2.1.1 Ribosomen-inaktivierende Proteine (RIPs)

RIPs gehören zur Familie der Polynukleotid-Adenosin-Glykosidasen (PNAG). Sie inaktivieren eukaryotische Ribosomen irreversibel, indem sie an der 60S-Untereinheit der Ribosomen eine Purinbase abspalten. Dadurch wird die Translation unterbrochen, die Proteinexpression gestoppt und die Zelle stirbt.

Man unterscheidet zwei Typen von RIPs, die Typ1-RIPs und die Typ2-RIPs. Die Typ2-RIPs bestehen aus einem RIP, oder A-Kette, an das ein lectinartiges Protein (B-Kette) kovalent über eine Disulfidbrücke gebunden ist. Diese B-Kette verfügt über Affinität für Zelloberflächenkohlenhydrate. Sie lagert sich an die Zelle an und führt durch diese Bindung zur Internalisierung des RIP-A-Kettenbestandteils, wodurch der Tod der Zelle eintritt. Typ2-RIPs sind demnach starke Cytotoxine. Das am besten untersuchte Beispiel ist Ricin.

Zum anderen gibt es die Typ1-RIPs. Sie besitzen nur eine Polypeptidkette, deren Aktivität äquivalent zu der A-Kette der Typ2-RIPs ist. Sie haben keine kovalent gebundene B-Kette und können daher nicht in die Zellen eingeschleust werden. Somit sind die Typ1-RIPs für intakte Zellen ungiftig (Stirpe 1980, Hossann 2006).

1.2.2.1.2 Gelonin

Gelonin ist ein Protein aus dem Samen der Pflanze *Gelonium multiflorum*. Es gehört zum Typ1 der Ribosomen-inaktivierenden Proteine. Die Inaktivierung beruht auf der Abspaltung eines Adenins der 60S-Untereinheit. Zunächst bilden die RIPs mit dem ersten Adenosin der GAGA-Sequenz in der Haarnadelstruktur der 28S-rRNA einen Komplex. Anschließend wird die Bindung zwischen dem Purinring und dem Zucker hydrolysiert. Die Abspaltung des Adenins verhindert das Binden des Elongationsfaktors EF2 an die 60S-Untereinheit bei der Translation; diese wird gestoppt und die Proteinexpression kommt zum Erliegen.

1 Einleitung

Da Gelonin zu den Typ1-RIPs gehört, kann es eukaryotische Zellen nicht eigenständig penetrieren. Somit ist es für intakte Zellen des menschlichen Körpers ungiftig (Stirpe 1980).

Fusioniert man Gelonin mit der α -Untereinheit des Acetylcholinrezeptor und bringt dieses Konjugat in einen Organismus mit der Krankheit *Myasthenia gravis*, greifen die Lymphozyten mit passendem T-Zell-Rezeptor den konjugierten AChR an und phagozytieren das Gelonin zusammen mit dem Rezeptor. Unter normalen Umständen würden diese B-Zellen daraufhin Antikörper gegen den AChR bilden. Da die Zellen jedoch durch das Gelonin abgetötet werden, kommt es nicht zur Antikörperproduktion und die Zelle stirbt ab (Urbatsch 1990, Hossann 2006).



Abbildung 19: Gelonin (TARGA 2011)

1.2.2.1.3 *Molecular mimicry* als mögliche Therapie gegen *Myasthenia gravis*

Molecular Mimicry bezeichnet das Verbergen bakterieller, viraler oder parasitärer Oberflächenmoleküle vor der Immunabwehr des Wirts. Diese Moleküle werden deshalb nicht vom Immunsystem erkannt, weil ähnliche oder gleiche Substanzen auch im Wirt vorkommen. Da der Wirtsorganismus gegen die eigenen Moleküle im Normalfall keine Antikörper bildet, werden diese Bestandteile des Pathogens nicht als Antigen erkannt.

T-Zellen und Antikörper-produzierende B-Zellen werden während ihrer Reifung auf Selbstkompatibilität überprüft. Wenn sie körpereigene Substanzen erkennen, werden sie eliminiert. Falls jedoch sogenannte Autoantikörper diese Selektion überstehen, können sie an *mimicry*-Moleküle binden. Folglich kommt es zu einer Immunreaktion, bei der zahlreiche Antikörper sezerniert werden, die gegen dieses *mimicry*-Antigen gerichtet sind.

1 Einleitung

Ziel des Projektes ist es, ein Konjugat aus der α -Untereinheit des Acetylcholinrezeptors und Gelonin herzustellen.

Als erstes bindet die autoreaktive Immunzelle mit ihren Rezeptoren an das Konjugat und nimmt es mittels Endozytose auf. In der Zelle wird das Konjugat durch *coated vesicles* zum Endosom transportiert. Im Endosom dissoziiert der Komplex und es erfolgt eine Translokation zum Trans-Golgi-Netzwerk. Von dort aus gelangt das Toxin ins Cytosol und schließlich zum Ribosom. Dort kommt es zur Hemmung der Proteinbiosynthese und zum Zelltod.

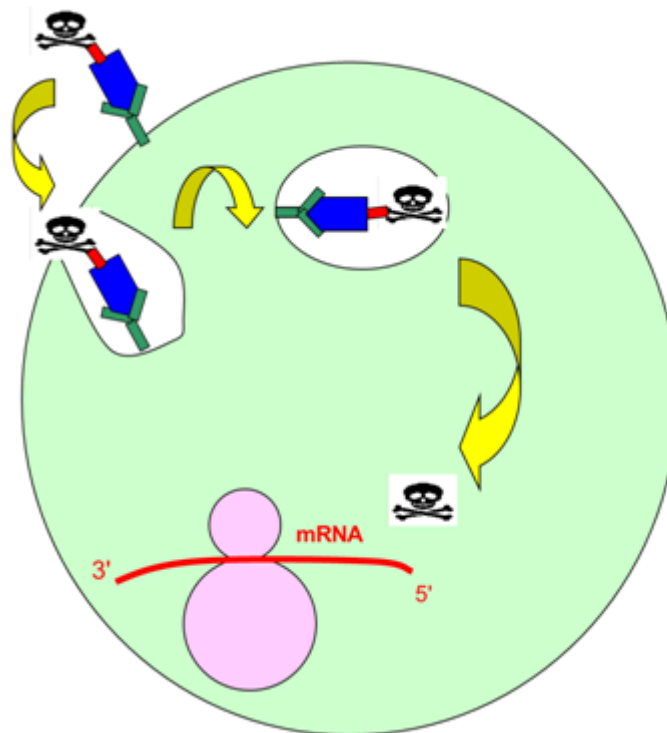


Abbildung 20: Mechanismus des Systems (eigener Arbeitskreis)

Im Arbeitskreis wurden zunächst Versuche auf Proteinebene durchgeführt, bei denen der Acetylcholinrezeptor aus *Torpedo californica* mit Gelonin aus *Gelonium multiflorum* chemisch gekoppelt wurde. Hierbei ergab sich allerdings, dass der ungekoppelte Acetylcholinrezeptor sich nicht vollständig von dem Konjugat abtrennen ließ (Urbatsch 1993).

Als nächstes wurde versucht, ein verkürztes Stück der α -Untereinheit des Acetylcholinrezeptors mit Gelonin rekombinant zu koppeln. Dies war erfolgreich, allerdings hatte das Protein ein niedriges Löslichkeitsprodukt und seine Niederschläge ließen sich nur sehr schwer zurückfalten. Mit dem renaturierten Protein wurden Tierversuche an Lewis-Ratten (Abbildung 21) durchgeführt, die vielversprechende Ergebnisse lieferten. Hier zeigte

1 Einleitung

sich, dass durch die Gabe des Proteins bei der Therapiegruppe die Symptome fast vollständig verschwanden (Hossann 2004).

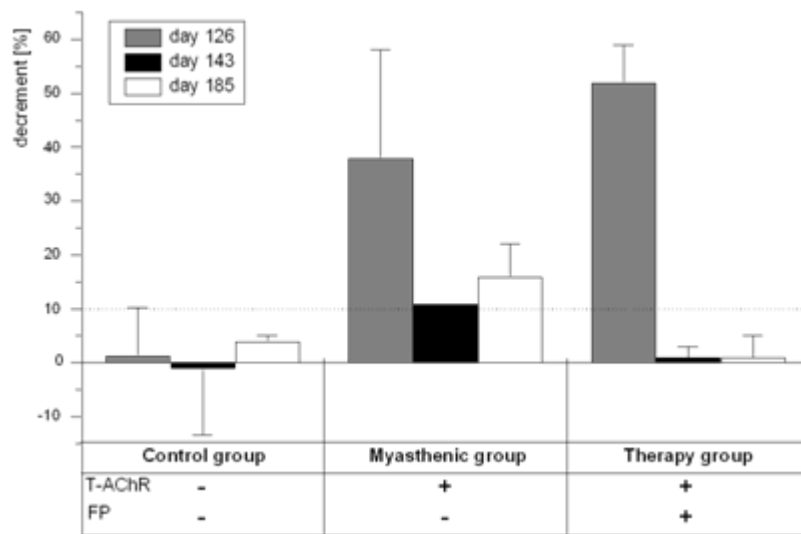


Abbildung 21: Erste Versuche an Lewis-Ratten (Hossann 2004)

2 Problemstellung

2.1 Daptomycin

Ziel dieses Projekts ist es, den Einfluss des cyclischen Polypeptids Daptomycin auf die Membranfluidität zu untersuchen.

Der postulierte Wirkmechanismus des Antibiotikums Daptomycin konnte bisher noch nicht vollständig geklärt werden. Im Rahmen dieser Dissertation sollte zunächst untersucht werden, inwiefern sich Daptomycin auf die Fluidität der Bakterienmembran auswirkt. Es wurde geplant, ESR-Messungen mit Liposomen aus Lipiden und solchen aus gram-negativen und gram-positiven Bakterien durchzuführen. In die Liposomen wurde eine Spinlabelsonde eingeführt. Aus der Änderung der Hyperfeinkonstante A_{zz} zog man Rückschlüsse auf die Membranbeweglichkeit.

Außerdem sollte Massen-, UV/VIS- und Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt werden. Mikroskopische Messungen sollten mittels Elektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie durchgeführt werden. Die Größe der Liposomen wurde mit differentieller Lichtstreuung bestimmt.

2 Problemstellung

2.2 Immunsuppression

Eine Therapiemöglichkeit für die Autoimmunerkrankung *Myasthenia gravis* ist ein Konjugat aus der α -Untereinheit des Acetylcholinrezeptors und Gelonin. Da dieses Fusionsprotein nur schwer löslich ist, sollte das Konjugat zusätzlich mit einem Löslichkeitstag verbunden werden.

Die zur Synthese eines solchen Konjugats notwendigen Plasmide waren im Arbeitskreis vorhanden. Das Plasmid pET-gel codiert für Gelonin und die DNA-Sequenz für die α -Untereinheit des Acetylcholinrezeptors war bereits in den pAChRex-Vektor inkloniert. Der Löslichkeitstag MBP ist im Plasmid pmal-c5x enthalten.

Auf Basis dieser Plasmide wurde folgende Klonierungsstrategie entwickelt:

Der von Hossann modifizierte Vektor, der den verlängerten AChR-Abschnitt enthielt, wurde mit *HindIII* und *EcoRI* geschnitten und das Insert AChRex in den Vektor pUC18 inkloniert. Die Vektoren pUC18AChRex und pET-gel sollten mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *HindIII* geschnitten werden. Dabei wird das Gelonin aus seinem Plasmid herausgeschnitten und nach Isolierung in den durch die Restriktionsenzyme aufgeschnittenen pUC18AChRex-Vektor, der den genetischen Code für den AChR enthält, inkloniert. Die DNA-Sequenzen von Gelonin und dem AChR sollten im Vektor ligiert und anschließend in kompetente Zellen des *E. coli*-Stammes BL21(DE3) transformiert werden. Da sich zwischen dem AChR- und dem Gelonin nach der Ligation noch das in der DNA-Sequenz des Gelonins vorhandene Stopcodon befindet, muss dieses mittels gezielter Mutagenese entfernt werden.

Das so synthetisierte Konjugat sollte im Folgenden mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *EcoRI* herausgeschnitten werden. Da sich jedoch innerhalb des Konjugats eine weitere Schnittstelle für *EcoRI* befindet, muss diese Schnittstelle vorher wiederum mit gezielter Mutagenese modifiziert werden.

Letztendlich sollte das derart synthetisierte Fusionsprotein in den Vektor pmal-c5x umkloniert werden, um dort mit dem Löslichkeitstag MBP verbunden zu werden. Hierfür werden die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *NdeI* verwendet.

Nach Beendigung der Restriktion sollte demnach ein pmal-c5x-Vektor vorliegen, der für ein MBP-Gel-AChR-Konjugat codiert. Dieser kann als Grundlage zur Expression des Proteins dienen.

3 Ergebnisse

3 Ergebnisse

3.1 Daptomycin

3.1.1 Liposomenpräparation

Lipidvesikel oder Liposomen sind künstlich hergestellte wässrige Kompartimente, die durch eine Lipiddoppelschicht begrenzt sind. Die wässrige Phase stellt dabei ein Modell für das Cytoplasma dar, die Lipiddoppelschicht für die Zellmembran.

3.1.1.1 Liposomen aus Lipid Mix

Ein zuvor gebildeter dünner Lipidfilm, der aus übereinanderliegenden Doppelschichten besteht, quillt bei der Hydratisierung mit einem polaren Lösungsmittel auf und es bilden sich große multilamellare Vesikel (*large multilamellar vesicles*, LMV). Durch Behandlung der LMV mit Ultraschall bilden sich kleine unilamellare Vesikel (*small unilamellar vesicles*, SUV) mit einem Durchmesser von 15 bis 50 nm. Man kann die Verkleinerung der LMV auch durch Fließpressen über einen geeigneten Filter erreichen (Lasic 1997, Avanti 2015). Die im Folgenden verwendeten Liposomen wurden nach Kapitel 4.1.10.1 hergestellt.

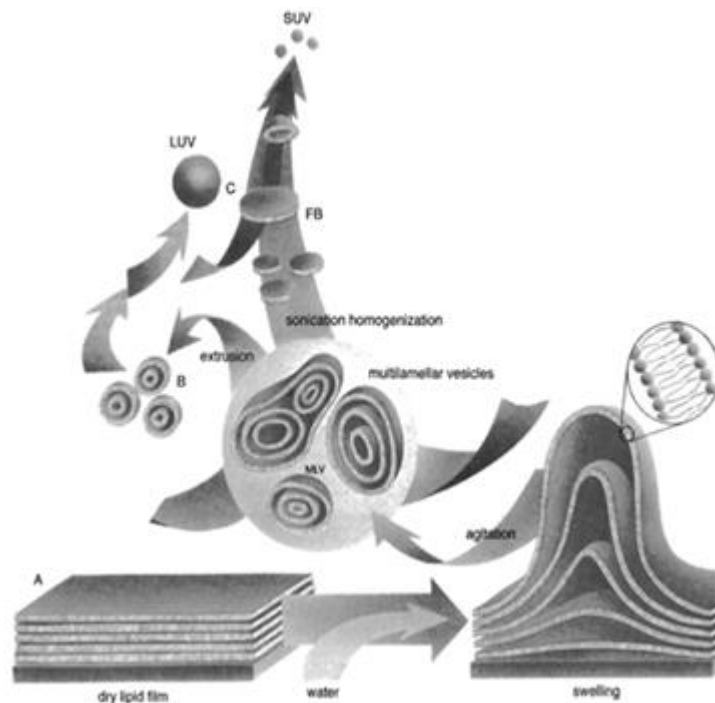


Abbildung 22: Mechanismus der Liposomenformation (Avanti Polar Lipids, 2015)

3 Ergebnisse

3.1.1.2 Liposomen aus Bakterien

Bei der Herstellung von Liposomen aus Bakterien wurde nach der Methode von Kaback (Kaback 1971) und Poole (Poole 1993) gearbeitet. Diese ist in Kapitel 4.1.10.3 beschrieben. Die Methode basiert auf einer selektiven Zentrifugation sowie Aufschluss der Zellen durch Lysozym bzw. Ultraschall. Abschließend werden die Liposomen synthetisiert, indem man sie im Ultraschallbad formt.

3.1.2 *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation* (MALDI)

Daptomycin ist ein cyclisches Lipopeptid, das außer zwei konjugierten π -Systemen in zwei Aminosäuren über keine weiteren π -Systeme verfügt. Trotzdem ist das Natriumsalz ein gelber Feststoff. Um auszuschließen, dass es sich hierbei um eine Verunreinigung handelt, wurde mittels Massenspektrometrie ein MALDI-Spektrum aufgenommen. Die Probe wurde nach Kapitel 4.1.6 präpariert und wurde im MALDI vermessen.

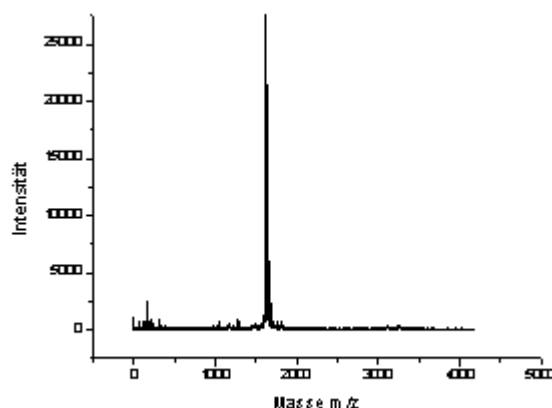


Abbildung 23: MALDI-Messung von Daptomycin mit HCCA als Matrix

Die MALDI-Messungen zeigen, dass keine Verunreinigungen in der Probe waren, die für die Farbe verantwortlich sind. Die Farbe rührt also von den Aminosäuren mit konjugierten π -Systemen her.

3.1.3 *Electron Spray Ionisation* (ESI)

Bei dem Wirkmechanismus von Daptomycin sind zwei Varianten möglich. Zum einen kann Daptomycin an zwei Ca^{2+} -Ionen binden und danach mit der einfach positiven Ladung an die negative Membran. Die andere Möglichkeit besteht darin, dass die Ca^{2+} -Ionen sich zuerst an die negative Membran anlagern und diese dadurch positiv geladen ist. An diese bindet dann

3 Ergebnisse

das negativ geladene Daptomycin. Um dieses zu untersuchen, sollte mittels ESI-Messungen gezeigt werden, ob in der Gasphase Calciumionen an Daptomycin binden. Hierzu wurde zuerst mittels ESR-Spektroskopie festgestellt, ob Daptomycin selektiv an Calciumionen bindet. Die Proben wurden nach Kapitel 4.1.7 hergestellt. Es wurden unterschiedliche Kationen getestet und der $2A_{zz}$ -Wert bestimmt.

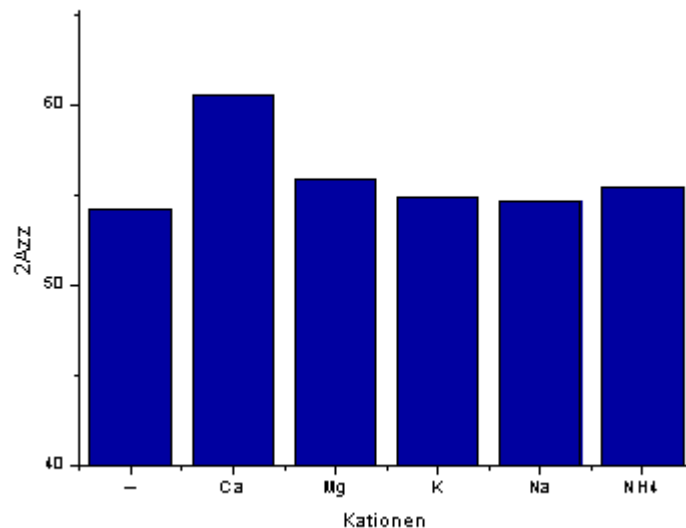


Abbildung 24: $2A_{zz}$ -Werte von *E. coli* Lipid Mix Liposomen mit unterschiedlichen Kationen (10 mM) als Gegenionen zu Daptomycin (5mM)

Kationen	$2A_{zz}/G$
-	54,2
Ca ²⁺	60,5
Mg ²⁺	55,9
K ⁺	54,9
Na ⁺	54,6
NH ₄ ⁺	55,4

Tabelle 1: $2A_{zz}$ -Werte von *E. coli* Lipid Mix Liposomen mit unterschiedlichen Kationen (10 mM) als Gegenionen zu Daptomycin (5mM)

Zuerst wurde Daptomycin in Tris-Puffer gemessen, was einen zweifachen A_{zz} -Wert von 54,2 ergab. Danach wurde die Messung mit zusätzlich 5 mM CaCl₂-Lösung durchgeführt. Es ergab

3 Ergebnisse

sich eine Veränderung der Fluidität. Der $2A_{zz}$ -Wert betrug nun 60,5. Weitere Messungen, in denen die Kationen variiert wurden, zeigten, dass für die Änderungen der A_{zz} -Werte und somit für die Beweglichkeit der Membran ausschließlich Ca^{2+} -Ionen verantwortlich sind.

3.1.3.1 Neutraler pH-Wert: Ca^{2+}

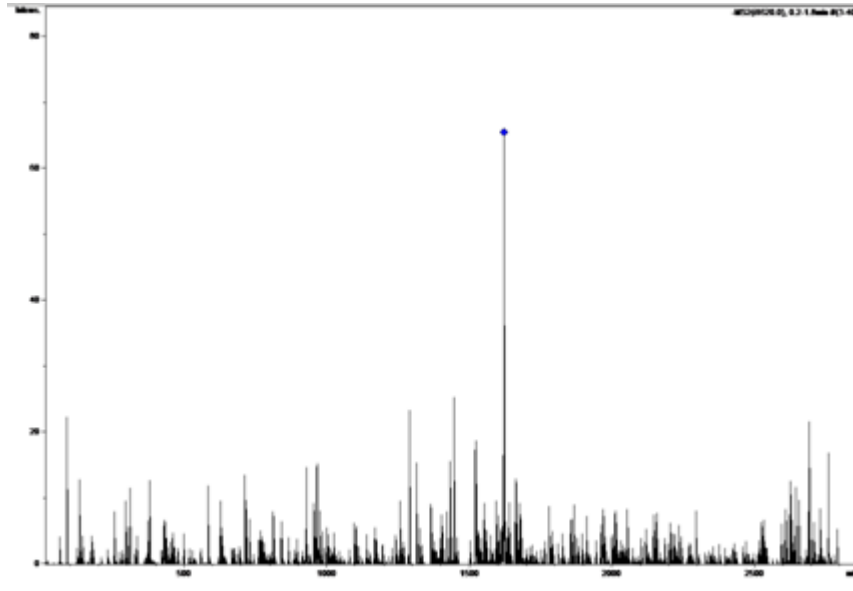


Abbildung 25: ESI-Spektrum von 5 mM Daptomycin und 10 mM Ca^{2+} bei neutralem pH-Wert

Zuerst wurde ein ESI-Spektrum bei physiologischen pH-Wert aufgenommen, um eine physiologische Umgebung zu simulieren. Bei dieser Messung war das Signal/Rausch-Verhältnis so schlecht, dass keine eindeutige Aussage möglich war.

3 Ergebnisse

3.1.3.2 Saurer pH-Wert: Ca^{2+}

In einem nächsten Schritt wurde die Probe mit Phosphorsäure angesäuert und dann wiederum mittels ESI vermessen.

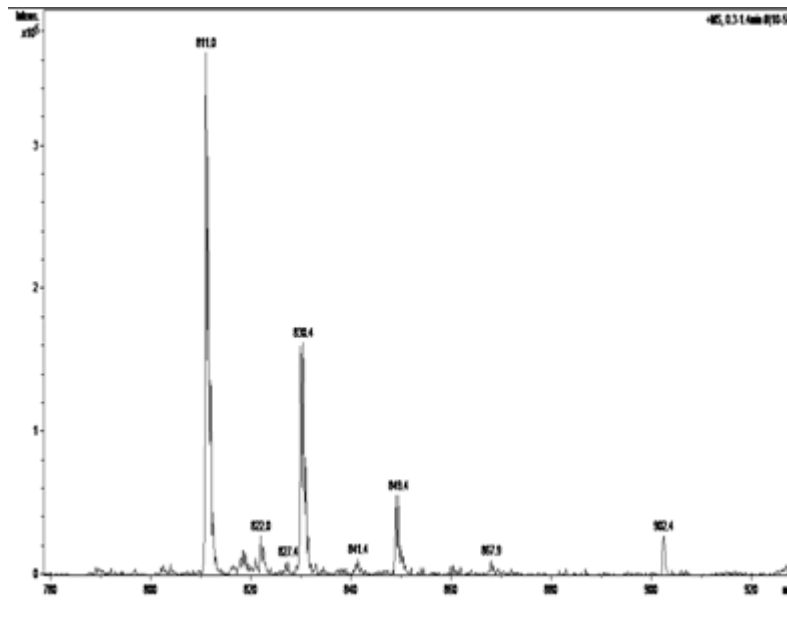


Abbildung 26: ESI-Spektrum von 5 mM Daptomycin und 10 mM Ca^{2+} bei saurem pH-Wert

Signal	Masse/Ladung
Daptomycin	811
Daptomycin mit 1x Ca^{2+}	832
Daptomycin mit 2x Ca^{2+}	849

Tabelle 2: Masse der gemessenen Signale einer 5mM Daptomycinlösung mit 10 mM Ca^{2+}

Diese Messungen zeigen, dass sowohl ein als auch zwei Äquivalente Calciumionen an Daptomycin binden.

3 Ergebnisse

3.1.3.3 Saurer pH-Wert: Mg^{2+}

Anschließend wurde die Messung analog mit Magnesiumionen durchgeführt.

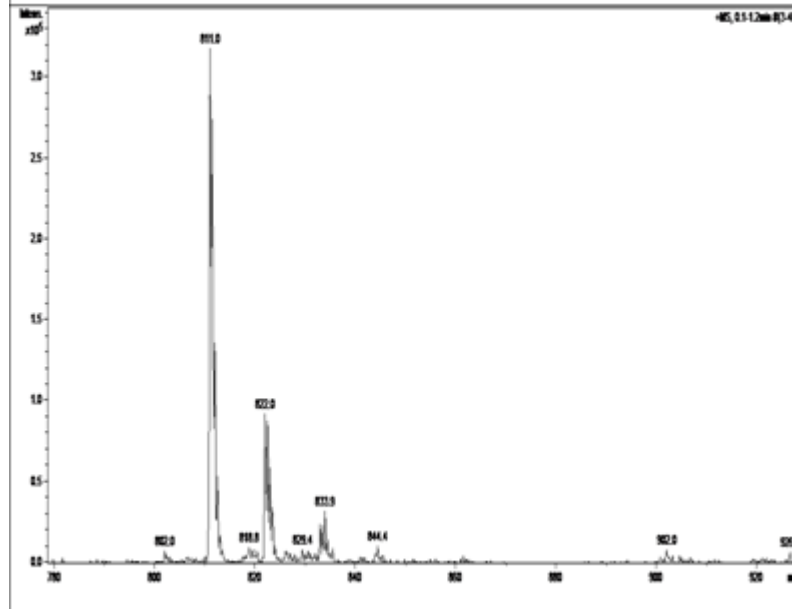


Abbildung 27: ESI-Spektrum von 5 mM Daptomycin und 10 mM Mg^{2+} bei saurem pH-Wert

Signal	Masse/Ladung
Daptomycin	811
Daptomycin mit 1x Mg^{2+}	822
Daptomycin mit 2x Mg^{2+}	833

Tabelle 3: Masse der gemessenen Signale einer 5 mM Daptomycinlösung mit 10 mM Ca^{2+}

Hier zeigte sich allerdings, dass Magnesiumionen in der Gasphase ebenfalls an Daptomycin binden. Dies steht im Widerspruch zur ESR-Messung in wässriger Phase und ist darauf zurückzuführen, dass, im Gegensatz zur flüssigen Phase, in der Gasphase Magnesiumionen elektrostatisch an Daptomycin binden. Dadurch lässt sich leider mittels ESI-MS kein aussagekräftiger Hinweis auf den Mechanismus geben.

3.1.4 Calciumbestimmung

Ein Teil der folgenden Messungen wurde in fötalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) durchgeführt, um eine eukaryotische Umgebung zu simulieren. Um sicherzugehen, dass die

3 Ergebnisse

Ca²⁺-Konzentration ausreichend hoch ist, wurde diese in der Analytik-Abteilung der Organischen Chemie mittels Königwasseraufschluss bestimmt.

Probe	Konzentration/mM
Kälberserum	1,55 Ca ²⁺

Tabelle 4: Ca²⁺ Konzentration in FCS

Es ergab sich eine Konzentration von 1,55 mM Ca²⁺.

3.1.5 Differential Light Scattering (DLS)

Bei DLS handelt es sich um eine Methode, mit der die Größe von Partikeln bestimmt werden kann. Hierzu wird das Streulicht eines Lasers analysiert und danach auf den hydrodynamischen Radius R_h geschlossen. Die Größenbestimmung wurde bei allen Liposomensystemen durchgeführt.

3.1.5.1 Liposomen aus Lipid Mix

In dieser Versuchsreihe wurden die Größen von Liposomen, hergestellt aus Lipid Mix, ermittelt. Die Liposomen wurden nach Kapitel 4.1.10.1 hergestellt. Abbildung 28 zeigt die gemessenen Werte.

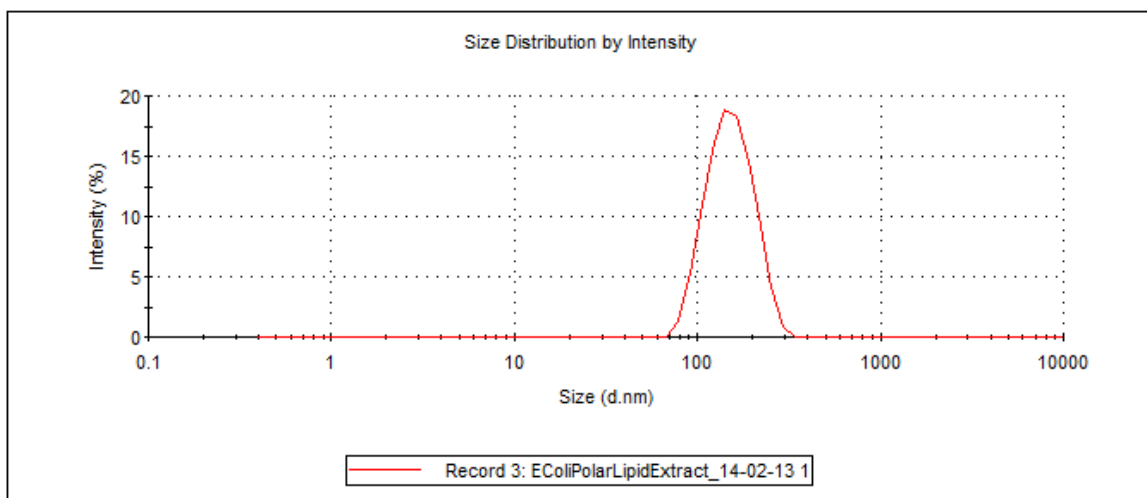


Abbildung 28: DLS-Messung der Liposomen aus Lipid Mix

Aus Abbildung 28 ist zu entnehmen, dass der durchschnittliche hydrodynamische Radius der Liposomen bei 368 nm liegt und eine Polydispersität von 47 % vorliegt.

3 Ergebnisse

3.1.5.2 Liposomen aus PG und PC

In dieser Versuchsreihe wurden die Größen von Liposomen, hergestellt aus 25 % PG und 75 % PC, mittels DLS gemessen. Die Liposomen wurden nach 2.7.11 präpariert. Abbildung 29 zeigt die gemessenen Werte.

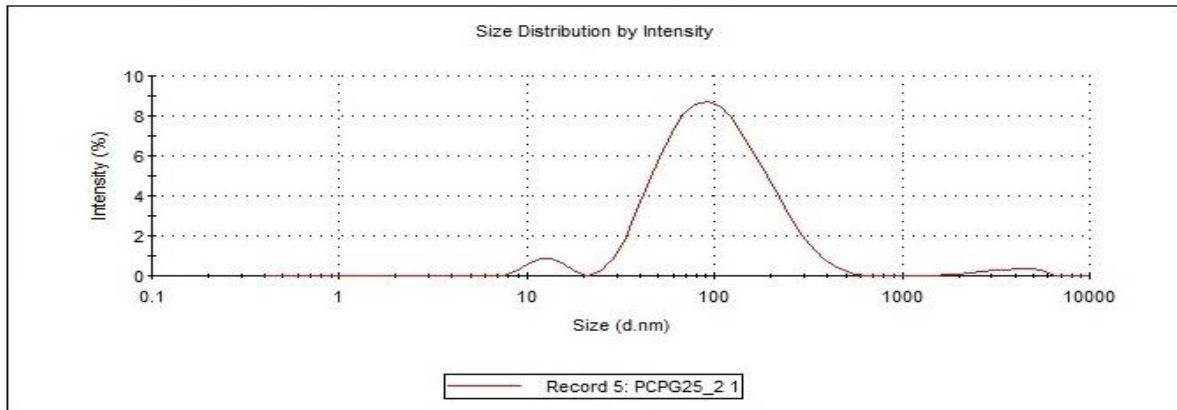


Abbildung 29: DLS-Messung der Größe von Liposomen aus PG und PC

Aus Abbildung 29 ist zu entnehmen, dass der durchschnittliche hydrodynamische Radius der Liposomen bei 79 nm liegt und eine Polydispersität von 30 % vorliegt.

3.1.5.3 Liposomen aus gram-positiven Bakterien (*B. subtilis*)

In dieser Versuchsreihe wurden die Größen von Liposomen, hergestellt aus gram-positiven Bakterien, mittels DLS gemessen. Die Liposomen wurden nach 4.1.10.3 hergestellt. Die Abbildung 30 zeigt die gemessenen Werte.

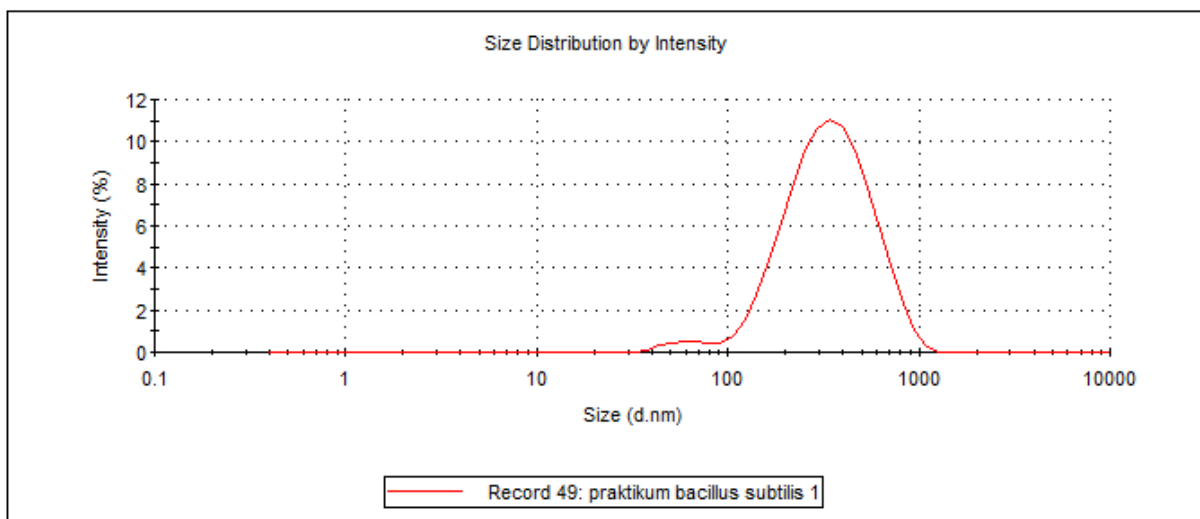


Abbildung 30: DLS-Messung der Größe von Liposomen aus gram-positiven Bakterien

3 Ergebnisse

Aus Abbildung 30 ist zu entnehmen, dass der durchschnittliche hydrodynamische Radius der Liposomen bei 274 nm liegt und eine Polydispersität von 26 % vorliegt.

3.1.5.4 Liposomen aus gram-negativen Bakterien (*E. coli*)

In dieser Versuchsreihe wurden die Größen von Liposomen, hergestellt aus gram-negativen Bakterien, mittels DLS gemessen. Die Liposomen wurden nach 4.1.10.3 hergestellt. Die Abbildung 31 zeigt die gemessenen Werte.

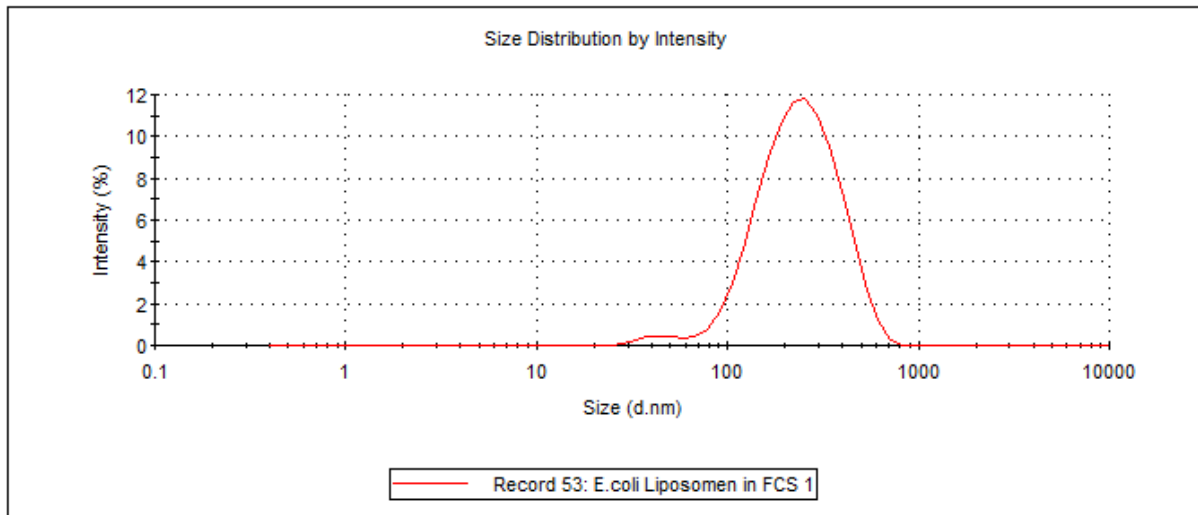


Abbildung 31: DLS-Messung der Größe von Liposomen aus gram-negativen Bakterien

Aus Abbildung 31 zu entnehmen, dass der durchschnittliche hydrodynamische Radius der Liposomen bei 201 nm liegt und eine Polydispersität von 26 % vorliegt.

3.1.6 Optische Dichtemessung mit verschiedenen Bakterienkulturen

In dieser Versuchsreihe wurden sowohl die gram-negativen als auch die gram-positiven Bakterienkulturen bei 37° C untersucht. Der in Abbildung 31 dargestellte Verlauf zeigt die optische Dichte in Abhängigkeit von der Zeit; gram-negative Bakterien jeweils ohne Daptomycin, mit einer Konzentration von 3 µg/mL Daptomycin und einer Konzentration von 10 µg/mL Daptomycin. Die Messungen wurden analog zu Kapitel 4.1.9 durchgeführt.

