



Etablierung FRET-basierter Biosensoren zur
quantitativen Detektion von Sauerstoff in
Escherichia coli

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Diplom-Biologe
Janko Potzkei

aus Wuppertal

Düsseldorf 2012

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger

Korreferentin: Prof. Dr. Martina Pohl

Tag der mündlichen Prüfung: 11.01.2013



Veröffentlichungen während der Promotion

Potzkei, J., Kunze, M., Drepper, T., Gensch, T., Jaeger, K.-E., Büchs, J. **(2012)**. Real-time determination of intracellular oxygen in bacteria using a genetically encoded FRET-based biosensor. *BMC biology* 10, 28.

Potzkei, J., Rupprecht, C., Gensch, T., Endres, S., Pohl, M., Jaeger, K.-E., Drepper, T. **(2013)** A novel FbFP-based biosensor for sensitive determination of intra- and extracellular pH. *In Vorbereitung*

Patentanmeldungen

Circolone F., Drepper T., Endres S. Heck A., Jaeger, K.-E., Potzkei J. **(2010)** Neue Biosensoren und deren Verwendung. Patent Nummer: **DE 10 2010 037 001**

Drepper T., Endres S., Jaeger, K.-E., Potzkei J. **(2010)**. LOV-Domänen Protein zur photosensiblen Desfunktionalisierung. Patent Nummer: **DE 10 2010 036 997**

Drepper T., Jaeger, K.-E., Potzkei J. **(2011)**. Verwendung von FMN-bindenden Fluoreszenzproteinen (FbFP) als neuartige Sekretionsmarker. Patent Nummer: **DE 102011052443.6**

Posterpräsentationen auf internationalen Tagungen

Heck, A., Circolone, F., Potzkei, J., Svensson, V., Jaeger, K.-E., Drepper, T. **(2008)**: A novel strategy for the high-level expression of heterologous membrane proteins. *Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)*, Frankfurt am Main.

Potzkei, J., Kunze, M., Endres, S., Heck, A., Büchs, J., Jaeger, K.-E., Drepper, T. **(2011)** A novel genetically encoded FRET biosensor for quantitative detection of oxygen in living cells. *Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)*, Karlsruhe.

Wingen, M., Potzkei, J., Hausmann, S., Drepper, T., Jaeger K.-E. **(2012)** Enhanced FMN-binding fluorescent proteins. *Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)*, Tübingen

Endres S., Walter J., Potzkei J., Heck A., Jaeger K.-E., Drepper, T. **(2012)** BlueTox: A LOV-domain dependent genetically encoded photosensitizer. *Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)*, Tübingen

Ich danke Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger für die Überlassung des interessanten wissenschaftlichen Themas, der Bereitstellung des Arbeitsplatzes und sein großes Interesse an dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. Martina Pohl danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats und der tollen Zusammenarbeit während der Kooperation.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thomas Drepper für die engagierte und freundliche Betreuung, für die anregenden Diskussionen während des Schreibens der Publikation und die vielen Aufmunterungen während meiner Doktorarbeit. Aber auch für die tolle, immer motivierende Leitung unserer Arbeitsgruppe.

Bei Herrn Dr. Achim Heck bedanke ich mich für die zahlreichen Ratschläge, nützlichen Hilfestellungen und endlosen Diskussionen zu fachlichen und vor allem zu fachfremden Themen.

Prof. Dr. Jochen Büchs, Dr. Thomas Gensch, Martin Kunze und Dr. Roland Moussa danke ich für die tolle Zusammenarbeit und guten Diskussionen während der Kooperationsarbeit.

Meinem Masterstudenten Christian Rupprecht danke ich für die tolle Arbeit und die Hilfe während seiner Zeit der Masterarbeit, aber auch für die Zeit darüber hinaus.

Den Mitgliedern meiner Fahrgemeinschaft (Nuschi, Rike, Stephan und Chris) danke ich dafür, dass das Fahren nach Jülich nie langweilig wurde.

Allgemein geht ein großer Dank an alle Kollegen meines Labors/ Büros und der ganzen AG Drepper für das (grinsende) Beistehen bei mathematischen Fragestellungen und für die vielen tollen Stunden in den vergangenen Jahren.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des IMET für die tolle Arbeitsatmosphäre.

Mein ganz besonderer Dank geht an die Familie Joel für ihre Unterstützung und ihrem großen Zuspruch während der Doktorarbeit.

Ich danke meinem Vater, dass er mir immer alle Entscheidungsfreiheiten gelassen hat und mich immer unterstützt hat.

Der größte Dank jedoch geht an meine Frau Sarah für die tolle Unterstützung und das lange Durchhalten bei der letzten Phase meiner Doktorarbeit.

Last but not least danke ich natürlich all meinen Freunden für die tolle Unterstützung und dem Zuspruch.

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
1	Die Bedeutung von Sauerstoff in lebenden Systemen.....	1
1.1	Biosensoren	2
1.2	Fluoreszenz	2
1.2.1	Der Mechanismus des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET)	4
1.3	Fluorophore - Anwendungsmöglichkeiten als Fluoreszenzreporter und FRET-basierte Biosensoren	4
1.3.1	Fluoreszenzreporter	5
1.3.2	FRET-Systeme als Biosensoren und deren Anwendungen.....	9
1.4	Zielsetzung.....	12
II.	Material und Methoden.....	13
2.1	Bakterienstämme	13
2.1.1	<i>Escherichia coli</i> Stämme	13
2.2	Vektoren und rekombinante Plasmide	13
2.2.1	Vektoren	13
2.2.2	Rekombinante Plasmide.....	14
2.3	Oligonukleotide und Sequenzierung	15
2.3.1	Verwendete Oligonukleotide	15
2.3.2	Als Primer verwendete Oligonukleotide:	15
2.3.3	Sequenzierungen	16
2.4	Nährmedien und Zusätze	16
2.4.1	Nährmedien.....	16
2.4.2	Antibiotika	16
2.4.3	Enzyme.....	17
2.4.4	Verwendete Chemikalien	17
2.4.5	Verwendete Antiseren.....	18
2.4.6	Puffer und Lösungen.....	18
2.5	Reaktions- und Nachweis-„Kits“	22
2.6	Sonstige Materialien und Geräte	22
2.7	Mikrobiologische Methoden	23
2.7.1	Anzucht von <i>E. coli</i>	23
2.7.2	Induzierte Genexpression in <i>E. coli</i>	23
2.7.3	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA.....	23
2.8	DNA-Techniken	24

2.8.1	Präparation von Plasmid-DNA.....	24
2.8.2	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	24
2.8.3	<i>In vitro</i> Rekombination von DNA.....	25
2.8.4	Agarosegelelektrophorese (Sambrook and Gething, 1989).....	25
2.8.5	Elution von DNA aus Agarosegelen (Vogelstein and Gillespie, 1979).....	26
2.8.6	Ligation von DNA-Fragmenten	26
2.8.7	Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis and Faloona, 1987)	26
2.9	Proteintechniken	27
2.9.1	Gesamtproteinisolierung aus <i>E. coli</i>	27
2.9.2	Fraktionierung von <i>E. coli</i> -Zellen (modifiziert nach (Witholt et al., 1976a)).....	28
2.9.3	Proteinreinigung mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) modifiziert nach (Belew et al., 1987).....	29
2.9.4	TCA-Proteinfällung.....	29
2.9.5	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)	29
2.9.6	Coomassie-Färbung zur Proteindetektion (Merril, 1990)	30
2.9.7	Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen / Western Blot (Triplett, 1989).....	30
2.9.8	Immunodetektion von Proteinen.....	31
2.9.9	Amidoschwarz-Färbung von Proteinen auf einer PVDF-Membran (Geyer, 1960)	31
2.10	Optische Methoden.....	31
2.10.1	Fluoreszenzanalyse unter Blaulicht ($\lambda = 365 \text{ nm}$).....	31
2.10.2	Photometrische Fluoreszenzemissionsmessung.....	31
2.10.3	Thrombinprotease Spaltung (Morita et al., 1986)	34
2.10.4	Bestimmung der Quantenausbeute (Schwartz, 1972).....	34
2.10.5	Messung der Fluoreszenzlebensdauer	34
2.10.6	FLIM	36
2.11	Computerprogramme und Datenbanken.....	36
III.	Ergebnisse	37
3.1	Eignung des EcFbFP als YFP-Fusionspartner in FRET-Biosensoren.....	37
3.2	Herstellung eines neuartigen genetisch kodierten FRET-Biosensors zur Detektion von Sauerstoff	39
3.3	<i>In vitro</i> Charakterisierung des EcFbFP als potentielle FRET-Donordomäne	40
3.3.1	<i>In vitro</i> Charakterisierung des potentiellen FRET-Akzeptors YFP.....	41
3.4	Erzeugung eines FbFP-basierenden Biosensors zur quantitativen Detektion von Glukose.....	45
3.5	Konstruktion einer FbFP-YFP FRET-Fusion als Sauerstoff- bzw. pH-Sensor	49

3.6	<i>In vitro</i> Charakterisierung der FbFP-YFP-Fusion.....	50
3.6.1	Spektrale Analyse der FbFP-YFP-Fusion	51
3.6.2	Nachweis der FRET-Kopplung durch proteolytische Spaltung.....	56
3.6.3	Fluoreszenzlebendauermessung.....	58
3.7	<i>In vivo</i> Charakterisierung der FbFP-YFP FRET-Fusion.....	62
3.7.1	Spektrale Analyse der FbFP-YFP FRET-Fusion <i>in vivo</i>	62
3.7.2	<i>Fluorescence Lifetime Imaging Measurement</i> (FLIM)	64
3.8	Charakterisierung der FbFP-YFP-Fusionsproteine als Biosensoren	68
3.8.1	Einsatz der FbFP-YFP FRET-Fusion als O ₂ -Biosensor.....	68
3.8.2	Anwendung des O ₂ -Biosensors FluBO in Wachstumsexperimenten in <i>E.coli</i>	70
3.8.3	Bestimmung des FRET-Verhältnisses von FluBO	73
3.8.4	<i>In vivo</i> Kalibrierung des Sauerstoffbiosensors FluBO in <i>E.coli</i> -Zellen.....	76
3.9	Einsatz des FluBO-Fusionsproteins als pH-Biosensor.....	84
3.9.1	<i>In vivo</i> Anwendung des FluBpH 5.6	88
IV.	Diskussion	92
4.1	Austausch der FRET-Donordomäne CFP durch das EcFbFP	93
4.1.1	Verifizierung der Fluoreszenzeigenschaften des FRET-Akzeptors YFP.....	93
4.2	Erzeugung von FRET-Systemen aus zwei Biosensordesigns.....	94
4.3	Einsatz des FluBO als O ₂ -Biosensor	95
4.3.1	Optimierung von fermentativen Prozessen	96
4.3.2	Anwendungsbereiche in der Grundlagenforschung	97
4.4	Limitationen des Sauerstoffbiosensors FluBO	99
V.	Zusammenfassung	101
VI.	Summary	103
VII.	Literaturverzeichnis	105
VIII.	Anhang	116

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Strahlenübergänge von Elektronen	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der autokatalytischen Bildung des Chromophors von GFP modifiziert nach (Zimmer, 2002).	6
Abbildung 3: 3D Kristallstruktur der YtvA LOV-Domäne aus <i>B. subtilis</i> (Möglich and Moffat, 2007).	8
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines durch pH direkt beeinflusstes FRET-System. ...	10
Abbildung 5: Schema einer Liganden-induzierten Konformationsänderung der FRET- Domänen, modifiziert nach (Frommer et al., 2009).	11
Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines FRET-basierten Metabolit-Biosensors, modifiziert nach (Frommer et al., 2009).	38
Abbildung 7: Schematischer Aufbau und prinzipielle Funktion eines FbFP-basierten Sauerstoffsensors.	39
Abbildung 8: Absorptions- und Fluoreszenzspektren der unfusionierten FRET-Domänen EcFbFP und YFP.	41
Abbildung 9: Fluoreszenzspektren des EcFbFP und des Riboflavins zur Quantenausbeute- Bestimmung.	43
Abbildung 10: Fluoreszenzspektren des YFP und des Fluoresceins zur Quantenausbeute- Bestimmung.	44
Abbildung 11: Klonierungsstrategie zur Erzeugung des FbFP-basierten Glukose-Biosensors.	46
Abbildung 12: Schematischer Aufbau des FRET-Biosensorkonstruktes FbFP-mglb-Citrine.	47
Abbildung 13: Fluoreszenzspektrum der FbFP-mglb-Citrine FRET-Fusion (nach Doktorarbeit Moussa 2012).	48
Abbildung 14: Klonierungsstrategie zur Erzeugung des FbFP-basierten Biosensors.	49
Abbildung 15: Schematischer Aufbau des FRET-Biosensorkonstruktes FbFP-YFP.	50
Abbildung 16: <i>In vitro</i> Absorptionsspektren der Fluoreszenzproteine EcFbFP und EYFP sowie des Fusionsproteins YFP-FbFP.	52
Abbildung 17: <i>In vitro</i> Fluoreszenzspektren der Fluoreszenzproteine EcFbFP und EYFP sowie des Fusionsproteins YFP-FbFP.	54
Abbildung 18: Zweidimensionaler Anregungs- und Emissionswellenlängenscan des EcFbFP und EYFP.	55
Abbildung 19: Überprüfung des intramolekularen FRET-Ereignisses der FbFP-YFP-Fusion. ...	57
Abbildung 20: <i>In vitro</i> Lebensdauerermessung von FbFP-YFP.	59
Abbildung 21: <i>In vitro</i> Lebensdauerermessung von EcFbFP.	60
Abbildung 22: <i>In vivo</i> Fluoreszenzspektren des FRET-Systems FbFP-YFP.	63
Abbildung 23: FLIM-Bilder von EcFbFP und FbFP-YFP exprimierenden <i>E. coli</i> -Zellen.	65
Abbildung 24: Analyse der FbFP-Fluoreszenzlebensdauer mittels FLIM-Messungen in <i>E.coli</i> - Zellen.	66
Abbildung 25: Qualitative Analyse des Sauerstoffsensors FbFP-YFP in lebenden <i>E.coli</i> -Zellen.	69
Abbildung 26: Bestimmung der intrazellulären Sauerstoffkonzentration in einer <i>E.coli</i> - Batchkultur im BioLector.	72

Abbildung 27: FRET-basierte Bestimmung der intrazellulären Sauerstoffkonzentration in einer <i>E.coli</i> -Batchkultur mithilfe des FluBO-Biosensors.	75
Abbildung 28: Analyse der zelleigenen Hintergrundfluoreszenz (Leervektorkontrolle) während der Batch-Kultivierung von <i>E. coli</i> im BioLector.	76
Abbildung 29: Fluoreszenzverhältnisse (Em_{YFP}/Em_{EcFbFP}) des FluBO während des Versuches zur quantitativen Sauerstoffbestimmung.....	78
Abbildung 30: Kalibrierung des FluBO für die quantitative Bestimmung von intrazellulärem Sauerstoff.....	80
Abbildung 31: FluBO-Kalibrierungsgerade zur ratiometrischen Bestimmung von intrazellulärem Sauerstoff.....	82
Abbildung 32: Fluoreszenzemission des YFP in Abhängigkeit des pH-Wertes.....	84
Abbildung 33: pH-Titrationskurze zur Bestimmung des pKa-Werts von YFP.....	85
Abbildung 34: Fluoreszenzemission des EcFbFP, in Abhängigkeit des pH-Wertes.....	86
Abbildung 35: <i>In vitro</i> pH-Titration des Biosensors FluBO.....	87
Abbildung 36: <i>In vitro</i> pH-Titration des Biosensors FluBpH 5.6.....	89
Abbildung 37: <i>In vivo</i> -Analyse der Wirkungsweise von Nigericin mithilfe des pH-Biosensors FluBpH 5.6.....	90
Abbildung 38: Neuronale transgene Expression unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen (aus Walter et al, 2012).	98

Tabelle 1: Genotypen der verwendeten <i>E.coli</i> -Stämme. (Nomenklatur nach Bachmann, 1990)	13
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Vektoren mit weitem Wirtsbereich.....	13
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide	14
Tabelle 4: Als Primer verwendete Oligonukleotide:	15
Tabelle 5: Verwendete Antibiotika mit der für die jeweilige Anzucht von <i>R. capsulatus</i> und <i>E. coli</i> empfohlenen Konzentrationsangabe.....	16
Tabelle 6: Liste der verwendeten Chemikalien	17

Abkürzungen

° C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Ampere
A. dest	Aqua destillata, destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DOT	<i>dissolved oxygen tension</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Em	Emission
EPG	Eppendorfgefäß
Ex.	Excitation, Anregung
FMN	Flavinmononukleotid
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
G	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
H	Stunde(n)
ICM	Intracytoplasmatische Membran
IMET	Institut für Molekulare Enzymtechnologie
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
L	Liter
LB	Luria-Bertani Broth
LOV	Light Oxygen Voltage
M	mol/Liter
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol/Liter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N-terminus	Amino-Terminus
o.D.580	optische Dichte bei 580 nm
o.D.660	optische Dichte bei 660 nm

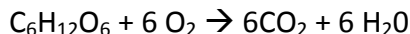
PCR	Polymerasekettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Round per minute</i> , Umdrehung pro Minute
s	Sekunde(n)
s.o.	siehe oben
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ss.	Signalsequenz
Tab.	Tabelle
Tc	Tetracyclin
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Enzymeinheit
ÜK	Übernachtkultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chlor-3- Indolyl- β -D-Galactopyranosid
YFP	Gelb Fluoreszierendes Protein
λ	Wellenlänge

I. Einleitung

1 Die Bedeutung von Sauerstoff in lebenden Systemen

Sauerstoff ist in lebenden Organismen an zahlreichen Reaktionswegen beteiligt, ist wichtiger Bestandteil in vielen chemischen Verbindungen und an allen Verbrennungsprozessen beteiligt.

Die Bedeutung des molekularen Sauerstoffes wird daran deutlich, dass aerobe Organismen, beispielsweise Eukaryoten, wie der Mensch und die Pflanzen sowie viele Bakterien, diesen Metaboliten zum Leben benötigen. So brauchen Eukaryoten beispielsweise molekularen Sauerstoff zur Energiegewinnung durch Oxidation in den Mitochondrien. Bei diesem zentralen Stoffwechselprozess wird Sauerstoff dabei in der Atmungskette wieder zu Wasser reduziert. Hierbei werden organische Verbindungen (Kohlenhydrate, Fettsäuren) oxidiert und in der Regel nach Durchlaufen der Atmungskette auf den terminalen Elektronenakzeptor übertragen. Der Sauerstoff wird hier also genutzt, um Energie in Form von ATP (Adenosintriphosphat) herstellen zu können, welches von der jeweiligen Zelle weiterverwendet wird (Wehner, 2007) (Berg, 2003). Die Summengleichung der aeroben Atmung ist hierbei bei Verwendung von Glukose durch Zellen:



Da molekularer Sauerstoff sehr reaktiv ist, kann dieser allerdings auch negative Auswirkungen auf Zellen bzw. Zellstrukturen haben, wenn diese keine Enzyme zum Schutz vor dem reaktiven Sauerstoff besitzen, wie beispielsweise die Katalase oder die Peroxidase (Baker et al., 2000; Kobayashi et al., 1987). Es können sich als Abbauprodukt des Sauerstoffes in Zellen reaktive Sauerstoffspezies wie zum Beispiel freie Radikale bilden, die sehr schnell biologische Strukturen oder Gewebe zerstören können (Halliwell, 1999). Diese werden beispielsweise für die Förderung von Alterungsprozessen verantwortlich gemacht (Berg, 2003).

Sauerstofflimitationen können in aeroben Organismen erheblichen Schaden hervorrufen bzw. eine erhebliche Einschränkung im aeroben Wachstum bedeuten. In der Biotechnologie, der Biomedizin und in der Grundlagenforschung besteht ebenfalls ein großes Interesse an der Detektion von Sauerstoff und möglichen Sauerstofflimitationen bzw. mikroaeroben Bereichen. Diese Detektion spielt bei dem Verständnis von sauerstofflimitierenden Prozessen, beispielsweise in hypoxischen Geweben, eine große Rolle (Lin and Yun, 2010; Lu and Kang, 2010) .

1.1 Biosensoren

Als Biosensoren definiert man im Allgemeinen integrierte Messsysteme, bei denen biologische Erkennungsstrukturen in Wechselwirkung mit geeigneten Analyten stehen. Hierbei wird durch den Biosensor ein physiochemisches Signal erzeugt, welches durch einen sich in sterischer Nähe befindlichen Transduktor in auswertbare Messwerte umgewandelt werden kann. Solche Biosensoren finden eine breite Anwendung in der klinischen Diagnostik, der Umweltanalytik, der Lebensmittelanalytik, in der Prozesskontrolle und in der Grundlagenforschung (Borisov and Wolfbeis, 2008).

Mithilfe solcher Biosensoren können Metall-Ionen (Chakraborty and Basak, 2008), verschiedene Zucker wie zum Beispiel Glucose (Pickup et al., 2005), Nukleinsäuren oder auch definierte chemische Verbindungen durch verschiedene Interaktionen detektiert werden. Darüber hinaus können Biosensoren dazu beitragen, biologische Vorgänge, wie zum Beispiel posttranslationale Modifikationen, Protein-Protein Interaktionen oder Enzymaktivitäten aufzudecken. Weiterhin ist eine Detektion von physikalisch-chemischen Zellparameter wie der pH-Wert oder die Konzentration bestimmter Ionen wie z.B. Chlorid-Ionen (Esposito et al., 2008) (Markova et al., 2008) in lebenden Organismen möglich zu analysieren. Abhängig von dem zu detektierenden Signal und dem Transduktor ist eine Detektion über mehrere Wege durchführbar. So können Biosensoren die Detektion optischer, elektrischer, elektrochemischer, thermischer, oder magnetischer Signale ermöglichen.

Im Gegensatz zu den physikalischen oder chemischen Biosensoren, welche meistens eine künstliche Komponente, wie elektronische Bauelemente, beinhalten, bestehen biologische Biosensoren aus Biomakromolekülen wie Nukleinsäuren (DNA/ RNA) oder Proteinen, wobei Proteine sehr gut als Biosensoren geeignet sind, da sie verschiedenste Moleküle in Zellen hochspezifisch erkennen und mit einer hohen Affinität binden können (Sud and Mycek, 2009). In diesem Zusammenhang können fluoreszierenden Proteinen vielseitig eingesetzt werden, um ein Signal effizient mittels hoch spezifischer und sensativer Proteininteraktion nicht-invasiv zu detektieren. Hierbei misst man die Fluoreszenzemission eines Fluorophors nach Anregung und Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge mithilfe eines Fluoreszenzdetektors, wie beispielsweise eines Fluoreszenzphotometers (Wang et al., 2008). Um auch geringe Schwankungen z.B. bei zellspezifischen Signalen, Metaboliten bzw. Proteinen exakt auflösen und detektieren zu können, wurden Biosensoren entwickelt bei denen ein *Förster resonance energy transfer* (FRET)-System zugrunde liegt (Sun et al., 2011) (Förster, 1948). Da die photophysikalischen Prozesse im Verlauf dieser Arbeit eine zentrale Rolle spielen, sollen die grundsätzlichen Zusammenhänge im Folgenden erläutert werden.

1.2 Fluoreszenz

Die Strahlungsemission von Fluorophoren nach der Absorption von elektromagnetischen Wellen (Licht) bezeichnet man als Lumineszenz. Dabei wird zwischen Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterschieden. Phosphoreszenz ist der Übergang vom angeregten Triplett-

in den Singulettgrundzustand unter Aussendung eines Photons. Diese Prozesse sind in Abb. 1 schematisch in einem Jablonski-Diagramm zusammenfassend dargestellt. Dabei wechselt der Chromophor durch Absorption (a) eines Photons u.a. vom elektronischen Grundzustand S_0 in einen angeregten Zustand S_n . Durch thermische Umverteilung (interne Konversion unter Energieerhalt) und Schwingungsrelaxation (b) wird Überschussenergie als thermische Energie abgegeben bis zum Erreichen des ersten angeregten Singulettzustands (S_1) als elektronischen Grundzustand. Dieser kann mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Fluoreszenz (f) unter Abgabe eines Photons oder strahlungslos durch *intersystem crossing* (ISC) (c) in den Triplettzustand (T_1) verlassen werden (Lakowicz, 2006). Nach der Kasha-Regel erfolgt die Emission vom angeregten Zustand geringster Energie. Durch Phosphoreszenz (p) erfolgt die Rückkehr unter Abgabe eines Photons (p) in den elektronischen Grundzustand. Alle Energieniveaus können auch durch strahlungslose Desaktivierung (d) verlassen werden (Wöhrle, 1998).

Phosphoreszenz lässt sich hierbei noch mehrere Millisekunden lang auf Grund der geringen Übergangswahrscheinlichkeit der Elektronen zurück in den Singulettgrundzustand nachweisen. Der als Fluoreszenz bezeichnete Übergang vom angeregten Singulettzustand in den Singulettgrundzustand läuft im Allgemeinen sehr schnell ab, so dass die Fluoreszenz nahezu zeitgleich mit dem Bestrahlungsende (innerhalb von ns bis μ s) erlischt. Das Abklingverhalten kann allerdings genauer untersucht werden und liefert die Fluoreszenzlebenszeit. Diese hängt von verschiedenen physikalischen und chemischen Parametern (wie z. B. der Temperatur, dem pH-Wert oder der Ionenkonzentrationen) ab. Demzufolge können Änderungen in der Fluoreszenzlebenszeit Informationen über Änderungen der lokalen Umgebung liefern.

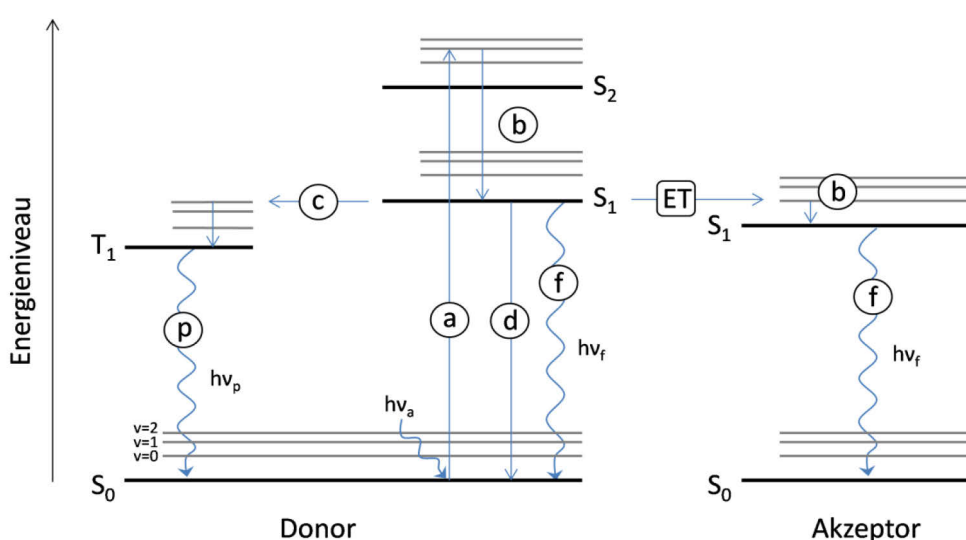


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Strahlenübergänge von Elektronen

Das Jablonski Diagramm veranschaulicht die Strahlungsübergänge von Elektronen in verschiedene Anregungsübergänge bei Anregung von Molekülen mit Licht. Hierbei ist (a) Absorption; (b) vibronische Relaxation; (f) Fluoreszenz; (c) *Intersystem crossing*; (p) Phosphoreszenz; (d) strahlungslose Desaktivierung; (ET)

strahlungsloser Energietransfer (ET); (S_0) Singulettgrundzustand; (S_1) erster elektronisch angeregter Singulettzustand; (S_2) zweiter elektronisch angeregter Singulettzustand; (T_1) Triplettzustand

1.2.1 Der Mechanismus des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET)

FRET ist ein physikalischer Prozess der strahlungsfreien Energieübertragung eines angeregten Donor-Fluorophors auf ein Akzeptorfluorophor über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (Förster, 1948). Bei FRET erfolgt der Übergang vom angeregten Singulett- in den Grundzustand mit Energieübertrag auf einen Akzeptor strahlungslos (ET). Dieser kann wiederum vom angeregten Singulettzustand fluoreszieren (e). FRET kann somit sowohl über die Abnahme der Donor-Fluoreszenz (f) als auch die Zunahme der Akzeptorfluoreszenz (e) detektiert werden. Da die Intensität der Übertragung mit der sechsten Potenz des Abstandes d abnimmt, treten Abstände von wenigen Nanometern (< 10 nm) auf. Die Effizienz des Energietransfers η_F ist vom Förster-Radius r_F abhängig, der als Abstand zwischen beiden Fluorophoren definiert ist und bei dem die Energieübertragung zu 50 % vom Donor auf den Akzeptor erfolgt (Lakowicz, 2006; Wöhrle, 1998).

Um das Phänomen des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers beobachten zu können, benötigt man zwei in ihren optischen Eigenschaften aufeinander abgestimmte Chromophore: Einen so genannten Donor und einen Akzeptor. Aufgabe des Donors ist die selektive Absorption des von einer Lichtquelle ausgestrahlten Lichts und dessen anschließende Wiederabstrahlung, die zu längeren Wellenlängen hin verschoben ist. In diesem Emissionsspektrum liegt das Absorptionsmaximum des Akzeptors, sodass er die abgestrahlte Energie aufnehmen kann. Insgesamt beobachtet man also mit der Emission des Akzeptors einen Energietransfer vom Donor zum Akzeptor, den man als FRET bezeichnet. Des Weiteren ist die räumliche Orientierung der Fluorophore für die Intensität des Energie-Transfers von entscheidender Bedeutung. So kann ein Energieübertrag nur dann stattfinden, wenn die Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor möglichst parallel zueinander angeordnet sind (Lakowicz, 2006).

1.3 Fluorophore - Anwendungsmöglichkeiten als Fluoreszenzreporter und FRET-basierte Biosensoren

Reporterproteine werden in der Molekularbiologie und Grundlagenforschung eingesetzt um zelleigene Signale oder Metaboliten zu detektieren. Der Einsatz von Reportern dient sowohl der Zuordnung von unbekannten Enzymen zu den jeweiligen Enzymklassen durch Identifizierung möglicher Substrate und somit der Aufklärung der Spezifität des Enzyms, als auch dem Auffinden möglicher Enzyminhibitoren, die als potentielle Wirkstoffe interessant sind. Häufig verwendete Reporter sind unter anderem die β -Galactosidase, die sezernierte humane alkalische Phosphatase (SEAP) und die Luciferase. Die β -Galactosidase hydrolysiert das Substrat ONPG (*o*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid) (Letunova et al., 1981), wodurch β -D-Galaktose und *o*-Nitrophenol entsteht, wobei das gelbe Produkt *o*-Nitrophenol photometrisch bestimmt werden kann. Ebenfalls durch einen gelben Farbumschlag durch Hydrolyse des Substrats *p*-Nitrophenylphosphat (pNPP) kann die Aktivität der sezernierten

humanen alkalischen Phosphatase (SEAP) detektiert werden (McComb and Bowers, 1972). Der dritte genannte Reporter, die Luziferase, kann das Substrat Luziferin zu Oxyluziferin umsetzen und bildet so Biolumineszenz aus, welche wiederum detektiert werden kann (de Wet et al., 1987). Die meisten Reporter haben allerdings den Nachteil, dass zur Detektion ein bestimmtes Substrat vorhanden sein muss, welches meistens nur in *in vitro* Test hinzugegeben werden kann. *In vivo* Reaktionen kann man mit diesen Verfahren nicht analysieren. Zu diesem Zweck wurden Fluoreszenzreporter entwickelt.

1.3.1 Fluoreszenzreporter

In vivo Fluoreszenzreporter, wie das Green Fluorescent Protein (GFP), finden in vielen Bereichen der Grundlagenforschung und Biotechnologie eine breite Anwendung: So werden fluoreszierende Proteine zur Untersuchung von genregulatorischen Mechanismen (Zimmer, 2002) oder zur Überwachung von biotechnologischen Prozessen eingesetzt (March et al., 2003). Für die Untersuchung von zellulären Differenzierungsprozessen und zur Lokalisation des jeweiligen Zielproteins in der Zelle können ebenfalls Fluoreszenzreporter verwendet werden (Thomas et al., 2001). Diese können auch zur Überprüfung von Faltungsprozessen heterologer Proteine in bakteriellen Expressionsstämmen dienen (Waldo et al., 1999).

1.3.1.1 Die GFP-Familie als etablierte Fluoreszenzreporter

GFP wurde nach seiner Entdeckung 1962 von einer Arbeitsgruppe um Osamu Shimomura zu einem der wichtigsten Instrumente der Molekularbiologie. Dabei wurde herausgefunden, dass die Oxoluciferase Aequorin aus der Qualle *A. victoria* nach UV-Anregung mit einem grün fluoreszierenden Protein assoziiert vorliegt, dessen Emissionsspektrum identisch mit dem des Aequorea-Gewebes ist (Shimomura et al., 1962). Die weitere Charakterisierung und Isolierung wurde erstmals 1974 durchgeführt und die Primärstruktur 1994 veröffentlicht (Heim et al., 1994). Das natürliche GFP, enthält als Chromophor die Aminosäuren Serin (65), Tyrosin (66) und Glycin (67). Die photophysikalischen Eigenschaften des Proteins sind von seiner Tertiärstruktur und dem Protonierungsgrad zwischen dem Chromophor und der β -Barrel-Struktur abhängig. Durch einen Protonentransfer der Hydroxylgruppe von Tyrosin (66) und Bildung einer Wasserstoffbrückenbindungen kommt es zur beschriebenen grünen Fluoreszenz, wobei die ausgebildete Fluoreszenzemission abhängig vom pH-Wert ist (Ward and Cormier, 1979). Durch gezielte Mutagenese der obengenannten Aminosäure des Chromophors ist es möglich, Anregungs- und Emissionswellenlängen zu verändern, und somit zum Beispiel cyan- oder gelb- fluoreszierende Proteine zu entwickeln. Der große Vorteil dieser Art von Reporterproteinen ist, dass sie genetisch kodiert sind und von den Zielzellen selbst produziert werden können, sie müssen also nicht, wie oben beschriebene Reporter, künstlich in die Zellen gebracht werden (Guerrero and Isacoff, 2001).

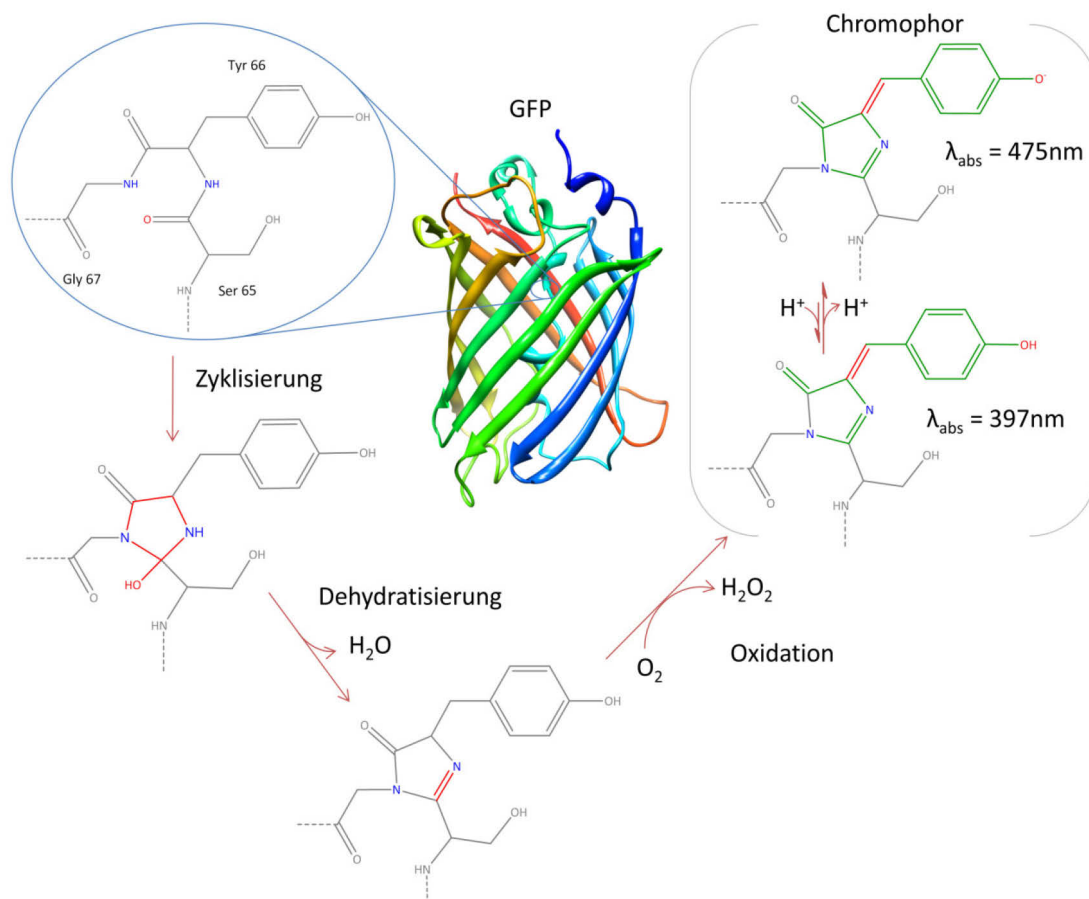


Abbildung 2: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der autokatalytischen Bildung des Chromophors von GFP modifiziert nach (Zimmer, 2002).

Auf die Zyklisierung folgt die Dehydratisierung. Der essenzielle Oxidationsschritt in Gegenwart von molekularem Sauerstoff führt zur Entstehung des intakten Chromophors. In Rot dargestellt sind die Bindungen bzw. Strukturen, welche an der jeweiligen Phase beteiligt sind. In Grün dargestellt sind die Aminosäure, die an der Fluoreszenzbildung direkt beteiligt sind.

Was alle GFP-Varianten allerdings gemeinsam haben, ist der Chromophor und die damit verbundene Sauerstoffabhängigkeit. Das Chromophor von GFP, p-Hydroxybenzyliden-imidazolidin-5-on, wird posttranslational autokatalytisch aus den Aminosäuren Serin, Tyrosin und Glycin gebildet. Nach einer Zyklisierung und einer Dehydratisierung ist der Chromophor noch nicht fluoreszent (Heim et al., 1995). Hierzu ist erst ein Oxidationsschritt nötig, der die Anwesenheit von molekularem Sauerstoff bedingt. Erst durch diesen Schritt wird ein fluoreszenzaktives Chromophor gebildet (Cubitt et al., 1995). Dieser befindet sich im Zentrum der Faltstruktur und ist dadurch vor Einflüssen der Umgebung geschützt. Wichtig für die Chromophorbildung ist die Aminosäure Arginin an Position 96 (Cubitt et al., 1995). Die Faltung des Proteins ist hierbei einer der zeitbestimmenden Schritte, die bei zeitabhängigen Untersuchungen beachtet werden müssen (Heim et al., 1995). Das GFP findet hierbei eine große Anwendung als Reporterprotein oder kommt in FRET-Biosensoren zum Einsatz (Demchenko, 2010; Shaner et al., 2005). So lassen sich anhand eines modulierten EYFP (Yellow Fluorescent Protein) (Insertion von einer Zinkfingerdomäne) Zinkionen sensitiv detektieren oder durch eine Insertion von Calmodulin in das EYFP Calcium-

Ionen sensitiv detektieren (Baird et al., 1999) (Lengyel et al., 2000). Trotz der vielseitigen Einsatzmöglichkeiten ist die Verwendung des GFP sowie der Farbvarianten (z.B. *Yellow fluorescent protein* (YFP)) unter anaeroben Bedingungen nicht möglich, da für die autokatalytische Synthese des Fluorophors, Sauerstoff essentiell ist. Somit kann GFP und dessen Farbvarianten in obligat anaeroben Organismen nicht eingesetzt werden (Garcia et al., 2009). Um dennoch in anaeroben Organismen mit *in vivo* Fluoreszenzreportern arbeiten zu können, wurden die FMN-basierten Fluoreszenzproteine (FbFPs) entwickelt, wie z.B. das PpFbFP (*Pseudomonas putida* FMN-based fluorescence protein), EcFbFP (*E. coli* FMN-based fluorescence protein) und das BsFbFP (*B. subtilis* FMN-based fluorescence protein) (Drepper et al., 2007; Drepper et al., 2010).

1.3.1.2 LOV-Proteine - neue FMN-basiere Fluoreszenzreporterproteine

Das aus *Bacillus subtilis* stammende Gen *ytaA* wurde im Rahmen der kompletten Genomsequenzierung identifiziert. Das YtaA wurde als unbekanntes Protein mit Ähnlichkeit zu Proteinkinasen klassifiziert (SubtiList <http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>). In einer von Akbar et al. (2001) durchgeführten Studie wurde aufgrund spektroskopischer Untersuchungen vermutet, dass YtaA einen Chromophor in Form eines Flavinmononukleotids (FMN) enthalten könnte. Diese Vermutung wurde 2002 von Losi et al. bestätigt und es konnte durch Datenbankrecherche nach Proteinen mit Homologien zu den pflanzlichen Phototropinen der N-terminale Bereich von YtaA als sog. LOV-Domäne (Light, Oxygen, Voltage) identifiziert werden (Losi et al., 2002). Bei den Phototropinen handelt es sich um membrangebundene Kinasen höherer Pflanzen, die bei Bestrahlung mit blauem (390–500 nm) und UV- Licht (320–390 nm) autophosphorylieren (Briggs et al., 2001). Als Hauptphotorezeptoren in Pflanzen sind sie verantwortlich für den Phototropismus einer Pflanze, sowie den Ortswechsel von Chloroplasten und die Öffnung von Stomata (Briggs and Christie, 2002; Briggs et al., 2001; Christie et al., 1998). Proteine mit einer LOV-Domäne werden in der Regel durch die Faktoren Licht, Sauerstoff oder Spannung (Light, Oxygen, Voltage) reguliert, wobei sie in Bakterien an verschiedene Effektdomänen gekoppelt sein können (Crosson et al., 2003; Huala et al., 1997). Des Weiteren durchlaufen die LOV-Domänen einen Licht-induzierten Photozyklus (Salomon et al., 2000; Salomon et al., 2001). Anders als die Phototropine setzt sich das 261 AS große YtaA aus nur zwei Domänen zusammen: einer N-terminalen LOV- und einer C-terminalen STAS-Domäne. Für die YtaA-LOV-Domäne, welche die Consensus-Sequenz NCRFLQG besitzt, konnte nachgewiesen werden, dass sie ein FMN als Chromophor bindet und einen Photozyklus durchläuft wie LOV-Domänen der Phototropine (Losi et al., 2002).

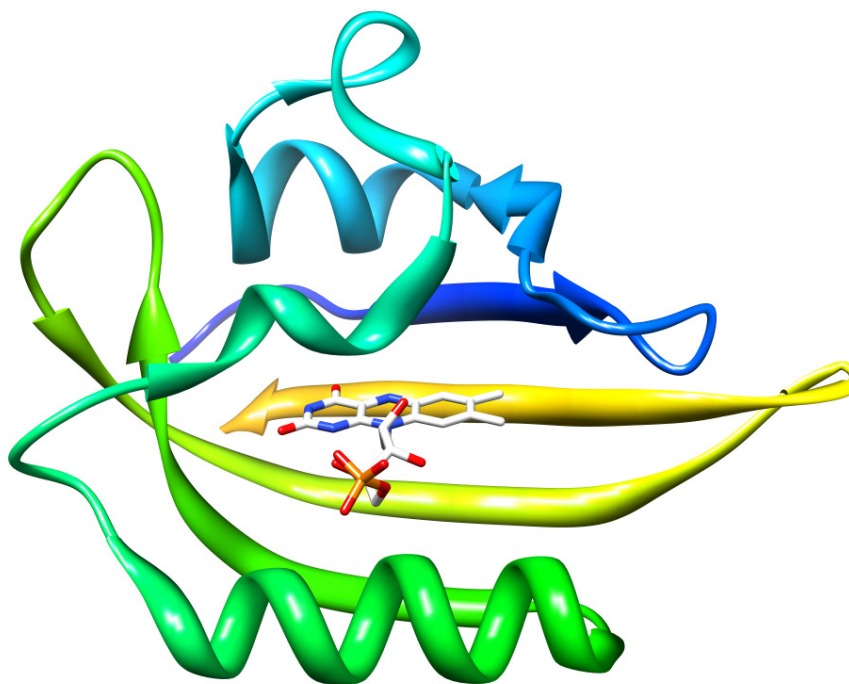


Abbildung 3: 3D Kristallstruktur der YtvA LOV-Domäne aus *B. subtilis* (Möglich and Moffat, 2007).

Gezeigt ist hier beispielhaft für die Familie der LOV-Protein das YtvA-Protein isoliert aus *B. subtilis*. Assoziiert ist hier der Kofaktor Flavinmononukleotid (FMN), welcher zur Ausbildung einer Fluoreszenz benötigt wird. Hier dargestellt ist nur das Zentrum des YtvA-Proteins ohne α -Helix und STAS Domäne.

In unserer Gruppe wurde auf Basis der LOV-Blaulichtrezeptoren eine völlig neue Familie von FMN-bindenden Fluoreszenzreporterproteinen (FbFP) entwickelt (Drepper et al., 2007). Bei den neuen Fluoreszenzproteinen handelt es sich um rekombinante Varianten bakterieller Blaulicht-Rezeptoren. Anders als die GFP-ähnlichen Fluoreszenzproteine sind die neuen Fluoreszenzproteine sehr klein (16-19 kDa) und binden das vom Wirtsorganismus bereitgestellte Chromophor Flavinmononukleotid (FMN). Dieses Molekül wird sowohl in Pro- als auch in Eukaryonten Sauerstoff-unabhängig synthetisiert. Um die FMN-abhängige Fluoreszenz der Blaulichtrezeptoren zu erhöhen und somit deren Verwendung als Fluoreszenzreporter zu ermöglichen, wurden die bakteriellen Proteine mittels moderner Verfahren, der sogenannten *directed evolution*, verändert. Durch Mutationen wurde die Autofluoreszenz der Proteine drastisch erhöht, wodurch die FMN-bindenden Fluoreszenzproteine entstanden. Die photochemische Charakterisierung der neuen Markerproteine ergab, dass die FbFPs nach Anregung mit blauem Licht (450 nm) eine blaugrüne Fluoreszenz (495 nm) emittieren. Die neuen Markerproteine konnten in verschiedenen pro- und eukaryotischen Wirtszellen exprimiert und die für FbFP charakteristische Fluoreszenz *in vivo* nachgewiesen werden (Drepper et al., 2007), (Walter et al., 2012). Weiterhin ist es seit kurzem möglich, Nervenzellen unter hypoxischen Bedingungen mittels des Sauerstoff-insensitiven Reporterproteins zu analysieren (Walter et al., 2012). In der Zukunft sollte es möglich sein, hypoxische Bereiche zum Beispiel in humanen Tumoren analysieren zu können, um so die Physiologie solcher Tumoren verstehen zu können.

Da die Untersuchung von Reaktionswegen in lebenden Systemen sowie die Identifizierung der dabei beteiligten Moleküle sehr schwierig ist, besteht erheblicher Bedarf an der Entwicklung von Analysemethoden, die schnell und effizient Ergebnisse liefern.

1.3.2 FRET-Systeme als Biosensoren und deren Anwendungen

Gerade bei Vorgängen wie Proteinfaltung, Wechselwirkung zwischen Proteinen untereinander oder mit DNA bzw. RNA, sowie Reaktionen von Enzymen mit ihren jeweiligen Substraten ist ein Verfahren zur abstandsabhängigen Untersuchung dieser Prozesse wünschenswert, weshalb sogenannten „FRET-Systemen“ auch als Biosensoren ein besonderes Interesse zukommt (Frommer et al., 2009; Ibraheem and Campbell, 2010; Stepanenko et al., 2008). Mit Hilfe dieser "molekularen Werkzeuge" ist es möglich, Abstandsänderungen im nm-Bereich in Echtzeit zu verfolgen, weshalb sie sich besonders für die Analyse von biochemischen Ereignissen *in vitro* und *in vivo* eignen. Ein weiteres Arbeitsgebiet in der Diagnostik ist das Design neuer Biosensoren für das Screening von Enzymfunktionen. FRET-Systeme erfüllen sowohl auf Grund der einfachen, direkten Detektion eines spezifischen Signals, als auch durch ihre breite Anwendbarkeit diese Anforderungen sehr gut und werden deshalb in immer größerem Maß eingesetzt (Hires et al., 2008; Newman et al., 2011; Nikolaev et al., 2004). In den letzten Jahren hat die Zahl der für FRET-Messungen geeigneten Donor-Akzeptor-Paare kontinuierlich zugenommen, sodass inzwischen ein breites Spektrum an Absorptions- und Emissionswellenlängen abgedeckt wird. Des Weiteren wurden viele FRET-Systeme entwickelt die auf ganz unterschiedliche Weise einen FRET ausbilden (Aoki et al., 2012; Carlson and Campbell, 2009; Esposito et al., 2008; Liu et al., 2011).

So wurden rekombinante Fluoreszenzreporterproteine entwickelt, die entweder über eine spezifische Sensordomäne in direkter Interaktion mit dem zu ermittelnden Substrat bzw. Signal stehen, wodurch die Fluoreszenzdomänen nur bei deren An- oder Abwesenheit fluoresziert (vgl. Abb. 5) oder bei denen die Fluoreszenzeigenschaften einer Fluoreszenzdomäne durch die Veränderungen der Zellparameter oder –Metaboliten, wie z.B. durch einen schwankenden pH-Werte, direkt verändert wird (vgl. Abb. 4). Die Tatsache, dass das FRET-Signal und somit auch die Fluoreszenzintensität mit einem erhöhten Abstand der FRET-Partner zueinander abnimmt, konnte für die Herstellung eines Glucose sensitiven Biosensors genutzt werden (Pickup et al., 2005). Dies ist ein weiteres Beispiel für die effektive, hocheffiziente Detektion eines Zellmetaboliten durch einen FRET-Biosensor.

1.3.2.1 FRET-Biosensoren zur ratiometrischen Detektion von Zellparametern

Durch die Entwicklung von FRET-Biosensoren ist man in der Lage, komplexe Zellvorgänge, Zellparameter oder Proteininteraktionen in der Grundlagenforschung und in der Biotechnologie viel genauer zu detektieren bzw. zu identifizieren, da die Abhängigkeit des Fluoreszenzsignales von zwei Fluoreszenzreportern die Sensitivität der Signalerkennung stark erhöht. So hat beispielsweise Esposito (Esposito et al., 2008) mit einer YFP/CFP-FRET-Fusion (Abb. 4) pH-Wert Schwankungen quantitativ nachweisen können.

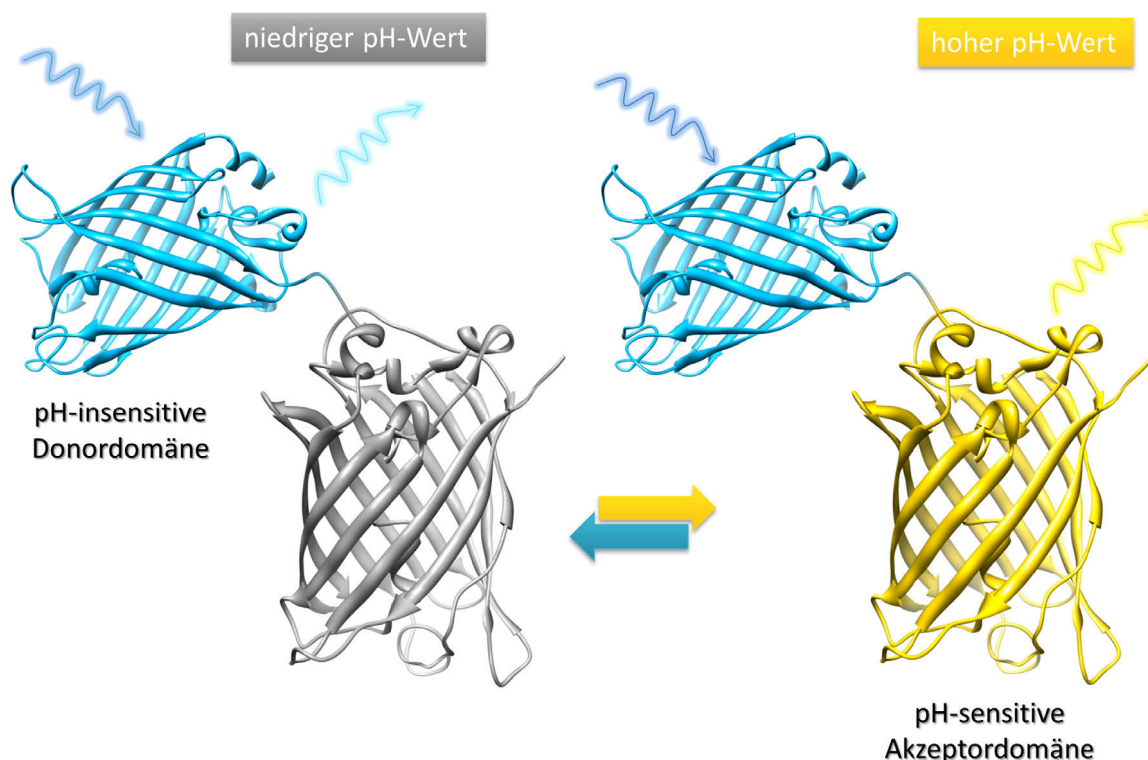


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines durch pH direkt beeinflussten FRET-Systems.

