Entwicklung einer Toolbox von FRETbasierten Biosensoren für die Metabolitanalytik

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Victoria Steffen

aus Düsseldorf

Jülich, Mai 2015

aus dem Institut für Bio- und Geowissenschaften 1 (IBG-1: Biotechnologie) des Forschungszentrums Jülich

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

Referent:Prof. Dr. Martina PohlKorreferent:Prof. Dr. Michael Bott

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2015

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation "Entwicklung einer Toolbox von FRET-basierten Biosensoren für die Metabolitanalytik" von mir selbstständig verfasst und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel gemäß der "Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf" erstellt wurde.

Bisher habe ich keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen und diese Dissertation nicht an einer anderen Fakultät vorgelegt.

Ort, Datum

Victoria Steffen

Publikationsliste

Moussa R., Baierl A., <u>Steffen V.</u>, Kubitzki T., Wiechert W., Pohl M. An evaluation of genetically encoded FRET-based biosensors for quantitative metabolite analyses *in vivo*. **2014**, J. Biotechnol. 191:250-259. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.07.007.

Steffen V., Moussa R., Baierl A., Kubitzki T., Wiechert W., Pohl M.

A critical evaluation of genetically encoded FRET-based biosensors for quantitative metabolite analyses *in vivo*. 3rd International Conference on Bio-Sensing Technology Mai **2013**, Sitges, Spanien

Steffen V., Engelmann S., Wiechert W., Pohl M.

Construction of a FRET-biosensor toolbox with different linkers connecting fluorescent proteins and binding domain. Symposium on Advanced Imaging in Celland Microbiology Technology and Applications Oktober **2013**, Jülich, Deutschland

Abkürzungsverzeichnis

AIM	Autoinduktionsmedium
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
BP	Bindeprotein(e)
C. glutamicum	Corynebacterium glutamicum
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ΔR	FRET-ratio Shift, R _{sat} -R ₀
ECFP	Enhanced cyan fluorescent protein
E. coli	Escherichia coli
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FP	Fluoreszenzprotein
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
I	Isoleucin
IMAC	Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (Metallionen-
	Affinitätschromatographie)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ITC	Isothermal titration calorimetry (Isothermale
	Titatrionskalorimetrie)
k _D	Dissoziationskonstante (Konzentration bei der der Sensor
	halbmaximal gesättigt vorliegt)
Km	Kanamycin
LAO-BP	Lysin- / Arginin- / Ornithin-Bindeprotein
LB	Lysogeny broth
Lys-Ala	L-Lysyl-L-Alanin
M.M.	Material und Methoden
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure

Ν	Asparagin
NADP⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
PBP	Periplasmatische(s) Bindeprotein(e)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PI	Proteaseinhibitor
рК _S	Negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R ₀	FRET-Ratio in Abwesenheit von Liganden
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
R _{sat}	Gesättigte FRET-ratio
RT	Raumtemperatur = 22 °C
RZE	Rohzellextrakt
SDS	Sodium dodecyl sulfate = Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis =
	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SV	Säulenvolumen
Т	Threonin
TBS	<i>Tris buffered saline</i> = Tris gepufferte Salzlösung
TBST	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween
THF	Tetrahydrofuran
VE	Voll entsalzt
Y	Tyrosin
YFP	Yellow fluorescent protein