3 Ergebnisse

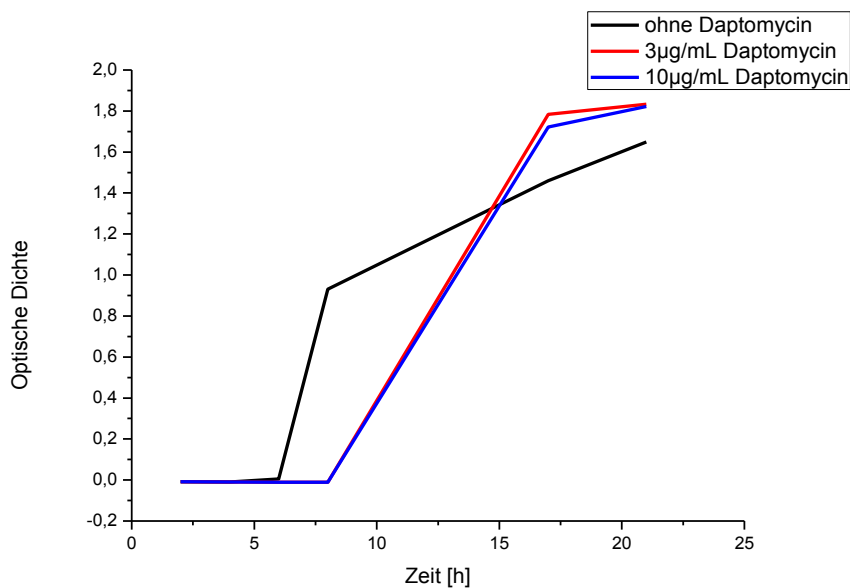


Abbildung 32: OD-Verlauf gram-negativer Zellen über einen Zeitraum von 21 h: ohne Daptomycin (schwarz), 3 µg/mL Daptomycin (rot) und 10 µg/mL (blau)

Zeit [h]	Ohne Daptomycin	3 µg/mL Daptomycin	10 µg/mL Daptomycin
2	0,09	-0,01	-0,01
4	-0,10	-0,01	-0,01
6	0,06	-0,01	-0,01
8	0,96	-0,01	-0,01
17	1,46	1,78	1,72
21	1,64	1,83	1,82

Tabelle 5: OD-Verlauf gram-negativer Zellen über einen Zeitraum von 21 h: ohne Daptomycin (schwarz), 3 µg/mL Daptomycin (rot) und 10 µg/mL (blau)

3 Ergebnisse

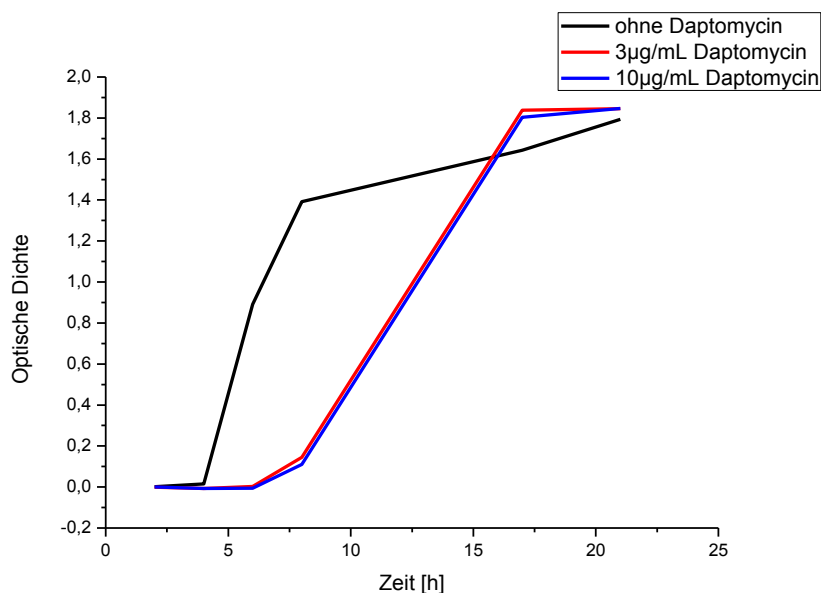


Abbildung 33: OD-Verlauf gram-positiver Zellen über einen Zeitraum von 21 h: ohne Daptomycin (schwarz), 3 µg/mL Daptomycin (rot) und 10 µg/mL (blau)

Zeit [h]	Ohne Daptomycin	3 µg/mL Daptomycin	10 µg/mL Daptomycin
2	0,00	0,00	0,00
4	0,01	-0,01	-0,01
6	0,89	0,00	-0,01
8	1,39	0,14	0,11
17	1,64	1,83	1,80
21	1,79	1,85	1,85

Tabelle 6: OD-Verlauf gram-positiver Zellen über einen Zeitraum von 21 h: ohne Daptomycin (schwarz), 3 µg/mL Daptomycin (rot) und 10 µg/mL (blau)

Aus den OD-Messungen lässt sich die Wachstumsrate der Bakterienkulturen ablesen. Je größer die optische Dichte ist, desto mehr Zellen liegen vor. Allerdings lässt sich nicht unterscheiden, ob die Bakterien leben oder tot sind. Bei dieser Versuchsdurchführung kann mit Hilfe der optischen Dichte geklärt werden, ob sich das Wachstum der Bakterienkulturen von verschiedenen Daptomycinkonzentrationen beeinflussen lässt. Es wurden sowohl gram-positive als auch gram-negative Zellen untersucht. Bis jetzt wurde publiziert, dass Daptomycin ausschließlich gegen gram-positive Keime wirkt. Dies lässt sich mit diesen Ergebnissen nicht bestätigen, da beide Kulturen im Wachstum verzögert wurden. Dies

3 Ergebnisse

bedeutet, dass Daptomycin auch bei gram-negativen Infektionen eingesetzt werden könnte und sich so das Wirkspektrum vergrößert.

3.1.7 Elektronenspin-Resonanzspektroskopie (ESR)

Um die Beweglichkeit eines Membransystems zu untersuchen, ist die ESR-Spektroskopie die ideale Methode, da der A_{zz} -Wert eine Aussage über diese macht. Man benutzt hierzu Spinlabel-markierte Fettsäuren, die in das System eingeführt werden. Im Folgenden wurden die Messungen nach Kapitel 4.1.11 vorgenommen.

3.1.7.1 Temperaturabhängigkeiten der Fluidität

Die Membranfluidität eines Systems verändert sich mit der Temperatur. Um zu sehen, wie groß diese ist, wurde in einem Bereich von 298 K (Standardtemperatur) bis 310 K (physiologische Temperatur) der $2A_{zz}$ -Wert gemessen. Da es sich bei Liposomen um metastabile Systeme handelt, wurden im Folgenden alle Messungen zuerst bei 298 K durchgeführt und danach erst bei 310 K. Die Liposomen wurden nach 4.1.11 hergestellt und ESR-spektroskopisch vermessen.

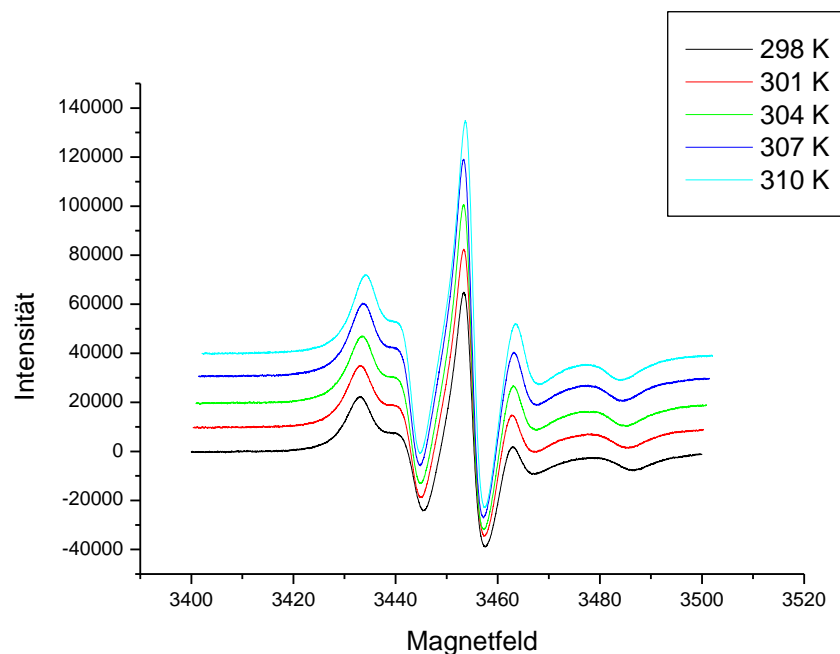


Abbildung 34: Temperaturabhängigkeit der Fluidität in Liposomen aus *E. coli* Lipid Mix 5-Doxylphosphatidylcholin als Spinlabel im Bereich von 298 K bis 310 K

3 Ergebnisse

Temperatur	$2A_{zz}/G$
298 K	53,4
301 K	52,1
304 K	51,3
307 K	50,7
310 K	49,8

Tabelle 7: Temperaturabhängigkeit der Fluidität in Liposomen aus *E. coli* Lipid Mix 5-Doxylphosphatidylcholin als Spinlabel im Bereich von 298 K bis 310 K

Aus Tabelle 7 lässt sich ersehen, dass der $2A_{zz}$ -Wert mit steigender Temperatur kontinuierlich abnimmt. Dies hängt damit zusammen, dass mit Erhöhung der Temperatur die Mobilität der Lipide zunimmt und dadurch auch die Fluidität der Membran; somit sinkt der $2A_{zz}$ -Wert. Mit dieser Messreihe konnte verifiziert werden, dass die hergestellten Vesikel empfindlich gegenüber Temperaturänderungen sind und man dies ESR-spektroskopisch verfolgen kann.

3.1.7.2 Messungen mit Lipid Mix von *Avanti Polar Lipids*

3.1.7.2.1 Messungen mit 12-Doxylphosphatidylcholin

Es wurden Messungen an Liposomen durchgeführt, die 12-Doxylphosphatidylcholin enthielten. Die Liposomen wurden so hergestellt, dass 4 % w/w Spinlabel in der Membran enthalten war. Die Liposomen wurden nach Kapitel 4.1.11 hergestellt und ESR-spektroskopisch vermessen. Hierbei wurde zuerst eine Messreihe durchgeführt, bei der nur die entsprechenden Ca^{2+} -Konzentrationen zu den Liposomen gegeben wurde. Es wird postuliert, dass Daptomycin in Lösung dreifach negativ geladen ist (Silverman 2005). Deshalb wurden alle folgenden Messungen sowohl mit einem als auch mit zwei Äquivalenten Ca^{2+} -Ionen durchgeführt.

3 Ergebnisse

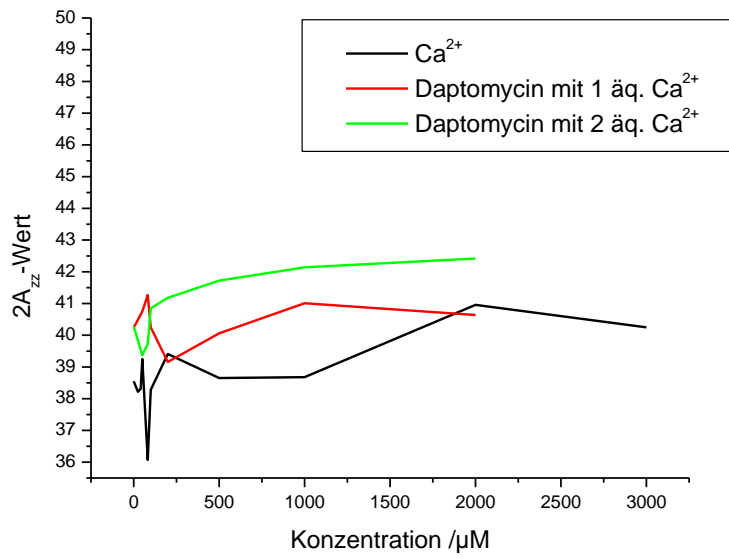


Abbildung 35: $2A_{zz}$ -Werte der Messungen von *E. coli* Lipid Mix Liposomen mit 12-Doxylphosphatidylcholin: zweifache Ca^{2+} -Konzentration (schwarz), Daptomycinkonzentration mit einem Äquivalent Ca^{2+} (rot) und Daptomycinkonzentration mit zwei Äquivalenten Ca^{2+}

3 Ergebnisse

c(Dap)/ μ M	2A _{zz} /G	c(Dap)/ μ M	2A _{zz} /G	c(Dap)/ μ M	2A _{zz} /G
0	38,55	0	40,24	0	40,28
25	38,22	50	40,75	50	39,37
41	38,31	82	41,27	82	39,72
50	39,25	100	40,25	100	40,85
82	36,07	200	39,16	200	41,18
100	38,28	500	40,06	500	41,72
200	39,41	1000	41,01	1000	42,14
500	38,65	2000	40,64	2000	42,42
1000	38,68	3000	-	3000	-
2000	40,96	4000	-	4000	-
3000	40,25	5000	-	5000	-
4000	-				
5000	-				

Tabelle 8: 2A_{zz}-Werte der Messungen von *E. coli* Lipid Mix Liposomen mit 12-Doxylphosphatidylcholin bei 298 K: zweifache Ca²⁺-Konzentration (schwarz), Daptomycinkonzentration mit einem Äquivalent Ca²⁺ (rot) und Daptomycinkonzentration mit zwei Äquivalenten Ca²⁺

Es zeigte sich, dass durch die Zugabe von Ca²⁺-Ionen die Fluidität der Membran nicht verändert wurde. Man konnte lediglich feststellen, dass bei hoher Ca²⁺-Zugabe die Liposomen zum Teil ausfallen, da Ca²⁺ an die negative Membran bindet und die Liposomen aggregieren (Seelig 1984).

Bei den Messungen mit Daptomycin und Ca²⁺-Ionen konnte keine signifikante Änderung der Fluidität festgestellt werden. Dies lässt den Schluss zu, dass Daptomycin keine Änderung in der Fluidität hervorruft bzw. ausschließlich an der Oberfläche der Membran wirkt. Deshalb wurde im Folgenden 5-Doxylphosphatidylcholin als Sonde eingesetzt.

3 Ergebnisse

3.1.7.2.2 Messungen mit 5-Doxylphosphatidylcholin

Da bei den Messungen mit 12-Doxylphosphatidylcholin keine Veränderung der Fluidität festgestellt werden konnte, wurden die folgenden Messungen mit 5-Doxylphosphatidylcholin durchgeführt. Die Liposomen wurden nach Kapitel 4.1.11 hergestellt und vermessen. Die Messung wurde als erstes bei Standardtemperatur (298 K) durchgeführt.

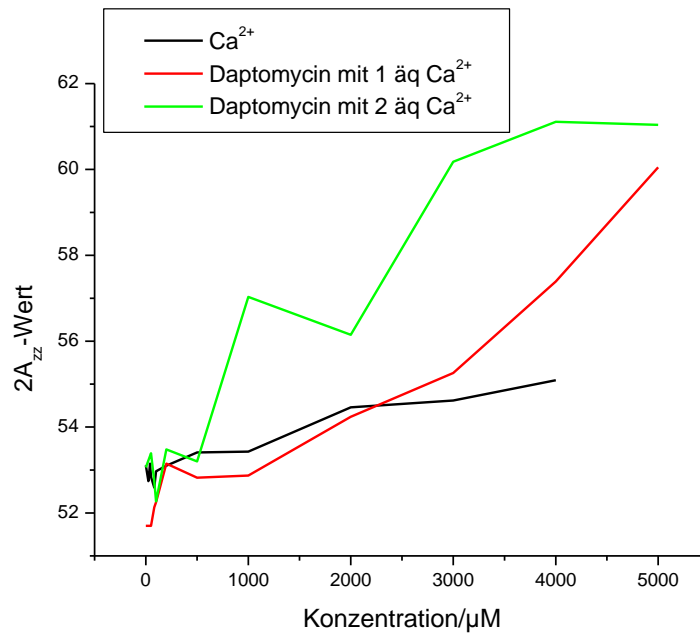


Abbildung 36: 2A_{zz}-Werte der Messungen von *E. coli* Lipid Mix Liposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 298 K: zweifache Ca²⁺-Konzentration (schwarz), Daptomycinkonzentration mit einem Äquivalent Ca²⁺ (rot) und Daptomycinkonzentration mit zwei Äquivalenten Ca²⁺

3 Ergebnisse

c(Dap)/ μ M	$2A_{zz}/G$	c(Dap)/ μ M	$2A_{zz}/G$	c(Dap)/ μ M	$2A_{zz}/G$
0	53,11	0	51,70	0	53,06
25	52,74	50	51,70	50	53,39
41	53,15	82	52,13	82	52,74
50	52,84	100	52,25	100	52,27
82	52,59	200	53,15	200	53,48
100	52,97	500	52,82	500	53,20
200	53,10	1000	52,87	1000	57,03
500	53,41	2000	54,24	2000	56,15
1000	53,43	3000	55,26	3000	60,18
2000	54,46	4000	57,39	4000	61,11
3000	54,62	5000	60,05	5000	61,04
4000	55,09				
5000	-				

Tabelle 9: $2A_{zz}$ -Werte der Messungen von *E. coli* Lipid Mix Liposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 298 K: zweifache Ca^{2+} -Konzentration (schwarz), Daptomycinkonzentration mit einem Äquivalent Ca^{2+} (rot) und Daptomycinkonzentration mit zwei Äquivalenten Ca^{2+}

Zuerst wurde wieder eine Messung durchgeführt, bei der ausschließlich Ca^{2+} -Ionen und Liposomen verwendet wurden. Hier wurde keine Änderung der Fluidität festgestellt. Bei hohen Konzentrationen kam es wieder zur Aggregation der Liposomen.

Danach wurden die Messungen mit Daptomycin mit einem und zwei Äquivalenten Ca^{2+} -Ionen durchgeführt. Man sieht bei beiden Kurven, dass mit steigenden Konzentrationen die $2A_{zz}$ -Werte steigen und somit die Fluidität sinkt. Dies lässt den Schluss zu, dass die Anlagerung von Daptomycin direkt an der Lipiddoppelschicht erfolgt, was im Vergleich zu handelsüblichen Antibiotika sehr ungewöhnlich ist. Es erfolgt eine eingeschränkte Fluidität an der Oberfläche. Dies lässt die Vermutung zu, dass sich der Fettsäureschwanz als Anker in die Membran einlagert, die Aminosäuren an der Oberfläche bleiben und eine Krümmung der Membran hervorgerufen wird, da sich bei den Messungen mit 12-Doxylphosphatidylcholin

3 Ergebnisse

keine Änderung zeigte .

Das Ziel besteht darin, möglichst nahe an den physiologischen Bedingungen zu arbeiten, deshalb wurden die folgenden Messungen bei 310 K durchgeführt. Alle anderen Parameter wurden konstant gehalten. Zuerst wurde wiederum die Hyperfeinaufspaltung bei Zugabe von 2 Äq. Ca^{2+} -Ionen bestimmt. Diese änderte sich kaum und es kam bei hohen Konzentrationen zur Liposomenaggregation. Bei Zugabe von Daptomycin und jeweils 1 und 2 Äq. Ca^{2+} -Ionen trat eine Änderung des $2A_{zz}$ -Wertes auf, der mit dem bei 298 K vergleichbar ist.

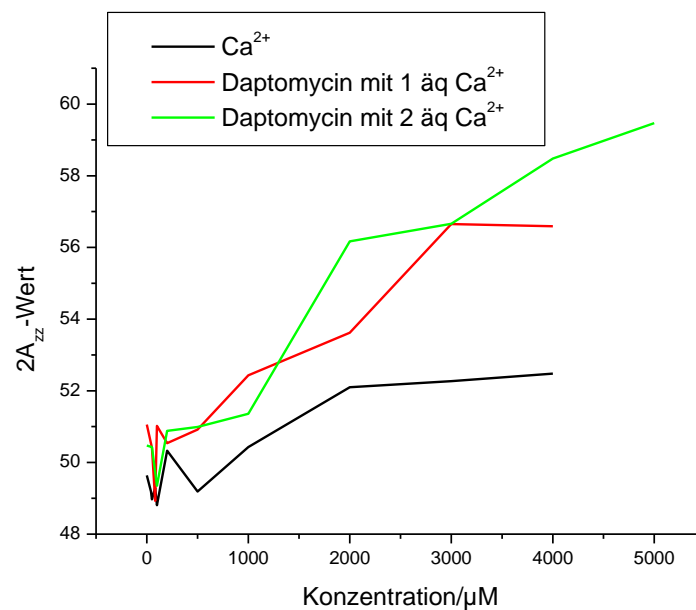


Abbildung 37: $2A_{zz}$ -Werte der Messungen von *E. coli* Lipid Mix Liposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 310 K: zweifache Ca^{2+} -Konzentration (schwarz), Daptomycinkonzentration mit einem Äquivalent Ca^{2+} (rot) und Daptomycinkonzentration mit zwei Äquivalenten Ca^{2+}

3 Ergebnisse

c(Dap)/ μ M	2A _{zz} /G	c(Dap)/ μ M	2A _{zz} /G	c(Dap)/ μ M	2A _{zz} /G
0	49,64	0	51,06	0	50,47
41	49,19	50	50,41	50	50,43
50	48,97	82	48,93	100	49,35
82	49,29	100	51,02	200	50,88
100	48,81	200	50,54	500	50,99
200	50,33	500	50,92	1000	51,36
500	49,19	1000	52,43	2000	56,17
1000	50,43	2000	53,62	3000	56,66
2000	52,10	3000	56,65	4000	58,48
3000	52,27	4000	56,59	5000	59,47
4000	52,48	5000	-		
5000	-				

Tabelle 10: 2A_{zz}-Werte der Messungen von *E. coli* Lipid Mix Liposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 310 K: zweifache Ca²⁺-Konzentration (schwarz), Daptomycinkonzentration mit einem Äquivalent Ca²⁺ (rot) und Daptomycinkonzentration mit zwei Äquivalenten Ca²⁺

Um eine Restriktion des Assays durch Calciumionen bei niedrigen Konzentrationen auszuschließen, wurde die nächste Messreihe bei physiologischer Calciumkonzentration durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass sich bei niedrigen Daptomycinkonzentrationen der 2A_{zz}-Wert ebenfalls kaum ändert. Die niedrige Ca²⁺-Konzentration ist also in den vorhergehenden Messungen nicht der restriktive Faktor.

3 Ergebnisse

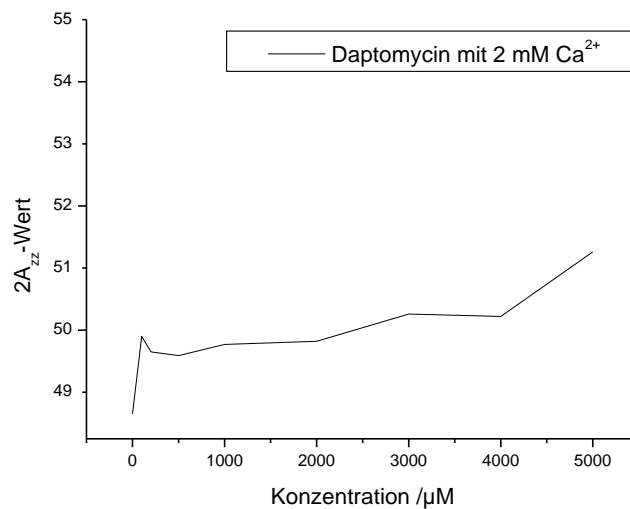


Abbildung 38: 2A_{zz}-Werte der Messungen von *E. coli* Lipid Mix Liposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 298 K: Daptomycinkonzentration mit 2mM Ca²⁺

c(Dap)/µM	2A _{zz} /G
0	48,65
100	49,90
200	49,65
500	49,59
1000	49,77
2000	49,82
3000	50,26
4000	50,22
5000	51,26

Tabelle 11: 2A_{zz}-Werte der Messungen von *E. coli* Lipid Mix Liposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 298 K: Daptomycin mit 2 mM Ca²⁺

3 Ergebnisse

3.1.7.3 Messungen mit Liposomen aus Phosphatidylcholin und Phosphatidylglycerol

Durch die vorhergehenden Messungen liegt es nahe, dass 2 Äquivalente Ca^{2+} -Ionen an das dreifach negativ geladene Daptomycin binden. Dies lässt vermuten, dass der Daptomycin- Ca^{2+} -Komplex, der nun einfach positiv geladen ist, an die negativ geladene Membran bindet.

Hierzu wurden zuerst Liposomen aus dem ungeladenen Phosphatidylcholin nach Kapitel 4.1.11 hergestellt und ESR-spektroskopisch untersucht.

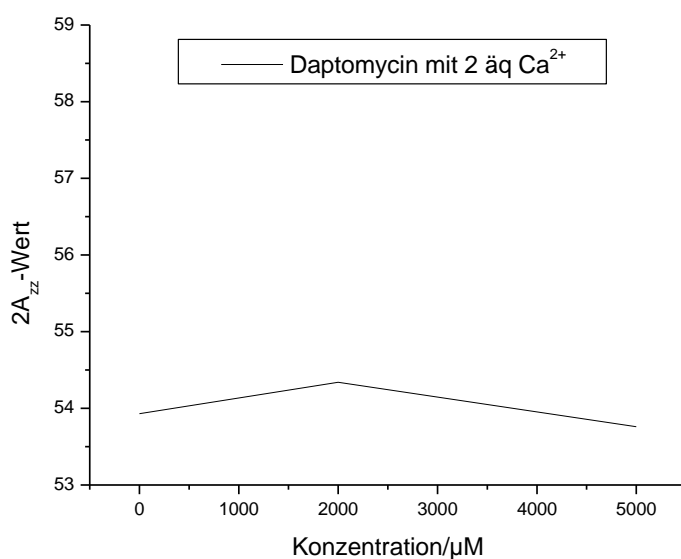


Abbildung 39: $2A_{zz}$ -Werte der Messungen von Phosphatidylcholinliposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 298 K: Daptomycinkonzentration mit zwei Äquivalenten Ca^{2+}

c(Dap)/ μM	$2A_{zz}/G$
0	53,93
2000	54,34
5000	53,76

Tabelle 12: $2A_{zz}$ -Werte der Messungen von Phosphatidylcholinliposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 298 K: und Daptomycinkonzentration mit zwei Äquivalenten Ca^{2+}
Messungen mit Liposomen aus Phosphatidylcholin

3 Ergebnisse

Bei der Messung wurde festgestellt, dass sich der $2A_{zz}$ -Wert bei diesen Liposomen nicht ändert. Vermutlich konnte sich der Komplex aus Daptomycin und Ca^{2+} nicht an die Membran anlagern.

Als nächstes wurden Liposomen aus 75 % Phosphatidylcholin und 25 % Phosphatidylglycerol (*w/w*) nach Kapitel 4.1.10.1 hergestellt. Hierbei entspricht der Gehalt an Phosphatidylglycerol in etwa dem in Bakterien. Zuerst wurde die Messung wiederum mit 2 Äq. Ca^{2+} -Ionen durchgeführt, um deren Einfluss zu messen. Danach wurde die Messung mit verschiedenen Daptomycinkonzentrationen mit jeweils 2 Äq. Ca^{2+} -Ionen durchgeführt.

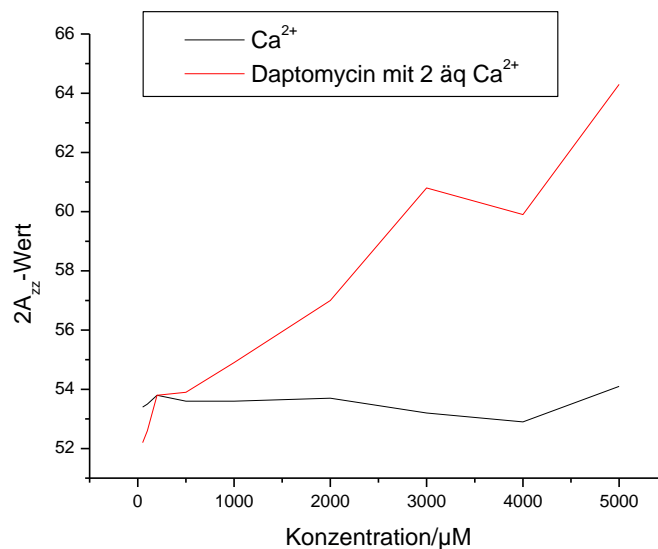


Abbildung 40: $2A_{zz}$ -Werte der Messungen von PC/PG Liposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 298 K: zweifache Ca^{2+} -Konzentration (schwarz) und Daptomycinkonzentration mit zwei Äquivalenten Ca^{2+} (rot)

3 Ergebnisse

c(Dap)/ μM	$2A_{zz}/G$	c(Dap)/ μM	$2A_{zz}/G$
0	53,4	0	52,2
50	53,5	50	52,6
100	53,4	100	53,3
200	53,8	200	53,8
500	53,6	500	53,9
1000	53,6	1000	54,9
2000	53,7	2000	57
3000	53,2	3000	60,8
4000	52,9	4000	59,9
5000	54,1	5000	64,3

Tabelle 13: $2A_{zz}$ -Werte der Messungen von PC/PG Liposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 298 K: zweifache Ca^{2+} -Konzentration (schwarz) und Daptomycinkonzentration mit zwei Äquivalenten Ca^{2+} (rot)

Es ergab sich, dass mit 25 % Phosphatidylglycerol und 75 % Phosphatidylcholin in den Liposomen bei unterschiedlicher Daptomycinkonzentration ein signifikanter Unterschied in der Fluidität besteht. Durch diese Versuchsreihe lässt sich ein eindeutiger Nachweis erbringen, dass negativ geladene Lipide ein wichtiger Bestandteil des Mechanismus sind.

3 Ergebnisse

Als nächstes wurde die Messung analog bei 310 K durchgeführt.

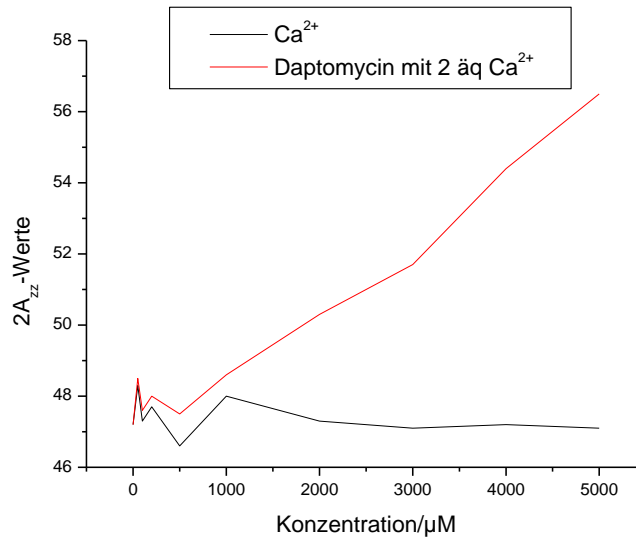


Abbildung 41: 2A_{zz}-Werte der Messungen von PC/PG Liposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 310 K: zweifache Ca²⁺-Konzentration (schwarz) und Daptomycinkonzentration mit zwei Äquivalenten Ca²⁺ (rot)

c(Dap)/μM	2A _{zz} /G	c(Dap)/μM	2A _{zz} /G
0	47,2	0	47,2
50	48,3	50	48,5
100	47,3	100	47,6
200	47,7	200	48,0
500	46,6	500	47,5
1000	48,0	1000	48,6
2000	47,3	2000	50,3
3000	47,1	3000	51,7
4000	47,2	4000	54,4
5000	47,1	5000	56,5

Tabelle 14: 2A_{zz}-Werte der Messungen von PC/PG Liposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 310 K: zweifache Ca²⁺-Konzentration (schwarz) und Daptomycinkonzentration mit zwei Äquivalenten Ca²⁺ (rot)

3 Ergebnisse

Auch hier ergaben sich ähnliche Fluiditätsänderungen, wie bei der vorangegangenen Messung.

3.1.7.3.1 Liposomen aus Phosphatidylcholin und Phosphatidylglycerol bei 2 mM Calciumkonzentration

Danach wurde die Messung analog zu 4.1.11 bei einer konstanten Ca^{2+} -Konzentration von 2 mM durchgeführt.

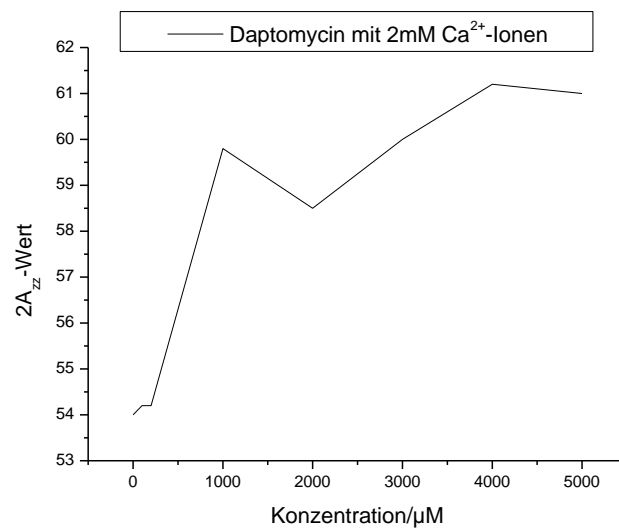


Abbildung 42: $2A_z$ -Werte der Messungen von PC/PG Liposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 298 K: Daptomycinkonzentration mit 2 mM Ca^{2+}

3 Ergebnisse

c(Dap)/ μM	$2A_{zz}/G$
0	54,0
100	54,2
200	54,2
1000	59,8
2000	58,5
3000	60,0
4000	61,2
5000	61,0

Tabelle 15: $2A_{zz}$ -Werte der Messungen von PC/PG Liposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 298 K: Daptomycinkonzentration mit 2 mM Ca^{2+}

Aus den Werten lässt sich ablesen, dass die Hyperfeinkopplungskonstanten mit zunehmender Daptomycinkonzentration steigen. Hier wird die Fluidität der Liposomen wieder beeinflusst.

In der folgenden Versuchsreihe wurde bei konstanter Calciumkonzentration von 2 mM der Einfluss von Daptomycin bei 310 K gemessen.

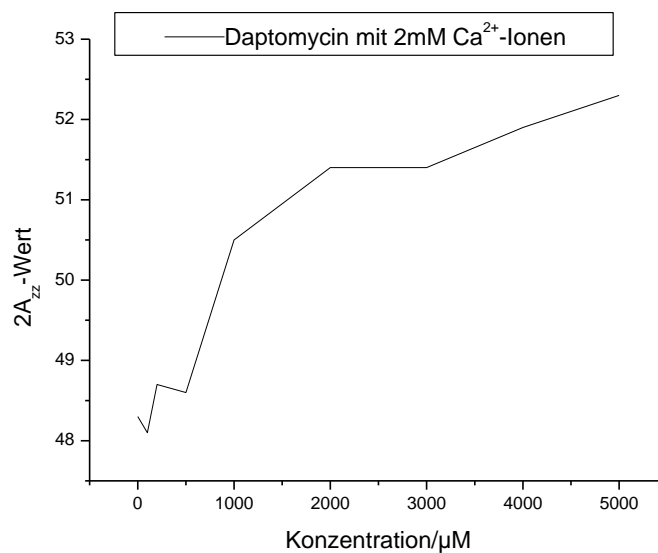


Abbildung 43: $2A_{zz}$ -Werte der Messungen von PC/PG Liposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 310 K: Daptomycinkonzentration mit 2 mM Ca^{2+}

3 Ergebnisse

c(Dap)/ μM	$2A_{zz}/G$
0	48,3
100	48,1
200	48,7
500	48,6
1000	50,5
2000	51,4
3000	51,4
4000	51,9
5000	52,3

Tabelle 16: $2A_{zz}$ -Werte der Messungen von PC/PG Liposomen mit 5-Doxylphosphatidylcholin bei 310 K: Daptomycinkonzentration mit 2 mM Ca^{2+}

Aus Tabelle 16 lässt sich ablesen, dass die Hyperfeinkopplungskonstanten mit zunehmender Daptomycinkonzentration steigen.

3.1.7.4 Messungen mit Liposomen aus Bakterien

Die vorangegangenen Messungen wurden mit verschiedenen Lipidzusammensetzungen in physiologischem Tris-Puffer durchgeführt. Um das Modell an die tatsächliche Infektion anzunähern, wurden in einem nächsten Schritt Liposomen aus Bakterien hergestellt. Hierzu wurden die Vorschriften von Kaback (Kaback 1971) und Poole (Poole 1993) verwendet. Als Puffer wurde fötales Kälberserum verwendet, um eine eukaryotische Umgebung zu simulieren. Um die Methode im Arbeitskreis zu etablieren, wurde zuerst mit einem bereits vorhandenen Stamm gearbeitet (DH5 α).

Die Methode beruht auf einer Lyse der Zellen, einer fraktionellen Zentrifugation und einer Behandlung mit Ultraschall (Kapitel 4.1.10.3). Die Größe der Liposomen wurde mittels DLS bestimmt und danach ESR-Messungen durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1.7.4.1 Messungen mit Liposomen aus gram-negativen Bakterien

In dieser Versuchsreihe wurden als Proben Liposomen aus gram-negativen Bakterien nach Kapitel 4.1.10.3 hergestellt. Diese wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Daptomycin inkubiert. In Abbildung 44 sind die Daten graphisch zusammengefasst.

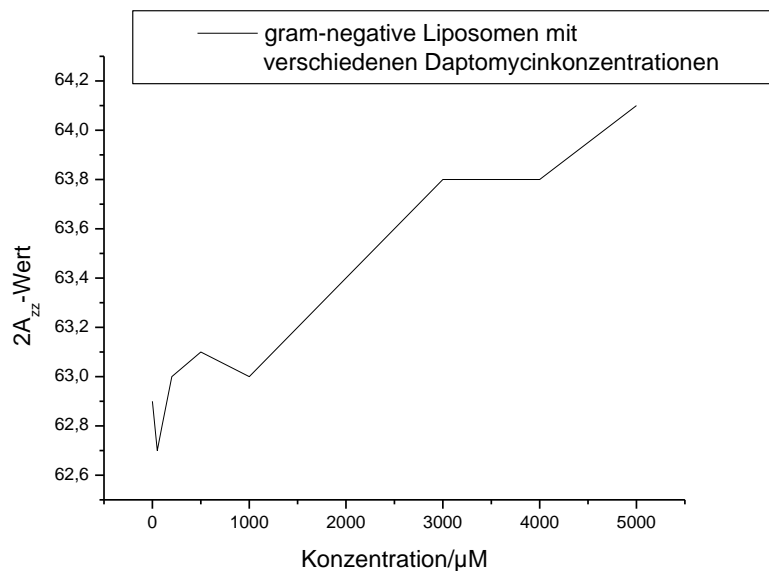


Abbildung 44: $2A_{zz}$ -Werte der Messungen von Liposomen aus gram-negativen Bakterien mit 5-Doxylphosphatidylcholin in FCS bei 298 K bei verschiedenen Daptomycinkonzentrationen

Anhand der Hyperfeinkopplungskonstanten lassen sich wiederum Rückschlüsse auf die Fluidität der Vesikel ziehen. Die Werte dieser ESR-Spektren sind in folgender Tabelle 17 aufgelistet.

3 Ergebnisse

c(Dap)/ μ M	$2A_{zz}/G$
0	62,9
50	62,7
100	62,8
200	63,0
500	63,1
1000	63,0
2000	63,4
3000	63,8
4000	63,8
5000	64,1

Tabelle 17: $2A_{zz}$ -Werte der Messungen von Liposomen aus gram-negativen Bakterien mit 5-Doxylphosphatidylcholin in FCS bei 298 K bei verschiedenen Daptomycinkonzentrationen

Es ist zu erkennen, dass die Hyperfeinkopplungskonstanten mit zunehmender Daptomycinkonzentration ansteigen. Auch aus gram-negativen Bakterien hergestellte Liposomen scheinen vom Daptomycin beeinflusst zu werden. Des Weiteren lässt sich erkennen, dass die Fluidität stärker eingeschränkt ist. Somit ist auch die Mobilität geringer. Da in der Literatur postuliert wird, dass Daptomycin nur gegen gram-positive Keime wirkt, war dieses Ergebnis recht überraschend. Um es zu verifizieren, wurde die Messung wiederholt und lieferte die gleichen Ergebnisse (nicht aufgeführt).

3.1.7.5 Messungen mit Liposomen aus gram-positiven Bakterien

In einem nächsten Schritt wurden Liposomen aus gram-positiven Bakterien hergestellt. Dazu wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Henrich (Fachbereich Biologie, Fachrichtung Mikrobiologie, TU Kaiserslautern) ein *Bacillus subtilis*-Stamm zur Verfügung gestellt. Die Liposomen wurden nach einem analogen Verfahren hergestellt.