In diesem FRET-basierten Biosensor-Design liegen die FRET-Partner grundsätzlich in der richtigen Konformation zueinander vor. Diese Fusion besteht aus einer Domäne, die insensitive von dem gewählten Zellparameter (pH-Wert) ist, und einer die eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Parameter aufweist, damit FRET-Verhältnisänderungen stattfinden können. Die Anregung mit Licht (Blau) und die Fluoreszenzemissionen (Türkis, Gelb) sind hier mit Pfeilen gekennzeichnet.

Hierbei wird über das variierende Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der beiden Fluoreszenzreporterproteine YFP und CFP ein FRET-Verhältnis errechnet und so der pH-Wert quantitativ bestimmt (vgl. Abb. 4), wobei das YFP sensibler auf hohe Protonen-Konzentrationen reagiert als das CFP. Bei dieser Art von Biosensordesign liegen die Fusionsproteine immer in der optimalen Konformation zueinander vor. Die Veränderung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten kommt hierbei ausschließlich durch Inaktivierung einer sensitiven FRET-Domäne durch das zu messende Signal zustande. In diesem Falle wird das YFP-Chromophor durch eine hohe Protonenkonzentration (niedriger pH-Wert) protoniert bzw. inaktiviert (Esposito et al., 2008). Dieser Vorgang ist reversibel, sodass jederzeit schwankende pH-Werte direkt anhand eines kalibrierten pH-Sensors bestimmt werden können.

1.3.2.2 Cameleons - Die ersten FRET-basierenden Calciumbiosensoren

Mithilfe von FRET-basierten Biosensoren ist es inzwischen möglich, verschiedenste Ionen in Eukaryoten als auch in Prokaryoten sensitiv nachzuweisen bzw. in bestimmten Zelltypen, wie etwa Nervenzellen, zu lokalisieren. Mit dem ersten FRET-basierenden Calciumsensor, war man in der Lage die Konzentration der Ca^{2+} -Ionen in Zellen nachzuweisen (Baird et al., 1999). Dies geschah mit den sogenannten Cameleons. Die Cameleons stellen FRET-basierte

ratiometrische Calciumsensoren dar. Diese bestehen aus zwei verschiedenen GFP-Derivaten, wobei die beiden Konstrukte über eine Calmodulin, ein Calcium bindendes regulatorisches Protein (Miyawaki et al., 1997), und eine M13-Sequenz, ein synthetisches Protein mit identischer Struktur zum Calmodulin (Ikura et al., 1992), miteinander verbunden sind. Das FRET-Verhältnis der Lichtintensitäten bei den emittierten Wellenlängen zueinander ist hierbei abhängig von der intrazellulären Calciumkonzentration. Die ursprünglichen Cameleons zeigten allerdings eine schwache Fluoreszenzemission. Daher wurden durch gezielte Mutagenesen ein neuer Sensor, das Cameleon 2.0 (Miyawaki et al., 1997) entwickelt. Diese Version besteht aus den GFP-Derivaten ECFP (*Enhanced Cyan Fluorescent Protein*) und EYFP (*Enhanced Yellow Fluorescent Protein*). Auf Grund der Verwendung des EYFPs und des ECFPs zeigte der Sensor eine erhöhte Fluoreszenzintensität. Jedoch zeigt sich bei niedrigen intrazellulären pH-Werten eine starke Abhängigkeit des Sensors von dem pH. Die pH-Sensitivität konnte in einer weiteren Version, dem Cameleon 2.1, verbessert werden, wobei die Aminosäuren Valin (Position 68 im EYFP) gegen Leucin sowie Glutamin (Position 69 im EYFP) gegen Lysin ausgetauscht worden sind. Dies hatte eine bessere pH-Stabilität zur Folge. Da es sich hierbei um den ersten FRET-Biosensor handelt, soll seine Funktionsweise etwas näher betrachtet werden. Die Fusion wurde in Neuronen exprimiert und lag im Cytosol gelöst vor. Bei niedriger neuronaler Aktivität kann das ECFP mit Licht der Wellenlänge 436 nm angeregt werden und emittiert Licht der Wellenlänge 485 nm. Es kann die Energie hierbei nicht über einen FRET abgeben, da die sterische Nähe zum Akzeptor fehlt. Steigt jedoch die neuronale Aktivität, kann Calcium ins Innere der Zellen strömen und bindet an Calmodulin, das sich seinerseits an dem Strukturanalog M13 anlagert.

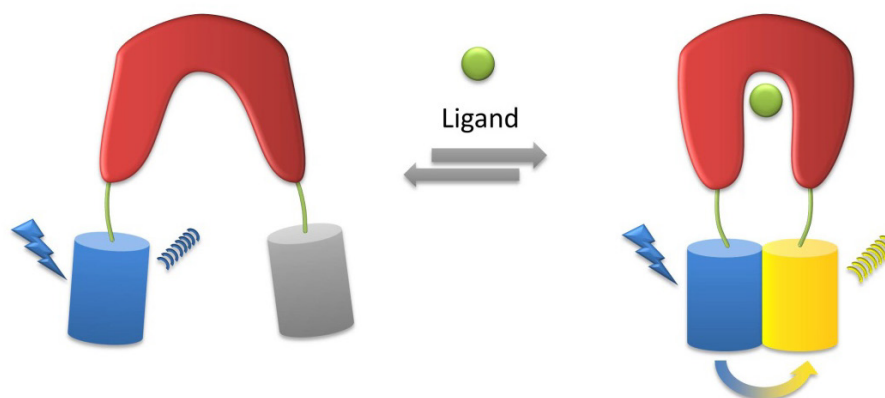


Abbildung 5: Schema einer Liganden-induzierten Konformationsänderung der FRET-Domänen, modifiziert nach (Frommer et al., 2009).

Dies ist ein reversibler FRET, wobei die beiden FRET-Domänen (blau und gelb) durch einen Linker (rot) verbunden sind, der bei Bindung eines Liganden (grün) eine Konformationsänderung durchläuft. Dieses Modell wird auch als „Venusfliegenfalle“ bezeichnet.

Durch eine Konformationsänderung kommt es zu einer räumlichen Annäherung von ECFP und EYFP. Es kann nun ein strahlungsloser Energietransfer (FRET) von ECFP auf den Akzeptor EYFP erfolgen. Das angeregte EYFP kann durch den FRET Licht der Wellenlänge 535 nm emittieren, was im Photometer detektiert werden kann. Dieser Vorgang wird anhand der

Abbildung 5 verdeutlicht. Mit Hilfe dieses reversiblen Vorgangs ist es möglich, verschiedene intrazelluläre Calciumkonzentration nicht-invasiv zu detektieren. Man war also erstmals in der Lage, die neuronale Aktivität von Nervenzellen indirekt zu messen. Es wurden weitere verbesserte Versionen des Cameleon 2.1 entwickelt: Cameleon 3.1 (Llopis et al., 1998) und das Cameleon 6.1 (Li et al., 2006). Diese Verbesserungen resultierten in einer erhöhten Quantenausbeute des Biosensors.

Die Gruppe um Marco Mank konnte 2006 zudem die Geschwindigkeit der Fluoreszenzintensitätsveränderung optimieren und dies für einen Ca^{2+} -Biosensor in Nervenzellen zeigen (Mank et al., 2006). Ein interessantes Anwendungsgebiet der FRET-Biosensoren ist die lokale Untersuchung von verschiedenen Redox-Vorgängen und physikalische Variablen (Temperatur, pH-Wert usw.) in verschiedenen Kompartimenten der Zellen. So konnte Yano *et al.* 2010 mit Hilfe des Biosensors Redoxfluor physiologische und pathogene Redoxzustände in den Peroxisomen detektieren und identifizieren (Yano et al., 2010).

1.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines neuen genetisch kodierten FRET-Biosensors basierend auf einer Fusion zwischen dem *Yellow fluorescent protein* (YFP) und dem neuen Fluoreszenzprotein FbFP. FRET-Biosensoren, wie die CFP-YFP-Biosensoren wurden bereits für die Detektion verschiedenster Metabolite und Umweltfaktoren wie etwa Chloridionen oder den pH-Wert etabliert (Esposito et al., 2008; Markova et al., 2008). Grundsätzlich hätte die Verwendung des cyangrün-fluoreszierenden FbFP als alternative Donordomäne einige mögliche Vorteile gegenüber CFP: Da das FbFP-Signal im Vergleich zur CFP-Fluoreszenz weniger anfällig gegenüber Umweltparametern, wie etwa Sauerstoff ist (Drepper et al., 2010), könnte die Verwendung des alternativen FRET-Donors zu einer verbesserten quantitativen Bestimmung von Metaboliten mittels FbFP-YFP-basierten Biosensoren führen. Des Weiteren wäre es sogar denkbar, aufgrund der oben beschriebenen Sauerstoff-abhängigkeit der YFP-Fluoreszenz einen völlig neuen FRET-Biosensor zu erzeugen, der in der Lage ist, molekularen Sauerstoff intrazellulär ratiometrisch zu bestimmen. Der Hauptteil dieser Arbeit widmet sich hierbei der Entwicklung und Etablierung eines FRET-Biosensors, um ratiometrisch Sauerstoff in lebenden Zellen nicht-invasiv zu detektieren. Hierbei soll durch eine Kalibrierung eine Bestimmung dieses wichtigen Metaboliten in Zellen erreicht werden. Hierzu soll der Sauerstoffsensor *in vitro* und *in vivo* charakterisiert werden. Des Weiteren sollen geeignete Versuchsbedingungen zur Charakterisierung ermittelt und etabliert werden. Zusätzlich sollte dieses System auf die Eignung als pH-Biosensors hin untersucht werden.

II. Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme

2.1.1 *Escherichia coli* Stämme

Tabelle 1: Genotypen der verwendeten *E.coli*-Stämme. (Nomenklatur nach Bachmann, 1990)

Stamm	Relevante Eigenschaften	Referenz
DH 5 α	F ⁻ , $\Delta lacU169$, 80lacZ Δ M15, <i>hsdR17</i> , <i>recA 1</i> , <i>endA 1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA</i> , (<i>res⁻</i> , <i>mod⁺</i>), <i>deoR</i>	(Hanahan, 1983)
BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>), <i>gal</i> , <i>dem</i> , (<i>λts857</i> , <i>indl</i> , <i>Sam7</i> , <i>nin5</i> , <i>lacUV5-T7gene1</i>)	(Studier and Moffatt, 1986)

2.2 Vektoren und rekombinante Plasmide

2.2.1 Vektoren

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Vektoren mit weitem Wirtsbereich.

Vektoren mit weitem Wirtsbereich	Relevante Eigenschaften	Referenz
pBluescript KSII	PT3 Plac <i>lacZ</i> α Amp ^R ColE1	Agilent technologies
pET28a	PT7, LacI, aphII, His-Tag, MCS	Merck Millipore
pRhotHi-2	pBRR1mcs (rep, mob, Cm ^r), pET22b (MCS), pBSL15 (aphII), Ori I	(Katzke et al., 2010)
pRSET	PT7, EK Site, His6-Tag, AmpR	Life technologies

2.2.2 Rekombinante Plasmide

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide

Rekombinante Plasmide	Relevante Eigenschaften	Referenz
pBluescript KSII-FluBO	Gensyntheseplasmid, 1194bp Fragment (<i>NdeI</i> -FluBO- <i>XhoI</i>)	MWG eurofins
pRhotHi-2 FluBO	1194bp Fragment (<i>NdeI</i> -FluBO- <i>XhoI</i>) aus pBluescript KSII-FluBO mit <i>NdeI</i> und <i>XhoI</i> in pRhotHi-2, His6-Tag	diese Arbeit
pRhotHi-2 YFP-His	pRhotHi-2-Derivat, <i>yfp</i> , His6-Tag	(Katzke et. Al., 2010)
pRhotHi-2 EcFbFP-His	pRhotHi-2-Derivat, <i>ecfbfp</i> , His6-Tag	Circolone, unveröff.
pRhotHi-2 FluBpH 5.6	1167bp Fragment (<i>NdeI</i> -FluBpH 5.6- <i>XhoI</i>), 716bp Fragment <i>NdeI</i> -Citrine- <i>SacI</i> aus pRSET CFP-mglb-Citrine mit <i>NdeI</i> und <i>SacI</i> in pRhotHi-2, His6-Tag	diese Arbeit
pRSET CFP-mglb-Citrine	2490bp Fragment CFP-mglb-Citrine, Glukosesensor	(Moussa, 2012)
pET28a EK-mglb	142bp Fragment EK-mglb (<i>NdeI</i> -EK mglb- <i>EcoRI</i>) aus PCR	diese Arbeit
pET28a EK-mglb EcFbFP	558bp Fragment EK-mglb EcFbFP (<i>NdeI</i> -EK mglb-EcFbFP- <i>SacI</i>), EcFbFP mit <i>EcoRI</i> und <i>SacI</i> aus PCR in pET28a EK-mglb	diese Arbeit
pET28a EK-mglb EcFbFP mglb-Citrine	2237bp Fragment EK-mglb EcFbFP mglb-YFP (<i>NdeI</i> -EK mglb-EcFbFP- mglb-YFP- <i>XhoI</i>), mglb-YFP mit <i>SacI</i> und <i>XhoI</i> aus PCR in pET28a EK-mglb EcFbFP	diese Arbeit
pRotHi-2 EcFbFP-mglb-Citrine	2237bp Fragment EK-mglb EcFbFP mglb-YFP (<i>NdeI</i> -EK mglb-EcFbFP- mglb-YFP- <i>XhoI</i>) mit <i>NdeI</i> und <i>XhoI</i> aus pET28a EK-mglb EcFbFP mglb-Citrine in pRhotHi-2	diese Arbeit

2.3 Oligonukleotide und Sequenzierung

2.3.1 Verwendete Oligonukleotide

Als für die Polymerasekettenreaktion notwendigen Startermoleküle (Primer) wurden die in der folgenden Tabelle erwähnten Oligonukleotide verwendet. Diese wurden von der Firma MWG Biotech bezogen.

2.3.2 Als Primer verwendete Oligonukleotide:

Tabelle 4: Als Primer verwendete Oligonukleotide:

Name	Sequenz (5'→3')	T _m [° C]	Länge [bp]	Verwendung
5' <i>Nde</i> I-EK-mglb	GCAGCGATATACATATGCGG GGTTC	67	25	Up-Primer zur PCR-Amplifikation des EK-mglb
3' <i>Eco</i> RI-EK-mglb	TCTATAAGTCGGAATTCGGC CGCTG	68	25	Down-Primer zur PCR-Amplifikation des EK-mglb
5' <i>Eco</i> RI-EcFbFP	CGACAGAATTCATGGCGTCG TTC	66	23	Up-Primer zur PCR-Amplifikation des EcFbFP
EcFbFP- <i>Sac</i> I-3'	GCGGAGAGCTCCAGCTTTTC AT	67	22	Down-Primer zur PCR-Amplifikation des EcFbFP
5' <i>Sac</i> I-mglb-YFP	GCCCGAGAGCTCGAGATAAC TTTA	65	24	Up-Primer zur PCR-Amplifikation des mglb-YFP
mglb-YFP- <i>Xho</i> I-3'	GTTCCGCCTCGAGCAAGCTT TTAC	68	24	Down-Primer zur PCR-Amplifikation des mglb-YFP
5' <i>Nde</i> I-Citrine	CATATGGTGAGCAAGGGCG	58,8	19	Up-Primer zur PCR-Amplifikation des Citrine
Citrine- <i>Sac</i> I-3'	GAGCTCCTTGACAGCTCGT CCATG	66,3	25	Down-Primer zur PCR-Amplifikation des Citrine

2.3.3 Sequenzierungen

Die für diese Arbeiten notwendigen Sequenzierungen wurden von der Firma Sequiserve GmbH (Vaterstetten) durchgeführt.

2.4 Nährmedien und Zusätze

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Nährmedien für 20 min bei 200 kPa und 120 ° C autoklaviert.

2.4.1 Nährmedien

E. coli LB-Flüssigmedium (Sambrook and Gething, 1989)

NaCl	10,0 g
Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
VE-Wasser	ad 1000 ml

E. coli LB-Agar

Agar	15,0 g
NaCl	10,0 g
Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
A. dest.	ad 1000 ml

E. coli α -Komplementationsagar (Sambrook and Gething, 1989)

100 mM IPTG	1 ml
2% (w/v) X-Gal in DMF	5 ml
LB-Agar	300 ml

2.4.2 Antibiotika

Tabelle 5: Verwendete Antibiotika mit der für die jeweilige Anzucht von *R. capsulatus* und *E. coli* empfohlenen Konzentrationsangabe.

Antibiotikum	Konzentration in <i>E. coli</i> Medien [$\mu\text{g/ml}$]
Ampicillin (Amp)	100
Kanamycin (Km)	50

2.4.3 Enzyme

Enzym:	Bezugsfirma:
Phusion DNA Polymerase	Finnzymes
T4-DNA-Ligase	Fermentas GmbH (St.Leon-Rot)
<i>NdeI</i>	Fermentas GmbH (St.Leon-Rot)
<i>SacI</i>	Fermentas GmbH (St.Leon-Rot)
<i>Sall</i>	Fermentas GmbH (St.Leon-Rot)
<i>XhoI</i>	Fermentas GmbH (St.Leon-Rot)
<i>BamHI</i>	Fermentas GmbH (St.Leon-Rot)
<i>EcoRI</i>	Fermentas GmbH (St.Leon-Rot)

2.4.4 Verwendete Chemikalien

Tabelle 6: Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Bezugsfirma
β -Mercaptoethanol	Sigma
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid, X-Gal	Sigma
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)-Lösung	Roth
Agar	Gibco BRL, Invitrogen
Agarose	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Ammoniumsulfat	Merck
Ampicillin	Serva
Borat	Merck
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Serva
Calciumchlorid	Merck
Coomassie Brilliant Blau R250	Serva
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dinatriumethyldiamintetraacetat ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$)	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Glycerol	Roth
Hefeextrakt	Gibco BRL
Isopropyl- β -D-Thiogalactosid (IPTG)	Gerbu
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Kanamycin	Serva

L-Glycin	Roth
L-Serin	Calbiochem
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Calbiochem
Magnesiumchlorid-Heptahydrat	Merck
Manganchlorid	Merck
Mangansulfat-Hydrat	Merck
Methanol	Roth
N,N,N',N'-Tetraethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydroxid	Roth
Natriummolybdat-Dihydrat	Merck
Pepton	BD
Polyoxyethylensorbitolmonolaurat (Tween)	Roth
Rubidiumchlorid	Sigma
Salzsäure (HCl)	Roth
Thiamin	Sigma
Trihydroxymethylaminomethan (Tris)	Biomol
Trypton	Sigma
Zinksulfat-Heptrahydrat	Merck

2.4.5 Verwendete Antiseren

Antiserum	Bezugsfirma
Kaninchen-Anti-His	Invitrogen
Kaninchen-Anti-YtvA	Eurogentec (Seraing, Belgien)
Kaninchen-AntiYFP	BD Biosciences GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Ziege-Anti-Kaninchen-HRP-Konjugat	AmershamBiosciences Europe GmbH (Freiburg, Deutschland)

2.4.6 Puffer und Lösungen

2.4.6.1 Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

TBE-Puffer

Tris	89 mM
Borat	89 mM
Na ₂ -EDTA	2,5 mM

DNA-Probenpuffer

Na ₂ -EDTA	100 mM
Glycerol	43 % (v/v)
BPB	0,05 % (w/v)

DNA-Molekulargewichtsstandard "GeneRuler 1kb DNA Ladder" (Fermentas)

10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 bp

Zur besseren Orientierung heben sich die Banden bei 3000 und 2000 bp im Agarosegel durch eine höhere DNA-Konzentration von den anderen Banden ab.

2.4.6.2 Puffer und Lösungen zur Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNAMagnesium-Mix

MgCl ₂	500 mM
MgSO ₄	500 mM

Transformationspuffer (TMF)

CaCl ₂	100 mM
RbCl ₂	50 mM
MnCl ₂	40 mM

2.4.6.3 Puffer und Lösungen zur Proteinisolierung mittels immobilisierender Metallionen- Affinitäts- Chromatographie (IMAC)Lyse Puffer pH 8.0 entgast

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	10 mM

Waschpuffer pH 8.0 entgast

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	50 mM

Elutionspuffer

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM

Proteinlagerpuffer

NaH ₂ PO ₄	10 mM
NaCl	10 mM

2.4.6.4 Puffer und Lösungen zur Proteinisolierung und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

10-fach Elektrophorese-Puffer

Tris-HCl	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)
A. dest	ad 1000 ml

4-fach Sammelgelpuffer (pH 6,8)

Tris-HCl	0,5 M
VE-Wasser	ad 200 ml

4-fach Trenngelpuffer (pH 8,8)

Tris-HCl	1,5 M
VE-Wasser	ad 200 ml

SDS-Probenpuffer (pH 6,8)

Tris-HCl	50 mM
Glycerin	10 % (v/v)
SDS	4 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	2 % (v/v)
BPB	0,03 % (w/v)

15 % (w/v) SDS-Trenngel (Für zwei Mini-Gele)

4-fach Trenngelpuffer	2,500 ml
87 % (v/v) Glycerol	0,100 ml
A.dest	3,050 ml
40 % Acrylamid-Lösung	3,750 ml
10 % (w/v) SDS	0,100 ml
10 % (w/v) APS	0,075 ml
TEMED	0,015 ml

SDS-Sammelgel (für zwei Mini-Gele)

4-fach Sammelgelpuffer	1,250 ml
VE-Wasser	3,150 ml
40 % Acrylamid-Lösung	0,715 ml
10 % (w/v) SDS	0,050 ml
10 % (w/v) APS	0,050 ml
TEMED	3,5 µl

Protein-Größenstandard "PageRulerPrestainedProteinLadder" (Fermentas)

170, 130, 100, 72, 55, 40, 33, 24, 17, 11 kDa

Zur besseren Orientierung ist die 72 kDa Bande rot gefärbt.

Coomassie-Blau-Färbelösung

Ethanol	25 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blue R250	0,2 % (w/v)

Entfärber-Lösung

Ethanol	20 % (v/v)
Essigsäure	7 % (v/v)

2.4.6.5 Puffer und Lösungen für das Immunoblotting (Western Blot)10-fach Dunn-Carbonat-Puffer (pH 9,45) (Dunn, 1986)

NaHCO ₃	10 mM
NaCO ₃	3 mM
Methanol	20 % (v/v)

20-fach TBS-Puffer (pH 8,0)

Tris-HCl	25 mM
NaCl	150 mM
KCl	3 mM

TBST-Puffer

Tween20 in 1-fach TBS-Puffer	0,2 % (v/v)
------------------------------	-------------

Färbelösung für die PVDF-Membran

Amidoschwarz	0,1 % (w/v)
Ethanol	45 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

Universalpuffer

Amidoschwarz	0,1 % (w/v)
Ethanol	45 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

2.5 Reaktions- und Nachweis-„Kits“

<u>Reaktions-/Nachweis-„Kit“</u>	<u>Bezugsfirma</u>
ECL Western Blotting Detection System	Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg)
PlasmidDNA-OLS Mini-Kit	OLS Life Science
Omnipure-OLS Gelextraktionskit	OLS Life Science

2.6 Sonstige Materialien und Geräte

Gerät	Hersteller
Blaulichtapparat VilberLourmat CN-6	VilberLourmat
Blotapparaturen Mini-Transfer BlotCell	BioRad
Elektrophoreseapparaturen Mini-PROTEAN Gelkammer II	BioRad
Feinwaage 2400MP	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Fluoreszenzphotometer Luminescence Spectrometer LS 50B	Perkin Elmer
Inkubationsschüttler Infors Ht	HT
Luminograph EG&G	Berthold
PCR-Geräte eppgradient, eppgradient S	Eppendorf
pH-Meter	Knick
Spannungsgeber	Biorad
Thermoblock/Thermomixer/ ThermomixerComfort	Eppendorf
Ultraschallgerät BadelinSonopuls HD2070	Badelin
Video-/Photodokumentation Eagle Eye II	Stratagene

Alle hier nicht aufgeführten Geräte entsprechen den üblichen Laborstandards.

2.7 Mikrobiologische Methoden

2.7.1 Anzucht von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* wurde entweder auf LB-Agarplatten oder in LB-Flüssigmedium durchgeführt. Dabei wurden dem Medium bei der Anzucht von transformierten Stämmen zur Stabilisierung des Plasmides die entsprechenden Antibiotika zugegeben. Übernachtskulturen wurden für mindestens 16 h inkubiert.

Kulturvolumen von bis zu maximal 5 ml wurden in Reagenzgläsern angesetzt und auf einem Brutroller inkubiert. Größere Kulturvolumen wurden in Erlenmeyerkolben angesetzt. Hierbei sollte die Flüssigkultur niemals mehr als 1/10 des Volumens des Kulturgefäßes einnehmen. Damit sollte sichergestellt werden, dass die Kulturen ausreichend mit Luft versorgt werden. Die Inkubation dieser Kulturen erfolgte im Inkubationsschüttler bei 120 rpm.

2.7.2 Induzierte Genexpression in *E. coli*

Für die Expression von Genen, die unter der Kontrolle des T7-Polymerase-abhängigen Promotors waren, wurden die entsprechenden Plasmide in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Die Produktion der zelleigenen T7-Polymerase kann hierbei durch die Aufnahme von Laktose von den Zellen induziert werden, welches eine Mediumkomponente ist. Diese Aufnahme wird allerdings durch Glucose reprimiert, welche sich ebenfalls in dem Medium befindet. Haben die sich exponentiell vermehrenden *E. coli*-Zellen diesen Energieträger verstoffwechselt, wird die Aufnahme von Laktose nicht mehr reprimiert und es kann in die Zellen aufgenommen werden. Die Produktion der T7-Polymerase wird induziert, diese bindet am T7-Promotor, unter dessen Kontrolle sich die Expression des FluBO-Gens befindet und das Gen kann exprimiert werden. Am Vortag der Überexpression wurde eine Einzelkoloniekultur angesetzt, indem von einer Transformationsplatte mit einem sterilen Zahnstocher eine Kolonie gepickt wurde und in die Flüssigkultur mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Stabilisierung des Plasmides übertragen worden ist. Am nächsten Tag wurde hieraus eine Testkultur mit einer $OD_{580} = 0,1$ angesetzt. Nachdem diese Kultur eine $OD_{580} = 0,5$ erreicht hatte, wurde durch Zugabe von 0,4 mM IPTG die Plasmid kodierte Expression gestartet.

2.7.3 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

2.7.3.1 Herstellen chemisch transformationskompetenter *E. coli* Zellen (Hanahan, 1983)

Zunächst wurde aus einer *E. coli* ÜK eine *E. coli* Kultur mit einer $OD_{580} = 0,05$ in LB-Flüssigmedium + 0,04 Volumen Mg^{2+} -Mix angesetzt, die bei 37 °C und 120 rpm inkubiert wurde. Sobald diese Kultur eine $OD_{580} = 0,5$ erreicht hatte, was der logarithmischen Wachstumsphase entspricht, wurde die Kultur für 20 min bei 4 °C und 5000 rpm

zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das Pellet hingegen wurde in ½ Volumen eiskaltem TMF-Puffer mit einer Pipettenspitze resuspendiert. Nach einer einstündigen Inkubation auf Eis wurde das gelöste Pellet wieder für 20 min bei 4 °C und 5000 Rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auch wieder verworfen und das Pellet diesmal in 1/10 Volumen eiskaltem TMF-Puffer + 20% (v/v) Glycerol resuspendiert. Anschließend wurden die gelösten Zellen in Aliquots von je 200 µl in EPG verteilt. Diese EPG wurden bis zur weiteren Verwendung bei - 80°C gelagert.

2.7.3.2 Hitzeschock-Transformation von *E. coli* Zellen mit Plasmid-DNA

Für die Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA wurden zunächst 200 µl transformationskompetenter Zellen auf Eis mit einem Ligationsansatz oder mit 5 µl isolierter Plasmid-DNA vermischt. Nach einer mindestens 30 min Inkubation auf Eis wurde der Hitzeschock durchgeführt. Dabei wurde der Transformationsansatz für 90 sec einer Temperatur von 42 °C ausgesetzt. Nach Zugabe von 700 µl LB-Medium zum Transformationsansatz wurde dieser für 2 bis 3 Stunden bei 37 °C auf einem Roller zur phänischen Expression der Plasmid kodierten Antibiotikaresistenz inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden 200 µl des Transformationsansatzes auf Selektiv-Agar aufgetragen.

2.8 DNA-Techniken

2.8.1 Präparation von Plasmid-DNA

2.8.1.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Kleinere Mengen an Plasmid-DNA wurden mit dem PlasmidDNA-OLS Mini-Kit von der Firma OLS Life Science nach Anweisung des Herstellers mit dem unter Verwendung der vom Hersteller mitgelieferten Puffer isoliert. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde die Plasmid-DNA mit 50 µl VE-Wasser (65 °C) eluiert. Durch die Elution mit vorgewärmtem Wasser wurden höhere Ausbeuten erzielt, zudem konnten inhibitorische Effekte des im TE-Puffer enthaltenen EDTA auf nachfolgende Enzym- oder Sequenzierungsreaktionen ausgeschlossen werden.

2.8.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte in Agarosegelen anhand der entsprechend gelagerten Banden des Molekulargewichtsstandards (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Fermentas). Alle Banden des Molekulargewichtsstandards enthalten eine vom Hersteller definierte Menge an DNA anhand dessen die Menge an DNA in den eigenen Proben abgeschätzt werden kann.

2.8.3 *In vitro* Rekombination von DNA

2.8.3.1 *Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen (Smith and Birnstiel, 1976)*

Nach Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* kann es notwendig sein die isolierte DNA zu überprüfen. Hierzu ist es möglich, die DNA zu verdauen. Der Verdau einer DNA führt zu spezifisch großen Fragmenten, mit denen ein bestimmtes Plasmid identifiziert werden kann. Zudem wird DNA ebenfalls verdaut, mit dem Zweck, Fragmente zu isolieren, die in einen Vektor kloniert werden sollen.

Die hydrolytische Spaltung der DNA erfolgt durch TypII-Restriktionsendonukleasen. TypII-Restriktionsendonukleasen zeichnen sich dadurch aus, dass sie an eine bestimmte Erkennungssequenz binden und innerhalb dieser auch schneiden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Restriktionsverdaue wurden mit dem für jedes Enzym spezifischen Puffer nach Herstellerangaben durchgeführt. Für jeden Restriktionsansatz wurde jeweils 1/10 Volumen an Restriktionsenzym zugegeben. Die Spaltungsreaktion wurde normalerweise für 1 bis 2 Stunden durchgeführt und anschließend durch die Zugabe von ¼ Volumen DNA-Probenpuffer inhibiert.

2.8.4 *Agarosegelelektrophorese (Sambrook and Gething, 1989)*

Die Agarosegelelektrophorese ist ein Trennverfahren, das auf den unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten verschieden großer geladener Moleküle im elektrischen Feld beruht. Nukleinsäuren, die auf Grund ihres Zucker-Phosphats-Rückrats ein konstantes Masse-Ladungs-Verhältnis besitzen, wandern durch ihre negative Ladung im elektrischen Feld zur Anode. Dabei hängt ihre Wanderungsgeschwindigkeit vom Molekulargewicht der DNA-Fragmente, ihrer Konformation, der Konzentration des Agarosegels und der Stärke des elektrischen Feldes ab. Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA-Restriktionen und PCR-Reaktionen, zur präparativen Isolierung bestimmter DNA-Fragmente und bei der Mengenabschätzung von DNA angewendet. Für die Gelmatrix wurde je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente Agarosekonzentrationen zwischen 0,8 % und 2,0 % (w/v) in 0,5-fachen TBE-Puffer eingesetzt. Zur Anfärbung der DNA im Gel wurde pro ml der aufgekochten Agaroselösung 0,1 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) zugesetzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 0,2 Volumen 5-fach DNA-Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde in horizontalen Gelkammern bei einer Spannung bis zu 11 V pro cm Elektrodenabstand mit 0,5fachem TBE-Puffer als Laufpuffer durchgeführt. Die Visualisierung der DNA erfolgte nach der Elektrophorese durch Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 254 - 366 \text{ nm}$). Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die Helix von doppelsträngiger DNA interkaliert und bei

Bestrahlung mit UV-Licht Strahlung im sichtbaren Bereich ($\lambda = 590 \text{ nm}$) emittiert. Die Dokumentation der mit UV-Licht bestrahlten Agarosegele erfolgte mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage.

2.8.5 Elution von DNA aus Agarosegelen (Vogelstein and Gillespie, 1979)

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen nach DNA-Restriktion oder auch zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das Omnipure Gelextraktionskit der Firma OLS Life Science nach Herstellerangaben mit den mitgelieferten Puffern verwendet.

2.8.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Damit ein Gen in einen Vektor kloniert werden kann, muss seine DNA mit einem vorher durch hydrolytische Spaltung linearisiertem Plasmid ligiert werden. Hierbei kann die Ligation entweder durch blunt ends erfolgen oder durch sticky ends. Bei blunt ends handelt es sich um DNA-Fragmente, die stumpfe Enden haben. Diese können entweder bei der PCR entstehen oder aber durch einen SmaI-Verdau von z.B. einem Expressionsvektor. DNA-Fragmente mit stickyends entstehen durch hydrolytische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.

In einem Reaktionsansatz von 50 μl wurden Vektor-DNA und Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von mindestens 1:3 eingesetzt.

Die Ligation der beiden Fragmente wurde durch die T4-Ligase katalysiert. Für die Ligation von blunt ends wird 5U von der T4-Ligase zugegeben und für die Ligation von stickyends wird 1U der T4-Ligase zugegeben. Die Ligation wurde dann für 1 Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach einer Stunde wurde die Ligation durch Hitzeinaktivierung der T4-Ligase für 10 min bei 65 °C abgebrochen.

2.8.7 Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis and Faloona, 1987)

Bei der Polymerasekettenreaktion werden bestimmte DNA-Bereiche *in vitro* aus einem Gemisch von DNA-Molekülen selektiv angereichert. Hierzu werden eine thermostabile DNA-Polymerase, geringe Mengen Ausgangsmaterial als Matritze, zwei Oligonukleotidprimer, die in weiten Bereichen komplementär zu der zu amplifizierenden Sequenz sind sowie DNA-Polymerasepuffer und ein dNTP-Mix benötigt. Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion beruht auf einer sich wiederholenden Abfolge von drei Schritten. Zuerst wurde die Matritze denaturiert. In dem darauf folgenden Schritt, der Hybridisierung, lagern sich die Primer an die komplementären Sequenzen der Matritze an. Im dritten Schritt, der Elongation, verlängert

die DNA-Polymerase die angelagerten Oligonukleotidprimer (3' nach 5') und kopiert auf diese Weise die Matritze. Die Hybridisierung erfolgt an beiden Strängen der Matritzen-DNA, wodurch sich die DNA in einem Zyklus verdoppelt. Nach 30 bis 40 Zyklen erhält man ausreichende Mengen der gewünschten DNA. Zur Amplifizierung wurde die *Pfu*-Polymerase verwendet, die eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität („proofreading“) aufweist.

Standard-PCR-Ansatz

Oligonukleotidprimer	100 pm
Oligonukleotidprimer II	100 pm
Polymerasepuffer	1x Puffer
dNTP-Mix	2,5 mM
DMSO	6 % (v/v)
Matritzen-DNA	50 ng
Polymerase	1,0 – 3,5 U
A.dest.	ad 50 µl

Die PCR wurde in den Geräten eppgradient s und eppgradient der Firma Eppendorf durchgeführt.

Standardprogramm für die PCR mit der Fusion-Polymerase

Initiale Denaturierung	98 °C, 10 min
Denaturierung	98 °C, 1 min
Hybridisierung	T _m , 1 min
Elongation	72 °C, 15sec/Kb
Terminale Elongation	72 °C, 10 min

Die Schritte Denaturierung, Hybridisierung und Elongation wurden zyklisch 35 mal durchlaufen. Die Hybridisierungstemperatur T_m (Richtwert: $[(T_{m1} + T_{m2})/2] - 5\text{ °C}$) richtete sich nach der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotidprimer T_{m1} und T_{m2}. Die Elongationszeit richtete sich nach der Länge der verwendeten DNA-Matritze (2 min pro Kb der verwendeten DNA-Matritze).

2.9 Proteintechniken

2.9.1 Gesamtproteinisolierung aus *E. coli*

Für die Gesamtproteinisolierung aus *E. coli* wurde zunächst die optische Dichte bei 580 nm der angezogenen Kulturen aus der ÜN-Kultur im Falle von *E. coli* DH5α und nach 3 stündiger induzierter Expression im Falle von *E. coli* BL21(DE3) bestimmt. Anschließend wurde dann

von einer Kultur 1,5 ml abgenommen und in ein 1,5 ml EPG überführt. Diese Probe wurde dann für 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1,0 ml 1-fach Sammelgelpuffer resuspendiert. Anschließend wurde erneut eine Zentrifugation für 3 min bei 13.000 Rpm durchgeführt. Auch diesmal wurde der Überstand verworfen. Für die Extraktion der Proteinproben und ihrer Denaturierung wurde auf das Pellet 75 µl SDS-Probenpuffer zugegeben und dieser Ansatz nach dem Vortexen für 10 min bei 99 °C auf einem Eppendorf Thermomixer bei 1000 Rpm aufgekocht. Anschließend wurden die Proben erneut für 5 min bei 13.000 Rpm zentrifugiert um die Zelltrümmer zu pelletieren. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand, der die löslichen Proteine enthielt, abgenommen und zur Aufbewahrung bei -20 °C in ein 1,5 ml EPG gelagert.

2.9.2 Fraktionierung von *E. coli*-Zellen (modifiziert nach (Witholt et al., 1976a))

Puffer A (pH 8,0)

100 mM Tris/ HCl; 20 % (w/v) Saccharose

Puffer B (pH 8,0)

100 mM Tris/ HCl; 20 % (w/v) Saccharose, 5 mM EDTA

Puffer C (pH 8,0)

100 mM Tris/ HCl; 40 mM MgCl₂

Es wurde, wenn nicht anders angegeben, ein einer O.D. 580 = 5 (1 O.D. 580 = 0,5 mg/ml Zellen, Trockengewicht) entsprechendes Volumen einer Zellkultur abzentrifugiert (30 min., 5.000 Rpm, 4°C), und der Kulturüberstand vollständig entnommen und steril filtriert (0,2 µm Porendurchmesser, Schleicher & Schüll, Dassel). Das Zellsediment wurde in 200 µl Puffer A resuspendiert, mit 200 µl Puffer B und 20 µg Lysozym versetzt (Witholt et al., 1976b) und die resultierende Zellsuspension für 25 min bei RT inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (20 min, 10.000 Rpm, 4°C, EZ) wurde der Überstand als periplasmatische Fraktion verwendet. Die sedimentierten Spheroplasten wurden in 500 µl Puffer C aufgenommen. Der Zellaufschluß erfolgte auf Eis durch Ultraschall für 1-10 min (75 W, "Branson Sonifer 250", Branson, Danbury, USA). Die entstandene Suspension wurde als Cytoplasma verwendet. Zu allen Fraktionen wurde als Protease-Inhibitor Pefabloc (Roche) in einer Endkonzentration von 0,4 mM gegeben. Bei der Fraktionierung größerer Zellmengen wurden die Volumina der eingesetzten Puffer entsprechend angeglichen.

2.9.3 Proteinreinigung mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) modifiziert nach (Belew et al., 1987)

Die in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden jeweils über den His-Tag, welcher sich C-terminal an den Proteinen befindet, mittels IMAC aufgereinigt. Hierzu wurden die verwendeten *E.coli*-Kulturen mit Lysepuffer versetzt und mittels French Press bei 320 Bar Zellinnendruck aufgeschlossen. Nach dem Equilibrieren der Ni-NTA-Säule (Lagerung in 20% Ethanol bei 4°C; Qiagen, Deutschland) mit dem 5-fachen Säulenvolumen Lysepuffer (vgl. Kap. 2.4.6.3), wurde das Zelllysate auf die Säule aufgetragen und mit 10-fachem Volumen Lysepuffer gewaschen. Anschließend wurde die Säule mit dem 10-fachen Säulenvolumen mit Waschpuffer (vgl. Kap. 2.4.6.3) gewaschen und mit dem 5-fachen Säulenvolumen Elutionspuffer (vgl. Kap. 2.4.6.3) eluiert. Die Reinheit der gewonnenen Eluatfraktion wurde mittels SDS-Page ermittelt ([vgl. Kap. 2.9.5](#)) (Porath and Olin, 1983). Nach erfolgter Aufreinigung wurden die Proteinproben mit Vivaspinsäulen (Firma Milipore, MW 10.000 cut off) aufkonzentriert und mit 10 mM NaH₂PO₄, 10 mM NaCl –Puffer umgepuffert.

2.9.4 TCA-Proteinfällung

Für die Fällung der löslichen Proteine wurde zunächst die Proteinlösung mit 0,1 Volumen 70% TCA versetzt. Nach kurzem Vortexen wurde der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei 13.000 Rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 80 % Aceton gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 5 min bei 13.000 Rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen (Mechin et al., 2007).

2.9.5 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Masse genutzt. Hierbei bedient man sich der Tatsache, dass stark negativ geladene SDS-Moleküle die Eigenladungen der Proteine überdecken, was zu einer Linearisierung der Proteine führt. Zusätzlich werden die Sekundär- und Tertiärstrukturen und Wasserstoffbrückenbindungen unterbrochen. Die von SDS-Molekülen umgebenen Proteine ist stark negativ geladen, wobei die Ladung proportional zur Masse des Proteins ist. Diese Proteine wandern zusammen mit dem SDS in einem Polyacrylamidgel nach Anlegen einer Spannung in Richtung der Anode.

Das Polyacrylamidgel wurde selbst gegossen. Hierbei wurde zuerst das Trenngel in die dafür vorbereiteten Mini-PROTEAN-Gelkammer gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem dieses Gel auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol entfernt und über dem Trenngel das Sammelgel gegossen.

Für die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine wurden die Proben zuerst für 10 min bei 99 °C aufgeköcht. Nach dem das Polyacrylamidgel in eine Gelkammer mit 1-fach SDS-Laufpuffer gestellt wurde, wurde von jeder Probe 15 µl auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese selbst wurde zunächst mit dem Anlegen einer Spannung von 120 V gestartet. Nach dem die Proben sich am Übergang von Sammelgel zu Trenngel konzentriert hatten, wurden durch Erhöhung der Spannung auf 180 V die Proteine im Trenngel aufgetrennt. Die Gelelektrophorese wurde durchgeführt bis die Lauffront den untersten Rand des Polyacrylamidgeles erreicht hatte.

2.9.6 Coomassie-Färbung zur Proteindetektion (Merril, 1990)

Durch die Coomassie-Färbung ist es möglich, Proteine die durch eine SDS-PAGE aufgetrennt wurden, auf dem Gel selbst sichtbar zu machen.

Hierfür wurde das Gel für 20 min in einer Coomassie – BrilliantblauR250 – Lösung (Vgl. Kap. [2.4.6.4](#)) inkubiert. Durch die anschließende Behandlung des Gels mit einer Entfärber-Lösung konnte der Gelhintergrund entfärbt werden, wodurch die Proteinbanden klar erkennbar wurden.

2.9.7 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen / Western Blot (Triplett, 1989)

Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe der „Mini-Transfer-Blot-Electrophoretic-Transfer-Cell“ (BioRad) auf eine PVDF-Membran übertragen. Vor dem Transfer wurde die PVDF-Membran 1 min in Methanol, dann für 5 min in VE-Wasser und abschließend für 10 min in 1-fach Dunn-Carbonat-Puffer equilibriert. Das Polyacrylamidgel wurde für 10 min in 1-fach Dunn-Carbonat-Puffer equilibriert.

Für den Transfer wurde die Sandwich-Methode angewendet. Hierbei wurde eine aus mehreren Schichten aufgebaute Blot-Apparatur verwendet. Zunächst kam auf der schwarzen Fläche des Gitters der Blotkammer ein Schwamm. Darüber wurden 2 Schichten Whatman-Papier gelegt. Auf dem Whatman-Papier wurde das Polyacrylamidgel gelegt. Hierüber kam dann die Blot-Membran. Über die Blot-Membran kamen dann wieder 2 Schichten Whatman-Papier und darüber dann nochmals 1 Schwamm. Das Gitter wurde dann geschlossen und mit der schwarzen Seite des Gitters an die schwarze Seite der Blot-Kammer eingebaut.

Der Proteintransfer erfolgte dann zunächst für 15 min bei 150 mA und dann für weitere 20 min bei 300 mA in 1-fach Dunn-Carbonat-Puffer.

2.9.8 Immunodetektion von Proteinen

Nach dem Proteintransfer der Proteine von dem Polyacrylamidgel auf die PVDF-Membran wurde diese über Nacht mit TBST + 5% (w/v) Magermilchpulver bei 4 °C inkubiert. Dieser Inkubationsschritt sollte dazu dienen die freien Bindungsstellen der Membran abzusättigen. Am nächsten Tag wurde die Membran für 2x 15 min in TBST bei 30 °C gewaschen. Nach diesem Waschschrift wurde die Membran mit dem Erstantikörper für 1 Stunde bei ebenfalls 30 °C inkubiert. Bei denen in dieser Arbeit verwendeten Erstantikörpern handelte es sich um Anti-YtvA (eingesetzte Verdünnung: 1/40.000), Anti-YFP (eingesetzte Verdünnung: 1/5000), und Anti-His (eingesetzte Verdünnung: 1/5000). Nach dem der Erstantikörper durch einen zweimaligen Waschschrift für je 30 min herausgewaschen worden ist, wurde der Zweitantikörper hinzugegeben. Hierbei handelte es sich um ein Ziege-Anti-Kaninchen-HRP-Konjugat, das in einer Konzentration von 1/5000 in TBST eingesetzt worden ist. Nach der einstündigen Inkubation mit dem Zweitantikörper wurde die Membran zunächst für 10 min mit TBST gewaschen. Nach zusätzlichen vier Waschschriften für je 5 min wurden die Proteine auf der Membran detektiert.

Es wurde die Detektion mit Hilfe des ECL-Systems (Enhanced Chemiluminescence Western Blotting Detection System) an dem Luminographen der Firma EG&G, Berthold durchgeführt.

2.9.9 Amidoschwarz-Färbung von Proteinen auf einer PVDF-Membran (Geyer, 1960)

Nachdem die Proteine auf der Membran mit Hilfe des Luminographen oder durch die Fotoentwicklung detektiert worden sind, war es möglich durch Färbung der Blot-Membran die Proteine sichtbar zu machen. Hierfür wurde die Membran zunächst für 15 min mit TBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 30 min in einer Amidoschwarz-Lösung inkubiert. Durch eine anschließende Inkubation für 1 Stunde an der Luft wurde dann die Membran getrocknet.

2.10 Optische Methoden

2.10.1 Fluoreszenzanalyse unter Blaulicht ($\lambda = 365 \text{ nm}$)

Zur schnellen und einfachen *in vivo* Visualisierung von fluoreszierenden, LOV-Proteine exprimierenden Bakterienkolonien auf Agarplatten wurde eine Blaulichtapparatur eingesetzt. Die Agarplatten wurden mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 365 \text{ nm}$ illuminiert und die Fluoreszenzemission der LOV-Proteine detektiert und photographisch dokumentiert.

2.10.2 Photometrische Fluoreszenzmissionsmessung

Die Fluoreszenzemission wurde sowohl in ganzen Zellen (*in vivo* Fluoreszenz) als auch im Überstand nach Zellaufschluss mit dem Ultraschall (*in vitro* Fluoreszenz) quantifiziert. Zur

Quantifizierung wurde ein Fluoreszenzphotometer (Perkin Elmer LS50B Luminescence Spektrometer) verwendet. Für die Messung der Fluoreszenzemission für Quantenausbeuten wurde von jeder Probe eine Verdünnung der Probe auf eine entsprechende OD = 0,1 hergestellt. Die *E. coli*-Proben wurden zunächst in 1 ml LB-Medium verdünnt. Nach einer Zentrifugation für 3 min bei 13.000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet für die Quantifizierung der Fluoreszenzemission in 1 ml 100 mM Tris-HCl (pH 8) resuspendiert. Die einzelnen Proben wurden dann unmittelbar vor der Messung aufgeschossen und verdünnt. Von diesen Proben wurden dann 750 µl abgenommen und in QS Viertelmikroküvetten (Hellma) übertragen. Die Spalteinstellungen am verwendeten Perkin Elmer LS50B Luminescence Spektrometer betrugen 12,5 nm (Exzitation-Schlitz) und 15,0 nm (Emissions-Schlitz). YFP wurde bei diesen Messungen mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und seine Fluoreszenzemission zwischen 515 nm und 600 nm detektiert. Die LOV-Proteine wurden bei 450 nm angeregt und ihre Fluoreszenzemission zwischen 480 nm und 600 nm detektiert.

Die Dokumentation der Spektren erfolgte mit der Fluorescence Data Manager Software der Firma Perkin Elmer, die Auswertung mit Microsoft Excel.

Die jeweilige Fluoreszenzintensität als „relative Fluoreszenzintensität“ wurde errechnet aus der gemessenen Fluoreszenzemission pro Zelldichte, die einer OD von 1 entsprach, pro 1 ml Zellextrakt oder Zellsuspension.

Alle weiteren Absorptions- und Fluoreszenzemissionsbestimmungen, wie z.B. zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten oder Aufnahme von Absorptions- und Fluoreszenzscans von FbFP, YFP und FluBO, wurden im UV-2450 Absorption Spektrophotometer (Shimadzu) bzw. mit Hilfe des QM-4 Fluoreszenzspektrophotometer (PTI, mit spektraler Korrektur des Detektors und des Emissionsmonochromators), in 10 mM NaCl/ 10 mM Natriumphosphat Puffer, pH 8.0, durchgeführt. Die Absorptionsspektren wurden in einem Bereich von 330 nm bis 620 nm Wellenlänge detektiert. Die Emissionsspektren wurden mit Licht einer Wellenlänge von 380 nm oder 440 nm angeregt. Die maximale Absorption der Proben sollte hierbei 0,15 nicht überschreiten, um einer Selbstabsorption und damit einer Verfälschung des Ergebnisses vorzubeugen. Im Falle des Anregungs- /Emissionsscans (2D-Scan) wurde ein Bereich von 300 nm bis 600 nm mit einem Inkrement von 5 nm angeregt und die Emission von 450 nm bis 595 nm detektiert, und die Proben bei 22°C gemessen.

Im Falle der Fluoreszenzmessungen des pH-Biosensors und dessen jeweilige Domänen YFP und EcFbFP wurde die zu messende Proteinprobe bei den jeweiligen pH-Werten in dem jeweiligen Citrat-Phosphatpuffer gelöst. Es wurde eine Proteinabsorption von $\lambda_{450\text{ nm}}=0,1$ im Falle von EcFbFP und $\lambda_{514\text{ nm}} = 0,1$ im Falle von YFP und FluBpH5.6 in einem Probenvolumen von 1ml hergestellt.

Citrat-Phosphatpuffer

Citronensäure	100 mM
VE-Wasser	ad 1000 ml

di-Natriumhydrogenphosphat	200 mM
VE-Wasser	ad 1000 ml

Der entsprechende pH-Wert des Citrat-Phosphatpuffers konnte durch die Zugabe von jeweils x ml Zitronensäure und x ml di-Natriumhydrogenphosphat zwischen pH 4-8 in 0,2 Abständen genau eingestellt werden, um 100 ml des Puffer mit dem jeweils angegebenen pH-Wert zu erhalten (Tabelle 7).

Tabelle 7: Citrat-Phosphatpufferzusammensetzung für Puffer von pH 4-8

pH-Wert	Zitronensäure (in ml)	di-Natriumhydrogenphosphat (in ml)
4	61,45	38,55
4.2	58,6	41,4
4.4	55,9	44,1
4.6	53,25	46,75
4.8	50,7	49,3
5	48,5	51,5
5.2	46,4	53,6
5.4	44,25	55,75
5.6	42	58
5.8	39,55	60,45
6	36,85	63,15
6.2	33,9	66,1
6.4	30,75	69,25
6.6	27,25	72,75
6.8	22,75	77,25
7	17,65	82,35
8	2,75	97,25

2.10.3 Thrombinprotease Spaltung (Morita et al., 1986)

Für die Spaltung der FRET-Fusion FluBO mittels der Protease Thrombin (Kowarzyk, 1952) wurden 10 µg aufgereinigtes Protein und eine Unit der Thrombin Protease in 50 µl Millipore Wasser gelöst und für 16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Überprüfung der Spaltung wurden nach 16 Stunden 10 µl der Reaktionslösung für eine SDS-Page bzw. Western Blot Analyse abgenommen (vgl. Kap. 2.9.7). Die Fluoreszenzemissionsmessung wurde in dem LS50B Lumineszenz Spektrometer (Perkin Elmer) bei 22 °C analog zu der oben beschriebenen Methode durchgeführt.

2.10.4 Bestimmung der Quantenausbeute (Schwartz, 1972)

Zur Bestimmung der Quantenausbeute von YFP und EcFbFP wurden die Proteine in Proteinlagerpuffer, pH 8, auf eine Absorption $\lambda_{\text{Abs max}}$ normiert. Im UV-2450 Absorption Spektrophotometer (Shimadzu) wurden zuerst ein Absorptionsspektrum von 220 nm bis 580 nm mit den jeweiligen Proteinen und anschließend Fluoreszenzspektren mittels QM-40 Fluoreszenzspektrophotometer (PTI, mit spektraler Korrektur des Detektors und des Emissionsmonochromators) aufgenommen .