Inhaltsverzeichnis

Abki	ürzun	gsverzeichnis	3	
I	Abstr	ract	8	
II. I	Kurzf	assung	9	
III.	Ein	leitung	10	
1.	Gru	undlagen der Fluoreszenz	10	
	1.1	Förster-Resonanzenergietransfer	11	
2.	Flu	oreszenzproteine	13	
3.	Wa	s sind Biosensoren?	17	
4.	Flu	oreszenzprotein-basierte Biosensoren	17	
	4.1	Messprinzip der FRET-basierten Biosensoren	20	
	4.2	Limitierungen FRET-basierter Biosensoren	23	
5.	Per	iplasmatische Bindeproteine	24	
ł	5.1	Lysin- / Arginin- / Ornithin-Bindeprotein	25	
IV.	Мо	tivation und Zielsetzung	28	
V .	Matei	rial und Methoden	30	
1.	Ma	terial	30	
	1.1	Chemikalien	30	
	1.2	Geräte	32	
	1.3	Puffer und Medien	33	
	1.4	Expressionssysteme	35	
	1.5	Plasmide und Sensorkonstrukte	36	
2.	Me	thoden	39	
:	2.1	Molekularbiologische Methoden	39	
:	2.1.1	Plasmidpräparation	39	
:	2.1.2	Polymerasekettenreaktion	39	
:	2.1.3	DNA-Restriktion	40	
:	2.1.4	Agarose-Gelelektrophorese	40	
:	2.1.5	Gel-Elution	41	
:	2.1.6	DNA-Konzentrationsbestimmung	41	
:	2.1.7 Ligation 42			

	2.1.8	Ligasefreie Klonierung	42
	2.1.9	Sequenzierung von DNA	43
	2.2	Mikrobiologische Methoden	44
	2.2.1	Herstellung von chemisch-kompetenten Zellen	44
	2.2.2	Transformation von kompetenten Zellen	44
	2.2.3	Kultivierung von Zellen	45
	a. Zu	r Vervielfältigung von Plasmid-DNA	45
	b. Zu	r Proteinproduktion in Komplexmedium	45
	c. Zu	r Proteinproduktion in M9-Medium	46
	d. Zu	r Herstellung von Lysin-Standards in Kulturüberständen	46
	e. Zu	r Produktion von Lysin im BioLector®-System	47
	2.2.4	Lysinbestimmung mit Sensor-exprimierenden E. coli Zellen	49
	2.2.5	Zellaufschluss durch Ultraschall	50
	a.	Zellaufschluss zur anschließenden Proteinreinigung im Labormaßstab	51
	b.	Zellaufschluss zur anschließenden Proteinreinigung im Mini-Maßstab	51
	2.3	Proteinbiochemische Methoden	52
	2.3.1	Reinigung von Proteinen mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographi	e 52
	2.3.2	Mini-Reinigung von Proteinen mittels immobilisierter Metallionen-	
	Affinität	schromatographie	54
	2.3.3	Pufferaustausch über Centricons	55
	2.3.4	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	55
	2.3.5	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Absorption bei 280 nm	56
	2.3.6	SDS-PAGE	57
	2.3.7	Western-Blot	58
	2.3.8	Stabilitätsuntersuchung von Biosensoren	59
	2.3.9	Bestimmung der Affinität eines FRET-Sensors mittels FRET-Signaländerung	59
	2.3.10	Bestimmung des pH-Wertes mittels Kresolrot	60
	2.3.11	Kristallisation der Sensorproteine	61
	2.3.12	Isothermale Titrationskalorimetrie	62
	2.3.13	Nachweis von Lysin mittels Ninhydrin-Farbreaktion	64
	2.3.14	Nachweis von Lysin mittels HPLC	64
VI.	Erg	ebnisse und Diskussion	66
1	. Des	ign genetisch kodierter FRET-basierter Lysinsensoren	66
	1.1	Sensor mit nativem Lysin- / Arginin- / Ornithin-Bindeprotein aus E. coli	67
	1.2	Zirkuläre Permutation des Bindeproteins und Verwendung im FRET-Sensor	73
	1.3	Reinigungsoptimierung und Stabilität des FRET-Sensors mit zirkulärer Permutation	78
	1.4	Aufbau und Charakterisierung der Sensortoolbox	86
	1.5	Vergleichende Bestimmung der Affinität des isolierten permutierten LAO-Bindeprotei	ns
	und im	entsprechenden FRET-Sensor ohne Linker	97