3 Ergebnisse

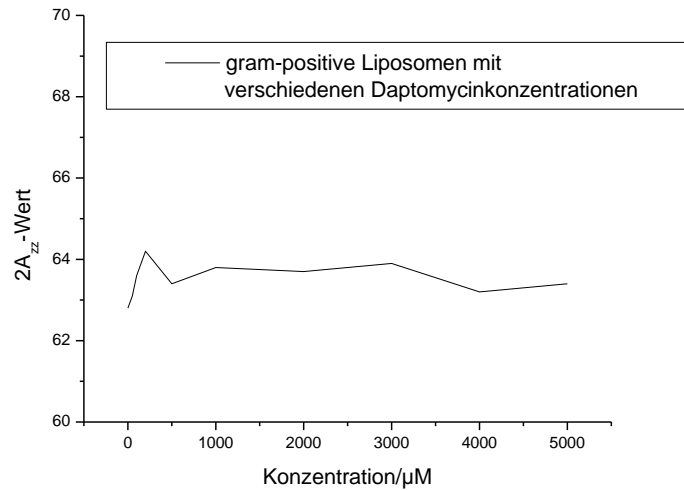


Abbildung 45: $2A_{zz}$ -Werte der Messungen von Liposomen aus gram-positiven Bakterien mit 5-Doxylphosphatidylcholin in FCS bei 298 K bei verschiedenen Daptomycinkonzentrationen

c(Dap) / μM	$2A_{zz}/G$
0	62,8
50	63,1
100	63,6
200	64,2
500	63,4
1000	63,8
2000	63,7
3000	63,9
4000	63,2
5000	63,4

Tabelle 18: $2A_{zz}$ -Werte der Messungen von Liposomen aus gram-positiven Bakterien mit 5-Doxylphosphatidylcholin in FCS bei 298 K bei verschiedenen Daptomycinkonzentrationen

Als Ergebnis wurde eine Erhöhung des $2A_{zz}$ -Wertes und somit eine Verringerung der Fluidität erwartet. Dies war allerdings nicht der Fall; der $2A_{zz}$ -Wert variierte um ein Gauß. Eine erneute Messung bestätigte dieses Ergebnis.

3 Ergebnisse

Durch die Schüttelkulturen Kapitel 4.1.9 konnte belegt werden, dass gram-positive Bakterien durch Daptomycin gehemmt werden. Dies steht im Widerspruch zu den ESR-Messungen. Es wurde angenommen, dass sich bei den Liposomen die Oberfläche ändert, allerdings die Fluidität gleich bleibt. Deshalb wurde in weiteren Schritten die Morphologie untersucht.

3.1.7.6 Diskussion

Zur Aufklärung des Mechanismus von Daptomycin wurden umfangreiche ESR-Studien durchgeführt. Hierzu wurden verschiedene Liposomensysteme und Puffer untersucht.

Als Puffer wurden Tris-Puffer mit physiologischem pH-Wert und fötales Kälberserum, das zur Simulierung der eukaryotischen Umgebung dient, benutzt.

Liposomen wurden hergestellt aus:

- *E. coli* Polar Lipid Mix
- Phosphatidylcholin
- 25 % (w/w) Phosphatidylglycerol/ 75 % (w/w) Phosphatidylcholin
- *B. subtilis*
- *E. coli*

Bei den Messungen mit Tris-Puffer wurde zuerst eine Messung mit Ca^{2+} -Ionen und ohne Daptomycin durchgeführt, um die Wechselwirkung von Ca^{2+} und der Membran zu untersuchen. Hier ließ sich bei allen Versuchsreihen kaum eine Änderung der Fluidität feststellen.

Zunächst wurden die Messungen mit Liposomen aus Lipid Mix und Tris-Puffer durchgeführt. Mit 12-Doxylphosphatidylcholin ergab sich keine signifikante Änderung. Mit 5-Doxylphosphatidylcholin konnten Änderungen von bis zu acht Gauß festgestellt werden. Die Messung wurde zunächst bei Standardtemperatur und danach bei physiologischer Temperatur durchgeführt; anschließend bei physiologischer Ca^{2+} Konzentration. In allen Fällen konnte ein ähnliches Verhalten der Membran bei hohen Daptomycinkonzentrationen festgestellt werden.

Anschließend wurde untersucht, welchen Einfluss die Ladung einer Membran auf den Mechanismus hat. Hierzu wurden zuerst Liposomen aus Phosphatidylcholin hergestellt. Hier konnte kein Unterschied in der Fluidität festgestellt werden. Wurde die Messung mit Liposomen aus 25 % Phosphatidylglycerol und 75 % Phosphatidylcholin durchgeführt,

3 Ergebnisse

konnte eine Verringerung der Fluidität festgestellt werden. Dies lässt den Schluss zu, dass negativ geladene Lipide eine wichtige Rolle im Mechanismus spielen.

In einem nächsten Schritt wurden die Liposomen aus Lipiden durch solche aus Bakterienmembranen ersetzt. Als Umgebung wurde FCS benutzt.

Zuerst wurden die Messungen mit Liposomen aus gram-negativen Bakterien hergestellt und ESR-spektroskopisch vermessen. Hier zeigte sich, dass bei Liposomen aus gram-negativen Bakterien eine Veränderung des $2A_{zz}$ -Wertes ergibt. Dies stimmt zwar nicht mit dem postulierten Wirkspektrum überein, bestätigt aber die eigenen Messungen der Schüttelkulturen.

Als nächstes wurden die Versuche an Liposomen aus gram-positiven Bakterien durchgeführt. Hier wurde überraschenderweise festgestellt, dass keine Veränderung des $2A_{zz}$ -Wertes vorliegt. Dies wurde im Hinblick auf die Schüttelkulturen darauf zurückgeführt, dass in der Membran keine Änderung der Fluidität stattfindet, sich allerdings die Morphologie ändert. Die unterschiedlichen Ergebnisse mit 5- und 12-Doxylphosphatidylcholin sind hierfür ein weiteres Indiz.

Um die Unterschiede in der Morphologie feststellen zu können, wurden im Folgenden Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie durchgeführt.

3.1.8 *Scanning Electron Microscopy (SEM)*

Da bei den ESR-Messungen der gram-positiven Liposomen keine Veränderung des $2A_{zz}$ -Wertes zu beobachten war, lag die Überlegung nahe, dass die Beweglichkeit des Systems gleich bleibt, sich jedoch die Morphologie ändert. Aus diesem Grund wurden in einem nächsten Schritt die verwendeten Systeme elektronenmikroskopisch untersucht. Die Versuche wurden an einem *Scanning Electron Microscope (SEM)* im Arbeitskreis von Prof. Büdel (Pflanzensystematik, TU Kaiserslautern) durchgeführt. Hierzu wurde die Probe auf ein Kupfertarget aufgetragen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Sie wurde danach in die Präparationseinheit eingeführt und unter Vakuum das Eis an der Oberfläche sublimiert. Danach wurde ein Stück der Probe herausgebrochen und die Probe mit Gold beschichtet. Dieser Vorgang musste gegebenenfalls wiederholt werden. Nun wurde die Probe in das Elektronenmikroskop eingeführt und mit der Messung begonnen. Die Liposomen wurden wie in Kapitel 4.1.12 hergestellt. Die Probe wurde unverdünnt auf das Target aufgetragen.

3 Ergebnisse

3.1.8.1 Elektronenmikroskopische Messungen mit Liposomen aus Lipid Mix

Als erstes wurde das einfachste System vermessen, d.h. Liposomen aus dem Lipid Mix von *Avanti Polar Lipids*.

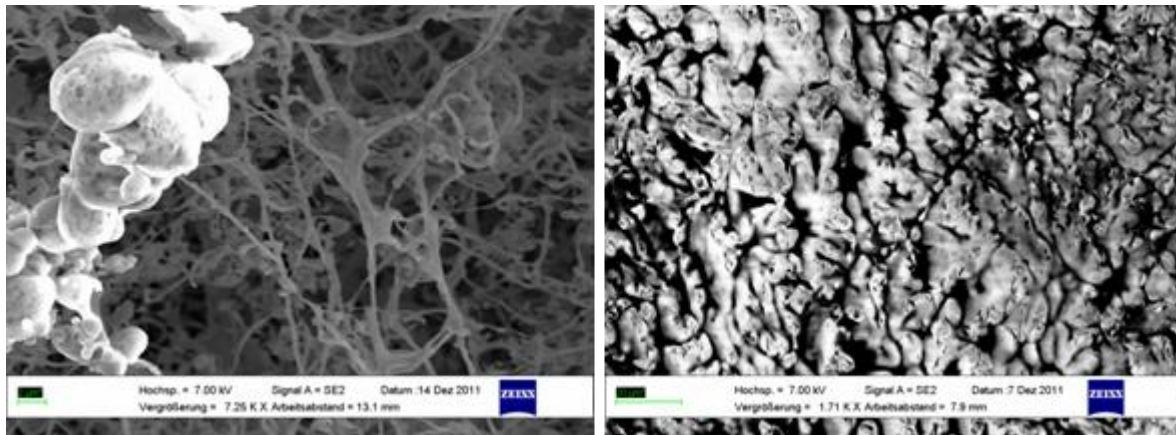


Abbildung 46: cryo-EM Messungen von Liposomen aus Lipid Mix ohne Daptomycin (links) und 5 mM Daptomycin (rechts)

Auf der Aufnahme in Abbildung 46 ohne Daptomycin sieht man links Liposomen, die sich von oben nach unten reihen. Im Hintergrund sieht man Eis. Die Liposomen sind intakt, man sieht keine Veränderung in der Membrankrümmung und keine Löcher.

Die Messung rechts in Abbildung 46 wurde mit Liposomen und einer Konzentration von 5 mM Daptomycin aufgenommen. Man erkennt deutlich eine Krümmung der Membran und das Auftreten von Löchern. Dies ist ein Beleg dafür, dass Daptomycin vermutlich keine Poren ausbildet, sondern es durch Krümmung zu einem Aufplatzen der Membran kommt.

3 Ergebnisse

3.1.8.2 Elektronenmikroskopische Messungen mit Liposomen aus *B. subtilis*

In einem nächsten Schritt wurden Liposomen aus gram-positiven Zellen untersucht. Die Proben wurden nach Kapitel 4.1.12 hergestellt.

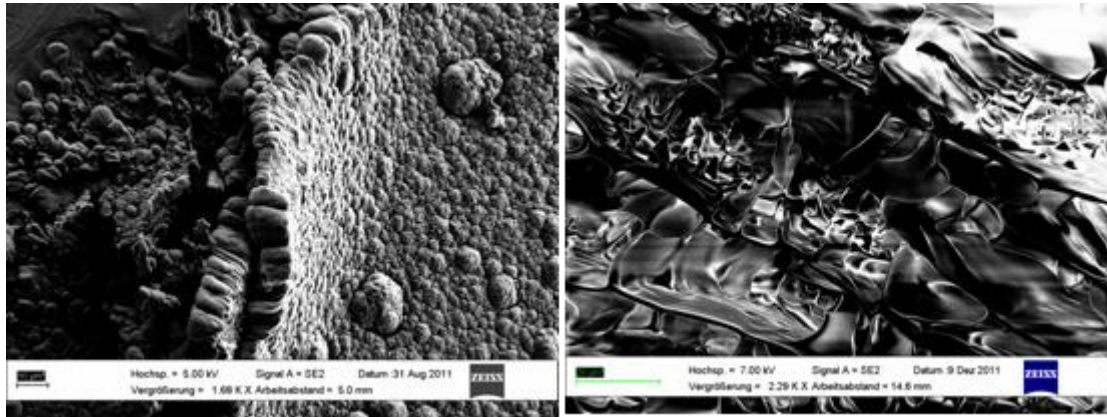


Abbildung 47: cryo-EM Messungen von Liposomen aus *B. subtilis* ohne Daptomycin (links) und 5 mM Daptomycin (rechts)

Bei der linken Abbildung in Abbildung 47 erkennt man Liposomen, die an der Oberfläche der Probe liegen; links die Bruchkante durch das Aufbrechen der Probe. Man erkennt, dass die Liposomen intakt sind und keine Störungen in der Membran vorliegen.

Bei den Liposomen aus *B. subtilis* mit 5 mM Daptomycin (rechte Abbildung in Abbildung 47) erkennt man eine deutliche Zerstörung der Membran durch die Änderung der Struktur. Es liegt eine so starke Krümmung vor, dass keine ursprüngliche Struktur der Membranoberfläche zu sehen ist.

3.1.8.3 Elektronenmikroskopische Messungen mit Liposomen aus *E. coli*

Zusätzlich wurden die Liposomen aus *E. coli* untersucht, da bei den ESR-Messungen ein Unterschied in der Membranfluidität festgestellt wurde. Die Liposomen wurden nach Kapitel 4.1.12 hergestellt.

3 Ergebnisse

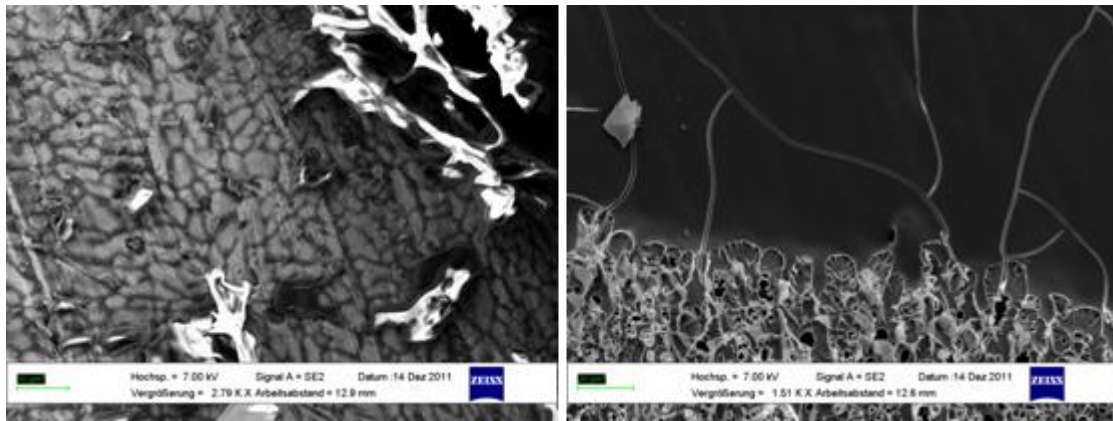


Abbildung 48: cryo-EM Messungen von Liposomen aus *E. coli* ohne Daptomycin (links) und 5 mM Daptomycin (rechts)

Auf der linken Abbildung ist eine homogene Oberfläche von Liposomen zu erkennen. Es liegen weder Krümmungen der Oberfläche noch Einstülpungen vor.

Bei den Liposomen aus *E. coli* mit 5 mM Daptomycin (rechts) erkennt man eine deutliche Veränderung. Man sieht Einstülpungen und Löcher in der Membran. Dies bestätigt auch die Ergebnisse der Schüttelkulturen aus Kapitel 3.1.6, dass Daptomycin sowohl gram-positive als auch gram-negative Bakterien inhibiert.

3.1.8.4 Elektronenmikroskopische Messungen mit *B. subtilis*

Elektronenmikroskopische Untersuchungen erlauben es komplette Zellen zu untersuchen und damit eine Aussage an Bakterien zu treffen. Diese wurden nach Kapitel 4.1.12 präpariert und direkt schockgefroren.

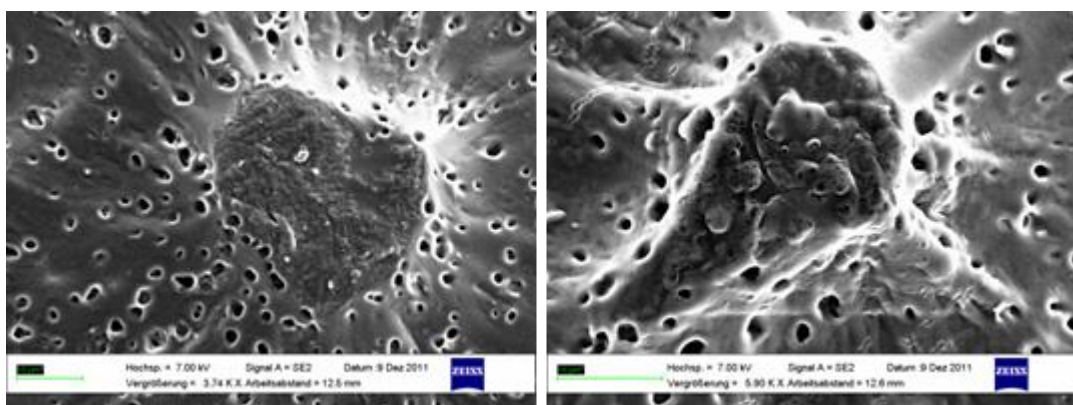


Abbildung 49: cryo-EM Messungen von *B. subtilis* ohne Daptomycin (links) und 5 mM Daptomycin (rechts)

Man erkennt links deutlich eine Bakterienzelle, die in Eis eingebettet ist und eine normale Morphologie aufweist. Es sind weder Löcher noch Einstülpungen zu erkennen.

3 Ergebnisse

Auch bei der Abbildung mit 5 mM Daptomycin erkennt man deutlich eine Zelle. Diese ist gestresst und bildet Ausstülpungen aus. Dies deutet stark darauf hin, dass durch die Gabe von Daptomycin zu Zellen nicht ausschließlich selektive K^+ -Poren entstehen, sondern es durch Krümmung zu Ausstülpungen kommt, die schließlich zum Kollaps des Membranpotentials führen.

3.1.8.5 Elektronenmikroskopische Messungen mit *E. coli*

Die Proben wurden im oben genannten Verfahren hergestellt und vermessen.

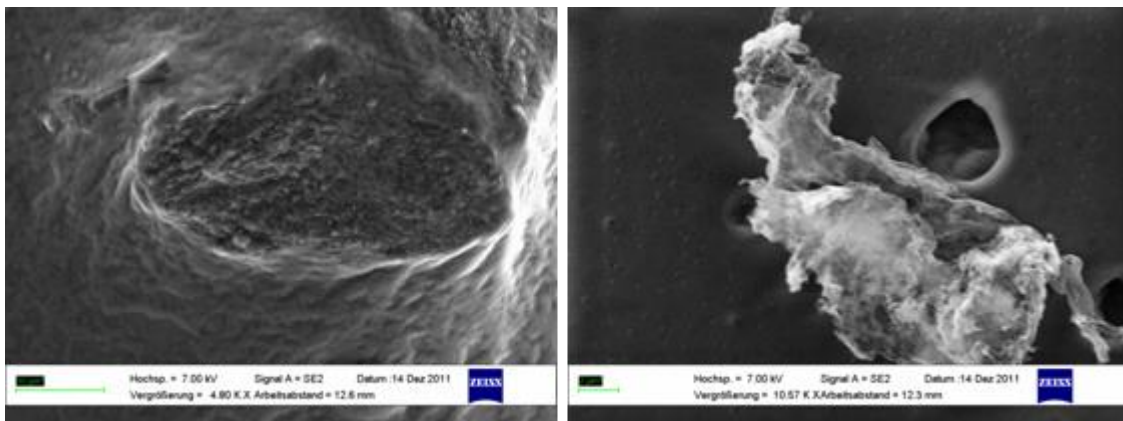


Abbildung 50: cryo-EM Messungen von *E. coli* ohne Daptomycin (links) und 5 mM Daptomycin (rechts)

Im linken Bild erkennt man eine intakte *E. coli*-Zelle, die keine Unregelmäßigkeiten aufweist. Rechts sieht man eine *E. coli*-Zelle, die mit 5 mM Daptomycin behandelt wurde. Die Zelle ist aufgeplatzt, es existiert nur noch eine Geisterzelle. Mit diesem Versuch konnten weiterhin die OD-Messungen mit *E. coli* bestätigt werden (Kapitel 3.1.6). Daptomycin scheint nicht ausschließlich gegen gram-positive Keime zu wirken.

3.1.8.6 Diskussion

Es wurden Elektronenmikroskopiemessungen durchgeführt, um die Morphologie von Bakterien aufzuklären, die mit Daptomycin behandelt wurden. Dazu wurden Liposomen aus einem Lipid Mix, aus *E. coli* und *B. subtilis* hergestellt, sowie die kompletten Zellen vermessen.

Die Messungen wurden sowohl ohne Daptomycin als auch mit 5 mM Daptomycin durchgeführt. Es zeigte sich, dass bei allen Proben, die mit Daptomycin behandelt wurden, es zu einer Änderung der Membranoberfläche kam. Es treten Einstülpungen, eine Art Abschnürung sowie Löcher auf. Bei den Messungen mit gram-negativen Zellen konnten Geisterzellen beobachtet werden. Dadurch, dass Daptomycin die Lipidschicht der Membran

3 Ergebnisse

angreift, ist es denkbar, dass auch andere ungewöhnliche Systeme zum Wirkspektrum gehören. Da es für diese kaum Medikamente gibt, wäre dies ein sehr großer Fortschritt. Zu untersuchende Systeme wären z.B. Chlamydien oder *L-forms*. Bei Chlamydien handelt es sich um Bakterien ohne Zellwand, die vor allem Schleimhäute infizieren. *L-forms* sind als Krankenhauskeime gefährlich, da sie keine Peptidoglykanschicht besitzen und somit nicht auf übliche Antibiotika reagieren. Da sie nur eine Lipidschicht als Begrenzung haben, wären sie das ideale System um weitere Messungen durchzuführen. Pambe konnte erfolgreich feststellen, dass diese ebenfalls gegen Daptomycin sensibel sind und die Membran schädigen. Außerdem wurden von Pambe Messungen erfolgreich bei 0,1 mM und 1 mM Daptomycinkonzentration durchgeführt.

3.1.9 Atomic Force Microscopy (AFM)

Um die Auswirkungen von Daptomycin auf Biomembranen qualitativ zu verdeutlichen, wurden bildgebende Messungen mittels AFM durchgeführt. Dabei wurden die gleichen Systeme untersucht wie bei den vorhergegangenen Elektronenmikroskopiemessungen. Diese wurden nach Kapitel 4.1.13 hergestellt und danach im Verhältnis 1:1000 verdünnt. Bei den Versuchen mit Bakterien wurden diese anschließend mit Glutaraldehyd behandelt, um die Zelle vor dem Trocknen zu fixieren. Dies war notwendig, da beim Trocknen der Zelle diese ohne Fixierung gestresst wurde und so Unregelmäßigkeiten in der Morphologie auftraten. Somit konnte nicht mehr unterschieden werden, ob die Änderungen auf den Trocknungsprozess oder Daptomycin zurückzuführen waren.

3.1.9.1 Strukturaufklärungen an mit Daptomycin behandelten Bakterien von Braga *et al.*

Experimente, die über acht Stunden an *Bacillus cereus*, einer Stäbchenbakterie, durchgeführt wurden, haben uncharakteristische Oberflächenausbildungen gezeigt; in den ersten beiden Stunden wurde das Abflachen und Schrumpfen der zylindrischen Stäbchenzellen beobachtet, wenn sie mit Daptomycin in Kontakt kamen. Außerdem wurden in diesem Zeitraum die meisten Geißeln von der Zelle abgetrennt. Nach 4 Stunden konnte man eine deutliche Ausbildung von Ausstülpungen an der Zelle beobachten, die zylindrische Struktur lässt sich allerdings noch erkennen. Nach 8 Stunden erkennt man selbst von dieser nichts mehr (Braga 2002).

Diese Ergebnisse sind allerdings kritisch zu betrachten, da bei Antibiotika ein Wirkzeitraum von acht Stunden sehr unrealistisch ist, da sich eine prokaryotische Zelle bis zu drei Mal in

3 Ergebnisse

der Stunde teilen kann. Zudem beruht der Mechanismus zu einem großen Teil auf elektrostatischen Wechselwirkungen, die sehr schnell ablaufen. Diese Merkmale stimmen auch mit den Ergebnissen aus den zuvor durchgeführten ESR- und EM-Messungen überein.

3 Ergebnisse

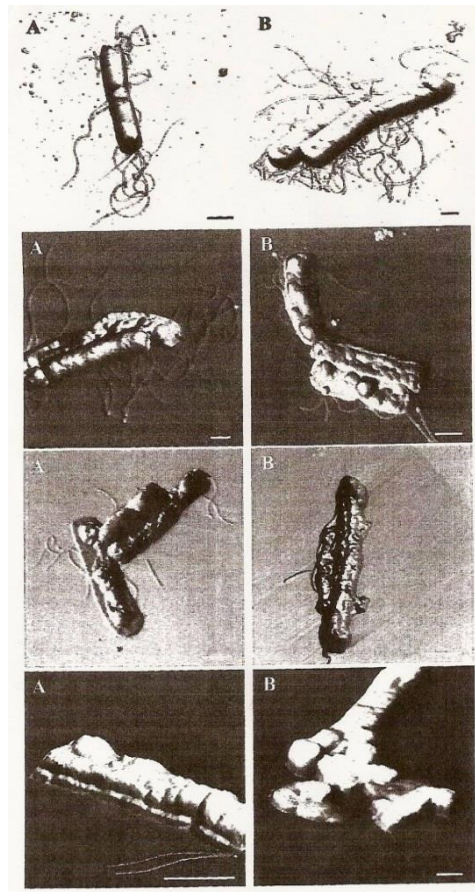


Abbildung 51: AFM-Aufnahmen von Bakterienzellen die mit 4 MIC90 (A) und 8 MIC90 (B) Daptomycin behandelt wurden (Braga 2002)

3.1.9.2 Liposomen aus Lipid Mix

Hierbei handelt es sich um Liposomen, die aus einem bei *Avanti Polar Lipids* erworbenen Lipid Mix hergestellt wurden (Kapitel 4.1.13.1). Diese wurden mit Daptomycin versetzt, auf Glimmerplättchen aufgetragen und getrocknet, so dass sie im AFM betrachtet werden konnten.

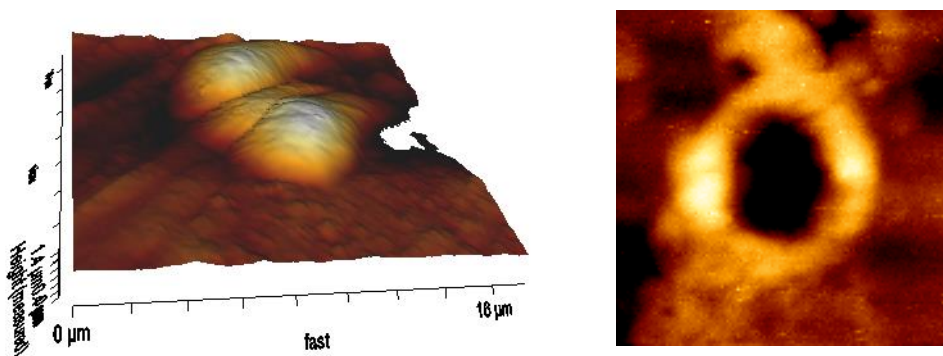


Abbildung 52: AFM-Messungen von Liposomen aus Lipid Mix ohne Daptomycin (links) und 5 mM Daptomycin

3 Ergebnisse

Das linke Bild in Abbildung 52 zeigt drei nebeneinander liegende intakte Liposomen und ermöglicht eine vergleichende Betrachtung des rechten Bildes. Dieses zeigt ebenfalls ein Liposom, allerdings nach der Behandlung mit Daptomycin. Im Vergleich mit den drei links dargestellten unbehandelten Liposomen ist deutlich die Schädigung der Membran durch das Antibiotikum in Form eines Lochs zu erkennen.

3.1.9.3 Liposomen aus *Bacillus subtilis*

Es wurden durch enzymatische Lyse von gram-positiven *Bacillus subtilis* nach Poole (Poole 1993) nach Kapitel 4.1.13.2 Liposomen gewonnen, die als Modellsystem für deren Zellmembran dienen. Diese wurden mit Daptomycin behandelt, auf Glimmerplättchen aufgetragen und getrocknet.

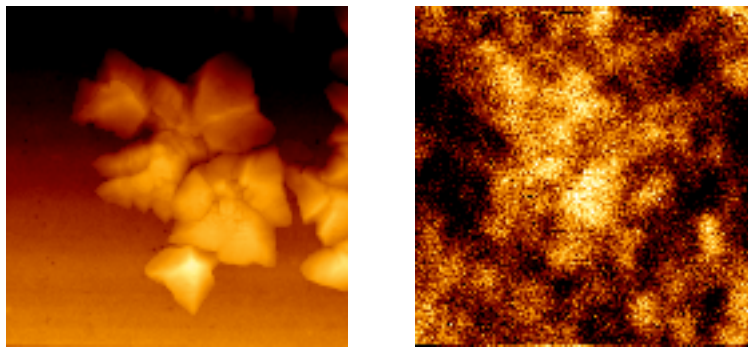


Abbildung 53: AFM-Messungen von Liposomen aus *B. subtilis* ohne Daptomycin (links) und 5 mM Daptomycin

Man erkennt, dass die Liposomen vor der Inkubation mit Daptomycin (links in Abbildung 53) geordnet und klar von ihrer Umgebung abgegrenzt vorliegen. Tritt eine Schädigung der Zellmembran durch Daptomycin auf, so verschwindet diese und auf den Bildern sind nur noch diffuse Strukturen erkennbar (rechts in Abbildung 53). Die Liposomen wurden durch Daptomycin zerstört.

3.1.9.4 Liposomen aus *E. coli*

Auch aus gram-negativen *E. coli*-Kulturen wurden nach Poole (Poole 1993) nach Kapitel 4.1.13.2 Liposomen gewonnen. Sie wurden mit Daptomycin inkubiert, auf Glimmer getrocknet und im AFM vermessen.

3 Ergebnisse

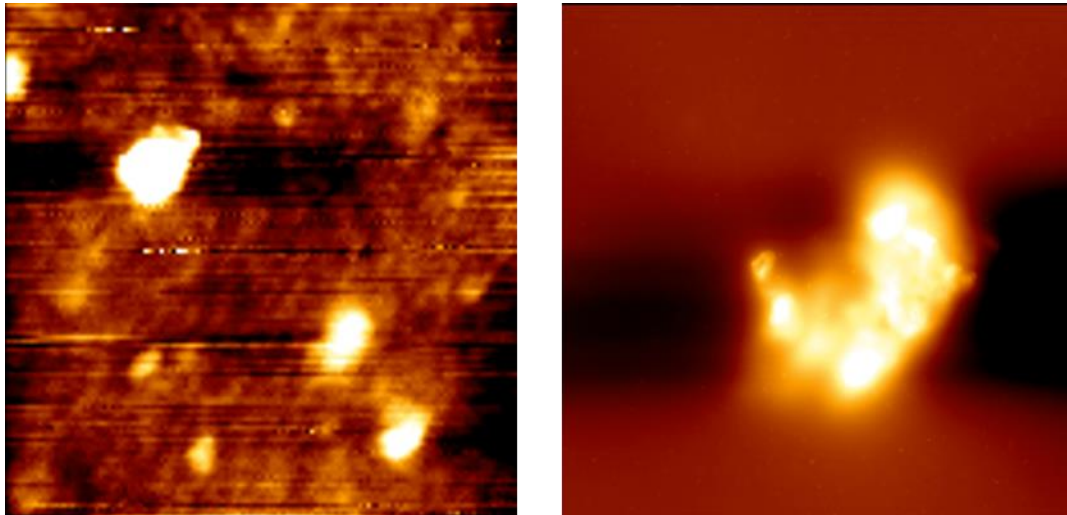


Abbildung 54: AFM-Messungen von Liposomen aus *E. coli* ohne Daptomycin (links) und 5 mM Daptomycin

Man erkennt auf dem linken Bild ohne Daptomycin mehrere Liposomen in ihrer runden Struktur. Auf dem rechten Bild sieht man ein einzelnes Liposom nach der Behandlung mit Daptomycin. Man erkennt deutlich, dass dieses aufgeplatzt ist.

3.1.9.5 *Bacillus subtilis*

Neben den aus ihnen gewonnen Liposomen wurden auch die Bakterien selbst vermessen (Kapitel 4.1.13.3). Hierbei wurde mit Glutaraldehyd gearbeitet, um die Zellen zu fixieren und so aussagekräftige Bilder zu ermöglichen. Die Zellen wurden mit Daptomycin behandelt, mit Glutaraldehyd fixiert, auf Glimmer getrocknet und im AFM vermessen.

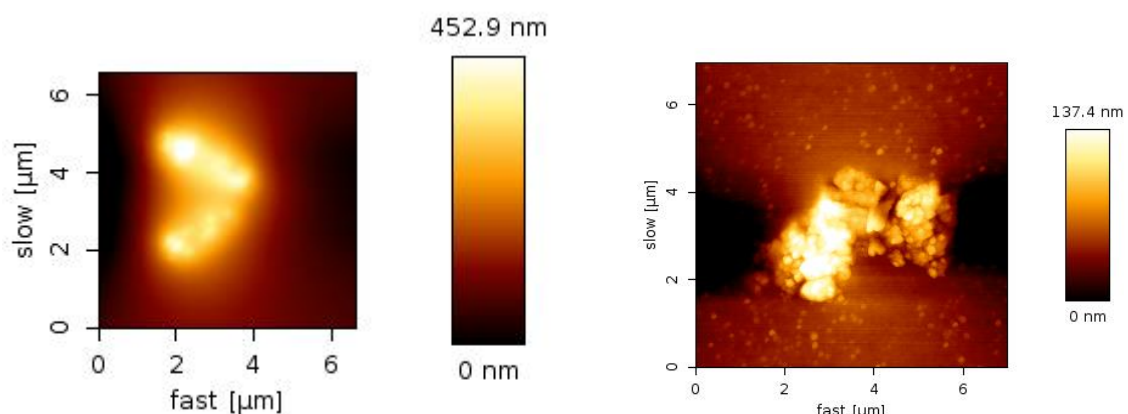


Abbildung 55: AFM-Messungen von *B. subtilis* ohne Daptomycin (links) und 5 mM Daptomycin, fixiert mit Glutaraldehyd

Man erkennt vor der Inkubation mit Daptomycin deutlich zwei intakte und typisch geformte Bakterien-Zellen (links in Abbildung 55). Die Messung der mit Daptomycin inkubierten

3 Ergebnisse

Probe zeigt eine im Zerfall begriffene Bakterienzelle (rechts) in Abbildung 55. Auf der Membranoberfläche bilden sich Ausstülpungen, Vesikel werden abgeschnürt und die Zelle stirbt ab.

3.1.9.6 *E. coli*

Die Proben der Übernachtskultur nach Kapitel 4.1.13.3 wurden mit Daptomycin behandelt, mit Glutaraldehyd fixiert, auf Glimmer aufgetragen und getrocknet.

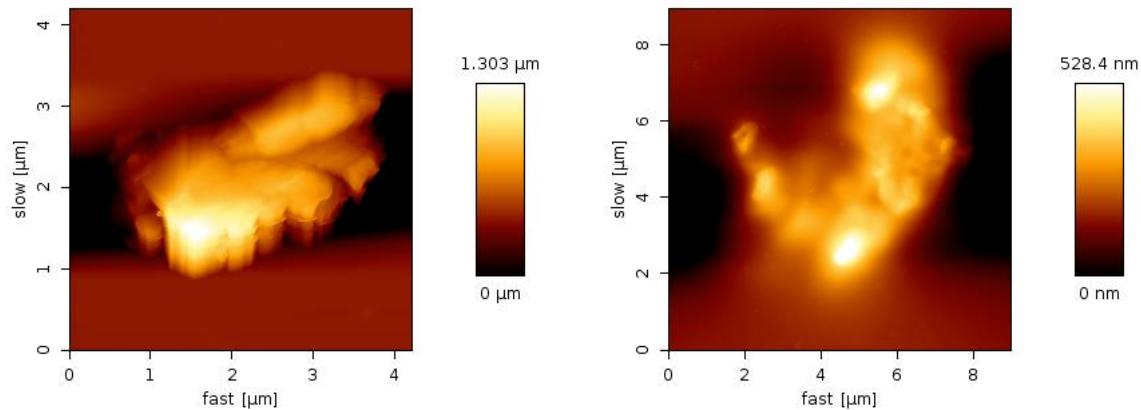


Abbildung 56: AFM-Messungen von *E. coli* ohne Daptomycin (links) und 5 mM Daptomycin, fixiert mit Glutaraldehyd

Die aufgenommenen Bilder zeigen auch hier deutlich die durch Daptomycin verursachte Schädigung der Zelle. Während die Zelle ohne Inkubation mit Daptomycin (links in Abbildung 56) eine klar abgegrenzte Struktur zeigt, ist bei Inkubation mit Daptomycin Vesikelbildung und Zerfall der Zelle zu beobachten (rechts in Abbildung 56).

3.1.9.7 Diskussion

Um eine deutlichere Aussage über die Schädigung von Membranen durch Daptomycin machen zu können, wurden nach den elektronenmikroskopischen Messungen Versuche am Rasterkraftmikroskop durchgeführt. Im Vergleich zum Elektronenmikroskop kann man über die Kraftkomponente eine Aussage über die Struktur machen, allerdings ist die Auflösung bei handelsüblichen Geräten geringer.

Die Systeme wurden nach Kapitel 4.1.13 hergestellt und verdünnt, die Zellen zusätzlich mit Glutaraldehyd fixiert, auf einem Glimmerplättchen aufgetragen, unter einer 100 W-Birne getrocknet und danach im AFM vermessen. Diese zeigte die gleichen morphologischen Änderungen. Die Löcher und Ausstülpungen konnten somit in ihrer Struktur nachgewiesen werden.

3 Ergebnisse

3.1.10 *Leakage Assay*

In der Literatur wird postuliert (Silverman 2005), dass sich bei Zugabe von Daptomycin und Ca^{2+} -Ionen zu gram-positiven Zellen ausschließlich eine Kaliumpore ausbildet. Dies wurde durch die vorangegangenen Messungen widerlegt. Zur Beobachtung *in situ* wurde ein *Leakage Assay* durchgeführt. Dieser beruht darauf, dass Liposomen, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefüllt sind, mit einem zu untersuchenden Stoff behandelt werden. Tritt dieser in Wechselwirkung mit der Membran und kommt es zur Ausbildung von unspezifischen Poren, so tritt der Farbstoff aus und es erfolgt eine Erhöhung der Fluoreszenz. Der verwendete Farbstoff ist hierbei das Natriumsalz von 5(6)-Carboxyfluorescein. Dieser wurde aus dem 5(6)-Carboxyfluorescein hergestellt. Die Liposomen wurden danach analog zu den Liposomen aus Lipid Mix nach Kapitel 4.1.10.2 hergestellt, mit dem Unterschied, dass zu dem physiologischen Tris-Puffer das Natriumsalz des 5(6)-Carboxyfluoresceins hinzugefügt wurde. Nach der Herstellung wurden die Liposomen mit Tris-Puffer dialysiert, um den Farbstoff außerhalb der Liposomen zu entfernen. Die erhaltene Probe wurde sowohl mit verschiedenen Konzentrationen Daptomycin als auch mit Triton-X-100 behandelt, das in der Literatur als ein Detergenz verwendet wird, das Liposomen zu 100 % zerstört.

3.1.10.1 **Synthese des 5(6)-Carboxyfluorescein-Mono-Natriumsalzes**

Das Natrium-Salz wurde aus 5(6)-Carboxyfluorescein (CF) und Natriumhydroxid hergestellt und anschließendes Umkristallisieren wurde nach der Methode von Prof. H.-J. Eibl (MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen) durchgeführt (Kapitel 4.1.14.1). Die Ausbeute betrug 61 %.

3.1.10.2 **Präparation der farbstoffhaltigen Liposomen**

Ein zuvor getrockneter Lipidfilm wurde durch Zupipettieren eines Tris-Puffers, der 0,1 mM CF-Lösung enthielt, aufgeschwemmt, anschließend gevortext und im Ultraschallbad sonifiziert. Danach wurde die Probe über Nacht gegen physiologischen Tris-Puffer dialysiert (Kapitel 4.1.10.2).

3 Ergebnisse

3.1.10.3 Leakage Assay mit 5(6)-Carboxyfluorescein

Mit den Liposomen wurde eine Messreihe für verschiedene Konzentrationen angesetzt. Die Messergebnisse sind in Tabelle 19 aufgeführt.