2.10.5 Messung der Fluoreszenzlebensdauer

Die Fluoreszenzeigenschaften molekulare Systeme wie zum Beispiel Fluoreszenzreporter lassen sich nicht nur durch Anregungs- und Emissionsspektren, sondern auch durch Fluoreszenzlebensdauermessungen beschreiben. Nach der Absorption eines Photons relaxieren die Moleküle und geben die Anregungsenergie in Schwingungen, Fluoreszenz und *intersystem crossing* (Übergang vom Singulett- in den Triplettzustand) wieder ab.

Fluoreszenzlebensdauermessungen ermöglichen die Bestimmung der Dynamik der Prozesse im angeregten Zustand, aus denen Rückschlüsse auf den Zustand des molekularen Systems und in sensorischen Systemen auch über die Umgebungsparameter gezogen werden können. Im Falle des vorliegenden FRET-Systems sollte davon ausgegangen werden, dass sich durch einen Fluoreszenzresonanzenergietransfer vom Donormolekül auf das Akzeptormolekül die Fluoreszenzlebensdauer des FRET-Donors, in diesen Fall des EcFbFP, stark verkürzt, was durch Fluoreszenzlebensdauermessungen bestätigt werden sollte. Hierzu sollten Fluoreszenzabklingkurven aufgezeichnet werden und die Fluoreszenzlebensdauern ermittelt werden. Hierzu muss erörtert werden, warum es zu einer verkürzten Fluoreszenzlebensdauer des FRET-Donor kommt.

Die Fluoreszenzabklingkurven können im einfachsten Fall mit einer Exponentialfunktion beschrieben werden:

$$I = I_0 \exp(-t/\tau_F) \quad (2.1)$$

Die mittlere Fluoreszenzlebensdauer τ_F ist hierbei definiert als der Kehrwert der Übergangsrate k_F (Übergangswahrscheinlichkeit eines angeregten Moleküls in den jeweiligen energetisch günstigeren Zustand S_j).

$$k_F = \frac{1}{\tau_F} \quad (2.2)$$

Da die Lebensdauer nicht nur von der Fluoreszenzrate abhängig ist sondern auch von den Übergangsraten für andere strahlungslose Prozesse, ergibt sich die mittlere Lebensdauer eines angeregten Elektrons im S_i Zustand aus folgender Formel:

$$\tau_F = \frac{1}{k_F + k_{IU} + k_{IK} + k_{div}} = \frac{1}{\sum k_i} \quad (2.3)$$

k_F = Fluoreszenzübergangsrate

k_{IU} = Innere Umwandlungsrate

k_{IK} = Interkombinationsrate

k_{div} = andere Übergangsraten

Je größer die Übergangswahrscheinlichkeit eines Deaktivierungsprozesses ist, desto größer ist auch die Übergangsrate, wobei eine große Übergangsrate einer kurzen Lebensdauer z.B. eines fluoreszenten Proteins oder des FRET-Donors im Falle eines FRET-Systems entspricht, bei dem durch den Energietransfer ein weiterer Desaktivierungskanals vorliegt (Bayley and Martin, 1992). Die resultierenden Abklingzeiten der jeweiligen fluoreszenten Proteine oder Systeme werden hierbei durch Zeit-korrelierte Einzelphoton-Zählung („*time-correlated single photon counting*“ TCSPC) bestimmt. Da es sich bei TCSPC um eine zeitaufgelöste Messung handelt, sind die Messungen unabhängig von der Fluorophorkonzentration (Becker et al., 2007; Dumas et al., 2010; Duncan et al., 2004; Fruhwirth et al., 2010).

Fluoreszenzlebensdauer-Messungen finden häufig Anwendung bei der Untersuchung von Umwelteinflüssen auf Fluoreszenzproteine, da die Lebensdauer von Parametern, wie dem pH-Wert beeinflusst wird. Aus den Fluoreszenzabklingkurven werden dann durch geeignete Fitprozeduren die Fluoreszenzlebensdauern bestimmt.

Das hier verwendete Messsystem, ist das *Timeharp 100 Time-Correlated Photon Counting System* von Picoquant, Software Version 3.0. Das Steuermodul hat zwei Ausgänge. Einer steuert die Laserdiode, der andere gibt ein Synchronisationssignal über eine Verzögerungsschleife an den Computer, wobei die Laserdiode periodisch mit vorgegebener Frequenz (5-40 MHz) und fester Wellenlänge mit einer gewissen Pulsbreite von 0,5 ns - 0,9

ns auf die Küvette blitzt. Die Photonen werden durch einen Photomultiplier detektiert, welcher das Signal weiter an die TCSPC-Elektronik im Computer leitet. Die Messung des Fluoreszenzsignals findet in 90° Geometrie statt, um die unerwünschte Detektion von Anregungslicht zu minimieren. Alle Lebensdauermessungen erfolgen unter Berücksichtigung der Bedingung des magischen Winkels (Magic angle). Dazu wird ein Polarisator im Detektionsstrahlengang positioniert, der einen Winkel von 54,7° bezüglich der (linearen) Polarisation des Lasers einnimmt. Dadurch wird die Detektion von Streulicht vermindert und Effekte der Rotation der Moleküle unterdrückt. In einem Histogramm, dass als x-Achse die Zeitdifferenz von Synchronisationssignal und Probensignal und als y-Achse die Anzahl der gemessenen Ereignisse darstellt, trägt dieser ein Ereignis ein. Das Verfahren nennt man TCSPC (Time-Correlated Single Photon Counting). Die Auswertung der zeitaufgelösten Fluoreszenzdaten erfolgte mit der Software Fluofit Version 2.0 (Picoquant, Berlin).

2.10.6 FLIM

Die *E. coli* Zellen die FbFP, YFP oder FluBO exprimierten wurden hierbei zwischen zwei Objektträger aufgetragen und an dem Auflicht Fluoreszenz Mikroskop (BX50WI; Olympus Optical, Japan) befestigt. Die Zellen wurden mit dem 60× Wasser Immersion Objektiv (NA =0.9; Olympus Optical) vergrößert und sichtbar gemacht. Um eine Zwei-Photonen Anregung der Probe zu gewährleisten wurde diese mit ca. 100 fs Lichtpulse ($\lambda_{\text{exc}} = 760 \text{ nm}$) angeregt, welche mit einer Frequenz von 80 MHz von einem Titan-Sapphire Laser (MaiTai DeepSee; output power > 2W; Newport, Spectra Physics) generiert wurden.

Die Fluoreszenz wurde durch den Photomultiplier (PMT-100, Becker & Hickl) mit geeigneten Filtern zum Nachweis der Fluoreszenz von EcFbFP sowie der Donorfluoreszenz von FluBO (short pass filter 500 nm; $\lambda_{\text{obs}} < 500 \text{ nm}$; Omega Optical) und der Fluoreszenz von YFP sowie der Akzeptorfluoreszenz von FluBO (band pass filter 535 +/-13 nm; Omega Optical) detektiert. Das Fluorescence lifetime imaging und das *time-correlated single photon counting* wurde mit den Geräten Simple-Tau 152 (Becker & Hickl, Berlin) und der Software SPCM8.95 (Becker & Hickl, Berlin) wie zuvor beschrieben durchgeführt. Die generierten Bilder bzw. Pixel wurden mit Hilfe der Software SPCImage 2.97 (Becker & Hickl, Berlin) mono- oder biexponentiell gefittet und ausgewertet.

2.11 Computerprogramme und Datenbanken

Für die Erstellung der Klonierungsstrategie und Bestimmung der Enzyme für die hydrolytische Spaltung von Plasmiden wurde das Programm Clone Manager (Version 9)(Scientific & Educational Software) verwendet. Die Auswertung photometrischer Messungen erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel2010 (Microsoft) und den in den jeweiligen Kapiteln bereits erwähnten Programmen.

III. Ergebnisse

In vivo Fluoreszenzreporter finden in der Grundlagenforschung sowie in der Biotechnologie eine weitgefächerte Anwendung. Sie werden sowohl zur Erforschung von genregulatorischen Mechanismen in biologischen Prozessen als auch zur Überprüfung von Faltungsprozessen von Proteinen (Peters and Sikorski, 1999) verwendet. Ein weiteres Anwendungsfeld von *in vivo* Fluoreszenzreportern ist die Erforschung von Protein-Protein-Interaktion in lebenden Zellen. Der bisher meistverwendete Fluoreszenzreporter ist das GFP (Green Fluorescent Protein) und diverse Farbvarianten wie das YFP (Yellow Fluorescent Protein). Nachteil aller Vertreter dieser Proteinfamilie ist, dass zur Chromophor-Synthese ein Oxidationsschritt notwendig ist, so dass die Anwendung dieser Fluoreszenzreporter nur unter aeroben Bedingungen möglich ist. Um anaerobe bzw. Sauerstoff-limitierte Prozesse analysieren zu können, werden alternative Fluoreszenzreporterproteine benötigt. Ein solcher Fluoreszenzreporter wurde unter hypoxischen Bedingungen in Krebszellen eingesetzt (Walter et al., 2012). Eine Möglichkeit, verschiedenste Signale in komplexen biologischen Systemen *in vitro* und *in vivo* detektieren und interpretieren zu können, ist die Anwendung von Biosensoren. Wie bereits in der Einleitung näher beschrieben, finden dabei sehr viele verschiedene Arten von Biosensoren eine breitgefächerte Anwendung. Im Rahmen dieser Arbeit wird im Folgenden näher auf die Klasse der genetisch kodierten, FP-basierten FRET-Biosensoren eingegangen. Mit diesen Sensoren, bestehen aus einer Donor- und einer Akzeptordomäne, ist es möglich, Veränderungen von Umweltsignalen in *in vitro*- und *in vivo*-Systemen zeitlich zu verfolgen. Je nach Eigenschaft des jeweiligen Sensors lassen sich so durch Veränderungen des FRET-Verhältnisses ratiometrisch die intrazellulären Veränderungen des jeweiligen Signals, wie etwa Metabolitkonzentrationsänderungen, pH-Wert-Schwankungen oder Veränderungen von verschiedenen Ionenkonzentrationen fluoreszenzphotometrisch detektieren (vgl. Kapitel 1.3.2) (Esposito et al., 2008).

3.1 Eignung des EcFbFP als YFP-Fusionspartner in FRET-Biosensoren

Das Design der Biosensoren richtet sich speziell nach den zu detektierenden Signalen und dem zu untersuchenden System. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Biosensoren mit zwei verschiedener Designs zur Anwendung kommen. Zum einen sollte ein auf Metabolitbindedomänen-basierter FRET-Biosensor (FbFP-mglb-Citrine) zum Einsatz kommen, welcher durch eine Konformationsänderung aktiviert wird. Zum anderen sollte ein FRET-Biosensor (FbFP-YFP) realisiert werden, der auf einer insensitiven und einer sensitiven FRET-Domäne basiert, der bei Vorhandensein eines bestimmten Umgebungsfaktors aktiviert wird. Im Falle des Bindedomänen-basierten FRET-Biosensors ist es möglich, Metabolite intrazellulär mittels eines spezifischen FRET-Biosensors zu messen. Hierzu werden die FRET-Fusionsgene an eine DNA-Region fusioniert, die für eine Metabolit-Bindedomäne kodiert. Die Wirkungsweise des Biosensors ist schematisch in Abbildung 6 dargestellt. Durch Bindung des geeigneten Metaboliten erfährt diese Domäne eine Konformationsänderung, welche eine direkte Auswirkung auf die beiden FRET-Partner CFP und YFP hat. Die daraus

resultierende Änderung in dem FRET-Verhältnis ($\text{Emission}_{\text{Akzeptor}}/\text{Emission}_{\text{Donor}}$) ist ratiometrisch bestimmbar und auswertbar.

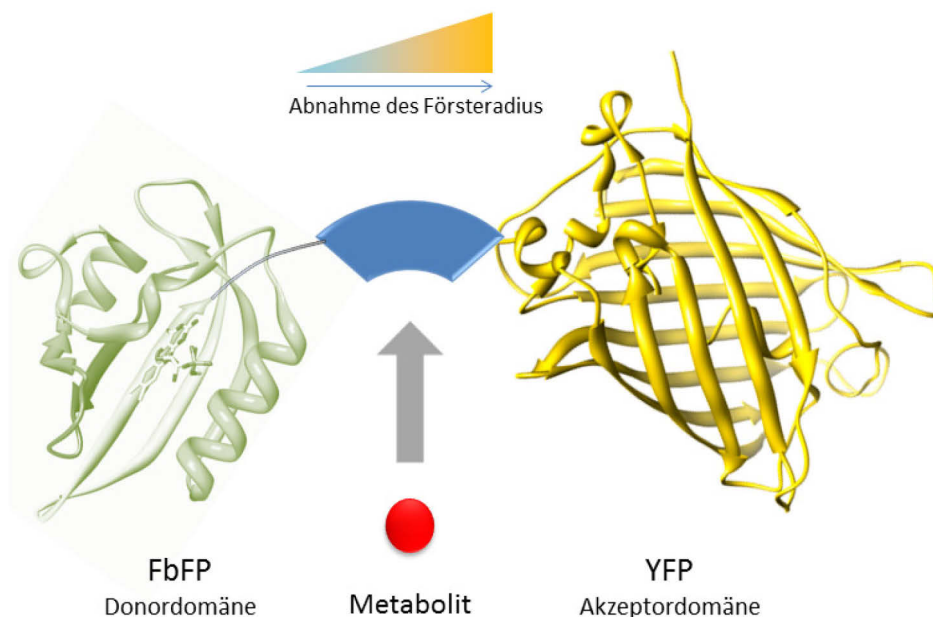


Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines FRET-basierten Metabolit-Biosensors, modifiziert nach (Frommer et al., 2009).

Schematisch dargestellt ist der funktionelle Aufbau eines FRET-Biosensors, welcher durch eine Konformationsänderung der Metabolitbindedomänen (blauer Balken) durch einen geeigneten Metaboliten (roter Kreis) aktiviert wird. Beispielhaft sind hier das FbFP als Donordomäne und das YFP als Akzeptordomäne gewählt. Die FRET-vermittelte Änderung des Fluoreszenzspektrums in Abhängigkeit von der Abnahme des Försterradiuses ist ebenfalls schematisch dargestellt.

Im Falle des Biosensordesigns mit sensibler und insensibler FRET-Domäne, führt die Sensitivität der Biosensor Akzeptordomäne gegenüber einem bestimmten Umweltfaktor und nicht die Konformationsänderung zu einer Beeinträchtigung der FRET-Effizienz und somit zur messbaren Veränderung des Fluoreszenzverhältnisses beider FP-Domänen. Bei einem solchen Biosensor liegen die Donor- und Akzeptordomänen sterisch in optimaler Distanz zueinander, um einen effizienten FRET prinzipiell gewährleisten zu können. Für die Erzeugung der beschriebenen FRET-Biosensoren werden häufig CFP und YFP als FRET-Donor und Akzeptor-Domänen verwendet.

3.2 Herstellung eines neuartigen genetisch kodierten FRET-Biosensors zur Detektion von Sauerstoff

Als zentrale Fragestellung dieser Arbeit sollte daraufhin überprüft werden, ob eine FbFP-YFP-Fusion als FRET-basierter *in vivo* O₂ Biosensor eingesetzt werden kann. Zur ratiometrischen Bestimmung von intrazellulärem Sauerstoff in lebenden Zellen mittels eines genetisch kodierten FRET-Biosensors sollte hierbei das FMN-basierende Fluoreszenzreporterprotein EcFbFP als FRET-Donor fungieren, welches sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen fluoresziert. Als FRET-Akzeptor sollte YFP fungieren, das, wie bereits erwähnt, unter anaeroben Bedingungen nicht fluoreszieren kann. Der schematische Aufbau und die erwartete Funktionsweise eines solchen Sensors sind in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

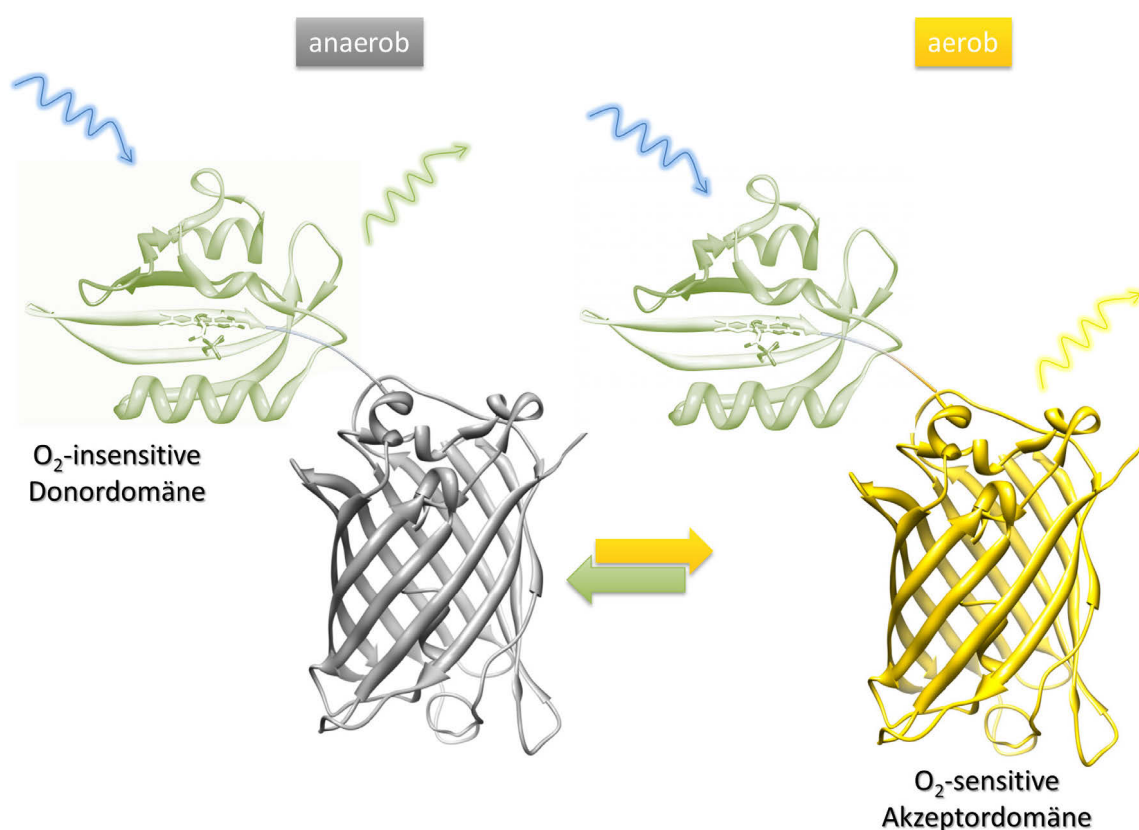


Abbildung 7: Schematischer Aufbau und prinzipielle Funktion eines FbFP-basierten Sauerstoffsensors.

Graphisch gezeigt ist der schematische Aufbau und die postulierte Funktionsweise des FRET-Sauerstoffsensors. Hierbei soll das EcFbFP als O₂-insensitive Donordomäne (hier ist die Kristallstruktur der LOV-Domäne des YtvA-Proteins (Möglich and Moffat, 2007) in grün dargestellt) fungieren. Das YFP sollte als O₂-sensitive Akzeptordomäne (typische β -Faltblatt Kristallstruktur YFP (Wachter et al., 1998)) fungieren. Zusätzlich sind die postulierten Zustände des FRET-Systems gezeigt. Im anaeroben Zustand ist das YFP als inaktiv grau dargestellt und im aeroben Zustand als funktionaler FRET-Akzeptor in Gelb.

Während man mit einzelnen GFP-basierten Fluoreszenzproteinen nur in der Lage ist, die An- oder Abwesenheit von Sauerstoff in lebenden Zellen zu detektieren, wäre man mit einem FRET-basierten Biosensor in der Lage, auch die Veränderung von Sauerstoffkonzentrationen

über die Zeit bestimmen zu können. Hierbei bestimmt man das Verhältnis der FRET-vermittelten Fluoreszenzemission des FRET-Akzeptors im Vergleich zur Fluoreszenzemission des FRET-Donors. Bei steigender Sauerstoffkonzentration verändert sich dementsprechend das FRET-Verhältnis durch Veränderung der Verhältnisse der Fluoreszenzemissionen des FRET-Donors und FRET-Akzeptors. Die EcFbFP-basierende Fluoreszenzemission nimmt ab, während die FRET-vermittelte Fluoreszenzemission des YFPs durch Reifung des Proteins bei Anwesenheit von Sauerstoff zunimmt. Da diese Veränderungen in den FRET-Verhältnissen in einer direkten Abhängigkeit zur Sauerstoffkonzentration stehen, sollte es möglich sein, einen solchen potentiellen Sauerstoffbiosensor auf die jeweilige Sauerstoffkonzentration zu kalibrieren. Dies wird nur möglich durch das Vorhandensein einer Sauerstoff-insensitiven und Sauerstoff-sensitiven Domäne, wie dies in der vorliegenden FbFP-YFP-Fusion der Fall ist.

3.3 *In vitro* Charakterisierung des EcFbFP als potentielle FRET-Donordomäne

Bevor jedoch im Rahmen dieser Arbeit FbFP-YFP-basierte Biosensoren näher charakterisiert werden konnten, musste zunächst die Funktionalität und die allgemeine Anwendbarkeit des EcFbFP als Fusionspartner für YFP innerhalb eines FRET-Biosensors überprüft werden. Die zentrale Fragestellung war hierbei, ob das Fluoreszenzreporterprotein EcFbFP, aufgrund der ähnlichen spektralen Eigenschaften, das CFP als FRET-Donordomäne in diesen beiden oben genannten Biosensor-Designs ersetzen kann. Um dieser Fragestellung nachzugehen, sollte das CFP-Gen zum einen in dem etablierten FRET-Glukose-Biosensor, bestehen aus CFP und Citrine und der Glukose-Bindedomäne mgIb (Frommer et al., 2009), durch das EcFbFP-Gen ersetzt werden. Des Weiteren sollte eine FbFP-YFP FRET-Fusion ohne Metabolit-Bindedomäne ausgehen von der etablierten CFP-YFP-Fusion hergestellt werden.

Um in den neuen FRET-Biosensoren einen optimalen Energietransfer vom Donor (EcFbFP anstelle von CFP) auf den Akzeptor YFP gewährleisten zu können, müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt werden (vgl. Kap. [1.2.1](#)). Unter anderem muss die Anregungswellenlänge des FRET-Akzeptors mit der Emissionswellenlänge des FRET-Donors überlappen. Dazu wurde zunächst von den jeweiligen unfusionierten Proteinen, EcFbFP und YFP, Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren aufgenommen, um die publizierten Absorptions- und Emissionsmaxima beim YFP ($\lambda_{\text{Abs}} = 514 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 527 \text{ nm}$) und EcFbFP ($\lambda_{\text{Abs}} = 450 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 495 \text{ nm}$) im für diese Arbeit verwendeten Messsystem verifizieren zu können (Drepper et al., 2007; Heim et al., 1995; Ormö et al., 1996; Palm and Wlodawer, 1999). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 8 dargestellt, die im folgenden dargestellten Versuche wurden wie in Kapitel [2.4.6](#) und [2.10](#) beschrieben durchgeführt.

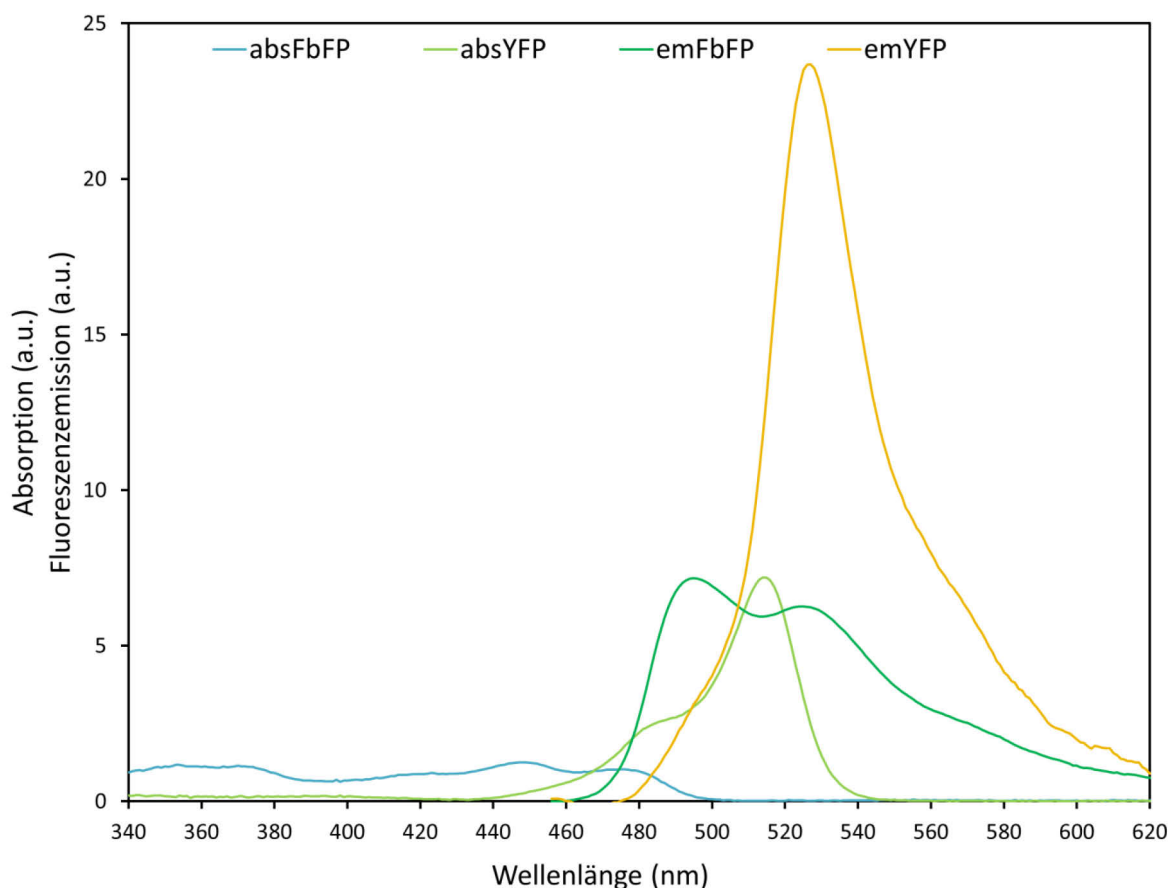


Abbildung 8: Absorptions- und Fluoreszenzspektren der unfusionierten FRET-Domänen EcFbFP und YFP.

Die Absorptionsspektren des YFP und EcFbFP sind auf die jeweiligen Extinktionskoeffizienten (YFP: $72.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, EcFbFP: $12.500 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) normiert. Die Fluoreszenzspektren sind auf die Quantenausbeuten (YFP: 0,76, EcFbFP: 0,39) normiert. Dargestellt sind die Spektren in einem Wellenlängenbereich von 340 – 620 nm, die Einheit sind relative Einheiten (arbitrary unit (a.u.)). Die Messungen wurden im Proteinlagerpuffer pH 8 durchgeführt. Die Proteine wurden auf eine Proteinabsorption $\lambda_{\text{Abs max}} = 0.1$ normiert.

Die Abbildung 8 macht deutlich, dass sich die im Fluoreszenzphotometer gemessenen Absorptionsmaxima und Fluoreszenzmaxima der Fluoreszenzproteine YFP ($\lambda_{\text{Abs}} = 514 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 527 \text{ nm}$) und EcFbFP ($\lambda_{\text{Abs}} = 450 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 495 \text{ nm}$) mit den in der Literatur beschriebenen Maxima decken. Des Weiteren lässt sich eine deutlich Überschneidung des Emissionsspektrums des Donors (EcFbFP) mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors (YFP) erkennen. Die beiden Reporterproteine FbFP und YFP erfüllen demnach die spektralen Voraussetzungen, um als Fusionsproteine ein funktionelles FRET-System zu bilden. Aufgrund dieser Ergebnisse wäre es also durch Fusion der beiden Fluoreszenz Reporterproteine möglich, ein funktionales FRET-System herzustellen.

3.3.1 *In vitro* Charakterisierung des potentiellen FRET-Akzeptors YFP

Vor der Erzeugung einer FbFP-YFP Fusion mussten jedoch noch weitere wichtige Eigenschaften der beiden Fluoreszenzproteine untersucht werden. Dies ist nötig, da das vorliegende YFP (GFP10C-T203Y/S65G/V68L/S72A Derivat von Clontech (Ormö et al., 1996)) in seinen Absorptions- und Fluoreszenzmaxima zwar mit den von Clontech angegebenen und von Ormö publizierten Daten übereinstimmt, man jedoch bereits am Verhältnis der

Intensität der Proteinabsorption bei der Wellenlänge 272 nm zur Intensität der fluoreszenzbildenden Absorption des Chromophors bei der Wellenlänge 514 nm erahnen kann, dass die publizierten Werte des Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 36.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ und der Quantenausbeute Φ von 0,63 nicht mit den Werten des vorliegenden YFP übereinstimmen können, obwohl eine durch Sequenzierung nachgewiesene Sequenzidentität vorliegt. Das vorliegende YFP scheint in seinen Eigenschaften eher dem GFP10C-Derivat zu ähneln welches bereits von (Kremers et al., 2006), (Nagai et al., 2002; Nagai et al., 2001) und (Heim et al., 1994; Heim and Tsien, 1996) veröffentlicht wurde. Allerdings ist bei diesem, in den genannten Publikationen als Kontrolle eingesetzten, Fluoreszenzprotein, ein Austausch der sich an Stelle 69 des Proteins befindlichen Aminosäure Glutamin zu Lysin vorhanden. Dieser Austausch ist in dem vorliegenden Protein nicht vorhanden (vgl. Anhang Aminosäuresequenz GFP 10C Clontech). Infolgedessen sollte hier die Quantenausbeute der Fluoreszenzproteine nochmals experimentell bestimmt werden, um zu gewährleisten, dass die optimalen Fluoreszenzeigenschaften der beiden Fusionspartner auch später als FRET Donor- und Akzeptor-Domänen innerhalb der Fusionsproteine vorliegen. Zur Kontrolle des jeweiligen Experimentes diene hierbei das EcFbFP, da die Quantenausbeute eindeutig bekannt waren.

Die Effizienz der Umwandlung der absorbierten Photonen in emittierte Fluoreszenz wird durch die Quantenausbeute Φ definiert und errechnet sich wie folgt (Wake et al., 1992):

$$\text{Quantenausbeute } \Phi = \frac{\text{Zahl der emittierten Photonen}}{\text{Zahl der absorbierten Photonen}} \quad (3.1)$$

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode verwendet, die eine indirekte Bestimmung der Quantenausbeute über den Referenzfarbstoff Fluoreszein im Falle des YFPs oder über den Referenz-Kofaktor Riboflavin im Falle des EcFbFP zulässt. Bei beiden Referenzen ist die Quantenausbeute bekannt, so dass man über diese Referenzwerte die Quantenausbeute des YFPs und des EcFbFP indirekt bestimmen kann. Somit wird die Quantenausbeute nach Bestimmung der Fläche über einen definierten Bereich nach folgender Formel errechnet:

$$\Phi_{\text{Probe}} = \Phi * \frac{1-10^{\text{Absorption Standard}}}{1-10^{\text{Absorption Probe}}} * \frac{\text{Area Probe}}{\text{Area Standard}} * \frac{\eta^2 \text{ Probe}}{\eta^2 \text{ Standard}} \quad \text{Formel (3.2)}$$

Wobei Φ die Quantenausbeute beschreibt und η^2 den Brechungsindex des Lösungsmittels. Die Quantenausbeute ist dimensionslos und kann Werte von null bis eins annehmen. Der bestmögliche Wert von $\Phi = 1$ ist erreicht, wenn es zu den oben geschilderten strahlenden Übergängen keine konkurrierenden strahlungslosen Prozesse gibt. Die Gesamtwirkung des Fluoreszenz-Prozesses ist durch das Produkt aus dem Extinktions-Koeffizienten $\epsilon(\lambda)$ und der Quantenausbeute Φ gegeben und kann damit als ein Qualitätskriterium für die absolute Helligkeit von Fluoreszenzfarbstoffen und Fluoreszenzproteinen dienen. YFP sollte hierbei einen Extinktionskoeffizienten von $72.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ und eine Quantenausbeute von 0,76 haben (Kremers et al., 2006), EcFbFP einen Extinktionskoeffizient von $12.500 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ und eine Quantenausbeute von 0,39 (Drepper et al., 2007).

In den Abbildungen 9 bzw. 10 sind Fluoreszenzspektren von EcFbFP bzw. YFP zu erkennen. Des Weiteren sind die Spektren des Riboflavins als Kofaktor des EcFbFPs und das Fluorescein als Referenzfarbstoff für YFP und deren spektrale Überlagerungen mit den jeweiligen Fluoreszenzreporterproteinen abgebildet.

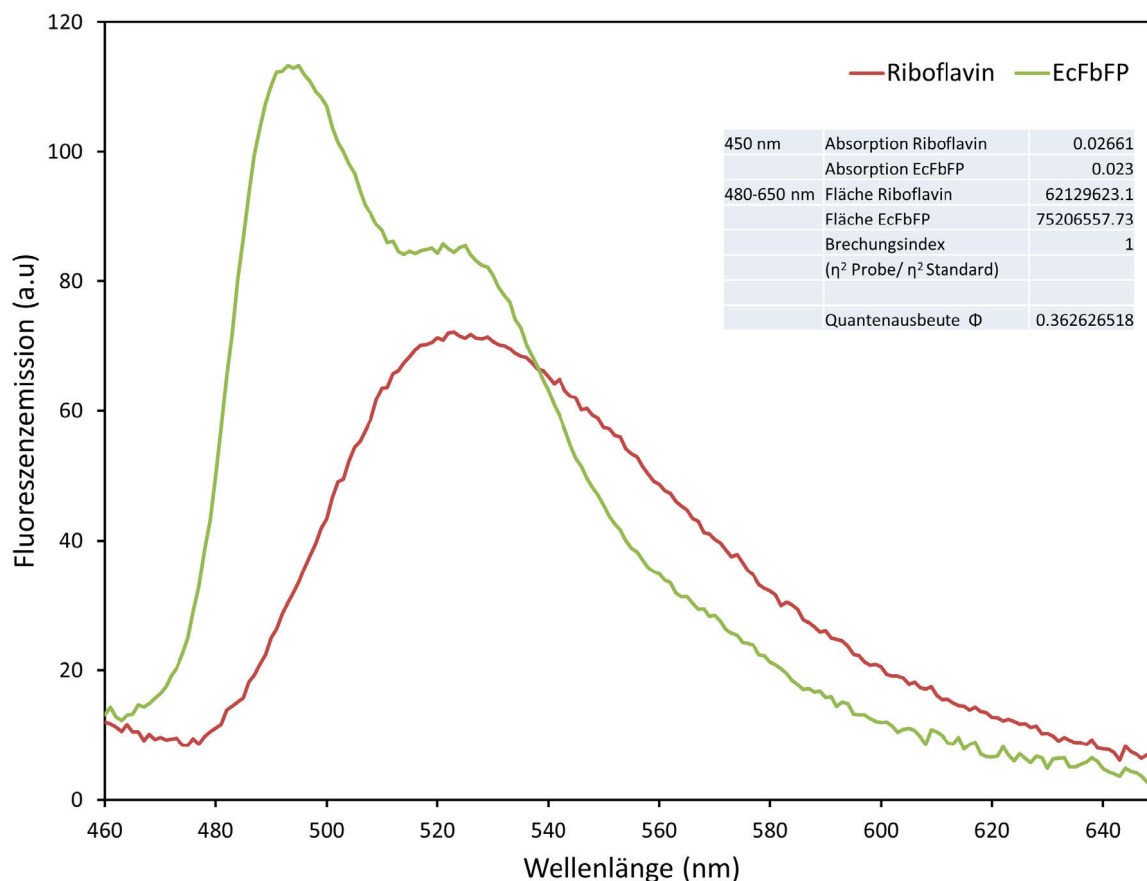


Abbildung 9: Fluoreszenzspektren des EcFbFP und des Riboflavins zur Quantenausbeute-Bestimmung.

Dargestellt sind die Fluoreszenzspektren des Fluoreszenzproteins EcFbFP und der Referenz Riboflavin ($\Phi = 0,26$ (Drössler et al., 2003; Holzer et al., 2002; P. Drossler, 2002)). Nach Integration der Kurven errechnet sich unter Einbeziehung der publizierten Quantenausbeute der Referenzsubstanz Riboflavin die FbFP-Quantenausbeute. Die Absorption zur Normierung der Fluoreszenzspektren sowie die Flächen unter den beiden Graphen und der zusätzlich hinzugezogene Brechungsindex des Lösungsmittels sind zusätzlich in einer Tabelle angegeben. Die errechnete Quantenausbeute beträgt $\Phi = 0,36$.

Anhand der Fluoreszenzspektren des Riboflavins und des EcFbFP wurde nach Integration der Kurven von 480 nm bis 650 nm die Flächen über einen bestimmten Wellenlängenbereich bestimmt und die Quantenausbeuten nach Normierung der Proteinabsorption auf eine Absorption von $\lambda_{450} = 0,02$ mit oben beschriebener Formel bestimmt. Diese niedrige Absorption λ_{450} der Proteinen wurde gewählt, da hier ein inneres Quenching, sprich ein auslöschen der Fluoreszenz benachbarter Proteine (40 - 80 Å) ausgeschlossen werden kann, was falschen Messergebnissen führen würde und somit die Berechnung der Quantenausbeute stark beeinflussen würde (Miller, 2005). Vorversuche haben gezeigt das Inneres Quenching erst bei Absorption über 0,5 bei den vorliegenden Proteinen auftritt. Zu beachten ist hierbei weiterhin die Verwendung der korrekten Referenz zur Berechnung der

Quantenausbeute. Hierzu wurden im Vorfeld zusätzliche Referenzsubstanzen wie Rodamin6G für das YFP und Fluorescein für das EcFbFP verwendet, um die geeignete Referenzsubstanz zu finden (Daten nicht gezeigt). Die hier gezeigten Kombination (Riboflavin/EcFbFP) und (Fluorescein/YFP) haben sich als die optimalen Kombinationen herausgestellt und wurden so auch in folgenden Versuchen ausschließlich verwendet.

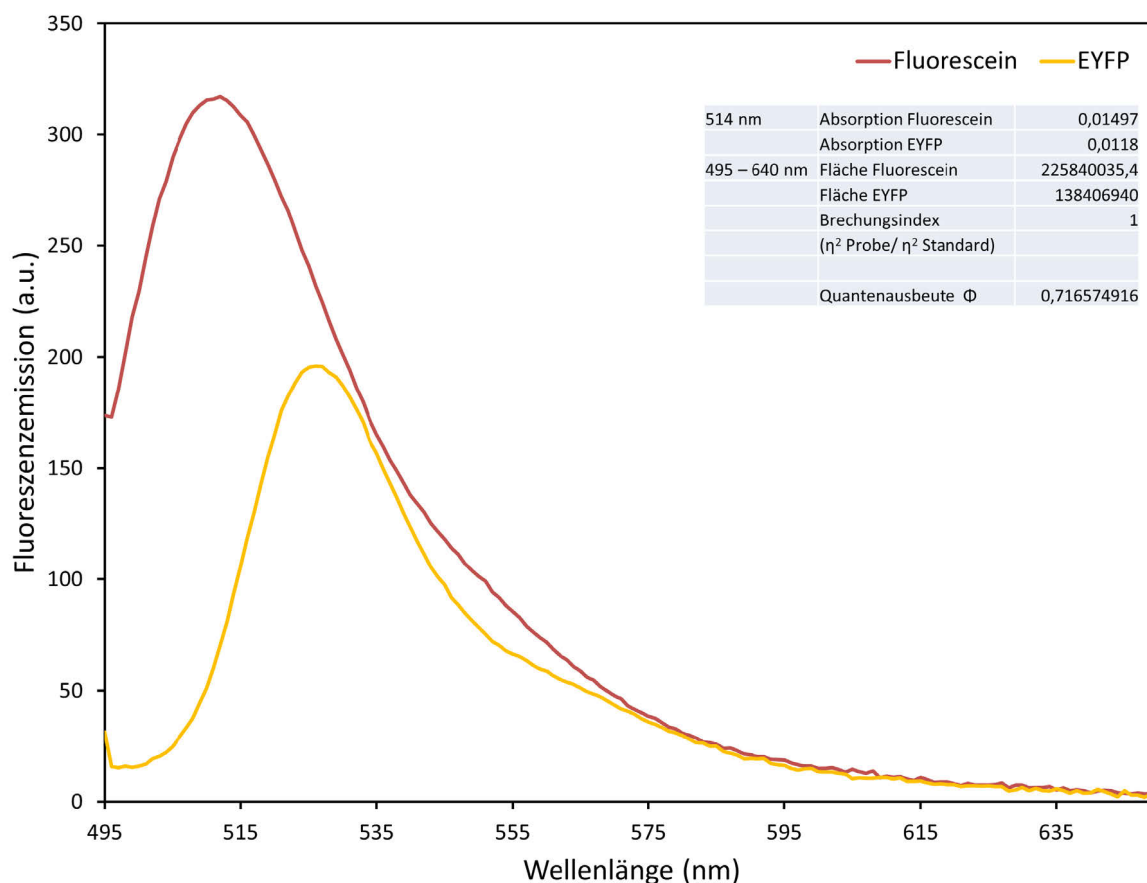


Abbildung 10: Fluoreszenzspektren des YFP und des Fluoresceins zur Quantenausbeute-Bestimmung.

Dargestellt sind die Fluoreszenzspektren des Reporterproteins YFP und der Referenz Fluorescein ($\Phi = 0,95$). Nach Integration der Kurven errechnet sich unter Einbeziehung der publizierten Quantenausbeute der Referenzsubstanz Fluorescein die YFP-Quantenausbeute. Die Absorption zur Normierung der Fluoreszenzspektren sowie die Flächen unter den beiden Graphen und der zusätzlich hinzugezogene Brechungsindex (dimensionslos) des Lösungsmittels sind zusätzlich in einer Tabelle angegeben. Die errechnete Quantenausbeute beträgt $\Phi = 0,72$.

Das EcFbFP entspricht hierbei mit einer gemessenen Quantenausbeute von 0,36 bzw. 36% den schon bereits publizierten Werten von $\Phi = 0,39$ für das EcFbFP (Drepper et al., 2010) zu 92,3%. Die Quantenausbeute des YFP wurde allerdings mit einer Φ von 0,72 bzw. 72%, anstelle der publizierten Quantenausbeute Φ von 0,63 (Heim et al., 1994; Kremers et al., 2006; Nagai et al., 2002; Ormö et al., 1996) für die weiteren Versuche festgelegt. Dies lässt sich auf unterschiedliche Versuchsbedingungen wie unterschiedliche Pufferzusammensetzungen zurückzuführen, weiterhin wurde von uns mit dem Spektrophotometer Quantamaster 40, PTI, korrigierte Fluoreszenzspektren aufgenommen.

Hierbei wurden die Wellenlängenabhängige Lichtintensitätsschwankungen der Halogenlampe berücksichtigt und die Wellenlängenabhängigen Sensitivitätsschwankungen des Detektors ebenfalls korrigiert (<http://www.pti-nj.com/>).

Die *in vitro* Charakterisierung der potentiellen FRET Donor- und Akzeptordomänen EcFbFP und YFP konnte somit erfolgreich abgeschlossen werden. Es konnten wichtige Eigenschaften wie die Quantenausbeute als auch die jeweiligen spektralen Eigenschaften wie die korrekten Absorptions- und Fluoreszenzmaxima der Protein stimmt werden. Geringe Abweichung wie zum Beispiel bei der Quantenausbeutebestimmung bei EcFbFP sind auf wechselnde Versuchsbedingungen bei der Aufreinigung sowie höchstwahrscheinlich nicht 100% beladene Proteine mit dem Kofaktor oder Verunreinigungen in der jeweiligen Probe zurückzuführen. Des Weiteren führen unterschiedliche Bedingungen wie unterschiedliche Temperaturen und geringe pH-Wert Abweichungen zu derartigen Schwankungen. Diese Abweichungen sind allerdings aufgrund der Fragestellung der allgemeinen Anwendbarkeit als Biosensoren vernachlässigbar.

3.4 Erzeugung eines FbFP-basierenden Biosensors zur quantitativen Detektion von Glukose

Nach erfolgreich abgeschlossener *in vitro* Charakterisierung der FRET-Donordomäne EcFbFP und der FRET-Akzeptordomäne YFP sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob die herkömmliche Donordomäne CFP durch FbFP ersetzt werden kann. Zu diesem Zweck wurde zunächst der bekannte Glukose-FRET-Biosensor (Frommer et al., 2009) modifiziert. Bei diesem Biosensor handelt es sich um ein CFP-YFP FRET-System, welches durch eine räumliche Konformationsänderung der metabolit-abhängigen Bindedomäne zwischen den beiden Fusionspartnern aktiviert werden kann. In diesem Biosensor wird die Konformationsänderung durch die Bindung eines Liganden, in diesem Fall Glucose, ausgelöst (Frommer et al., 2009).

Der Fluoreszenzreporter EcFbFP sollte hierbei das CFP als Donormolekül in dem bereits bestehenden Glukosebiosensorkonstrukt, bestehend aus CFP (Kremers et al., 2006) und dem YFP-Derivat Citrine (Deuschle et al., 2005b) ersetzen (vgl. Abb. 11). Dies geschah in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Martina Pohl. Wie Roland Moussa im Rahmen seiner Doktorarbeit feststellte, werden die Fluoreszenzintensitäten der FP-Fusionspartner des ursprünglichen CFP-Citrine-Biosensors durch unterschiedliche Parameter, wie dem pH-Wert, die Ionenstärke und weiterer Zellmetaboliten wie ADP und ATP signifikant beeinflusst (Moussa, 2012). Aus diesem Grund sollte im Rahmen einer Kooperation untersucht werden, ob in diesem Biosensordesign die Verwendung von EcFbFP als alternative FRET-Donordomäne zu einer Verbesserung der Biosensoreigenschaften führen kann. Um untersuchen zu können, ob die CFP-Donordomäne des Glukose-Biosensors CFP-mglb-Citrine durch FbFP in Hinblick auf eine effiziente FRET-Kopplung ersetzt werden kann, wurde

anstelle des CFP-Gens das EcFbFP-Gen verwendet. Das mglb-Gen codiert hierbei für die periplasmatische Bindedomäne MglB des Galaktose ABC Transporters MglBAC (Baba et al., 2006; Harayama et al., 1983; Hogg et al., 1991; Robbins et al., 1976). Um das rekombinante Biosensorgen zu erzeugen, mussten die einzelnen DNA-Fragmente, welche für die jeweiligen Fluoreszenzproteine sowie für die Glukosebindedomäne kodieren, mittels PCR amplifiziert werden. Dadurch wurden an den 5'- und 3'-Enden der Genabschnitte Restriktionsschnittstellen erzeugt, die eine schrittweise Klonierung in den Klonierungsvektor pET28a ermöglichten. Die Klonierungsstrategie ist in Abb. 11, das resultierende Endkonstrukt ist in Abb. 12 dargestellt. Das DNA-Fragment His₆-EK-mglb, das für einen Teil der Glukosebindedomäne mit N-terminalen His₆-Tag kodiert, beinhaltet neben dem His-Tag zur Aufreinigung des Sensors zusätzlich eine Enteropeptidase-Erkennungssequenz (EK), um den His-Tag vom endgültigen Biosensorprotein nach erfolgreicher Aufreinigung abtrennen zu können (Collins-Racie et al., 1995). Das zweite DNA-Fragment, welches für das EcFbFP kodiert, wurde an den Genabschnitt kloniert, welcher für die Glucose Bindedomäne kodiert. Das dritte DNA-Fragment kodiert für die zweite Hälfte des Glukosebindeproteins sowie für die FRET-Akzeptordomäne Citrine.

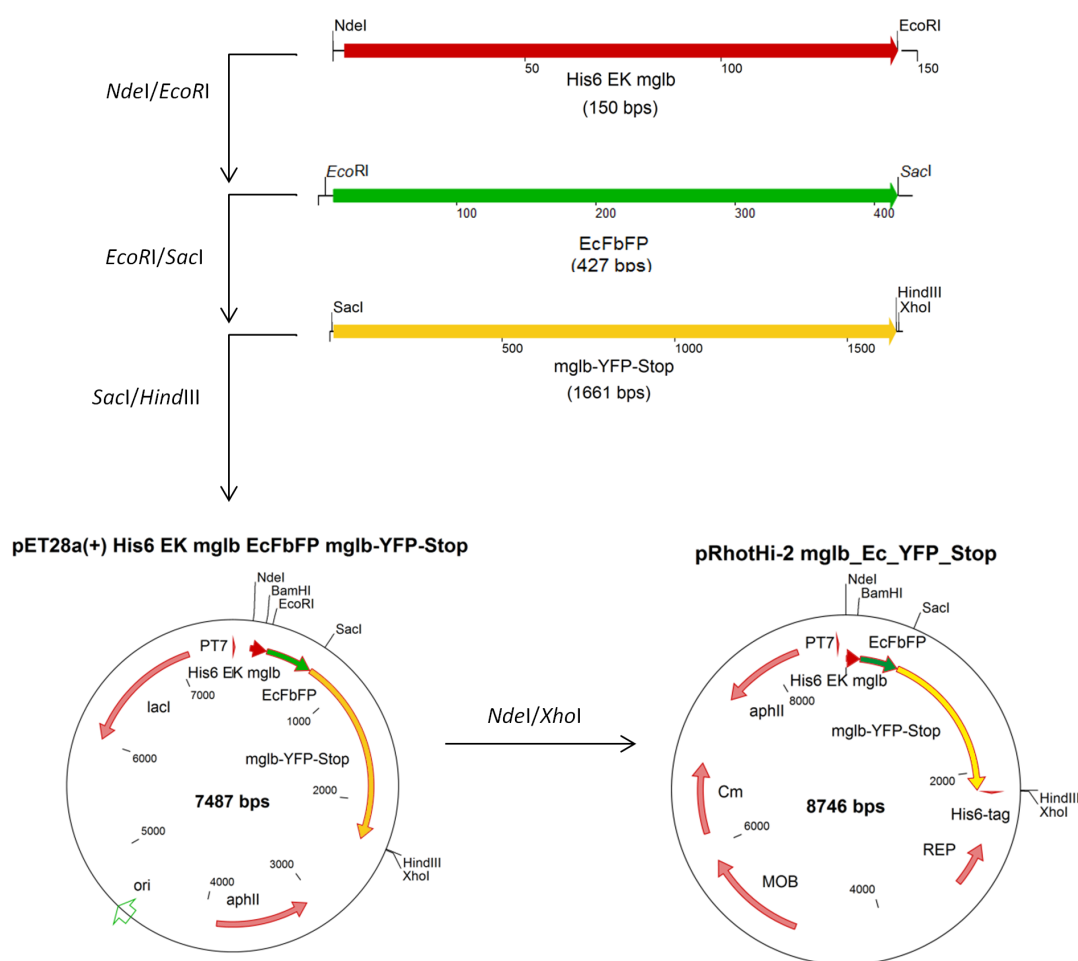


Abbildung 11: Klonierungsstrategie zur Erzeugung des FbFP-basierten Glukose-Biosensors.

Schematisch dargestellt ist die Klonierung des FbFP-basierenden Glukosebiosensors. Zusätzlich markiert sind die DNA-Bereiche, welche für die Restriktionsschnittstellen der Endonucleasen *NdeI/EcoRI*, *EcoRI/SacI* und *SacI/HindIII* der PCR-Produkte His₆-EK-mglb, EcFbFP und mglb-YFP-Stopp kodieren. Anhand einer Restriktion

mit Restriktionsendonukleasen, anschließender Ligation und Transformation in *E.coli* DH5 α -Zellen wurde die auf Restriktionschnittstellen basierende Klonierung durchgeführt. Als Plasmidkarten sind die beiden Endkonstrukte FbFP-mglb-YFP in den Plasmiden pET28a und pRhotHi-2 dargestellt. Die Genbereiche, die für die Glukosebindedomäne, das EcFbFP bzw. das YFP kodieren sind als roter, grüner bzw. gelber Pfeil in den Plasmidkarten markiert.

Zur Expression des neuen FbFP-basierten FRET-Biosensors wurde die DNA-Region, die für die gesamte Genfusion kodiert, in das Plasmid pRhotHi-2 kloniert. Hierbei handelt es sich um ein Plasmid mit einem breiten Wirtsspektrum, in dem das Gen unter Kontrolle des T7-Promoters, welcher sich stromaufwärts von dem Biosensorgen befindet und durch die T7-Polymerase spezifisch erkannt wird, liegt. Um eine direkte Vergleichbarkeit zu dem ursprünglichen CFP-basierten Biosensor zu gewährleisten, wurde die vollständige DNA-Region, inklusive des Abschnitts für den N-terminalen His-Tag, verwendet. Um zu vermeiden, dass der Biosensor nach der Expression einen zusätzlichen His₆-Tag am C-Terminus trägt, wurde am 3'-Ende des rekombinanten Biosensorgens ein entsprechendes Stopcodon eingefügt. An Abbildung 12 ist der schematische Aufbau des FbFP-basierende Glukosebiosensorgens zu erkennen.

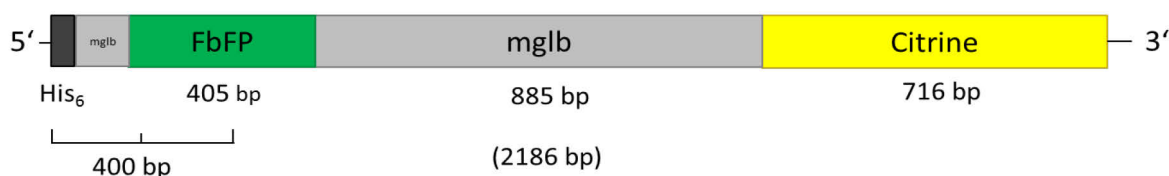


Abbildung 12: Schematischer Aufbau des FRET-Biosensorkonstruktes FbFP-mglb-Citrine.