	1.7	Versuche zur Strukturuntersuchung der neuen Lysinsensoren	104
2.	Lys	sinbestimmung in Kulturüberständen	107
	2.1	Varianz des Sensorsignals	107
	2.2	Einfluss des pH-Wertes	109
	2.3	Sensorstabilität in unterschiedlichen Mikrotiterplattendesigns	112
	2.4	Konzeptvalidierung der Lysinbestimmung während einer Kultivierung im BioLector®-	•
	Biorea	ktor	117
	a.	Die Verwendung von FRET-Sensoren erfordert eine komplexe Kalibrierung	117
	b.	Einsatz der Biosensoren zum Lysinnachweis im BioLector®	120
	c.	Herstellung geeigneter Standards	121
	d.	Atline Einsatz des Biosensors bei der Lysinproduktion	121
	e.	Vergleich der etablierten Methoden zur Lysinbestimmung im Vergleich zum FRET-Biosensor	125
	2.5	Lysinbestimmung mit Sensor-exprimierenden E. coli Zellen	126
	a.	Evaluierung Sensorzellen für die extrazelluläre Lysin-Analytik	127
	b.	Evaluierung von Ganzzellsystemen zum Sensorscreening	135
VII.	Zus	sammenfassung und Ausblick	138
VIII.	Lite	eraturverzeichnis	140
IX.	An	hang	i
1.	Vel	ktorkarten	i
Dan	ksagı	ung	xix

I. Abstract

Due to the continuous development of emerging biotechnological processes for the production of fine chemicals, there is a growing demand for biosensors as robust measurement tools especially in high throughput screening or single cell analysis. This thesis presents a toolbox of genetically encoded FRET-based biosensors for metabolite analysis based on the "Venus-flytrap" principle.

For this purpose two biosensor prototypes affine towards lysine were developed. These biosensors comprise of a lysine- / arginine- / ornithine-binding protein (LAO-BP) from *E. coli* flanked by two fluorescent proteins (FPs: ECFP, Citrine). The sensitivity and apparent affinity was optimized by varying flexible and rigid linkers between LAO-BP and FPs. The first toolbox was based on the native LAO-BP in which a binding event does not result in a FRET-effect because either the FPs are not flexible enough or are not orientated in an optimal way. Nevertheless this sensor toolbox allowed the measurement of effects dependent on lysine concentrations caused by variation of the FP environment. This toolbox is suited for lysine determination at concentrations ranging from 10 to 400 mM.

To build the second toolbox a circular permutated LAO-BP was used to orient the FP in a more favourable way. This concept was successful and the first prototype already exhibits high sensitivity. The sensitivity and apparent affinity of the sensor could be varied in a wide range by assembling flexible and rigid linkers in all possible combinations. The second toolbox is suited for lysine determination at concentrations ranging from 0.3 μ M up to 2 mM.

Disadvantageously the second toolbox revealed a decreased stability of the sensors due to the permutated BP. Although the sensor proteins are prone to thermal degradation, they exhibit stability longer than 90 minutes at 30 °C. Therefore, in the second part of the thesis they could be used for atline measurements for strain optimisation in a BioLector® cultivation system.

The prototype (0-perm-0-Sensor) developed in this thesis was successfully applied for atline detection of lysine concentration in a *Corynebacterium glutamicum* culture supernatant during a typical production process. With this the previous portfolio of instrumental and colorimetric methods for concentration determination in culture supernatant could be expanded with the addition of FRET-based biosensors as new measurement tools.

Furthermore, the applicability of these biosensors was evaluated in whole cell systems in *E. coli*. It was revealed that the biosensors in whole cells showed a reproducible intracellular signal change in response to extracellular lysine.

II. Kurzfassung

Durch die stetige Entwicklung neuer biotechnologischer Prozesse zur Herstellung von Feinchemikalien steigt der Bedarf an Biosensoren als schnelles Messwerkzeug insbesondere im Hochdurchsatzscreening und für Einzelzellanwendungen. In dieser Arbeit wurde eine Toolbox genetisch kodierter, FRET-basierter Biosensoren für die Metabolitanalytik entwickelt, die nach dem "Venus-Fliegenfallen"-Prinzip funktionieren.