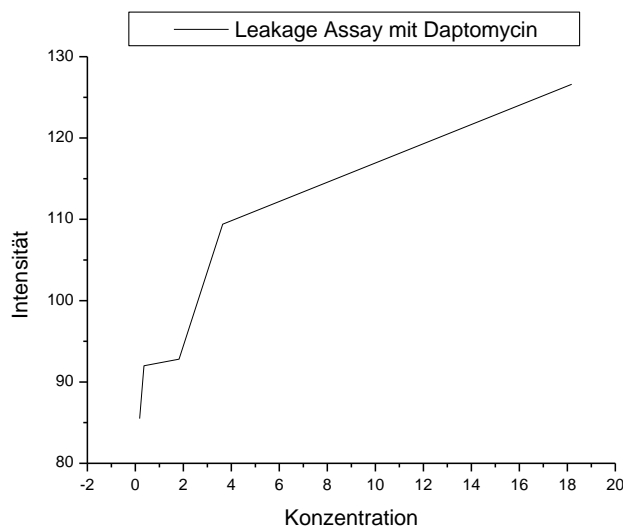


Abbildung 57: Leakage Assay Liposomen aus Lipid Mix bei 298 K mit verschiedenen Daptomycinkonzentrationen bei jeweils zwei Äquivalenten Ca^{2+}

c(Dap)/ μM	Intensität bei 496 nm	Intensität bei 513 nm
9,09	86,7	126,6
1,82	61,9	109,4
0,91	66,0	92,8
0,18	59,6	92,0
0,09	56,6	85,5

Tabelle 19: Leakage Assay Liposomen aus Lipid Mix bei 298 K mit verschiedenen Daptomycinkonzentrationen bei jeweils zwei Äquivalenten Ca^{2+}

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass Daptomycin einen starken Einfluss direkt auf die Lipiddoppelschicht hat, was für ein Antibiotikum sehr ungewöhnlich ist. Zudem entsteht keine selektive Kaliumpore, sondern es werden durch einen Anstieg der Krümmung unspezifische Löcher in die Membran gerissen.

3 Ergebnisse

3.2 Immunsuppression

3.2.1 Parallelveröffentlichung

Im Arbeitskreis wird seit vielen Jahren mit Gelonin als einem Ribosomen-inaktivierenden Protein gearbeitet. Veröffentlichungen und andere Arbeiten werden deshalb auch auf diesem Gebiet beschrieben. Während dieser Dissertation wurde eine Publikation von Lee-Huang, die die DNase-Aktivität von Gelonin beschreibt, bei Klonierungsversuchen zu Hilfe genommen. Gelonin wird in dieser Veröffentlichung als GAP31 beschrieben, was zu Anfang ausschließlich als Laborabkürzung dieses Labors gewertet wurde.

Unter dem Namen Gelonin existieren zwei Proteinsequenzen, die von Nolan veröffentlichte Sequenz und die von Rosenblum. Zudem wurde die Geloninsequenz, die von Nolan veröffentlicht wurde, von Lee-Huang noch einmal veröffentlicht. Dies war möglich, da Lee-Huang die Veröffentlichungen auf dem Gebiet der anti-HIV Proteine tätigte und somit auf einem Gebiet, das mit dem ursprünglichen Forschungsgebiet kaum in Berührung kam.

Im Folgenden werden die Veröffentlichungen chronologisch beschrieben.

Ribosomen inaktivierendes Protein	Anti-HIV Protein
Stirpe 1980	
Erste Veröffentlichung von Gelonin	
Lambert 1985	
Patent Gelonin als Immunotoxin	
	Lee-Huang 1991
	Arbeit über GAP31, bezieht sich allerdings auf den Artikel von Stirpe
Rosenblum 1992	
Patent Gelonin als Immunokonjugat	
Nolan 1993	
Veröffentlichung der Sequenz mit 252 aa	

3 Ergebnisse

Hosur 1994	Lee-Huang 1994
Veröffentlichung der Kristallstruktur	Veröffentlichung der Kristallstruktur
	Lee-Huang
	Veröffentlichung der DNase-Aktivität
	Lee-Huang
	Veröffentlichung mit verkürztem Protein
Rosenblum 1995	
Veröffentlichung der Sequenz mit 258 aa	
Gaspari-Campani 1996	
Veröffentlichung DNase-Aktivität	Lee-Huang 1999
	Veröffentlichung der Sequenz von mit 251 aa
	Lee-Huang 1995
	Veröffentlichung als Integraseinhibitor
	Lee-Huang 2000
	Veröffentlichung Kristallstruktur
	Lee-Huang 2003
	Patent
Daubenfeld 2005	
Veröffentlichung 252 aa	
Li 2007	Lee-Huang 2009
Veröffentlichung mit verkürztem Protein	Glykosidaseaktivität

Tabelle 20: Tabellarische Auflistung der Veröffentlichungen von Gelonin unter dem Namen Gelonin und GAP31

3.2.2 Cytotoxizität

Unter Cytotoxizität versteht man die Fähigkeit von Substanzen, Gewebezellen zu schädigen, so dass diese absterben. Dies kann auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen, so z.B. auf

3 Ergebnisse

der Hemmung der Proteinsynthese. Diese cytotoxische Wirkung kann von chemischen Substanzen, aber auch von Naturstoffen ausgehen. In Cytotoxizitäts-Tests, als *in vitro* Methode, kann die Wirkung solcher Substanzen an eukaryotischen Zellkulturen untersucht werden. Es gibt verschiedene Cytotoxizitäts-Tests z.B. den MTT- oder den SRB-Test. Diese beruhen beide auf dem Anfärben von Zellen, welche dann photometrisch ausgewertet werden können. Dadurch lassen sich Aussagen über die Wirkung einer Substanz erzielen.

3.2.3 Isolation von rekombinantem Gelonin aus *E. coli*

3.2.3.1 Expression von Gelonin und Zellaufschluss

Auf einer kanamycinhaltigen Agarplatte wurden BL21 Zellen, die den pET-gel-Vektor enthielten, ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Mit einer gewachsenen Kolonie wurden 20 mL LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37° C im Wasserbadschüttler inkubiert. Ausgehend von dieser Übernachtskultur wurden 500 mL LB-Medium angesetzt, die im Luftschüttler bei 37° C inkubiert wurden und deren optische Dichte regelmäßig gemessen wurde. Nach Erreichen einer optischen Dichte von 1,6 wurde die Expression des Gelonins mit IPTG induziert und die Zellen bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase unter den gleichen Bedingungen weiter im Luftschüttler geschüttelt. Die Zellen wurden dann mittels Zentrifugation vom Nährmedium abgetrennt, mit Pellet-Waschpuffer gewaschen und in Bindungspuffer resuspendiert. Mit einer Lysozym-Lösung und durch Behandlung mit Ultraschall wurden die Zellen lysiert und die löslichen Bestandteile durch Zentrifugation von den Zelltrümmern und *inclusion bodies* abgetrennt.

3.2.3.2 Isolation von Gelonin mittels Nickel-Affinitätschromatographie

Durch einen N-terminal an das Gelonin gekoppelten His-Tag kann rekombinantes Gelonin über Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Dazu wurde das Proteingemisch auf eine mit Nickelsulfat aktivierte *Hi-Trap-Chelating*-Affinitätssäule aufgetragen und entsprechend Kapitel 4.2.19.2.1.1 gesäult. Die Elutionsfraktion wurde über Nacht in Dialysepuffer im Kühlraum dialysiert, um in der Probe enthaltenes Imidazol zu entfernen (Kapitel 4.2.11.2).

3 Ergebnisse

3.2.3.3 SDS-PAGE

Alle isolierten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (Kapitel 4.2.11.1) charakterisiert (Abbildung 58).

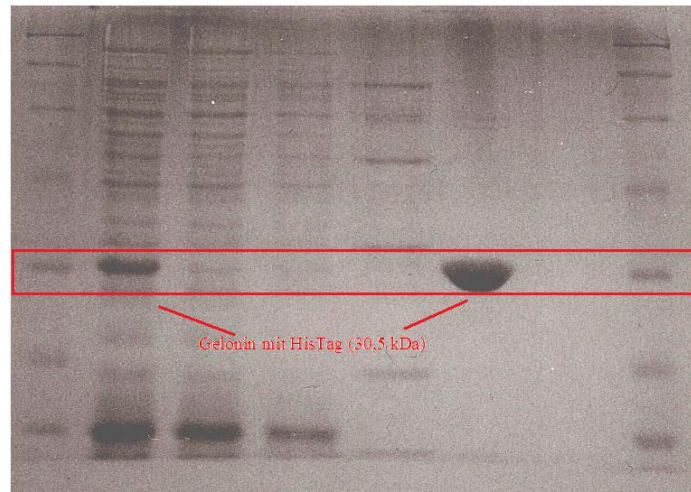


Abbildung 58: SDS-PAGE der Fraktionen der Nickelsäule

Hierbei ließ sich, wie erwartet, im Vorlauf sowie in der Elutionsfraktion, eine intensive Bande kurz über der 29 kDa Bande des Markers identifizieren. Diese lässt sich dem rekombinanten Gelonin (30,5 kDa) zuordnen.

3.2.3.4 ELISA

Zur weiteren Charakterisierung wurde nach Kapitel 4.2.21 ein ELISA mit der dialysierten Fraktion durchgeführt. Als Blank diente dabei PBS, als Negativ-Kontrolle wurde BSA verwendet.

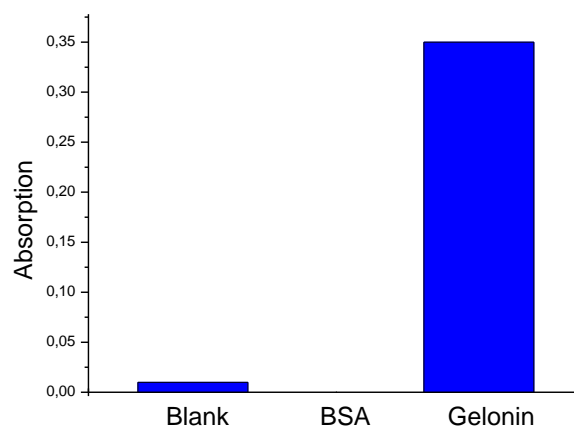


Abbildung 59: ELISA des isolierten Gelonins

3 Ergebnisse

Wie der Grafik zu entnehmen ist, war auch das Ergebnis des ELISA positiv. Damit zeigen beide Untersuchungen, dass Gelonin erfolgreich isoliert wurde.

3.2.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration des isolierten Gelonins wurde mittels BCA-Test durchgeführt (Kapitel 4.2.10.1). Da die Proteinkonzentration für die His-*Tag*-Abspaltung mit dem Thrombin-Kit zu gering war, wurde die Proteinlösung mit einem Amicon-Konzentrator (10 kDa) aufkonzentriert (Kapitel 4.2.11.3). Anschließend wurde die Geloninkonzentration erneut mittels BCA-Test bestimmt.

3.2.3.6 SRB-Test

Entsprechend Kapitel 4.2.23.5.2 wurden die in einer 24-Well-Platte ausgesäten Zellen für 24 h mit rekombinantem Gelonin inkubiert und weiter behandelt. Die photometrische Auswertung lieferte die in Abbildung 60 dargestellten Ergebnisse.

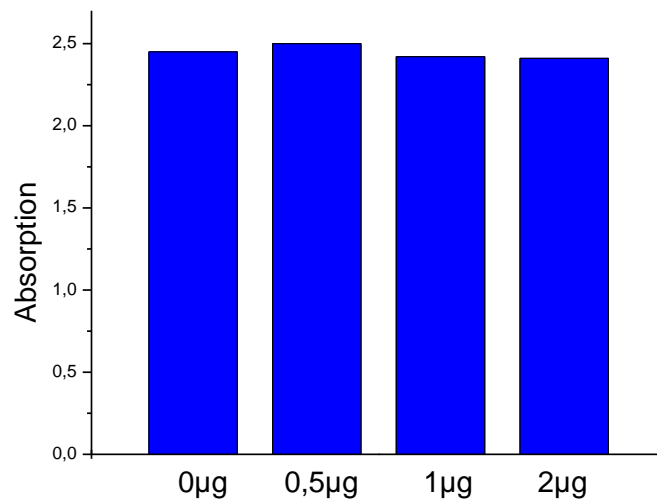


Abbildung 60: Graphische Auftragung der Mittelwerte des SRB-Tests nach 24 h Inkubation mit rekombinantem Gelonin

Wie die Grafik zeigt, war kein Effekt auf die Vitalität der MCF-7 Mammakarzinomzellen nach 24 h Inkubation mit rekombinanten Gelonin zu erkennen. Daraus lässt sich schließen, dass Gelonin keine Cytotoxizität besitzt.

3.2.4 Isolierung des Acetylcholinrezeptors aus *Torpedo californica*

Zur Induzierung von EAMG in Ratten wird der Acetylcholinrezeptor benötigt. Dieser kann aus dem elektrischen Organ des Zitterrochen *Torpedo californica* isoliert werden, das

3 Ergebnisse

besonders viele Acetylcholinrezeptoren besitzt. Die Isolierung beruht auf Dichtegradientenzentrifugation. Diese Methode macht sich das unterschiedliche Sedimentationsverhalten verschieden schwerer Proteinmoleküle zunutze und führt so zur Trennung der Proteine (Herling-Jaweed 1988, Urbatsch 1990).

3.2.4.1 Durchführung der Isolierung

Der Versuch erfolgte analog der Isolierung von Urbatsch (Urbatsch 1990) nach Kapitel 4.2.20.

100 g des elektrischen Organs wurden homogenisiert und mit einem Mulltuch abfiltriert, um größere Gewebeteile zu entfernen. Bei der anschließenden Zentrifugation wurden lösliche Proteine abgetrennt. Das Sediment wurde resuspendiert und unter Eiskühlung im Ultraschallbad beschallt. Nach zweistündiger Zentrifugation wurden die letzten beiden Arbeitsschritte wiederholt, um möglichst alle löslichen Proteine abzutrennen. Das Pellet wurde resuspendiert und auf einen kontinuierlichen Gradienten einer 25 bis 50% Sucroselösung vorsichtig aufgetragen. Die enthaltenen Proteine wurden durch eine Zentrifugation in die Region des Gradienten befördert, deren Dichte ihrer eigenen Schwebedichte entspricht. Es entstanden zwei Banden.



Abbildung 61: Proteinanreicherung in einem 50-25% Sucrosegradienten nach erfolgter Zentrifugation

Die SDS-PAGE (nicht aufgeführt) ergab die folgende Auftrennung: die obere Bande bei ca. 35 % Sucrose enthielt nur geringe Mengen des AChRs mit Verunreinigungen. In der Region mit 40 bis 45 % Sucroselösung fanden sich rezeptorreiche Vesikel und die löslichen Proteine. Die AChR-reichen Fraktionen wurden vereinigt und zentrifugiert. Zur Abtrennung des

3 Ergebnisse

Proteins mit dem Molekulargewicht 43 kDa erfolgten eine Inkubation mit LIS-Puffer und eine Zentrifugation. Das AChR-haltige Sediment wurde anschließend mit Cholatpuffer extrahiert. Der nach der Zentrifugation im Überstand befindliche AChR wurde dialysiert.

3.2.4.2 Charakterisierung des isolierten AChRs

Zur Proteinbestimmung wurden nach der Aufkonzentrierung ein BCA-Test und eine SDS-PAGE durchgeführt. Der BCA-Test ergab eine durchschnittliche Proteinkonzentration von 532 µg/mL. Als Ergebnis der SDS-PAGE konnte die folgende Auftrennung beobachtet werden (siehe Abbildung 62).

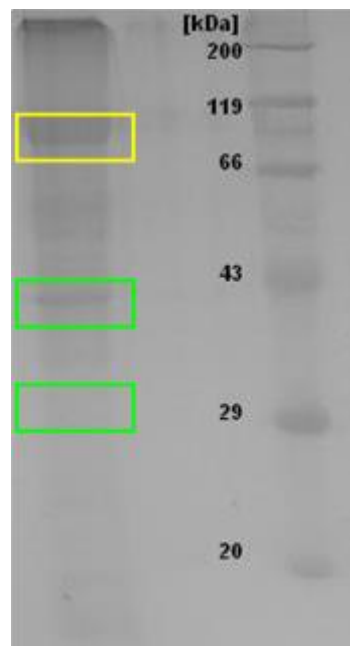


Abbildung 62: Analyse des aus *Torpedo californica* isolierten und aufgereinigten AChRs durch SDS-PAGE

Der Rezeptor wurde aufgrund der denaturierenden Wirkung des SDS in seine Untereinheiten aufgespalten. Durch die Aufreinigung erhielt man ein Proteingemisch, was man an den Banden bei 90, 57 und 39 kDa erkennen konnte. Die Banden bei etwa 39 und 57 kDa konnten den beiden Untereinheiten (39 kDa) und (57 kDa) des isolierten AChRs aufgrund ihrer Masse zugeordnet werden, was mit den in der Literatur angegebenen Molekularmassen übereinstimmte (Tzartos 1981). Bei der Bande bei ca. 90 kDa handelte es sich um eine Verunreinigung, die einer ATPase zugeschrieben werden konnte (Hucho 1988). Der aus *Torpedo californica* isolierte AChR konnte zwar isoliert und eindeutig identifiziert, jedoch nicht komplett von Verunreinigungen befreit werden. Die Ausbeute an AChR aus 100 g elektrischem Organ betrug etwa 12 mg, was den Ausbeuten von Urbatsch (Urbatsch 1990) entsprach.

3 Ergebnisse

3.2.5 Isolierung von MBP- α AChR₄₋₂₀₈

Eine effiziente Methode Proteine selektiv zu isolieren, ist die Affinitätschromatographie. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass mit Hilfe eines *Tags* das Zielprotein an eine funktionalisierte Sephadexsäule bindet und nach einem Waschschrift dieses wieder eluiert werden kann. Übliche *Tags* sind der in vielen Vektoren der Firma *Novagen* enthaltene *His-Tag* und der *MBP-Tag* von *New England Biolabs*. Im Folgenden wurde mit dem *MBP-Tag* gearbeitet, da dieser sowohl als *Tag* für immobilisierte Amylose als auch als Löslichkeitstag für die α -Untereinheit des Acetylcholinrezeptors fungiert.

3.2.5.1 Expression und Isolierung von MBP- α AChR₄₋₂₀₈

Li gelang die Expression und Aufreinigung der α -Untereinheit (Aminosäuren 4-208) des Acetylcholinrezeptors durch die Insertion der gewünschten Gensequenz in den Vektor *pMal-c2x* der Firma *New England Biolabs*. Die Isolierung des auf diese Weise hergestellten Fusionsproteins MBP- α AChR₄₋₂₀₈ gelang durch die Aufreinigung mittels Amylose-Affinitätschromatographie. Nach Abspaltung des *MBP-Tags* konnte das gewünschte Protein α AChR₄₋₂₀₈ in nativer Faltung nachgewiesen werden (Li 2004).

3.2.5.1.1 Expression

Das 7.310 bp große rekombinante Plasmid *pMal- α AChR₄₋₂₀₈* codiert für die α -Untereinheit des Acetylcholinrezeptors (α AChR₄₋₂₀₈), welche mit dem C-Terminus des *MBP-Tags* unter Kontrolle des *tac*-Promotors fusioniert ist. Der Vektor beinhaltet die β -Lactamase-codierende Sequenz der Ampicillin-Resistenz. Zwischen MBP und α AChR₄₋₂₀₈ befindet sich eine Schnittstelle für die Protease Factor Xa (Li 2004).

Von einer *E. coli* BL21(DE3) *pMal- α AChR₄₋₂₀₈*-Glycerinkultur wurden Verdünnungsausstriche auf Agarplatten mit Ampicillin angefertigt. Es folgte eine Kultivierung der Zellen in LB-Flüssigmedien mit Ampicillin. Sobald sich die Zellen in ihrer exponentiellen Wachstumsphase befanden, wurde die Expression induziert. Letztere wurde ab Beginn der stationären Wachstumsphase beendet. Es folgte ein Zentrifugationsschritt.

3 Ergebnisse

3.2.5.1.2 Lyse der Zellen und Aufarbeitung der *inclusion bodies*

Die erhaltenen Zellpellets wurden lysiert und zentrifugiert, so dass sich die unlöslichen Bestandteile wie *inclusion bodies* und Zelltrümmer von den löslichen abtrennten. Nach der Zentrifugation befanden sich die löslichen Bestandteile im Überstand, wohingegen die *inclusion bodies* und Zelltrümmer im Pellet verblieben. Die *inclusion bodies* wurden mit Guanidiniumhydrochlorid denaturierend aufgeschlossen. Mittels SDS-PAGE (4.2.11.1) wurde überprüft, ob das gewünschte Fusionsprotein MBP- α AChR₄₋₂₀₈ enthalten war. In Abbildung 63 ist das Polyacrylamidgel mit den Proben der aufgeschlossenen Proteinlösung nach der durchgeführten SDS-PAGE zu sehen.

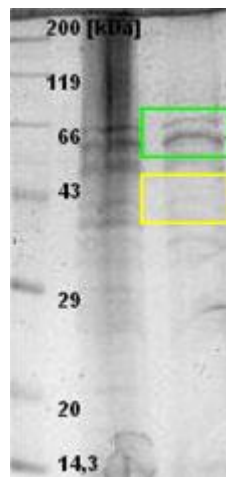


Abbildung 63: SDS-PAGE der aufgetrennten Proteinlösung mit MBP- α AChR₄₋₂₀₈ aus *inclusion bodies*

Die Banden bei 65 kDa weisen darauf hin, dass in der aufgeschlossenen Proteinlösung das Fusionsprotein MBP- α AChR₄₋₂₀₈ mit entsprechendem Molekulargewicht enthalten war. Es war auch eine schwache Bande bei 42 kDa zu erkennen, was auf das Vorhandensein eines Proteins in der Größe des MBPs schließen ließ. Das in der Probe enthaltene Guanidiniumhydrochlorid war für die schlecht gelaufene SDS-PAGE verantwortlich.

Wegen der Denaturierung durch Guanidiniumhydrochlorid musste vor der Amylose-Affinitätschromatographie die Probe durch Ultrazentrifugation und Dialyse weiter aufbereitet werden. Nach der Zentrifugation befanden sich die denaturierten Proteine im Überstand. Durch die anschließende Dialyse wurde das Guanidiniumhydrochlorid entfernt, da es die Tertiärstruktur des MBP-*Tags* denaturiert und dieser somit nicht mehr an die Amylose-Affinitätsmatrix binden kann.

3 Ergebnisse

3.2.5.1.3 Isolierung mittels Amylose-Affinitätschromatographie

Aufgrund des *MBP-Tags* konnte das Fusionsprotein MBP- α AChR₄₋₂₀₈ mittels Amylose-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden (Kapitel 4.2.19.2.2.1). Man erhielt durch die Elution mittels Affinitätschromatographie eine Fraktion, die nur noch das Fusionsprotein und MBP enthielt. Diese wurden mittels BCA-Test und SDS-PAGE charakterisiert. Die Proteinkonzentration lag bei 25 μ g/mL. Die SDS-PAGE ist in Abbildung 64 dargestellt.

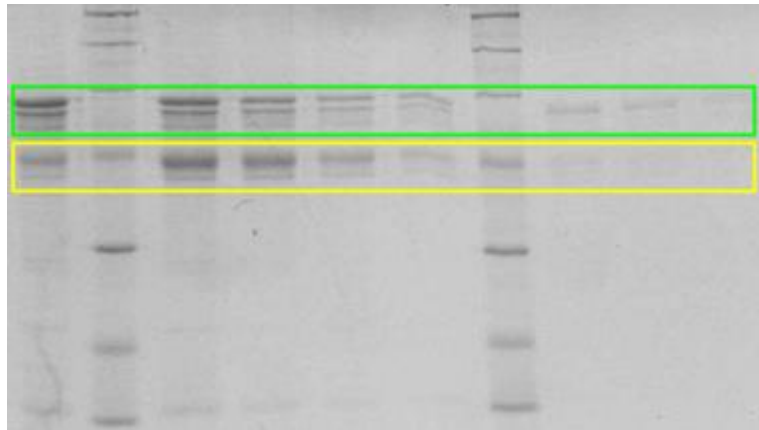


Abbildung 64: SDS-PAGE der Elutionsfraktionen mit MBP- α AChR₄₋₂₀₈ nach Amylosesäule.

Danach wurde das SDS-Gel densitometrisch vermessen und ein Proteingehalt von 30-55 % des Fusionproteins festgestellt. Mit den Fraktionen, die mindestens 42 % des Fusionsproteins enthielten, wurde weitergearbeitet.

3.2.5.1.4 Isolierung mit Hilfe der Gelfiltrations-Chromatographie

Um das MBP, das durch den Stoffwechsel der Zelle entsteht und nach der Amylose-Affinitätschromatographie noch in der Proteinlösung enthalten war, zu entfernen, wurden die entsprechenden Fraktionen auf eine *HiTrap Q FF*-Sepharosesäule aufgetragen (Kapitel 4.2.19.2.2.2). Zuvor musste mittels Dialyse (Kapitel 4.2.11.2) umgepuffert werden. Durch die Dialyse wurde Natriumchlorid entfernt, da das Fusionsprotein MBP- α AChR₄₋₂₀₈ mit einem Natriumchloridgradienten von der Sepharosesäule eluiert werden sollte.

Die Probe wurde auf ein Volumen von 2 mL aufkonzentriert und auf die *HiTrap Q FF*-Säule aufgetragen (Kapitel 4.2.19.2.2.2). Es folgte die Elution mit einem kontinuierlichen NaCl-Gradienten. Hierzu wurde ein Gradientenmischer mit jeweils 50 mL Startpuffer und Elutionspuffer der Natriumchloridkonzentration 0,2 mol/L befüllt. Das folgende Elutionsdiagramm (Abbildung 65) gibt den Verlauf der Elution wieder.

3 Ergebnisse

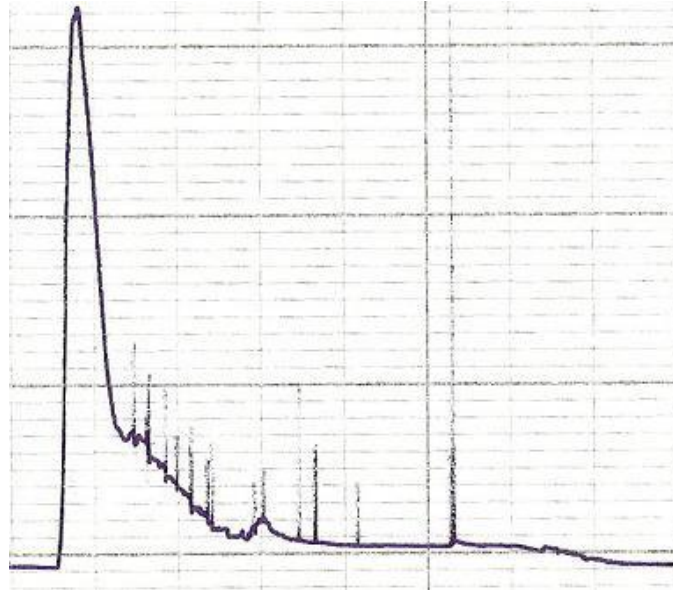


Abbildung 65: Elutionsdiagramm der Gelfiltrations-Chromatographie

Das Elutionsdiagramm wies einen scharfen Peak auf, bei dem eine große Menge an Protein eluiert wurde. Zur Überprüfung der Konzentration und der Reinheit der eluierten Proteinfractionen wurden sowohl ein BCA-Test als auch eine SDS-PAGE durchgeführt. Der BCA-Test ergab Proteinkonzentrationen im Größenbereich von 6 $\mu\text{g/mL}$ bis 34 $\mu\text{g/mL}$. Aus der Abbildung 66 können die Ergebnisse der Polyacrylamidgelelektrophorese entnommen werden.

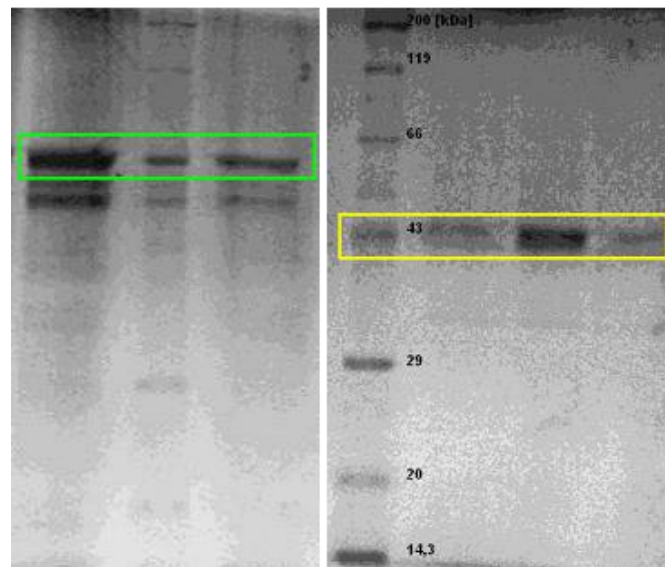


Abbildung 66: SDS-PAGE der Elutionsfraktionen nach der Gelfiltrations-Chromatographie

Es konnte eine deutlich bessere Auftrennung und Aufreinigung der Proteinlösung festgestellt werden. Das Fusionsprotein MBP- α AChR₄₋₂₀₈ wurde ausschließlich mit einer leichten Verunreinigung eluiert, was die Banden bei 50 und 65 kDa belegen. Mittels BCA-Test konnte

3 Ergebnisse

nach einer Aufkonzentrierung die Proteinkonzentration der Fraktionen ermittelt werden, die laut SDS-PAGE das Fusionsprotein enthielt. Es ergab sich eine Konzentration von 5 µg/mL.

3.2.5.1.4.1 Abspaltung des MBP-Tags vom Fusionsprotein

Um die α -Untereinheit des Acetylcholinrezeptors zu erhalten, musste das durch Gelfiltrations-Chromatographie aufgereinigte Fusionsprotein proteolytisch gespalten werden (Kapitel 4.2.19.2.2.3). Hierzu wurde, wie durch die Schnittstelle vorgegeben, die Protease Faktor Xa mit dem Molekulargewicht von 42,4 kDa verwendet. Die Protease schneidet Proteine bzw. Peptide bevorzugt hinter der Aminosäuresequenz Isoleucin–Glutamat/Aspartat–Glycin–Arginin. Vor der Spaltung wurde die Proteinlösung aufkonzentriert, so dass eine Konzentration von 43 µg/mL vorlag. Im Folgenden wurde die proteolytische Spaltung des Fusionsproteins mehrmals durchgeführt, wobei jeweils die Menge des eingesetzten Proteins verändert wurde. Die Volumina des Factor-Xa-Puffers sowie der Enzymlösung wurden entsprechend angepasst, so dass stets ein Endvolumen von 50 bzw. 100 µL vorlag. Des Weiteren wurde die Reaktionszeit variiert. Die folgende Tabelle (siehe Tabelle 21) gibt die eingesetzten Volumina sowie die Reaktionszeiten in den jeweiligen Spaltungsversuchen wieder.

3 Ergebnisse

	Volumen der Protein- lösung / μL	Menge an Protein /ng	Volumen der Enzymlösung / μL	Volumen des Puffers / μL	Gesamt- volumen/ μL	Reaktionszeit /h
1	2	87	1	47	50	9,5;24
2	2	87	1	47	50	2;4;6;8;24
3	4	170	1	95	100	2;4;6;8;24
4	2	87	1	47	50	4
5	4	170	1	45	50	24
6	8	350	1	41	50	24
7	10	430	2	88	100	24
8	10	430	1	39	50	4
9	15	650	1	34	50	4
10	20	870	1	29	50	4
11	30	1300	1,5	28,5	60	4
12	50	2170	1,5	48,5	100	4

Tabelle 21: Proteolytische Spaltung des Fusionsproteins – modifizierte Zusammensetzung des Reaktionsgemischs

Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden die Proben mittels SDS-PAGE (Kapitel 4.2.11.1) auf das Vorliegen der gewünschten Spaltungsprodukte überprüft. Vor der SDS-PAGE wurden die Proben lyophilisiert, in Probenpuffer aufgenommen und denaturiert. Es wurden drei verschiedene Probenpuffer eingesetzt, um eventuell ausgefallenes, schwerlösliches Protein in Lösung zu bringen. Das Ergebnis der SDS-PAGE ist in Abbildung 67 zu sehen.

3 Ergebnisse

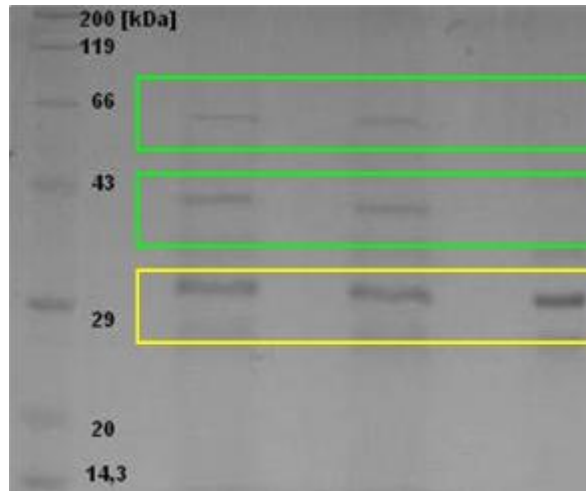


Abbildung 67: SDS-PAGE der Spaltung von MBP- α AChR₄₋₂₀₈ mit der Protease Xa

Alle Spaltungsreaktionen führten zum gleichen Ergebnis, das hier exemplarisch nur an einem Versuch ausgewertet wurde. Änderungen waren nur in der Intensität der Banden zu beobachten, die bei einer längeren Reaktionszeit entweder schwächer, Abnahme des Ausgangsproteins, oder stärker, Zunahme der Spaltungsprodukte, wurden. Die obige Abbildung zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der Spaltprodukte von Spaltung 8.

Nach 4 Stunden Reaktionszeit waren noch schwache Banden bei 65 kDa zu erkennen, die auf nicht gespaltenes MBP- α AChR₄₋₂₀₈ zurückzuführen waren. Die Banden bei 42 kDa deuteten auf das Spaltprodukt MBP hin. Die deutliche Bande bei 33 kDa konnte durch den direkten Vergleich mit der aufgetragenen Enzymlösung der Protease Faktor Xa zugeschrieben werden. Entgegen den Herstellerangaben erschien Faktor Xa nicht bei 42,4 kDa, sondern bei 33 kDa. Dies konnte mit dem Vorliegen der Protease in Form von zwei über Disulfidbrücken miteinander verbundenen Peptidketten erklärt werden. Laut *New England Biolabs* beträgt das Molekulargewicht einer Kette 26,7 kDa, was im SDS-Gel eine Bande bei ungefähr 30 kDa ergibt. Die erwartete, der α -Untereinheit des AChRs entsprechenden Bande, bei einem Molekulargewicht von 23 kDa, war nicht zu erkennen. Das konnte mit der geringen Löslichkeit des α AChR₄₋₂₀₈ begründet werden. Um den α AChR₄₋₂₀₈ in Lösung zu bringen, wurden verschiedene Probenpuffer mit Harnstoff ausprobiert, deren Zusammensetzung in Kapitel 4.2.19.2.2.3 aufgeführt ist; damit konnte dieser allerdings auch nicht in Lösung gebracht und nachgewiesen werden.

3 Ergebnisse

3.2.5.1.5 Charakterisierung

3.2.5.1.5.1 MALDI-Massenspektrometrie

Mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie (Kapitel 4.2.22) sollte nachgewiesen werden, dass es sich bei dem isolierten Protein tatsächlich um MBP- α AChR₄₋₂₀₈ handelte. Dazu wurde ein Vergleich mit dem Massenspektrum eines virtuellen tryptischen Verdaus der MBP- α AChR₄₋₂₀₈-Aminosäuresequenz mit dem Programm *flex analysis* durchgeführt.

Nach einer Kalibrierung mit einem Peptid-Kalibrierungsstandard wurden die Proben massenspektrometrisch untersucht. Im Folgenden wurde die Massenliste der aufgezeichneten *Peaks* automatisch erstellt und in das Programm *Bio Tools* importiert. Mit Hilfe des Sequenz-Editors wurde die Aminosäuresequenz des Fusionsproteins eingegeben, um im Anschluss virtuell mit Trypsin verdaut zu werden. Das Ergebnis des virtuellen Verdaus wurde zum aufgenommenen Spektrum hinzugefügt. Mit dem *SumPeakfinder* wurden die *Peaks* aus dem gemessenen und dem virtuell erzeugten Massenspektrum miteinander verglichen und dadurch auf eine Sequenzübereinstimmung geprüft. Bei der automatischen *Peak*-Suche ergab sich eine Sequenzübereinstimmung von 34,6 %.

3.2.5.1.5.2 ELISA

Mit der aufgereinigten und aufkonzentrierten Proteinlösung wurde ein *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) durchgeführt (Kapitel 4.2.21). Damit sollte das richtig gefaltete Protein MBP- α AChR₄₋₂₀₈ spezifisch nachgewiesen werden. Bei dem verwendeten Antikörper mAB 35 handelte es sich um einen konformationsabhängigen monoklonalen Antikörper, der nur native Antigene erkennt.

Sowohl das Testprotein MBP- α AChR₄₋₂₀₈ als auch die Positivkontrolle AChR aus *Torpedo californica* zeigten eine Gelbfärbung. Der Blank und die Negativkontrolle mit BSA blieben farblos. Die statistische Auswertung bestätigte das positive Ergebnis, da die Messwerte der Extinktionen von MBP- α AChR₄₋₂₀₈ größer waren als die Summe aus dem Mittelwert der Negativkontrollen und der doppelten Standardabweichung (siehe Abbildung 68).

3 Ergebnisse

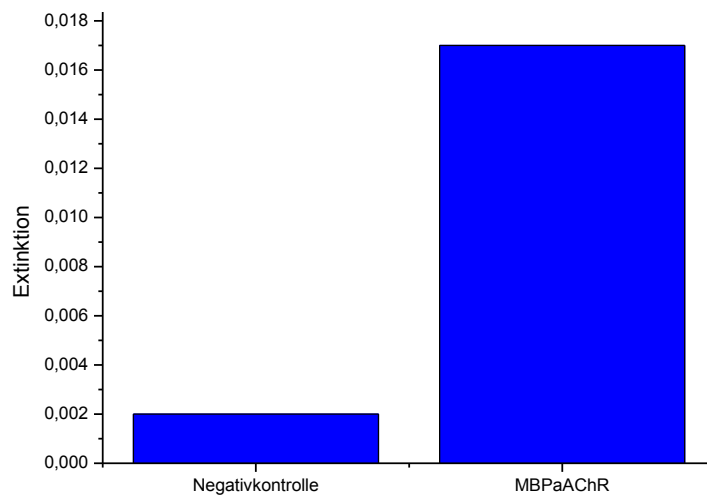


Abbildung 68: ELISA mit monoklonalen anti-AChR-Antikörpern (1:1.000)

3.2.5.1.5.3 Sequenzierung

Die Probe des Expressionsplasmids pmal- α AChR₄₋₂₀₈ wurde am Institut für Immungenetik sequenziert. Diese ergab auf Proteinebene die folgende Aminosäuresequenz:

MIGNIQIRGI RAAVIGHAMF PATGLPDHPL PALHEVAQVW LVAFRVDGHD
RAVVGPGAQL HAAVLFIK GK VGDDDLTVAF KDGWRCPRDV ASVLQEHFGE
LDNSKVTICI VIENK VWAPD LF

Mit der Plasmidsequenz (siehe Anhang Kapitel 6.1) wurde in der Datenbank des NCBI ein Sequenzvergleich angestellt, der eine 100 % Übereinstimmung mit der DNA-Sequenz der α -Untereinheit des menschlichen Acetylcholinrezeptors (gb/AAA73020.1/NCBI-Homepage) ergab. Einen bildlichen Überblick über die Lage und die Schnittstellen des α AChR₄₋₂₀₈ im Plasmidring gibt die Abbildung 69 wieder.

3 Ergebnisse

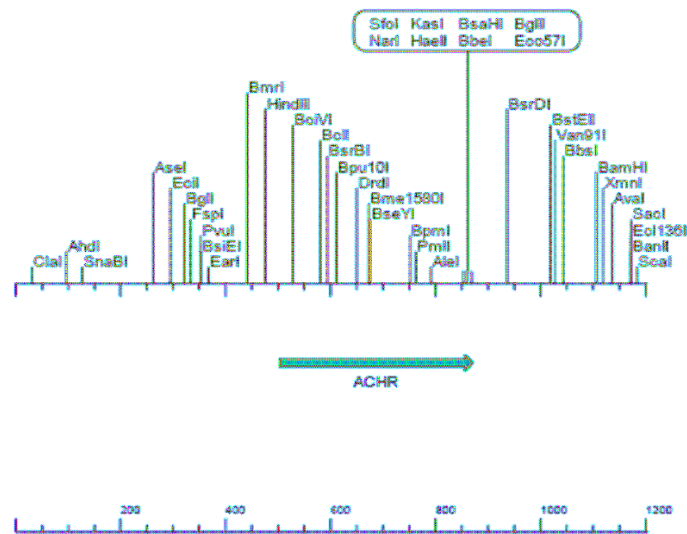


Abbildung 69: Schema der Sequenz der α -Untereinheit des AChRs auf dem Expressionsplasmid **pmal- α AChR₄₋₂₀₈** im Überblick

Bei dem exprimierten Plasmid handelte es sich also um pmal-c2x mit der Gensequenz für die α -Untereinheit des AChRs.