Zu erkennen ist der Aufbau des rekombinanten Gens mit DNA-Abschnitten die für die Fluoreszenzreporter Citrine und EcFbFP und der Glukosebindedomäne kodieren. In grün dargestellt ist die DNA-Region welche für das FbFP-Gen kodiert, welches von den in grau dargestellten DNA-Regionen flankiert wird, welche für die Glukosebindedomäne mglb kodieren. In Gelb wiederum ist die DNA-Region zu erkennen welche für das Citrine-Gen kodiert. Die Größe ist in Basenpaaren (bp) angegeben, die Gesamtgröße beträgt 2186 bp.

Um die Fragestellung klären zu können, ob mit dem EcFbFP ein FRET-Donormolekül vorliegt mit dem ein effektiver FRET auf das Akzeptormolekül Citrine möglich ist, wurde die potentielle FRET-Fusion zunächst überexprimiert. Hierzu wurde der *E.coli*-Stamm BL21(DE3) mit dem FRET-Biosensorgen FbFP-mglb-YFP, welches auf dem Expressionsplasmid pRhotHi-2 kodiert vorlag, transformiert und die Expression mit IPTG induziert. Nach 24 stündiger Kultivierung wurde das Fusionsprotein wie in Kapitel 2.9.3 beschrieben über den His₆-Tag mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt und in Proteinlagerpuffer (10 mM NaH₂PO₄, 10 mM NaCl, pH 8) aufgenommen. Anschließend konnten die spektralen Eigenschaften im Fluoreszenzphotometer untersucht werden. Hierzu wurde die FbFP-Donordomäne des Fusionsproteins mit Licht der Wellenlänge von 450 nm angeregt und ein Fluoreszenzemissionsspektrum von 460 – 700 nm aufgenommen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt. Deutlich zu erkennen sind die spezifischen Fluoreszenzmaxima der jeweiligen FRET-Fusionspartner.

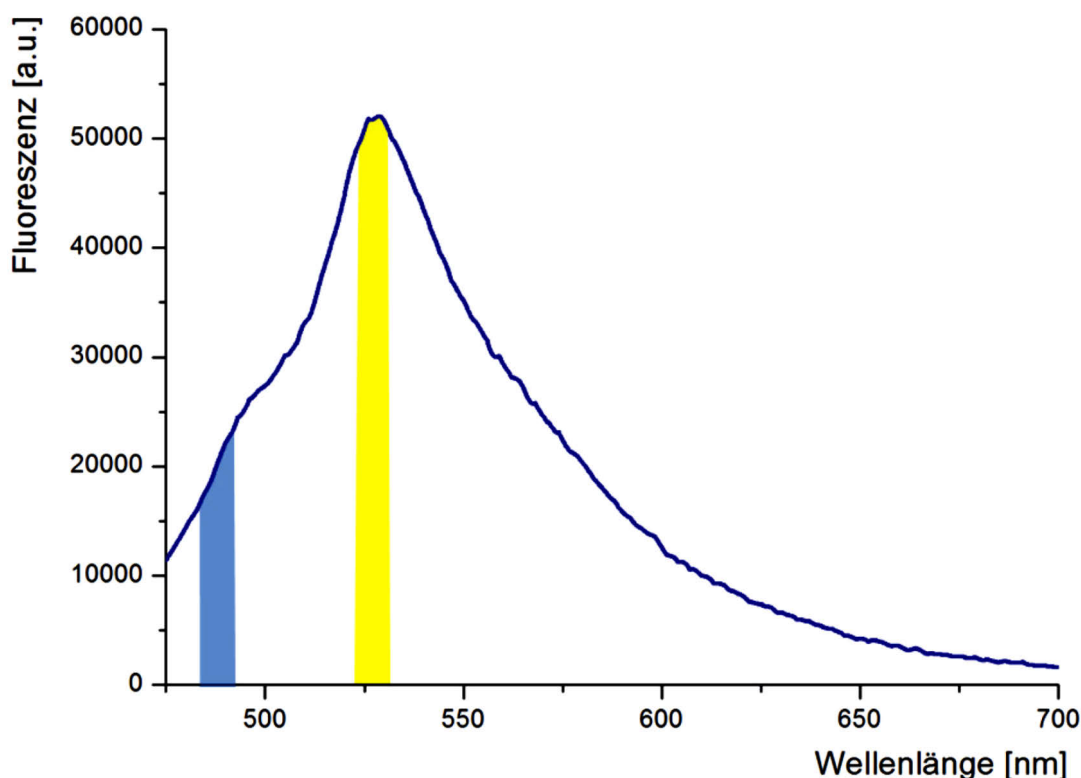


Abbildung 13: Fluoreszenzspektrum der FbFP-mglb-Citrine FRET-Fusion (nach Doktorarbeit Moussa 2012).

Um zu überprüfen, ob die FbFP-Citrine-Fusion ein funktionelles FRET-System ist, wurde die FRET-Donordomäne mit blauem Licht der Wellenlänge 450 nm in Abwesenheit von Glukose angeregt. Die Proteinkonzentration betrug $0,5 \text{ mg}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ in 20 mM MOPS pH 7,3; 25 °C. Farblich hervorgehoben sind die Maxima der jeweiligen Fluoreszenzproteindomänen (blau: EcFbFP 495 nm; gelb: Citrine 527 nm). Die Fluoreszenzemission ist in relativen Einheiten (a.u.) dargestellt. Der Versuch wurde im Rahmen der beschriebenen Kooperation von R. Moussa durchgeführt und in seiner Doktorarbeit ursprünglich beschrieben.

Anhand der blauen Markierung lässt sich das Maximum von dem FRET-Donor EcFbFP erkennen, an der gelben Markierung das Fluoreszenzmaximum von dem FRET-Akzeptor Citrine. Anhand des hohen FRET-Verhältnisses des FRET-Systems bei der Anregung bei 450 nm kann vermutet werden, dass hier tatsächlich eine FRET-Kopplung zwischen dem FbFP und Citrine stattfindet. Es scheint also grundsätzlich möglich zu sein den Fluoreszenzreporter EcFbFP als Donor gemeinsam mit dem Akzeptor YFP in einem FRET-System einzusetzen. Ob jedoch FbFP im Vergleich zu CFP die Eigenschaften von FRET-Biosensoren mit Metabolit-Bindedomänen verbessern kann, soll nun in einer zukünftigen Kooperation mit der Gruppe von Prof. Dr. M. Pohl eingehend untersucht werden.

3.5 Konstruktion einer FbFP-YFP FRET-Fusion als Sauerstoff- bzw. pH-Sensor

Analog zu den bereits bestehenden CFP-YFP-basierten FRET-Systemen, die über die erhöhte Sensitivität der YFP-Fluoreszenz beispielsweise als FRET-Biosensoren zur Detektion des pH-Wertes oder von Chlorid-Ionen zum Einsatz kommen, sollte zunächst ein EcFbFP-YFP Fusionsprotein konstruiert und anschließend eingehend überprüft werden, ob das FbFP anstelle des CFPs als Donormolekül für die FRET-Akzeptordomäne YFP eingesetzt werden kann. Das 1194bp große rekombinante Gen konnte erfolgreich in das *broad host range* Expressionsplasmid pRhotHi-2 kloniert werden. Da sich auf diesem Vektor ausschließlich die Erkennungssequenz der T₇-Polymerase befindet und keine *E. coli*-spezifische RNA-Polymerase, ist eine gezielte Induktion der Genexpression möglich, ohne eine basale Expression durch die wirtsspezifischen Polymerasen zu aktivieren. Die FbFP-YFP-Fusionsgene konnten wie auf dem Klonierungsschema in Abbildung 14 dargestellt, erfolgreich von dem Klonierungsplasmid pBluescript II SK (+) mittels *Nde*I/ *Xho*I Restriktionsverdau und anschließender Ligation in das Expressionsplasmid kloniert werden. Die korrekte Sequenz des FbFP-YFP-Gens wurde mittels Sequenzierung verifiziert (vgl. Anhang).

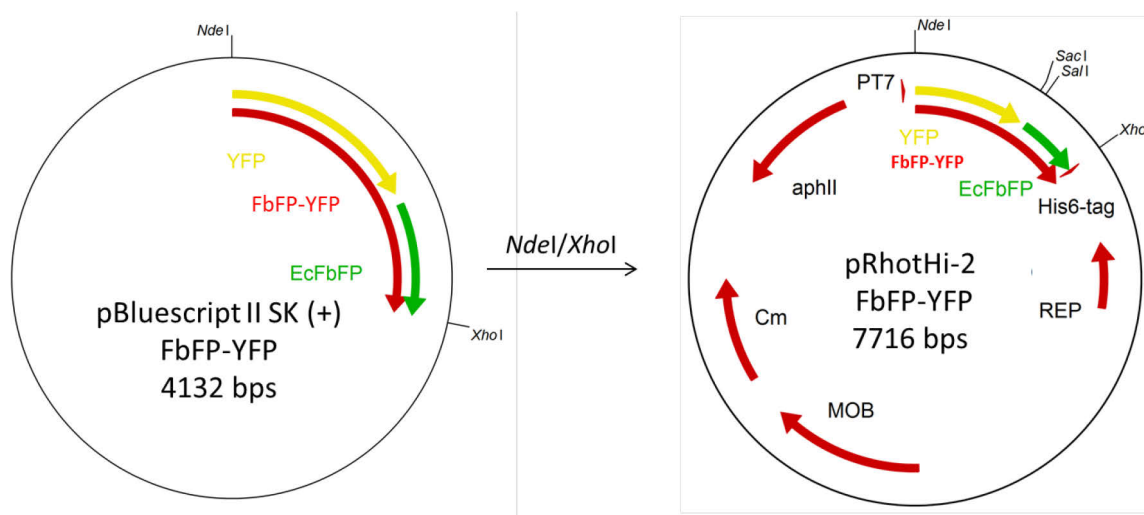


Abbildung 14: Klonierungsstrategie zur Erzeugung des FbFP-basierten Biosensors.

Schematisch dargestellt ist die Klonierung des FbFP-basierenden Sauerstoffbiosensors. Zusätzlich markiert sind die DNA-Bereiche, welche für die Restriktionschnittstellen der Endonucleasen *Nde*I, *Sac*I, *Sal*I und *Xho*I kodieren. Anhand einer Restriktion mit den Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Xho*I, anschließender Ligation und Transformation in *E. coli* DH5 α -Zellen wurde die auf Restriktionschnittstellen basierende Klonierung durchgeführt. Als Plasmidkarten sind die beiden Konstrukte FbFP-YFP in den Plasmiden pBluescript II SK (+) und pRhotHi-2 dargestellt. Die Genbereiche die für die FbFP-YFP-Fusion, das EcFbFP bzw. das YFP kodieren sind als roter, grüner bzw. gelber Pfeil in den Plasmidkarten markiert.

In Abbildung 15 ist das rekombinante Gen dieser YFP-FbFP Translationsfusion schematisch dargestellt. Es sind die Genabschnitte zu erkennen, die für die jeweiligen FRET-Domänen kodieren. Als FRET-Akzeptor im Falle der FbFP-YFP-Fusion wurde eine Farbvariante des GFP ausgewählt. In allen nachfolgenden Experimenten bezüglich der FbFP-YFP Fusion wurde das

als GFP 10C Mutante publizierte YFP verwendet (Ormö et al., 1996) und nachfolgend als YFP bezeichnet.

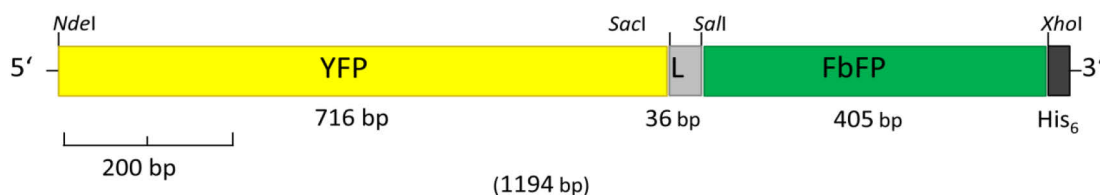


Abbildung 15: Schematischer Aufbau des FRET-Biosensorkonstruktes FbFP-YFP.

Zu erkennen ist der Aufbau des rekombinanten Gens mit Abschnitten für die Fluoreszenzreporter YFP und EcFbFP und den Linker, welcher für eine Thrombin-Schnittstelle kodiert. Weiterhin dargestellt sind die benötigten Restriktionschnittstellen zur Klonierung dieses Translationsfusionsgens. Die Größe ist in Basenpaaren (bp) angegeben, die Gesamtgröße beträgt 1194 bp.

Die verwendete YFP Variante trägt die Substitution H231L, welche die Verschiebung der Absorptionswellenlänge von 489 nm auf 514 nm und die Verschiebung der Emissionswellenlänge von 511 nm auf 527 nm verursacht. Weiterhin ist bei dieser Variante ein Valin hinter der ersten Aminosäure inseriert, was zu einer erhöhten Löslichkeit des Proteins führt (Heim et al., 1994; Heim and Tsien, 1996; Kremers et al., 2006; Ormö et al., 1996). Des Weiteren ist ein DNA-Abschnitt zu erkennen der für einen Linkerbereich kodiert. In dem enthalten sind die DNA-Bereich, welche Erkennungssequenzen für Endonucleasen *SacI* und *SalI* enthalten. Diese sind eingefügt worden, falls die vorliegenden Genabschnitte zur Konstruktion weiterer Biosensoren oder Proteinfusionen benötigt werden. In dem Linkerbereich befindet sich weiterhin die Erkennungssequenz für Schnittstelle der Protease Thrombin, zur spezifischen Trennung des potentiellen FRET-Systems.

3.6 *In vitro* Charakterisierung der FbFP-YFP-Fusion

Da aufgrund der in Abb. 13 gezeigten Ergebnisse die prinzipielle Eignung von FbFP als mögliche FRET-Donordomäne für YFP lediglich vermutet werden kann, sollte nun zunächst überprüft werden, ob innerhalb des Fusionsproteins eine effiziente FRET-Kopplung realisiert wird. Um diesen Sachverhalt zu klären, bedarf es einer ausführlichen *in vitro* Charakterisierung, um die spektralen Eigenschaften des FbFP-YFP Konstrukts analysieren und die FRET-Effizienz bestimmen zu können. Hierzu sollten die folgenden Aspekte untersucht werden: (1) Einfluss des Förster Resonanz Energie Transfers auf die spezifische Absorption und Fluoreszenz des FRET-Fusion Systems; (2) Änderung der Fluoreszenzlebensdauer des Donors FbFP durch FRET und (3) Nachweis des intramolekularen FRET-Ereignisses durch den Vergleich der Fluoreszenzeigenschaften von FbFP und YFP vor und nach der Hydrolyse der FRET-Fusion.

Um die obengenannten *in vitro* Tests realisieren zu können, wurde der Expressionsvektor pRhotHi-2-FbFP-YFP in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) transformiert und anschließend die *E. coli*-Zellen in Autoinduktionsmedium kultiviert. Nach der Expression des FbFP-YFP-Fusionsproteins folgte ein Zellaufschluss mittels French press (vgl. Kapitel 2.9) und eine

Aufreinigung des Zielproteins über eine NiNTA-Matrix-Säule (vgl. Kapitel 2.9). Zusätzlich wurde nach Aufschluss der *E.coli* Zellen zur eindeutigen Detektion der Fusion und zur Überprüfung der Löslichkeit bzw. zum Nachweis möglicher Bildung von Einschlusskörperchen, sogenannten *inclusion bodies* (Lathrop et al., 1992), von der löslichen und unlöslichen Fraktion ein Western-Blot durchgeführt und die Proteine spezifisch mit His₆-Antikörper nachgewiesen (siehe Anhang). Anhand der Abbildung lässt sich erkennen, dass ca. 80 % der Fusion in löslicher Form in den *E. coli*-Zellen vorlag, was auf optimale Expressionsbedingungen schließen lässt.

Um nachweisen zu können, dass es sich bei dem aus der Aufreinigung gewonnenen Protein um das FbFP-YFP Fusionsprotein handelte und um die Reinheit des gewonnenen Proteins bestimmen zu können, wurde eine SDS-PAGE und ein Western Blot durchgeführt (vgl. Kap.2.9.5 und 2.9.7) mit dessen Hilfe anhand der erwarteten spezifischen Proteingröße (55 kDa) der YFP-FbFP-Fusion eindeutig identifiziert werden konnte. Das Fusionsprotein wurde zur weiteren Charakterisierung der spektralen Eigenschaften weiterverwendet.

3.6.1 Spektrale Analyse der FbFP-YFP-Fusion

Da die Fusionierung von zwei Proteinen grundsätzlich zu einer Veränderung der jeweiligen Proteinstruktur und somit zu einer Beeinträchtigung bzw. zum Verlust der individuellen Proteinfunktion führen kann, sollte zunächst untersucht werden, ob die Donor- und Akzeptordomäne des FP-Fusionsproteins eine korrekte Faltung und Chromophor-Reifung (YFP) bzw. –Beladung (FbFP) aufwiesen. Hierzu wurden Absorptions- und Fluoreszenzspektren des FbFP-YFP-Fusionsproteins aufgenommen, um die spektralen Eigenschaften analog zu den Einzelkonstrukten YFP und EcFbFP zu bestimmen. Das Absorptionsspektrum ist in Abbildung 16 dargestellt.

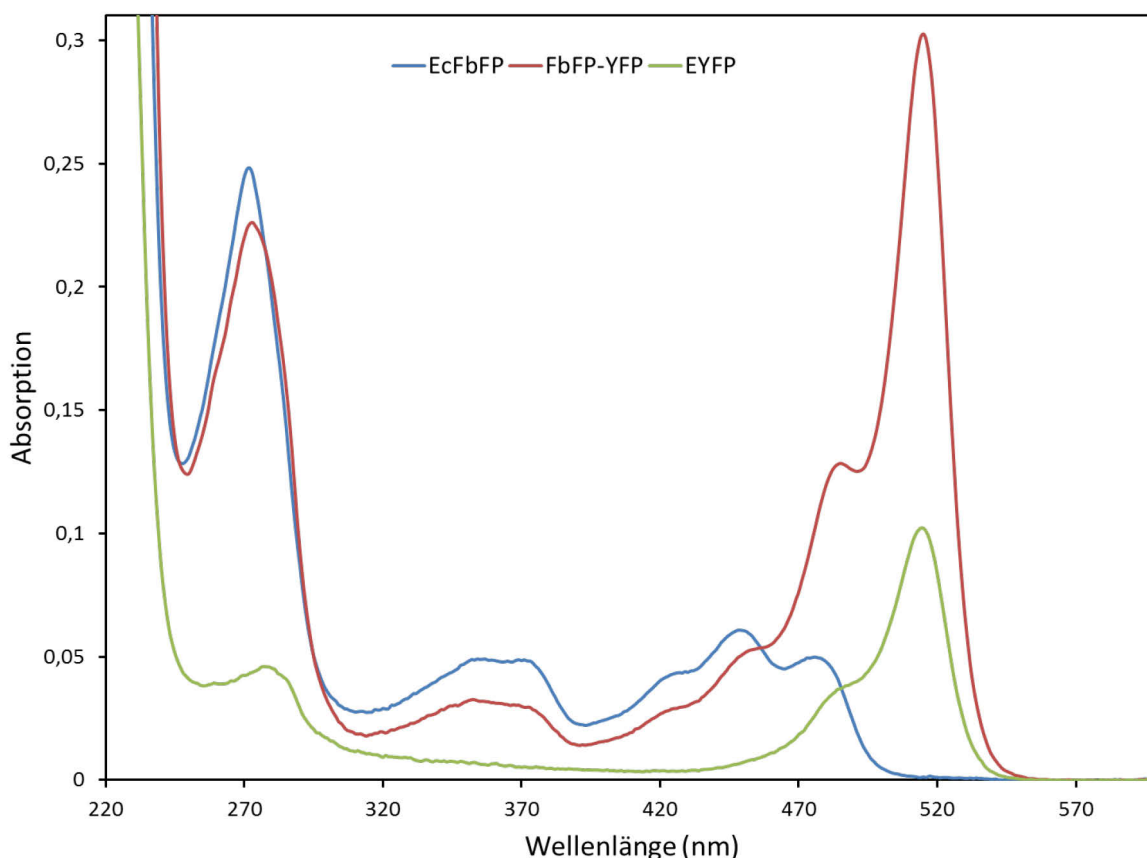


Abbildung 16: *In vitro* Absorptionsspektren der Fluoreszenzproteine EcFbFP und EYFP sowie des Fusionsproteins YFP-FbFP.

Die Absorptionsspektren von EcFbFP, YFP und FbFP-YFP wurden in einem Wellenlängenbereich von 220 – 590 nm aufgenommen. Die Proteine EcFbFP und FbFP-YFP wurden auf eine Absorption $\lambda_{450 \text{ nm}}$ von 0,05 normiert, das YFP Protein wurde, da es im Bereich von 450 nm keinerlei Absorption aufweist auf eine Absorption bei $\lambda_{514 \text{ nm}}$ auf 0,1 eingestellt. Deutlich zu erkennen sind die Maxima der jeweiligen Proteine bzw. Proteinfusion (EcFbFP: 450 nm; YFP: 514 nm; FbFP-YFP: 450 nm und 514 nm). Die Absorption ist in relativen Einheiten (a.u.) angegeben.

Zu erkennen an der blauen Kurve ist das charakteristische Absorptionsspektrum des EcFbFP. Das Absorptionsmaximum liegt bei 450 nm, weiterhin zu erkennen ist ein weiteres relativ breites Maximum bei dem Wellenlängenbereich von ca. 350 nm, welche auf die Absorption des Kofaktors FMN zurückzuführen ist. Als grüne Kurve graphisch dargestellt ist das typische Absorptionsspektrum des YFP mit einem Hauptmaximum bei 514 nm und einer Absorptionsschulter bei 488 nm. Anhand der roten Kurve (FbFP-YFP) sind die spezifischen Absorptionsmaxima der Fusionsproteine bei ca. 350 nm und 450 nm für EcFbFP sowie bei 488 nm und 514 nm für YFP klar zu erkennen. Bei der Wellenlänge 272 nm ist bei allen drei Proteinabsorptionsspektren die Absorption der aromatischen Aminosäuren zu erkennen. Anhand des Verhältnisses der Höhe der spezifischen Absorption der Proteine und der Absorption des Chromophors zur Ausbildung der spezifischen Fluoreszenzemission lässt sich unter anderem auch der Extinktionskoeffizient eines Proteins abschätzen. Wichtig wird eine solche Abschätzung bei Fusionsproteinen wie der vorliegenden FbFP-YFP-Fusion. Hierbei ließe sich anhand der Absorptionsspektren und der bekannten Extinktionskoeffizienten eine

Aussage darüber treffen, inwieweit die Proteine in der Fusion ihre normale Absorption beibehalten oder inwiefern diese sich gegenseitig zum Beispiel sterisch behindern und somit weniger elektromagnetische Strahlung absorbieren können, was einen direkten Effekt auf die Ausbildung einer Fluoreszenz bzw. einen eventuellen Energieübertrag in einem potentiellen FRET-System hat (Lakowicz, 2006). Vergleicht man die Verhältnisse der Absorption bei 272 nm (absolute Proteinabsorption) und der Absorption der Fluoreszenzproteine bei $\lambda_{450 \text{ nm}}$ (relative Absorption der an der Fluoreszenz beteiligten Proteine) in den Verhältnisse der jeweiligen Absorptionen in der Fusion, lässt sich erkennen, dass im Falle von EcFbFP in beiden Fällen nahezu das gleiche Verhältnis zwischen absoluter und spezifischer Absorption bei 450 nm vorliegt. Im Falle von YFP ist ein direkter Vergleich der Verhältnisse der absoluten Absorption des Protein und der spezifischen Absorption bei der Wellenlänge 514 nm weitaus schwieriger, da ein Großteil der absoluten Absorption in der Fusion von dem EcFbFP herrührt. Das Verhältnis der absoluten Absorption der FbFP-YFP-Fusion und der spezifischen Absorption des YFPs bei 514 nm beträgt hierbei nicht mehr, wie im Einzelprotein $\frac{1}{2}$ sondern $\frac{1}{1,4}$. Als erste Einschätzung lässt sich sagen, dass beide Fusionsproteine soweit in der Fusion korrekt gefaltet und in einem aktiven Zustand vorliegen, da beide Fluoreszenzproteine eine spezifische Absorption bei der typischen Wellenlänge aufweisen. Das EcFbFP zeigt hierbei ein beinahe identisches Verhältnis zwischen absoluter und relativer Absorption was auf eine korrekte Absorption hinweist. Die spezifische Absorption des YFPs ist hingegen nach erster Abschätzung leicht erniedrigt, da das Verhältnis zwischen absoluter und spezifischer Absorption der Fusion nicht der des Einzelproteins entspricht. In wieweit die vorliegende Fusion aus EcFbFP und YFP die jeweiligen Proteine nicht in ihrer spektralen Eigenschaft behindert und ob dies einen funktionellen Einfluss auf die zu erwartende FRET-Fusion hat, lässt sich zu diesem Zeitpunkt noch nicht mit Sicherheit sagen. Die Effizienz eines möglichen FRET-Systems und die weiteren spektralen Eigenschaften, wie die Fluoreszenzlebensdauer und die spezifischen Fluoreszenzemissionen sollten im Folgenden Klarheit über die Funktionalität der Fluoreszenzproteine in der FRET-Fusion bringen. Zur weiteren Überprüfung der spektralen Eigenschaften des FRET-Systems wurden Fluoreszenzemissionsspektren aufgenommen. Diese sind in Abbildung 17 dargestellt. Zu erkennen sind hierbei die überlagerten Fluoreszenzemissionen der FRET-Fusion FbFP-YFP und der einzelnen Proteine EcFbFP und YFP nach Anregung mit einer Wellenlänge von 450 nm. In allen drei Fällen ließen sich die charakteristischen Fluoreszenzemissionsmaxima nachweisen. Das FRET-Donorprotein EcFbFP emittiert sowohl in unfusionierten als auch im fusionierten Zustand wie erwartet Licht bei einer Wellenlänge von 495 nm, der FRET-Akzeptor YFP bei erwarteten 527 nm. Hervorzuheben ist hierbei die Abnahme der Fluoreszenzintensität des Donors im FRET-System gegenüber der unfusionierten Domäne, was auf einen erfolgreichen Energieübertrag vom Donormolekül EcFbFP auf das Akzeptormolekül YFP zurückzuführen ist. Der FRET-Akzeptor absorbiert hierbei die Energie und emittiert diese in Form von Fluoreszenz, was eine geringere Donorfluoreszenz zur Folge hat. Vergleicht man hierbei die FRET-Verhältnisse der FbFP-YFP-Fusion (7,5) mit dem FRET-Verhältnis der FbFP-mglb-Citrine-Fusion (2,75) lässt sich erkennen, dass das FRET-Verhältnis der FbFP-YFP-Fusion um einen Faktor 3 höher ist im

Vergleich zum FRET-Verhältnis der FbFP-mglb-Citrine-Fusion, was auf einen effektiven FRET schließen lässt. Anhand der Absorptions- und Fluoreszenzspektren (vgl. Abb. 16 und 17) muss allerdings auch davon ausgegangen werden, dass die in Abbildung 17 gezeigte Fluoreszenzemission des fusionierten FRET-Akzeptors YFP (rote Kurve) nicht nur von dem Energieübertrag auf das Molekül herrührt sondern eventuell auch durch eine direkte Absorption des YFPs zustande kommt.

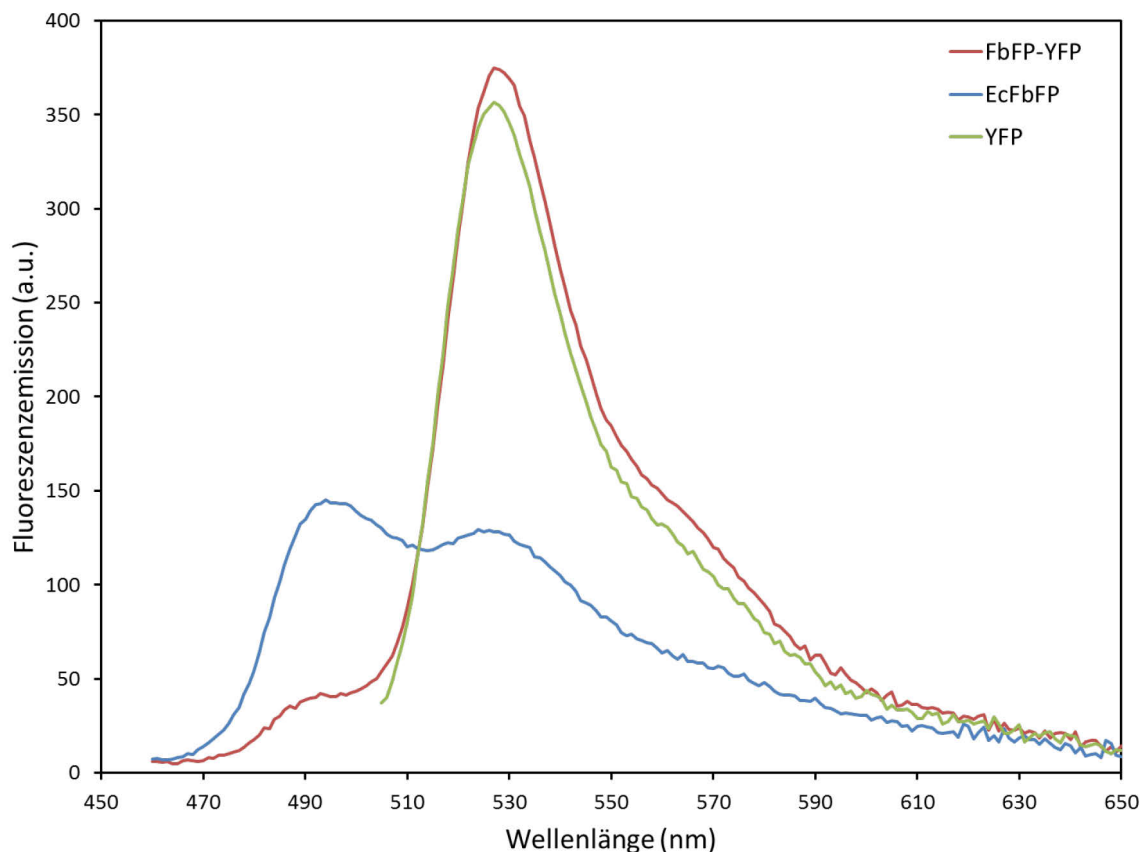


Abbildung 17: *In vitro* Fluoreszenzspektren der Fluoreszenzproteine EcFbFP und EYFP sowie des Fusionsproteins YFP-FbFP.

EcFbFP und FbFP-YFP wurden bei $\lambda_{450 \text{ nm}}$ angeregt. Die Proteine EcFbFP und FbFP-YFP wurden auf eine Absorption bei 450 nm von 0,05 normiert. Das EYFP Protein wurde, da es im Bereich von 450 nm keinerlei Absorption aufweist, auf eine Absorption bei 500 nm auf 0,1 eingestellt. Deutlich zu erkennen sind die Maxima der jeweiligen Proteine bzw. Proteinfusion (EcFbFP 495 nm; EYFP 527 nm; FbFP-YFP 495 nm und 527 nm). Die Fluoreszenzemission ist in relativen Einheiten (a.u.) dargestellt.

In Bezug auf die optimale Anregungswellenlänge des zu testenden FRET-Systems lässt sich folgendes schlussfolgern: Würde der FRET-Donor EcFbFP bei seinem optimalen Absorptionsmaximum (450 nm) angeregt, könnte das YFP nicht nur über einen FRET-Übertrag seitens des EcFbFPs angeregt werden, sondern auf Grund der Absorption bei 450 nm auch direkt angeregt werden. Dies hätte wahrscheinlich eine YFP-vermittelte Fluoreszenzemission zur Folge, die nicht ausschließlich von dem FRET-Ereignis herrührt. Um eine direkte Anregung von YFP zu vermeiden, musste die für das FRET-System optimale Donor-Anregungswellenlänge ermittelt werden. Um den Effekt der direkten Absorption seitens des YFPs zu minimieren, wurde anhand eines zweidimensionalen Anregungs- und Emissionswellenlängenscans (2D Scan (vgl. Abbildung 18)) die optimale Wellenlänge zur

Anregung des FRET-Systems ermittelt. Hierbei lassen sich Fluoreszenzspektren im gewünschten Anregungswellenlängenbereich aufnehmen. Dies ist zum Beispiel bei Proteinen mit unbekannten spektralen Eigenschaften erforderlich, um deren optimale Anregungswellenlänge zur Identifizierung des Fluoreszenzemissionsmaximums ermitteln zu können.

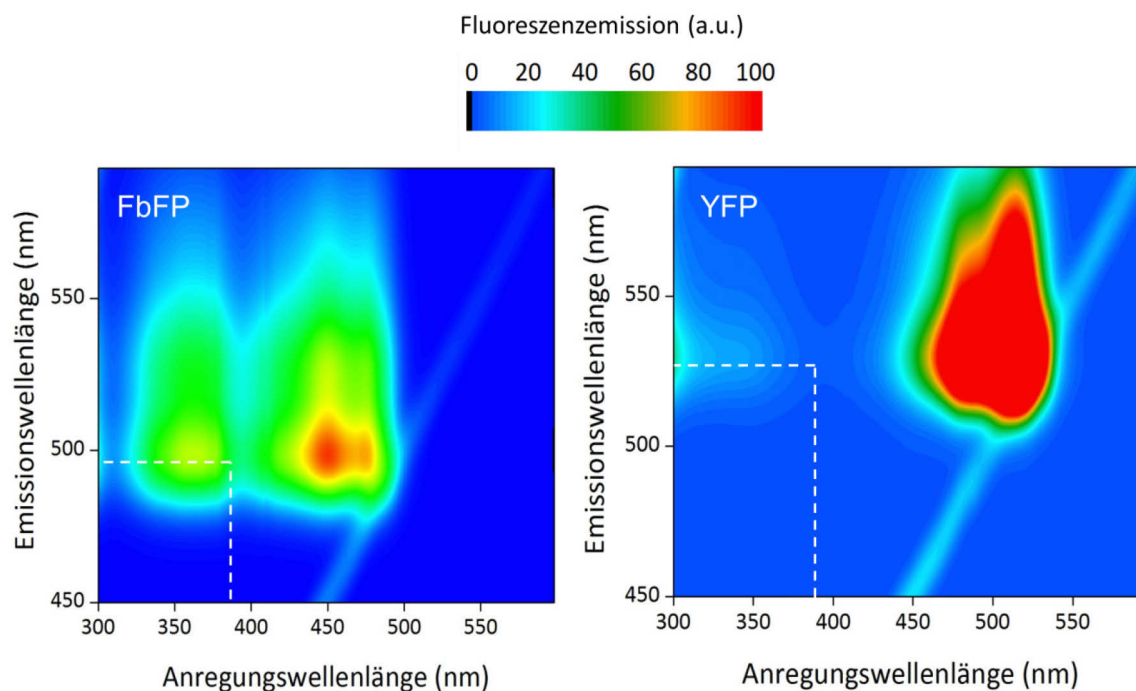


Abbildung 18: Zweidimensionaler Anregungs- und Emissionswellenlängenscan des EcFbFP und EYFP.

Für diese Analyse wurde das jeweilige FP im Fluoreszenzphotometer bei Wellenlängen von 300-600 nm angeregt und die daraus resultierende Fluoreszenzemission von 450-600 nm detektiert. Hier gezeigt ist die graphische Auftragung der Anregungswellenlänge gegen die Emissionswellenlänge des EcFbFP und YFP. Die optimale Anregungswellenlänge des Sensors ist mit weißen gestrichelten Linien markiert und beträgt 380 nm.

Zu erkennen ist der 2D Scan des EcFbFP und des YFP. Hierbei werden von der Probe von 300 nm bis 600 nm mit einem Inkrement von 2 nm Fluoreszenzscans durchgeführt, welche eine Fluoreszenz über einen Bereich von 450 nm bis 600 nm detektieren. Farbig gekennzeichnet ist hierbei die jeweilige Intensität der Fluoreszenzemission der jeweiligen Proteine, wobei die Intensitäten an der oberhalb abgebildeten Skala dargestellt sind. Zu erkennen sind hierbei die Fluoreszenzspektren in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge. Deutlich detektiert werden konnten hierbei die Anregungswellenlängenbereiche mit denen man eine maximale Fluoreszenzemission erreichen kann. Bei dem EcFbFP lässt sich so das bereits publizierte Fluoreszenzemissionsmaximum von 495 nm auf der Y-Achse bei einer optimalen Anregungswellenlänge von 450 nm (x-Achse) bestimmen (Drepper et al., 2007). Ein weiteres Fluoreszenzmaximum bei 495 nm lässt sich nach Anregung mit einer Wellenlänge in den Bereich von 350 nm erkennen. Des Weiteren erkennbar ist der breite charakteristische Verlauf der Fluoreszenzspektren im Bereich von 500-550 nm des EcFbFP, hervorgerufen von dem fluoreszenten Cofaktor FMN (Christie et al., 1998; Losi et al., 2005; Losi et al., 2002). Das rechte Diagramm zeigt den 2D-Scan des YFPs. Die Z-Achse (Fluoreszenzintensität) ist

hierbei so skaliert das auch geringe Fluoreszenzemissionen dargestellt werden können. So ist hier ein relativ großer Anregungswellenlängenbereich 450 nm bis 530 nm von hoher Intensität um das Fluoreszenzmaximums des YFPs von ca. 527 nm zu erkennen. Weiterhin sichtbar wird, dass sich im Gegensatz zum EcFbFP beim YFP kein weiteres Fluoreszenzmaximum detektieren lässt, was sich ebenfalls mit in der Literatur dargestellten Ergebnissen deckt (Cubitt et al., 1995; Heim et al., 1995; Kremers et al., 2006; Nagai et al., 2002). Dieser Ausschnitt wurde mit Absicht so gewählt, dass auch diejenigen Anregungswellenlängen zu erkennen sind, bei denen eine geringe Fluoreszenzemission seitens des YFPs stattfindet, um diejenigen Anregungswellenlängen zu finden, bei denen fast ausschließlich das EcFbFP als potentieller FRET-Donor angeregt werden sollte, nicht aber der potentielle FRET-Akzeptor YFP. Als gestrichelte Linien abgebildet ist hierbei die optimale Anregungswellenlänge der FRET-Fusion, welche für das FbFP-YFP 380 nm beträgt. Bei dieser Wellenlänge weist das Akzeptormolekül YFP so gut wie keine Fluoreszenzemission auf, so dass eine YFP vermittelte Fluoreszenzemission bei dieser Wellenlänge nur vom Donormolekül EcFbFP herrühren kann. Eine unbeabsichtigte direkte Anregung von YFP ist somit ausgeschlossen, wodurch die quantitative Bestimmung der FRET-Effizienz möglich wird.

3.6.2 Nachweis der FRET-Kopplung durch proteolytische Spaltung

Um nachweisen zu können, dass die Fluoreszenz des FRET-Akzeptors YFP auf den Energietransfer vom FRET-Donor EcFbFP nach spezifischer Anregung des Donor-Chromophors zurückzuführen ist, wurden die beiden Fluoreszenzdomänen der FRET-Fusion durch die Protease wieder voneinander getrennt. Da sich in der Linkerregion der FbFP-YFP-Fusion eine Thrombinproteaseschnittstelle befindet, würde die räumliche Trennung der Fluoreszenzdomänen mittels der Thrombinprotease eine verminderte Fluoreszenzemission des YFP ($\lambda = 527$ nm) und eine erhöhte Fluoreszenzemission des EcFbFP ($\lambda = 495$ nm) zur Folge haben. Dies sollte geschehen, da im Falle der proteolytischen Trennung der maximale Försterradius von 100 Å überschritten würde und so die Energie des FRET-Donors EcFbFP nach spezifischer Anregung ($\lambda = 380$ nm) nicht mehr direkt auf den FRET-Akzeptor YFP übertragen werden kann, sondern das EcFbFP das Licht bei $\lambda = 495$ nm in Form von Fluoreszenz emittiert. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abb. 19 dargestellt.

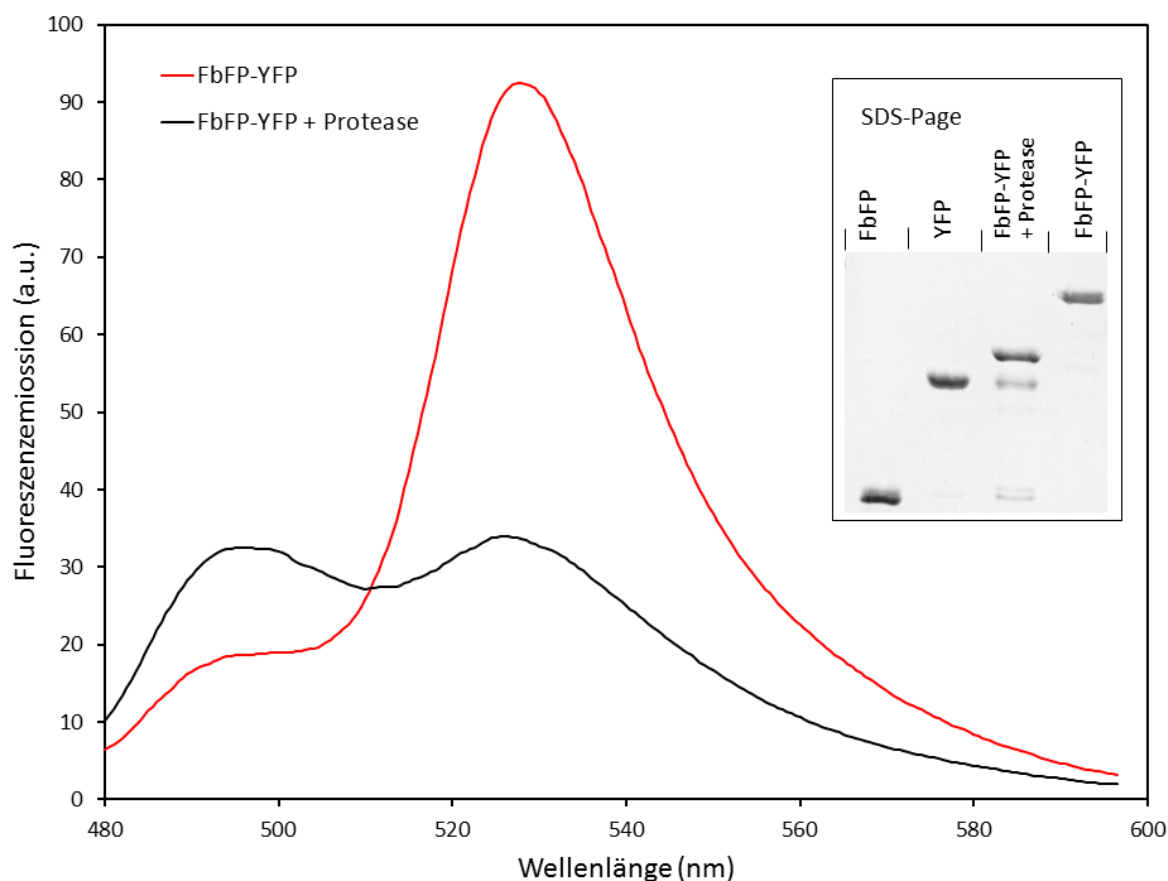


Abbildung 19: Überprüfung des intramolekularen FRET-Ereignisses der FbFP-YFP-Fusion.

Dargestellt ist die Fluoreszenzmessung nach Spaltung der FbFP-YFP-Fusion ($\text{YFP} \downarrow \text{FbFP}$) mittels der Thrombin-Protease in dem Proteinpuffer. Zusätzlich dargestellt ist als Kontrolle die Fluoreszenzemission des Fusionsproteins ohne Zugabe von Protease. Es wurde FbFP-YFP -Protein verwendet, welches mittels His₆-Tag affinitätschromatographisch gereinigt wurde. Die Fluoreszenzemission wurde im Fluoreszenzphotometer (Perkin Elmer) bei Anregung bei $\lambda = 380 \text{ nm}$ detektiert. Hierbei wurde das Fusionsprotein FbFP-YFP nach Anregung mit der Wellenlänge 380 nm auf eine Absorption von 0.1 bei dem Absorptionsmaximum des YFPs bei 514 nm eingestellt, die Thrombin-Protease wurde in einer Konzentration von 1 U/ μl eingesetzt.

Wie in dem Experiment gezeigt werden konnte, führt die proteolytische Trennung der EcFbFP- von der YFP-Fluoreszenzdomäne zu einer Zunahme der Fluoreszenzemission des EcFbFP, des potentiellen FRET-Donors. Des Weiteren ist gleichzeitig eine starke Abnahme der Fluoreszenzemission des potentiellen FRET-Akzeptors YFP zu erkennen. Es bestätigt sich die Annahme, dass bei Anregung mit einer Wellenlänge von 380 nm die Akzeptorfluoreszenz ausschließlich FRET-basiert ist. Dies lässt sich ebenfalls anhand der Abbildung 19 erkennen. Würde die hohe Fluoreszenzemission von ca. 90 bei 527 nm, welche dem Fluoreszenzmaximum des YFPs entspricht, aus einer direkten Anregung des YFPs resultieren, müsste dieser Wert nach der proteolytischen Spaltung der FbFP-YFP-Fusion dem Wert der FbFP-YFP-Fusion vor der Spaltung entsprechen. Es lässt sich allerdings eindeutig eine starke Abnahme auf ca. 35 a.u. der Fluoreszenzintensität bei dem Fluoreszenzmaximum des YFPs beobachten, welche nur mit einer FRET-basierten Fluoreszenzemission des YFPs zu erklären ist. So konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei der Akzeptorfluoreszenz ausschließlich um ein FRET-Ereignis handelt. Der vollständige Proteaseverdau des Fusionsproteins wurde

anschließend mittels SDS-PAGE bestätigt (Abb. 19). Wie man anhand der Abbildung 19 erkennt, liegt die FRET-Fusion nach dem proteolytischen Verdau nicht mehr als Fusionsprotein (~ 45 kDa) vor, sondern es sind die beiden getrennten Reporterproteine EcFbFP (~ 17 kDa) und YFP (~ 27 kDa) detektierbar (vgl. Abbildung 19; Spur 2 und Spur 3 und Spur 4). Als Referenz wurden die jeweiligen unfusionierten Reporterproteine aufgetragen, um den Effekt der Proteasespaltung verifizieren zu können. Weiterhin zu erkennen ist in Spur 4 eine weitere unspezifische Bande.

Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse der proteolytischen Spaltung zur Überprüfung der FRET-Fusion kann bestätigt werden, dass die Änderungen der Fluoreszenzemission des Donors sowie des Akzeptor durch ein intramolekulares FRET-Ereignis verursacht wird. Anhand der beschriebenen spektralen Eigenschaften der FbFP-YFP-Fusion kann an dieser Stelle somit geschlussfolgert werden, dass durch die Fusion von EcFbFP als FRET-Donor und YFP als FRET-Akzeptor eine effiziente FRET-Kopplung ermöglicht wird.

3.6.3 Fluoreszenzlebensdauermessung

Bei der Untersuchung der Fluoreszenzlebensdauer des FbFP-Signals außerhalb und innerhalb des FbFP-YFP Fusionsproteins wurde wie in Kapitel 2.10 beschrieben verfahren. Nach gepulster Anregung mit einem Laser wurden die Ankunftszeiten der vom FbFP-YFP und EcFbFP emittierten einzelnen Photonen detektiert, mit dem in Kapitel 2.10 beschriebenen Programm ausgewertet und in Abbildung 20 und 21 graphisch dargestellt. Man erkennt eine halblogarithmische Auftragung der gemessenen Ereignisse (Counts) mit der Zeit in Nanosekunden. Dargestellt ist die Abklingzeit der FbFP-Fluoreszenz innerhalb des FbFP-YFP (blaue Kurve) bzw. des EcFbFPs, die instrumentelle Antwortfunktion oder auch Apparatefunktion (*instrument response function*, IRF) (rote Kurve) und der berechnete Fit (schwarze Kurve). Des Weiteren gezeigt ist die Güte der Approximation $\chi^2_{red.}$ (Residues), welche die Summe der mittleren quadratischen Abweichung der Fit- von der Meßkurve angibt, sozusagen die Qualität des zuvor berechneten Fits. Gemessen wurde hier jeweils gereinigtes Protein mit einer Absorption von $\lambda_{450\text{ nm}} = 0,1$ in einem Puffer pH 8.0. Angeregt wurden die Proben bei 440 nm und die Ankunftszeiten bei 495 nm, der maximalen Fluoreszenzintensität des Donors detektiert. In den Abbildungen 20 und 21 ist die Lebensdauermessung des FbFP-YFP gezeigt, analog zu den gezeigten Ergebnissen wurde die Lebensdauer des FRET-Donor EcFbFP bestimmt (vgl. Abbildung 21).

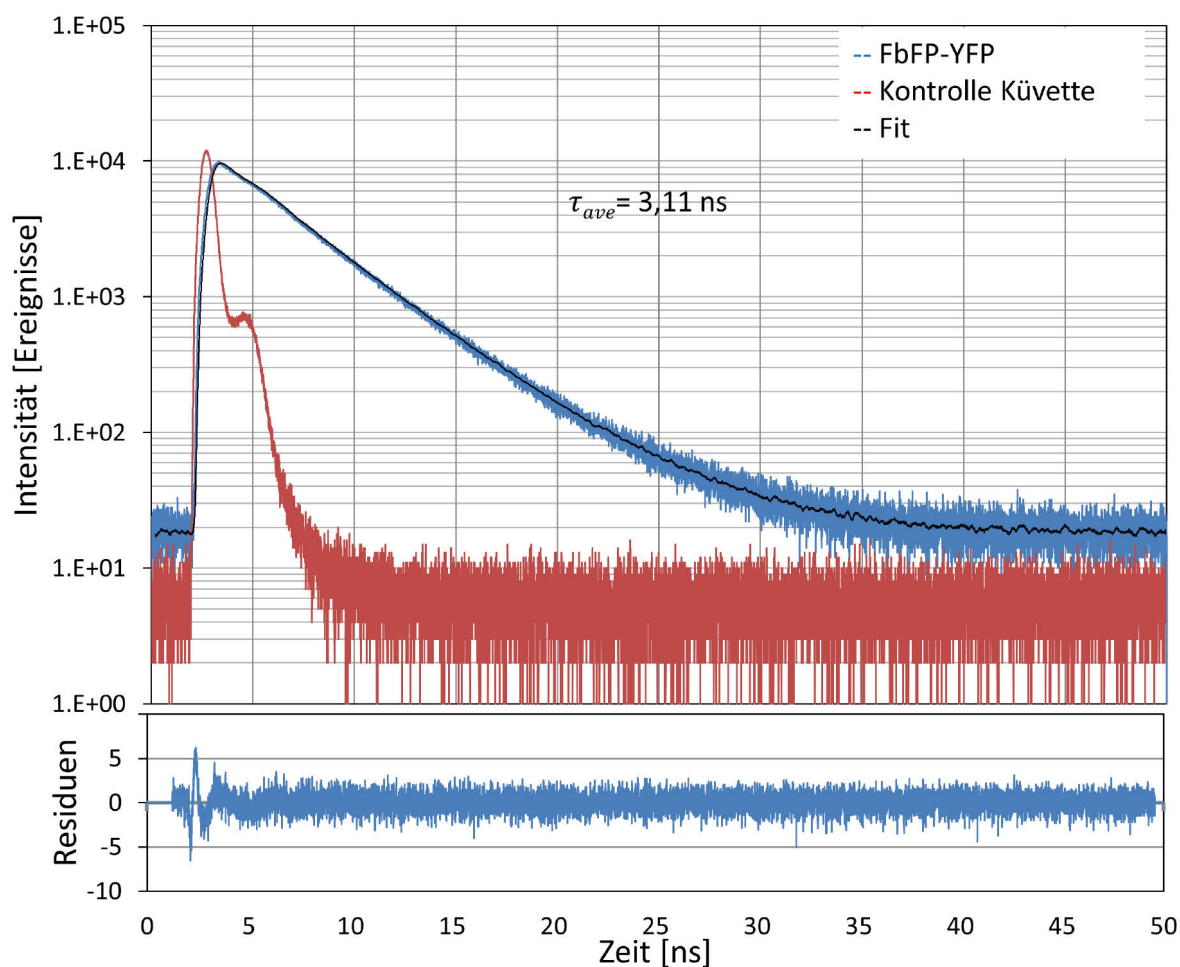


Abbildung 20: *In vitro* Lebensdauermessung von FbFP-YFP.

Die Fluoreszenzabklingzeiten des FRET-Donors im Sauerstoffsensor wurden anhand dieser Messung bestimmt. Gezeigt ist die Fluoreszenzabklingkurve (blau) des FbFP-YFP, die Apparatefunktion als Kontrolle der Apparatur mit wassergefüllter Küvette (rot), die Fitkurve (schwarz) und das Bestimmtheitsmaß (Residuen) der Messung. Aufgetragen ist die Intensität in Ereignisse gegen die Zeit in ns. Durch den Fit der Funktion konnte die Lebensdauer mit $\tau_{ave} = 3,11 \text{ ns}$ bestimmt werden.