Dazu wurden zwei Biosensorprototypen für Lysin basierend auf dem Lysin-/ Arginin-/Ornithin-Bindeprotein (LAO-BP) aus *E. coli* entwickelt, die von zwei Fluoreszenzproteinen (FPs: ECFP und Citrine) flankiert wurden. Die Sensitivität und scheinbare Affinität wurde durch Variation eines starren bzw. flexiblen Linkers zwischen BP und FP optimiert. Die erste Toolbox enthielt das native LAO-BP, bei dem das Bindeereignis zu Lysin nicht in einem FRET-Effekt resultierte, weil die FPs zu wenig Beweglichkeit hatten, bzw. nicht optimal zueinander orientiert waren. Mit dieser Sensortoolbox ließen sich jedoch unabhängig vom BP Lysinkonzentrationsabhängige Effekte messen, die auf der Umgebungsänderung der FPs beruhen. Diese Toolbox ist für die Messung von Lysinkonzentrationen von 10 – 400 mM geeignet.

Für die zweite Toolbox wurde das LAO-BP zirkular permutiert, um eine bessere Orientierung der FPs zu ermöglichen. Dieses Konzept war erfolgreich und der erste Sensorprototyp dieses Typs erreichte bereits hohe Empfindlichkeit. Durch Einbau eines starren und eines flexiblen Linkers in allen möglichen Kombinationen konnte die Empfindlichkeit und die scheinbare Affinität über weite Bereiche variiert werden. Diese 2. Toolbox ist für die Messung von Lysinkonzentrationen von 0,3 μ M - 2 mM geeignet.

Nachteilig bei der 2. Toolbox war eine verringerte Stabilität dieser Sensoren, bedingt durch die Permutation im BP. Dadurch neigten die Sensorproteine zu thermischem Zerfall. Allerdings waren sie auch über 90 min bei 30 °C stabil und konnten daher im zweiten Teil der Arbeit in atline Messungen in der Stammoptimierung im BioLector®-Kultivierungssystem erprobt werden.

Es wurde ein Modellprozess entwickelt, in dem am Beispiel des in dieser Arbeit entwickelten Prototyp-Lysinsensors (ohne Linker, 0-perm-0-Sensor) Lysin während eines typischen Produktionsprozesses im Zellüberstand von *Corynebacterium glutamicum* atline detektiert werden konnte. So wurde die Palette der bisherigen instrumentellen und kolorimetrischen Analysemethoden zur Konzentrationsbestimmung in Kulturüberständen mit den FRET-basierten Biosensoren als neues Werkzeug ergänzt.

Weiterhin wurde die Anwendbarkeit dieses Biosensors in Ganzzellsystemen (*E. coli*) als Sensorzellen getestet und gezeigt, dass die Biosensoren in den Messzellen eine reproduzierbare intrazelluläre Signaländerung auf extrazelluläres Lysin zeigen.

III. Einleitung

1. Grundlagen der Fluoreszenz

Die Emission von Licht, die nach Anregung eines Moleküls stattfindet, wird als Lumineszenz bezeichnet. Der Begriff der Lumineszenz, welche auch kaltes Leuchten genannt wird, fasst die photophysikalischen Prozesse der Fluoreszenz und Phosphoreszenz zusammen. Die erste Beschreibung von Fluoreszenz erfolgte bereits Mitte des 19. Jahrhunderts [1,2]. Das Prinzip der Fluoreszenz wurde durch Aleksander Jabłoński in einem Diagramm beschrieben ([3], Abbildung 1). So wird ein Elektron eines Fluorophors durch Lichtabsorption vom Grundzustand (S₀) in einen angeregten Zustand (S₁ oder S₂, ...) gehoben. In diesen angeregten Zuständen kann es in unterschiedlichen energetischen Zuständen vorkommen. Die aufgenommene Energie kann durch Stöße mit Nachbarmolekülen (Schwingungsrelaxation) oder durch innere Konversion (engl.: *internal conversion*) strahlungslos abgegeben werden.