3.2.5.1.6 Diskussion der Expression und Isolierung von **MBP- α AChR₄₋₂₀₈**

In diesem Teil der Arbeit sollte die α -Untereinheit des Acetylcholinrezeptors isoliert werden. Li hatte hierzu diese DNA-Sequenz in den kommerziellen Vektor pmal-c2x inkloniert. Davon versprach man sich ein höheres Löslichkeitsprodukt, da MBP ein Protein mit einer hohen Löslichkeit ist. Durch die Expression des Plasmids pmal- α AChR₄₋₂₀₈ konnte das Fusionsprotein isoliert werden. Nach der Amylose-Affinitätschromatographie ergaben sich Proteinkonzentrationen bis 800 $\mu\text{g/mL}$. Der weitere Aufreinigungsschritt durch Gelfiltrations-Chromatographie führte dazu, dass das gewünschte Fusionsprotein MBP- α AChR₄₋₂₀₈, mit Ausnahme einer leichten Verunreinigung, isoliert werden konnte. Es wurde bei einer NaCl-Konzentration zwischen 0,4 und 0,8 mol/L von der *HiTrap Q FF* Sepharosesäule eluiert. Die Abspaltung des MBP-Tags vom Fusionsprotein wurde durchgeführt, nachdem es auf 43 $\mu\text{g/mL}$ aufkonzentriert wurde. Die Spaltung wurde mehrmals unter Variieren der Reaktionsbedingungen durchgeführt. Neben der Menge des eingesetzten Proteins wurden die Volumina des Factor-Xa-Puffers sowie der Enzymlösung verändert. Die Reaktion wurde zudem nach unterschiedlichen Zeiten beendet. Die Bande bei einem Molekulargewicht von

3 Ergebnisse

23 kDa, welche zum gewünschten Spaltungsprodukt α AChR₄₋₂₀₈ gehören sollte, war bei keinem SDS-Gel zu sehen. Das konnte mit der geringen Löslichkeit von α AChR₄₋₂₀₈ begründet werden. Schließlich wurde der MBP-Tag auf Genebene an die Rezeptoruntereinheit angehängt, um ihre Löslichkeit zu erhöhen und um eine native Faltung zu erreichen (Li 2004). Dies steht zwar im Widerspruch zu der Veröffentlichung von Li, wurde von ihr allerdings mündlich bestätigt.

Mittels MALDI-Massenspektrometrie wurde die Identifizierung des isolierten Fusionsproteins MBP- α AChR₄₋₂₀₈ durchgeführt. Als Vergleichsmöglichkeit wurde der virtuelle tryptische Verdau der angenommenen Aminosäuresequenz siehe Anhang Kapitel 6.1 hinzugezogen. Bei dem automatischen Peak-Abgleich stimmten die Sequenzen zu 34,6% überein. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem isolierten Protein um MBP- α AChR₄₋₂₀₈ handelte. Der durchgeführte ELISA bestätigte, dass das Fusionsprotein seine Immunreaktivität besitzt und somit auch richtig gefaltet sein sollte. Die abschließende Sequenzierung des Expressionsplasmids bestätigte das Vorliegen von pmal- α AChR₄₋₂₀₈ mit der Gensequenz für die α -Untereinheit des AChRs.

3.2.6 Klonierung von MBP-Gelonin- α Acetylcholinrezeptor₄₋₂₀₈

Das Ziel dieses Projektes besteht darin, ein Fusionsprotein aus Gelonin und der α -Untereinheit des Acetylcholinrezeptors herzustellen. Um die Löslichkeit zu erhöhen, sollte dieses mit einem Löslichkeitstag verbunden werden, mit dem das Protein zudem über Affinitätschromatographie aufgereinigt werden kann. Als Löslichkeitstag diente wie schon im vorherigen Projekt das maltosebindende Protein (MBP).

3.2.6.1 Klonierungsstrategie

Folgende Klonierungsstrategie wurde erarbeitet:

Als erstes wird ein dem Arbeitskreis zur Verfügung gestellter Vektor, der den Code der α -Untereinheit des Acetylcholinrezeptors enthält, mit den M13 Primern sequenziert. Hierbei werden auch die Schnittstellen der *multiple cloning site* (MCS) erfasst, mit denen das DNA-Fragment des Acetylcholinrezeptors umkloniert werden soll.

Das Plasmid wird in einem nächsten Schritt mit *HindIII* und *EcoRI* geschnitten und in den *high copy* Vector pUC18 inkloniert. Es wird dieser Vektor benutzt, da sich im Folgenden weitere Klonierungsschritte anschließen.

Die Basensequenz für Gelonin liegt in einem pET-Vektor vor. Diese wird mit *NdeI* und

3 Ergebnisse

HindIII verdaut und in den Vektor pUCACHR einkloniert.

Da in diesem Vektor das Stopcodon für Gelonin sowie ein Aminosäureshift vorliegt, wird durch eine Punktmutation bei 944 eine Base aus dem Plasmid entfernt.

Eine weitere Punktmutation bei 949 führt dazu, dass eine zweite *EcoRI* Schnittstelle zwischen der Basensequenz von Gelonin und dem Acetylcholinrezeptor entfernt wird, da die DNA des Fusionsproteins in einem nächsten Schritt mit *EcoRI* umklont wird.

In einem letzten Schritt wird die DNA des Fusionsproteins mit *NdeI* und *EcoRI* verdaut und in den pmal-c5x Vector einkloniert.

3.2.6.1.1 Klonierung der α AChR₄₋₂₀₈-DNA in den Vektor pUC18

Der Vektor, der die Sequenz für den extrazellulären Teil der α -Untereinheit des Acetylcholinrezeptors (AChR₄₋₁₈₁) enthält, wurde freundlicherweise von Dr. Beeson (Institute of Molecular Medicine, Oxford, United Kingdom) zur Verfügung gestellt. Leider lag keine komplette Vektorsequenz vor. Es war bekannt, dass ursprünglich ein pET19b-Vektor von *Novagen* verwendet wurde. Der Vektor konnte von Kreilinger (Kreilinger 2001) allerdings nur teilweise sequenziert werden. Von Hossann (Hossann 2004) wurde das Fragment mittels einer 100bp-Box verlängert, so dass die α -Untereinheit als AChR₄₋₂₀₈ im modifizierten pET19b Vektor vorlag. Dieser diente als Grundlage für die folgenden Klonierungsarbeiten.

Der Vektor konnte erfolgreich mit dem Primer M13rev sequenziert werden. Daraus ergab sich, dass die α -Untereinheit des Acetylcholinrezeptors zwischen den Restriktionsstellen *HindIII* und *EcoRI* liegt.

Um die folgenden Klonierungsarbeiten durchführen zu können, wurde für die nächsten Schritte ein pUC-Vektor verwendet. Dieser zeichnet sich dadurch aus, dass transformiert in eine Zelle sehr viele Plasmidkopien erhalten werden. Folglich ist es sinnvoll, bei umfangreichen Klonierungen die Arbeiten auf DNA-Ebene in einem pUC-Vektor durchzuführen. In diesem Projekt wurde der Vektor pUC18 verwendet, da in diesem die passenden Schnittstellen vorlagen, um das α -AChR-Fragment einzuklonieren.

Der modifizierte pET19b-Vektor und der pUC18-Vektor wurden mit *HindIII* und *EcoRI* geschnitten und das α -Acetylcholinrezeptorfragment in den pUC18-Vektor ligiert.

3 Ergebnisse

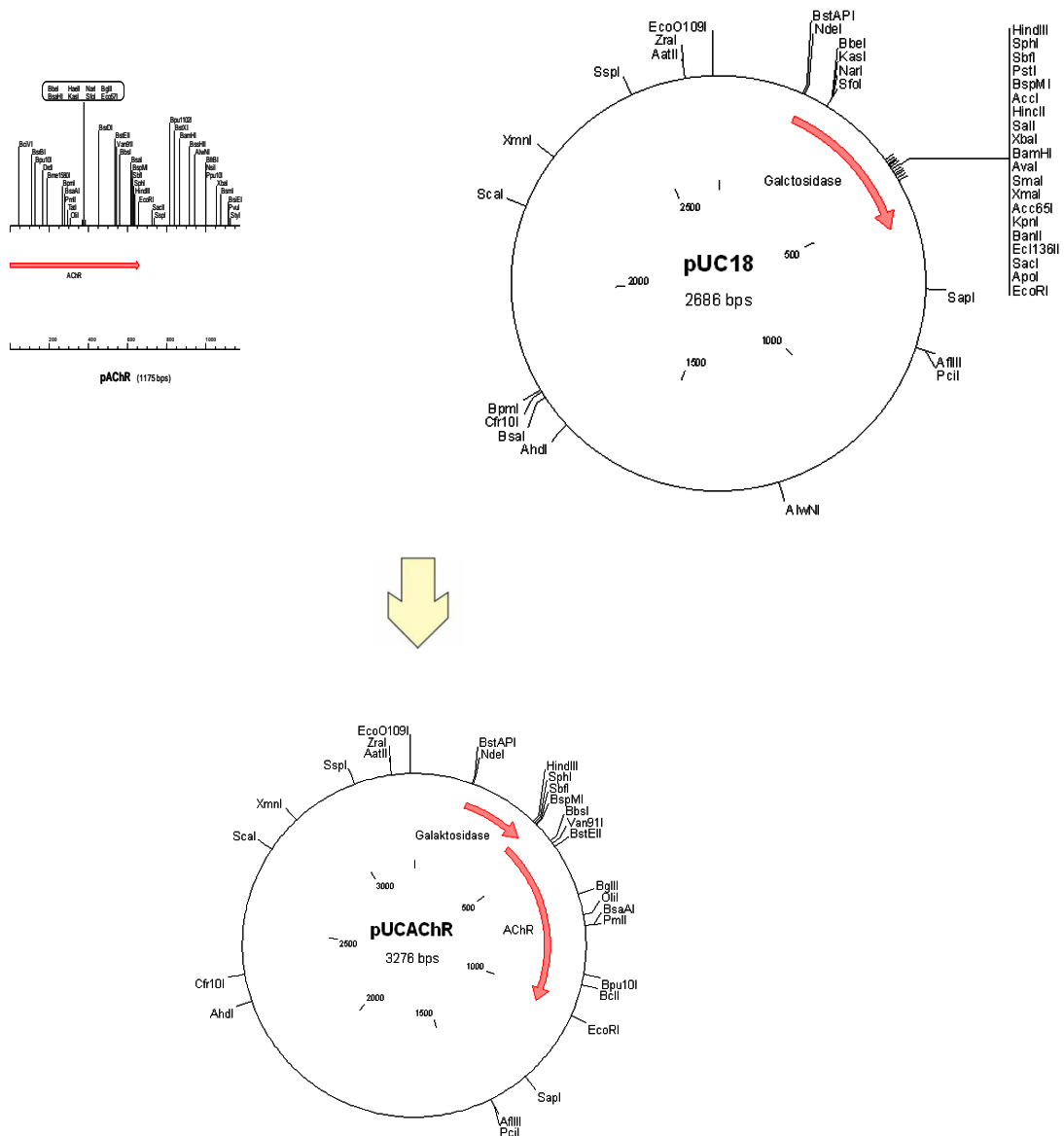


Abbildung 70: Klonierungsstrategie für das Plasmid pmaGelAChR (1): Synthese von pUCACHR durch Umklonieren der DNA für α -AChR in den *high copy* Vektor pUC18

3.2.6.1.2 Klonierung der Gelonin-DNA in den Vektor pUCACHR

In einem nächsten Schritt wurde die Expression und Isolierung des pET-gel-Vektors zuerst optimiert und danach das Geloninfragment in den Vektor pUCACHR einkloniert.

Als erstes wurde mittels verschiedener Isolierungsmethoden versucht, eine maximale Plasmidausbeute zu erreichen. Hier ist insbesondere zu berücksichtigen, dass die pET-Vektoren zur Proteinisolierung optimiert, und aus dem *low copy* Vektor pBR322

3 Ergebnisse

generiert wurden. Dadurch bedingt liegen die Ausbeuten bei Plasmidisolierungen generell sehr niedrig.

Außerdem lag in dem Vektor das Gen für Gelonin vor. Da dieses, im Gegensatz zu Ricin, über keine Membrandomäne verfügt, ist Gelonin, solange es außerhalb einer Zelle vorliegt, nicht toxisch. Sobald es innerhalb einer Zelle vorliegt, kann es diese abtöten. Li generierte den pET-gel-Vektor und konnte Gelonin rekombinant exprimieren. Allerdings wuchsen die Bakterien sehr viel langsamer.

Zudem wurde durch Clusteranalyse (Huang 1991) festgestellt, dass in Gelonin eine Sequenz vorliegt, die homolog zur Sequenz der Topoisomerase ist. Dadurch liegt mit Gelonin ein Protein vor, das zusätzlich auch eine DNase Aktivität besitzt.

Da zur Plasmidisolierung Minischüttelkulturen benutzt werden, liegt in diesen immer ein geringer Anteil Gelonin vor. Dieses kann dann während der Expression durch seine Ribosomen-inaktivierende Aktivität, als auch durch die DNase Aktivität, den Wachstum hindern.

Um eine möglichst gute Plasmidausbeute zu erreichen, wurde eine Maxiplasmidisolierung durchgeführt. Diese wurde zusätzlich modifiziert, indem das Volumen der Schüttelkultur verfünffacht wurde und das Volumen des Elutionspuffer 40 µL statt 15 mL betrug. Trotz dieser drastischen Isolierungsmethode wurden nur wenige Mikrogramm isoliert; diese Menge ist vergleichbar mit einer Minipräparation eines pET-Vektors ohne Protein.

Es wurden pET-gel und pUCACHR mit *Nde*I und *Hind*III verdaut und das Gelonin in den Vektor pUCACHRGel inkloniert.

3 Ergebnisse

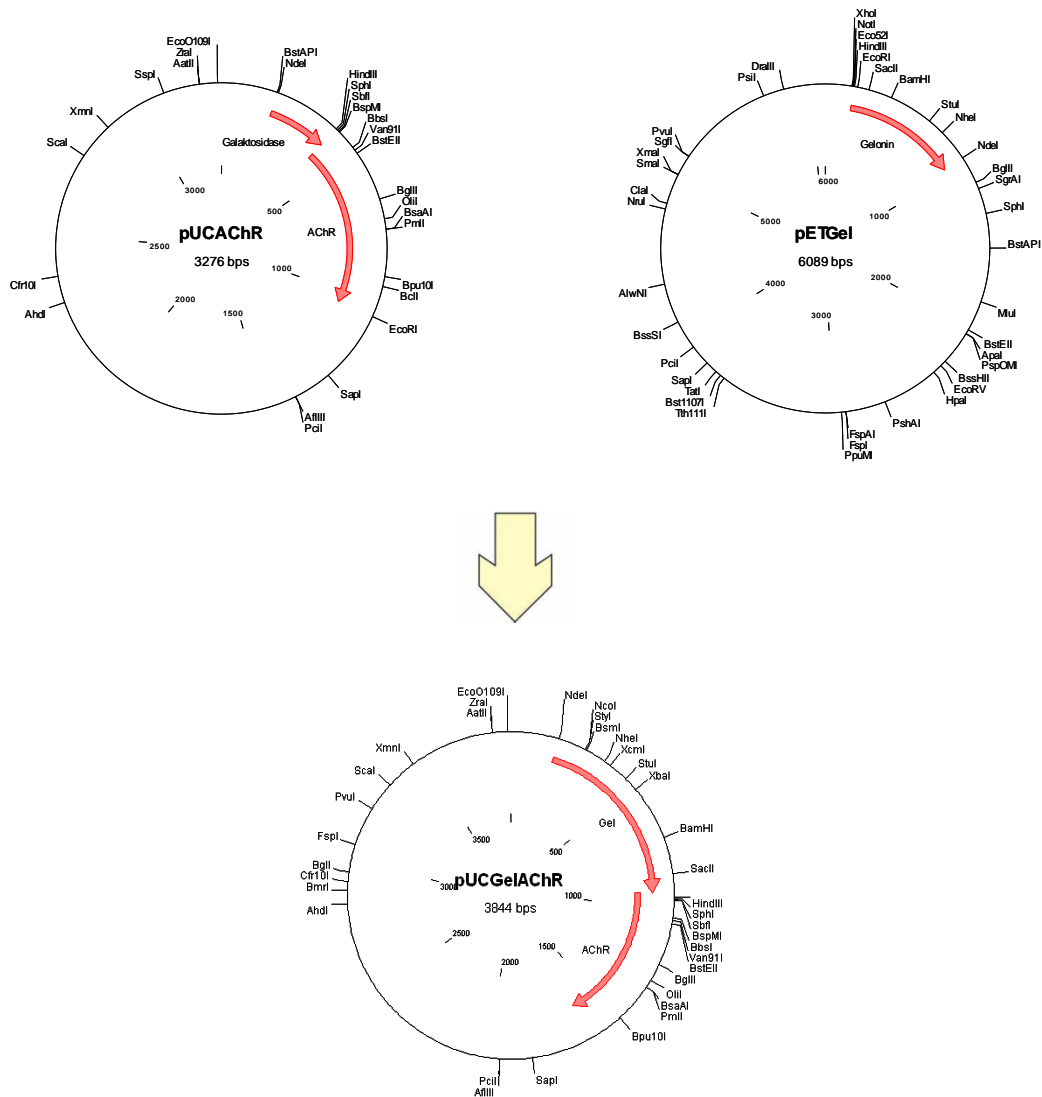


Abbildung 71: Klonierungsstrategie für das Plasmid pmalGelAChR (2): Synthese von pUCGelAChR durch Umklonieren der DNA von Gelonin in den Vektor pUCAChR

3.2.6.1.3 Deletion des Stopcodons und Aminosäureshifts sowie einer *EcoRI*-Schnittstelle durch gezielte Mutagenese

In dem nun erhaltenen Vektor lagen in der Gensequenz mehrere Stellen vor, die durch gezielte Mutagenese verändert werden sollten. Zum einen lag ein Aminosäureshift vor, der durch die Deletion einer Base rückgängig gemacht werden konnte. Diese wurde im Bereich des Stopcodons des Gelonings entfernt, womit dieser ebenfalls entfernt wurde. In einem weiteren Schritt sollte eine *EcoRI*-Schnittstelle entfernt werden, die zwischen dem α AChR-Gen und dem Gelonigen liegt, da in einem weiteren Schritt das Gen des

3 Ergebnisse

Fusionsproteins in den Vektor pmal-c5x mit den Schnittstellen *NdeI* und *EcoRI* umkloniert werden sollte.

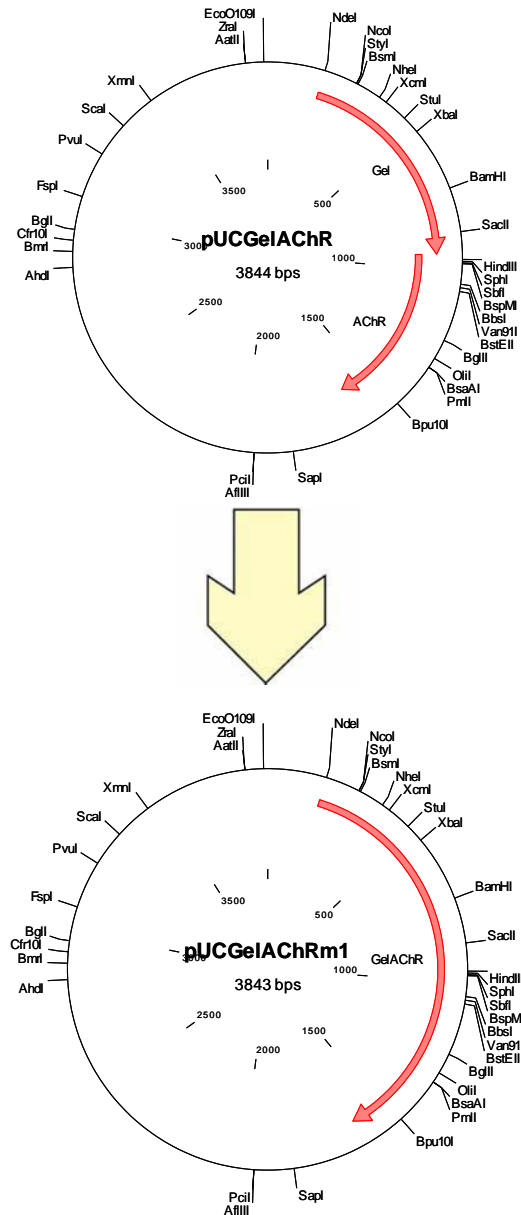


Abbildung 72: Klonierungsstrategie für das Plasmid pmalGelAChR (3): Synthese des Vektors pUCGelAChRm1 durch eine Deletion der Base an Position 944.

3 Ergebnisse

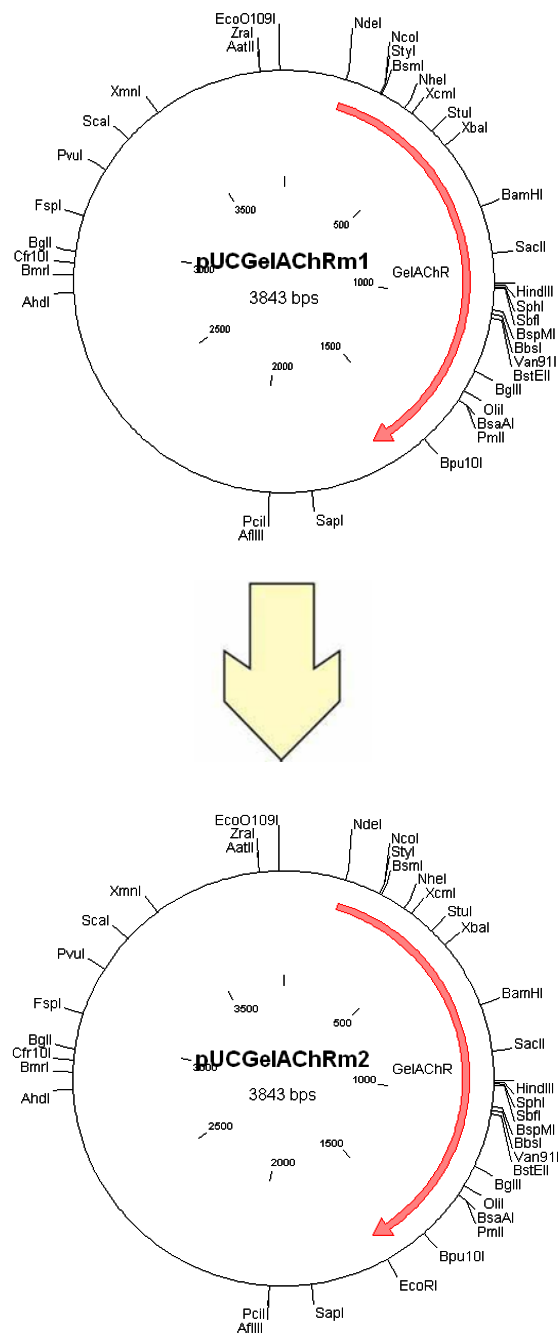


Abbildung 73: Klonierungsstrategie für das Plasmid pmalGelAChR (4):Synthese des Vektors pUCGelAChRm2 durch eine Punktmutation an Position 949.

3 Ergebnisse

3.2.6.1.4 Klonierung der Gelonin- α AChR₄₋₂₀₈-DNA in den Vektor pmal-c5x

Der letzte Schritt der Klonierungsstrategie ist ein Umklonieren des Fusionsproteingens aus dem vorliegenden *high copy* Vektor in den Proteinisolierungsvektor pmal-c5x. Vektoren der Firma *New England Biolabs* zur Isolierung von schwer löslichen Proteinen verfügen über die Gensequenz des MBP, das als *Tag* fungiert. Da MBP ein hohes Löslichkeitsprodukt besitzt, erhöht es das Löslichkeitsprodukt des rekombinant hergestellten Proteins aus MBP und dem gewünschten Protein. Dadurch kann in diesem Schritt das Fusionsprotein richtig gefaltet werden und danach der *Tag*, wenn notwendig, abgespalten werden. Dadurch erhält man ein Fusionsprotein aus der extrazellulären α -Untereinheit des Acetylcholinrezeptors 4-208 und Gelonin.

3 Ergebnisse

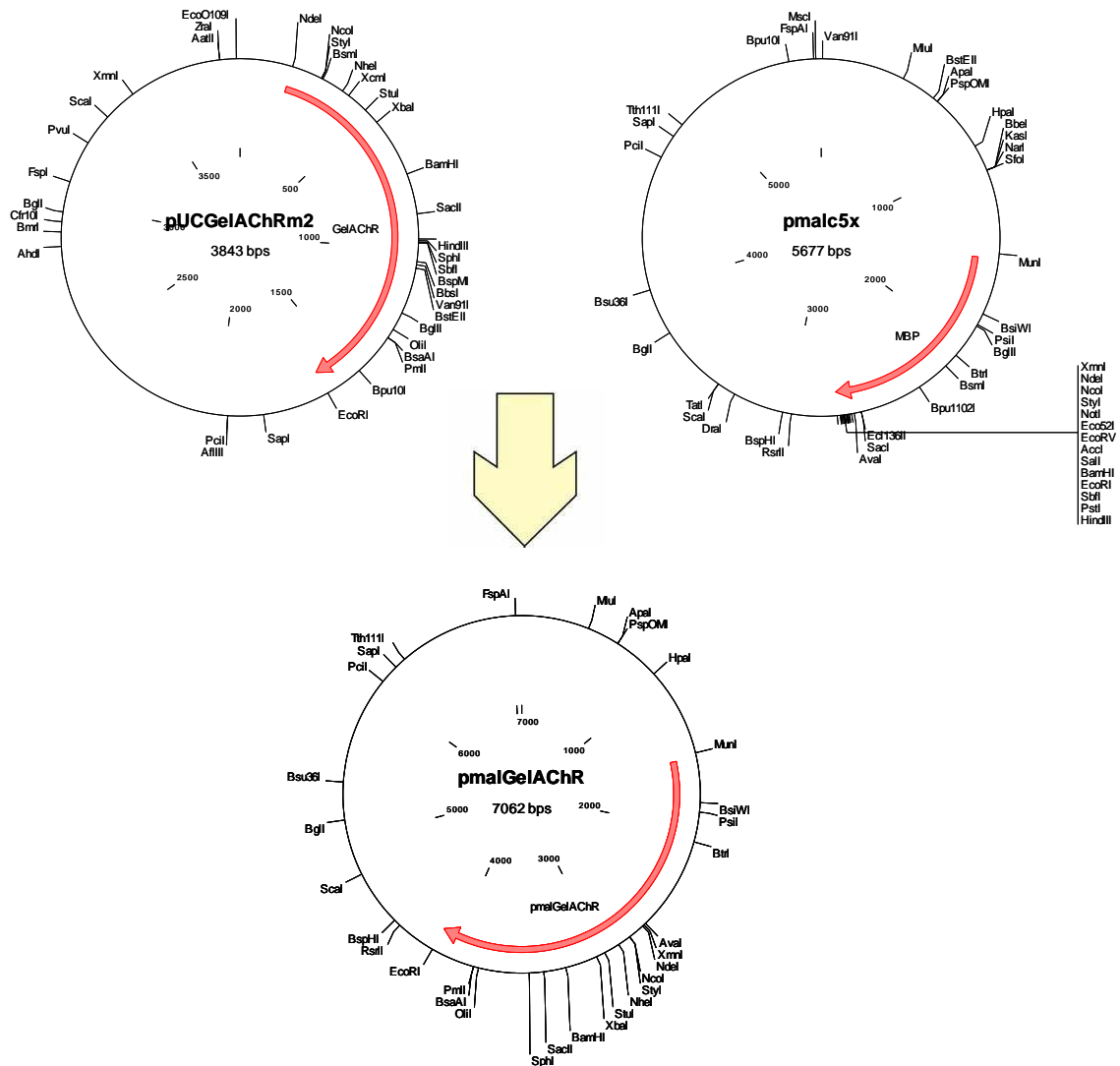


Abbildung 74: Klonierungsstrategie für das Plasmid pmalGelAChR (5) Synthese des Vektors pmalGelAChR durch umklonieren der DNA des Fusionsproteins GelAChR in den Vektor pmal-c5x

3 Ergebnisse

3.2.6.2 Plasmidisoliation

Auf antibiotikahaltigen Agarplatten wurden Zellkulturen mit den Plasmiden pUC18 und pET-gel ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde jeweils eine der gewachsenen Kolonien von der Platte entnommen und in je eine Übernachtskultur überführt. Nachdem diese über Nacht geschüttelt wurden, konnten die Plasmide mit dem QIAprep Spin Mini Kit aus den Zellen isoliert werden (Kapitel 4.2.12.1).

3.2.6.3 Klonierung des α AChR-Fragments in den Vektor pUC18

Nach der Sequenzierung des von Beeson zur Verfügung gestellten Vektors konnten die Schnittstellen *EcoRI* und *HindIII* ermittelt werden. Das Plasmid und der Vektor pUC18 wurden daraufhin mit diesen geschnitten und das α AChR-Fragment in den Vektor pUC18 ligiert. Im Folgenden ist der mit *HindIII* und *EcoRI* geschnittene Vektor und der pUC18 Vektor aufgetragen (Kapitel 4.2.13, 4.2.14).

3 Ergebnisse



Abbildung 75: Charakterisierung des pUC18-Vektors

Wie erwartet ist in der Bahn, in der der unverdaute pUC18-Vektor aufgetragen wurde, nur eine Bande zu erkennen. Da die Plasmid-DNA unverändert auf das Gel geladen wurde, waren darin keine Fragmente enthalten und es konnte nur eine Bande entstehen.

Die zweite Bahn, in der der Rezeptor geschnitten aufgetragen wurde, zeigt erwartungsgemäß zwei Banden. Das Stück, das herausgeschnitten wurde, bildet die zweite Bande, der restliche Vektor die erste. Vergleicht man die zweite Bande mit dem Marker, wird deutlich, dass es sich dabei um den AChR handelt.

Da nun sichergestellt war, dass der AChR im pUC18-Vektor enthalten ist, konnte damit weitergearbeitet werden.

3.2.6.4 Verdau der isolierten Plasmide pUC18AChR und pET-gel

Der Verdau der isolierten Plasmide erfolgt gemäß der Klonierungsstrategie mit Restriktionsenzymen von *Fermentas* (Kapitel 4.2.13).

Der pUC18AChR-Vektor wird mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *HindIII* geschnitten. Dabei wird das Plasmid aufgeschnitten, um eine Einklonierung des Gelonins zu ermöglichen (Tabelle 22: Konzentration der Plasmid-DNA). Hierbei wird außerdem ein Rest der β -Galaktosidase-Sequenz entfernt. Das ist von Vorteil, da sich die DNA für die β -

3 Ergebnisse

Galaktosidase direkt vor der Sequenz des AChR innerhalb der Schnittstellen befindet und somit der Rezeptor isoliert kloniert werden kann. Die gleichen Restriktionsendonukleasen schneiden das Gelonin aus dem pET-gel-Vektor (Kapitel 4.2.12, 4.2.13).

Vektor	Methode	Konzentration
pET-gel	Maxi	462 ng/ μ L
pUC18AChRex	Mini	495 ng/ μ L

Tabelle 22: Konzentration der Plasmid-DNA

Ansätze für den Verdau:

Ansatz	1	2	3	4	5
Vektor	pET-gel	pET-gel	pUC18AChRex	pUC18AChRex	pUC18AChRex
<i>HindIII</i>	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L
<i>NdeI</i>	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L
DNA	5 μ L	10 μ L	1 μ L	3 μ L	10 μ L
Puffer R	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L
H ₂ O	10 μ L	5 μ L	14 μ L	12 μ L	5 μ L

Tabelle 23: Pipettierschema des Verdaus der isolierten Plasmide

Nachdem der Ansatz 2h im Thermomixer bei 37° C inkubiert wurde, wurde die Probe mit *Loading Dye* versetzt und auf ein Agarosegel aufgetragen (Kapitel 4.2.14).

3 Ergebnisse

3.2.6.5 Agarose-Gelelektrophorese der verdauten Plasmide

Die folgende Abbildung zeigt die Plasmide, die nach dem Verdau auf ein Agarosegel aufgetragen wurden.

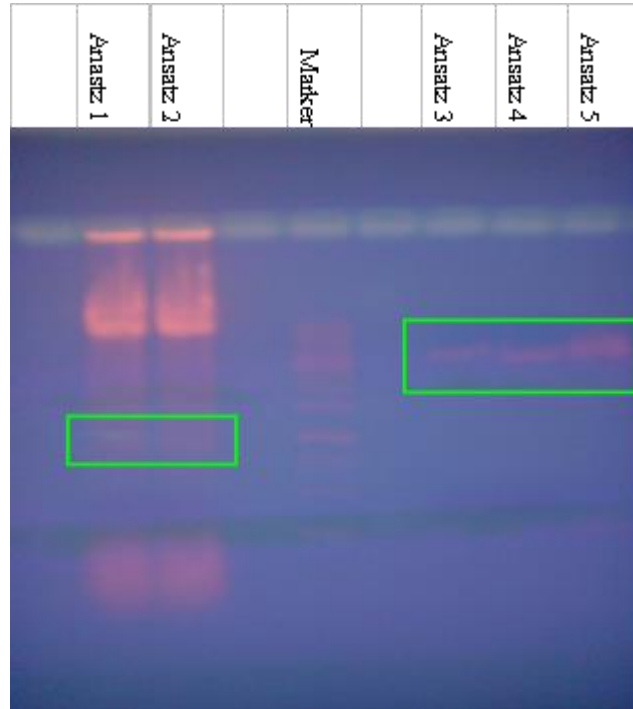


Abbildung 76: Agarose-Gelelektrophorese der verdauten pET-gel- und pUC18AChRex-Plasmide

In den ersten beiden Ansätzen sind jeweils zwei Banden zu erkennen. Vergleicht man diese mit dem Marker, so wird deutlich, dass es sich bei den kleinen Banden um das ausgeschnittene Gelonin handelt und bei den großen Banden demnach um die Vektor-DNA. Die Ansätze drei bis fünf zeigen jeweils nur eine Bande. Dabei handelt es sich um das große Fragment des pUC-Vektors. Das ausgeschnittene Stück, das die β -Galaktosidase enthält, ist aufgrund seiner geringen Größe nicht mehr im Gel erkennbar (Kapitel 4.2.14).

3 Ergebnisse

3.2.6.6 Ligation der Gelonin-DNA in den Vektor pUCACHR

Um den nächsten in der Klonierungsstrategie beschriebenen Schritt durchführen zu können, müssen die nun isoliert vorliegenden DNA-Sequenzen für den pUC-AChR und das Gelonin extrahiert und ligiert werden (Kapitel 4.2.14.1, 4.2.14.2, 4.2.15).

DNA	Methode	Konzentration
Gelonin	GenJet Gel Extraction Kit	45 ng/ μ L
pUC18-AChR	GenJet Gel Extraction Kit	135 ng/ μ L

Tabelle 24: Konzentrationen der extrahierten DNA

Die DNA wurde in folgenden Ligationsansätzen eingesetzt:

Ansatz	1	2
Gel-DNA	10 μ L	12,5 μ L
pUCACHRex	2 μ L	2,5 μ L
T4-Ligase	1 μ L	1 μ L
T4-Puffer	4 μ L	4 μ L
H ₂ O	3 μ L	-

Tabelle 25: Ligationsansätze

Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 16° C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Ligationsprodukte in kompetente Zellen transformiert.

3.2.6.7 Transformation der Ligationsprodukte

Von den Ligationsansätzen wurden nach Beendigung der Inkubation jeweils 2 μ L DNA in kompetente Zellen des *E. coli*-Stammes BL21(DE3) transformiert (Kapitel 4.2.16). Am nächsten Tag waren auf den ausgestrichenen Agarplatten Kolonien vorhanden. Die Transformation ist also erfolgreich verlaufen. Um zu kontrollieren, dass die Zellen auch das gewünschte Konjugat enthalten und um falsche Positive auszuschließen, wurden mit sechs Kolonien der Platte Übernachtskulturen angesetzt und die Plasmid-DNA am folgenden Tag gemäß der Anleitung über Mini-Präparation isoliert (Kapitel 4.2.12.1).

3.2.6.8 Agarose-Gelelektrophorese der Ligation und Transformation

3 Ergebnisse

Damit festgestellt werden kann, ob das Gelonin korrekt in den pUC-Vektor aufgenommen wurde und welche der Kolonien nun entsprechend das AChR-Gel-Konjugat enthalten, wurde die isolierte Plasmid-DNA unverdaut auf eine Agarosegel aufgetragen (Kapitel 4.2.14).

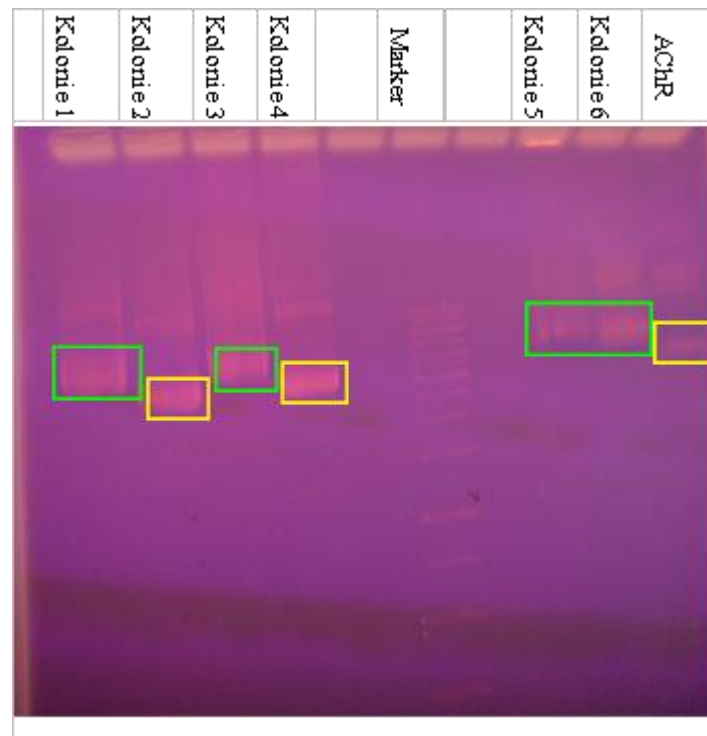


Abbildung 77: Überprüfung der Klonierung von pUCAChRex und Gelonin

Abbildung 77 zeigt, dass in Kolonie 1, Kolonie 3, Kolonie 5 und Kolonie 6 das AChR-Gelonin-Konjugat enthalten ist. Lediglich die Plasmide von Kolonie 2 und Kolonie 4 haben kein Gelonin aufgenommen, sondern wurde ungeschnitten mitgeschleppt. Das wird daraus ersichtlich, dass die Bande von Kolonie 2 und 4 tiefer liegen, als die von Kolonie 1, 3, 5 und 6. Der Grund dafür liegt darin, dass die Plasmide von Kolonie 2 und 4 ohne Gelonin eine kleinere Masse besitzen als die übrigen. Sie sind genauso weit gelaufen wie die Bande des AChR-Vektors, der in Bahn 7 des Gels aufgetragen war. Demnach entspricht deren Plasmid dem AChR-Plasmid und beinhaltet kein Gelonin.

Für weitere Untersuchungen liegt nun ein Gel-AChR-Konjugat im pUC-Vektor vor. Wie in der Klonierungsstrategie erkennbar ist, befindet sich in der DNA-Sequenz zwischen dem Gelonin und dem AChR noch ein Stopcodon. Darüber hinaus ist bei der Klonierung eine Leseraster-Verschiebung, ein sogenannter *frameshift*, aufgetreten.

Mittels gezielter Mutagenese sollen daher Stopcodon und *shift* entfernt werden.

3.2.6.9 Erste gezielte Mutagenese

3 Ergebnisse

Über gezielte Mutagenese lassen sich spezifische Veränderungen an einer DNA-Sequenz vornehmen. Mit Hilfe speziell synthetisierter Primer kann man einzelne Basen beispielsweise austauschen oder deletieren. In diesem Versuch soll eine Base aus dem genetischen Code entfernt werden. Somit wäre das vorhandene Stopcodon aufgehoben und auch der *shift* beseitigt. Dazu muss die Base Nummer 944 aus der Sequenz entfernt werden (Kapitel 4.2.17).