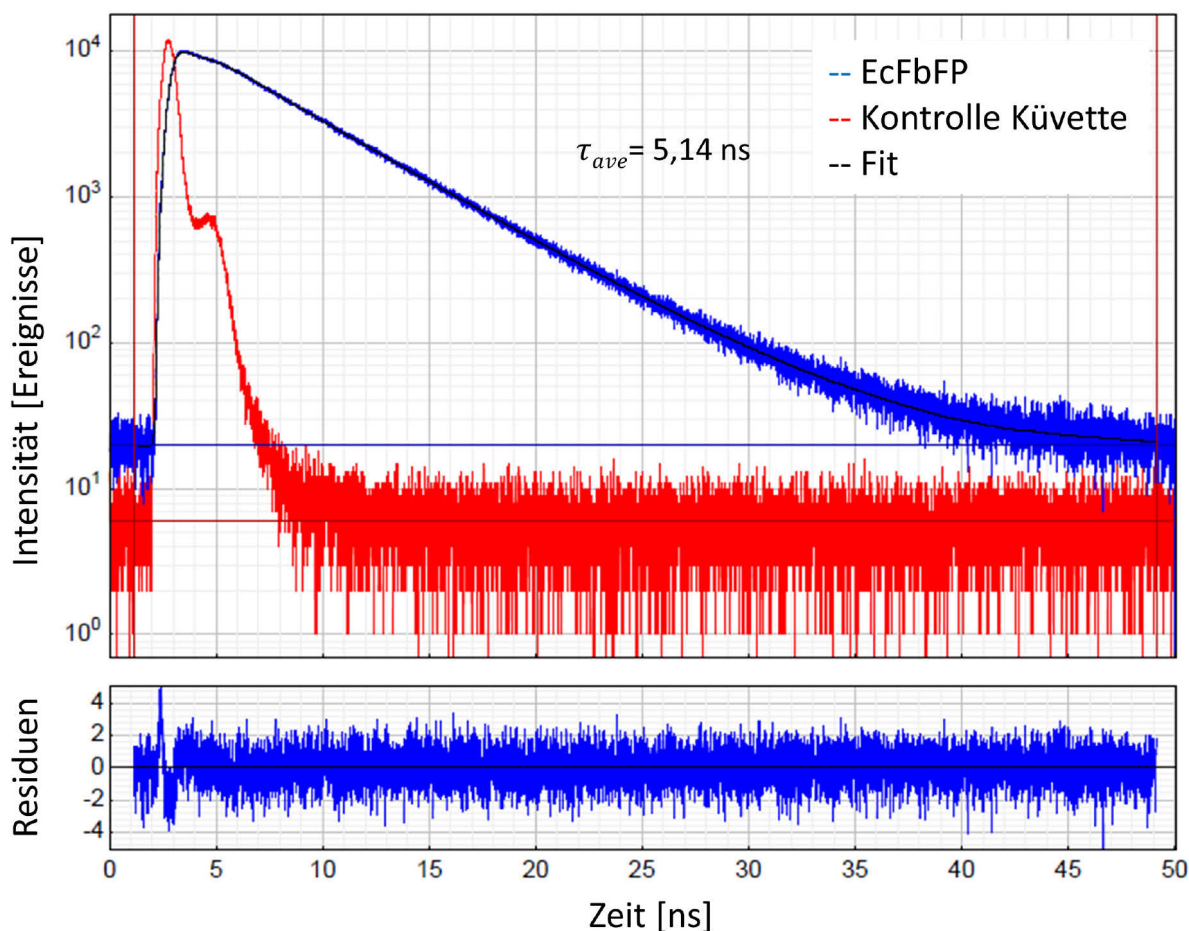


Abbildung 21: In vitro Lebensdauerermessung von EcFbFP.

Die Fluoreszenzabklingzeiten des EcFbFP wurden anhand dieser Messung bestimmt. Gezeigt ist die Fluoreszenzabklingkurve (blau) des EcFbFP, die Apparatefunktion als Kontrolle der Apparatur mit wassergefüllter Küvette (rot), die Fitkurve (schwarz) und das Bestimmtheitsmaß (Residuen) der Messung. Aufgetragen sind die Ereignisse in Ereignisse gegen die Zeit in ns. Durch den Fit der Funktion konnte die Lebensdauer mit $\tau_{ave} = 5,14 \text{ ns}$ bestimmt werden.

Die Anpassung der Fluoreszenzabklingkurve des Donors im FbFP-YFP erfordert eine biexponentielle Funktion. Diese Anpassung ist notwendig da im EcFbFP anscheinend mehrere Komponenten vorliegen, die unterschiedlich lange Abklingzeiten zeigen. Dies ließe sich nicht mit einer minimalen Abweichung der Approximation $\chi_{red.}^2$ (Residuen) mit einem monoexponentiellen Fit darstellen. Erklären ließe sich dies durch eine heterogene Kofaktorbeladung der Proteine oder auch durch ein Quenching der Fluoreszenzausbildung des Chromophors durch benachbarte aromatische Proteine. Die mittlere Fluoreszenzlebensdauer τ_{ave} liegt bei einem pH Wert von 8 bei $\tau_{ave} = 3,11 \text{ ns}$. Die ebenfalls bestimmte Lebensdauer vom unfusionierten EcFbFP, welche sich durch eine monoexponentielle Funktion beschreiben lässt, beträgt $\tau_{ave} = 5,14 \text{ ns}$. Das EcFbFP besitzt also eine wesentlich längere Fluoreszenzlebensdauer als Einzelprotein im Vergleich zum EcFbFP als Donordomäne in einer FRET-Fusion mit YFP als Akzeptordomäne. Das ist auf eine direkte strahlungslose Energieübertragung vom Donor auf den Akzeptor zurückzuführen. Bei diesem Vorgang kommt es in dem FRET-Molekül zu einer geringeren Fluoreszenzausbildung,

was in einer verkürzten Fluoreszenzlebensdauer resultiert. Der Grund dafür liegt in einem zusätzlichen Deaktivierungskanals im Protein.

Die Bestimmung der Fluoreszenzlebensläufe des FbFP-YFP-Proteins mit Hilfe zeitaufgelöster Fluoreszenzmessungen bestätigen somit die vorangegangenen Ergebnisse zum Nachweis eines funktionellen FRET-Systems in FbFP-YFP.

Im Hinblick auf die Fragestellung ob mit der FbFP-YFP-Fusion ein funktionelles FRET-System vorliegt, lässt sich zusammenfassend sagen, dass aufgrund der erfolgreich abgeschlossenen *in vitro* Charakterisierung ein FRET-System vorliegt. Des Weiteren konnte erfolgreich die optimale Anregungswellenlänge für einen effektiven Energietransfer bestimmt und das FRET-System über eine proteolytische Spaltung verifiziert werden. Die erwarteten Unterschiede in den Fluoreszenzlebensdauern bzw. die Abnahme der Lebensdauer des FRET-Donors in der FRET-Fusion konnte ebenfalls bestätigt werden. Somit kann sichergestellt werden das mit den Fusionen aus den FbFP und den GFP-Derivaten YFP und Citrine funktionelle FRET-Systeme vorliegen, welche im weiteren Verlauf auf ihre Tauglichkeit als Glukosebiosensor (Moussa et Al., 2012) bzw. als Sauerstoffbiosensor überprüft werden sollten.

3.7 *In vivo* Charakterisierung der FbFP-YFP FRET-Fusion

Nach abgeschlossener *in vitro* Charakterisierung des gereinigten Fusionsproteins FbFP-YFP, bei dem die spektralen Eigenschaften einschließlich der FRET-Effizienz überprüft wurden, folgte eine *in vivo* Charakterisierung des exprimierten Genproduktes in *E. coli* Zellen. Das Ergebnis dieser Charakterisierung ist für die weitere Verwendung und Kalibrierung des FbFP-YFP als potentieller Sauerstoffsensor enorm wichtig, da der genetisch kodierte Biosensors vorrangig in lebenden Zellen Verwendung finden wird. Eine *in vitro* Kalibrierung des Biosensors als Sauerstoffsensor würde sich zudem sehr schwierig gestalten. Es ist zwar möglich, den Biosensor unter anaeroben Bedingungen zum Beispiel durch das Bakterium *R. capsulatus* zu exprimieren, allerdings müssten alle weiteren Schritte, wie der Aufschluss der Zellen, sämtliche Zentrifugationsschritte und die komplette Aufreinigung bis hin zur Umpufferung und fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung unter Ausschluss von Sauerstoff bzw. Luft durchgeführt werden, was im Rahmen dieser Arbeit nicht realisiert werden konnte.

3.7.1 Spektrale Analyse der FbFP-YFP FRET-Fusion *in vivo*

Um das FbFP-YFP FRET-System auf die Tauglichkeit als potentiellen Sauerstoffbiosensor in lebenden Zellen hin zu testen, mussten 1) durch Aufnahme der *in vivo* Fluoreszenzspektren der FRET-Fusion die spektralen Eigenschaften sowie die FRET-Kopplung analog zur *in vitro* Charakterisierung überprüft werden und 2) sollte die Effizienz des Energieübertrags auf die Akzeptordomäne durch Messung der Fluoreszenzlebensdauer des Donors nachgewiesen werden.

Zur *in vivo* Charakterisierung des Proteins wurden *E. coli* Zellen des Stammes BL21(DE3), welche das Plasmid pRhotHi-2FbFP-YFP trugen, wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben kultiviert. Die *in vivo* Fluoreszenzspektren wurden bei einer Anregung mit blauem Licht ($\lambda = 380$ nm) im Fluoreszenzphotometer detektiert und aufgezeichnet. Die Zellmenge wurde hierbei auf eine optische Dichte von 0,5 normiert und das Pellet in 100 mM Tris/ HCl aufgenommen. Um die aus dem FRET-vermittelten Energieübertrag resultierende verminderte Fluoreszenzintensität des Donors und die deutlich erhöhte Akzeptor-Fluoreszenzintensität nachzuweisen, wurden zusätzlich die unfusionierten Fluoreszenzproteine FbFP und YFP einzeln exprimiert (vgl. Kapitel 2.7.1) und ebenfalls ein Fluoreszenzspektrum bei dieser Anregung aufgenommen. Die Ergebnisse sind in Abb. 22 dargestellt.

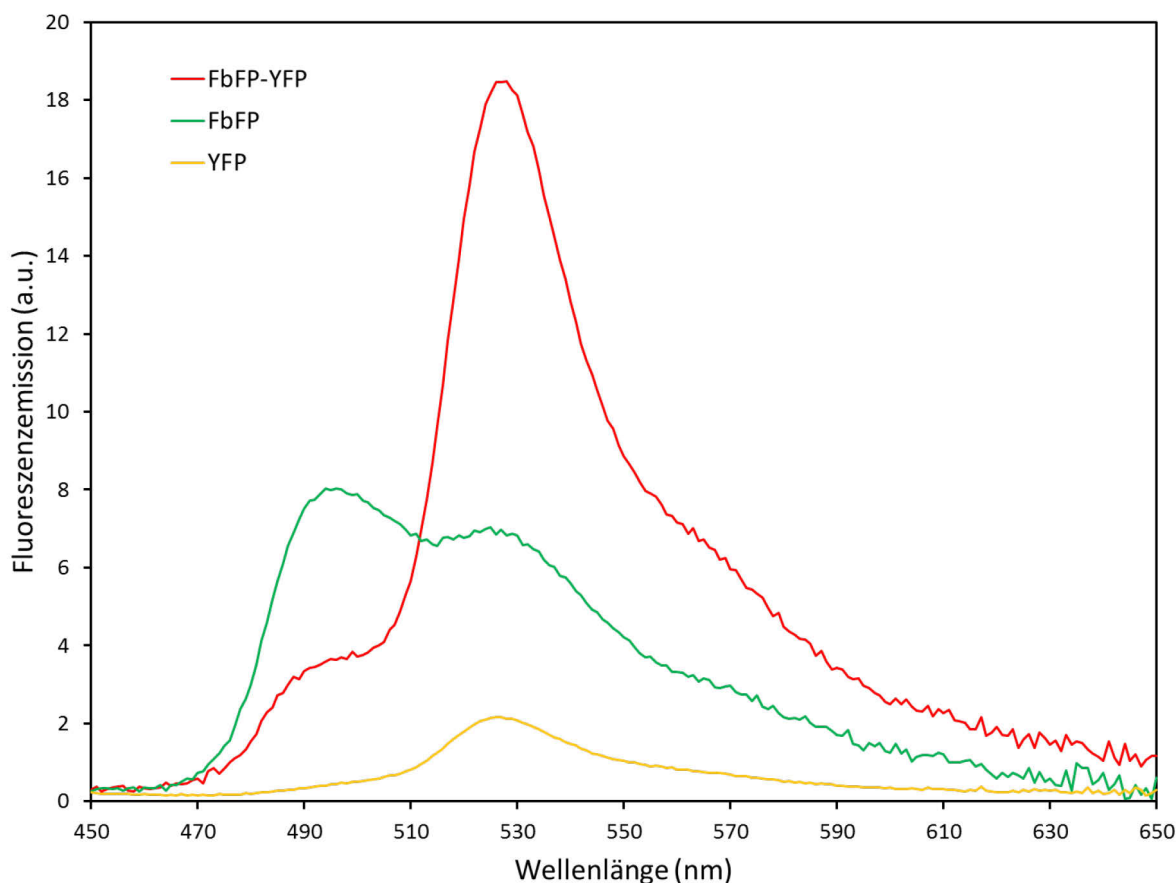


Abbildung 22: *In vivo* Fluoreszenzspektren des FRET-Systems FbFP-YFP

Dargestellt ist die *in vivo* Fluoreszenz des FbFP-YFP FRET-Systems sowie der einzelnen Fluoreszenzproteine nach einer T_7 Überexpression in *E.coli* BL21(DE3)-Zellen. Detektiert wurde die Fluoreszenz der Zellen nach spezifischer Anregung des FbFP mit $\lambda_{380\text{ nm}}$ und Aufzeichnung der Spektren von 450-650 nm (Schlitzbreite 10 nm) mittels eines Fluoreszenzphotometers (Perkin Elmer). Die abgebildeten Kurvenverläufe entsprechen den spezifischen Fluoreszenzemissionen der genannten Proteine. Die Zellen wurden hierbei auf eine OD von 0,5 normiert. Gemessen wurde nach Resuspension der Zellen in 100 mM Tris-HCl in einer 800 μl Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke.

Der Kurvenverlauf des gezeigten Fluoreszenzspektrums des EcFbFP (grüne Kurve) entspricht im vollen Maße dem Spektrum des in Kapitel 3.3 charakterisierten Fluoreszenzreporters. Erkennlich ist das typische Fluoreszenzemissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 495 nm. Der *in vivo* Kurvenverlauf des Fluoreszenzemissionsspektrums des YFP ist ebenfalls identisch mit dem zuvor bestimmten Spektrum *in vitro*. Das Fluoreszenzemissionsmaximum ist hierbei ebenfalls bei der Wellenlänge 527 nm lokalisiert. Die geringe Fluoreszenzintensität ist hierbei auf die Anregungswellenlänge bei 380 nm zurückzuführen, bei der in erster Linie der FRET-Donor angeregt wird, nicht aber der FRET-Akzeptor YFP. Vergleicht man die Emissionsmaxima von FbFP und YFP in der FbFP-YFP-Fusion mit den Maxima der jeweiligen unfusionierten Fluoreszenzproteinen, ist ein signifikanter Unterschied zu erkennen. Hierbei zeigen sich nach spezifischer Anregung des FbFP-Chromophors eine niedrige Fluoreszenzemission des FbFP (Emissionsmaximum bei 495 nm) und eine signifikante Erhöhung der Fluoreszenzemissionsintensität des YFP (Emissionsmaximum bei 527 nm). Diese Intensitätserhöhung der Fluoreszenzemission ist bei dieser Wellenlänge nur durch die

Anregung eines FRET-Donors und einem strahlungslosen Energieübertrag auf den FRET-Akzeptor YFP in einem funktionellen FRET-System zu erklären. Es ist aufgrund der Fragestellung und den oben gezeigten Ergebnissen davon auszugehen, dass nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* durch das FRET-System ein effizienter Energieübertrag auf die Akzeptordomäne YFP vorliegt. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die Möglichkeit besteht, auch in lebenden Zellen die spezifischen Fluoreszenzemissionen der FRET-Fusion und der Einzelkonstrukte durch ein Fluoreszenzphotometer detektieren zu können.

3.7.2 Fluorescence Lifetime Imaging Measurement (FLIM)

Um sicher zu stellen, dass die ermittelte Akzeptorfluoreszenz von einem funktionierenden FRET-System herrührt, wurden FLIM Messungen *in vivo* durchgeführt. Das FLIM (*fluorescence lifetime imaging microscopy*) ist ein bildgebendes Verfahren mit dem man *in vivo* die Fluoreszenzlebensdauer von Fluorophoren, wie der vorliegenden FbFP-YFP-Fusion messen kann. Hierbei reicht die Auflösung des Mikroskops, um einzelne Bakterienzellen, wie etwa *E. coli* sehr gut darstellen zu können (Morton and Parsons, 2011). Diese Methode findet Anwendung bei der FRET-Biosensor-basierten Bestimmung des pH-Wertes, der Chloridkonzentration oder der Quantifizierung von Ca^{2+} -Ionen *in vivo*. Wie schon bei der *in vitro* Charakterisierung gezeigt, eignet sich die Messung der Fluoreszenzlebensdauer sehr gut für die Detektion von FRET (Becker et al., 2007; Duncan et al., 2004; Esposito et al., 2008; Fruhwirth et al., 2010; Hinde et al., 2013; Jose et al., 2007; Morton and Parsons, 2011; Vitali et al., 2011).

Mit diesem Verfahren sollte die Effizienz des Energieübertrags von der Donordomäne EcFbFP auf die Akzeptordomäne YFP in dem vorliegenden FRET-System ermittelt werden. Hierbei vergleicht man die Fluoreszenzlebensdauer des EcFbFP als FRET-Donordomäne mit der des EcFbFP als Einzelkonstrukt. Der grundlegende Gedanke dahinter ist, dass unter aeroben Bedingungen ein FRET vom FRET-Donor auf den FRET-Akzeptor stattfindet, was sich direkt in einer kürzeren Fluoreszenzlebensdauer des Donormolekül bemerkbar macht. Da unter anaeroben Bedingungen das YFP in einer Fluoreszenzinaktiven nichtmaturierte Form vorliegt, kann dort kein FRET stattfinden (vgl. Kapitel 1.3.1.1). Hierbei lässt sich die FRET-Effizienz durch das Verhältnis der Fluoreszenzlebensdauer des EcFbFP und der Donordomäne ermitteln. In Abbildung 23 ist eine FLIM-Messung dargestellt. Hierbei setzen sich die Bilder von den Messungen von EcFbFP und FbFP-YFP aus einer Reihe von Punktmessungen zusammen, welche durch das Rastern des Fokusses des Anregungslasers über den Objektträger mit den *E. coli*-Zellen entsteht. Nach Anpassen der Messwerte mit einer entsprechenden mono-, bi-, oder triexponentiellen Funktion, erhält man für jeden Bildpunkt die Fluoreszenzlebensdauer des EcFbFP und der Donordomäne in der FRET-Fusion FbFP-YFP, welche hier in Falschfarben dargestellt ist. Anhand der Skala (blau lange Lebensdauer, rot kurze Lebensdauer) und den FLIM-Bildern (links: EcFbFP, rechts: FbFP-YFP) in Abbildung 23 kann man sehr gut erkennen, dass EcFbFP unfusioniert in *E. coli* BL21(DE3)

Zellen exprimiert, eine deutlich längere Lebensdauer besitzt, als im fusionierten Protein, welches in der FRET-Fusion als Donor fungiert. Die Fluoreszenzlebensdauer des EcFbFP konnte mit einem monoexponentiellen Fit von $\tau_{ave} = 2,73 \text{ ns}$ bestimmt werden, während die Lebenszeit von FbFP-YFP mit einem biexponentiellen Fit bestimmt werden musste und eine durchschnittliche Lebensdauer von $\tau_{ave} = 1,74 \text{ ns}$ ergab (vgl. Abbildung 24 linkes Diagramm). Es findet also unter aeroben Bedingungen ein FRET vom Donor auf den Akzeptor statt, was sich direkt in einer kürzeren Fluoreszenzlebensdauer des Donormolekül bemerkbar macht.

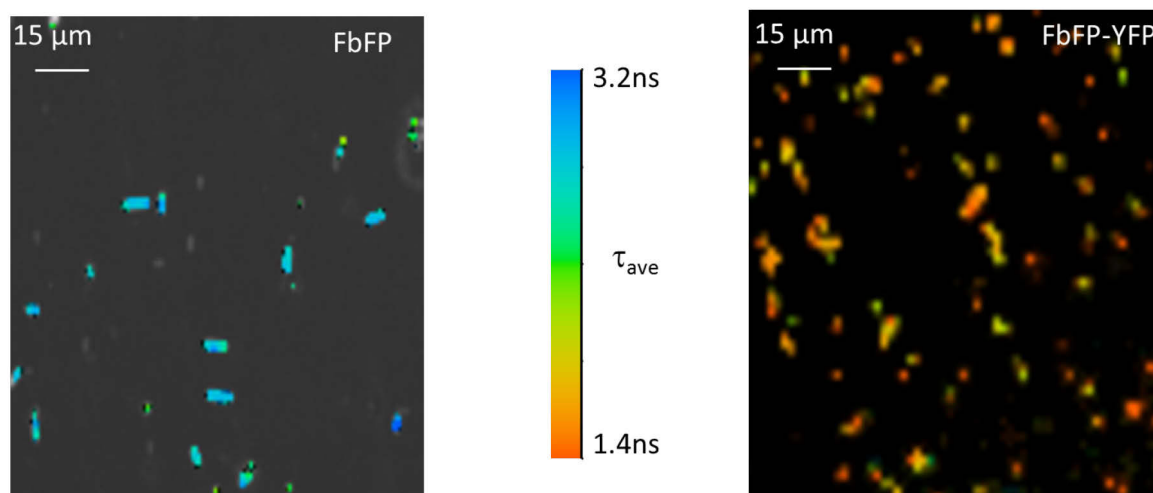


Abbildung 23: FLIM-Bilder von EcFbFP und FbFP-YFP exprimierenden *E. coli*-Zellen.

E. coli-Zellen wurden kultiviert und in der stationären Phase nach einem 16 stündigen aeroben Wachstum bei 37°C geerntet. Die Zellen wurden anschließend unter dem FLIM-Mikroskop betrachtet und FLIM Aufnahmen gemacht. Die Fluoreszenzemission wurde bei $\lambda_{em} = 500 \text{ nm}$ detektiert. Es erfolgte eine Zwei-Photonen-Anregung bei $\lambda_{ex} = 760 \text{ nm}$ (entspricht 380 nm bei Einzelphotonenmessungen). Die Bilder zeigen die Fluoreszenzlebensdauer τ_{ave} von EcFbFP und FbFP-YFP in lebenden Zellen. Die Lebensdauer ist dabei in farblichen Abstufungen dargestellt und in einer Skala verdeutlicht.

Die aus der Formel

$$E = 1 - \frac{\tau_{ave \text{ FbFP-YFP}}}{\tau_{ave \text{ EcFbFP}}} \quad (3.3)$$

abgeleitete FRET-Effizienz (E) beträgt hierbei 37%. Betrachtet man die gemessenen Fluoreszenzabklingkurven in Abbildung 24 und ihre Analyse genauer, fällt auf, dass beim FbFP-YFP zwei verschiedenen schnelle Abklingzeiten nachweisbar sind. Dieser Zusammenhang ist in der rechten Grafik dargestellt. Zu erkennen ist die, mit einer roten Kurve dargestellte und für den FRET relevante, kurze Abklingzeit von $\tau_1 = 1,03 \text{ ns}$. Weiterhin zu erkennen ist eine längere Abklingzeit (blau). Diese längere Abklingzeit entspricht der des unfusionierten EcFbFP und lässt darauf schließen, dass bei einem bestimmten Anteil der fusionierten Proteine kein FRET von FbFP auf das Akzeptormolekül YFP stattfindet und das EcFbFP die Energie in Form von Fluoreszenz abgibt. Weiterhin möglich wäre das Vorliegen von unfusionierten FRET-Partnern, so dass EcFbFP ohne vorhandenen FRET-Partner in direkter Umgebung keine Energie übertragen kann und somit Fluoreszenz emittiert.

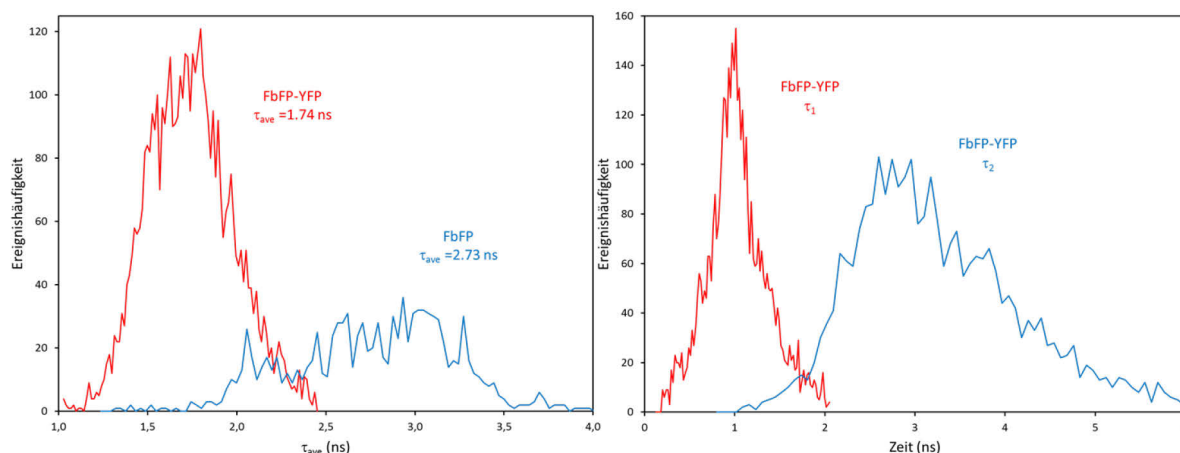


Abbildung 24: Analyse der FbFP-Fluoreszenzlebensdauer mittels FLIM-Messungen in *E.coli*-Zellen.

Analyse der Fluoreszenzlebensdauer der EcFbFP und FbFP-YFP exprimierenden *E.coli*-Zellen. Die ermittelten Daten wurden von den FLIM-Bildern (vgl. Abb. 23) abgeleitet. Anhand derer wurde die Lebensdauer von EcFbFP (blau) mittel monoexponentiellen Fit mit $\tau_{ave} = 2,73 \text{ ns}$ bestimmt, die Lebensdauer von FbFP-YFP (rot) mittels biexponentiellen Fit mit $\tau_{ave} = 1,74 \text{ ns}$ bestimmt werden (linker Graph). Eine detaillierte Analyse der Abklingzeiten des FbFP-YFP zeigen eine kurze Abklingzeit (rechtes Bild, rot) und eine relativ lange Abklingzeit (rechtes Bild, blau). Es konnte eine FRET-Effizienz der am FRET beteiligten Moleküle von 62% errechnet werden.

Betrachtet man nur die Abklingzeit, die für den FRET verantwortlich ist ($\tau_1 = 1,03 \text{ ns}$), so lässt sich eine FRET-Effizienz von 62% berechnen, welche im direkten Vergleich zu anderen bereits etablierten FRET-Systemen sehr hoch ist. So beträgt die FRET-Effizienz bei vergleichbaren bereits etablierten Systemen wie der CFP-YFP Fusion 25% bei $\tau_{ave \text{ CFP-YFP}} = 1,67 \text{ ns}$ und $\tau_{ave \text{ CFP}} = 2,23 \text{ ns}$ (Kremers et al., 2006).

Somit konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass sich mithilfe dieser Methode auch FbFP-basierte FRET-Systeme für Einzelzellanalysen mittels FLIM einsetzen lassen.

Vergleicht man die Ergebnisse der FLIM-Messungen mit der *in vitro* Fluoreszenzlebensdauerbestimmungen von EcFbFP und FbFP-YFP fällt allerdings auf, dass die Fluoreszenzlebensdauern der FLIM-Messungen deutlich kürzer sind, als die der *in vitro* Messungen (EcFbFP $\tau_{ave} = 5,14 \text{ ns}$; FbFP-YFP $\tau_{ave} = 3,11 \text{ ns}$) (vgl. Kap.: 3.6.3). Es scheint hier eine zusätzliche deutlich kürzere Komponente mit sehr kurzer Abklingzeit vorzuliegen. Dies ließe sich mit dem zusätzlich frei in Bakterienzellen vorkommenden FMN erklären, welches eine sehr kurze Fluoreszenzlebensdauer von $\tau_{ave} = 0,15 \text{ ns}$ besitzt (Lee et al., 1990). FMN ist in den gereinigten Fluoreszenzproteinen zwar auch enthalten allerdings hauptsächlich in assoziierter Form, während dieser Kofaktor in Bakterienzellen frei vorliegt und wichtiger Bestandteil bei der Reduktion der Oxidationsäquivalente in der Atmungskette darstellt (Gibson et al., 1962). Des Weiteren wäre es sehr gut möglich, dass noch weitere unbekannte Mechanismen in Bakterienzellen existieren, durch die die Fluoreszenzlebensdauer erniedrigt werden könnte. So wäre es denkbar, dass die Fluoreszenzemission durch Fluoreszenzreporter in Bakterienzellen durch eine erhöhte Sauerstoffradikalbildung wie Beispielsweise Singlett Sauerstoff eine Stressantwort in den Stressosomen auslöst, was ein zellvermittelte Fluoreszenzlöschung zur Folge hätte, bzw. eine Schädigung der Zellen zu

Folge hätte (Gomes et al., 2005; Maeda, 2008; Marles-Wright et al., 2008; Ragàs et al., 2011). Generell kann man sagen dass es auf Grund der obengenannten Faktoren nicht bzw. nur schwer möglich ist, die Fluoreszenzlebensdauer *in vitro* auf die Lebensdauer *in vivo* zu übertragen. Dem entsprechend müssen Biosensoren generell *in vitro* und *in vivo* separat kalibriert werden.

3.8 Charakterisierung der FbFP-YFP-Fusionsproteine als Biosensoren

Heutzutage verfügt man über ein breites Spektrum an Biosensoren, die eine einfache und nicht-invasive Quantifizierung verschiedenster Metabolite und Umweltsignale erlauben. Häufig basieren solche Biosensoren auf zwei unterschiedlichen Fluoreszenzdomänen, die aufgrund ihrer Fluoreszenzeigenschaften ein funktionelles FRET-System bilden. Solche Biosensoren finden bereits in vielen Bereichen der Medizin, Biotechnologie und Grundlagenforschung eine breite Anwendung. Nachdem wir zeigen konnten, dass in einem YFP-FbFP-Fusionsprotein, nach der spezifischen Anregung des FbFP-Chromophors, die Energie mittels FRET effizient vom Donor auf das YFP-Chromophor übertragen werden kann, wurde überprüft, ob das rekombinante Fusionsprotein als Biosensor für intrazellulären molekularen Sauerstoff und den pH-Wert eingesetzt werden kann.

3.8.1 Einsatz der FbFP-YFP FRET-Fusion als O₂-Biosensor

Alle Fluoreszenzproteine der GFP-Familie bilden ohne Ausnahme den Chromophor in einer mehrstufigen Autobiokatalyse aus. Da bei diesem Prozess molekularer Sauerstoff benötigt wird, hängt die Reifung des Chromophors und somit die Ausbildung des Fluoreszenzsignals von diesem Umweltfaktor unmittelbar ab (Cubitt et al., 1995; Heim et al., 1994; Mank et al., 2006; Miyawaki et al., 1997; Wachter et al., 1997). So beschränken sich die quantitative Anwendungen von GFP und dessen Derivate als Fluoreszenzreporterproteine auf aerobe Systeme.

Mit den „*FMN-based fluorescent protein*“ (FbFP) liegen nun Fluoreszenzreporterproteine vor, die unabhängig vom Sauerstoffpartialdruck fluoreszieren. Im Gegensatz zu Vertretern der GFP-Familie benötigt FbFP, welches FMN als Chromophor bindet, keinen Sauerstoff für die Ausbildung der Fluoreszenz. So konnte bereits gezeigt werden, dass FbFPs erfolgreich als Fluoreszenzreporterproteine in anaeroben Systemen eingesetzt werden können (Drepper et al., 2010; Ernst and Tielker, 2009; Tielker et al., 2009; Walter et al., 2012).

Aufgrund dieser Eigenschaften sollte im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden, inwiefern das Fusionsprotein FbFP-YFP als *in vivo* Biosensor zur Detektion für molekularen Sauerstoff eingesetzt werden kann. Es sollte hierbei die Fragestellung erörtert werden, ob es möglich ist, mit geeigneten *in vivo* Testsystemen, verschiedene Sauerstoffkonzentrationen mittels der FbFP-YFP-Fusion qualitativ zu detektieren. Die nötige Charakterisierung und Genexpression konnte hierbei mit *E. coli* Batch-Kulturen mit etablierten T7-Expressionsystem realisiert werden, die unterschiedlichen O₂-Konzentrationen im Medium sollen in einem ersten Versuch durch einfache Veränderung der Schüttelfrequenz gesteuert werden. Mit Hilfe dieses Test-Systems sollte bei unterschiedlichen Schüttelfrequenzen messbare Änderungen der Fluoreszenzemissionsintensitäten des FRET-Systems detektiert werden. Dies kann allerdings nur nach der Annahme geschehen, dass bei geringen Schüttelfrequenzen der O₂-Eintrag ins Medium so gering ist, dass durch die respiratorische Aktivität der Zellen der O₂-Gehalt im Zytoplasma sinkt. Bei ausreichend geringen Sauerstoffkonzentrationen kann das

Chromophor des YFPs aufgrund des fehlenden Sauerstoffs, nach der Faltung des Proteins nicht korrekt maturieren. Der Oxidationsschritt des Tyrosins 66 kann nicht erfolgen, so dass sich der Chromophor nicht ausbilden kann und das YFP somit fluoreszenzaktiv ist. Diese inaktive Variante des Biosensors sollte durch eine möglichst geringe Schüttelfrequenz von 30 rpm realisiert werden. Hierbei sollte eine erhöhte Fluoreszenzintensität des EcFbFPs zu detektieren sein, während bei dem YFP im Gegensatz zu aeroben Bedingungen eine erniedrigte Fluoreszenzintensität detektierbar sein sollte. Aerobe Bedingungen wurden in dem Experiment durch eine Schüttelfrequenz von 120 rpm herbeigeführt. Bei einem hohen Sauerstoffeintrag in dem Medium sollten beide FRET-Domänen in einen fluoreszenzaktiven Zustand vorliegen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 25 dargestellt.

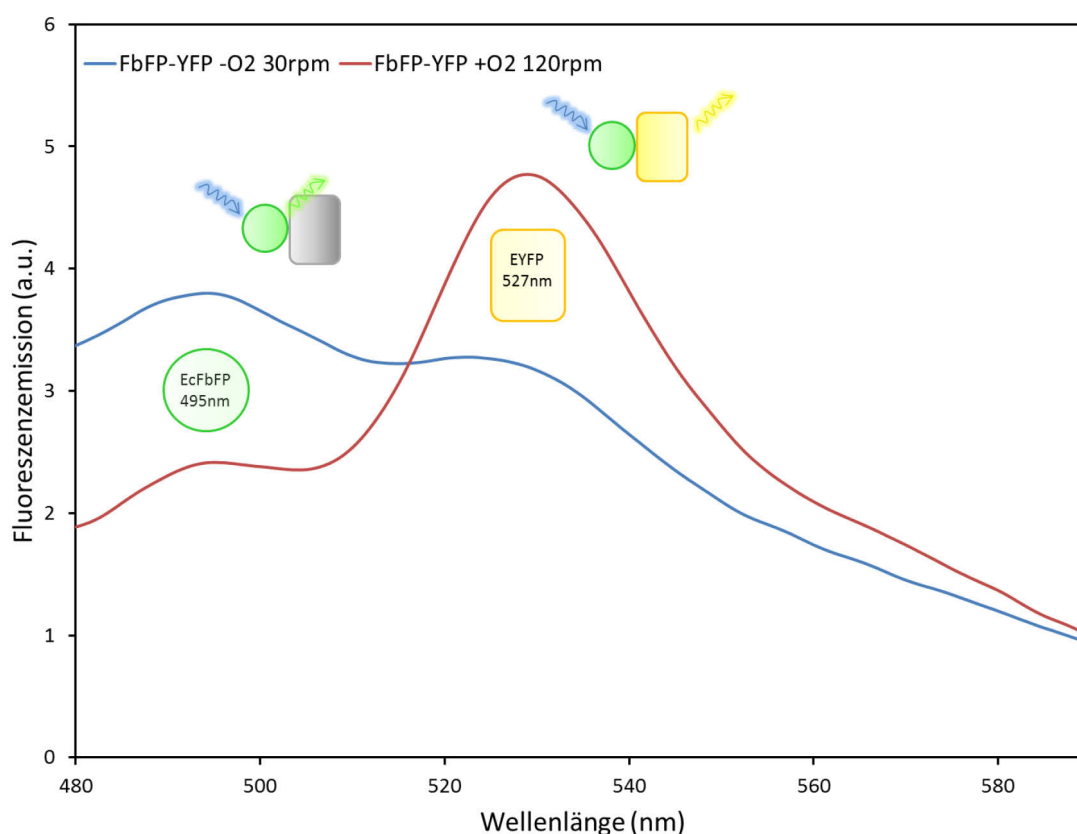


Abbildung 25: Qualitative Analyse des Sauerstoffsensors FbFP-YFP in lebenden *E.coli*-Zellen.

Dargestellt sind Fluoreszenzspektren des FbFP-YFP nach 16h Expression in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen bei 30 rpm (blaue Kurve) und 120 rpm (rote Kurve) Schüttelfrequenz in Autoinduktionsmedium. Schematisch sind die beiden FRET-Domänen, EcFbFP (grüner Kreis) und EYFP (gelbes Viereck) mit jeweiligen Fluoreszenzmaxima dargestellt. Die erwarteten Anregungs- und Emissionssituationen sind mit den jeweiligen Pfeilen kenntlich gemacht. Die Fluoreszenz des FbFP-YFP-Fusionsproteins wurde nach spezifischer Anregung der FRET-Donordomäne ($\lambda = 380$ nm) in einem Bereich von 480-600 nm gemessen.

Hier gezeigt ist die Fluoreszenzemission der FbFP-YFP-Fusion bei Anzucht der *E.coli*-Zellen unter Sauerstoff-limitierten (30 rpm, blaue Kurve) und ausreichend belüfteten (120 rpm, rote Kurve) Bedingungen. In den Spektren sind die jeweiligen Fluoreszenzmaxima des Donor-

und Akzeptorproteins bei 495 nm und 527 nm unter beiden Bedingungen deutlich zu erkennen. Zur besseren Veranschaulichung sind die FRET-Zustände des FbFP-YFP-Fusionsproteins bei Sauerstoffmangelbedingungen und Sauerstoffsättigungsbedingungen gezeigt. Die in Abbildung 25 gezeigten Ergebnisse bestätigen dabei die erwarteten Kurvenverläufe der Fluoreszenzemissionen von FbFP-YFP unter mikroaeroben und aeroben Anzuchtbedingungen: Die rote Kurve zeigt deutlich eine erniedrigte Donorfluoreszenzemission und eine erhöhte Akzeptorfluoreszenzemission, was bei vorhandenem Sauerstoff auf einen FRET-bedingten Energietransfer von dem Donormolekül auf das Akzeptormolekül hinweist. Dagegen kann bei mikroaeroben Bedingungen das YFP-Chromophor durch die intrazelluläre Sauerstofflimitierung nur teilweise reifen, was zu einer Abnahme der FRET-Ereignisse und somit zu einer erhöhten FbFP-Fluoreszenz und einer verminderten YFP-Fluoreszenz führt. Dieser Sachverhalt soll mit den in der Abbildung dargestellten Schemata verdeutlicht werden: Die durch die verminderte Schüttelfrequenz verursachte Abnahme der Gelöstsauerstoff-Konzentration im Medium führte offensichtlich tatsächlich zu einer signifikanten Abnahme der intrazellulären O_2 -Konzentration. Diese Veränderung des zellulären Sauerstoffgehalts konnte nun mit Hilfe der YFP-FbFP FRET-Fusion aufgrund des geschilderten Mechanismus durch einen veränderten Anteil der FRET-Ereignisse und somit durch die Änderung der Fluoreszenzemissionsmaxima erstmals in lebenden Zellen dargestellt werden. Die Ergebnisse des Schüttel-experiments lassen somit den Schluss zu, dass mit FbFP-YFP nicht nur ein durch die *in vitro* Charakterisierung bestätigtes FRET-System vorliegt, sondern ein System, das auf verschiedene Sauerstoffkonzentrationen reagiert. Diese Sauerstoff-abhängige Änderung des FbFP-YFP-Fluoreszenzspektrums kann mittels ratiometrischer Fluoreszenzmessung in lebenden Zellen mittels nicht-invasiver Verfahren qualitativ dargestellt werden. Aus diesem Grund wird die YFP-FbFP-Fusion im weiteren Verlauf als FluBO (*Fluorescence Biosensor for Oxygen*) bezeichnet.

3.8.2 Anwendung des O_2 -Biosensors FluBO in Wachstumsexperimenten in *E.coli*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das YFP-FbFP FRET-System als ein Sauerstoffindikator in lebenden Zellen eingesetzt werden kann, sollte in den nächsten Schritten überprüft werden, inwiefern intrazelluläre O_2 -Konzentrationen durch FluBO auch quantitativ bestimmt werden können. Daher musste ein Experiment gewählt werden, bei dem der Sauerstoffsensor unter verschiedensten intrazellulären Sauerstoffbedingungen exprimiert und die jeweilige Fluoreszenzemission bzw. das sich ändernde FRET-Verhältnis (Em_{YFP}/Em_{ECFbFP}) bestimmt werden kann.

Diese Fragestellung wurde mit der Arbeitsgruppe Bioverfahrenstechnik unter der Leitung von Professor Dr. Jochen Büchs an der RWTH Aachen im Rahmen einer Kooperation bearbeitet. Hierzu sollten die Kultivierungen in einem Biolector© System realisiert werden (Huber et al., 2009; Kensy et al., 2009). Mit Hilfe des Mikrobioreaktors und den eigens für das Gerät entwickelten Flower-Plates (Mikrotiterplatten, die Kultivierungsräume in Form von Blumen mit optimiertem Sauerstoffeintrag ins Medium aufweisen) können in 48

Reaktionskompartimenten Mikroorganismen parallel angezogen werden. Hierbei kann die Schüttelfrequenz der Flower-Plates, die Kultivierungstemperatur und die Luftfeuchtigkeit im Inneren der Inkubationskammer angepasst werden. Des Weiteren kann während der Kultivierung der Mikroorganismen mit Hilfe von sogenannten Optoden (immobilisierte Farbstoffe auf dem Boden der einzelnen Flower-Plate Vertiefungen) kontinuierlich der pH-Wert und die Sauerstoffkonzentration (DOT = *dissolved oxygen tension*) im Medium gemessen werden. Zusätzlich kann die Zelldichte über eine Trübungsmessung bestimmt werden. Zur Detektion des Fluoreszenz-Verhältnisses zwischen YFP und FbFP wurden Fluoreszenzfilter verwendet, mit denen es möglich war, den FRET-Donor EcFbFP spezifisch mit einer Wellenlänge von 372 nm anzuregen und die Fluoreszenzemissionsmaxima des Donors (495 nm) und des Akzeptors (527 nm) zu detektieren. In diesem Experiment sollte weiterhin die Zelldichte und die Sauerstoffkonzentration im Medium während der Kultivierung kontinuierlich verfolgt werden. Um die Funktionsweise des Biosensors FluBO in *E. coli* während einer BioLector-Kultivierung zu analysieren, wurden als erstes der *E. coli*-Stamm BL21(DE3), mit dem FluBO Expressionsplasmid pRhotHi-2 FluBO in Autoinduktionsmedium bei 37°C und konstanten Schüttelbedingungen von 1000 rpm angezogen. Während der Kultivierung wurden (i) das Wachstumsverhalten der Bakterienzellen, (ii) die Veränderungen in der Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium und (iii) die Veränderung der FluBO-Fluoreszenzemission permanent überwacht. Die *E. coli* Kulturen wurden über einen Zeitraum von 23 Stunden bis zur spätstationären Wuchsphase angezogen, wobei die obengenannten Parameter in einem Abstand von 7 min in drei parallelen Kulturen detektiert und aufgezeichnet wurden.

Die Ergebnisse eines repräsentativen Wachstumsexperiments sind in Abbildung 26 gezeigt. Die detektierten Fluoreszenzemissionen sind auf der linken Y-Achse, die Biomasse (relative Einheiten (a.u.)) und die Sauerstoffkonzentration (DOT) sind auf der rechten Y-Achse skaliert. Betrachtet man die Entwicklung der Biomasse (schwarze Kurve) und die Sauerstoffkonzentration (blaue Kurve), lässt sich erkennen, dass nach einer kurzen Lag-Phase von ca. 3 h die Biomasse ab Zeitpunkt t_0 kontinuierlich zunahm, da die Kulturen ab diesem Zeitpunkt in die exponentielle Wachstumsphase übergingen. Gleichzeitig sank die Sauerstoffkonzentration im Medium auf annähernd 0%. Dieser Effekt ist auf die verstärkte respiratorische Aktivität der Zellen innerhalb der logarithmischen Wuchsphase zurückzuführen. Dies führte dazu, dass selbst bei den hohen Schüttelfrequenzen der gelöste Sauerstoff im Medium fast vollständig verbraucht wird. Nach ca. 3 bis 4 Stunden setzte die Induktion der FluBO-Expression ein, da bis zu diesem Zeitpunkt die auf das Expressionssystem reprimierend wirkende Glucose vollständig verstoffwechselt wurde. Diesen Sachverhalt kann man an der steigenden Fluoreszenzintensität des EcFbFPs (grüne Kurve) erkennen, das für die Ausbildung des spezifischen Fluoreszenzsignals keinen Sauerstoff benötigt. Bei dem FRET-Akzeptor ist ebenfalls eine Zunahme der Fluoreszenzemission zu erkennen, wenn auch eine weitaus geringere. Dies lässt den Schluss zu, dass der in dieser Wuchsphase verbliebene Sauerstoff im Medium ausreicht, damit intrazellulär die Chromophore einiger YFP-Moleküle reifen können und somit das

Fluoreszenzsignal entwickeln können. Die unterschiedliche Entwicklung der Donor- und Akzeptorfluoreszenz lässt daher vermuten, dass der FluBO-Sensor auch sehr geringe Sauerstoffkonzentrationen detektieren kann.

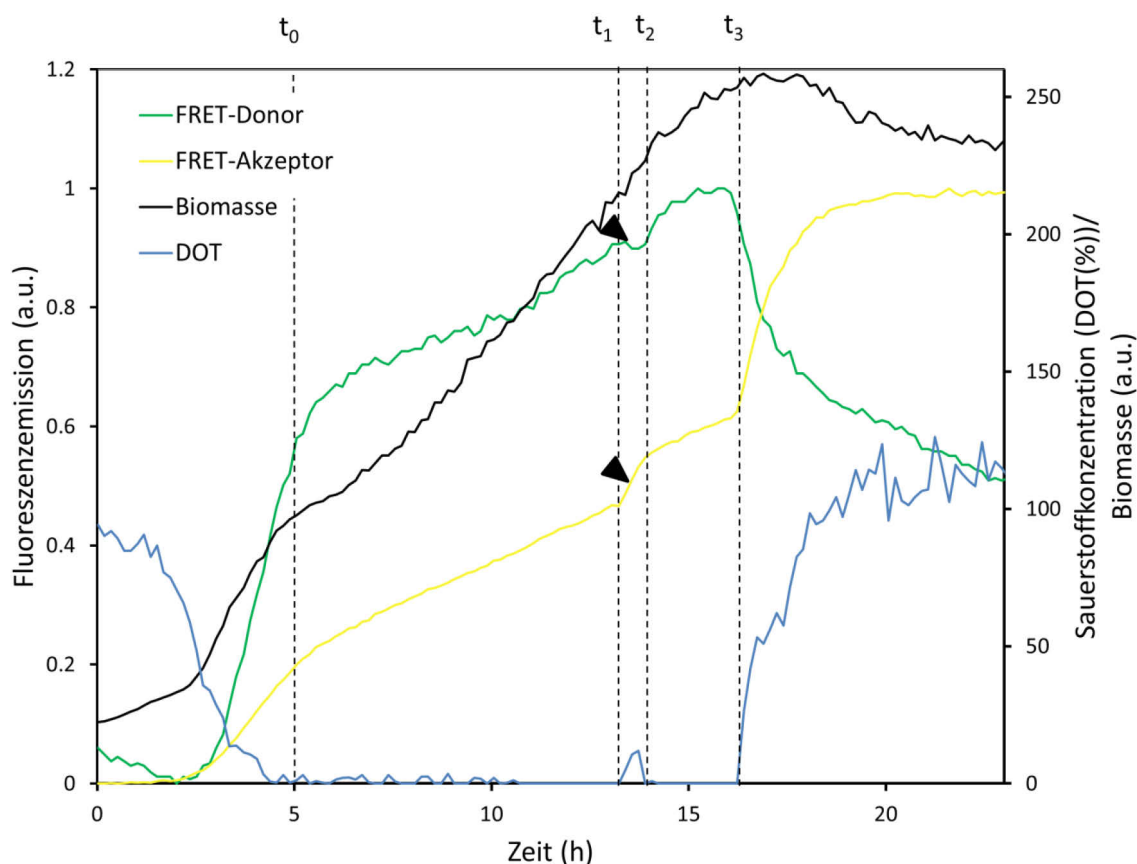


Abbildung 26: Bestimmung der intrazellulären Sauerstoffkonzentration in einer *E.coli*-Batchkultur im BioLector.

Dargestellt sind die Kurven der Messdaten der Kultivierung der FluBO exprimierenden *E.coli* BL21(DE3)-Zellen in dem Mikrokultivierungssystem BioLector. Folgende Parameter sind während der Kultivierung erfasst worden und graphisch dargestellt: Biomasse (schwarze Kurve), Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium (blaue Kurve) sowie die Fluoreszenzemissionen der FluBO Donor- (grün, $\lambda_{em} = 492\text{nm}$) und Akzeptor- (gelb, $\lambda_{em} = 532\text{nm}$) Domänen bei einer Anregung mit UV-Licht ($\lambda = 372\text{nm}$). Die Zeitpunkte, bei denen während der Batchkultivierung wichtige Sauerstoffkonzentrationsänderungen zu beobachten waren, sind mit t_0 - t_3 und mit gestrichelten Linien und Pfeilen markiert.

Wie man an der Entwicklung der Biomasse erkennen kann, lag trotz Expression des Sensors eine relativ lange (ca. 10 h) exponentielle Wachstumsphase der *E. coli* Kultur vor, die nach ca. 16 Stunden in die stationäre Wachstumsphase überging. Nach 17 h begann dann die Absterbephase, in der durch Zelllyse die Biomasse wieder abnahm. Betrachtet man den weiteren Entwicklung des Gelöstsauerstoffkonzentration, so fällt auf, dass ab dem Eintritt der Kultur in die stationäre Wachstumsphase (Zeitpunkt t_3) aufgrund des verlangsamten Zellstoffwechsels ein starker Anstieg des O_2 -Gehalts im Medium zu verzeichnen war. Interessanterweise führt dies ebenfalls zu einem direkten Anstieg des intrazellulären O_2 -Gehalts, was unmittelbar durch eine veränderte Donor- und Akzeptorfluoreszenz des

Sauerstoffsensors zu detektieren war: die Donorfluoreszenzintensität halbierte sich fast von 1 auf 0,5 Einheiten, während die Akzeptorfluoreszenz von 0,6 auf 1 Einheit zunahm. Dieser Effekt ist wiederum über den O₂-abhängigen Anstieg der FRET-Ereignisse in den Zellen zu erklären. Die erhöhte Fluoreszenzemission des Akzeptors YFP kann nur von einem Energietransfer von dem Donormolekül herrühren, der wiederum durch die O₂-abhängige Reifung des YFP-Chromophors ermöglicht wird. Aufgrund der Tatsache, dass der Sauerstoffsensor überraschenderweise direkt und ohne Zeitversatz auf zunehmende intrazelluläre Sauerstoffkonzentrationen reagierte, lässt die Vermutung zu, dass mit diesem Sensor nicht nur qualitativ die relative Änderung von intrazellulären O₂-Konzentrationen überwacht werden kann, sondern auch kleine Änderungen der Sauerstoffkonzentration ratiometrisch online quantifiziert werden können. Ein weiteres Indiz für die direkte Reaktion des Sensors auch auf geringe Zunahmen der zellulären Sauerstoffkonzentration ist ebenfalls in Abbildung 26 dargestellt, zwischen den markierten Zeitpunkten t_2 und t_3 findet bei den *E. coli* Zellen ein sogenannter diauxischer Shift statt. Die Bakterien stellen hierbei ihre Kohlenstoffquelle auf Grund des Mangels an Laktose auf Acetat um. Bei dieser Umstellung verbrauchen die Bakterienzellen geringfügig weniger Sauerstoff, was sich direkt in einer höheren Sauerstoffkonzentration im Medium widerspiegelt und von der Optode detektiert wurde (Sauerstoffanstieg zwischen t_1 und t_2). Selbst bei diesem vergleichsweise geringen Anstieg der Sauerstoffkonzentration lässt sich eine direkte Reaktion seitens des Biosensorkonstruktes detektieren. Hierbei lässt sich anhand der Abbildung 26 erkennen, dass die Fluoreszenz des FRET-Akzeptors zunimmt, bei gleichzeitiger Abnahme der FRET-Donorfluoreszenzintensität. Diese Veränderungen der Fluoreszenzemissionen sind mit einem FRET-gekoppelten Energieübertrag seitens des EcFbFP auf das YFP zu erklären. Da dies zeitgleich mit einer Zunahme der Sauerstoffkonzentration im Medium (vgl. Abb. 26, T_1 - T_2) geschah, ist diese Änderung in den Fluoreszenzverhältnissen der FRET-Domänen nur mit der Reifung des YFP-Chromophors und dem erfolgreichen Energietransfers im FRET-System bei Anwesenheit von molekularem Sauerstoff zu erklären. Dies lässt folgende Schlussfolgerungen zu. I) Der O₂-Biosensor ist in der Lage, direkt auch auf geringe Sauerstoffschwankungen zu reagieren und II) Die durch die Optode bestimmten Konzentrationsänderungen des Gelöstsauerstoffs im Medium haben eine direkte Auswirkung der intrazellulären Sauerstoffkonzentration, welche direkt mit dem Sauerstoffbiosensor detektiert werden konnte. Um die Fluoreszenzemissionsänderungen der FRET-Domänen nicht immer einzeln beschreiben zu müssen, lässt sich zur Vereinfachung ein FRET-Verhältnis bestimmen.