So kann das Elektron von energetisch höher angeregten Zuständen (z.B. S₂) in niedrigere angeregte Zustände (z.B. S₁) übergehen und schließlich wieder in den Grundzustand gelangen. Den Übergang vom niedrigsten angeregten Zustand (S₁) in den Grundzustand unter Abgabe eines Photons bezeichnet man als **Fluoreszenz**. Ein Sonderfall ist der Übergang der Elektronen aus einem Singulett- in einen Triplettzustand (T₁). Dieser eigentlich verbotene Übergang kann nur durch ein sogenanntes *intersystem crossing* (Spinumkehr) erreicht werden. Wenn bei dem Übergang aus dem niedrigsten Triplettzustand in den Grundzustand ein Photon emittiert wird, so wird dies als **Phosphoreszenz** bezeichnet. Durch die innere Konversion kann auch der "Stokes-Shift" erklärt werden: Diese bereits von Sir George Gabriel Stokes im Jahr 1852 beschriebene Verschiebung der Wellenlänge des emittierten Lichts beschreibt das Phänomen, dass das emittierte Licht meist niederenergetischer ist als das absorbierte Licht, die Absorptionswellenlänge also meist kürzer ist als die Emissionswellenlänge [2].



Abbildung 1: Jabłoński-Diagramm (nach [4])

Zeitlich unterscheiden sich die im Jabłoński-Diagramm beschriebenen Prozesse stark: Die Absorption des Lichts geschieht in ca. 10^{-13} s [5]. Der Übergang zwischen zwei energetischen Zuständen (innere Konversion, z.B. S₂ zu S₁) benötigt ca. 10^{-12} s. Die Fluoreszenzlebensdauer ist für jeden Fluorophor spezifisch, liegt aber normalerweise in der Größenordnung von 10^{-8} s. Auf Grund des verbotenen energetischen Übergangs vom Triplett- in den Singulettzustand weist die Phosphoreszenz mit 1-1000 s eine wesentlich längere Lebensdauer auf [4,5].

Neben der Fluoreszenzlebensdauer ist die Quantenausbeute einer der wichtigsten Charakteristika eines Fluorophors. Sie beschreibt das Verhältnis von emittierten zu absorbierten Photonen [4].

1.1 Förster-Resonanzenergietransfer

Eine besondere Wechselwirkung eines Fluorophors mit einem anderen Molekül ist der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET, [6]). Dieser basiert auf dem strahlungslosen Energieübertrag zwischen den beiden Partnern über Coulombsche Dipol-Dipol Wechselwirkungen. Die FRET-Effizienz bezeichnet den Anteil der Photonen, die vom Donor absorbiert und an den Akzeptor transferiert werden und wird von folgenden Voraussetzungen bedingt:

Überlappende Emissions- und Absorptionsspektren

Die resonante Energieübertragung kann nur stattfinden, wenn die Elektronen des Akzeptors im Grundzustand in der Lage sind, die Energie des Donors im angeregten Zustand zu absorbieren. Daraus folgt, dass das Emissionsspektrum des Donors und das Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen müssen. Je größer das Überlappungsintegral der Spektren ist, desto höher ist die FRET-Effizienz eines FRET-Paares [4].

Orientierung der Dipolmomente

Zur optimalen Wechselwirkung der Dipole müssen diese parallel orientiert sein. Sind sie orthogonal zu einander orientiert, so kann kein FRET stattfinden (Abbildung 2A). Dies ist ein gradueller Prozess: Je idealer die parallele Orientierung der beiden Fluorophore ist, desto höher ist die FRET-Effizienz [7].

Abstand zwischen den FRET-Partnern

Die FRET-Effizienz ist ebenfalls abhängig vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor. Abbildung 2B zeigt die FRET-Effizienz als Funktion des relativen Abstandes zwischen den Partnern. Je näher sich die beiden Partner sind, desto höher ist die FRET-Effizienz [4].