Das Computerprogramm PrimerX (www.bioinformatics.org/PrimerX/) liefert nach Eingabe der Bedingungen und Ziele der Mutagenese die nötigen Primersequenzen, die dann bei der Firma *Eurofins MWG Operon* synthetisiert wurden.

Sind die Primer vorhanden, wird die Mutagenese mittels einer PCR durchgeführt (Kapitel 4.2.18).

Primer	Molekulargewicht	Konzentration	Verdünnung
1	10476 g/mol	837 ng/μL	1:10
2	10404 g/mol	837 ng/μL	1:10

Tabelle 26: Primer erste gezielte Mutagenese

Ansatz für die PCR:

Komponenten	Volumen
Primer 1	11,9 μL
Primer 2	12,1 μL
DNA	3,5 μL
Reaction buffer	5 μL
dNTPs	1 μL
H ₂ O	16,5 μL
Polymerase	1 μL

Tabelle 27: Ansatz der ersten PCR

Verlauf der PCR:

Zyklen	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3
1	1 min bei 95° C	-	-
18	30 s bei 95° C	1 min bei 55° C	5,4 min bei 68° C

3 Ergebnisse

1	1 min bei 94° C	1 min bei 55° C	10 min bei 72° C
---	-----------------	-----------------	------------------

Tabelle 28: Verlauf der ersten PCR (Sambrook 2006)

Nach Beendigung der PCR wird die DNA in Zellen der *E. coli*-Stämme BL21 und XL-Blue transformiert. Von den über Nacht gewachsenen Kolonien wurden 6 Übernachtskulturen angesetzt und am folgenden Tag die Plasmid-DNA isoliert (4.2.12.1).

3.2.6.10 Verdau der mutierten Plasmid-DNA

Um kontrollieren zu können, ob die Mutagenese erfolgreich war, benötigt man die Sequenzen der entstandenen DNA. Dafür wurden die Plasmide der 6 Übernachtskulturen folgendermaßen verdaut (Kapitel 4.2.13).

Ansatz	1	2	3	4	5	6
Zellen	XLBlue	XLBlue	BL21	BL21	BL21	BL21
DNA	4 µL	4 µL	4 µL	4 µL	4 µL	4 µL
<i>Hind</i> III	1 µL	1µL	1 µL	1µL	1µL	1µL
<i>Nde</i> I	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
Puffer R	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2µL
H ₂ O	11 µL	11 µL	11 µL	11 µL	11 µL	11µL

Tabelle 29: Pipettierschema des Verdaus der mutierten Plasmid-DNA

3 Ergebnisse

3.2.6.11 Agarose-Gelelektrophorese zur Kontrolle der Mutagenese

Nachdem die Plasmide verdaut waren, wurden sie auf ein Agarosegel aufgetragen. Nachfolgende Abbildung zeigt das Ergebnis der Elektrophorese (Kapitel 4.2.14).



Abbildung 78: Kontrollgel der ersten Mutagenese

Man erkennt, dass in allen Proben ein gleich großes DNA-Fragment ausgeschnitten wurde. Es handelt sich dabei um das Gel-AChR-Konjugat aus dem pUC-Vektor und nicht um eine Verunreinigung.

Um allerdings sichergehen zu können, dass die Mutagenese erfolgreich verlaufen ist, benötigt man einen Vergleich der DNA-Sequenzen. Dafür wurden die markierten Banden aus dem Gel extrahiert und die DNA sequenziert. Der Vergleich dieser Sequenzen hat gezeigt, dass die Mutagenese erfolgreich war.

3.2.6.12 Zweite gezielte Mutagenese

Bevor nun das synthetisierte Konjugat mit *Hind*III und *Eco*RI aus dem Plasmid herausgeschnitten werden kann, muss die oben erwähnte zweite Schnittstelle für *Eco*RI aus dem Fusionsprotein entfernt werden. Dafür wurde erneut eine gezielte Mutagenese durchgeführt (Kapitel 4.2.17).

3 Ergebnisse

Dabei sollte die Base Adenin an Stelle 949 der DNA-Sequenz durch die Base Thymin ersetzt werden.

Die benötigten Primer wurden wiederum mit Hilfe des oben genannten Computerprogramms synthetisiert und im nachstehenden PCR-Ansatz eingesetzt (Kapitel 4.2.18).

Primer	Molekulargewicht	Konzentration	Verdünnung
1	12306 Da	3480 ng/ μ L	1:100
2	12282 Da	3480 ng/ μ L	1:100

Tabelle 30: Primer zweite gezielte Mutagenese

Ansatz für die PCR:

Komponente	Volumen
Primer 1	10,2 μ L
Primer 2	10,2 μ L
DNA	1 μ L
Reaction buffer	5 μ L
dNTPs	1 μ L
H ₂ O	22,6 μ L
Polymerase	1 μ L

Tabelle 31: Ansatz der zweiten PCR

Verlauf der PCR:

Zyklen	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3
1	1 min bei 95° C	-	-
12	30 s bei 95° C	1 min bei 55° C	7,6 min bei 68° C
1	1 min bei 94° C	1 min bei 55° C	10 min bei 72° C

Tabelle 32: Verlauf der zweiten PCR (Sambrook, 2006)

Nach Beendigung der PCR wird die DNA in Zellen der *E. coli*-Stämme BL21 und XL-Blue transformiert (Kapitel 4.2.16).

3 Ergebnisse

Um zu kontrollieren, ob die Mutagenese erfolgreich verlaufen ist, wurde die isolierte Plasmid-DNA mit *EcoRI* und *NdeI* verdaut und auf ein Agarosegel aufgetragen. Abbildung 79 zeigt das Ergebnis dieser Elektrophorese.

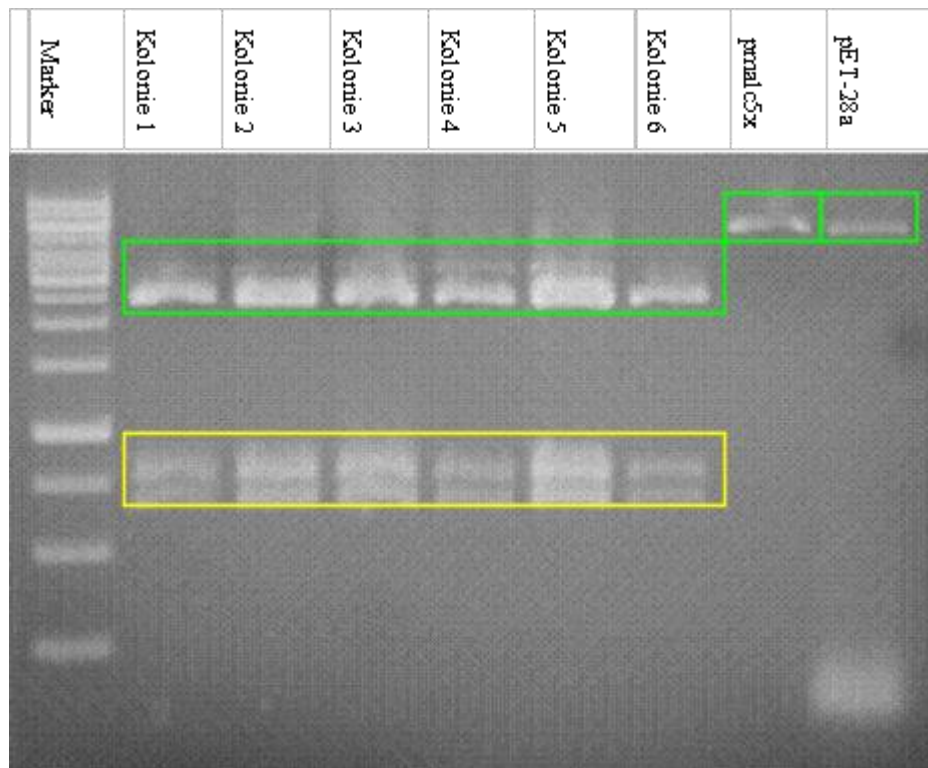


Abbildung 79: Kontrollgel der zweiten Mutagenese

Die Abbildung 79 zeigt, dass die zweite Mutagenese nicht funktioniert hat. Da die Restriktionsenzyme das Plasmid in drei Fragmente zerschneiden konnten, war die zweite *EcoRI*-Schnittstelle im Plasmid beim Verdau noch vorhanden, somit wurde das Konjugat wieder auseinander geschnitten. Die dicht aufeinanderfolgenden Banden, von denen die obere Gelonin darstellt und die untere AChR, zeigen, dass zwischen Gelonin und AChR weiterhin die *EcoRI*-Schnittstelle noch vorlag.

Die Plasmide pmal-c5x und pET28a wurden aufgetragen, um, im Falle einer erfolgreichen Mutagenese, ausgeschnitten und zur Klonierung weiter verwendet zu werden. Hierbei wurden die Vektoren lediglich aufgeschnitten, so dass nur eine Bande im Gel erkennbar ist. Die zweite Bande in der pET28a-Bahn wurde durch nicht vollständig abgetrennte RNA verursacht, die vom Extraktionskit nicht denaturiert wurde. Dieser Versuch wurde mit verschiedenen Primern und PCR-Assays mehrmals wiederholt.

3 Ergebnisse

3.2.7 Diskussion

Um einen Wirkstoff zur möglichen Therapie von *Myasthenia gravis* synthetisieren zu können, sollte ein Gel-AChR-Konjugat auf DNA-Ebene hergestellt werden.

Grundlegender Vektor für diese Arbeit war der veränderte Vektor pET19b, der in vorherigen Arbeiten nur unvollständig charakterisiert werden konnte.

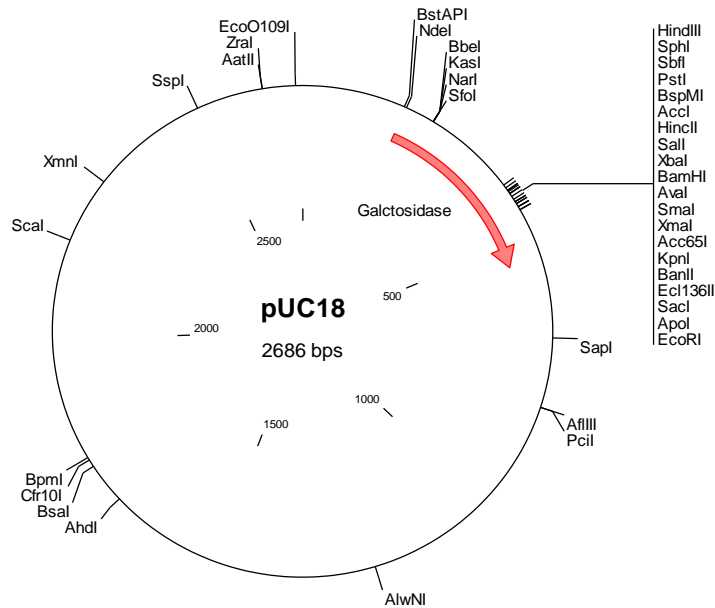


Abbildung 80: pUC18-Vektor

Das α AChR-Fragment wurde als erstes in den *high copy* Vektor pUC18 inkloniert. Um sicherzugehen, dass der Rezeptor auch, wie angenommen, enthalten ist, wurde ein Verdau zur Charakterisierung vorgenommen. Das entstandene Plasmid ist in Abbildung 80 gezeigt.

3 Ergebnisse

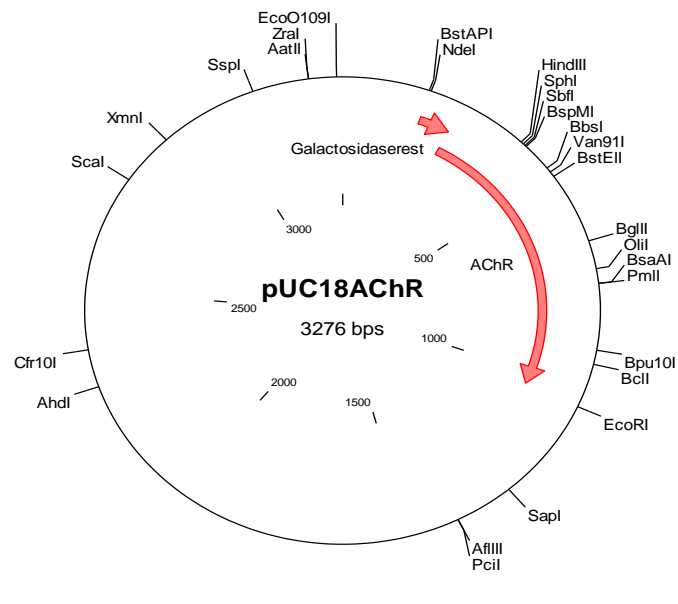


Abbildung 81: pUC18-Vektor mit AChR und Galaktosidase-Rest

Im nächsten Schritt wurde die Gelonin-DNA einkloniert und gleichzeitig der Galaktosidase-Rest entfernt. Abbildung 82 zeigt den entstandenen Vektor.

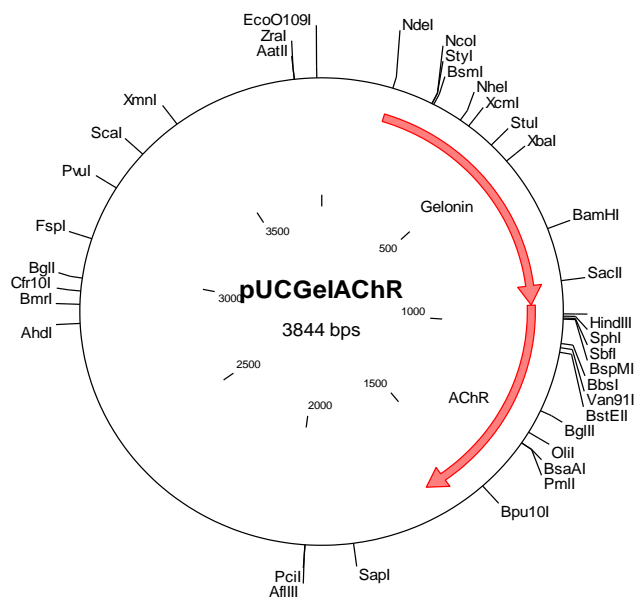


Abbildung 82: pUC18AChR mit Gelonin

3 Ergebnisse

Bei obigem Konjugat sollte nun das Stopcodon zwischen Gelonin und dem Rezeptor und ein *frameshift* entfernt werden.

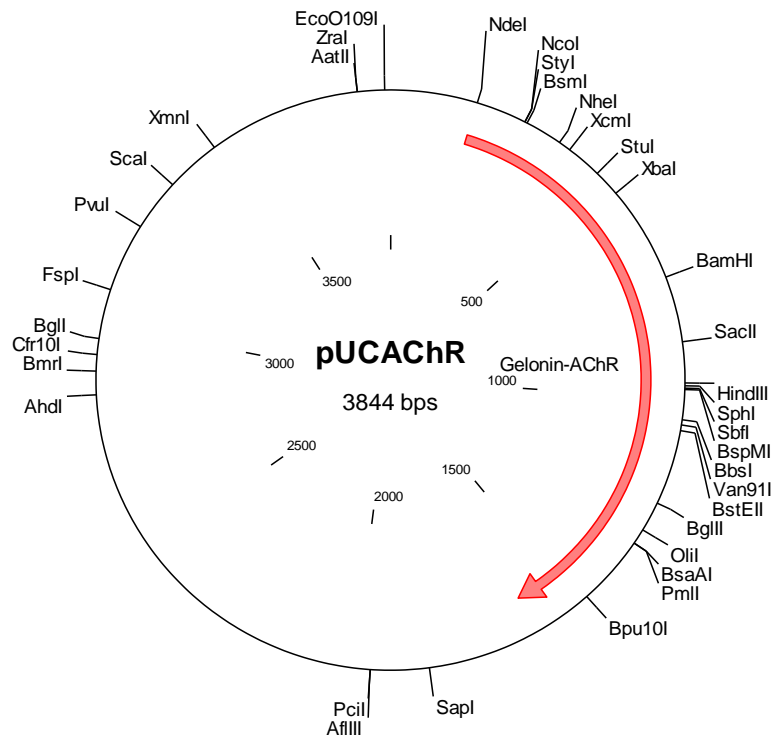


Abbildung 83: pUC18-Vektor mit Gel-AChR-Konjugat ohne Stopcodon

Abbildung 83 zeigt, dass die erste Mutagenese erfolgreich verlaufen ist, und die DNA des konjugierten Proteins im Plasmid kein Stopcodon mehr aufweist. Aus der DNA-Sequenz wird auch ersichtlich, dass die Leseraster-Verschiebung korrigiert wurde.

Bis zu diesem Punkt ist die Arbeit erfolgreich verlaufen.

Die in der Klonierungsstrategie vorgesehene Klonierung des Konjugats konnte nicht mehr durchgeführt werden, da die zweite Mutagenese, also die Entfernung der im Konjugat befindlichen *EcoRI*-Schnittstelle, erfolglos verlaufen ist.

4 Experimenteller Teil

4 Experimenteller Teil

4.1 Daptomycin

4.1.1 Verwendete Chemikalien

Acetonitril	JT Baker
Agar	Roth
4-Azetoxypalmitinsäure	Arbeitskreis K. Hideg, Institute of Organic and Medicinal Chemistry, Pécs University, Ungarn
Butanon	Sigma
Calciumchlorid-2-hydrat	Riedel-de Haen
Carboxyfluorescein	Fluka, zur Verfügung gestellt von Dr. Martin Hossann, LMU München
Daptomycin	Cubist Pharmaceuticals, Lexington, USA
DNase	Applichem
5-Doxylphosphatidylcholin	Avanti Polar Lipids
12-Doxylphosphatidylcholin	Avanti Polar Lipids
Foetal Calf Serum	PAA Laboratories
Glutaraldehyd	Sigma
HCCA	Sigma
Kieselgur	Merck
LB-Medium	Roth
Maleinsäure	Sigma
L- α -Phosphatidylcholin	Sigma
L- α -Phosphatidyl-DL-glycerol	Sigma
Polar Lipid Mix	Avanti Polar Lipids

4 Experimenteller Teil

4-Proxypalmitinsäure	Arbeitskreis K. Hideg, Institute of Organic and Medicinal Chemistry, Pécs University, Ungarn
RNAse	Applichem
Trifluoressigsäure	Roth
Xylose	Merck

4.1.2 Bakterienstämme

<i>Bacillus subtilis</i>	Arbeitskreis Prof. Henrich, Mikrobiologie, TU Kaiserslautern
<i>E. coli</i> (DH5 α)	Novagen

4.1.3 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Cantilever	Silicon Classic	Olympus
DLS Zetasizer	Zetasizer Nano S90	Malver
Elektronenmikroskop	SUPRA 55 VP	Zeiss
ESI-MS	Esquire 6000	Bruker
ESR-Spektrometer	ELEXYS E580	Bruker
Glimmer	G250-6	Plano
Küvette	QS 1000	Hellma
Lumineszenzspektrometer	LS-5 Luminescence Spectrometer	Perkin Elmer
Luftschüttler	MAXQ 4000	Thermo Scientific
MALDI-TOF	Ultraflex 6000	Bruker
MALDI-Target	Anchor Chip	Bruker
pH-Meter	pH521	WTW
Rasterkraftmikroskop	Nanowizzard III	JPK

4 Experimenteller Teil

Rotationsverdampfer	Rotavarpat-RE 111	Büchli
Schreiber	2210 2-Channel Recorder	LKB Bromma
Sonifier	Sonifier B-12	Branson
Sterilbank	LaminAir HB 2448	Heraeus
Ultraschallbad	SonorexRK106	Bandelin
UV-Spektrometer	UV-DU640	Beckman
Vortexer	REAX 1D	Heidolph
Waage	XS205	Satorius AG
Zentrifuge	5810 R	Eppendorf
	5415C	Eppendorf

4 Experimenteller Teil

4.1.4 Verwendete Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Tris-Puffer für Liposomen aus Lipid Mix	Tris-Puffer 20 mM Tris (pH 7,2)
Tris-Puffer für Liposomen aus Lipid Mix mit der jeweiligen Ca^{2+} -Konzentration	Tris-Puffer 20 mM Tris (pH 7,2) mit der jeweiligen 10x Konzentration an CaCl_2
Tris-Puffer für Liposomen aus Lipid Mix für Leakage Assay	Tris-Puffer 20 mM Tris (pH 7,2) 0,1 mM Carboxyfluorescein
Glutaraldehydlösung für die Fixierung der Zellen	50 % Stammlösung von Glutaraldehyd in Wasser 90:720 μL mit Puffer 2 verdünnt
Fötale Kälberserum	PAA
Puffer 1 zur Herstellung von Liposomen aus Bakterien	1,8 g Tris, 10 g Sucrose 500 μL Ampicillin, ad 500 mL H_2O mit CH_3COOH (6M) auf pH 8 einstellen
Puffer 2 zur Herstellung von Liposomen aus Bakterien	17,7 mg Na-phosphat, 2,4 mg MgSO_4 DNase 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, RNase 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ad 100 mL H_2O mit CH_3COOH (6M) auf pH 6,6 einstellen

Tabelle 33: Angesetzte Puffer

4.1.5 Säulenmaterial

Die Liposomen wurden mit folgendem Säulenmaterial gesäult:

Sephadex G50

Sephadex

4.1.6 Probenpräparation MALDI

Die Matrix-unterstützte Laserdesorption-/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) dient zur Identitätskontrolle von Peptiden und Oligonucleotiden aufgrund ihrer Masse. Das Massenspektrum einer Molekülverbindung kommt zunächst durch die Ionisation der Moleküle zustande. Danach werden die Molekülmassen der beim Ionisationsprozess gebildeten, primären Ionen und der Zerfallsprodukte im Hochvakuum bestimmt.

4 Experimenteller Teil

Durch das Einbetten der Probe in eine geeignete Matrix können höhere Intensitäten der Analytmolekül-Ionen erhalten und das Auftreten von Fragment-Ionen verringert werden. Eine solche Matrix besteht aus kleinen, organischen Molekülen, die bei der eingestrahnten Laserwellenlänge eine hohe Absorption zeigen (Karas und Hillenkamp 1988; Beavis 1992).

TFA (0,1 %)	TFA	1 μ L
	bidest. Wasser	999 μ L
Acetonitril/TFA-Lösung	Acetonitril	500 μ L (50 %)
	TFA (0,1 %)	1 μ L
	bidest. Wasser	ad 1 mL
Matrixlösung	Acetonitril (50 %)	500 μ L
	TFA (0,1 %)	1 μ L
	HCCA (1 %)	10 mg
	bidest. Wasser	ad 1 mL

Nach einer kurzen Zentrifugation inkubierte das verdaute Gelstück 45 Minuten lang mit 0,1 % TFA bei Raumtemperatur. Die ZipTip-Spitze wurde zweimal mit 10 μ L Acetonitril/TFA-Lösung angefeuchtet. Dann wurde sie mit 10 μ L 0,1 % TFA equilibriert. 10 μ L der mit 0,1 % TFA-Lösung inkubierten Peptidlösung wurden mehrmals mit der ZipTip-Spitze in die Matrix aufgenommen. Nachdem die Spitze zweimal mit 10 μ L 0,1 % TFA gespült wurde, wurden mit ihr 2 μ L Matrixlösung aufgenommen und entsprechend der *Dried Droplet*-Methode direkt auf das MALDI-Target aufgebracht

4.1.7 Probenpräparation ESI

Die Proben zur ESI Messung wurden analog der Konzentration der ESR-Proben nach Kapitel 4.1.11 ohne Liposomen hergestellt und im ESI vermessen. Nachdem kein Signal gemessen werden konnte, wurde die Probe mit wenigen Tropfen Phosphorsäure angesäuert und nochmals vermessen.

4 Experimenteller Teil

4.1.8 Herstellung des LB-Mediums

In einem Erlenmeyerkolben wurden 125 mL destilliertes Wasser und 3,125 g LB-Medium gemischt. Durch gleichmäßiges Schütteln wurde das LB-Medium zum Lösen gebracht und autoklaviert.

4.1.9 Anzucht der Bakterienkulturen

Die Übernachtskulturen wurden mit Bakterien angeimpft und für eine Stunde bei 37° C geschüttelt. Anschließend wurde jede Kultur gedrittelt, so dass am Ende jeweils drei Kulturen mit je 10 mL Bakteriensuspension vorhanden waren. Es wurde jeweils eine Kultur ohne Daptomycin belassen, eine mit einer Konzentration von 10 µg/mL Daptomycin, eine mit 5 µg/mL. Diese wurden bei 37° C geschüttelt.

4.1.10 Synthese von Liposomen

Die Liposomen wurden sowohl aus Lipiden als auch aus Zellen synthetisiert.



Abbildung 84: Liposomen aus gram-negativen Bakterien in Tris-Puffer (links) und FCS

4 Experimenteller Teil



Abbildung 85: Liposomen aus Lipid Mix (links) und PC/PG in Tris-Puffer

4.1.10.1 Liposomen aus Lipidgemischen

Das Ziel dieses Arbeitsschrittes war es, Phospholipidvesikel mit einer Konzentration von 200 μg Phosphor pro mL Lösung zu erhalten. Es wurde der *Polar Lipid Extract* von *Avanti Polar Lipids* oder eine Phospholipidmischung bestehend aus 25 % PG und 75 % PC benutzt. Die Herstellung erfolgte mittels eines mit Argon gefüllten Spitzkolbens, zu dem 290 μL der in Chloroform vorliegenden Lipide sowie der ebenfalls in Chloroform gelösten Spinlabelverbindung gegeben wurde, so dass die Endkonzentration der Spinlabelverbindung 4 % betrug. Das Lösungsmittel wurde unter Drehen des Kolbens im Argonstrom verdampft, so dass sich am Ende an der Gefäßwand ein dünner Lipidfilm bildete. Im Hochvakuum wurden die verbliebenen Chloroformreste eine Stunde entfernt. Durch Vortexen wurde anschließend der Lipidfilm mit 1 mL Puffer 1 (20 mM; pH 7,8) von der Kolbenwand gelöst. Zur Bildung von unilamellaren Vesikel wurden die entstandenen multilamellaren Vesikel so lange im Ultraschallbad unter Eiskühlung behandelt, bis die Lösung eine Opaleszenz aufwies (ca. 45 min).

4 Experimenteller Teil

4.1.10.2 Herstellung von Liposomen mit 0,1 mol/L CF-Lösung

Zur Herstellung wurden 301 μL Lipid-Lösung in einen Spitzkolben pipettiert und das Lösungsmittel im Argonstrom verdampft. Der zurückbleibende Lipidfilm wurde mit 1 mL 0,1 mol/L CF-Lösung (pH 7,2) hydratisiert, kurz gevortext und anschließend im eisgekühlten Ultraschalbad für 45 min sonifiziert.

4.1.10.2.1 Über Nacht in NaCl dialysierte Liposomen

Die nach Kapitel 4.1.10.2 synthetisierten Liposomen wurden über Nacht bei 4° C in 5 L 0,9 % NaCl-Lösung dialysiert.

Für die Messung wurden je 20 μL der dialysierten Liposomen mit 200 μL Wasser bzw. 200 μL 2 % Triton X-100-Lösung versetzt. Jeweils 80 μL der entsprechenden Lösung wurden zu 3,9 mL Tris/NaCl 0,9 % w/v Puffer (10 mM; pH 8) pipettiert, gemischt und im Lumineszenz-Spektrometer gemessen.

Parameter	Wert
Extinktionswellenlänge	493 nm
Emissionswellenlängen	mit Wasser: 460-630 nm mit Triton X-100: 460-700 nm
Scangeschwindigkeit	30 nm/min
Slit Ex. und Em.	2,5
FixSCL	0,75
Schreibergeschwindigkeit	3 cm/min

Tabelle 34: Mess- und Geräte-Parameter *Leakage Assay*

4.1.10.3 Liposomen aus Zellen

Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase bei 0° C durch Zentrifugation geerntet und in Puffer 1 (Kapitel 4.1.4) resuspendiert. Während des magnetischen Rührens wurden Kalium-EDTA und Lysozym zu einer finalen Konzentration von 10 mM und 0,5 mg/mL zugegeben. Das Gemisch wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde bei 13000 x g für 30 Minuten zentrifugiert. Es wurden dann 2 g in Puffer 2 (Kapitel 4.1.4) gelöst. Dieses Gemisch wurde schnell mit einer Spritze und einer 18-g-Nadel gelöst. Daraufhin wurde das Gemisch für 30 Minuten auf einer Schüttelplattform inkubiert. Es

4 Experimenteller Teil

folgte dann eine Zentrifugation bei 800 x g für eine Stunde um die kompletten Zellen und unlysierten Spheroplasten abzutrennen. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und bei 46000 x g wieder zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 50 mM Puffer 2 bis zu einer Proteinkonzentration von 5-10 mg/mL suspendiert.

4.1.11 Probenpräparation für die ESR-Spektroskopie

Es wurden in einem Eppendorfgesäß 1,3 mg Daptomycin abgewogen. Daraufhin wurde je nach gewünschter Konzentration die notwendige Menge von einer Lösung hinzugegeben. Des Weiteren wurden 45 µL der synthetisierten Liposomen hinzugegeben. Dieser Versuch wurde mit Liposomen hergestellt aus Lipiden sowie Zellen durchgeführt.

Die Messungen wurden mit folgenden Parametern durchgeführt:

Parameter	Wert
Center-Field / G	3450
Width / G	100
Points	4096
Field Mod. Amplitude	0,0001
Field Mod. Frequency kHz	100
Microwave Power / mW	6,38
Microwave Frequency /GHz	9,70
Receiver Gain / dB	60
Receiver Time Constant / ms	327,72
Sampling Time / ms	1310,72

Tabelle 35: Mess- und Geräte-Parameter ESR-Spektroskopie

Das Gerät wurde über eine Wärmebrücke thermostatisiert.

4.1.12 Probenpräparation für die Elektronenmikroskopiemessungen

Die Proben wurden wie in Kapitel 4.1.11 hergestellt bzw. aus einer Übernachtskultur entnommen und ohne Verdünnung auf ein Kupfertarget aufgetragen und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese wurden über eine Vakuumvorrichtung in das Elektronenmikroskop eingeführt und vermessen.

4 Experimenteller Teil

4.1.13 Probenpräparation für die Rasterkraftmikroskopiemessungen

4.1.13.1 Liposomen aus Lipid Mix

Die hergestellten Liposomen aus Lipid Mix in Tris-Puffer wurden 2x 10:90 μL und 1x 10:990 μL verdünnt. Aus der so verdünnten Lösung wurden 45 μL entnommen und zu diesen 3,25 μL einer Daptomycin-Lösung (1,3 mg Daptomycin gelöst in 10 μL 5000Ca²⁺-Puffer) gegeben. Um ein Probenvolumen von 50 μL zu erhalten, wurden weitere 1,75 μL 5000Ca²⁺-Puffer zugegeben. Es wurden 10 μL Probe entnommen und auf einem Glimmerplättchen aufgetragen und getrocknet.

4.1.13.2 Liposomen aus *E. coli* und *B. subtilis*

Die Probenpräparation der Liposomen aus Bakterien mit Daptomycin verlief analog Kapitel 4.1.13.1 Dabei wurde allerdings FCS als Puffer verwendet.

Es wurden ebenfalls Proben der Liposomen aus Bakterien ohne Daptomycin-Zugabe vermessen. Hierzu wurde analog zu Kapitel 4.1.13.2 verdünnt und dann wurden unmittelbar aus der so verdünnten Lösung 10 μL Probe entnommen, die auf Glimmerplättchen aufgetragen und getrocknet wurden.

4.1.13.3 *E. coli* und *B. subtilis* Zellen

Es wurden je Bakterienstamm zwei Verdünnungsreihen bis 3 x 10:90 μL Waschpuffer angefertigt.

Der höchsten Verdünnung der ersten Reihe wurden je 10 μL entnommen und mit 90 μL Glutaraldehydlösung (50 % Stammlösung von Glutaraldehyd in Wasser 90:720 μL mit Waschpuffer verdünnt) versetzt. Aus diesen 100 μL Lösung wurden 45 μL entnommen und mit 5 μL Waschpuffer versetzt, wovon schließlich 10 μL als Probe auf ein Glimmerplättchen aufgetragen und getrocknet wurden.

4,5 μL der höchsten Verdünnung der zweiten Reihe wurden mit 3,25 μL Daptomycin-Lösung (1,3 mg Daptomycin gelöst in 10 μL Waschpuffer) und 1,75 μL Waschpuffer inkubiert. Es folgte die Zugabe von 40 μL Glutaraldehydlösung und 5 μL Waschpuffer. Es wurden 10 μL Probe entnommen und auf ein Glimmerplättchen aufgetragen und getrocknet.

4 Experimenteller Teil

4.1.14 Leakage Assay

4.1.14.1 Herstellung des 5(6)-Carboxyfluorescein-Mono-Natriumsalzes

Um aus 5(6)-Carboxyfluorescein ($M = 374,33 \text{ g/mol}$) das 5(6)-Carboxyfluorescein-Mono-Natriumsalz ($M = 398,30 \text{ g/mol}$) herzustellen, wurden 10 g der freien Säure (266 mmol) in 160 ml Methanol suspendiert. Dazu wurden 1,2 g Natriumhydroxid (300 mmol) in 3 mL Wasser mit einer Pasteurpipette zugetropft, woraufhin sich die orangefarbene Suspension in eine klare dunkelorange Lösung verfärbte. Es wurde mit 2 mL Wasser nachgewaschen. Die Lösung wurde erst über 3 g Aktivkohle und anschließend über 3 g Kieselgur gefiltert. Das Filtrat wurde mit 5 Tropfen Butanon versetzt und die Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde unter Rotieren wieder in 30 mL Methanol gelöst und das Natriumsalz mit 220 mL Butanon ausgefällt. Der Feststoff wurde getrocknet und mit wenig Ether gewaschen.

4.1.14.2 5(6)-Carboxyfluorescein-Verdünnungsreihe

Um konzentrationsabhängige Effekte des CF zu untersuchen, wurde aus einer 0,1 M CF-Lösung (pH 7,2) die in Tabelle 36 aufgeführte Verdünnungsreihe erstellt und vermessen.

Konzentration CF/M
10
1
0,1
0,05
0,01
0,005
0,001

Tabelle 36: Konzentrationen der CF-Probeklösungen

4 Experimenteller Teil

Parameter	Wert
Extinktionswellenlänge	493 nm
Emissionswellenlängen	460-600 nm
Scangeschwindigkeit	30 nm/min
Slit Ex. und Em.	2,5
FixSCL	1
Schreibergeschwindigkeit	3 cm/min

Tabelle 37: Mess- und Geräte-Parameter *Leakage Assay* Verdünnungsreihe

4.1.14.3 Calcium- und Daptomycin-Verdünnungsreihe

Die nachfolgenden Messungen wurden mit nach Kapitel 4.1.10.2 und präparierten Liposomen durchgeführt und die entsprechenden Probelösungen statt Wasser bzw. Triton X-100 bei den Ansätzen zugegeben.

Zur Untersuchung der Ca^{2+} -abhängigen Wirkung von Daptomycin wurden die in Tabelle 38 aufgeführten Konzentrationen eingesetzt. Die Daptomycin-Verdünnungsreihe wurde mit der höchsten Konzentration der Ca^{2+} -Verdünnungsreihe angesetzt und anschließend mit Wasser verdünnt, so dass immer ein Verhältnis von 2:1 für Ca^{2+} : Daptomycin bestand.

Ca^{2+} -Verdünnungsreihe 1 c $\mu\text{mol/L}$	Ca^{2+} -Verdünnungsreihe 2 c $\mu\text{mol/L}$	Daptomycin- Verdünnungsreihe c $\mu\text{mol/L}$
10 000	18,18	9,09
2 000	3,64	1,82
1 000	1,82	0,91
200	0,36	0,18
100	0,18	0,09

Tabelle 38: Konzentrationen der Ca^{2+} - und Daptomycin-Verdünnungsreihen

4 Experimenteller Teil

4.2 Immunsuppression

4.2.1 Verwendete Geräte

Bei der Durchführung der Versuche wurden die folgenden Geräte verwendet:

Autoklav	Dampfkochtopf	Sitram
Brutschrank		Memmert
CO ₂ -Inkubator	Innova CO-170	New Brunswick Scientific
Densitometer	Elscript 400	Hirschmann
Durchflussphotometer	2238 Uvicord S	LKB Pharmacia
EIA-Plattenreader	Typ 2550	Bio-Rad
Elektrophoresezubehör	Miniprotean II	Bio-Rad
Fraktionssammler	2111 Multirac	LKB Bromma
Gefriertrocknung	Speed Vac SC 110	Savant
Inkubatoren	Innova 4000	New Brunswick
	HTBTR 112	Infors
Lichtbank		Fröbel
Konzentratoren	Amicon Ultra	Millipore
Küvetten	Plastibrand	Brand
	Suprasil Präzisionsküvetten	Hellma
Sterilbank	LaminAir [®] HLB 2448	Heraeus
Magnetrührer	KMO 2 electronic	Janke & Kunkel
MALDI-TOF	Ultraflex 1	Bruker
Mikroskop	IMT-2	Olympus
Mikrowelle	M 401	Privileg
Mixer	Typ 8011	Waring Blender
PCR-Gerät	PCR Sprint	Hybaid

4 Experimenteller Teil

Peristaltikpumpe	Peristaltikpumpe P-1	Pharmacia
pH-Meter	pH 521	WTW
Pipetten	Transferpette S	Brand
	20µL, 200 µL, 1000 µL	
	Reasearch Plus	Eppendorf
	10 µL	
	Accu Jet pro	Brand
Rotoren	Type 70Ti	Beckman
	JA10, JA14 und JA20	Beckman
	A-4-62	Eppendorf
Spannungsgeräte	Power Pac 300	Bio-Rad
Transilluminator	TFX-20.M	Fröbel
Thermomixer	comfort	Eppendorf
Ultraschallstab	Sonifier B-12	Branson
Ultraschallbad	Sonorex RK 106	Brandelin
UV/VIS-Spektrophotometer	DU 640	Beckman
Waagen	1601 MP8-1	Sartorius
	L 610 D	Sartorius
Wasserbad	VC	Julabo
Zentrifugen	Optima LE-80k	Beckman
	Ultrazentrifuge J2-21	Beckman
	5810	Eppendorf

4 Experimenteller Teil

4.2.2 Verwendete Chemikalien

Agarose	Roth
Ammoniumhydrogenphosphat	Serva
Ampicillin	Roth
Agar	Roth
BCA Reagenz	Pierce
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Sigma
Butanol	Riedel-de- Haen
Cholat	Sigma
Coomassie Brilliant Blue	Serva
EDTA	Applichem
EGTA	Merck
Essigsäure	Roth
Ethidiumbromid	Applichem
Guanidinhydrochlorid	Roth
Imidazol	Applichem
Kanamycin	Roth
Lithium-diiodosalicylat	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
Manganchlorid	Merck
Maltose	Roth
MOPS	Sigma
Natriumazid	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Roth

4 Experimenteller Teil

Natriumcholat	Sigma
Natriumdeoxycholat	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Nickelsulfat	Merck
PMSF	Applichem
Rubidiumchlorid	Sigma
SDS	Roth
TEMED	Applichem
Trichloressigsäure	Roth
Tris	Applichem
Triton-X-100	Applichem
Tween	Sigma

4 Experimenteller Teil

4.2.3 Verwendete Kits

Thrombinkit	Novagen
Protease Xa Kit	New England Biolabs
Plasmidisolierungskit Mini	Qiagen
Plasmidisolierungskit Maxi	Genomed
Restriktionsenzyme mit Puffern	MBI Fermentas
Plasmidextraktionskit	MBI Fermentas

4.2.4 DNA- und Proteinmarker

Bei den Elektrophoresen wurde folgender Marker und Loading Dye verwendet:

DNA-Marker	GeneRuler 1kb DNA Ladder	MBI Fermentas
Loading Dye	Orange Loading Dye	MBI Fermentas
Proteinmarker	Roti-Mark Standard	Roth

4.2.5 Säulenmaterial

Es wurden die folgenden Säulen verwendet:

Amylosesäule	New England Biolabs
HiTrap SP FF	GE Healthcare
Ni-CAM HC Resin	GE Healthcare

4.2.6 *E. coli*-Stämme und Plasmide

Für die gentechnischen Arbeiten wurden die folgenden *E. coli*-Stämme verwendet (Genotyp nach Sambrook et al., 2006).