3.8.3 Bestimmung des FRET-Verhältnisses von FluBO

Um die Fluoreszenzänderungen in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration im Medium des Biosensors FluBO besser darstellen zu können, wurde, wie bei FRET-Systemen üblich, ein so genanntes FRET-Verhältnis aus den Fluoreszenzintensitäten des Akzeptors und Donors errechnet. In diesem Fall ist das FRET-Verhältnis der Quotient aus der Akzeptorfluoreszenz und Donorfluoreszenz. Das FRET-Verhältnis wurde für alle Datenpunkte des Wachstumsexperiments berechnet und dieses erneut gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 27).

Weiterhin aufgetragen ist, analog zur vorherigen Abbildung, die Sauerstoffkonzentration im Medium. Anhand dieser Abbildung lässt sich direkt die Funktionalität des Sauerstoffsensors ablesen: So bleibt das FRET-Verhältnis bei unveränderter Sauerstoffkonzentration annähernd unverändert (vgl. t_0 - t_1 bzw. t_2 - t_3). Mit Hilfe dieser Darstellung bestätigt sich die Vermutung, dass der Biosensor FluBO nicht nur große Änderungen der Sauerstoffkonzentration direkt anzeigt (vgl. t_3), also sich das FRET-Verhältnis direkt mit Zunahme der Sauerstoffkonzentration ändert, sondern auch bei geringen Änderungen der Sauerstoffkonzentration (t_1 - t_2). Bei näherer Betrachtung der FRET-basierten Bestimmung der intrazellulären Sauerstoffkonzentration (Abbildung 27) fällt auf, dass

- 1) die Steigung des FRET-Signals ab dem Zeitpunkt t_3 geringer wird und dann nach 18 h beinahe konstant bleibt, und
- 2) das bei Abnahme der O_2 -Konzentration (t_2) keine Änderung des FRET-Verhältnisses vorliegt, sondern nur nach Erhöhung der O_2 -Konzentration.

Diese beiden Effekte beruhen auf der Tatsache, dass bei Vorhandensein von molekularem Sauerstoff eine irreversible Reifung des YFP-Chromophors stattfindet. Aufgrund dieser Reifung findet der Energieübertrag auf den FRET-Akzeptor statt, welcher wiederum zu einer Änderung in den Fluoreszenzverhältnissen des FRET-Donor und –Akzeptor führt. Diese Änderung des FRET-Verhältnisses kann allerdings nur solange stattfinden, wie noch nicht gereiftes YFP-Protein in den Zellen vorliegt. Sind alle Fusionsproteine gereift, ist das maximale Verhältnis von 4,1 der Fluoreszenzemissionen zwischen Akzeptor und Donor erreicht. Erst durch neu synthetisierte Fusionsproteine kann eine erneute Erhöhung des FRET-Verhältnis ermöglicht werden. Anhand dieses Test-Systems kann also nur eine Erhöhung der Sauerstoffkonzentration durch gleichzeitige Veränderung der FRET-Verhältnisse beschrieben werden. Bei Abnahme der O_2 -Konzentration ändert sich das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten zwischen FRET-Donor und –Akzeptor nicht mehr, da keine weiteren YFP-Moleküle maturieren können. Aufgrund des irreversiblen Chromophor-Reifungsprozesses der bereits maturierten YFP-Chromophor ist keine Abnahme der YFP-vermittelten Fluoreszenz zu erwarten und somit auch keine negative Änderung des FRET-Verhältnisses.

Dieser Versuch wurde in einer Dreifachbestimmung durchgeführt, es wurden drei verschiedene Klone verwendet und kultiviert. Aufgrund des BioLector-vermittelten zeitversetzten Messverfahrens würde eine Mittelwertberechnung und eine Standardabweichung zu Abweichungen bzw. Artefakten führen, die gerade bei kleinen Änderungen in der Sauerstoffkonzentration und der direkten Reaktion des Sauerstoffsensor große Auswirkungen in der Bestimmung der Sauerstoffkonzentrationen hätte. Um dies zu vermeiden sind die drei Messungen der Wachstumskurve der *E. coli* Bakterien in drei Diagrammen veranschaulicht (vgl. Anhang 5). In allen drei Bestimmungen lassen sich zeitversetzt, sowohl die gleichen Wachstumskurven als auch die gleichen Sauerstoffkonzentrationsveränderungen über die Zeit erkennen. Des Weiteren stimmen die

Fluoreszenzdaten miteinander überein. In weiteren Versuchen wurde aus diesem Grund ebenso verfahren, es wurde auf eine Mittelwert- und Standardabweichungsberechnung verzichtet.

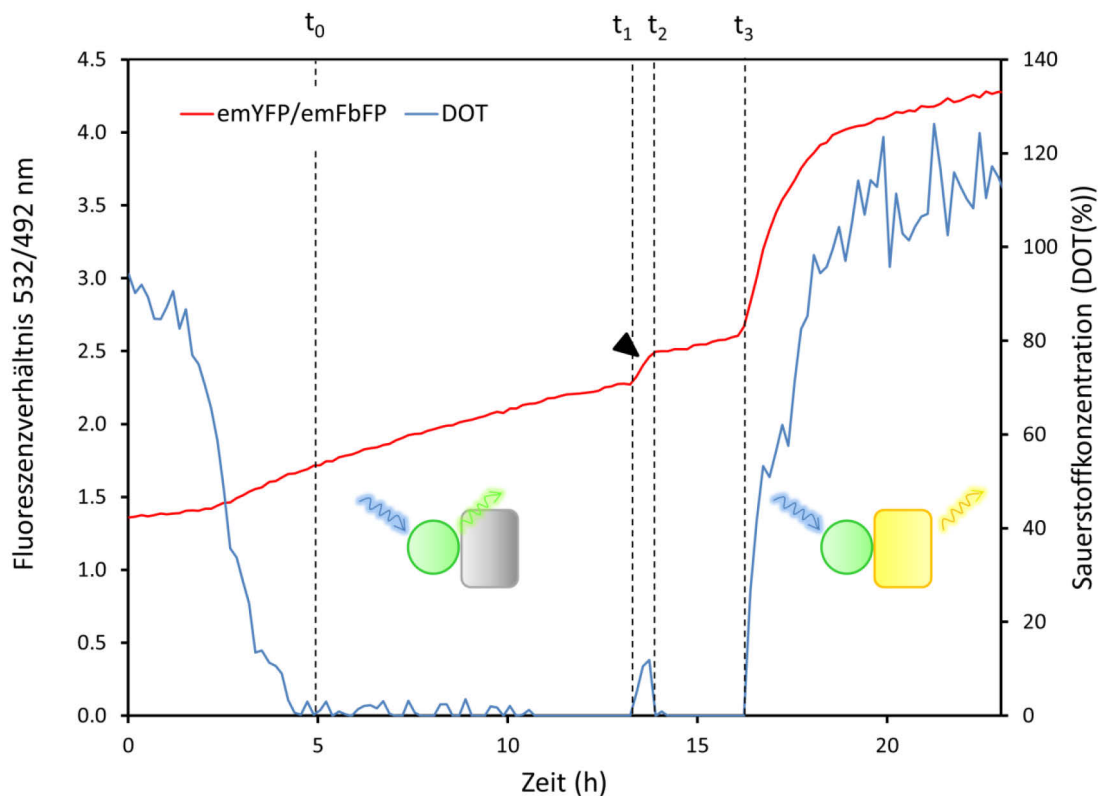


Abbildung 27: FRET-basierte Bestimmung der intrazellulären Sauerstoffkonzentration in einer *E.coli*-Batchkultur mithilfe des FluBO-Biosensors.

Graphisch gezeigt ist das FRET-Verhältnis 532 nm/ 492 nm der Fluoreszenzemissionen des FluBO-Donors und Akzeptors während eines *E. coli* Wachstumsversuchs. Zur Berechnung des FRET-Verhältnisses dienten die in Abb. 26 dargestellten Fluoreszenzwerte und es wurde die gleiche Skalierung gewählt. Dargestellt ist in blau die Sauerstoffkonzentration (DOT) und in Rot das FRET-Verhältnis über 22 h. Die Zeitpunkte, bei denen während der Batchkultivierung wichtige Sauerstoffkonzentrationsänderungen zu beobachten waren, sind auch hier mit t_0 - t_3 und mit gestrichelten Linien markiert. Zusätzlich ist der diauxische Shift der Bakterien mit einem Pfeil markiert. Die Schemata zeigen die inaktive (graues Viereck) und die aktive (gelbes Viereck) FRET-Fusion.

Um sicherzustellen, dass die oben beschriebenen Änderungen in den Fluoreszenzverhältnissen nur auf den exprimierten O_2 -Biosensor zurückzuführen sind und nicht auf intrinsische Fluoreszenz der *E.coli*-eigenen Proteinen beruht, wurde zusätzlich der *E.coli* BL21 (DE3)-Stamm kultiviert, welcher ausschließlich das Plasmid pRhotHi-2 enthielt. In Abbildung 28 ist der entsprechende Wachstumsversuch gezeigt. Das FRET-Verhältnis und die Sauerstoffkonzentration sind hierbei gegen die Zeit aufgetragen. Deutlich zu erkennen sind sich nur geringfügig ändernde Fluoreszenzverhältnisse über den gesamten Messzeitraum, unabhängig von Veränderungen der Sauerstoffkonzentration. Vergleicht man die Änderungen in dem Fluoreszenzverhältnis der FRET-Fusion mit denen des Leerplasmides ist zu folgern, dass die Veränderungen in den FRET-Verhältnissen in Abbildung 28 nur von dem exprimierten Sauerstoffbiosensor herrühren. In denjenigen Zellen, die das Leerplasmid

trugen, findet keine FRET-gekoppelte sauerstoffabhängige Veränderung der Fluoreszenzverhältnisse statt.

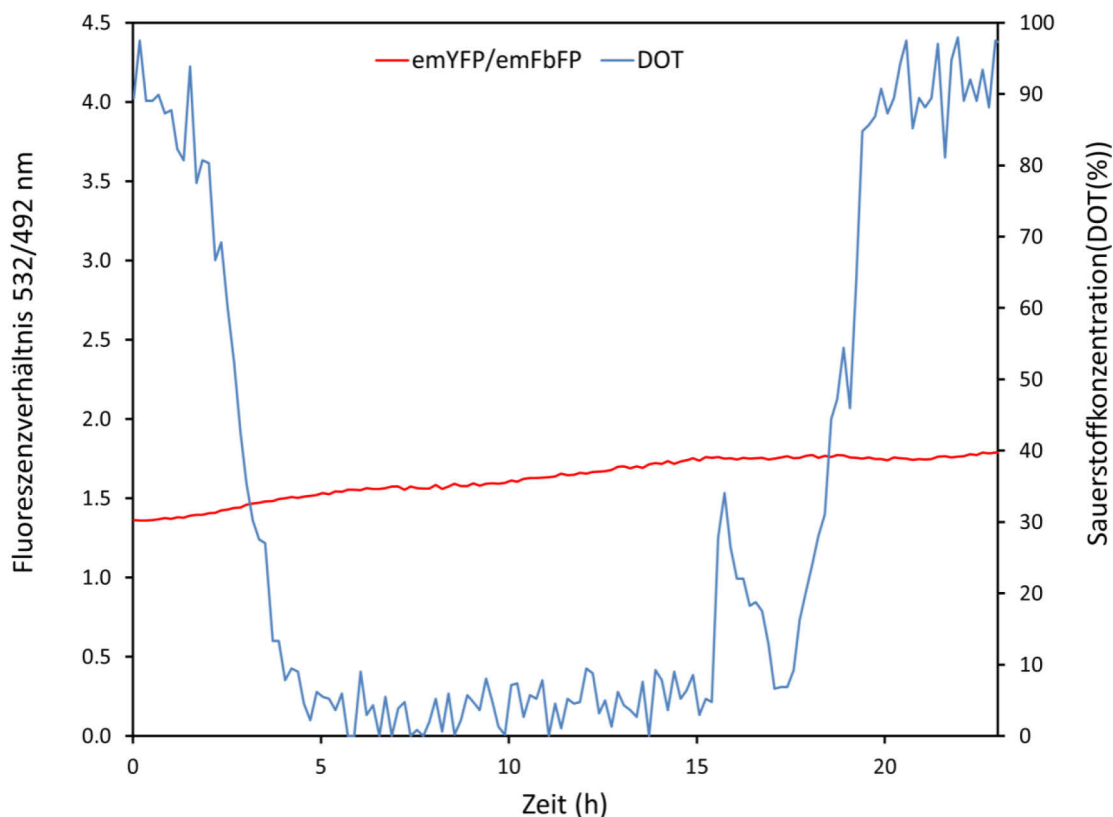


Abbildung 28: Analyse der zelleigenen Hintergrundfluoreszenz (Leervektorkontrolle) während der Batch-Kultivierung von *E. coli* im BioLector.

Hier dargestellt ist das Verhältnis der Fluoreszenzemission 532 nm zu 492 nm bei einer Anregung der *E. coli*-Zellen mit einer Wellenlänge von 372 nm. Als Negativkontrolle diente das Expressionsplasmid pRhotHi-2, welche in *E. coli* BL21(DE3) transformiert vorlag. Weiterhin dargestellt, ebenso über einen Zeitraum von 22 Stunden, ist die Sauerstoffkonzentration (DOT).

3.8.4 *In vivo* Kalibrierung des Sauerstoffbiosensors FluBO in *E.coli*-Zellen

Anhand der im vorangegangenen Kapitel präsentierten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Änderung der intra- und extrazellulären Sauerstoffkonzentrationen während der Kultivierung von *E. coli*-Zellen miteinander korreliert sind. Dabei wurde der Gelöstsauerstoff im Medium mithilfe einer Flowerplate-Optode, der zelluläre O₂-Gehalt jedoch mittels des neuen Biosensors FluBO überwacht. Dabei erwies sich FluBO als ein sehr sensibler molekularer Biosensor, der bereits geringe O₂-Schwankungen deutlich aufzeigte. Daher stellte sich die Frage, ob FluBO nicht nur zum qualitativen Nachweis von O₂-Konzentrationsveränderungen eingesetzt werden kann, sondern ob durch eine Kalibrierung des Biosensors auch die jeweilige Sauerstoffkonzentration in *in vivo* Systemen quantitativ, anhand des FRET-Verhältnisses, bestimmt werden können. Um eine solche Kalibrierung durchführen zu können, ist es nötig, FRET-Verhältnisse bei so vielen Sauerstoffkonzentrationen wie möglich zu detektieren. Anhand der Auftragung der

Fluoreszenzintensitäts-Verhältnisse zwischen FRET-Donor und –Akzeptor gegen die Sauerstoffkonzentration und der daraus resultierenden Kalibrierungsgeraden sollte dann direkt die jeweilige Sauerstoffkonzentration abgelesen werden. Dazu wurde zunächst eine Versuchsanordnung basierend auf einer Batch-Kultivierung entwickelt, mit der eine *in vivo* Kalibrierung von FluBO zur quantitativen Bestimmung des intrazellulären Sauerstoffs möglich ist.

Das Prinzip und die damit verbundenen Voraussetzungen der unten beschriebenen Versuchsanordnung sind im Folgenden beschrieben.

- 1) Um eine möglichst hohe Genauigkeit der Kalibrierungsgerade zu erreichen, müssen mittels des Biosensors so viele verschiedene O₂-Konzentrationen wie möglich detektiert werden. Um dies erreichen zu können, muss die Sauerstoffkonzentration schrittweise erhöht werden.
- 2) Aufgrund des irreversiblen Maturierungsprozesses des YFP-Chromophors müssen zunächst Sauerstoff-limitierende Bedingungen vorherrschen.
- 3) Um eine schrittweise Zunahme der O₂-Konzentration kontrollieren zu können, sollte möglichst aktiv, beispielsweise durch Erhöhung der Schüttelfrequenz der FlowerPlates, in die Kultivierung eingegriffen werden.

Folgender Versuchsaufbau wurde unter Berücksichtigung der unter 1-3 beschriebenen Voraussetzungen durchgeführt. Die *E. coli*-Zellen, welche FluBO exprimieren, wurden analog zu dem Wachstumsversuch im BioLector angezogen. Der Maturierungsprozess des YFP-Chromophors konnte hierbei durch die bereits in Kapitel 3.8.2 beschriebene natürliche Sauerstofflimitierung der *E. coli* Zellen verhindert werden, sodass von einem inaktiven FRET-Akzeptor YFP ausgegangen werden kann. Unter der Annahme, dass bei einer schrittweisen Erhöhung der Schüttelfrequenz der FlowerPlates sich auch der Sauerstoffeintrag ins Medium und damit auch der O₂-Gehalt in den Zellen schrittweise erhöht, sollte sich durch die Reifung einiger YFP-Chromophore direkt das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten (532 nm/492 nm) ändern. Anhand dieses Prinzips sollten genügend Messpunkte generiert werden, um anhand einer Auftragung der Veränderung der Fluoreszenzintensitätsverhältnisse in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration eine Kalibrierung erstellen zu können. Mittels dieser Kalibrierungsgeraden sollen Rückschlüsse auf die quantitative Bestimmung von intrazellulären O₂-Konzentrationen mittels FluBO gezogen werden. In der Abbildung 29 sind die Ergebnisse dieses Versuches graphisch dargestellt.

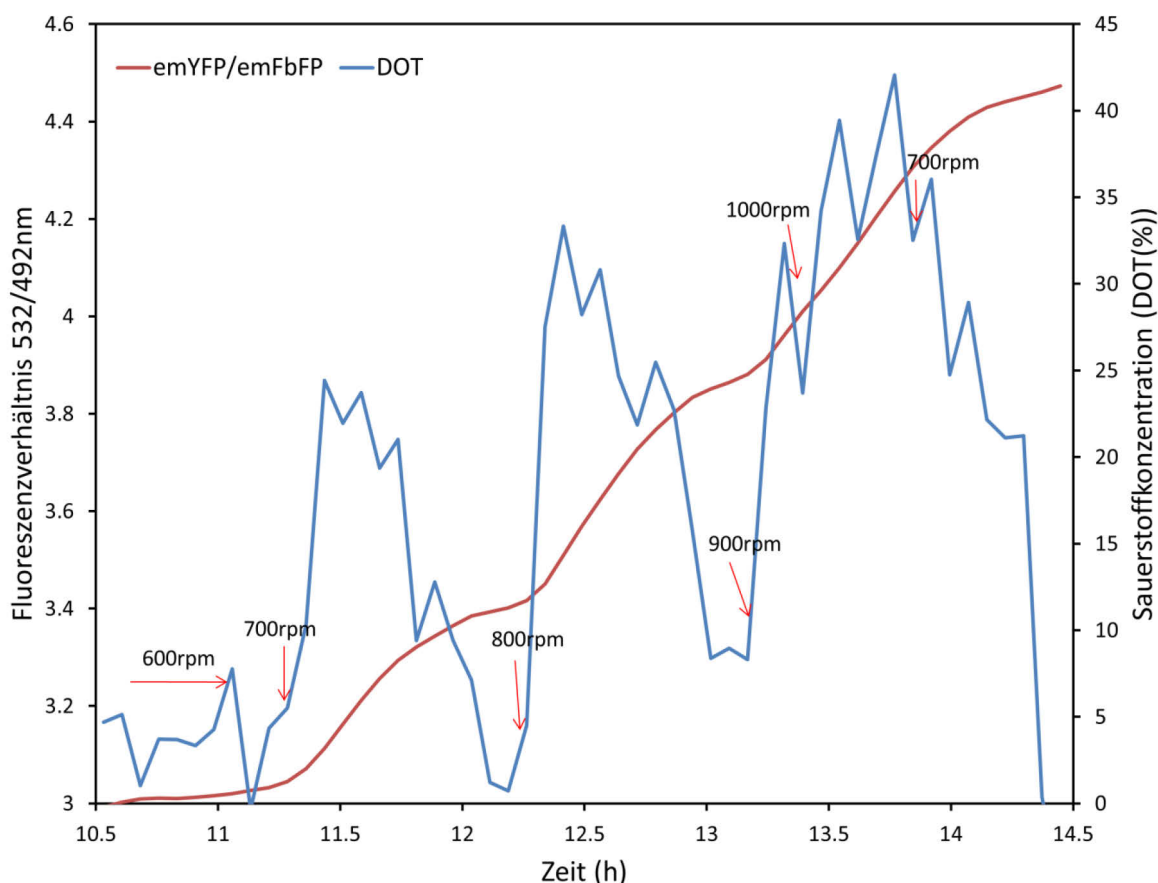


Abbildung 29: Fluoreszenzverhältnisse (Em_{YFP}/Em_{EcFbFP}) des FluBO während des Versuches zur quantitativen Sauerstoffbestimmung.

Dargestellt sind die Fluoreszenzverhältnisse (Em_{YFP}/Em_{EcFbFP}) während des Versuches zur Sauerstoffbestimmung. Die Zellen wurden hierbei analog zu dem Wachstumsversuch bis zur logarithmischen Wachstumsphase und der damit zusammenhängenden O_2 -Limitierung der Zellen angezogen. Danach wurde die Schüttelfrequenz von 600 rpm schrittweise erhöht. Die Schritte sind im Diagramm mit roten Pfeilen und der jeweiligen Frequenz gekennzeichnet. Weiterhin dargestellt ist die Sauerstoffkonzentration (DOT).

Zu erkennen sind die Fluoreszenzverhältnisse zwischen dem FRET- Akzeptor und -Donor (rote Kurve) und die Gelöstsauerstoffkonzentration (DOT) (blaue Kurve) im zeitlichen Verlauf. Der dargestellte Zeitraum von 4 Std. (10,5 h. nach Start der Batch-Kultivierung) beschreibt den Zeitraum in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase der Zellen in dem aktiv durch Schüttelfrequenzerhöhung in die Batch-Kultivierung eingegriffen wurde, um wie unter 3) beschrieben den O_2 -Eintrag in die *E.coli*-Zellen zu erhöhen. Dies musste in der genannten Wachstumsphase geschehen, da zu diesem Zeitpunkt in den *E. coli*-Zellen Sauerstoff-limitierende Bedingungen herrschten. Die Batch-Kultivierung wurde mit einer Schüttelfrequenz von 600 rpm gestartet und nach Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase die Schüttelfrequenz manuell auf 700 rpm erhöht. An dem Verlauf des DOT (blaue Kurve) erkennt man zunächst einen starken Anstieg der Sauerstoffkonzentration im Medium von 0% auf 25% DOT und ein erneutes Absinken des DOT auf 2% DOT aufgrund der starken respiratorischen Aktivität der *E. coli*-Zellen in der Wachstumsphase. Gleichzeitig lässt sich bei Erhöhung der Sauerstoffkonzentration im Medium eine Grün-zu-Gelb-Verschiebung der Fluoreszenzverhältnisse (Em_{YFP}/Em_{EcFbFP}) von 3 auf 3,4 erkennen. Des Weiteren lässt sich bei

sinkenden Gelöstsauerstoffkonzentrationen keine Abnahme des FRET-Verhältnis, sondern eine Stabilisierung auf ein gleichbleibendes FRET-Verhältnis von 3,4 erkennen. Dies bestätigt die Annahme, dass aufgrund der irreversiblen Reifung des YFP-Chromophors zwar steigende O₂-Konzentrationen durch Fluoreszenzverhältnisänderungen detektiert, aber die Abnahme von Sauerstoffkonzentrationen nicht direkt bestimmt werden kann. Bei drei weiteren Erhöhungen der Schüttelfrequenz (800, 900, und 1000 rpm) lassen sich ebenfalls erneute Erhöhungen der Gelöstsauerstoffkonzentrationen bis zu ca. 42% detektieren. Des Weiteren lässt sich erneut eine Erhöhung des FRET-Verhältnisses beobachten, welche direkt mit der steigenden intrazellulären Sauerstoffkonzentration korreliert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass 1) bei diesem Testsystem mittels Schüttelfrequenzerhöhungen eine Steigerung der Gelöstsauerstoffkonzentration erreicht und durch die Optode bestimmt werden kann. Des Weiteren konnte durch respiratorische Aktivität der *E.coli*-Zellen eine Erniedrigung der Gelöstsauerstoffkonzentration erreicht werden. Es lässt sich 2) erkennen, dass die Änderung der Gelöstsauerstoffkonzentration einen direkten Effekt auf die Änderung der intrazellulären O₂-Konzentration hat, welche 3) durch den O₂-Biosensor quantitativ über einen Gelöstsauerstoffkonzentrationsbereich von 0 - 45% detektiert werden konnte. Aufgrund des irreversiblen Prozesses der Reifung des YFP-Chromophors können 4) mit dem vorliegenden Testsystem ausschließlich steigende intrazelluläre O₂-Konzentrationen nachgewiesen werden, da bei fallenden O₂-Konzentration das die Veränderung der Fluoreszenz-Verhältnisse über die Zeit erst gering wird und schließlich konstant bleibt.

Aufgrund der obengenannten Schlussfolgerungen lässt sich folgende Fragestellung formulieren: Können mit dem vorliegenden O₂-Biosensor indirekt durch eine Veränderung des grün-zu-gelb Fluoreszenzverhältnisses über die Zeit betrachtet auch sinkende O₂-Konzentrationen in lebenden Zellen gemessen werden, obwohl die YFP-Chromophorreifung irreversibel ist?

Um diese Fragestellung beantworten zu können, wurde, ebenfalls in Kooperation mit Martin Kunze von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jochen Büchs aus der RWTH Aachen eine Ableitung der FluBO Fluoreszenzverhältnisveränderung über die Zeit $d(\text{Fluoreszenzverhältnis } 532/492 \text{ nm})/d(t)$ der oben beschriebenen Batch-Kultivierung mathematisch bestimmt und eine Fitkurve der Ableitung errechnet. Die abgeleitete Veränderung des Fluoreszenzverhältnisses über die Zeit konnte in Korrelation zur Gelöstsauerstoffkonzentration (DOT) graphisch in Abbildung 30 dargestellt werden.

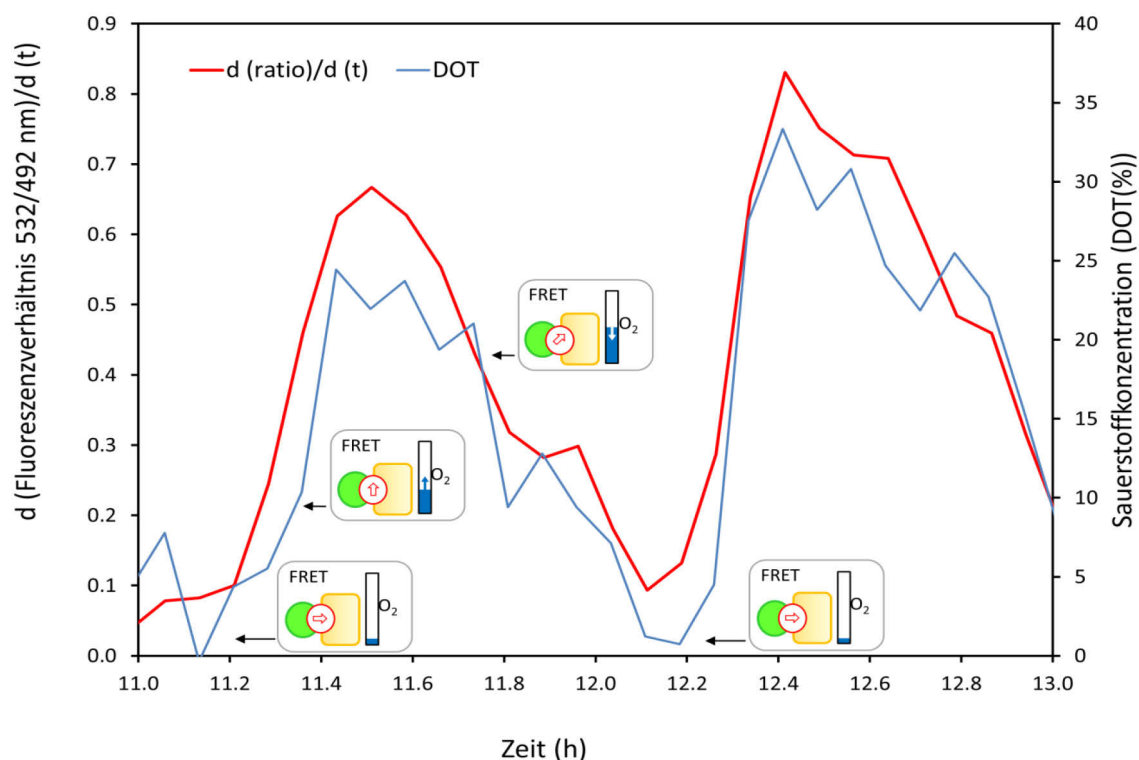


Abbildung 30: Kalibrierung des FluBO für die quantitative Bestimmung von intrazellulärem Sauerstoff

Dargestellt ist ein zeitlicher Ausschnitt des Versuches zur Verdeutlichung der Funktionsweise des FluBO. Graphisch aufgetragen ist die Ableitung der Fluoreszenzveränderungen über die Zeit $d(\text{Fluoreszenzverhältnis } 532/492\text{nm})/d(t)$ (rote Kurve) und die entsprechende Sauerstoffkonzentration (DOT (blaue Kurve)). Zur Verdeutlichung des Kurvenverlaufs sind Schemata hinzugefügt, wobei der grüne Kreis und das gelbe Viereck den Sauerstoffbiosensor symbolisieren. Die Geschwindigkeit der Veränderung des Fluoreszenzverhältnisses über die Zeit ist mit einem roten Pfeil angegeben. Steigende bzw. fallende Sauerstoffkonzentrationen sind mit einem blauweißen Kasten schematisch dargestellt. Der betrachtete Zeitraum beträgt hier 2 Stunden.

Aufgetragen sind hierbei die Gelöstsauerstoffkonzentration (DOT) (blaue Kurve) und die Ableitung $d(\text{Fluoreszenzverhältnis } 532/492\text{nm})/d(t)$ (rote Kurve). Es lässt sich beobachten, dass der Verlauf der Veränderung der FRET-Fluoreszenzverhältnisse über die Zeit sowohl dem Verlauf der Zu- als auch der Abnahme der Gelöstsauerstoffkonzentration entspricht. Anhand der vorliegenden Abbildung und den darin dargestellten Schemata der Funktionsweise des FRET-Systems lässt sich die Geschwindigkeit der Veränderung der FRET-Fluoreszenzverhältnisse über die Zeit in Abhängigkeit von der intrazellulären O_2 -Konzentration darstellen und erklären.

I) Zum Zeitpunkt der O_2 -limitierten Bedingungen kann kein FRET-vermittelte Energieübertrag auf das YFP stattfinden, die Veränderung der Fluoreszenzverhältnisses des FRET-Systems ist somit gleich null (vgl. waagerechter roter Pfeil).

II) Bei Erhöhung der Sauerstoffkonzentration durch eine Schüttelfrequenzerhöhung kann die Chromophorreifung des YFPs stattfinden, was in einem Energieübertrag seitens des FRET-Donors auf den FRET-Akzeptor resultiert. Dies hat eine schnelle Zunahme der Veränderung der Fluoreszenzverhältnisse (grün-zu-Gelb-Verschiebung) des FRET-Systems über die Zeit zur Folge (senkrechter roter Pfeil).

III) Bei gleichbleibender O₂-Konzentration bzw. Abnahme der Sauerstoffkonzentration durch erneuter respiratorischer Aktivität der *E.coli*-Zellen ist anhand der Abbildung zu erkennen, dass $d(\text{Fluoreszenzverhältnis } 532/492 \text{ nm})/d(t)$ abnimmt und somit dem Verlauf der Sauerstoffkonzentrationsabnahme im Medium folgt (sinkender roter Pfeil). Dies geschieht auf Grund der Tatsache, dass im Vergleich zur starken Erhöhung der intrazellulären Sauerstoffkonzentration weniger YFP-Chromophore irreversibel maturieren. Eine rapide Abnahme der intrazellulären Sauerstoffkonzentration hat eine Inhibierung der Maturierung weiterer YFP-Chromophore zur Folge, wodurch die $d(\text{Fluoreszenzverhältnis } 532/492 \text{ nm})/d(t)$ der FluBO Fluoreszenz abnimmt.

Aufgrund der beschriebenen Schlussfolgerungen lässt sich sagen, dass mit Hilfe des vorliegenden Test-Systems zur Kalibrierung des FluBO nicht nur steigende O₂-Konzentrationen, sondern auch indirekt über die Bestimmung der Veränderung der Fluoreszenzverhältnisse des FRET-System über die Zeit auch sinkende Sauerstoffkonzentrationen quantitativ bestimmt werden können, obwohl die YFP-Chromophorreifung irreversibel ist. Dies wird möglich da nicht die absolute Änderung der Sauerstoffkonzentration betrachtet wurde sondern die relative Änderung der Sauerstoffkonzentration über die Zeit. Hierbei wurde sozusagen die unterschiedliche Fluoreszenzemission des FluBO gegenüber sich verändernden Sauerstoffkonzentrationen zwischen zwei aufeinanderfolgenden Messpunkten betrachtet.

Zur abschließenden Kalibrierung des FluBO wurde aus den Fluoreszenzdaten der Abbildung 31 eine lineare Kalibrierungskurve gegenüber der Sauerstoffkonzentration errechnet. Zu erkennen ist hier die Abhängigkeit der FRET-vermittelten Änderungen der Fluoreszenzverhältnisse über die Zeit gegenüber der intrazellulären Sauerstoffkonzentration sowie der Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium. Anhand der dargestellten Kalibrierungsgeraden lässt sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Änderung der Fluoreszenzverhältnisse des FRET-Systems und der Sauerstoffkonzentration erkennen. Aufgrund der gezeigten Ergebnisse zur Kalibrierung des O₂-Biosensors kann die intrazelluläre O₂-Konzentration direkt mit der Gelöstsauerstoffkonzentration korreliert werden. Es ist damit möglich, anhand der Verhältnisveränderungen aufgrund des FRET-gekoppelten Energieübertrags direkt auf die intrazelluläre Sauerstoffkonzentrationen der Zellen zu schließen.

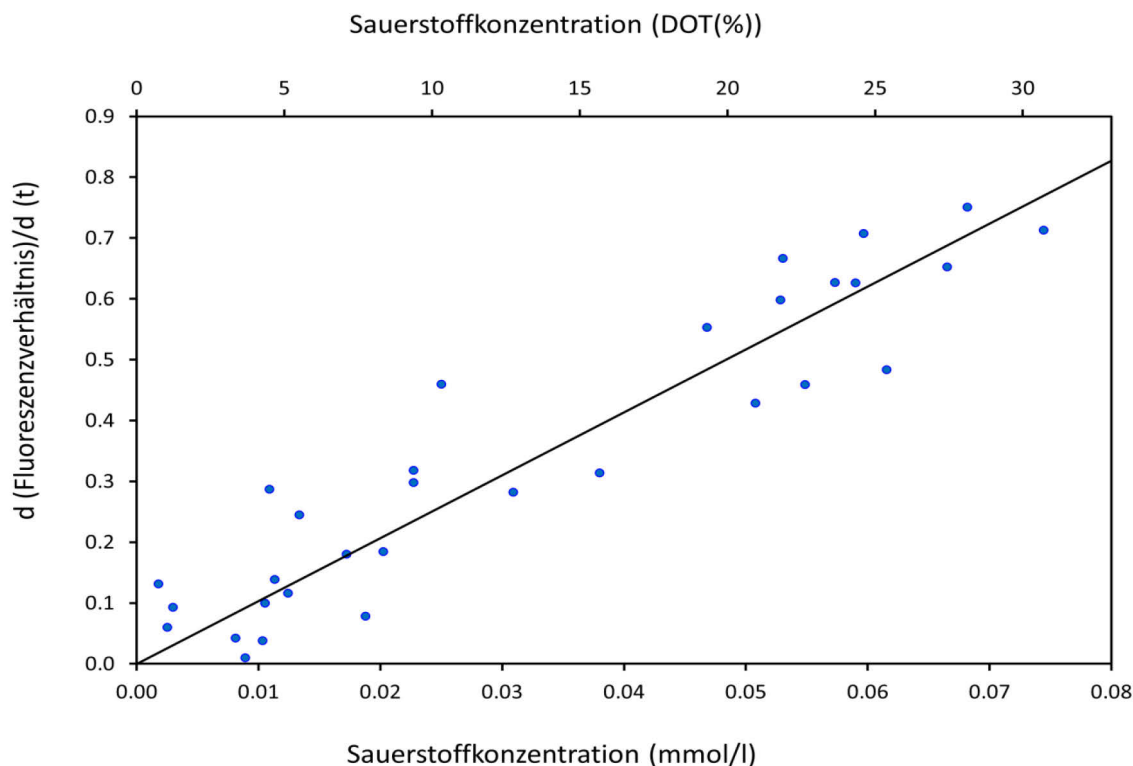


Abbildung 31: FluBO-Kalibrierungsgerade zur ratiometrischen Bestimmung von intrazellulärem Sauerstoff.

Gezeigt sind die Datenpunkte der Ableitung d (Fluoreszenzverhältnis 532 /492 nm)/ $d(t)$ der FRET-Fluoreszenzverhältnisse aufgetragen gegen die Sauerstoffkonzentration in DOT und mmol/l, wobei 100% DOT eine Sauerstoffkonzentration von 0,24 mmol/l entspricht (Ward, 2008).

Aufgrund der Ergebnisse der *in vivo* Charakterisierung konnte folgendes gezeigt werden:

- 1) Es konnte ein Test-System genutzt werden, mit dem es möglich ist durch Schüttelfrequenzveränderungen Gelöstsauerstoffkonzentrationsänderungen in einer Batch-Kultivierung hervorzurufen.
- 2) Mit dem neuartigen FluBO-Biosensor ist es erstmals möglich ist, Sauerstoff über das relative Verhältnis der Signale beider Fluoreszenzdomänen ratiometrisch zu bestimmen.
- 3) Es können nicht nur steigende O_2 -Konzentrationen bestimmt werden, sondern auch durch differentielle Änderungen der FRET-Fluoreszenzverhältnisse über die Zeit auch abnehmende Sauerstoffkonzentration detektiert werden.
- 4) Durch die Kalibrierung des FluBO können die intrazellulären Sauerstoffkonzentrationen erstmals direkt mit den durch die Optode im Biolector bestimmten Gelöstsauerstoffkonzentrationen korreliert werden.

FluBO-Zusammenfassung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass nach erfolgreicher *in vitro*-Charakterisierung der Einzelkonstrukte und anschließender Konstruktion einer funktionellen FRET-Fusion, die Abhängigkeit des FRET-Systems gegenüber der Sauerstoffkonzentration in einer Batch-Kultivierung bestätigt werden konnte. Nach Bestimmung der Veränderungen der FRET-Fluoreszenzverhältnisse über die Zeit und anschließender erfolgreiche Kalibrierung des Sauerstoff-Biosensors auf die intrazelluläre Sauerstoffkonzentration konnte eine ratiometrische Bestimmung der Zu- und Abnahme von intrazellulären Sauerstoffkonzentrationen bestätigt werden.

In dieser Arbeit konnte somit erfolgreich der erste genetisch kodierte FRET-Biosensor zur quantitativen Detektion von intrazellulären Sauerstoffkonzentrationen beschrieben werden (Pötzkei et al., 2012).

3.9 Einsatz des FluBO-Fusionsproteins als pH-Biosensor

Aufgrund der guten Eignung der FRET-Fusion als O_2 -Biosensor wurde nach weiteren Anwendungen der Fusion als Biosensor gesucht. Ein weiteres wichtiges Anwendungsgebiet von FRET-Biosensoren ist die Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes. Wie schon näher im Kapitel 1.3 beschrieben, liegen bereits einige etablierte FP-basierte pH-Biosensoren, wie z.B. das pHlameleon (Esposito et al., 2008) vor. Dieser pH-Biosensor besteht aus einer CFP und einer YFP Domäne, die einen pKa-Wert von 5,9 (CFP) bzw. 6,0 (YFP) aufweisen. Um die Abhängigkeit der Fluoreszenzemission des FbFP-basierten Biosensors vom pH-Wert charakterisieren zu können, wurde FluBO, YFP und EcFbFP in *E. coli* BL21(DE3) Zellen exprimiert und affinitätschromatographisch mittels His₆-Tag aufgereinigt. Die Fluoreszenzintensitätsänderung der unfusionierten FRET-Partner sowie des FRET-Systems in Abhängigkeit von verschiedenen pH-Werten wurde unter Zuhilfenahme eines pH-Universalpuffers *in vitro* näher charakterisiert. Hierzu wurden die verschiedenen Fluoreszenzintensitäten bei einem pH-Bereich von 4.0-8.0 gemessen werden. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen dargestellt. Die oben beschriebene pH Abhängigkeit des YFPs bzw. Unabhängigkeit des EcFbFP konnte hierbei bestätigt werden. Wie anhand der Abbildung 32 an den Fluoreszenzemissionsspektren zu erkennen ist, nimmt die Fluoreszenzintensität des YFPs bei der Wellenlänge 527 nm mit sinkendem pH-Wert von 4×10^6 bei pH 8 auf die Hälfte bei pH 5,2 ab.

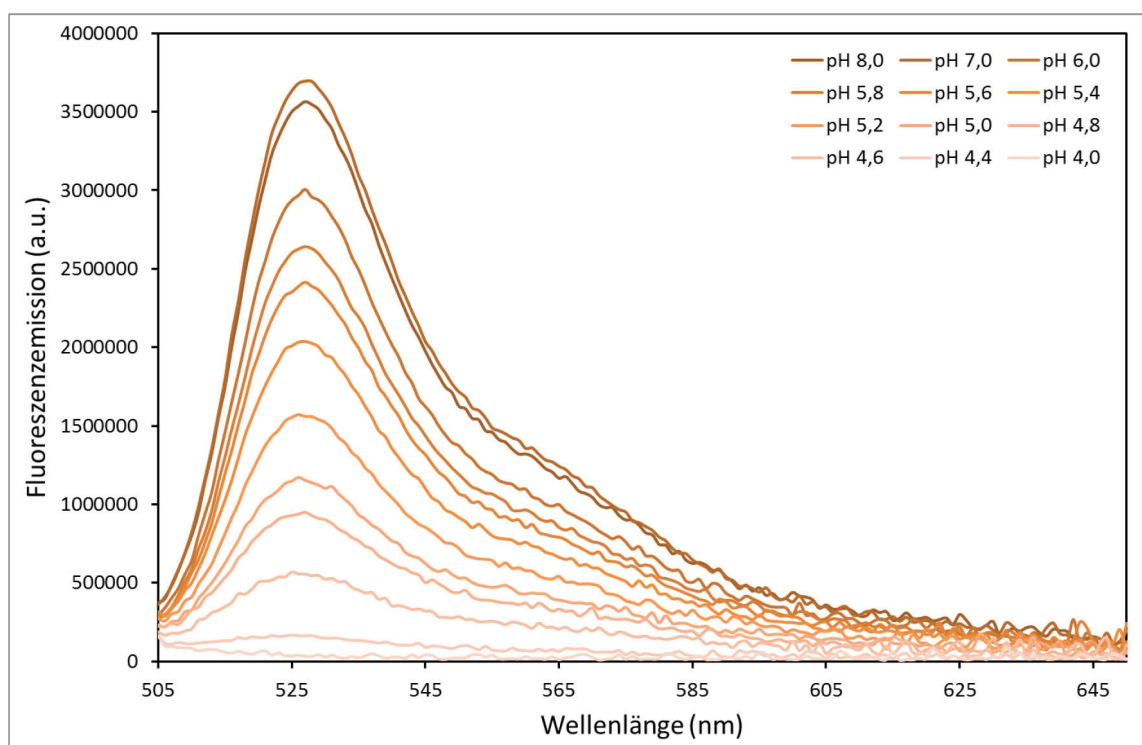


Abbildung 32: Fluoreszenzemission des YFP in Abhängigkeit des pH-Wertes

Das Diagramm zeigt die Abhängigkeit der Fluoreszenzemission von YFP bei verschiedenen pH-Werten. Als Messbereich wurde der Bereich zwischen pH 4-8 gewählt. Bei einem pH-Werten 5,4 ist nur noch die Hälfte der ursprünglichen Fluoreszenz (vgl. pH 8) zu erkennen.

Anhand der pH-abhängigen Fluoreszenzspektren des YFPs konnte der pKa Wert des Proteins bestimmt werden (Abb. 33). Der pKa-Wert bei fluoreszenten Proteinen ist als der Wert beschrieben, bei dem das Protein noch 50% seiner Fluoreszenzemission zeigt. Der pKa des in dieser Arbeit verwendeten YFPs liegt somit bei $pK_a=5,2$. Dieser Wert wird im Allgemeinen dazu genutzt, die pH-Stabilität von Fluophoren, wie zum Beispiel denen der GFP –Familie, zu untersuchen. So erreicht das Citrine einen pKa von 5,6 und Venus einen pKa von 6,0 (Griesbeck et al., 2001; Kremers et al., 2006; Nagai et al., 2002). Weitaus intolerantere Proteine gegenüber niedrigen pH-Werten, wie das YFPH148G, haben laut Literaturangaben dagegen einen pKa Wert von 8.0 (Wachter et al., 1998). Bei diesen Proteinen liegt das Chromophor, im Gegensatz zu den obengenannten YFP-Varianten, schon bei relativen hohen pH-Werten protoniert vor, was eine erniedrigte Fluoreszenz zur Folge hat. Das hier verwendete YFP ist somit eine der pH stabilsten gelb-fluoreszierenden Varianten der GFP Familie.

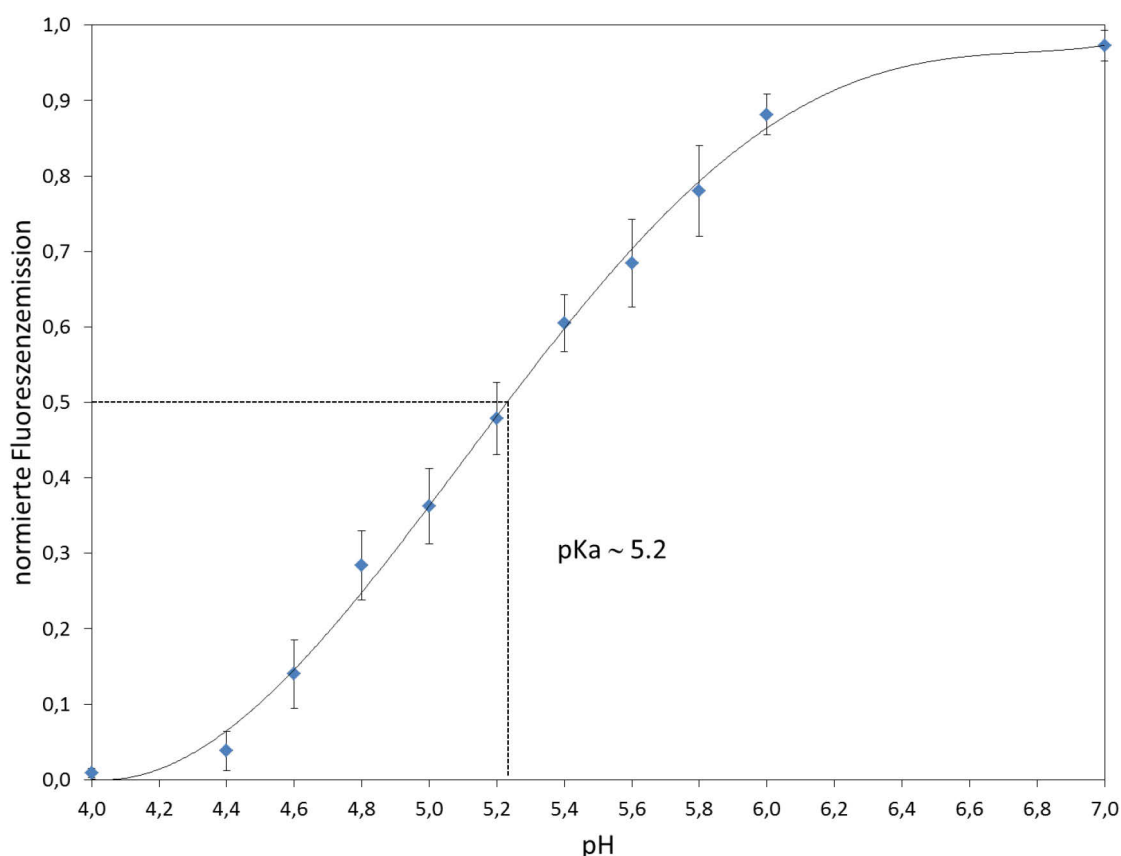


Abbildung 33: pH-Titrationskurve zur Bestimmung des pKa-Werts von YFP.

Graphisch aufgetragen sind die Messpunkte der pH-Titration des YFPs. Dargestellt ist die normierte Fluoreszenzemission gegen den pH-Wert. Der pKa-Wert ist mit gestrichelten Linien markiert. Dieser konnte mit $pK_a = 5,2$ bestimmt werden. Die Messpunkte sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei voneinander unabhängigen Messungen.

Bei dem EcFbFP dagegen konnte keine bzw. nur eine geringe Abhängigkeit gegenüber verschiedenen pH-Werten detektiert werden, wie in Abbildung 34 dargestellt ist.

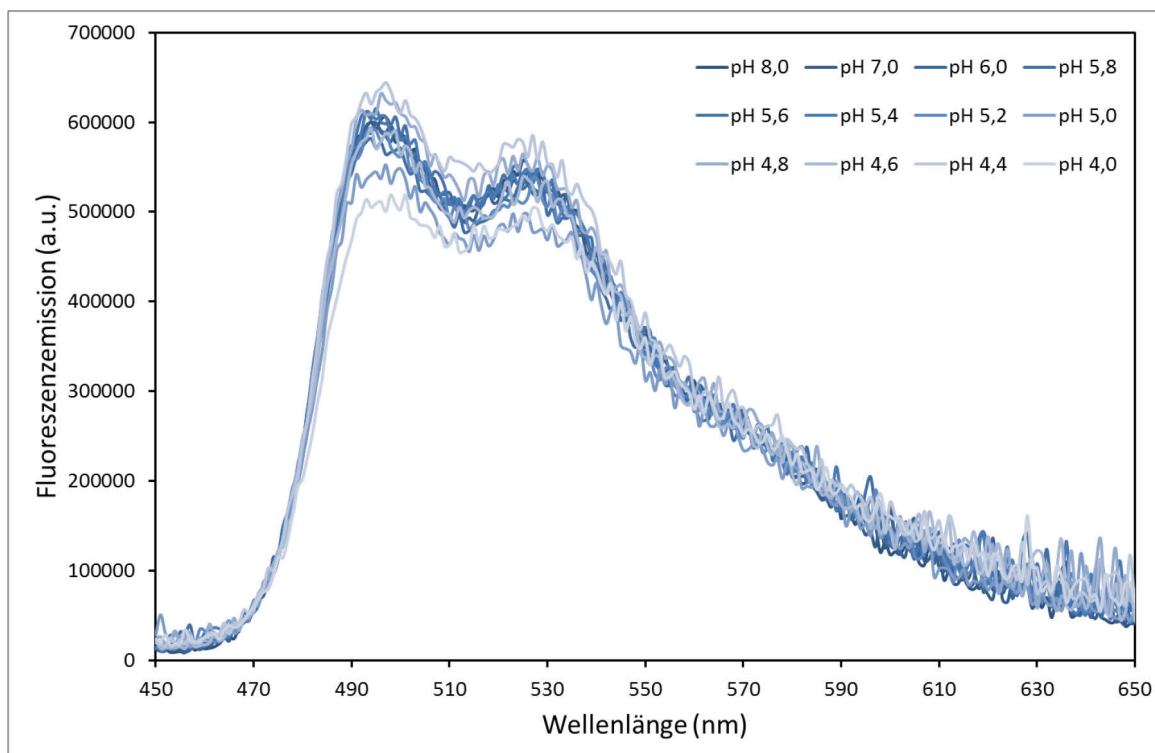


Abbildung 34: Fluoreszenzemission des EcFbFP, in Abhängigkeit des pH-Wertes

Das Diagramm zeigt die Abhängigkeit der Fluoreszenzemission von EcFbFP bei verschiedenen pH-Werten. Als Messbereich wurde der Bereich zwischen pH 4-8 gewählt.

Das EcFbFP zeigt fast über den gesamten pH-Bereich von 4.0 - 8.0 nahezu konstante Fluoreszenzemission. Die Fluoreszenzintensität weist hierbei einen maximalen Unterschied von 1×10^6 auf. Im Vergleich dazu beträgt der maximale Unterschied der Fluoreszenzintensität des YFPs in einem pH-Bereich von 4 bis 8 bei $3,7 \times 10^6$ a.u.. Anhand der vorliegenden Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass das YFP um einen Faktor von 3,7 pH-sensitiver reagiert als das EcFbFP.