Abbildung 2: Abhängigkeit der FRET-Effizienz von der relativen Orientierung ((A), nach [8]) und vom relativen Abstand zwischen Donor und Akzeptor ((B), nach [4]).

In Abbildung 2 wird der sogenannte Försterradius R_0 verwendet. Diese Größe, die jeweils spezifisch für ein Donor-Akzeptor-Paar ist, beschreibt den Abstand zwischen den beiden Partnern, bei dem die FRET-Effizienz 50 % ihres maximalen Wertes

erreicht hat. Für biologische Systeme werden Systeme mit Försterradien zwischen 20 und 90 Å verwendet, entsprechend der Größe bzw. Abstände in Biomolekülen [4].

2. Fluoreszenzproteine

Für die in dieser Arbeit verwendeten FRET-basierten Biosensoren wurden zwei Fluoreszenzproteine benötigt, die ein gutes FRET-Paar darstellen. Dafür wurden die beiden Fluoreszenzproteine ECFP (*enhanced cyan fluorescent protein*) und Citrine (Variante von YFP, *yellow fluorescent protein*) verwendet.

Dies sind Varianten des bekannten grün fluoreszierenden Proteins (GFP), welches 1962 in der Qualle *Aequorea victoria* entdeckt wurde [9]. Nach der Verwendung des GFP-Gens in Klonierungsarbeiten 1992 [10] konnten auch erste Strukturinformationen gewonnen und durch weitere Arbeiten nachgewiesen werden, dass durch heterologe Expression dieses Gens Fluoreszenz in verschiedenen Zellen ermöglicht werden konnte [11,12]. Für die "Entdeckung und Weiterentwicklung des grün fluoreszierenden Proteins" wurde 2008 der Nobelpreis für Chemie an Martin Chalfie, Osamu Shimomura und Roger Tsien verliehen [13–15].

Unter anderem durch die Arbeiten von Heim und Tsien [16] wurde es möglich, verschiedene Farbvarianten des GFPs herzustellen. Allen GFP-Derivaten gemein ist die Fass-ähnliche Struktur mit 11 antiparallel angeordneten β -Faltblättern, die in Abbildung 3 am Beispiel der beiden in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzproteine ECFP und Citrine dargestellt ist. Der Fluorophor ist zwischen den beiden α -Helices im Zentrum des Fasses lokalisiert und die Farbvarianten der Fluoreszenzproteine unterscheiden sich nur durch wenige Punktmutationen.



Abbildung 3: Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten GFP-Varianten ECFP (links) und Citrine (rechts). Um die Fluorophore (schwarz) im Inneren sichtbar zu machen, wurde die Fassstruktur leicht transparent dargestellt. Schwarz markiert sind die Fluorophore und die Aminosäuren, die mit den Fluorophoren direkt interagieren und so die Absorptions- und Emissionseigenschaften verändern.

Eine wichtige Eigenschaft des GFP ist, dass sich der Fluorophor 4-(*p*-Hydroxybenzyliden)-Imidaziolidin-5-on autokatalytisch unter Sauerstoffverbrauch aus drei benachbarten Aminosäuren bildet (Abbildung 4, [17]). Im Fall des GFP sind dies die Aminosäuren Ser₆₅–Tyr₆₆–Gly₆₇ [10].

Die Fluorophore der in dieser Arbeit verwendeten cyanen und gelben Farbvarianten sind in Abbildung 4 dargestellt. Im Gegensatz zu dem GFP-Fluorophor bestehen diese aus den Aminosäuren Thr₆₅-Trp₆₆-Gly₆₇ (ECFP) und Gly₆₅-Tyr₆₆-Gly₆₇ (Citrine). Bei dem Citrine-Fluorophor ist auch der Austausch T203Y essentiell für die Verschiebung des spektralen Bereichs [18], da durch Einführung eines Tyrosins in Position 203 π - π -Wechselwirkungen mit den Tyrosin-Resten im Fluorophor stattfinden können und damit eine höhere Polarisierbarkeit erreicht werden kann.