BL21	(DE3) F ⁻ ompT hsdSB (r ⁻ B, m ⁻ B) gal dcm (DE3)
XL Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' <i>proAB</i> <i>lacI^qZAM15</i> Tn10 (Tet ^r)]

Für die Klonierungs- und Expressionsversuche wurden die folgenden Plasmide verwendet:

pUC18	Novagen
-------	---------

4 Experimenteller Teil

pUCaAChRex	Hossann 2004
pET-gel	Li 2002
pmalAChRex	Li 2005
pmal-c5x	New England Biolabs

4.2.7 Restriktionsenzyme und Ligase

Für die durchgeführten Restriktionsreaktionen wurden die mitgelieferten Pufferlösungen verwendet und mit

T4 Ligase	MBI Fermentas
ligiert.	
<i>Bam</i> HI	MBI Fermentas
<i>Eco</i> RI	MBI Fermentas
<i>Hind</i> III	MBI Fermentas
<i>Nde</i> I	MBI Fermentas

4.2.8 Antikörper

Für die immunologischen Untersuchungen wurden folgende Antikörper verwendet:

Anti-His	Novagen
mAb 35	University of Iowa
Anti-MBP	New England Biolabs

4.2.9 Oligonukleotide

Zur Sequenzierung der kommerziell erhältlichen Plasmide wurden die folgenden Primer verwendet.

M13	zur Sequenzierung zur Verfügung gestellt vom Institut für Immungenetik
M13rev	zur Sequenzierung zur Verfügung gestellt vom Institut für Immungenetik
T7	zur Sequenzierung zur Verfügung gestellt vom Institut für Immungenetik
T7rev	zur Sequenzierung zur Verfügung gestellt vom Institut für Immungenetik

4 Experimenteller Teil

malE New England Biolabs

Die verwendeten Oligonukleotide zur Mutagenese wurden von der Firma *Operon* synthetisiert.

Oligo 1.1 CAA AGA TCC GAA ATA TAA GAT TTC GAG CTC CGT CGA CAA G

Oligo 1.2 CTT GTC GAC GGA GCT CGA AAT CTT ATA TTT CGG ATC TTT G

Oligo 2.1 CAA AGA TCC GAA ATA TAA GAT TTC GAG CTC CGT CGA CAA G

Oligo 2.2 CTT GTC GAC GGA GCT CGA AAT CTT ATA TTT CGG ATC TTT G

Oligo 3.1 GAC AAA GAT CCG AAA TAT AAG AAT TCG AGC TCC G

Oligo 3.2 CGG AGC TCG AAT TCT TAT ATT TCG GAT CTT TGT C

Nach der Mutagenesereaktion wurden die Plasmide mit den jeweiligen Primern im Labor für Immungenetik in Kaiserslautern sequenziert.

4.2.10 Konzentrationsbestimmungen

4.2.10.1 BCA-Test

Der BCA-Test dient zur Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe eines Testsystems der Firma Pierce. Mit einem Gemisch aus 4,4'-Dicarboxy-2,2'-bichinolinatriumsalz (BCA, Reagenz A) und Kupfer-(II)sulfat (Reagenz B) erhält man eine Lösung, die zur Proteinbestimmung herangezogen werden kann. Die Cu^{2+} -Ionen werden dabei durch oxidierbare Gruppen im Protein zu Cu^+ -Ionen reduziert, die dann von BCA komplexiert und durch photometrische Bestimmung detektiert werden können (Smith 1985).

4.2.10.2 TCA-Fällung

Die Fällung von Proteinen mittels Trichloressigsäure (TCA) dient zur schnellen Aufkonzentration von Proteinen. Es handelt sich dabei um eine irreversible Denaturierung der Proteine und wird hauptsächlich zur Aufkonzentration vor einer SDS-PAGE eingesetzt (Weinstein 1976).

4 Experimenteller Teil

Natriumdesoxycholat (DOC)-Lösung 0,15 g
ad 100 mL H₂O

Trichloressigsäure-Lösung, 72 %: 72 g
ad 100 ml H₂O

Tris-Lösung: 2 M Tris

500 µL einer Proteinprobe werden in einem Eppendorfgefäß vorgelegt, mit 50 µL DOC-Lösung versetzt, kurz gevortext und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 50 µL 72 % TCA-Lösung hinzugegeben und erneut kurz gevortext. Es erfolgt eine zehnminütige Inkubation auf Eis. Danach wird die Probe 20 Minuten in einer Eppendorf-Zentrifuge bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird anschließend in 200 µL eiskaltem Ethanol gewaschen und erneut 20 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird wieder verworfen und darauf geachtet, dass das Pellet frei von Ethanol ist. Das Pellet wird in 10 µL SDS-Probenpuffer aufgenommen und mit 10 µL 2M Trislösung neutralisiert. Die Farbe sollte sich dabei von Gelb nach Blau ändern. Diese Proteinlösung kann dann direkt für eine SDS-PAGE (Kapitel 4.2.11.1) eingesetzt werden.

4.2.11 Allgemeine Arbeitsmethoden

4.2.11.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-PAGE lassen sich Proteine aufgrund ihrer Molekularmassen trennen und charakterisieren. Die Methode geht auf Laemmli zurück (Laemmli 1970). Sie wurde geringfügig modifiziert: In Abwandlung der Literaturvorschrift wurde eine Elektrophoresekammer von 10 x 7,5 x 0,2 cm verwendet und die Elektrophorese bei einer konstanten Stromstärke von 20-28 mA durchgeführt.

Eine zur Färbung von SDS-Gelen weit verbreitete Methode ist die Färbung mit Coomassie Brilliantblau R 250. Sie zeichnet sich vor allem durch die Linearität der Proteinfärbung und geringe Hintergrundfärbung aus. Dies ermöglicht z.B. die quantitative Proteinbestimmung mit Hilfe einer densitometrischen Analyse. Mit der Coomassie-Färbung können noch etwa 2 µg Protein detektiert werden (de Groth 1963).

4 Experimenteller Teil

4.2.11.2 Dialyse

Die Dialyse von Proteinlösungen dient zum Pufferwechsel bzw. zum Entfernen von niedermolekularen Substanzen.

Der Dialyseschlauch (Visking Size 1-8/32“) wird im Dialysepuffer für 10 Minuten inkubiert, an einem Ende mit einem Clip verschlossen und die Proteinlösung eingefüllt. Nach dem Verschließen des anderen Endes wird der Schlauch in 5 L Dialysepuffer gegeben und über Nacht, unter leichtem Rühren, inkubiert. Am nächsten Tag wird der Dialysepuffer zweimal gewechselt und jeweils für ca. 2 Stunden inkubiert.

4.2.11.3 Aufkonzentration mit Amicon-Konzentratoren

Zur Aufkonzentration von Proteinlösungen können Membranen mit definierten Porengrößen verwendet werden. Durch die Zentrifugation (4170 x g, 20° C, ca. 1 min/mL) der Lösung durch die Membran werden kleinere Moleküle durchgelassen, Moleküle mit größerem Durchmesser als die Pore werden zurückgehalten und somit aufkonzentriert.

4.2.11.4 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Kompetente Zellen sind Bakterienzellen, die derart modifiziert wurden, dass sie in Lösung befindliche DNA in sich aufnehmen können.

Eine Kultur mit 200 mL LB-Medium wurde mit 2 mL einer Übernachtskultur von *E. coli* BL21 (DE3) angeimpft und bei 37° C im Luftschüttler inkubiert. Am folgenden Tag werden die Zellen in vorgekühlte Zentrifugenbecher überführt, 5 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 5 Minuten bei 6000 x g und 4° C abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in 80 mL kaltem Puffer 1 resuspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis werden die Bakterien erneut bei 4° C und 6000 x g für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 8 mL kaltem Puffer 2 resuspendiert. Je 400 µL der Zellsuspension werden in Eppendorf-Gefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gelagert.

4 Experimenteller Teil

Puffer 1	100 mM RbCl ₂ 30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl ₂ 15 % (v/v) Glycerin mit verdünnter Essigsäure pH 5,8 einstellen 50 mM MnCl ₂
Puffer 2	10 mM MOPS 75 mM CaCl ₂ 10 mM RbCl ₂ 15 % (v/v) Glycerin mit verdünntem Kaliumhydroxid pH 6,5 einstellen

4.2.11.5 Sterilisation von Geräten

Da die Versuche unter sterilen Bedingungen ablaufen mussten, wurden die benötigten Medien und Materialien autoklaviert. Nicht-autoklavierbare Gegenstände und Oberflächen wurden mit 70 % wässriger Ethanollösung desinfiziert.

4.2.11.6 Kulturbedingungen

4.2.11.6.1 Wachstumsbedingungen

Von einer Glycerinkultur wurde eine Probe auf einer Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert. Am folgenden Tag wurde eine der gewachsenen Kolonien von der Platte gepickt und damit eine Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur wurde danach über Nacht bei 37° C geschüttelt. Wurde eine größere Menge an DNA benötigt, konnte mit dieser Übernachtskultur am dritten Tag eine Großkultur von 500 mL LB-Medium-Lösung angeimpft werden, welche unter gleichen Bedingungen wiederum über Nacht geschüttelt wurde.

4.2.11.6.2 Wachstumsmessungen

Zur Kontrolle des Bakterienwachstums wurde das Medium photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm im UV/VIS-Spektrometer untersucht. Das Licht wurde beim

4 Experimenteller Teil

Durchtritt durch die Suspension gestreut, wobei die Stärke der Streuung dabei von der Anzahl und Größe der Bakterien abhängt.

4.2.11.6.3 Glycerinkulturen

Glycerinkulturen dienen zur Lagerung von Zellen. Zu ihrer Herstellung wurden 500 µL autoklaviertes Glycerin mit 500 µL einer Übernachtskultur gemischt und danach in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

4.2.12 Plasmidisolierung

Zur Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* wurden die Plasmidisolierungskits QIAprep Spin Mini der Firma *Qiagen* und die Jetstar Maxipräparation der Firma *Genomed* verwendet.

4.2.12.1 Mini-Präparation

Die Mini-Präparation diente der Isolation von Plasmid-DNA aus einer Übernachtskultur. Sie wurde mit dem Qiagen-Kit QIAprep Spin Mini Kit nach deren Handbuch durchgeführt.

Alle benötigten Reagenzien waren im Kit enthalten. Die Zellen mit dem pUC18-Vektor wurden abzentrifugiert, resuspendiert, durch Zugabe eines Reagenz lysiert und anschließend erneut abzentrifugiert. Sämtliche Zellbestandteile befanden sich dann im Pellet, während die Plasmid-DNA im Überstand lokalisiert war. Der Überstand wurde daraufhin in ein spezielles Reaktionsgefäß überführt, welches eine Silica-Säule enthält, die die DNA bei Zentrifugation bindet. Im Anschluss wurde die Plasmid-DNA gewaschen, von der Säule eluiert und die Konzentration der DNA spektrometrisch ermittelt. Die DNA stand dann zu weiteren Experimenten zur Verfügung.

4.2.12.2 Maxi-Präparation

Die Maxi-Präparation dient wie die Mini-Präparation der Isolation von Plasmid-DNA und wurde mit dem Jetstar Maxiprep von Genomed durchgeführt.

Der Unterschied zur Miniprep liegt darin, dass die Maxiprep bei einer größeren Zahl von Zellen aus einer größeren Kultur angewendet wird und somit mehr DNA als bei der Miniprep isoliert werden kann. Die Durchführung der Maxiprep erfolgte analog zum Ablauf der Miniprep. Entsprechend der größeren Menge an Flüssigkeit und DNA, wurde eine größere Säule mit mehr Säulenmaterial verwendet. Alle benötigten Materialien waren im Kit enthalten.

4 Experimenteller Teil

4.2.13 Restriktionsverdau

Beim Restriktionsverdau werden DNA-Moleküle spezifisch mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. Dabei erkennt das Enzym eine Basensequenz und spaltet an dieser Stelle eine chemische Bindung. Durch Verdau entsteht aus einem Plasmid ein offenes, lineares DNA-Molekül, dessen Größe im Agarosegel bestimmt werden kann. Der Verdau wurde jeweils nach den auf der MBI Fermentas-Seite empfohlenen Bedingungen durchgeführt.

4.2.14 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der analytischen Auftrennung von DNA-Gemischen. Um zu kontrollieren, ob beispielsweise Restriktionsversuche oder Ligationsansätze erfolgreich verlaufen sind, wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen, welches an eine Spannungsquelle angeschlossen war. Da DNA negativ geladen ist, wanderte sie im elektrischen Feld in Richtung der Anode. Der Siebwirkung des Gels folgend, wurde sie dabei ihrer Größe nach aufgetrennt. Die DNA wurde anschließend mit Hilfe einer Ethidiumbromidlösung im UV-Licht sichtbar gemacht (Sambrook, 2006). Ein ebenfalls aufgetragener Marker mit längendefinierten DNA-Strängen ermöglichte eine Zuordnung der Molekulargewichte der Proben.

4.2.14.1 Gelextraktion

Sind die Plasmide durch eine Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt worden, kann man die Plasmide weiter verwenden, indem man sie mit Hilfe des GenJet Gel Extraction Kit von Fermentas aufreingt. Dazu wurde eine Bande aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten. Um Verunreinigungen zu vermeiden, sollte möglichst wenig Gel mit-ausgeschnitten werden. Die Plasmide in der Agarose wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und nach Vorschrift des Kits aus dem Gel isoliert. Alle benötigten Puffer waren im Kit vorhanden. Die Agarose mit den Plasmiden wurde gelöst und anschließend auf eine Silica-Säule gegeben. An diese wurde die DNA gebunden, gewaschen und schließlich eluiert.

4.2.14.2 Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA-Lösungen

Die Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA-Lösungen erfolgte mit Hilfe eines UV/VIS-Spektrometers. DNA besitzt ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Daher gilt:

$$1 \text{ OD}_{260} = 5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

4 Experimenteller Teil

Die Lösungen wurden in Quarzküvetten vermessen und die Konzentrationen berechnet.

4.2.15 DNA-Ligation

Bei einer DNA-Ligation werden zwei DNA-Stränge mit Hilfe einer DNA-Ligase verknüpft. In den Versuchen wurde die T4-Ligase verwendet. Sie verbindet die beiden DNA-Stränge, indem sie eine Esterbindung zwischen der 5`-Phosphat- und der 3`-Hydroxylgruppe der Enden der doppelsträngigen DNA bildet.

Die Insert-Menge berechnet sich wie folgt:

Insert-Masse (in ng) = $6 \times \text{Insert-Länge (in bp)} / \text{Vektor-Länge (in bp)} \times \text{Vektor-Masse (in ng)}$

4.2.16 Transformation und Kompetenztest

Nachdem die kompetenten Zellen (*E. coli*, BL21(DE3)) 30 Minuten auf Eis aufgetaut wurden, wurden 2 µL Plasmid-Lösung hinzu pipettiert und eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 42° C für 2 Minuten einem Hitzeschock unterzogen und danach sofort wieder auf Eis gestellt. Daraufhin wurde die Zellsuspension mit 750 µL LB-Medium-Lösung versetzt und 45 Minuten bei 37° C und 300 U/min im Thermomixer geschüttelt. Nach dieser Wachstumsphase wurden die Zellen abzentrifugiert, vollständig auf eine ampicillinhaltige Agarplatte gegeben und mit einem Drigalski-Spatel ausgestrichen. Die Platte wurde über Nacht bei 37° C inkubiert. Waren am nächsten Tag Kolonien gewachsen, waren die Zellen kompetent und haben die zugegebene DNA in sich aufgenommen. Da die Agarplatten Antibiotikum enthielten, können die Zellen nur wachsen, wenn sie resistent gegen dieses Antibiotikum sind.

4.2.17 Gezielte Mutagenese

Gezielte Mutagenese ist ein Verfahren, mit dem die Sequenz einer DNA spezifisch modifiziert werden kann. Einzelne Basen eines DNA-Stranges können deletiert oder insertiert werden. Die Methode wird mit speziell synthetisierten Primern durchgeführt. Diese Primer enthalten die gewünschte Modifizierung, so dass die DNA durch die Anlagerung der Primer verändert wird. Eine Base wird beispielsweise entfernt, indem sie im Primer weggelassen und bei dessen Anlagerung nicht mitsequenziert wird. Die für die Mutagenese nötige Methode ist die Polymerase-Kettenreaktion.

4 Experimenteller Teil

4.2.18 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient in erster Linie der Vervielfältigung eines DNA-Fragments. Dabei wird die zu amplifizierende DNA zunächst denaturiert. Anschließend werden spezifische Primer angelagert, von denen ausgehend die DNA mittels einer Polymerase synthetisiert wird. Die nun wieder als dsDNA vorliegende Sequenz wird erneut denaturiert und der Zyklus wiederholt sich.

Soll nun eine Mutagenese durchgeführt werden, enthalten die verwendeten Primer eine Modifizierung, die beim Verlauf der PCR in die DNA-Sequenz übertragen wird.

4.2.19 Proteinexpression in *E. coli*-Zellen

Die Kultivierung in 750 mL Flüssigmedium erfolgt bei 37° C. In regelmäßigen Abständen werden Proben zur Wachstumskontrolle entnommen. Hat die OD einen bestimmten Wert erreicht, erfolgt die Induktion mit IPTG. Das Zellwachstum wird weiter durch Messung der optischen Dichte verfolgt. Bevor die Zellen in die stationäre Wachstumsphase übergehen, wird das Wachstum gestoppt und die Suspension abzentrifugiert (8700 x g, 4° C, 10 min), der Überstand vollständig entfernt und mit dem Pellet weitergearbeitet.

4.2.19.1 Zellyse

Benötigte Lösungen:

Pellet-Waschpuffer	20 mM Tris pH 7,6
PMSF-Lösung	0,75 M Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) in 2-Propanol
Resuspendierungspuffer	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 0,5 M Natriumchlorid 20 mM Imidazol 1,5 mM PMSF pH 7,2

4 Experimenteller Teil

Lysozym-Stammlösung 10 mg/mL Lysozym in 100 mM Tris
pH 8

Das Zellpellet wurde zweimal mit je 50 mL Waschpuffer gewaschen, bei 6400 x g und 4° C zehn Minuten abzentrifugiert, in 50 mL Resuspendierungspuffer resuspendiert und mit 5 mL Lysozym-Stammlösung versetzt. Die Zellen wurden mit dem Sonifier (8 x 30 Sekunden bei 65-85 % Leistung) auf Eiswasser lysiert. Zur Abtrennung der unlöslichen Bestandteile, *inclusion bodies* und Zelltrümmer, wurde die Suspension bei 30000 x g und 4° C dreißig Minuten zentrifugiert und der Überstand bzw. die *inclusion bodies* bis zur Weiterverarbeitung bei -20° C gelagert.

4.2.19.2 Proteinisolierung

4.2.19.2.1 Isolierung von rekombinantem Gelonin (His₆-Gelonin₁₋₂₅₁)

4.2.19.2.1.1 Isolierung mit Nickel-Affinitätschromatographie (Elution mit Imidazol)

Benötigte Lösungen:

Nickelsulfat-Lösung	0,2 M Nickelsulfat
Bindungspuffer	50 mM Natriumdihydrogenphosphat
	0,5 M Natriumchlorid
	20 mM Imidazol
	1,5 mM PMSF
	pH 7,2

4 Experimenteller Teil

Waschpuffer	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 0,5 M Natriumchlorid 100 mM Imidazol 1,5 mM PMSF pH 7,2
Elutionspuffer	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 0,5 M Natriumchlorid pH 7,2
Regenerationspuffer	20 mM Tris 500 mM Natriumchlorid 50 mM EDTA-Na-Salz pH 8
Dialysepuffer	20 mM Tris 0,5 M NaCl pH 7,2

Die Aufreinigung erfolgte mittels Nickel-Affinitätschromatographie bei Raumtemperatur unter Verwendung einer Peristaltikpumpe und eines Uvicord-Detektors bei 280 nm. Die Flußrate wurde auf ca. 0,5 - 1 mL/min eingestellt. Alle Lösungen mussten vor dem Auftragen auf die Säule steril filtriert werden. Der Überstand der Zellyse wurde vor dem Säulengang in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (40000 x g, 4 ° C, 60 min). Währenddessen wurde die *HiTrap Chelating* Affinitätssäule (1 mL) mit 10 mL Wasser gewaschen, mit Nickel-Ionen beladen (2 mL Nickelsulfatlösung) und anschließend wieder mit 10 mL Wasser gewaschen. Danach

4 Experimenteller Teil

wurde die Säule mit 10 mL Bindungspuffer equilibriert und der Überstand der Ultrazentrifugation auf die Säule aufgetragen.

Nichtgebundene Proteine wurden mit Bindungspuffer von der Säule gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm wieder die Baseline erreicht hatte. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit 10 mL Waschpuffer von der Säule eluiert, während Gelonin durch Elutionspuffer eluiert werden konnte. Die erhaltene Proteinlösung wurde 3 x gegen 5 L Dialysepuffer bei 4° C dialysiert und bei -20 ° C gelagert.

Die *HiTrap Chelating* Affinitätssäule wurde durch Spülen mit 10 mL Regenerationspuffer entladen, anschließend mit 10 mL Wasser gespült und danach in 20 % ethanolischer Lösung bei 4° C gelagert.

4.2.19.2.1.2 Abspaltung des His-Tags von His₆-Gelonin₁₋₂₅₁

Der His-Tag kann mit Hilfe des Thrombin-Kits abgespalten werden. Thrombin ist eine Endoprotease, die spezifisch an die Aminosäuresequenz Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser bindet und vor dem enthaltenen Glycin eine Peptidbindung spaltet.

Benötigte Lösung:

Guanidinhydrochlorid-Stammlösung	6 M Guanidinhydrochlorid
	20 mM Natriumdihydrogenphosphat
	pH 8,4

Es wurden 0,2 mg/mL His₆-Gelonin₁₋₂₅₁ mit 1 mU Thrombin pro µg Protein nach Vorschrift des Herstellers versetzt und 16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

4.2.19.2.2 Isolierung des MBP-AChR Fusionsproteins

4.2.19.2.2.1 Isolierung mit Amylose-Affinitätschromatographie

Die Amylose-Affinitätschromatographie dient der Isolierung von Proteinen, die mit dem Maltose-bindenden Protein (MBP) fusioniert sind. Letzteres hat eine hohe Affinität zu Amylose und eine noch höhere zu Maltose, was bei der Aufreinigung ausgenutzt wird. Das Fusionsprotein lagert sich an die Affinitätsmatrix an und wird nach der Reinigung durch einen Maltose-haltigen Puffer wieder eluiert. Die Durchführung erfolgte entsprechend der mitgelieferten Vorschrift des Säulenmaterials der Firma *New England BioLabs* und der von Li veröffentlichten Methode (Li 2004). Alle Arbeitsschritte wurden bei 4° C durchgeführt.

4 Experimenteller Teil

Säulenpuffer	20 mM Tris 0,2 M NaCl 1 mM EDTA pH 7,4
Elutionspuffer	D(+)-Maltose-Monohydrat 10 mM in Säulenpuffer lösen 0,1 % SDS-Lösung
Lagerpuffer	20 % Ethanol

Bevor 15 mL der aufzureinigenden Proteinlösung auf die Amylosesäule aufgebracht wurden, wurde die Säule mit 110 mL Säulenpuffer gewaschen. Nach der Beladung erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 220 mL Säulenpuffer, um nichtgebundene Proteine von der Säule zu entfernen. Das Fusionsprotein wurde schließlich mit 30 mL Elutionspuffer eluiert. Der Verlauf der Elution wurde von einem, an die Amylose-Säule angeschlossenen, Durchflussphotometer (280 nm) verfolgt.

Durch eine Regeneration wurde die Amylose-Säule für die nächste Affinitätschromatographie vorbereitet. Die Regeneration besteht aus vier Waschschriften mit den folgenden Lösungen:

bidest. Wasser	66 mL
SDS-Lösung	66 mL
bidest. Wasser	22 mL
Säulenpuffer	110 mL

Um die Verunreinigung und Zersetzung durch Keime zu verhindern, wurde die Amylose-Säule bis zur Wiederverwendung bei 4° C in Lagerpuffer aufbewahrt.

4.2.19.2.2.2 Isolierung mit Gelfiltrations-Chromatographie

Die weitere Aufreinigung erfolgt mit Hilfe der *HiTrap Q FF*-Sepharosesäule, bei der es sich um einen basischen Anionenaustauscher handelt. Die Gelfiltrations-Chromatographie führt zur Auftrennung unterschiedlicher Molekulargewichte. Das Säulenmaterial besteht aus einem

4 Experimenteller Teil

hydratisierten Polymer mit einer vernetzten Struktur. Kleinere Moleküle können im Gegensatz zu größeren in die feinen Hohlräume diffundieren. Es dauert also länger, bis kleinere Moleküle die Säule passiert haben. In einem Ionenaustauscher werden die Moleküle mit hoher Ladung fester gebunden als die Moleküle mit geringer Ladung. Dadurch können Proteinlösungen mit Hilfe eines Ionengradienten bei der Elution aufgetrennt werden.

Startpuffer	20 mM Tris
	1 mM EDTA
	pH 8
Elutionspuffer	1 M NaCl
	in Startpuffer gelöst
Lagerpuffer	20 % Ethanol
	in Startpuffer

Die Aufreinigung erfolgte bei 4° C unter Verwendung einer Pumpe und eines Durchflussphotometers (280 nm). Die Durchflussrate wurde auf ca. 1 mL/min eingestellt. Bevor die Gelfiltrations-Chromatographie beginnen konnte, wurde die Proteinlösung durch eine Dialyse vom Natriumchlorid befreit.

Vor dem Auftragen der Proteinlösung (max. 2 mL) musste das Säulenmaterial mit 8 Säulenvolumen (Säulenvolumen: 2 mL) Startpuffer equilibriert werden. Bei der Elution wurde ein diskontinuierlicher Gradient in sechs Schritten aufgetragen. Die Konzentrationen der einzelnen Schritte sind dem folgenden Schema zu entnehmen.

4 Experimenteller Teil

Konzentration mol/L	Volumen mL	Volumen Startpuffer mL
0,08	0,8	9,2
0,16	1,6	8,4
0,2	2	8
0,4	4	6
0,8	8	2
1	10	0

Tabelle 39: Mischungsschema zur Herstellung des diskontinuierlichen NaCl-Gradienten

Es wurden jeweils 10 mL Puffer der betreffenden Konzentration aufgetragen. Nach der Elution wurde die Säule zur Regeneration mit je 5 Säulenvolumen Startpuffer und Elutionspuffer gewaschen. Zur Equilibrierung wurden 5-10 Säulenvolumen Startpuffer auf die Säule aufgebracht. Wird die *HiTrap Q FF*-Sepharosensäule längere Zeit nicht genutzt, wird sie nach Durchfluss von 4 mL Lagerpuffer bei 4° C aufbewahrt.

4.2.19.2.2.3 Proteolytische Spaltung des Fusionsproteins MBP- α AChR₄₋₂₀₈

Das Fusionsprotein MBP- α AChR₄₋₂₀₈ beinhaltet zwischen dem MBP-Tag und der α -Untereinheit des AChRs eine spezifische Aminosäuresequenz, die von der Protease Factor Xa erkannt wird. Die Sequenz besteht aus den folgenden Aminosäuren: Isoleucin – Glutamat/Aspartat – Glycin – Arginin. Geschnitten wird hinter Arginin. Die proteolytische Spaltung findet im Factor-Xa-Puffer statt (Li 2004).

Factor-Xa-Puffer

- 29 mM Tris
- 100 mM Natriumchlorid
- 2 mM Calciumchlorid
- pH 8

Die aufkonzentrierte Proteinlösung und die Protease Faktor Xa wurden in den Factor-Xa-Puffer gegeben, gemischt und für eine bestimmte Zeit bei 23° C (Hybaid PCR Sprint) inkubiert. Die dabei eingesetzten Mengen und die Laufzeit wurden variiert, um die besten Bedingungen herauszufinden. Die Proteinlösung wurde direkt nach der Spaltung durch eine TCA-Fällung aufkonzentriert und einer SDS-PAGE unterzogen.

4 Experimenteller Teil

4.2.20 Spezielle Arbeitsmethode: Isolierung des AChR aus dem Zitterrochen

Der Acetylcholinrezeptor wurde aus dem elektrischen Organ des Zitterrochens *Torpedo californica* nach einer modifizierten Vorschrift von Hertling-Jaweed isoliert. Die Isolierung beruht auf der Auftrennung durch Dichtegradientenzentrifugation (Hertling-Jaweed 1988).

Puffer A

- Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat 1,38 g
- EGTA 0,19 g
- Natriumazid 1 g
- PMSF 17,5 mg
- Natriumchlorid 23,4 g
- NaOH bis pH 7,4
- bidest. Wasser ad 1 L

Puffer B

wie Puffer A, allerdings ohne Natriumchlorid

LIS-Puffer

- Tris 1 M
- EDTA 5 mM
- Lithium-3,5-diiodosalicylsäure 10 mM
- pH 8,1
- bidest. Wasser ad 1 L

Cholatpuffer

- Natriumcholat 1 %
- Puffer B ad 1 L

Dialysepuffer

- Natriumchlorid 130 mM
- di*-Natriumhydrogenphosphat 4,5 mM
- Natriumdihydrogenphosphat 2,5 mM

4 Experimenteller Teil

pH 7,2

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4° C durchgeführt. Zunächst wurden 100 g tiefgekühltes elektrisches Organ des Zitterrochens mit einem scharfen Messer fein zerkleinert und mit 400 mL Puffer A in einem Mixer (*Waring Blendor Typ 8011*) homogenisiert. Zum Entfernen der größeren Gewebeteile wurde das Homogenisat über ein Mulltuch abfiltriert und zwei Stunden bei 30000 x g zentrifugiert. Nachdem das Pellet in 200 mL Puffer B resuspendiert wurde, wurde es im eisgekühlten Ultraschallbad auf der niedrigsten Stufe in kurzen Intervallen beschallt. Es schloss sich eine zweistündige Zentrifugation bei 30000 x g an. Mit einer 10 mL Pipette wurde das Pellet in 15 mL Puffer B aufgenommen. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 2900 x g wurde der Überstand mit dem enthaltenen AChR auf sechs kontinuierliche Sucrosegradienten aufgetragen. Zum Herstellen der Sucrosegradienten wurde ein Gradientenmischer verwendet, der mit jeweils 15 mL einer 25 % und einer 50 % Sucroslösung gefüllt war. Die Dichtegradientenzentrifugation wurde 16 Stunden bei 22000 x g durchgeführt. Es entstanden dabei mehrere Banden. Der Rezeptor reicherte sich sowohl in der oberen als auch mit Verunreinigungen in der unteren Bande an. Die Gradienten wurden in Fraktionen von je 2 mL getrennt. Es folgen die Bestimmung der Proteinmenge und eine SDS-PAGE.

Die einzelnen Fraktionen wurden im Verhältnis 1:5 mit dem Puffer B verdünnt und anschließend vier Stunden bei 30000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 7 mL LIS-Puffer aufgenommen und eine Stunde geschüttelt. Danach wurde die Lösung 30 Minuten bei 100000 x g zentrifugiert. Im Überstand befand sich ein Protein mit einem Molekulargewicht von 43 kDa. Das Pellet wurde weiterverarbeitet, indem es in 5 mL Cholatpuffer resuspendiert und über Nacht geschüttelt wurde. Die Suspension wurde zwei Stunden lang bei 100000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dreimal gegen fünf Liter Dialysepuffer dialysiert. Zur Proteinbestimmung wurden ein BCA-Test und eine SDS-PAGE durchgeführt. Die Proteinlösung kann anschließend aufkonzentriert werden.

4.2.21 Immunologische Methode: ELISA

Bei ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) handelt es sich um einen immunologischen Test zum qualitativen Nachweis von Antikörpern bzw. Antigenen. Die Methode beruht auf der festen Bindung der meisten Proteine an bestimmte Kunststoffoberflächen. An die gebundenen Proteine kann ein spezifischer Primärantikörper binden. Der Sekundärantikörper, welcher spezifisch für den Primärantikörper ist, ist zur

4 Experimenteller Teil

Markierung an ein Enzym gekoppelt (Harlow 1988). Als Markierungsenzym diente in dieser Arbeit eine alkalische Phosphatase, die den Phosphatrest von p-Nitrophenylphosphat abspaltet. Das dabei entstehende gelbe Produkt absorbiert monochromatisches Licht der Wellenlänge 414 nm.

Coating-Puffer	Lösung A	200 mM Natriumcarbonat
Coating-Puffer	Lösung B	200 mM Natriumhydrogencarbonat
Coating-Puffer	Lösung A	17 mL
	Lösung B	8 mL
PBS-Puffer	<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat	0,92 g
	Natriumdihydrogenphosphat	0,35 g
	Natriumchlorid	8,18 g
		pH-Wert 7,2 ad 1 L
Waschpuffer	Tween 20	0,45 mL
PBS-Tween	PBS-Puffer	900 mL
Blockierlösung	BSA (1 %)	0,25 g
	PBS-Puffer	ad 25 ml
Substratpuffer	Natriumazid	0,2 g
	Magnesiumchlorid	0,1 g
	Diethanolamin	97 mL
		pH-Wert 9,8 ad 1 L

4 Experimenteller Teil

Substratlösung	p-Nitrophenylphosphat	10 mg
	Substratpuffer	ad 10 mL

Der immunologische Test ELISA wurde mit dem Testprotein MBP- α AChR₄₋₂₀₈, der Negativkontrolle BSA und der Positivkontrolle AChR aus *Torpedo californica* durchgeführt. Als Primärantikörper, der spezifisch für die α -Untereinheit des AChRs ist, diente mAb 35 aus der Maus in einer 1:1000-Verdünnung. Es handelte sich um einen konformationsabhängigen Antikörper, der nur native Antigene erkennt. Als Sekundärantikörper wurde ein Anti-Maus-IgG-Enzym-Konjugat mit einer alkalischen Phosphatase eingesetzt. Das Antigen wurde in Coating-Puffer auf eine Konzentration von 20 μ g/mL gebracht. Von dieser Lösung wurden auf einer 96-Wellplatte pro Napf 100 μ L pipettiert. Die Bindung des Antigens an die Kunststoffoberfläche geschah über Nacht bei 4° C. Die Platte wurde durch Ausschlagen geleert und mit 200 μ L Blockierlösung gefüllt. Es folgte eine 90-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Näpfe wurden bei den folgenden Arbeitsschritten vor jedem neuen Befüllen durch Ausschlagen geleert. Nach der Inkubation wurden die Näpfe zweimal mit jeweils 200 μ L Waschpuffer PBS-Tween gewaschen. Dann wurde in jede Vertiefung 100 μ L Primärantikörperlösung pipettiert. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur schlossen sich drei Waschschrte mit jeweils 200 μ L Waschpuffer PBS-Tween an. Pro Napf wurden 100 μ L Enzymkonjugatlösung(1:1000-Verdünnung) aufgetragen. Es folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Nachdem die Vertiefungen viermal mit jeweils 200 μ L Waschpuffer PBS-Tween gewaschen wurden, wurden 100 μ L Substratlösung eingefüllt. Die 96-Wellplatte wurde nun in regelmäßigen Abständen mit dem EIA-Reader bei 414 nm vermessen.

Zur statistischen Auswertung wurden die Mittelwerte der Messergebnisse gebildet und die Standardabweichungen berechnet. Eine Probe gilt als positiv, wenn der Messwert größer ist als die Summe aus dem Mittelwert der Negativkontrolle und der doppelten Standardabweichung.

4.2.22 Massenspektrometrische Charakterisierung: MALDI

Die Matrix-unterstützte Laserdesorption-/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) dient zur Identitätskontrolle von Peptiden und Oligonukleotiden aufgrund ihrer Masse. Des

4 Experimenteller Teil

Weiteren können Proteine aus Gelbanden mit Hilfe dieser Methode identifiziert werden. Das Massenspektrum einer Molekülverbindung kommt zunächst durch die Ionisation der Moleküle zustande. Danach werden die Molekülmassen der beim Ionisationsprozess gebildeten primären Ionen und der Zerfallsprodukte im Hochvakuum bestimmt. Die Probe, die für die Untersuchung verwendet wird, ist danach allerdings verloren.

Durch das Einbetten der Probe in eine geeignete Matrix können höhere Intensitäten der Analytmolekül-Ionen erhalten und das Auftreten von Fragment-Ionen verringert werden. Eine solche Matrix besteht aus kleinen, organischen Molekülen, die bei der eingestrahnten Laserwellenlänge eine hohe Absorption zeigen (Karas und Hillenkamp 1988, Beavis 1992).

4.2.22.1 Gelextraktion

Bevor die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus Gelbanden mit Hilfe der MALDI-MS untersucht werden konnten, mussten sie aus dem Gel freigesetzt und durch einen tryptischen Verdau in charakteristische Fragmente gespalten werden.

Benötigte Lösungen:

Lösung A Ammoniumhydrogencarbonat (50 mM) 40 mg
 bidest. Wasser ad 10 mL

Lösung B Ammoniumhydrogencarbonat (25 mM) 20 mg
 Acetonitril (50 %) 5 mL
 bidest. Wasser ad 10 mL

Reduktionspuffer Ammoniumhydrogencarbonat (50 mM) 40 mg
 DTT (10 mM) 15 mg
 bidest. Wasser ad 10 mL

Alkylierungspuffer Ammoniumhydrogencarbonat (50 mM) 40 mg
 Iodacetamid (5 mM) 9 mg
 bidest. Wasser ad 10 mL

4 Experimenteller Teil

In einem ersten Schritt wurde die Gelbande für 10 Minuten mit 50 µL Lösung A inkubiert. Nach Entfernung der Lösung A erfolgte eine 10-minütige Inkubation mit 50 µL Lösung B, die danach ebenfalls entfernt wurde. Die beiden Inkubationsvorgänge wurden wiederholt.

In einem zweiten Schritt wurde das Gelstück mit 200 µL Acetonitril lyophilisiert (Savant Speed Vac SC 110). Danach schloss sich eine 30-minütige Inkubation mit 50 µL Reduktionspuffer bei 56° C an. Der Reduktionspuffer wurde entfernt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation mit 50 µL Alkylierungspuffer bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach dem Entfernen des Alkylierungspuffers wurde der erste Schritt wiederholt.

Nachdem das Gelstück lyophilisiert wurde, erfolgte eine Inkubation mit 3 µL Trypsinlösung (1 mg/mL) über Nacht bei 37° C.

4.2.22.2 Vorbereiten der Proben für Massenspektrometrie

Für die massenspektrometrische Analyse von verdauten Proteinen eignet sich die C18-Matrix.

Benötigte Lösungen:

0,1 % TFA	TFA 1 µL bidest. Wasser 999 µL
Acetonitril/TFA-Lösung	Acetonitril (50 %) 500 µL TFA (0,1 %) 1 µL bidest. Wasser ad 1 mL
Matrixlösung	Acetonitril (50 %) 500 µL TFA (0,1 %) 1 µL HCCA (1 %) 10 mg bidest. Wasser ad 1 mL

Nach einer kurzen Zentrifugation (Eppendorf Zentrifuge 5415C) inkubierte das verdaute Gelstück 45 Minuten lang mit 0,1 % TFA bei Raumtemperatur. Die ZipTip-Spitze wurde zweimal mit 10 µL Acetonitril/TFA-Lösung angefeuchtet. Dann wurde sie mit 10 µL 0,1 % TFA equilibriert. 10 µL der inkubierten Peptidlösung wurden mehrmals mit der ZipTip-Spitze

4 Experimenteller Teil

in die C18-Matrix aufgenommen. Nachdem die Spitze zweimal mit 10 µL 0,1 % TFA gespült wurde, wurden 2 µL Matrixlösung aufgenommen und entsprechend der *Dried Droplet*-Methode direkt auf das MALDI-Target aufgebracht.

Zur Kalibrierung des MALDI-Massenspektrometers wurde ein Peptid-Kalibrierungsstandard verwendet. 0,5 µL dieses Standards wurden mit 0,5 µL Matrixlösung gemischt und auf das Target aufgetragen.