Die pH-Abhängigkeit des vom O₂-Biosensors FluBO-vermittelten Fluoreszenzsignals ist in Abbildung 35 schematisch dargestellt. In dem Diagramm dargestellt ist das errechnete Fluoreszenzverhältnis zwischen dem FRET-Akzeptor YFP und FRET-Donor EcFbFP. Zu erkennen ist eine klare lineare Abhängigkeit des FRET-Verhältnisses in Abhängigkeit vom pH-Wert. Das Verhältnis nimmt hierbei von 5,8 bei pH 8,0 auf 0,9 bei pH 4,0 um einen Faktor 6 ab. Somit besitzt dieser Sensor einen besseren Dynamikumfang bezüglich des pH-Wertes als vergleichbare etablierte Sensoren, wie beispielsweise die CFP-YFP-Fusionen, welche als pH-Biosensoren verwendet werden (Esposito et al., 2008; Markova et al., 2008).

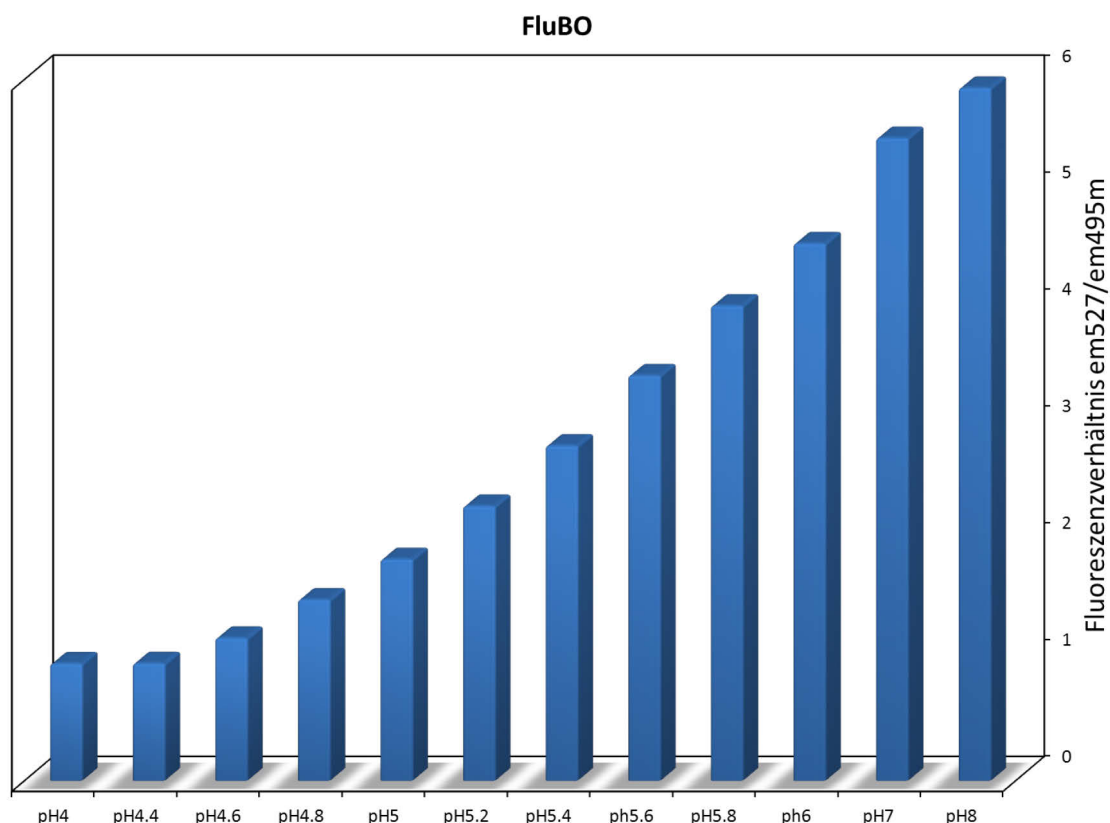


Abbildung 35: *In vitro* pH-Titration des Biosensors FluBO.

Dargestellt ist das errechnete Fluoreszenzverhältnis 527 nm/ 495 nm der Emissionsmaxima von YFP und FbFP. Die *in vitro*-Messung der YFP-FbFP-Fluoreszenzintensitäten wurde in einem pH-Wertbereich von 4,0 bis 8 durchgeführt (vgl. Kap. 2.10.2). Detektiert wurde die Fluoreszenzemission der Fusion bei einer spezifischen FbFP-Anregung ($\lambda=380$ nm) mit Hilfe des Perkin Elmer Fluoreszenzphotometers. Die Absorption der Probe wurde bei einer Wellenlänge von 514 nm auf 0,1 im Proteinlagerpuffer (10 Mm NaH_2PO_4 , 10 mM NaCl, pH 8) eingestellt und anschließend die Fluoreszenzspektren gemessen (nicht gezeigt).

Die Veränderung des FRET-Verhältnisses ist somit allein auf eine Veränderung bzw. Abnahme der Fluoreszenzemission des Akzeptormolekül YFP zurückzuführen. Aus beiden Abbildungen geht hervor, dass sich der neue Biosensor hervorragend zur äußerst sensitiven Bestimmung des pH-Werts eignet. Es konnte somit gezeigt werden, dass FbFP- basierende Biosensoren nicht nur sehr gut zur ratiometrischen Sauerstoffdetektion *in vivo* geeignet sind, sondern auch als pH-Biosensor eingesetzt werden können. Da FluBO primär als Sauerstoffsensor eingesetzt werden soll, wurde mit dem hier vorliegenden YFP, dem GFP10C von Clontech eines der pH-insensitivsten YFP's verwendet. Hierbei ist der pKa von YFP so niedrig, dass im Rahmen normaler physiologischer Verhältnisse die pH-Abhängigkeit wenig ins Gewicht fällt. Umso erstaunlicher ist es, dass man mit dem FluBO sensitivere Veränderungen in dem pH-Wert in einem Bereich von 4 bis 8 detektieren kann als mit anderen etablierten Systemen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass FluBO durch das YFP, wie alle FP-basierten Biosensoren sensitiv gegenüber niedrigen pH-Werten reagiert; für die meisten Anwendungen ist das allerdings zu vernachlässigen, da der pH-Wert *in vivo* meist konstant

ist (vgl. Diskussion); dennoch lassen diese Untersuchungen den Schluss zu, dass man aufgrund der pH-Toleranz von FbFP sensitive pH-Biosensoren mit verschiedenen YFP-Varianten mit unterschiedlichen pKa-Werten konstruieren könnte. Ziel war es daher, neue pH-Biosensoren zu charakterisieren und deren Funktion für verschiedene Anwendungsmöglichkeiten zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nur kurz auf die *in vitro* und *in vivo* Charakterisierung der neuen pH-Sensoren eingegangen werden, da diese im Rahmen der Masterarbeit von Christian Rupprecht durchgeführt wurde.

Lediglich die erste grundlegende *in vivo* Charakterisierung konnte in dieser Arbeit realisiert werden. Es sollte durch die Erzeugung unterschiedliche FbFP-YFP-Fusionen eine Toolbox an neuen FbFP-basierten pH-FRET Biosensoren hergestellt werden, mit denen man in der Lage wäre, pH-Werte in verschiedenen Bereichen ratiometrisch und mit einem großen Dynamikumfang detektieren zu können. Hierzu wurden von Christian Rupprecht drei verschiedene YFP-Varianten an das EcFbFP fusioniert. Dazu wurden folgende YFP-Varianten verwendet: (i) Citrine (pKa = 5.6 (Griesbeck et al., 2001)), Llopi (pKa = 7.1 (Llopi et al., 1998)) und Wachter (pKa = 8.0 (Wachter et al., 1998)). Die so erzeugten Biosensoren werden im folgenden FluBpH 5.6, FluBpH 7.1 und FluBpH 8.0 benannt. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte ausschließlich die *in vivo* Charakterisierung des FluBpH 5.6.

3.9.1 *In vivo* Anwendung des FluBpH 5.6

Um die Funktionalität des FluBpH 5.6 überprüfen zu können, musste zuvor eine *in vitro* Charakterisierung durchgeführt werden, bei der die Abhängigkeit der Veränderung der FRET-vermittelten Fluoreszenzverhältnisse gegenüber dem pH-Wert bestimmt werden sollten. Das Ergebnis des FRET-Verhältnisses gegenüber dem pH ist in der Abbildung 36 dargestellt. Es lässt sich eine klare Abhängigkeit der FluBpH 5.6 gegenüber dem pH erkennen. Das Fluoreszenzverhältnis nimmt hierbei von 8,5 bei pH 8 auf 1 bei pH 4 um einen Faktor 8 ab. Vergleicht man diese Abnahme mit der des FluBO (Faktor 6) kann geschlussfolgert werden, dass mit dem hier vorliegendem FluBpH 5.6 ein pH-Biosensor vorliegt, welcher auf Grund des höheren dynamischen Bereiches sensibler in der Lage ist, pH-Unterschiede zu detektieren. Diese pH-Titration des FluBpH 5.6 ist ebenfalls Bestandteil der Masterarbeit von C. Rupprecht und soll hier nur zum besseren Verständnis bezüglich der Funktionalität des Biosensors *in vitro* dienen. Die Bestätigung der Abhängigkeit des vorliegenden FRET-Systems gegenüber schwankendem pH ist Grundvoraussetzung zur weiteren Charakterisierung *in vivo*.

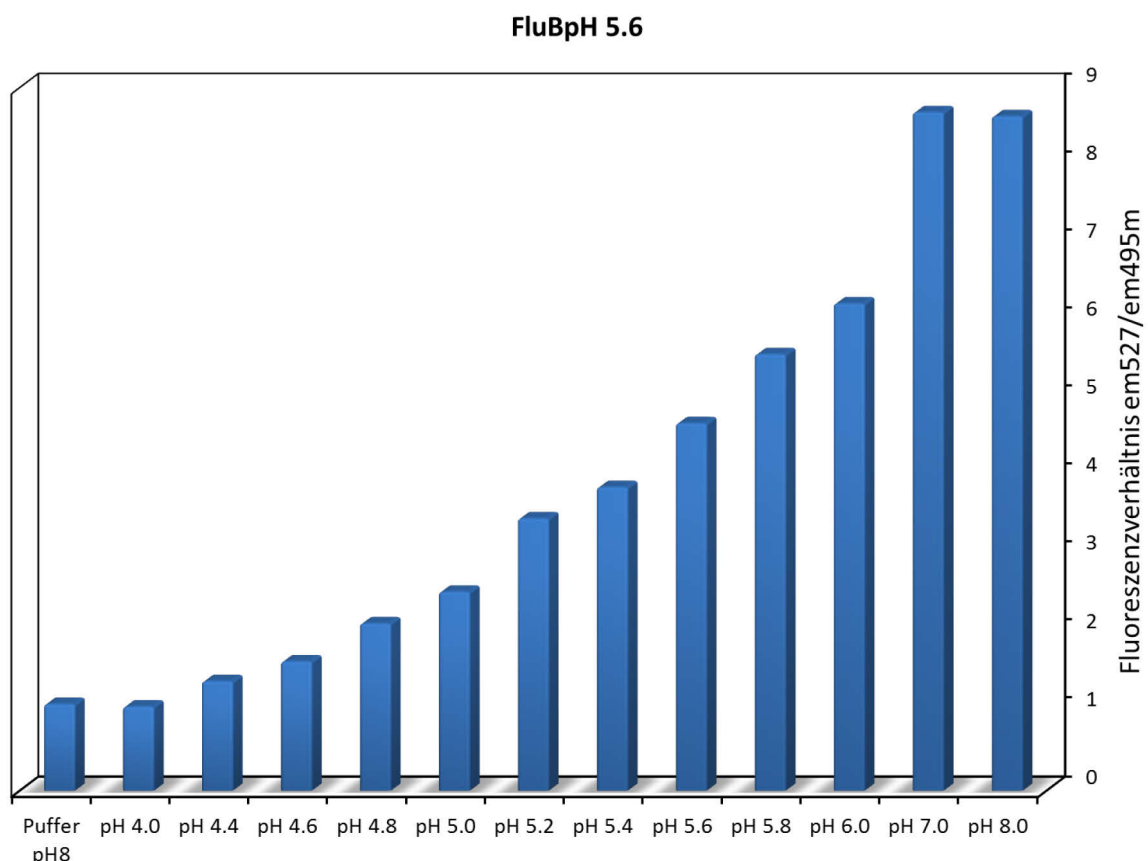


Abbildung 36: *In vitro* pH-Titration des Biosensors FluBpH 5.6.

Dargestellt ist das errechnete Fluoreszenzverhältnis 527nm/ 495 nm der Emissionsmaxima von YFP und FbFP. Die *in vitro*-Messung der YFP-FbFP-Fluoreszenzintensitäten wurde in einem pH-Bereich von 4.0 bis 8 durchgeführt. Detektiert wurde die Fluoreszenzemission der Fusion bei einer spezifischen FbFP-Anregung ($\lambda = 380\text{nm}$) mit Hilfe des Perkin Elmer Fluoreszenzphotometers. Die Absorption der Probe wurde bei einer Wellenlänge von 514 nm auf 0,1 im Proteinpuffer eingestellt und anschließend die Fluoreszenzspektren gemessen (nicht gezeigt).

Um die Funktionalität des FluBpH 5.6 überprüfen zu können, musste ein *in vivo* Testsystem gefunden werden, in dem die pH-Wertabhängigkeit getestet und detektiert werden konnte. Da der pH-Wert im Zytoplasma von Bakterienzellen strikt reguliert wird, musste eine Methode etabliert werden, die eine Änderung des intrazellulären pH-Werts ermöglicht. Ahmed und Booth haben 1983 bereits beschrieben, dass der pH-Wert in lebenden Bakterienzellen beliebig eingestellt werden kann. Dies geschieht mit Hilfe des Antibiotikums Nigericin. Nigericin wirkt wie ein Ionophor, dass die Permeabilität der Bakterienmembran für Protonen erhöht. Das Antibiotikum fungiert hierbei als Antiporter für H^+ - und K^+ -Ionen (Kovbasnjuk et al., 1991; Myskiw et al., 2010; Prabhananda and Kombrabail, 1999; Sturz et al., 2011). Bei einer genügend hohen Konzentrationen an K^+ -Ionen ist die Bakterienzelle in Anwesenheit von Nigericin nicht mehr in der Lage, den pH-Wert zu regulieren. In diesem Fall kann also davon ausgegangen werden, dass in der Zelle der gleiche pH-Wert vorherrscht, wie im umgebenden Medium. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen, die FluBpH 5.6 exprimieren, kultiviert, und die pH-Sensor-vermittelte Fluoreszenz des FRET-Donors und -Akzeptors mit einem Fluoreszenzmikroskop anschließend in den Zellen sichtbar gemacht. Hierbei ist zu beachten, dass die richtige K^+ -Ionenkonzentration gewählt

werden muss, damit der intra- und extrazelluläre pH-Wert möglichst identisch sind. Des Weiteren musste die richtige Nigericin-Konzentration gewählt werden, um eine pH-abhängige Änderung der Biosensor-Fluoreszenz gewährleisten zu können. Die nötigen Vorversuche kamen hierbei zu dem Ergebnis, dass eine K^+ -Ionenkonzentration von 150 mM KCl im Puffer und eine Nigericin-Konzentration von 2 μ M ausreichend waren, um in den Zellen die nötigen Bedingungen für die Mikroskopaufnahmen zu schaffen. Die Zellen wurden nach (Ahmed and Booth, 1983) mit EDTA behandelt, um diese aufnahmefähiger für das Nigericin zu machen. Vor der Behandlung mit EDTA und dem Versetzen mit dem KCl Nigericin Puffer wurden die mit dem pRhotHi-2 FluBpH 5.6 transformierten *E. coli* BL21(DE3) Zellen in Autoinduktionsmedium angezogen und 7 h bei 37°C kultiviert. Die Zellen wurden zentrifugiert und das Pellet in dem jeweiligen Puffersystem resuspendiert. In Abbildung 37 sind die Mikroskopaufnahmen des FluBpH 5.6 in *E. coli* Zellen gezeigt. Beim Versetzen der Zellen mit Medium bzw. Puffer mit verschiedenen pH-Werten dieser direkt durch Veränderung des FRET-Verhältnisses direkt in den Zellen detektiert werden.

FluBpH5.6

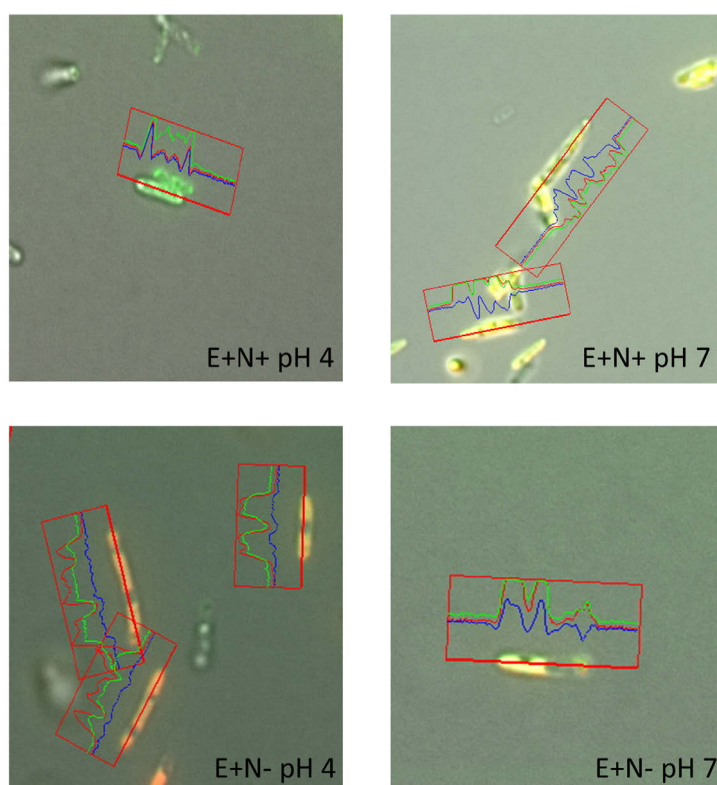


Abbildung 37: In vivo-Analyse der Wirkungsweise von Nigericin mithilfe des pH-Biosensors FluBpH 5.6.

Dargestellt sind FluBpH 5.6 exprimierende *E. coli* BL21(DE3)-Zellen nach einer Kultivierung in Autoinduktionsmedium bei 37°C für 7 h. Die Zellen wurden in einem 150 mM KCl-haltigen Citrat/ Phosphat-Puffer (vgl. Kapitel 2.10.2) aufgenommen. Es wurden hierbei mehrere Ansätze gewählt. Je nach Ansatz wurden die Zellen zusätzlich mit 2 μ M Nigericin und einem Puffer pH 4,0 bzw. pH 7,0 versetzt. Alle Zellen wurden vorher mit einem EDTA-Puffer behandelt. Die zusätzlich gezeigten Histogramme entsprechen den Kanälen Durchlicht (blau), Donorfluoreszenzemission (grün, Anregung 375 - 385 nm, Emission 480-500 nm), Akzeptorfluoreszenz-emission (rot, Anregung 375-385 nm, Emission 520 - 530 nm). Die gezeigten *E. coli*-Zellen sind beispielhaft für alle ausgezählten Zellen.

Dargestellt sind *E. coli* Zellen mit EDTA und Nigericin bei pH 4 und pH 7 (Abb. 37, oben). Als Negativkontrolle sind in den unteren beiden Abbildungen die Mikroskopbilder der *E. coli* Zellen mit EDTA und ohne Nigericin gezeigt. Die dargestellten Bilder stellen Überlagerungen von drei Aufnahmen dar: Zunächst wurden Bilder von Bakterienzellen mit Durchlicht (Detektion der Bakterienzellen ohne Fluoreszenz) gemacht. Des Weiteren wurde die von dem pH-Biosensor emittierte Fluoreszenz mit zwei Filterpaarungen aufgenommen. Mit dem Filterset „FRET-Donor“ wurde das EcFbFP mit einem Wellenlängenbereich von 375 - 385 nm angeregt und eine Fluoreszenzemission bei 480 – 500 nm aufgenommen. Der FRET vom Donor auf den Akzeptor Citrine wird mit dem Filterset „FRET-Akzeptor“ ebenfalls mit einem Wellenlängenbereich von 375 - 385 nm angeregt und die Fluoreszenzemission bei 520 - 530 nm detektiert. Zur besseren Unterscheidung der drei Kanäle sind diese in Falschfarben dargestellt, da die Kamera die aufgenommenen Bilder monochromatisch darstellt. Die an den Zellen dargestellten Histogramme zeigen die an den Punkten mit den jeweiligen Filterpaarungen detektierten Helligkeitswerte der emittierten Fluoreszenz. Je höher der Wert, d.h. je größer die Änderung des Helligkeitswertes ist, desto höher ist die emittierte Fluoreszenz. Das grüne Histogramm stellt die Donorfluoreszenz, das rote Histogramm die FRET-basierte Akzeptorfluoreszenz dar. Betrachtet man zunächst die Negativkontrolle in der kein Nigericin eingesetzt wurde, so lässt sich, wie erwartet, anhand des Vergleichs bei pH 4 und pH 7 keine Änderung der Donor- und Akzeptorfluoreszenzen erkennen. Dies bedeutet, dass die Zellen ohne das Nigericin noch intakt sind und die Protonen nicht in die Zellen eindringen konnten. Die Akzeptorfluoreszenz wird somit nicht durch die Protonierung des YFP-Chromophors bei geringen pH-Werten beeinflusst, da die Zelle die Aufnahme der Protonen reguliert. Die Energie kann also in beiden Fällen von dem Donormolekül nach Anregung auf das Akzeptormolekül übertragen werden und es ist anhand der Histogramme eine Akzeptor-Fluoreszenzemission detektierbar. Anders verhält es sich mit den *E. coli* Zellen, die mit Nigericin und EDTA behandelt wurden. Bei pH 4 lässt sich hierbei eine deutliche Abnahme der Akzeptorfluoreszenz erkennen. Die Intensität der YFP-Fluoreszenz (rotes Histogramm) ist hierbei deutlich gegenüber dem neutralen pH-Bereich (pH 7) erniedrigt. Anhand der dargestellten Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass 1) durch Zugabe des Ionophors Nigericin der pH-Wert der *E. coli*-Zellen beeinflusst werden kann, welcher 2) durch die ratiometrische Detektion der Veränderungen in den FRET-Fluoreszenzverhältnissen des pH-Biosensors eindeutig detektiert werden konnte.

Diese Daten belegen somit eindeutig, dass FbFP-basierende Biosensoren für die sensitive Bestimmung des pH-Werts sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eingesetzt werden können. Diese pH-Biosensoren weisen zudem eine weit höhere pH-Sensibilität auf als vergleichbare FRET-Systeme (Esposito et al., 2008) auf und haben somit einen größeren dynamischen Bereich. Es können so pH-Wertänderungen anhand der sich verändernden Fluoreszenzverhältnisse sehr viel genauer und hochauflösender nachgewiesen werden (vgl. Diskussion).

IV. Diskussion

Um in der Biotechnologie und in der Grundlagenforschung verschiedene Faktoren, Stoffe oder Prozesse mit Hilfe von Biosensoren analysieren zu können, spielen hierbei die genetisch kodierten Fluoreszenzreporterproteine eine wichtige Rolle. Aufgrund der einfachen Anwendbarkeit und des nicht-invasiven Einsatzes dieser Reporterproteine spielt die Weiterentwicklung bereits vorhandenen Sensoren und die Entwicklung neuer Biosensoren eine wichtige Rolle (Awaji et al., 2001; Berg et al., 2009). Spezielle Biosensoren, die in der Grundlagenforschung und Biotechnologie zum Einsatz kommen, sind die FRET-basierten Biosensoren. Mit Hilfe dieser Biosensoren lassen sich verschiedenste Metabolit- oder Ionenkonzentrationen oder Veränderungen von Zellparametern, wie pH-Wert (Awaji et al., 2001; Tantama et al., 2011) oder intrazelluläre Ionenkonzentrationen *in vivo* ratiometrisch detektieren. So ist es in der Vergangenheit gelungen, FRET-Systeme zu entwickeln, mit denen man sehr sensitiv sowohl in prokaryotischen Zellen wie auch in eukaryotischen Systemen, wie beispielsweise in Neuronen (Hellwig et al., 2004), verschiedene Ionen wie Ca^{2+} -Ionen oder Cl^- -Ionen detektieren kann (Markova et al., 2008), wodurch Zusammenhänge in der Signaltransduktion verstanden werden konnten. Auch zum besseren Verständnis der Abhängigkeit und Reaktion von Zellen gegenüber veränderten Zellfaktoren beispielsweise, schwankenden NADPH-Konzentrationen oder Redoxpotentialen konnte die Detektion mit spezifischen Biosensoren beitragen (Imamura et al., 2009; Zaccolo et al., 2000). Die dabei verwendeten FRET-Fusionen basierten hierbei meist auf Fluoreszenzreportern der GFP-Familie, welche ursprünglich aus der Qualle *Aequoria victoria* isoliert wurden oder aus DsRed-Derivaten, welche aus Korallen der Gattung *Discosoma sp.* stammen (Baird et al., 2000). Bislang war man allerdings noch nicht in der Lage, mittels genetisch kodierter Sauerstoffbiosensoren in lebenden Zellen oder Systemen quantitativ Sauerstoffkonzentrationen und deren Schwankungen über einen längeren Zeitraum zu detektieren. Hierbei kann die Veränderung der Fluoreszenz-Verhältnisse bei steigender Sauerstoffkonzentration durch Abnahme der Donorfluoreszenz und gleichzeitiger Zunahme der Akzeptorfluoreszenz ermittelt werden. Die ratiometrische Detektion von Sauerstoff kann demnach nur aufgrund einer Sauerstoff-unabhängigen Donordomäne und einer sauerstoffabhängigen Akzeptordomäne erfolgen. Mit dem neuartigen Fluoreszenz-reporterprotein EcFbFP liegt das erste Mal eine mögliche FRET-Donordomäne vor, welche auch unter anaeroben Bedingungen fluoresziert. Dies ist aufgrund des Kofaktors FMN möglich, welche unabhängig von Sauerstoff fluoresziert (Drepper et al., 2010). Bevor ein solcher Biosensor realisiert werden konnte, muss die Fragestellung beantwortet werden, ob sich das Reporterprotein EcFbFP als FRET-Donordomäne in verschiedenen FRET-Systemen eignet. Eine typische FRET-Donordomäne ist das CFP. Mehrere etablierte FRET-Systemen bestehen aus CFP und YFP Varianten.

4.1 Austausch der FRET-Donordomäne CFP durch das EcFbFP

Eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit war es, zu ermitteln, ob die Möglichkeit besteht, das sauerstoffabhängige Fluoreszenzreporterprotein CFP durch das sauerstoffunabhängige Reporterprotein EcFbFP als FRET-Donordomäne ersetzen zu können, um so einen Sauerstoffsensor zu erzeugen. Aufgrund seiner ähnlichen Fluoreszenzeigenschaften sollte das EcFbFP ($\lambda_{\text{Abs}} = 450 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 495 \text{ nm}$, $\Phi = 0,39$, $\epsilon = 12500 \text{ cm}^{-1} \text{ Mol}^{-1}$) (Drepper et al., 2010) sehr gut in der Lage sein, das CFP ($\lambda_{\text{Abs}} = 430 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 474 \text{ nm}$, $\Phi = 0,36$, $\epsilon = 28000 \text{ cm}^{-1} \text{ Mol}^{-1}$) (Kremers et al., 2006) als FRET-Donor zu ersetzen. Um dies zu überprüfen, mussten die genauen spektralen Eigenschaften des Einzelproteins ermittelt werden. Ein wichtiger Faktor für ein funktionelles FRET-System ist hierbei die Überlappung des Emissionsspektrums des FRET-Donors mit dem Absorptionsspektrums des FRET-Akzeptors. Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das EcFbFP diese spektrale Voraussetzung zur Bildung eines FRET-Systems erfüllt. Zur Realisierung eines funktionellen FRET-Systems ist es von entscheidender Bedeutung, die genauen Fluoreszenzeigenschaften zu kennen.

4.1.1 Verifizierung der Fluoreszenzeigenschaften des FRET-Akzeptors YFP

Bei dem vorliegenden FRET-Akzeptor handelt es sich um die Sequenz-identische YFP-Variante die als GFP10C T203Y/S65G/V68L/S72A von Ormö (Ormö et al., 1996) charakterisiert bzw. publiziert wurde und von Clontech vertrieben wird. Da verschiedene Eigenschaften des verwendeten YFPs nicht den publizierten Eigenschaften entsprachen, musste das vorliegende YFP *in vitro* charakterisiert werden. Nach erfolgreicher *in vitro* Charakterisierung konnte ermittelt werden, dass das vorliegende YFP einen abweichenden pKa-Wert von 5,2 gegenüber dem publizierten Wert von 5,7 (Kremers et al., 2006) besitzt. Des Weiteren konnte die Quantenausbeute mit $\Phi = 0,71$ bestimmt werden. Dieser Wert weicht bis auf den pKa-Wert verhältnismäßig gering von den von der Arbeitsgruppe um Kremers publizierten Wert (93,4% von, $\Phi_{\text{Kremers}} = 0,76$) ab, jedoch sehr stark von den von Ormö publizierten Daten (82,8% von $\Phi_{\text{Ormö}} = 0,63$). Diese Abweichung kann durchaus auf eine veränderte Pufferzusammensetzung in den jeweils verwendeten Assay Puffer zurückgeführt werden. So verwendete Kremers beispielsweise bei den Experimenten zur Bestimmung der Quantenausbeute einen Borate-Puffer, pH 9,1, zu dem benutzten Assay Puffer von Ormö kann keine Aussage getroffen werden, da zu den benutzten Puffern keine Angaben gemacht worden sind. Aufgrund der Ergebnisse der pH-Titration zur pH-Abhängigkeit lässt sich allerdings schon vermuten, dass die Abweichung in der Quantenausbeute aufgrund den unterschiedlichen pH-Wertes zustande kommen kann. Neuste Studien weisen ebenfalls daraufhin, dass verschiedene Ionenstärken ganz unterschiedlicher Ionen, der pH-Wert und das Vorhandensein weiterer Substanzen wie ATP einen großen Einfluss auf die Fluoreszenz des jeweiligen Proteins nehmen können (Moussa, 2012). Des Weiteren spielt hier sicherlich auch die Erzeugung von korrigierten Fluoreszenzspektren eine große Rolle. Da es die Möglichkeit früher nicht gab, die Wellenlängen-abhängige Intensitätsschwankungen der Lampe des verwendeten

Fluoreszenzphotometers korrigieren zu können, ist es durchaus möglich das so unterschiedliche Quantenausbeuten mit dergleichen Methode ermittelt worden sind.

4.2 Erzeugung von FRET-Systemen aus zwei Biosensordesigns

Die Voraussetzung eines Biosensors zur ratiometrischen Bestimmung eines Metabolit, Zellparameters oder eines Umweltsignals, ist das Vorhandensein eines effektiven FRET-Systems. In der vorliegenden Arbeit konnten FbFP-basierte FRET-Systeme in zwei verschiedenen Biosensor-Designs konstruiert und angewendet werden. Zum einen sollte ein FbFP-mglb-Citrine FRET-Biosensor hergestellt werden, mit dem die Möglichkeit bestand Glukose-Konzentrationsänderungen durch Veränderungen in den FRET-Fluoreszenzverhältnissen zu bestimmen. Die Aktivierung des FRET-Biosensors wird hierbei durch Bindung des Metaboliten an die Glukosebindedomäne und die daraus resultierende Konformationsänderung hervorgerufen. Zum anderen wurde ein FbFP-YFP FRET-Biosensor realisiert, mit dem es erstmals möglich war, ratiometrisch Sauerstoffkonzentrationsänderungen zu messen. Die bei diesem Design zugrunde liegende Funktionsweise des FRET-Systems beruht auf das Vorhandensein einer sensitiven sowie einer insensitiven FRET-Domäne gegenüber dem Sauerstoff. In beiden Fällen konnten nach erfolgreicher Konstruktion (vgl. Kapitel 3.4 und 3.5) und Expression in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen die löslichen Proteine mittels spezifischer Antikörper eindeutig detektiert werden. Aufgrund der Größe der Proteinbanden der FbFP-mglb-YFP (80,5 kDa) und der FbFP-YFP-Fusion (45 kDa) konnte bestätigt werden, dass es sich bei den detektierten Proteinen um die Translationfusionen handelt. Des Weiteren konnte in beiden Fällen in Rahmen der *in vitro* Charakterisierung nachgewiesen werden, dass es sich bei den eingesetzten Fusionen um funktionelle FRET-Systeme handelt (vgl. Kapitel 3.4 und 3.6). Die weitergehenden Untersuchungen des FRET-Biosensors zur ratiometrischen Detektion von Glukose, welcher auf den ursprünglichen Glukosebiosensoren von (Deuschle et al., 2005a) basiert, wurden in Kooperation mit Roland Moussa im Rahmen seiner Doktorarbeit durchgeführt und sollen hier nicht weiter diskutiert werden.

4.3 Einsatz des FluBO als O₂-Biosensor

In der vorliegenden Arbeit konnte ein neuartiger Biosensor hergestellt werden, mit dem intrazelluläre Sauerstoffkonzentrationen quantitativ bestimmt werden können. Dies geschieht durch Messung der Änderungen der FRET-Fluoreszenzverhältnisse zwischen der FRET-Donordomäne EcFbFP und der FRET-Akzeptordomäne YFP. Mittels dieses Biosensors konnte, nach erfolgreicher *in vitro* Charakterisierung und Bestätigung der FRET-Funktionalität (vgl. Kapitel 3.6), die intrazelluläre O₂-Konzentration *in vivo* in *E. coli*-Zellen kalibriert werden (vgl. Kapitel 3.8). Mittels der Kalibrierung konnten die FRET-Verhältnisse als Funktion der intrazellulären Sauerstoffkonzentration *in vivo* bestimmt werden. Mit diesem genetisch kodierten FRET-Biosensor ist man zum ersten Mal in der Lage in einem breiten Konzentrationsbereich Sauerstoffkonzentrationsänderungen von 0 bis 80 µMol/l *in vivo* nicht-invasiv nachzuweisen (Pötzke et al., 2012). Die physiologische Relevanz zur sensitive Detektion von den gezeigten Sauerstoffkonzentrationsunterschieden konnte unter anderem für eukaryotische Zellen bereits von (Ward, 2008) beschrieben werden. Der dynamische Bereich des Biosensors liegt in einem physiologischen Sauerstoffkonzentrationsbereich, der innerhalb von eukaryotischen Zellen vorherrscht. Beschrieben sind die Sauerstoffaffinitäten (K_m -Werte) der verschiedenen Enzyme der Klasse der Oxidoreduktasen, welche u.a. an der Atmungskette in den verschiedenen Gewebetypen bis hin zum Cytosol der Mitochondrien in aerob lebenden Organismen beteiligt sind. Mehrere Arbeitsgruppen konnten hierbei die jeweiligen Sauerstoffaffinitäten (K_m -Wert) des Chytochroms aa3, der Cytochrom- F450 ω -Hydroxylase, des FIH-1, der Hämoxygenase 2 und der NADPH-Oxygenase anhand der Messung der spezifischen Aktivität bestimmen (Ward, 2008). Von den vorliegenden Sauerstoffaffinitäten der obengenannten Enzyme lassen sich Rückschlüsse auf die Sauerstoffkonzentrationen in den jeweiligen Zellen bzw. Geweben ziehen. Des Weiteren kommen Oxidoreduktasen wie zum Beispiel Cytochrome nicht nur in eukaryotischen Zellen sondern auch in Prokaryoten vor. Dementsprechend ist die Relevanz zur quantitativen Bestimmung von geringen Sauerstoffkonzentrationsänderungen in eukaryotischen als auch in prokaryotischen Zellen durchaus gegeben. Die Sauerstoffaffinitäten und somit die vorliegenden Sauerstoffkonzentrationen sollten somit vergleichbar sein. Es liegen zu diesem Zeitpunkt allerdings keinerlei quantitative Aussagen über die Sauerstoffkonzentration und dessen Änderungen in prokaryotischen Zellen vor. Aufgrund dieses Umstands konnte der vorliegende Biosensor nur anhand von immobilisierten Farbstoffen (Optoden) auf die Sauerstoffkonzentrationen im Medium kalibriert werden (Huber et al., 2009; Kensy et al., 2009). Diese Optoden können allerdings nur in bestimmten Systemen, wie beispielsweise dem Biolector angewendet werden, da diese auf einem Trägermaterial immobilisiert werden müssen (Gupta and Rao, 2003). Der Vorteil eines genetisch kodierten Biosensors ist seine weitgefächerte Anwendbarkeit. Aufgrund des breiten Sensitivitätsbereiches des FRET-Systems zur Detektion von Sauerstoffkonzentrationsänderungen bei anaeroben Bedingungen und der hohen Auflösung auch in mikroaeroben Bedingungen (Auflösungsgenauigkeit: 0,01 mmol/l O₂-Konzentration) ist man in der Lage

quantitativ Sauerstoffänderungen bei Sauerstofflimitierungen nachzuweisen (Gupta and Rao, 2003).

4.3.1 Optimierung von fermentativen Prozessen

Mit diesem Sauerstoffsensor wäre man in der Lage Sauerstofflimitierungen in aeroben Zellen beispielweise bei der Zellatmung aufzudecken. Ein großes Problem bei fermentativen Prozessen ist der Umstand, dass die Bakterienzellen in der Phase des exponentiellen Wachstums eine sehr hohe respiratorische Aktivität zeigen und es so zu starken Sauerstofflimitierungen in der Kultur kommt, was sich wiederum auf die Wachstumsrate der Zellen auswirkt. Dies ist derzeit beispielsweise nur indirekt durch die Expression des GFPs und seiner Derivate unter Verwendung eines unter mikroaeroben Bedingungen induzierten *nar*-Promoters möglich (Garcia et al., 2009). Die Ausbildung der Fluoreszenz ist hierbei abhängig vom jeweiligen Promoter, es können mit diesem System keine regulatorischen Prozesse zur Sauerstofflimitation von Zellen quantitativ untersucht werden. Im Gegensatz zu GFP-basierten Sensorsystemen ist man so in der Lage, mittels Fluoreszenzintensitäts Veränderungen diese Sauerstofflimitierungen sichtbar zu machen. So wäre es denkbar, den Biosensor bei der Optimierung von Fermentationsprozessen in der Biotechnologie einzusetzen, da bis zu diesem Zeitpunkt zur Detektion von Sauerstoffkonzentrationsänderungen optische Sonden oder wie im Falle des Mikroreaktorsystems (BioLector) immobilisierte Farbstoffe, sogenannte Optoden, zum Einsatz kommen. Hinzu kommt noch, dass mit diesen Optoden beispielsweise nur die Konzentration des gelösten Sauerstoffs im Medium ermittelt werden kann. Huber konnte schon an Experimenten am BioLector die Tauglichkeit des EcFbFP als Expressionsreporter für die Produktbildung während der Fermentation bestätigen (Huber et al., 2009; Kensy et al., 2009). Des Weiteren ist die Ausbildung der Fluoreszenz aufgrund der Sauerstoffabhängigkeit und der Sauerstofflimitierung der Zellen bei einem exponentiellen Wuchsverhalten sowohl wuchsphasen- als auch zell-dichte-abhängig. Zur korrekten Bestimmung von Sauerstoffkonzentrationen mittels Abnahme der Fluoreszenzintensität des GFPs müsste über die gesamte Wuchsphase der Level der Proteinexpression bekannt sein. (Drepper et al., 2010) konnten zeigen, dass sich die Fluoreszenzemission des GFP-Derivates YFP nicht linear zur Proteinakkumulation verhält, sondern Wuchsphasen-abhängig ist, während die Fluoreszenzemission des EcFbFP eine direkte Korrelation zur Reporterproteinmenge zeigt. Aufgrund von Sauerstofflimitationen während des Wachstums von Zellen und der Sauerstoffabhängigkeit bei der Reifung des YFP-Chromophors kann dieser Fluoreszenzreporter folglich nicht zur qualitativen Detektion von Signalen *in vivo* zum Einsatz kommen (Drepper et al., 2010). Mit dem neuartigen Sauerstoffbiosensor wäre man allerdings in der Lage, auf Grund der festen Stöchiometrie der FRET-Fusion, wuchsphasen-unabhängig und ratiometrisch Sauerstofflimitationen bei den obengenannten Prozessen aufzudecken, und dies nicht nur indirekt durch Inaktivierung eines Reporters, wie beispielsweise durch Sauerstofflimitierung im Fall von GFP-Sensoren (Takahashi et al., 2005), sondern aktiv durch das Vorhandensein einer insensitiven FRET-Domäne (EcFbFP).

4.3.2 Anwendungsbereiche in der Grundlagenforschung

Ebenso wie in der Biotechnologie spielt die Sauerstofflimitation von Zellen bzw. Systemen in vielen Bereichen eine große Rolle. Weiterhin wäre es denkbar, den O₂-Biosensors zur Untersuchung von bakteriellen Biofilmen und hypoxischer Gewebe einzusetzen. Bakterien, wie das humanpathogene Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*, sind organisiert in Gruppen mit biotischen und abiotischen Oberflächen, welche Infektionen auslösen können (Biofilmbildung). Hier könnte die Physiologie, der Metabolismus und die Dynamik der Biofilme in den Zellen, welche sich an der Oberfläche befinden, untersucht werden (Andersen et al., 2001; Bagge et al., 2004; Hentzer et al., 2002; Tolker-Nielsen et al., 2000). In Biofilmen spielt jedoch die Sauerstoff-Limitierung für Zellen, die sich in den tieferen Schichten befinden, eine besondere Rolle. So ist es mit etablierten Fluoreszenzreportern auf Grund der Sauerstoffabhängigkeit solcher Systeme nicht möglich, genaue Untersuchungen der regulatorischen Prozesse, die zu einer Biofilmbildung führen können, aufzudecken. So ist es mit Hilfe eines „passiven“-O₂-Sensors, bestehend aus einem immobilisierten Fluoreszenzfarbstoff und einer Markierung der Zellen mit dem Farbstoff Syto 60 möglich, verschiedene Sauerstoffsättigungen zu detektieren und die Bereiche der Biofilmbildung passiv durch Inaktivierung des Farbstoffe nachzuweisen (Klimant et al., 1997; Kuhl, 2005; Kuhl et al., 2007). Mit dem O₂-Biosensor stünde ein hervorragendes Tool zur Verfügung, um mikroaerobe Bereiche in Biofilmen zu detektieren und gleichzeitig durch das in dem FRET-System enthaltene Sauerstoff-unabhängige FMN- basierende Fluoreszenz Protein (FbFP) diese Mechanismen und Zusammenhänge in den Biofilmen unter anaeroben Bedingungen aufzuklären.

Mit funktionellen Fluoreszenzreportern allerdings bestünde die Möglichkeit, anaerobe Prozesse bzw. Interaktionen von Bakterien innerhalb der Biofilme aufklären zu können, oder durch Expression eines solchen Biosensor- oder Reportergens, Gene zu identifizieren die für eine solche Biofilmbildung und die daraus folgende Pathogenität solcher Bakterien verantwortlich sind (Klimant et al., 1997; Kuhl, 2005; Kuhl et al., 2007). Ein derartiges Verständnis könnte zur Entwicklung von Therapeutika in der Biomedizin beitragen, die der Biofilmbildung entgegenwirken können.

Dies ist derzeit nur indirekt durch die Inaktivierung des GFPs und seiner Derivate, es wird sozusagen die Abnahme des Fluoreszenzsignales gemessen, möglich (Garcia *et al.*, 2009), und wäre in der Krebstherapie, aber auch in vielen Bereichen der Biotechnologie, so beispielsweise in der Fermentationstechnik bzw. bei der Entwicklung von Effizienteren Produktionsstämmen mit verbesserter Atmung, von großem Nutzen. Des Weiteren wäre es denkbar, den Sauerstoffsensor zum besseren Verständnis von patho-physiologischen Prozessen in weiteren hypoxischen Geweben einzusetzen. Aufgrund der Sauerstofflimitierungen müssen auch hier alternative Fluoreszenzreporter zu der GFP-Familie eingesetzt werden. Wie Walter et al. (2012) bereits zeigen konnten, eignet sich das Fluoreszenzprotein EcFbFP hervorragend als Reporter, um unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen verschiedene eukaryotische Zellen und Zelllinien mittels

Fluoreszenzemission sichtbar zu machen. So konnte die Anwendbarkeit in CHO (*chinese hamster ovary*)-Zellen, HEK (*human embryonic kidney*)-Zellen, HeLa-Zelllinien und pluripotenten ES-Zellen sowie in Tumorzelllinien bestätigt werden (Walter et al., 2012). Die Abbildung 39 soll hierbei den Vorteil der Anwendbarkeit des FbFPs gegenüber dem eGFP verdeutlichen. Die genauere Detektion ist hierbei unter hypoxischen Bedingungen nur mit dem FbFP als Fluoreszenzreporter gegeben, wie an den mit weißen Pfeilen markierte Bereiche zu erkennen ist (Abb.38 b)).

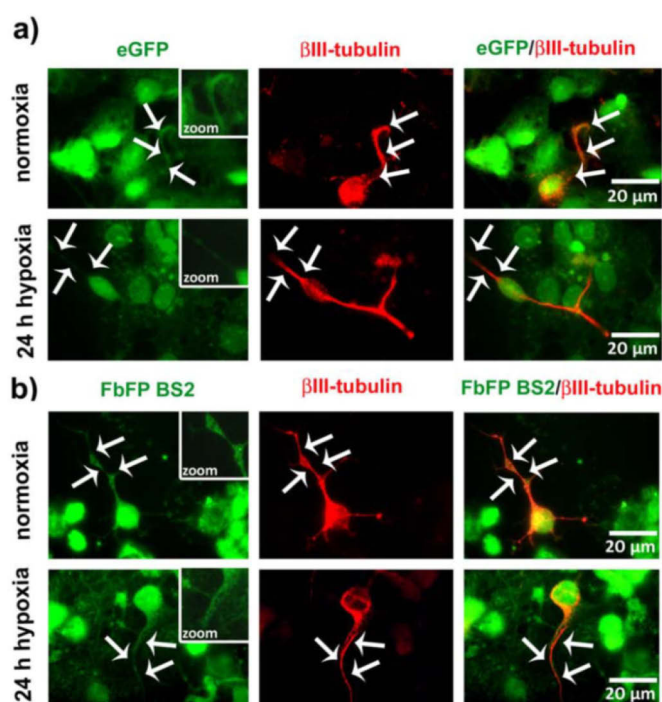


Abbildung 38: Neuronale transgene Expression unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen (aus Walter et al, 2012).

Dargestellt ist die neuronale transgene Expression nach neuraler Stammzelldifferenzierung des a) eGFPs und b) FbFP BS2. Visualisiert sind hierbei die Fluoreszenzemission des jeweiligen Fluoreszenzreporters (linke Seite) und das βIII-Tubulin-staining (mittlere Bilder). Zur Verdeutlichung der Ergebnisse ist eine Überlagerung der Bilder gezeigt (rechte Seite). Die weißen Pfeile markieren die Bereiche der unterschiedlichen Detektionsmöglichkeiten der beiden Reporter.

Mit dem vorliegenden O₂-Biosensor ließen sich nicht nur unter verschiedenen hypoxischen Bedingungen verschiedene Bereiche bzw. Gewebe nach Transfektion in beschriebenen Zelllinien sichtbar machen, es wäre beispielsweise in Krebszelllinien denkbar, die Wirksamkeit verschiedener Behandlungsmethoden wie z.B. der Strahlungstherapie, zur Zerstörung des Tumors und der hypoxischen Gewebe gezielt durch Fluoreszenzintensitäts-Verhältnisänderungen der Domänen des FRET-Systems zu visualisieren. Des Weiteren ließe sich durch Einsatz des Sauerstoffsensors eventuell die Physiologie bzw. Regulation, die hinter solchen hypoxischen Prozessen steckt und unter welchen Umständen sich überhaupt solche hypoxischen Bereiche ausbilden besser verstehen (Aoki et al., 2012; Brown, 2007; Eltzschig and Carmeliet, 2011)). Dieses Verständnis könnte gerade bei der Entwicklung von Medikamenten wie dem Tirapazamine ein großer Vorteil sein, da bei Proliferation von

Tumorgewebe die Wirksamkeit der Medikamente mit zunehmender Größe des Tumors auch auf Grund der gleichzeitigen Abnahme der Sauerstoffkonzentration abnimmt.

Auch das Verständnis der Regulation und Anwendbarkeit des Hypoxia induzierbaren Faktor 1 (HIF-1) in der Gentherapie, welcher nur unter hypoxischen Bedingungen in Zellen aktiviert wird, ließe sich durch die Aufdeckung und Beschreibung von hypoxischen Bereichen verbessern. Dies konnte in ersten Studien mit einer Fusion des HIF-1 und dem GFP verwirklicht werden. Dies kann allerdings nicht, aufgrund der mehrfach erwähnten Limitationen der GFP-Familie, in gewünschter Sensitivität auch in mikroaeroben bis anaeroben Bereichen geschehen (Aoki et al., 2012; Brown, 2000a, 2007; Brown, 2000b; Vordermark et al., 2001). In Zukunft soll deswegen ein klarer Schwerpunkt in der (Weiter-) Entwicklung des Fluoreszenzreporters EcFbFP und des O₂- Biosensors FluBO in Bezug auf die Untersuchung von hypoxischen Geweben und Sauerstoff-limitierenden Prozessen liegen.

4.4 Limitationen des Sauerstoffbiosensors FluBO

Da das FluBO durch das YFP als FRET-Akzeptordomäne, wie alle FP-basierten Biosensoren sensitiv gegenüber niedrigen pH-Werten reagiert (vgl. Kapitel 3.9), wurde in der vorliegenden Arbeit die genaue pH-Abhängigkeit untersucht. Für die meisten Anwendungen ist das allerdings zu vernachlässigen, da der pH in prokaryotischen Zellen meist konstant ist und die pH-Sensitivität des YFP in den physiologischen pH-Bereichen sehr gering ist. Die bestimmte Abnahme der Fluoreszenzintensität von pH 8 zu pH 7 beträgt $2,0 \times 10^5$ Einheiten im Vergleich zur Abnahme auf pH 4 von $3,5 \times 10^6$ Einheiten (vgl. Kapitel 3.9). Des Weiteren lässt sich sagen, dass bei dem hier vorliegenden Sensor das bereits pH-unempfindlichste YFP benutzt worden ist. Der pKa konnte hier mit 5,2 bestimmt werden, welcher gegenüber vergleichbarer Systeme sehr gering ist, so hat das Citrine, welches als das pH-unempfindlichste GFP-Derivat publiziert wurde, einen pKa von 5,6. Neue Studien der Arbeitsgruppe Pohl bezüglich der Abhängigkeit der publizierten FRET-Systeme gegenüber Umgebungsfaktoren, wie dem pH, NADPH-Konzentration, Ionen und verschiedenste Pufferzusammensetzungen, konnten eine große Abhängigkeit der FRET-Systeme durch das Vorhandensein dieser Faktoren feststellen. Diese Faktoren beeinflussen je nach Konzentration mehr oder minder das Fluoreszenzverhältnis des FRET-Systems. Vorteil des vorliegenden O₂-Biosensors ist hierbei das Vorhandensein einer weitgehend insensitiven Domäne (EcFbFP) gegenüber den obengenannten Faktoren (Moussa et al., 2012). Bei vergleichbaren FRET-System wie der bekannten Fusion aus CFP und YFP liegen mit beiden FRET-Domänen Proteine vor, die jeweils unterschiedlich stark auf die Umgebungsfaktoren reagieren, was sich wiederum auf den Messbereich des Systems auswirkt und negative Auswirkungen auf die spezifische Detektion des eigentlichen Signals hat.

Gerade aufgrund des vergleichsweise hohen Messbereichs wurde in der vorliegenden Arbeit und im Rahmen einer Masterarbeit durch Austausch der pH-insensitiven FRET-Domäne YFP unter anderem durch das Citrine ein pH-Sensor konstruiert und erfolgreich charakterisiert, der ein FRET-Fluoreszenzverhältnis von 6 hat. Vergleichbare Systeme kommen hierbei auf

maximale FRET-Fluoreszenzverhältnisse von 0,2 bei dem pHameleon 5 und 6 (Esposito et al., 2008) bzw. von 0,5 bis 4,2 bei dem ClopHsensor (Arosio et al., 2010). Diese Zunahme ist mit der Unabhängigkeit der Donordomäne EcFbFP gegenüber dem pH-Wert zu erklären. Dieser Effekt lässt sich mit einer destabilisierenden Wirkung des YFP-Chromophors durch die pH-abhängige Protonierung des Chromophors erklären (Esposito et al., 2008). So kann dieser Biosensor bei lifetime pH-Imaging in Zellen seinen Einsatz finden, wo man bei verschiedenen Wachstumsphasen den pH-Wert der verschiedenen Zellkompartimente auch im aciden Bereichen der Zellen *in vivo* wie zum Beispiel in Lysosomen oder Peroxisomen bestimmen kann. Vorteilhaft gegenüber anderen pH-Biosensoren ist das größere Messbereich dieses pH-Biosensors in Abhängigkeit vom pH-Wert, da sich das Fluoreszenzverhältnis von FbFP und YFP in einem Bereich von 0,5 bis 5 bewegt. Demgegenüber bewegt sich das entsprechende Fluoreszenzverhältnis bei anderen Biosensoren in diesem Anwendungsbereich nur in Bereichen von 1 bis 2 (Yano et al. 2010). pH-Wert Schwankungen können mit den neuen Sensoren also sehr viel genauer detektiert werden.