Im Vergleich zum wildtypischen GFP wurden bei dem in dieser Arbeit verwendeten Citrine folgende Austausche vorgenommen: S65G / V68L / Q69M / S72A / T203Y / H231L. Diese Austausche bewirken insbesondere eine höhere Photostabilität, bessere Produktion bei 37 °C und eine höhere Chloridionenstabilität (Q69M, [19]). Die in dieser Arbeit verwendete ECFP-Variante unterschied sich durch folgende Austausche vom wildtypischen GFP: F64L/S65T/Y66W/N146I/M153T/V163A. Diese Austausche beeinflussen, wie auch die Austausche des Citrines, nicht nur die spektralen Eigenschaften: So führt der Austausch S65T verglichen mit dem wildtypischen GFP zu einer vierfach schnelleren Oxidation des Fluorophors, zu langsamerem Photobleaching und zur Unterdrückung von Photoisomerisation [20]. Andere Austausche im ECFP, wie z.B. M153T/V163A, resultieren in einer dreifach höheren Quantenausbeute im Vergleich zum CFP [16].



Abbildung 4: (A) Von Cubitt *et al.* postulierter Reifungsprozess des Fluorophors am Beispiel des ECFP [20]. Abbildung nach [21], die Halbwertszeiten wurden mit einer GFP-Variante mit S65T Austausch bestimmt [22,23]. Fluorophore der beiden FRET-Partner ECFP (B) und Citrine (C) in der gereiften Form.

Die Absorptions- und Emissionsspektren der beiden Fluoreszenzproteine ECFP und Citrine sind in Abbildung 5 dargestellt. Auffällig sind hier vor allem die zwei Anregungs- und Emissionsmaxima des ECFP. Diese sind wahrscheinlich durch zwei mögliche Konformationen der dem Fluorophor nahen Aminosäuren Tyr₁₄₅ und His₁₄₈ bedingt [24] (Abbildung 3). Wichtig für die Nutzung der beiden Fluoreszenzproteine als FRET-Partner ist unter anderem, wie unter Kapitel 1.1 beschrieben, ein großes Überlappungsintegral des Emissionsspektrums des FRET-Donors (hier: ECFP) und des Absorptionsspektrums des FRET-Akzeptors (hier: Citrine). Um ein FRET-Ereignis messen zu können, wurde in dieser Arbeit nur der FRET-Donor bei 428 nm angeregt und die Fluoreszenzemission beider FRET-Partner bei 485 nm (ECFP) bzw. 528 nm (Citrine) aufgenommen (Abbildung 5, vertikale Markierungen).



Abbildung 5: Absorptions- und Emissionsspektren der FRET-Partner ECFP und Citrine. Grün markiert sind die Anregungs- und Emissionswellenlängen 428 nm, 485 nm und 528 nm.

Zusätzlich zu den GFP-basierten Fluoreszenzproteinen existiert ein weites Spektrum von anderen Fluoreszenzproteinfamilien [25], die aus ganz unterschiedlichen Organismen isoliert wurden und ein breites Farb- und Anwendungsspektrum aufweisen [26]. Die Fluoreszenzproteine (FP) lassen sich dabei in verschiedene Klassen aufteilen: die GFP-ähnlichen FP, die eine Strukturähnlichkeit zu GFP zeigen und z.B. in Nesseltieren gefunden wurden [27–29], die FMN-basierten FP, die über

"*Light Oxygen Voltage*"-Domänen verfügen und beispielsweise in Bakterien gefunden wurden [30–32] und andere FP, zu denen z.B. das Bilirubin-abhängige UnaG aus dem Aal gehört [33]. Besonders hervorzuheben sind hierbei die FMN-basierten Fluoreszenzproteine, die ohne sauerstoffabhängigen Reifungsprozess auch anaerobe Prozesse detektieren [34] oder in Sauerstoffsensoren verwendet werden können [35].