4.2.23 Säugerkultivierung: Cytotoxizitätstest von Gelonin

Alle Arbeiten mit noch lebenden Säugerkulturen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

4.2.23.1 Kultivierungsbedingungen

Die Zellen wurden bei 37° C, 19 % Sauerstoff und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Alle eingesetzten Puffer und Lösungen wurden im Wasserbad auf 37° C vortemperiert.

4.2.23.2 Mediumswechsel bei Monolayerkulturen

Zelllinien, die als Monolayerkulturen in Kulturgefäßen wachsen, benötigen zum Wachstum und zur Vitalitätserhaltung einen regelmäßigen Wechsel des Mediums, da bestimmte Bestandteile des Mediums von den Zellen metabolisiert werden oder bei 37° C im Laufe der Zeit zerfallen (Lindl 1987). In der Regel sollte das Medium zweimal pro Woche gewechselt werden, bei großer Zelldichte kann dieser aber auch dreimal pro Woche nötig sein.

4.2.23.3 Subkultivierung von Monolayerkulturen

Bei Erreichen einer zu hohen Zelldichte im Kulturgefäß ist es notwendig die Zellkulturen zu teilen. Dies geschah durch das Passagieren der Zellen, d.h. die Zellen werden unter Verdünnung in ein neues Kulturgefäß überführt (Lindl 1987).

Hierzu wurden die Zellen, nach Abziehen des Mediums, mit PBS gewaschen und anschließend mit 5 mL Trypsinlösung versetzt. Um ein vollständiges Ablösen der Zellen zu gewährleisten, ist darauf zu achten, dass die Lösung über den gesamten Gefäßboden verteilt ist. Die Zellen wurden für 1-2 Minuten im Brutschrank inkubiert. Der Ablösevorgang kann durch leichtes Schlagen gegen die Gefäßwand beschleunigt werden, um den Kontakt der Zellen mit dem Trypsin möglichst kurz zu halten. Um die Reaktion abzustoppen wurde eine kleine Menge Medium (ca. 5 mL) in die Kulturflasche gegeben, verteilt und resuspendiert, um

4 Experimenteller Teil

verklumpte Zellen zu vereinzeln. Die Zellsuspension wurde abgezogen, 1-2 Tropfen davon in eine neue Kulturflasche überführt und mit 30 mL Medium versetzt.

4.2.23.4 Zellzahlbestimmung mittels Hämocytometer

Die Zellkonzentration einer Zellsuspension kann mit einem Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer) unter dem Lichtmikroskop bestimmt werden. Beim Zusammensetzen dieser ist auf das Entstehen der „Newton`schen Ringe“ zu achten, die anzeigen, dass das Deckglas richtig angebracht ist und die Tiefe der Zählkammer richtig eingestellt ist (0,1 mm). Dies erreicht man durch leichtes Anhauchen.

Die Neubauer-Zählkammer besteht aus neun großen Quadraten, von denen jedes eine Fläche von 1 mm² besitzt. Bei einer Tiefe von 0,1 mm ergibt sich so ein Volumen von 0,1 µl pro großem Quadrat (Lindl 1987).

In einem Eppendorfgefäß wurde die Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau versetzt, die Zählkammer blasenfrei mit dem Gemisch befüllt und die Quadrate unter dem Mikroskop ausgezählt. Tote Zellen erscheinen dabei blau und werden nicht mitgezählt. Durch Mittelwertbildung kann dann die Zellzahl pro mL bestimmt werden.

4.2.23.5 SRB-Test zur Untersuchung der Cytotoxizität von Gelonin

Mit dem SRB-Test lässt sich die Toxizität von Substanzen auf Zellkulturen untersuchen. Er beruht auf der schnellen und empfindlichen Quantifizierung von zellulären Proteinen adhärent wachsender Zellen. Die Proteinbestimmung erfolgt mit dem intensiv pinken Aminoxanthan-Farbstoff Sulforhodamin B (SRB). Im Sauren bindet SRB stabil und mit hoher Affinität an Proteine.

TCA-Lösung, 50 %	500 g TCA
	ad 1L H ₂ O

SRB

Essigsäure	1 % Essigsäure
------------	----------------

4 Experimenteller Teil

Tris

10 mM Tris

pH 10

4.2.23.5.1 Vortest zur Ermittlung einer auswertbaren Mindestzellzahl

Von der hergestellten Zellsuspension wurde die Zellzahl bestimmt und mit Medium auf die in Tabelle 40 aufgeführten Konzentrationen verdünnt.

Zellkonzentration in Zellen/mL
5000
6000
8000
10 000

Tabelle 40: Angesetzte Zellkonzentrationen

In eine 24-Well-Platte wurde von jedem Zellkonzentrationsansatz je 1 mL in die 4 untereinander liegenden Wells pipettiert und 3 Tage anwachsen gelassen. Mit 50 % TCA-Lösung wurde die Reaktion beendet, wodurch eine starke Trübung eintrat, und die Zellen innerhalb einer Stunde bei 4° C fixiert wurden. Das TCA-haltige Medium wurde verworfen und die Platte drei- bis viermal unter kaltem Wasser abgespült und über Nacht bei RT oder eine Stunde bei 50° C im Trockenschrank getrocknet. Die fixierten Zellen wurden mit 250 µL SRB pro Well im Dunkeln für 30 Minuten angefärbt, der Farbstoff anschließend verworfen und überschüssiger Farbstoff durch Spülen mit 1 % Essigsäure entfernt. Wenn sich kein Farbstoff mehr löste wurde die Platte erneut getrocknet. Die Extinktionsmessung des eingelagerten Farbstoffs erfolgte dann nach Lösen in 1 mL Tris (pH 10) im UV/Vis-Spektrometer bei 546 nm.

4.2.23.5.2 SRB-Test nach Inkubation mit Gelonin

Von der entsprechend Kapitel 4.2.23.5.1 hergestellten Zellsuspension wurde die Zellzahl bestimmt und mit Medium auf eine Konzentration von 8000 Zellen pro mL verdünnt. In eine 24-Well-Platte wird jeweils 1 mL dieser Zellsuspension pipettiert und die Zellen 3 Tage

4 Experimenteller Teil

anwachsen gelassen. Die vier untereinander liegenden Wells wurden mit den in Tabelle 41 aufgeführten Geloninmengen in je 40 μL Medium für 24 h inkubiert.

Geloninkonzentration in $\mu\text{g/mL}$	Geloninmenge pro Well in μg
0	0
12,5	0,5
25	1
50	2

Tabelle 41: Eingesetzte Geloninmengen

Alle nachfolgenden Schritte wurden analog zu Kapitel 4.2.23.5.1 durchgeführt.

5 Fazit

5 Fazit

Daptomycin ist ein Antibiotikum, das zur Behandlung von Haut- und Weichteilinfektionen eingesetzt wird.

Durch breit aufgestellte Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit erfolgt sind, konnten weitreichende Erkenntnisse bezüglich des Mechanismus zu Daptomycin erzielt werden. Aufbauend konnten diese im Rahmen weiterer Untersuchungen bereits erweitert werden.

Myasthenia gravis ist eine Autoimmunerkrankung, die sich gegen Acetylcholinrezeptoren richtet. Eine mögliche Therapie wäre die Behandlung mit einem Konjugat aus Gelonin und dem Acetylcholinrezeptor. Hossann hatte hierzu ein Konjugat kloniert, welches allerdings nur schwer löslich war. Deshalb sollte ein zusätzlicher Löslichkeits-*Tag* an das Fusionsprotein fusioniert werden.

In weiteren Arbeiten könnte dies optimiert werden.

Literaturverzeichnis

- Alberts, B. 2011, Molekularbiologie der Zelle, 5. Auflage, Wiley-VCH, New York
- Atkins P. W 2013, Physikalische Chemie, 5. Auflage, Wiley-VCH, New York
- Avanti Polar Lipids <http://avantilipids.com/>
- Berliner L. J 1976, Spin Labeling Theory and Applications. Academic Press, New York, San Francisco, London.
- Berliner L. J Spin Labeling Theory and Applications II, Academic Press, New York, San Francisco, London.
- Blattler W. E., Lambert J. 1985, Immunotoxin and method of making, US Patent M., Senter P. D. WO1986005098 A1
- Deetjen P. 2004, Physiologie, 4. Auflage, Urban & Fischer, Elsevier, Amsterdam
- EMA <http://www.ema.europa.eu/ema/>
- EARSS <http://www.ecdc.europa.eu/en/Pages/home.aspx>
- Galla H-J. 1988, Spektroskopische Methoden in der Biochemie, Thieme, Stuttgart
- Hertling-Jaweed S., Bandini G., Müller-Fahrnow A., Dommes V., Hucho F. 1988, Rapid preparation of the nicotinic acetylcholine receptor for crystallization in detergent solution. FEBS letters, 241, 29–32.
- Hossann M. 2004, Antigen-spezifische Immunsuppression in einem Tiermodell der *Myasthenia gravis*. Doktorarbeit, TU Kaiserslautern
- Hossann M., Li Z.-Y., Shi Y., Kreilinger U., Büttner J., Vogel P. D., Yuan J., Wise J. G., Trommer W. E. 2006, Novel immunotoxin: A fusion protein consisting of gelonin and a acetylcholine receptor fragment as a potential immunotherapeutic agent for the treatment of *Myasthenia gravis*. *Protein Expression and Purification*, 46, 73-84.
- Hucho F. 1986, European Journal of Biochemistry, Wiley

Literaturverzeichnis

- Janeway C. 2009, Immunologie, 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Kaback H. R. 1971, Methods in enzymology, Elsevier, Amsterdam
- Klessinger M. 1995, Excited States and Photochemistry of Organic Molecules, 1. Auflage, Wiley, New York
- Knowles P. F., Marsh D., Rattle H. W. E. 1976, Magnetic Resonance of Biomolecules. John Wiley & Sons, New York.
- Lasic D. D. 1997, Liposomes in Gene Delivery. CRC Press LLC.
- Lee-Huang S., Kung H., Huang P. L., Huang P. L., 1991, A new class of anti-HIV agents: GAP31, DAPs 30 and 32, FEBS Letters, 291,1, 139–144
- Li Q., Huang P, Huang H.I., Chen H.
- Li, Z.-Y., Qu Y., Li H., Yuan J. 2007, Truncations of gelonin lead to a reduction in its cytotoxicity, Toxicology, 231, 2–3, 129–136
- Lottspeich F. 2012, Bioanalytik, 3.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Müller M. 2013, Forschungsarbeit Biochemie: Untersuchungen zur Wirkung von Daptomycin auf Bakterien, TU Kaiserslautern
- Muraih J. K., Pearson A., Silverman J., Palmer M. 2011, Oligomerization of daptomycin on membranes, BBA Biomembranes, 1808, 4, April 2011, 1154–1160
- Poole R. K. 1993, Isolation of membranes, Met in Mol Bio, 19, 109-122
- Psychrembel W. 2013, Klinisches Wörterbuch, 265. Auflage, de Gruyter, Berlin
- Purves, William 2012, Biologie, 9. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Sambrook J., Russell D. W. 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3. Auflage.

Literaturverzeichnis

- Stirpe F., Battelli M. G. 2006, Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cell Mol Life Sci*, 63, 1850-1866.
- Stirpe F., Olsnes S., Phil A. 1980, Gelonin, a new inhibitor of protein synthesis, nontoxic to intact cells. *J Biol Chem*, 255, 6947–6953.
- Stryer, Lubert Biochemie, Springer Spektrum, 7. Auflage 2012
- Tedesco K. L., Ryback M. J. 2004, Daptomycin, *Pharmacotherapy*, 24, 1, 41–57
- TARGA <http://www.targatherapeutics.com>
- Tzartos S. J., Kokla A., 1988, Localization of the main immunogenic region of
Walgrave S. L., Conti- human muscle acetylcholine receptor residues 67-76 of the
Tronconi B. M. α -subunit.
Proc Natl Acad Sci USA, 85, 2899–2903
- Urbatsch I. 1990, Antigen-spezifische Immunsuppression mit Hilfe von
Antigen-Gelonin Konjugaten. Doktorarbeit, TU
Kaiserslautern.
- Urbatsch I. L., Sterz R. K., 1993, Antigen-specific therapy of experimental *myasthenia*
Peper K., Trommer W. E. *gravis* with acetylcholine receptor-gelonin conjugates in
vivo. *Eur J Immunol*, 23, 776–779.
- Wertz J. E., Bolton J. R. 1972, Electron spin resonance: elementary theory and
practical applications, Chapman and Hall

6 Anhang

6.1 Anhang 1

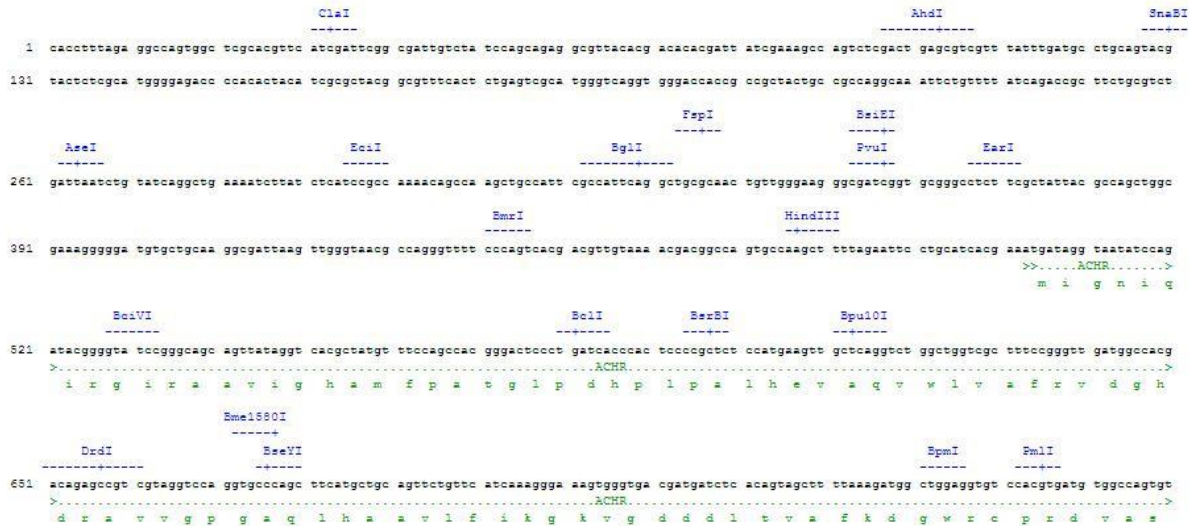


Abbildung 86: Sequenzierung pmalAChR

6.2 Anhang 2

Sequenz pUC18:

TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGAC
GGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGC
GTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCTGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAG
ATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGG
AGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAG
GGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGC
TGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAA
ACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGG
GTACCGAGCTCGAATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTA
TCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTG
GGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCT
TTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGG
GGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTG
CGCTCGGTTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATAC
GGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCC

Anhang

AGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCT
CCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAA
CCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGC
TCTCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGG
AAGCGTGGCGCTTTCTCAAAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTC
GTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCG
CCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCC
ACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGC
TACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTT
GGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTT
GATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCA
GATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGG
TCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTAT
CAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAAT
CTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAG
GCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGT
CGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATG
ATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAG
CCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTC
TATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGC
AACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGC
TTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGT
GCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGC
CGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGC
CATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGTGACTCAACCAAGTCATTCTGAGA
ATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACC
GCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGC
GAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCG
TGCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAA
AAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGT
TGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGT
CTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTC
CGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCAT
GACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC

Anhang

Sequenz pUC18AChR:

TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGAC
GGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGC
GTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAG
ATTGTAAGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGG
AGAAAATACCGCATCAGGGGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAG
GGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGC
TGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAA
ACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTGAGACCCGTCTGGTGGCAA
AGCTATTTAAAGACTACAGCAGCGTGGTGCGGCCAGTGGAAGACCACCGCCAGG
TCGTGGAGGTCACCGTGGGCCTGCAGCTGATACAGCTCATCAATGTGGATGAAGT
AAATCAGATCGTGACAACCAATGTGCGTCTGAAACAGCAATGGGTGGATTACAA
CCTAAAATGGAATCCAGATGACTATGGCGGTGTGAAAAAATTCACATTCCTTCA
GAAAAGATCTGGCGCCAGACCTTGTTCTCTATAACAATGCAGATGGTGACTTTG
CTATTGTCAAGTTCACCAAAGTGCTCCTGCAGTACACTGGCCACATCACGTGGAC
ACCTCCAGCCATCTTTAAAAGCTACTGTGAGATCATCGTCACCCACTTTCCTTTG
ATGAACAGAACTGCAGCATGAAGCTGGGCACCTGGACCTACGACGGCTCTGTCGT
GGCCATCAACCCGGAAAGCGACCAGCCAGACCTGAGCAACTTCATGGAGAGCGG
GGAGTGGGTGATCAAGGAGTCCCGTGGCTGGAAACATAGCGTGACCTATAGCTG
CTGCCCCGATACCCCGTATCTGGATATTACCTATCATTTCGTGATGCAGTAACTGA
ATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATT
CCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGA
GTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCTTTCAGTCGGGAA
ACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTT
GCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTC
GGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAG
AATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCC
AGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTG
ACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGAC
TATAAAGATAACAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCG
ACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCT
TTCTCAAAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGC
TGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAA

Anhang

CTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCC
ACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTG
AAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTC
TGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACA
AACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGA
AAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGT
GGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTT
CACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATAT
GAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAG
CGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACT
ACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACC
CACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCG
AGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGC
CGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCA
TTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCC
GGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGG
TTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCA
CTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATG
CTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGG
CGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCA
GAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAG
GATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGA
TCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGC
AAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATAAC
TCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGA
TACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCC
CCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTA
TAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCGTC

Anhang

Sequenz pUCGelAChR:

TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGAC
GGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGC
GTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAG
ATTGTAAGTGCAGAGTGCACCATATGGGCCTGGATACCGTGAGCTTCAGCACCAAAG
GCGCCACCTATATTACCTATGTGAACTTCTGAACGAACTGCGTGTGAAACTGAA
ACCGGAAGGCAACAGCCATGGCATTCCGCTGCTGCGTAAAAAATGCGATGATCC
GGGCAAATGCTTCGTGCTGGTGGCGCTGAGCAACGATAACGGCCAGCTAGCGGA
AATTGCGATTGATGTGACCAGCGTGTATGTGGTGGGCTATCAGGTGCGTAACCGT
AGCTATTTCTTCAAAGATGCGCCGGATGCGGGCGTATGAAGGCCTGTTCAAAAACA
CCATTAACCCCGTCTGCATTTCCGGCGGCAGCTATCCGAGTCTAGAAGGCGAAAA
AGCGTATCGTGAAACCACCGATCTGGGCATTGAACCGCTGCGTATTGGCATTAAA
AACTGGATGAAAACGCGATTGATAACTATAAACCGACCGAAATTGCGAGCAGC
CTGCTGGTGGTGAATTCAGATGGTGAAGCGGCGCGTTTCACCTTCATTGAAA
ACCAGATTCGTAACAACCTCCAGCAGCGGATCCGTCCGGCGAACAACACCATTAG
CCTGGAAAACAAATGGGGCAAGCTGAGCTTCCAGATTCGTACCAGCGGCGCGAA
CGGCATGTTTCAGCGAAGCGGTGGAGCTCGAACGTGCGAACGGCAAAAAATATTA
TGTGACCGCGGTTGATCAGGTGAAACCGAAAATTGCGCTGCTGAAATTCGTGAC
AAAGATCCGAAATAATAAGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCATGCCTGCAG
GTCGAGACCCGTCTGGTGGCAAAGCTATTTAAAGACTACAGCAGCGTGGTGGCGC
CAGTGGAAGACCACCGCCAGGTCGTGGAGGTCACCGTGGGCCTGCAGCTGATAC
AGCTCATCAATGTGGATGAAGTAAATCAGATCGTGACAACCAATGTGCGTCTGAA
ACAGCAATGGGTGGATTACAACCTAAAATGGAATCCAGATGACTATGGCGGTGT
GAAAAAATTCACATTCCTTCAGAAAAGATCTGGCGCCAGACCTTGTTCTCTAT
AACAATGCAGATGGTGAATTTGCTATTGTCAAGTTCACCAAAGTGCTCCTGCAGT
ACACTGGCCACATCACGTGGACACCTCCAGCCATCTTTAAAAGCTACTGTGAGAT
CATCGTCACCCACTTTCCCTTTGATGAACAGAACTGCAGCATGAAGCTGGGCACC
TGGACCTACGACGGCTCTGTGCGTGGCCATCAACCCGAAAGCGACCAGCCAGAC
CTGAGCAACTTCATGGAGAGCGGGGAGTGGGTGATCAAGGAGTCCCGTGGCTGG
AAACATAGCGTGACCTATAGCTGCTGCCCGGATAACCCGTATCTGGATATTACCT
ATCATTTTCGTGATGCAGTAACTGAATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTG
TGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGT
GTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTC

Anhang

ACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGC
CAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCA
CTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGGCAGCGGTATCAGCTCACTCAA
GGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTG
AGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTT
TTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAG
AGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGC
TCCCTCGTGCGCTCTCTGTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTT
TCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAAAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTT
CGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCC
CGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACAC
GACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTAT
GTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAA
GAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGT
TGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTT
GCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCT
TTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGT
CATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGT
TTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTT
AATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCT
GACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAG
TGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATA
AACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCC
TCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTA
ATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCG
TTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATC
CCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGA
AGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCT
TACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGT
CATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACG
GGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGT
TCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGT
AACCCTACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCT
GGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGAC

Anhang

ACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATC
AGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACA
AATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACC
ATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC

Anhang

Sequenz pUCGelAChRmut1:

TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGAC
GGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGC
GTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAG
ATTGTAAGTGCAGAGTGCACCATATGGGCCTGGATACCGTGAGCTTCAGCACCAAAG
GCGCCACCTATATTACCTATGTGAACTTCTGAACGAACTGCGTGTGAAACTGAA
ACCGGAAGGCAACAGCCATGGCATTCCGCTGCTGCGTAAAAAATGCGATGATCC
GGGCAAATGCTTCGTGCTGGTGGCGCTGAGCAACGATAACGGCCAGCTAGCGGA
AATTGCGATTGATGTGACCAGCGTGTATGTGGTGGGCTATCAGGTGCGTAACCGT
AGCTATTTCTTCAAAGATGCGCCGGATGCGGGCGTATGAAGGCCTGTTCAAAAACA
CCATTAACCCCGTCTGCATTTCCGGCGGCAGCTATCCGAGTCTAGAAGGCGAAAA
AGCGTATCGTGAAACCACCGATCTGGGCATTGAACCGCTGCGTATTGGCATTAAA
AACTGGATGAAAACGCGATTGATAACTATAAACCGACCGAAATTGCGAGCAGC
CTGCTGGTGGTGAATTCAGATGGTGAAGCGGCGGTTTCACCTTCATTGAAA
ACCAGATTCGTAACAACCTCCAGCAGCGGATCCGTCCGGCGAACAACACCATTAG
CCTGGAAAACAAATGGGGCAAGCTGAGCTTCCAGATTCGTACCAGCGGCGCGAA
CGGCATGTTTCAGCGAAGCGGTGGAGCTCGAACGTGCGAACGGCAAAAAATATTA
TGTGACCGCGGTTGATCAGGTGAAACCGAAAATTGCGCTGCTGAAATTCGTGAC
AAAGATCCGAAATATAAGAATTCGAGCTCCGTGACAAGCTTGCATGCCTGCAGG
TCGAGACCCGTCTGGTGGCAAAGCTATTTAAAGACTACAGCAGCGTGGTGGGCC
AGTGGAAGACCACCGCCAGGTCGTGGAGGTCACCGTGGGCCTGCAGCTGATACA
GCTCATCAATGTGGATGAAGTAAATCAGATCGTGACAACCAATGTGCGTCTGAAA
CAGCAATGGGTGGATTACAACCTAAAATGGAATCCAGATGACTATGGCGGTGTG
AAAAAATTCACATTCCTTCAGAAAAGATCTGGCGCCAGACCTTGTCTCTATA
ACAATGCAGATGGTGAATTTGCTATTGTCAAGTTCACCAAAGTGCTCCTGCAGTA
CACTGGCCACATCACGTGGACACCTCCAGCCATCTTTAAAAGCTACTGTGAGATC
ATCGTCACCCACTTTCCCTTTGATGAACAGAACTGCAGCATGAAGCTGGGCACCT
GGACCTACGACGGCTCTGTCGTGGCCATCAACCCGGAAAGCGACCAGCCAGACC
TGAGCAACTTCATGGAGAGCGGGGAGTGGGTGATCAAGGAGTCCCGTGGCTGGA
AACATAGCGTGACCTATAGCTGCTGCCCGGATACCCCGTATCTGGATATTACCTA
TCATTTTCGTGATGCAGTAACTGAATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGT
GAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTG
TAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCA

Anhang

CTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCC
AACGCGCGGGGAGAGGGCGGTTTGGCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCAC
TGA CT CGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAG
GCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGA
GCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTT
TTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGA
GGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCT
CCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTT
CTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAAAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTC
GGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCC
GACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACG
ACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGT
AGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGA
ACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTG
GTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGC
AAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTT
CTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTAAAGGGATTTTGGTCAT
GAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTT
AAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAA
TCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGA
CTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTG
CTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAA
CCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCC
ATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATA
GTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTT
GGTATGGCTTCATTCAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCC
CCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAG
TAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTA
CTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCA
TTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGG
ATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTT
TTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAA
CCCACTCGTGCAACCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGG
GTGAGCAAAAACAGGAAGGCCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACAC

Anhang

GGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAG
GGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAA
TAGGGGTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCAT
TATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC

Anhang

Sequenz pUCGelAChRmut2

TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGAC
GGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGC
GTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAG
ATTGTACTGAGAGTGCACCATATGGGCCTGGATACCGTGAGCTTCAGCACCAAAG
GCGCCACCTATATTACCTATGTGAACTTCCTGAACGAACTGCGTGTGAAACTGAA
ACCGGAAGGCAACAGCCATGGCATTCCGCTGCTGCGTAAAAAATGCGATGATCC
GGGCAAATGCTTCGTGCTGGTGGCGCTGAGCAACGATAACGGCCAGCTAGCGGA
AATTGCGATTGATGTGACCAGCGTGTATGTGGTGGGCTATCAGGTGCGTAACCGT
AGCTATTTCTTCAAAGATGCGCCGGATGCGGGCGTATGAAGGCCTGTTCAAAAACA
CCATTAACCCGTCTGCATTTCCGGCGGCAGCTATCCGAGTCTAGAAGGCGAAAA
AGCGTATCGTGAAACCACCGATCTGGGCATTGAACCGCTGCGTATTGGCATTAAA
AACTGGATGAAAACGCGATTGATAACTATAAACCGACCGAAATTGCGAGCAGC
CTGCTGGTGGTGAATTCAGATGGTGAAGCGGCGCGTTTCACCTTCATTGAAA
ACCAGATTCGTAACAACCTCCAGCAGCGGATCCGTCCGGCGAACAAACACCATTAG
CCTGGAAAACAAATGGGGCAAGCTGAGCTTCCAGATTCGTACCAGCGGCGCGAA
CGGCATGTTTCAGCGAAGCGGTGGAGCTCGAACGTGCGAACGGCAAAAAATATTA
TGTGACCGCGGTTGATCAGGTGAAACCGAAAATTGCGCTGCTGAAATTCGTGAC
AAAGATCCGAAATATAAGATTTTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCATGCCTGCAGG
TCGAGACCCGTCTGGTGGCAAAGCTATTTAAAGACTACAGCAGCGTGGTGGCGCC
AGTGGAAGACCACCGCCAGGTCGTGGAGGTCACCGTGGGCCTGCAGCTGATACA
GCTCATCAATGTGGATGAAGTAAATCAGATCGTGACAACCAATGTGCGTCTGAAA
CAGCAATGGGTGGATTACAACCTAAAATGGAATCCAGATGACTATGGCGGTGTG
AAAAAATTCACATTCCTTCAGAAAAGATCTGGCGCCAGACCTTGTTCTCTATA
ACAATGCAGATGGTGAATTTGCTATTGTCAAGTTCACCAAAGTGCTCCTGCAGTA
CACTGGCCACATCACGTGGACACCTCCAGCCATCTTTAAAAGCTACTGTGAGATC
ATCGTCACCCACTTTCCCTTTGATGAACAGAACTGCAGCATGAAGCTGGGCACCT
GGACCTACGACGGCTCTGTCGTGGCCATCAACCCGGAAAGCGACCAGCCAGACC
TGAGCAACTTCATGGAGAGCGGGGAGTGGGTGATCAAGGAGTCCCGTGGCTGGA
AACATAGCGTGACCTATAGCTGCTGCCCGGATACCCCGTATCTGGATATTACCTA
TCATTTTCGTGATGCAGTAACTGAATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGT
GAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTG

Anhang

TAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCA
CTGCCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCC
AACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCAC
TGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAG
GCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGA
GCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTT
TTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGA
GGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCT
CCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTT
CTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAAAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTC
GGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCC
GACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACG
ACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGT
AGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGA
ACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTG
GTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGC
AAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTT
CTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTAAAGGGATTTTGGTCAT
GAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTT
AAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAA
TCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGA
CTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTG
CTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAA
CCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCC
ATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATA
GTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTT
GGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCC
CCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAG
TAAGTTGGCCGACAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTA
CTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCA
TTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGG
ATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTT
TTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAA
CCCCTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCCAGCGTTTCTGG

Anhang

GTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACAC
GGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAG
GGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAA
TAGGGGTTCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCAT
TATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC

Anhang

Sequenz MBP-Gel-AChR:

TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGAC
GGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGC
GTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAG
ATTGTAAGTGCAGAGTGCACCATATGGGCCTGGATACCGTGAGCTTCAGCACCAAAG
GCGCCACCTATATTACCTATGTGAACTTCTGAACGAACTGCGTGTGAAACTGAA
ACCGGAAGGCAACAGCCATGGCATTCCGCTGCTGCGTAAAAAATGCGATGATCC
GGGCAAATGCTTCGTGCTGGTGGCGCTGAGCAACGATAACGGCCAGCTAGCGGA
AATTGCGATTGATGTGACCAGCGTGTATGTGGTGGGCTATCAGGTGCGTAACCGT
AGCTATTTCTTCAAAGATGCGCCGGATGCGGGCGTATGAAGGCCTGTTCAAAAACA
CCATTAACCCGTCTGCATTTCCGGCGGCAGCTATCCGAGTCTAGAAGGCGAAAA
AGCGTATCGTGAAACCACCGATCTGGGCATTGAACCGCTGCGTATTGGCATTAAA
AACTGGATGAAAACGCGATTGATAACTATAAACCGACCGAAATTGCGAGCAGC
CTGCTGGTGGTGAATTCAGATGGTGAAGCGGCGGTTTCACCTTCATTGAAA
ACCAGATTCGTAACAACCTCCAGCAGCGGATCCGTCCGGCGAACAACACCATTAG
CCTGGAAAACAAATGGGGCAAGCTGAGCTTCCAGATTCGTACCAGCGGCGCGAA
CGGCATGTTCAAGCGAAGCGGTGGAGCTCGAACGTGCGAACGGCAAAAAATATTA
TGTGACCGCGGTTGATCAGGTGAAACCGAAAATTGCGCTGCTGAAATTCGTGAC
AAAGATCCGAAATATAAGATTTCCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCATGCCTGCAGG
TCGAGACCCGTCTGGTGGCAAAGCTATTTAAAGACTACAGCAGCGTGGTGGCGCC
AGTGGAAAGACCACCGCCAGGTCGTGGAGGTCACCGTGGGCCTGCAGCTGATACA
GCTCATCAATGTGGATGAAGTAAATCAGATCGTGACAACCAATGTGCGTCTGAAA
CAGCAATGGGTGGATTACAACCTAAAATGGAATCCAGATGACTATGGCGGTGTG
AAAAAATTCACATTCCTTCAGAAAAGATCTGGCGCCAGACCTTGTCTCTATA
ACAATGCAGATGGTGAATTTGCTATTGTCAAGTTCACCAAAGTGCTCCTGCAGTA
CACTGGCCACATCACGTGGACACCTCCAGCCATCTTTAAAAGCTACTGTGAGATC
ATCGTCACCCACTTTCCCTTTGATGAACAGAACTGCAGCATGAAGCTGGGCACCT
GGACCTACGACGGCTCTGTCGTGGCCATCAACCCGGAAAGCGACCAGCCAGACC
TGAGCAACTTCATGGAGAGCGGGGAGTGGGTGATCAAGGAGTCCCGTGGCTGGA
AACATAGCGTGACCTATAGCTGCTGCCCGGATACCCCGTATCTGGATATTACCTA
TCATTTGCGTATGCAGTAACTGAATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGT
GAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTG
TAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCA

Anhang

CTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCC
AACGCGCGGGGAGAGGGCGGTTTGGCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCAC
TGA CT CGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAG
GCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGA
GCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTT
TTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGA
GGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCT
CCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTT
CTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAAAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTC
GGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCC
GACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACG
ACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGT
AGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGA
ACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTG
GTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGC
AAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTT
CTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTAAAGGGATTTTGGTCAT
GAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTT
AAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAA
TCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGA
CTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTG
CTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAA
CCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCC
ATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATA
GTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTT
GGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCC
CCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAG
TAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTA
CTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCA
TTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGG
ATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTT
TTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAA
CCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGG
GTGAGCAAAAACAGGAAGGCCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACAC

Anhang

GGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAG
GGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAA
TAGGGGTTCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCAT
TATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC

Danksagung

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

- Herrn Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer möchte ich für die freundliche Überlassung des hochinteressanten Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes danken.
- Herrn Junior Prof. Dr. Sandro Keller danke ich für die Bereitstellung eines DLS-Geräts.
- Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Dennis Keith (Cubist Pharmaceuticals Inc.) für die Initiierung der Kooperation, die dieser Arbeit zugrunde liegt.
- Großer Dank gilt Frau Prof. Dr. Ziegler und Dr. Christine Müller, die mir freundlicherweise ein Rasterkraftmikroskop bereitgestellt haben und die Durchführung der Experimente unterstützt haben.
- Mein besonderer Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. Büdel für die Möglichkeit meine Messungen am Elektronenmikroskop durchzuführen.
- Herrn Prof. Dr. Niedner-Schatteburg danke ich für die Überlassung zur Nutzung der Massenspektrometer.
- Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Hideg von der Universität Pecs für die Überlassung verschiedener Spinsonden
- Bei Prof. Dr. Zhou-Yu Li bedanke ich mich für die Bereitstellung des Plasmid pmalAChR.
- Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Reinhard Philipp für seine Unterstützung.
- Meinen Laborkollegen Dr. Stefan Hauck und Christian Kopp bedanke ich mich für die gemeinsame Zeit.
- Mein Dank geht ebenso an die Mitglieder der Verwaltung des Fachbereichs, insbesondere Frau Carolin Fluck.
- Dr. Martin Hossann und Dr. Nicole Bach möchte ich für die fachliche Unterstützung in Diskussionen während der gesamten Forschungszeit danken.
- Den Diplomanden Dr. Jessica Becker, Nadine Schwan, Thérèse Albert, Anna Weyrauch und Aline Werner danke ich für die Unterstützung während ihrer Diplomarbeit.
- Den Forschungspraktikanten Dr. Tina Horbach, Dr. Sebastian Soukoup, Elena Faitschuk, Beate Wollinsky, Sonja Matheis, Willon Kan, Nicole Kiweler, Sonja Adler, Ann-Kathrin Fischer, Mike Müller, Thierry Gakombe, Angela Osei-Kuffour, Ina Haimann und Aline Werner danke ich ebenfalls für ihre Unterstützung.
- Frau Elke Litmianski und Frau Doreen Knochenhauer danke ich für ihre kompetente Unterstützung.

Danksagung

- Ich möchte mich weiterhin bei allen bedanken, die mir bei der Arbeit regelmäßig mit Rat und Tat zur Seite standen, insbesondere Michael Hermann, Manfred und Silke Theison.

Diese Arbeit enthält Teile der im Rahmen der Dissertation betreuten Diplomarbeit von Frau Dr. Jessica Becker geb. Abrossinow, sowie der Staatsexamensarbeit von Frau StRin Nadine Schwan.

Nicht in dieser Arbeit erwähnt sind die in Teilen betreuten Doktorarbeiten von Herrn Dr Mohamed Badr und Herrn Dr. Mohammed Chakour.

Nicht Teil dieser Arbeit sind die betreuten Diplomarbeiten von Frau Dr. Nina Forler, Herrn Dipl-biophys Jörg Reichenwallner, Frau Dipl-chem Anna Weyrauch, Herrn Dipl-biophys Benjamin Selmke, Frau Dipl-chem. Therese Albert geb. Pambe, Frau Dipl-chem. Angela Ousei-Kouffour und Frau Dipl-chem. Aline Werner.

Ebenfalls nicht in der Arbeit erwähnt ist der Forschungsaufenthalt von Frau Prof. Dr. Irina Dragutan.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass diese Dissertation von mir selbstständig angefertigt wurde und alle von mir genutzten Hilfsmittel angegeben wurden.

Ich erkläre, dass die wörtlichen oder dem Sinne nach anderen Veröffentlichungen entnommenen Stellen von mir kenntlich gemacht wurden.

Datum

Unterschrift

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner weiteren Doktorprüfung unterzogen habe. Ich habe die Dissertation in der gegenwärtigen oder einer anderen Fassung an keiner anderen Fakultät eingereicht.

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Lebenslauf

Persönliche Daten

Sandra Theison

Schulische Ausbildung

1991- 2000 Christian von Mannlich Gymnasium Homburg
Abitur

Studium

10/2000 – 03/2007 Diplom Chemie Studium an der Technischen Universität
Kaiserslautern

04/2004 – 07/2004 Auslandssemester an der Universität Lille (Frankreich)

seit 04/2007 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl von Prof. Dr. W. E.
Trommer

Thema der Disseration: Versuche zur Antibiotikawirkung von
Daptomycin und der Immunsuppression bei Myastheinia gravis

Praktika

07/1999 Praktikum im Bereich Qualitätssicherung der Knoll-AG

12/2004 – 01/2005 Praktikum zur Etablierung eines Bead-Systems an einem
Luminexspektrometer bei der Merck AG

Lebenslauf

Mitgliedschaften

Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie

Gesellschaft Deutscher Chemiker

Tagungsbeiträge

Eigene Vorträge

2012 Molecular Membrane Biophysics

Towards the mechanism of Daptomycin- an EPR, EM and AFM approach

2012 Rocky Mountain Conference on Analytical Chemistry

Towards the mechanism of Daptomycin- an EPR, EM and AFM approach

Poster

2009 EPR Summer School

EPR Studies of Daptomycin by means of Spinlabels

2011 HIPS Symposium

EPR Studies of Daptomycin by means of Spinlabels

2011 SPIN Conference

EPR Studies of Daptomycin by means of Spinlabels

2011 SPIN Conference

Maltose Binding Protein is partially Structured in its Molten Globule State

2011 BSRT PhD Symposium

Antigen-Gelonin Fusion Protein for the treatment of Myasthenia gravis

Lebenslauf

2012 Senior Experten Chemie Tagung

Towards the mechanism of Daptomycin- an EPR, EM and AFM approach

2012 Senior Experten Chemie Tagung

Antigen-Gelonin Fusion Protein for the treatment of Myasthenia gravis

2013 GBM Frühjahrstagung

Towards the mechanism of Daptomycin- an EPR, EM and AFM approach

2013 GBM Frühjahrstagung

Investigations on the mechanism of Daptomycin with L-forms

2013 HIPS Symposium

Towards the mechanism of Daptomycin- an EPR, EM and AFM approach

2013 HIPS Symposium

Investigations on the mechanism of Daptomycin with L-forms

2014 Molecular Membrane Biophysics

Towards the mechanism of Daptomycin- an EPR, EM and AFM approach

Investigations on the mechanism of Daptomycin using AFM and ITC

Lebenslauf

Veröffentlichungen

M. Badr, C. Kopp, S. Theison, J. Meyer and W. E. Trommer

Methotrexate-gelonin conjugate – an inhibitor of MCF-7 cells expressing the dihydrofolate receptor

Biological Chemistry, 395, 12, Dezember 2014

S. Theison, T. Albert, C. Müller, S. Unger, J. Klingler, D. Wolf, K. Hideg, T. Mascher, S. Keller, C. Ziegler and W. E. Trommer

Towards the mechanism of Daptomycin- a biophysical approach

in Vorbereitung