Eine Limitation des FluBO ist die irreversible Reifung des YFP-Chromophors in Gegenwart von molekularem Sauerstoff. Durch diesen Prozess ist man mit dem FluBO nur in der Lage, Veränderungen in der Sauerstoffkonzentration zu messen, solange nicht maturierte YFP Proteine in dem jeweiligen Test-System vorhanden sind. Nur dann kann eine Veränderung des FRET-Fluoreszenzverhältnisses erfolgen, wodurch man auf die intrazelluläre Sauerstoffkonzentrationsänderung schließen kann. Sind alle Proteine maturiert, ist somit keine Änderung des FRET-Fluoreszenzverhältnisses mehr möglich. In dem Test-System, in dem ein solcher O₂-Biosensor zum Einsatz kommt, muss eine kontinuierliche Bildung der FRET-Fusion gewährleistet sein. Wie bereits weiter oben erörtert, liegt die Anwendbarkeit des FluBO bei der Detektion von Veränderungen in sauerstoff-limitierenden Prozessen oder -Gewebe sowie beim Bestimmen von mikroaeroben Bereichen und deren Schwankungen in der Sauerstoffkonzentration. Bereits publizierte O₂-Sensoren, mit denen reversibel schwankende Sauerstoffkonzentration bereits bestimmt werden können, sind die sogenannten lco₂-Probes oder MitoExpress, welche auf Pt-protophyrin Farbstoffen basieren (Amelia et al., 2011; Fercher et al., 2010; Freitas et al., 2009; Gomes et al., 2005; Maeda, 2008; O'Mahony and Papkovsky, 2006; O'Riordan et al., 2007; Sinks et al., 2010). Da diese reversibel Fluoreszenz emittieren können, werden diese Farbstoffe zur Detektion von molekularem Sauerstoff in lebenden Zellen eingesetzt. Hierbei kann die Sauerstoffkonzentration über den gesamten physiologischen Bereich detektiert werden (0 – 250 µM). Da es sich hierbei nicht um genetisch kodierte Biosensoren, sondern um Farbstoffe handelt, ist hierbei eine nicht invasive Detektion nicht möglich. Die Zellen müssen über mehrere Stunden auf das „Laden“ mit den Farbstoffen in mehreren Puffern inkubiert werden, was beispielsweise eine Detektion während einer laufenden Kultivierung unmöglich macht. Des Weiteren können diese Farbstoffe nicht, wie genetisch kodierte Biosensoren an bestimmte intrazelluläre Proteine oder Kompartimente von Interesse fusioniert werden, um spezifisch die Sauerstoffkonzentrationsänderung bestimmen zu können.

V. Zusammenfassung

In der heutigen Zeit ist es in der Biotechnologie, Biomedizin und in der Grundlagenforschung von großem Interesse, Sauerstoffkonzentrationsänderungen, nicht-invasiv mit einem genetisch kodierten Biosensor detektieren und quantifizieren zu können. So könnte die Physiologie von hypoxischen Geweben, wie zum Beispiel Tumorzellen besser untersucht und verstanden werden. Die korrekte Bestimmung der intrazellulären Sauerstoffkonzentration und deren Änderungen könnte außerdem zum besseren Verständnis vieler (patho)-physiologischen Prozessen in verschiedenen pro- und eukaryotischen Organismen sowie in menschlichen Geweben beitragen. Des Weiteren könnte ein solcher Biosensor vielfältige Anwendung in der Biotechnologie bzw. Verfahrenstechnik zur Optimierung von Fermentationsprozessen finden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ein neuartiger Fluoreszenzprotein-basierter Biosensor entwickelt, der Änderungen von Sauerstoffkonzentrationen in lebenden Systemen auch über mehrere Stunden (bis zu 20h, vgl. Kap. 3.8.2) ermöglicht. Bei dem Biosensor handelt es sich um ein Fusionsprotein, das aus einer Sauerstoff-insensitiven Fluoreszenzdomäne, dem FMN-bindenden Fluoreszenzprotein (FbFP) und einer Sauerstoff-sensitiven Fluoreszenzdomäne, dem gelb-fluoreszierenden Protein YFP, besteht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst mithilfe verschiedener spektroskopischer Nachweisverfahren gezeigt, dass aufgrund der spektralen Überlappung des FbFP-Emissionsspektrums und des YFP-Absorptionsspektrums eine sogenannte Förster-Resonanzenergietransfer- oder FRET-Kopplung zwischen der Donordomäne (FbFP) und der Akzeptordomäne (YFP) erfolgen kann. Zudem wurde durch eine hydrolytische Spaltung der beiden Fluoreszenzdomänen nachgewiesen, dass es sich bei dem Phänomen um einen intramolekularen Prozess handeln muss. Anschließend wurde mit umfangreichen *in vivo* Studien die Anwendbarkeit der FbFP-YFP-Fusion als FRET-basierter O₂-Biosensor in Bakterienzellen nachgewiesen. Diese Studien wurden in dem Mikrobioreaktor BioLector durchgeführt, der eine konstante Überwachung der Biomasse sowie der Gelöstsauerstoffkonzentration während einer *E. coli*-Batchkultivierung ermöglichte. Parallel wurden die intrazellulären Veränderungen der O₂-Konzentrationen mithilfe des FRET-Biosensors bestimmt. Hierbei diente die Fluoreszenzintensitäten des FRET-Donors und –Akzeptors als ein Maß für den zellulären Sauerstoffgehalt: Erhöhte Sauerstoffkonzentrationen führten zu einer hohen YFP-Fluoreszenz, die aufgrund eines effektiven FRET-vermittelten Quenchings gleichzeitig eine Abnahme der FbFP-Fluoreszenz zur Folge hatte. Im Gegensatz dazu führte eine Limitierung des intrazellulären Sauerstoffgehalts, die z. B. durch die hohe respiratorische Aktivität der Bakterienzellen in der exponentiellen Wachstumsphase auftrat, zu einer unvollständigen Ausbildung der YFP-Fluoreszenz. Dies hatte wiederum eine Zunahme der FbFP-Fluoreszenz aufgrund der fehlenden FRET-Kopplung zur Folge. Zur Kalibrierung des Sauerstoffbiosensors wurde die Sauerstoffkonzentration im Medium mit den Fluoreszenzsignalen der YFP-FbFP-Fusion korreliert. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass das FRET-Verhältnis als Funktion der Zeit den Veränderungen der extrazellulären Sauerstoffkonzentration in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 0,08 mmol/l folgt. Somit

wurde zum ersten Mal ein genetisch kodierter, ratiometrischer Biosensor erzeugt, der eine nicht-invasive Überwachung der intrazellulären Sauerstoffkonzentration mit einer hohen zeitlichen und räumlichen Auflösung erlaubt (Pötzke et al., 2012). Analog zum Sauerstoff-Biosensor konnte im Rahmen dieser Arbeit ein FRET-Biosensor entwickelt werden, mit dem es möglich ist, pH-Wert Änderungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in einem pH-Bereich von 4.0 bis 8.0 zu detektieren. Dabei wurde das Fluoreszenzprotein FbFP als pH-insensitive FRET-Donordomäne und die pH-sensitive YFP-Variante Citrine als entsprechende Akzeptordomäne verwendet. Mithilfe dieses Biosensors konnte die Funktion des H⁺-Ionophors Nigericin in lebenden *E. coli*-Zellen mit einem bildgebenden Verfahren nachgewiesen werden.

VI. Summary

At the present time it is of great interest in biotechnology, biomedical and basic research to be able to detect and quantify changes of oxygen concentration to non-invasively with a genetically encoded biosensor. How could the physiology of hypoxic tissues, such as tumor cells are better studied and understood. The correct determination of the intracellular oxygen concentration and its changes could also contribute to a better understanding of many (patho) physiological processes in various prokaryotic and eukaryotic organisms and in human tissues. Furthermore, such a biosensor could find numerous applications in biotechnology and process technology for the optimization of fermentation processes. In this paper, a novel fluorescent protein-based biosensor was developed to allow the detection of changes of oxygen concentrations in living systems over several hours (up to 20h, see Section 3.8.2). The biosensor is a fusion protein consisting of an oxygen-insensitive fluorescent domain, FMN binding fluorescent protein (FbFP) and an oxygen-sensitive fluorescent domain, the yellow fluorescent protein YFP. In this work, initially using various spectroscopic detection methods has been shown that due to the spectral overlap of the FbFP emission spectrum and YFP absorption spectrum can be a so-called Förster resonance energy transfer, or FRET coupling between the donor domain (FbFP) and the acceptor domain (YFP). It was also demonstrated by a hydrolytic cleavage of the two fluorescent domains, which it must be at the phenomenon to an intramolecular process. The applicability of FbFP-YFP fusion was detected as FRET-based biosensor O_2 in bacterial cells *in vivo* studies. These studies were carried out in the micro BioLector bioreactor that allowed a constant monitoring of the biomass, the dissolved oxygen concentration during batch cultivation of *E. coli*. In parallel, the intracellular change of O_2 concentrations was determined using the FRET biosensor. Here, the fluorescence intensities of the FRET donor and acceptor were used as a measure of cellular oxygen content: Increase concentrations of oxygen resulted in a high YFP fluorescence simultaneously in a decrease in FbFP fluorescence resulted because an effective FRET-mediated quenching. In contrast, a limitation resulted in intracellular oxygen content, which occurred because of the high respiratory activity of the bacterial cells in the exponential growth phase, for example, an incomplete formation of YFP fluorescence. This in turn had a FbFP increase in fluorescence due to the lack of FRET coupling result. To calibrate the O_2 -biosensors with oxygen concentration in the medium is correlated with the fluorescent signals of the YFP-FbFP fusion. It was here demonstrated that the FRET ratio as a function of time the changes following in the extracellular concentration of oxygen in a concentration range of 0 to 0.08 mM /l. Thus, for the first time a genetically encoded; ratiometric biosensor was produced, which allows non-invasive monitoring of intracellular oxygen concentration with a high temporal and spatial resolution (Pötzke et al., 2012). Analogous to the oxygen biosensor could be a FRET biosensor developed in this work, with which it is possible to detect pH changes in both *in vitro* and *in vivo* in a pH range from 4.0 to 8.0. Here, the fluorescent protein was used as FbFP pH-insensitive FRET donor domain and the pH-sensitive YFP variant Citrine than corresponding

acceptor domain. Using this biosensor, the function of the H⁺ ionophore Nigericin could be detected in living *E. coli* cells with an imaging procedure.

VII. Literaturverzeichnis

- Ahmed, S., and Booth, I.R. (1983).** The use of valinomycin, nigericin and trichlorocarbanilide in control of the protonmotive force in *Escherichia coli* cells. *Biochem J* **212**, 105-112.
- Amelia, M., Lavie-Cambot, A., McClenaghan, N.D., and Credi, A. (2011).** A ratiometric luminescent oxygen sensor based on a chemically functionalized quantum dot. *Chemical Communications* **47**, 325.
- Andersen, J.B., Heydorn, A., Hentzer, M., Eberl, L., Geisenberger, O., Christensen, B.B., Molin, S., and Givskov, M. (2001).** gfp-based N-acyl homoserine-lactone sensor systems for detection of bacterial communication. *Appl Environ Microbiol* **67**, 575-585.
- Aoki, K., Komatsu, N., Hirata, E., Kamioka, Y., and Matsuda, M. (2012).** Stable expression of FRET biosensors: a new light in cancer research. *Cancer Sci* **103**, 614-619.
- Arosio, D., Ricci, F., Marchetti, L., Gualdani, R., Albertazzi, L., and Beltram, F. (2010).** Simultaneous intracellular chloride and pH measurements using a GFP-based sensor. *Nat Methods* **7**, 516-518.
- Awaji, T., Hirasawa, A., Shirakawa, H., Tsujimoto, G., and Miyazaki, S. (2001).** Novel green fluorescent protein-based ratiometric indicators for monitoring pH in defined intracellular microdomains. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 457-462.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., and Mori, H. (2006).** Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2**, 2006 0008.
- Bagge, N., Hentzer, M., Andersen, J.B., Ciofu, O., Givskov, M., and Hoiby, N. (2004).** Dynamics and spatial distribution of beta-lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 1168-1174.
- Baird, G.S., Zacharias, D.A., and Tsien, R.Y. (1999).** Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11241-11246.
- Baird, G.S., Zacharias, D.A., and Tsien, R.Y. (2000).** Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11984-11989.
- Baker, C.J., Deahl, K., Domek, J., and Orlandi, E.W. (2000).** Scavenging of H₂O₂ and production of oxygen by horseradish peroxidase. *Arch Biochem Biophys* **382**, 232-237.
- Bayley, P.M., and Martin, S.R. (1992).** The alpha-helical content of calmodulin is increased by solution conditions favouring protein crystallisation. *Biochim Biophys Acta* **1160**, 16-21.
- Becker, W., Bergmann, A., and Biskup, C. (2007).** Multispectral fluorescence lifetime imaging by TCSPC. *Microscopy research and technique* **70**, 403-409.
- Belew, M., Yip, T.T., Andersson, L., and Ehrnstrom, R. (1987).** High-performance analytical applications of immobilized metal ion affinity chromatography. *Anal Biochem* **164**, 457-465.

- Berg, J., Hung, Y.P., and Yellen, G. (2009).** A genetically encoded fluorescent reporter of ATP:ADP ratio. *Nat Methods* **6**, 161-166.
- Berg, J.M.S., L.; Tymoczko, J. L. (2003).** Biochemie, 5. Auflage edn (New York, Spektrum Akademischer Verlag).
- Borisov, S.M., and Wolfbeis, O.S. (2008).** Optical biosensors. *Chem Rev* **108**, 423-461.
- Briggs, W.R., and Christie, J.M. (2002).** Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci* **7**, 204-210.
- Briggs, W.R., Christie, J.M., and Salomon, M. (2001).** Phototropins: a new family of flavin-binding blue light receptors in plants. *Antioxid Redox Signal* **3**, 775-788.
- Brown, J.M. (2000a).** Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies. *Mol Med Today* **6**, 157-162.
- Brown, J.M. (2007).** Tumor hypoxia in cancer therapy. *Methods Enzymol* **435**, 297-321.
- Brown, M.C. (2000b).** Cancer metastasis at percutaneous endoscopic gastrostomy stomata is related to the hematogenous or lymphatic spread of circulating tumor cells. *Am J Gastroenterol* **95**, 3288-3291.
- Carlson, H.J., and Campbell, R.E. (2009).** Genetically encoded FRET-based biosensors for multiparameter fluorescence imaging. *Curr Opin Biotechnol* **20**, 19-27.
- Chakraborty, A., and Basak, S. (2008).** Interaction with Al and Zn induces structure formation and aggregation in natively unfolded caseins. *J Photochem Photobiol B* **93**, 36-43.
- Christie, J.M., Reymond, P., Powell, G.K., Bernasconi, P., Raibekas, A.A., Liscum, E., and Briggs, W.R. (1998).** Arabidopsis NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* **282**, 1698-1701.
- Collins-Racie, L.A., McColgan, J.M., Grant, K.L., DiBlasio-Smith, E.A., McCoy, J.M., and LaVallie, E.R. (1995).** Production of recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli* using the novel secretory fusion partner DsbA. *Biotechnology (N Y)* **13**, 982-987.
- Crosson, S., Rajagopal, S., and Moffat, K. (2003).** The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry* **42**, 2-10.
- Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., and Tsien, R.Y. (1995).** Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* **20**, 448-455.
- de Wet, J.R., Wood, K.V., DeLuca, M., Helinski, D.R., and Subramani, S. (1987).** Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **7**, 725-737.
- Demchenko, A.P. (2010).** Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology I Fundamentals and Molecular Design / edited by Alexander P. Demchenko. [E-Book] (Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag Berlin Heidelberg).

- Deuschle, K., Fehr, M., Hilpert, M., Lager, I., Lalonde, S., Looger, L.L., Okumoto, S., Persson, J., Schmidt, A., and Frommer, W.B. (2005a). Genetically encoded sensors for metabolites. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **64**, 3-9.
- Deuschle, K., Okumoto, S., Fehr, M., Looger, L.L., Kozhukh, L., and Frommer, W.B. (2005b). Construction and optimization of a family of genetically encoded metabolite sensors by semirational protein engineering. *Protein Sci* **14**, 2304-2314.
- Drepper, T., Eggert, T., Circolone, F., Heck, A., Krauss, U., Guterl, J.K., Wendorff, M., Losi, A., Gartner, W., and Jaeger, K.E. (2007). Reporter proteins for in vivo fluorescence without oxygen. *Nat Biotechnol* **25**, 443-445.
- Drepper, T., Huber, R., Heck, A., Circolone, F., Hillmer, A.K., Buchs, J., and Jaeger, K.E. (2010). Flavin mononucleotide-based fluorescent reporter proteins outperform green fluorescent protein-like proteins as quantitative in vivo real-time reporters. *Appl Environ Microbiol* **76**, 5990-5994.
- Drössler, P., Holzer, W., Penzkofer, A., and Hegemann, P. (2003). Fluorescence Quenching of Aqueous Solutions of Riboflavin by Methionin and Cystein. *J Chem Phys*, 409-420.
- Dumas, D., Henrionnet, C., Hupont, S., Werkmeister, E., Stoltz, J.F., Pinzano, A., and Gillet, P. (2010). Innovative TCSPC-SHG microscopy imaging to monitor matrix collagen neo-synthesized in bioscaffolds. *Biomed Mater Eng* **20**, 183-188.
- Duncan, R.R., Bergmann, A., Cousin, M.A., Apps, D.K., and Shipston, M.J. (2004). Multi-dimensional time-correlated single photon counting (TCSPC) fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to detect FRET in cells. *J Microsc* **215**, 1-12.
- Dunn, S.D. (1986). Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western blots by monoclonal antibodies. *Anal Biochem* **157**, 144-153.
- Eltzschig, H.K., and Carmeliet, P. (2011). Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med* **364**, 656-665.
- Ernst, J.F., and Tielker, D. (2009). Responses to hypoxia in fungal pathogens. *Cell Microbiol* **11**, 183-190.
- Esposito, A., Gralle, M., Dani, M.A., Lange, D., and Wouters, F.S. (2008). pHlameleons: a family of FRET-based protein sensors for quantitative pH imaging. *Biochemistry* **47**, 13115-13126.
- Fercher, A., Ponomarev, G.V., Yashunski, D., and Papkovsky, D. (2010). Evaluation of the derivatives of phosphorescent Pt-coproporphyrin as intracellular oxygen-sensitive probes. *Anal Bioanal Chem* **396**, 1793-1803.
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* **437**, 55-75.
- Freitas, M., Lima, J.L., and Fernandes, E. (2009). Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. *Anal Chim Acta* **649**, 8-23.

- Frommer, W.B., Davidson, M.W., and Campbell, R.E. (2009).** Genetically encoded biosensors based on engineered fluorescent proteins. *Chem Soc Rev* **38**, 2833-2841.
- Fruhworth, G.O., Ameer-Beg, S., Cook, R., Watson, T., Ng, T., and Festy, F. (2010).** Fluorescence lifetime endoscopy using TCSPC for the measurement of FRET in live cells. *Opt Express* **18**, 11148-11158.
- Garcia, J.R., Cha, H.J., Rao, G., Marten, M.R., and Bentley, W.E. (2009).** Microbial nar-GFP cell sensors reveal oxygen limitations in highly agitated and aerated laboratory-scale fermentors. *Microb Cell Fact* **8**, 6.
- Geyer, G. (1960).** [On staining proteins with Amidoblack 10 B]. *Acta histochemica* **10**, 286-292.
- Gibson, Q.H., Massey, V., and Atherton, N.M. (1962).** The nature of compounds present in mixtures of oxidized and reduced flavin mononucleotides. *Biochem J* **85**, 369-383.
- Gomes, A., Fernandes, E., and Lima, J.L. (2005).** Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Methods* **65**, 45-80.
- Griesbeck, O., Baird, G.S., Campbell, R.E., Zacharias, D.A., and Tsien, R.Y. (2001).** Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. *J Biol Chem* **276**, 29188-29194.
- Guerrero, G., and Isacoff, E.Y. (2001).** Genetically encoded optical sensors of neuronal activity and cellular function. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 601-607.
- Gupta, A., and Rao, G. (2003).** A study of oxygen transfer in shake flasks using a non-invasive oxygen sensor. *Biotechnol Bioeng* **84**, 351-358.
- Halliwell, B. (1999).** Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat Res* **443**, 37-52.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Harayama, S., Bollinger, J., Iino, T., and Hazelbauer, G.L. (1983).** Characterization of the *mgl* operon of *Escherichia coli* by transposon mutagenesis and molecular cloning. *J Bacteriol* **153**, 408-415.
- Heim, R., Cubitt, A.B., and Tsien, R.Y. (1995).** Improved green fluorescence. *Nature* **373**, 663-664.
- Heim, R., Prasher, D.C., and Tsien, R.Y. (1994).** Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12501-12504.
- Heim, R., and Tsien, R.Y. (1996).** Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol* **6**, 178-182.

- Hellwig, N., Plant, T.D., Janson, W., Schafer, M., Schultz, G., and Schaefer, M. (2004). TRPV1 acts as proton channel to induce acidification in nociceptive neurons. *J Biol Chem* **279**, 34553-34561.
- Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Heydorn, A., Andersen, J.B., Parsek, M.R., Rice, S.A., Eberl, L., Molin, S., Hoiby, N., *et al.* (2002). Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology* **148**, 87-102.
- Hinde, E., Digman, M.A., Hahn, K.M., and Gratton, E. (2013). Millisecond spatiotemporal dynamics of FRET biosensors by the pair correlation function and the phasor approach to FLIM. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 135-140.
- Hires, S.A., Zhu, Y., and Tsien, R.Y. (2008). Optical measurement of synaptic glutamate spillover and reuptake by linker optimized glutamate-sensitive fluorescent reporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 4411-4416.
- Hogg, R.W., Voelker, C., and Von Carlowitz, I. (1991). Nucleotide sequence and analysis of the *mgI* operon of *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* **229**, 453-459.
- Holzer, W., Penzkofer, A., Fuhrmann, M., and Hegemann, P. (2002). Spectroscopic characterization of flavin mononucleotide bound to the LOV1 domain of Phot1 from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photochem Photobiol* **75**, 479-487.
- Huala, E., Oeller, P.W., Liscum, E., Han, I.S., Larsen, E., and Briggs, W.R. (1997). Arabidopsis NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* **278**, 2120-2123.
- Huber, R., Ritter, D., Hering, T., Hillmer, A.K., Kensy, F., Muller, C., Wang, L., and Buchs, J. (2009). Robo-Lector - a novel platform for automated high-throughput cultivations in microtiter plates with high information content. *Microb Cell Fact* **8**, 42.
- Ibraheem, A., and Campbell, R.E. (2010). Designs and applications of fluorescent protein-based biosensors. *Curr Opin Chem Biol* **14**, 30-36.
- Ikura, M., Barbato, G., Klee, C.B., and Bax, A. (1992). Solution structure of calmodulin and its complex with a myosin light chain kinase fragment. *Cell Calcium* **13**, 391-400.
- Imamura, H., Nhat, K.P., Togawa, H., Saito, K., Iino, R., Kato-Yamada, Y., Nagai, T., and Noji, H. (2009). Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 15651-15656.
- Jose, M., Nair, D.K., Reissner, C., Hartig, R., and Zuschratter, W. (2007). Photophysics of Clomeleon by FLIM: discriminating excited state reactions along neuronal development. *Biophys J* **92**, 2237-2254.
- Katzke, N., Arvani, S., Bergmann, R., Circolone, F., Markert, A., Svensson, V., Jaeger, K.E., Heck, A., and Drepper, T. (2010). A novel T7 RNA polymerase dependent expression system for high-level protein production in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Protein Expr Purif* **69**, 137-146.

- Kensy, F., Zang, E., Faulhammer, C., Tan, R.K., and Büchs, J. (2009).** Validation of a high-throughput fermentation system based on online monitoring of biomass and fluorescence in continuously shaken microtiter plates. *Microb Cell Fact* **8**, 31.
- Klimant, I., Kühn, M., Glud, R.N., and Holst, G. (1997).** Optical measurement of oxygen and temperature in microscale: strategies and biological applications. *Sensors and Actuators B: Chemical* **38**, 29-37.
- Kobayashi, S., Nakano, M., Kimura, T., and Schaap, A.P. (1987).** On the mechanism of the peroxidase-catalyzed oxygen-transfer reaction. *Biochemistry* **26**, 5019-5022.
- Kovbasnjuk, O.N., Antonenko, Y.N., and Yaguzhinsky, L.S. (1991).** Proton dissociation from nigericin at the membrane-water interface, the rate-limiting step of K⁺/H⁺ exchange on the bilayer lipid membrane. *FEBS Lett* **289**, 176-178.
- Kowarzyk, H. (1952).** Thrombin and thrombin-protease. *Nature* **169**, 614-615.
- Kremers, G.J., Goedhart, J., van Munster, E.B., and Gadella, T.W., Jr. (2006).** Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Forster radius. *Biochemistry* **45**, 6570-6580.
- Kuhl, M. (2005).** Optical microsensors for analysis of microbial communities. *Methods Enzymol* **397**, 166-199.
- Kuhl, M., Rickelt, L.F., and Thar, R. (2007).** Combined imaging of bacteria and oxygen in biofilms. *Appl Environ Microbiol* **73**, 6289-6295.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lakowicz, J.R. (2006).** Principles of fluorescence spectroscopy (New York, Springer).
- Lathrop, B.K., Burack, W.R., Biltonen, R.L., and Rule, G.S. (1992).** Expression of a group II phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus* in *Escherichia coli*: recovery and renaturation from bacterial inclusion bodies. *Protein Expr Purif* **3**, 512-517.
- Lee, J., Wang, Y.Y., and Gibson, B.G. (1990).** Recovery of components of fluorescence spectra of mixtures by intensity- and anisotropy decay-associated analysis: the bacterial luciferase intermediates. *Anal Biochem* **185**, 220-229.
- Lengyel, I., Fieuw-Makaroff, S., Hall, A.L., Sim, A.T., Rostas, J.A., and Dunkley, P.R. (2000).** Modulation of the phosphorylation and activity of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II by zinc. *J Neurochem* **75**, 594-605.
- Letunova, E.V., Tikhomirova, A.S., Shiiian, S.D., Markin, V.A., and Khorlin, A. (1981).** [Purification and properties of beta-galactosidase from *Alternaria tenius*]. *Biokhimiia* **46**, 911-919.
- Li, I.T., Pham, E., and Truong, K. (2006).** Protein biosensors based on the principle of fluorescence resonance energy transfer for monitoring cellular dynamics. *Biotechnol Lett* **28**, 1971-1982.

- Lin, Q., and Yun, Z. (2010).** Impact of the hypoxic tumor microenvironment on the regulation of cancer stem cell characteristics. *Cancer Biol Ther* **9**, 949-956.
- Liu, R., Ren, D., Liu, Y., Deng, Y., Sun, B., Zhang, Q., and Guo, X. (2011).** Biosensors of DsRed as FRET partner with CFP or GFP for quantitatively imaging induced activation of Rac, Cdc42 in living cells. *Mol Imaging Biol* **13**, 424-431.
- Llopis, J., McCaffery, J.M., Miyawaki, A., Farquhar, M.G., and Tsien, R.Y. (1998).** Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6803-6808.
- Losi, A., Ghiraldelli, E., Jansen, S., and Gartner, W. (2005).** Mutational effects on protein structural changes and interdomain interactions in the blue-light sensing LOV protein YtvA. *Photochem Photobiol* **81**, 1145-1152.
- Losi, A., Polverini, E., Quest, B., and Gartner, W. (2002).** First evidence for phototropin-related blue-light receptors in prokaryotes. *Biophys J* **82**, 2627-2634.
- Lu, X., and Kang, Y. (2010).** Hypoxia and hypoxia-inducible factors: master regulators of metastasis. *Clin Cancer Res* **16**, 5928-5935.
- Maeda, H. (2008).** Which Are You Watching, an Individual Reactive Oxygen Species or Total Oxidative Stress? *Ann N Y Acad Sci* **1130**, 149-156.
- Mank, M., Reiff, D.F., Heim, N., Friedrich, M.W., Borst, A., and Griesbeck, O. (2006).** A FRET-based calcium biosensor with fast signal kinetics and high fluorescence change. *Biophys J* **90**, 1790-1796.
- March, J.C., Rao, G., and Bentley, W.E. (2003).** Biotechnological applications of green fluorescent protein. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**, 303-315.
- Markova, O., Mukhtarov, M., Real, E., Jacob, Y., and Bregestovski, P. (2008).** Genetically encoded chloride indicator with improved sensitivity. *J Neurosci Methods* **170**, 67-76.
- Marles-Wright, J., Grant, T., Delumeau, O., van Duinen, G., Firbank, S.J., Lewis, P.J., Murray, J.W., Newman, J.A., Quin, M.B., Race, P.R., *et al.* (2008).** Molecular architecture of the "stressosome," a signal integration and transduction hub. *Science* **322**, 92-96.
- McComb, R.B., and Bowers, G.N., Jr. (1972).** Study of optimum buffer conditions for measuring alkaline phosphatase activity in human serum. *Clin Chem* **18**, 97-104.
- Mechin, V., Damerval, C., and Zivy, M. (2007).** Total protein extraction with TCA-acetone. *Methods Mol Biol* **355**, 1-8.
- Merril, C.R. (1990).** Gel-staining techniques. *Methods Enzymol* **182**, 477-488.
- Miller, J.N. (2005).** Fluorescence energy transfer methods in bioanalysis. *Analyst* **130**, 265-270.
- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J.M., Adams, J.A., Ikura, M., and Tsien, R.Y. (1997).** Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**, 882-887.

- Möglich, A., and Moffat, K. (2007).** Structural basis for light-dependent signaling in the dimeric LOV domain of the photosensor YtvA. *J Mol Biol* **373**, 112-126.
- Morita, T., Mizuguchi, J., Kawabata, S., and Iwanaga, S. (1986).** Proteolytic cleavage of vitamin K-dependent bovine plasma protein S by alpha-thrombin and plasma serine protease. *J Biochem* **99**, 561-568.
- Morton, P.E., and Parsons, M. (2011).** Measuring FRET using time-resolved FLIM. *Methods Mol Biol* **769**, 403-413.
- Moussa, R. (2012).** Eine kritische Evaluierung FRET-basierter Biosensoren als Werkzeuge für die quantitative Metabolitanalytik (Jülich, Forschungszentrum Jülich).
- Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987).** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-350.
- Myskiw, C., Piper, J., Huzarewich, R., Booth, T.F., Cao, J., and He, R. (2010).** Nigericin is a potent inhibitor of the early stage of vaccinia virus replication. *Antiviral Res* **88**, 304-310.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K., and Miyawaki, A. (2002).** A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* **20**, 87-90.
- Nagai, T., Sawano, A., Park, E.S., and Miyawaki, A. (2001).** Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca²⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3197-3202.
- Newman, R.H., Fosbrink, M.D., and Zhang, J. (2011).** Genetically encodable fluorescent biosensors for tracking signaling dynamics in living cells. *Chem Rev* **111**, 3614-3666.
- Nikolaev, V.O., Bunemann, M., Hein, L., Hannawacker, A., and Lohse, M.J. (2004).** Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem* **279**, 37215-37218.
- O'Mahony, F.C., and Papkovsky, D.B. (2006).** Rapid high-throughput assessment of aerobic bacteria in complex samples by fluorescence-based oxygen respirometry. *Appl Environ Microbiol* **72**, 1279-1287.
- O'Riordan, T.C., Zhdanov, A.V., Ponomarev, G.V., and Papkovsky, D.B. (2007).** Analysis of intracellular oxygen and metabolic responses of mammalian cells by time-resolved fluorometry. *Anal Chem* **79**, 9414-9419.
- Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., and Remington, S.J. (1996).** Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**, 1392-1395.
- P. Drossler, W.H., A. Penzkofer, P. Hegemann (2002).** Fluorescence quenching of riboflavin in aqueous solution by methionin and cystein.
- Palm, G.J., and Wlodawer, A. (1999).** Spectral variants of green fluorescent protein. *Methods Enzymol* **302**, 378-394.
- Peters, R., and Sikorski, R. (1999).** Protein expression. Folding to green. *Science* **285**, 1229.

- Pickup, J.C., Hussain, F., Evans, N.D., Rolinski, O.J., and Birch, D.J. (2005).** Fluorescence-based glucose sensors. *Biosens Bioelectron* **20**, 2555-2565.
- Porath, J., and Olin, B. (1983).** Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry* **22**, 1621-1630.
- Potzkei, J., Kunze, M., Drepper, T., Gensch, T., Jaeger, K.E., and Buchs, J. (2012).** Real-time determination of intracellular oxygen in bacteria using a genetically encoded FRET-based biosensor. *BMC biology* **10**, 28.
- Prabhananda, B.S., and Kombrabail, M.H. (1999).** Metal ion specificity in anaesthetic induced increase in the rate of monensin and nigericin mediated H⁺/M⁺ exchange across phospholipid vesicular membranes. *Indian J Biochem Biophys* **36**, 415-421.
- Ragàs, X., Cooper, L.P., White, J.H., Nonell, S., and Flors, C. (2011).** Quantification of Photosensitized Singlet Oxygen Production by a Fluorescent Protein. *ChemPhysChem* **12**, 161-165.
- Robbins, A.R., Guzman, R., and Rotman, B. (1976).** Roles of individual *mgI* gene products in the beta-methylgalactoside transport system of *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem* **251**, 3112-3116.
- Salomon, M., Christie, J.M., Knieb, E., Lempert, U., and Briggs, W.R. (2000).** Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. *Biochemistry* **39**, 9401-9410.
- Salomon, M., Eisenreich, W., Durr, H., Schleicher, E., Knieb, E., Massey, V., Rudiger, W., Muller, F., Bacher, A., and Richter, G. (2001).** An optomechanical transducer in the blue light receptor phototropin from *Avena sativa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12357-12361.
- Sambrook, J., and Gething, M.J. (1989).** Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* **342**, 224-225.
- Schwartz, M. (1972).** Quantum yield determinations of photosynthetic reactions. *Methods Enzymol* **24**, 139-146.
- Shaner, N.C., Steinbach, P.A., and Tsien, R.Y. (2005).** A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* **2**, 905-909.
- Shimomura, O., Johnson, F.H., and Saiga, Y. (1962).** Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**, 223-239.
- Sinks, L.E., Roussakis, E., Esipova, T.V., and Vinogradov, S.A. (2010).** Synthesis and Calibration of Phosphorescent Nanoprobes for Oxygen Imaging in Biological Systems. *J Vis Exp* **37**, 1731.
- Smith, H.O., and Birnstiel, M.L. (1976).** A simple method for DNA restriction site mapping. *Nucleic Acids Res* **3**, 2387-2398.

- Stepanenko, O.V., Verkhusha, V.V., Kuznetsova, I.M., Uversky, V.N., and Turoverov, K.K. (2008).** Fluorescent proteins as biomarkers and biosensors: throwing color lights on molecular and cellular processes. *Curr Protein Pept Sci* **9**, 338-369.
- Studier, F.W., and Moffatt, B.A. (1986).** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113-130.
- Sturz, G.R., Phan, T.H., Mummalaneni, S., Ren, Z., DeSimone, J.A., and Lyall, V. (2011).** The K⁺-H⁺ exchanger, nigericin, modulates taste cell pH and chorda tympani taste nerve responses to acidic stimuli. *Chem Senses* **36**, 375-388.
- Sud, D., and Mycek, M.A. (2009).** Calibration and validation of an optical sensor for intracellular oxygen measurements. *J Biomed Opt* **14**, 020506.
- Sun, Y., Wallrabe, H., Seo, S.-A., and Periasamy, A. (2011).** FRET Microscopy in 2010: The Legacy of Theodor Förster on the 100th Anniversary of his Birth. *ChemPhysChem* **12**, 462-474.
- Takahashi, E., Takano, T., Numata, A., Hayashi, N., Okano, S., Nakajima, O., Nomura, Y., and Sato, M. (2005).** Genetic oxygen sensor: GFP as an indicator of intracellular oxygenation. *Adv Exp Med Biol* **566**, 39-44.
- Tantama, M., Hung, Y.P., and Yellen, G. (2011).** Imaging intracellular pH in live cells with a genetically encoded red fluorescent protein sensor. *J Am Chem Soc* **133**, 10034-10037.
- Thomas, J.D., Daniel, R.A., Errington, J., and Robinson, C. (2001).** Export of active green fluorescent protein to the periplasm by the twin-arginine translocase (Tat) pathway in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **39**, 47-53.
- Tielker, D., Eichhof, I., Jaeger, K.E., and Ernst, J.F. (2009).** Flavin mononucleotide-based fluorescent protein as an oxygen-independent reporter in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **8**, 913-915.
- Tolker-Nielsen, T., Brinch, U.C., Ragas, P.C., Andersen, J.B., Jacobsen, C.S., and Molin, S. (2000).** Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *J Bacteriol* **182**, 6482-6489.
- Triplett, B.A. (1989).** A simple method to prevent membranes from touching during western blot incubations. *Biotechniques* **7**, 817-818.
- Vitali, M., Picazo, F., Prokazov, Y., Duci, A., Turbin, E., Gotze, C., Llopis, J., Hartig, R., Visser, A.J., and Zuschratter, W. (2011).** Wide-Field Multi-Parameter FLIM: long-term minimal invasive observation of proteins in living cells. *PLoS One* **6**, e15820.
- Vogelstein, B., and Gillespie, D. (1979).** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 615-619.
- Vordermark, D., Shibata, T., and Brown, J.M. (2001).** Green fluorescent protein is a suitable reporter of tumor hypoxia despite an oxygen requirement for chromophore formation. *Neoplasia* **3**, 527-534.

- Wachter, R.M., Elsliger, M.A., Kallio, K., Hanson, G.T., and Remington, S.J. (1998).** Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein. *Structure* **6**, 1267-1277.
- Wachter, R.M., King, B.A., Heim, R., Kallio, K., Tsien, R.Y., Boxer, S.G., and Remington, S.J. (1997).** Crystal structure and photodynamic behavior of the blue emission variant Y66H/Y145F of green fluorescent protein. *Biochemistry* **36**, 9759-9765.
- Wake, D.R., Yoon, H.W., Wolfe, J.P., and Morkoc, H. (1992).** Response of excitonic absorption spectra to photoexcited carriers in GaAs quantum wells. *Phys Rev B Condens Matter* **46**, 13452-13460.
- Waldo, G.S., Standish, B.M., Berendzen, J., and Terwilliger, T.C. (1999).** Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **17**, 691-695.
- Walter, J., Hausmann, S., Drepper, T., Puls, M., Eggert, T., and Dihne, M. (2012).** Flavin Mononucleotide-Based Fluorescent Proteins Function in Mammalian Cells without Oxygen Requirement. *PLoS One* **7**, e43921.
- Wang, Y., Shyy, J.Y., and Chien, S. (2008).** Fluorescence proteins, live-cell imaging, and mechanobiology: seeing is believing. *Annu Rev Biomed Eng* **10**, 1-38.
- Ward, J.P. (2008).** Oxygen sensors in context. *Biochim Biophys Acta* **1777**, 1-14.
- Ward, W.W., and Cormier, M.J. (1979).** An energy transfer protein in coelenterate bioluminescence. Characterization of the Renilla green-fluorescent protein. *J Biol Chem* **254**, 781-788.
- Wehner, R.G.W. (2007).** Zoologie, 24. Auflage edn (New York, Georg Thieme Verlag).
- Witholt, B., Boekhout, M., Brock, M., Kingma, J., Heerikhuizen, H.V., and Leij, L.D. (1976a).** An efficient and reproducible procedure for the formation of spheroplasts from variously grown Escherichia coli. *Anal Biochem* **74**, 160-170.
- Witholt, B., Heerikhuizen, H.V., and De Leij, L. (1976b).** How does lysozyme penetrate through the bacterial outer membrane? *Biochim Biophys Acta* **443**, 534-544.
- Wöhrle, D.T., M. W.; Stohrer, W.-D. (1998).** Photochemie - Konzepte, Methoden, Experimente (Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH).
- Yano, T., Oku, M., Akeyama, N., Itoyama, A., Yurimoto, H., Kuge, S., Fujiki, Y., and Sakai, Y. (2010).** A Novel Fluorescent Sensor Protein for Visualization of Redox States in the Cytoplasm and in Peroxisomes. *Mol Cell Biol* **30**, 3758-3766.
- Zaccolo, M., De Giorgi, F., Cho, C.Y., Feng, L., Knapp, T., Negulescu, P.A., Taylor, S.S., Tsien, R.Y., and Pozzan, T. (2000).** A genetically encoded, fluorescent indicator for cyclic AMP in living cells. *Nat Cell Biol* **2**, 25-29.
- Zimmer, M. (2002).** Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem Rev* **102**, 759-781.

VIII. Anhang

Anhang 1: DNA-Sequenz FluBO

5' –

CATATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTG

M V S K G E E L F T G V V P I L V E L

<NdeI>-----

GACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACC

D G D V N G H K F S V S G E G E G D A T

TACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCC

Y G K L T L K F I C T T G K L P V P W P

ACCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGCAGTGCTTCGCCCCGCTACCCCGACCACATG

T L V T T F G Y G L Q C F A R Y P D H M

AAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATC

K Q H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I

TTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACC

F F K D D G N Y K T R A E V K F E G D T

-----YFP-----

CTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGG

L V N R I E L K G I D F K E D G N I L G

CACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAG

H K L E Y N Y N S H N V Y I M A D K Q K

AACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTC

N G I K V N F K I R H N I E D G S V Q L

CCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAAC

A D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N

CACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATG

H Y L S Y Q S A L S K D P N E K R D H M

GTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG

V L L E F V T A A G I T L G M D E L Y K

-----<

GAGCTCGCGGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCGGCGCCGTCGACATGGCGTCGTTCCAGTCG

E L A G L V P R G S G A V D M A S F Q S

>-----Linker-----<

TCGGCATCCCGGGCCAGCTGGAAGTCATCAAGAAGGCGCTGGATCACGTGCGCGTCGGC

F G I P G Q L E V I K K A L D H V R V G

GTGGTCATCACCGATCCCGCGCTGGAAGATAACCCGATCGTCTACGTGAACCAGGGCTTC

V V I T D P A L E D N P I V Y V N Q G F

GTGCAGATGACCGGCTACGAGACCGAGGAAATCCTGGGCAAGAACGCGCGCTTCCTCCAG

V Q M T G Y E T E E I L G K N A R F L Q

-----FbFP-----

GGGAAGCACACCGATCCGGCGGAAGTGGACAACATCCGCACCGCGCTGCAAAATAAAGAA

G K H T D P A E V D N I R T A L Q N K E

CCGGTCACCGTGCAGATCCAGAACTACAAGAAGGACGGCACGATGTTCTGGAACGAAC TG

P V T V Q I Q N Y K K D G T M F W N E L

AACATCGATCCGATGGAAATCGAGGATAAGACGTATTTTCGTCGGCATCCAGAACGACATC

N I D P M E I E D K T Y F V G I Q N D I

ACCAAGCAGAAGGAATATGAAAAGCTGCTCGAGCACCACCACCACCACCAC-3'

T K Q K E Y E K L L E H H H H H H

-----><XhoI><---His-Tag----->

Gelb: YFP-Sequenz, Schwarz: linker-Sequenz; Grün: FbFP-Sequenz; Grau: His₆ tag-Sequenz

Anhang 2: Proteinsequenz EYFP Clontech

EYFP Clontech

VSKGEELFTG|VVPILVELDG|DVNGHKFSVS|GEGEGDATYG|KLTLKFICTT|GKLPVPWPTL|

Insertion 2V

VTTFGYGLQC|FARYPDHMKQ|HDFFKSAMPE|GYVQERTIFF|KDDGNYKTRA|EVKFEGDTLV|

S65G V68L S72A

NRIELKGIDF|KEDGNILGHK|LEYNYNSHNV|YIMADKQKNG|IKVNFKIRHN|IEDGSVQLAD|

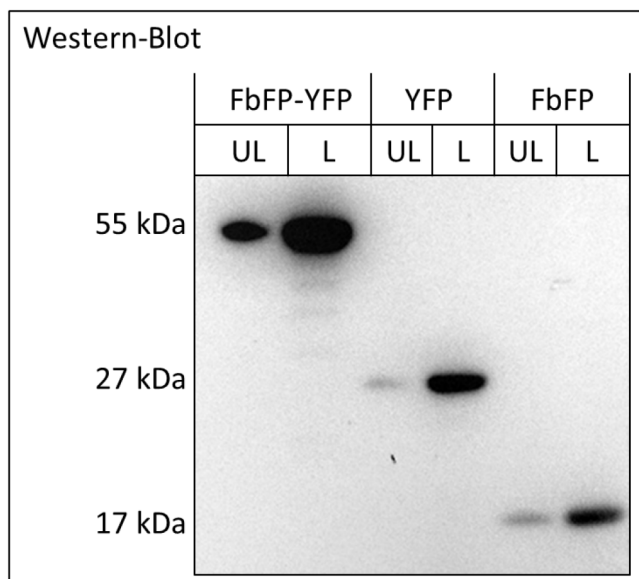
HYQQNTPIGD|GPVLLPDNH Y|LSYQSALSKD|PNEKRDHML|LEFVTAAGIT|LGMDELYK

T203Y

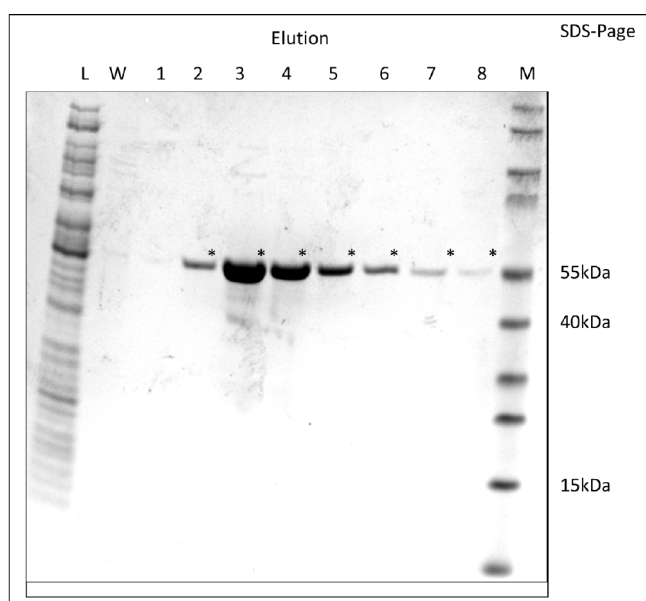
H231L

Grün markiert sind die spezifischen Austausche welche vom GFP zum GFP10C geführt haben und so von Clontech vertrieben wurde.

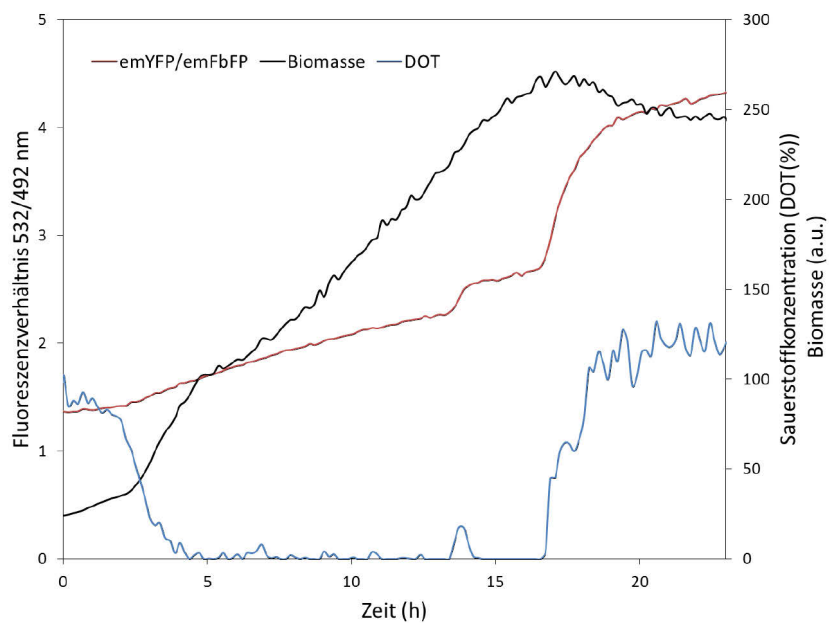
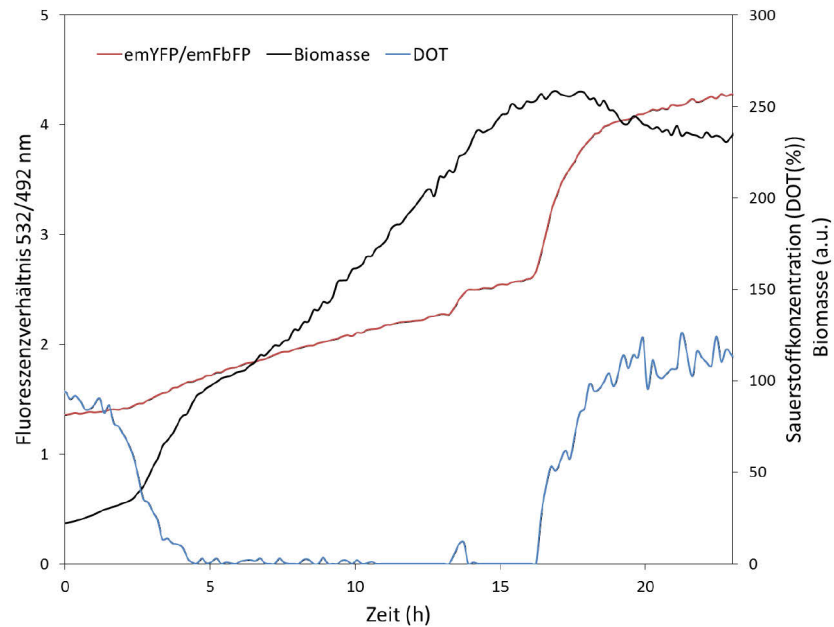
Anhang 3: Western-Blot der löslichen und unlöslichen Fraktionen der FRET-Fusion FbFP-YFP und der Einzelkonstrukte YFP und FbFP.

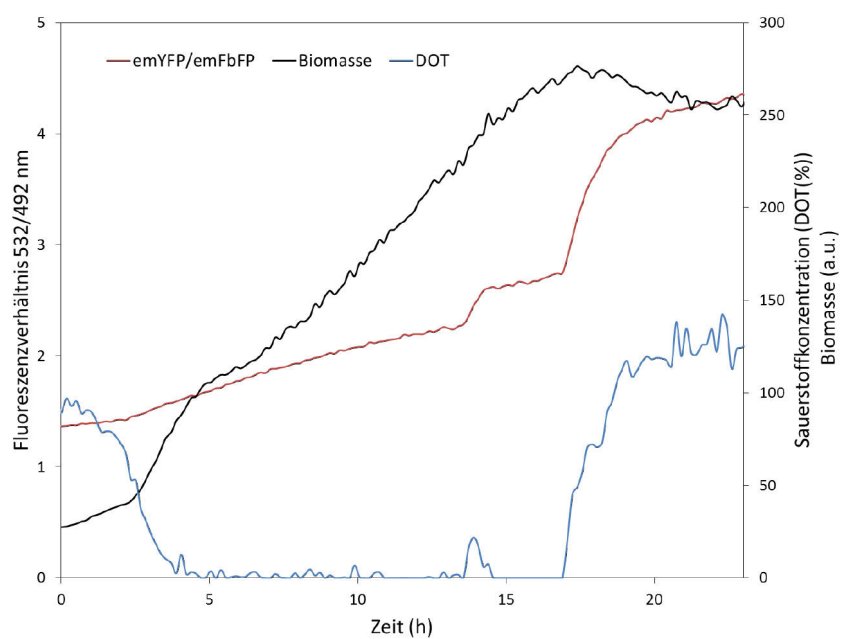


Anhang 4: SDS-Page der Aufreinigung des FbFP-YFP-FRET-Systems



Anhang 5: FRET-basierte Bestimmung der intrazellulären Sauerstoffkonzentration in einer *E.coli*-Batchkultur mithilfe des FluBO-Biosensors. Die hier graphisch dargestellten Messungen entsprechen drei eigenständigen Messungen im BioLector.





Lebenslauf

Janko Potzkei

Diplom Biologe

*13. Mai 1981

Verheiratet, keine Kinder

Schulbildung

- 08/1987 – 06/1988** Städt. Grundschule Meyerstraße in Wuppertal
- 08/1988 – 06/1991** Städt. Grundschule Wittener Straße in Wuppertal
- 08/1991 – 06/2000** Gesamtschule Else Lasker-Schüler in Wuppertal
- Abschluss Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Grundwehrdienst

- 08/2000 – 06/2001** Zivildienst bei den Maltesern in Wuppertal

Hochschulbildung

- 08/2001- 06/2002** Lebensmittelchemiestudium an der Bergische Universität Wuppertal
- 08/2002- 12/2008** Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- 01.01.2009** Abschluss des Diplomstudiengangs Biologie

Thema der Diplomarbeit:

„Verwendung der FbFP-Reporterproteine für Lokalisation- und Sekretionsanalysen in *E.coli* und *Rhodobacter sp.*“

- Seit 04/ 2009** Promotionsstudium am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich.

Thema der Dissertation:

„Etablierung FRET-basierter Biosensoren zur quantitativen Detektion von Sauerstoff in *Escherichia coli*“

Sprachkenntnisse

Englisch

Sonstiges

Mitglied des DVF e.V.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 07. November 2012

JANKO POTZKEI