3. Was sind Biosensoren?

Der Begriff "Biosensor" wurde von der IUPAC folgendermaßen definiert [36]:

"(Unter Biosensoren versteht man)... ein Instrument, das spezifische biochemische Reaktionen von isolierten Enzymen, Antikörpern, Geweben, Organellen oder ganzen Zellen verwendet, um chemische Verbindungen zu detektieren - normalerweise durch elektrische, thermische oder optische Signale."

Dies zeigt, dass das Feld der Biosensoren sehr divers ist – die prominentesten Beispiele für Biosensoren sind Blutzuckermessgeräte, die bereits seit 1962 verwendet werden und die Glukosekonzentrationen enzymatisch in elektrische Signale übersetzen [37]. Diese sind mittlerweile sogar als einfach auf die Haut auftragbare Biotinte verfügbar [38]. Andere bekannte Beispiele für solche Biosensoren finden sich in der Krebserkennung bei der Analytik von Tumorbiomarkern [39].

Davon zu unterscheiden sind Fluoreszenzprotein-basierte Biosensoren, die intrazellulär ausgelesen werden können. Mit diesen können beispielsweise Protein-Protein-Interaktionen untersucht werden [40–42] oder auch intrazelluläre Metabolitkonzentrationen [43–46], Sauerstoffgehalt [35] oder pH-Werte [47] bestimmt werden. Die Funktion einiger ihrer Vertreter wird im folgenden Kapitel beschrieben.

4. Fluoreszenzprotein-basierte Biosensoren

In der Metabolitanalytik wurden bisher diverse Biosensorkonzepte, wie zum Beispiel Translokalisationssensoren, Transkriptionsfaktor-basierte Biosensoren oder FRETbasierte Biosensoren verwendet.

Bei den Translokalisationssensoren wird z.B. eine Fusion eines stark pHabhängigen Fluorophors mit einem Protein mit bekannter Lokalisation in der Zelle zur Bestimmung des intrazellulären pH-Werts verwendet [48,49]. Diese können zur Bestimmung des pH-Werte im Zytosol, in Mitochondrien und im Golgi-Apparat genutzt werden. Zur Signalaufnahme werden Absorptions- oder Fluoreszenzspektren des einzelnen Fluorophors (z.B. Derivate des GFPs) aufgenommen. Da bei diesen Fluorophoren die Spektren pH-abhängig sind, kann durch das Verhältnis von zwei Absorptions- oder Fluoreszenzsignalen unterschiedlicher Wellenlänge auf den pH-Wert geschlossen werden. Ein Nachteil dieser Sensoren besteht darin, dass die Fluoreszenz des gewählten Fluoreszenzproteins auch von anderen Faktoren, wie z.B. der intrazellulären ATP-Konzentration, abhängig ist [50]. Ein Vorteil dieses Systems ist sein einfacher Aufbau, denn abgesehen von dem Fluoreszenzprotein und dem Fusionsprotein zur gezielten Lokalisation sind keine weiteren Komponenten vorhanden, die durch die zelluläre Umgebung gestört werden können und dadurch fehlerhafte Resultate ergeben. Ein weiterer Vorteil dieser Sensoren besteht in der konstitutiven Produktion der Fluoreszenzproteine. So liegen sie bereits funktional in der Zelle vor, wenn die Messung gestartet wird und können ohne zeitliche Verzögerung ein Messsignal generieren. Dies steht im Gegensatz zu den Transkriptionsfaktor-basierten Biosensoren, die im Folgenden beschreiben werden.

Transkriptionsfaktor-basierte insbesondere Biosensoren sind bei der Einzelzellanalytik von Bedeutung. In diesen Sensoren steht ein Fluoreszenzreportergen (meist ein GFP-Derivat) unter der Kontrolle eines Promotors, an den ein durch die Zielmoleküle kontrollierter Transkriptionsfaktor bindet. Ist das Zielmolekül vorhanden, so wird das Fluoreszenzprotein konzentrationsabhängig produziert, sodass die Fluoreszenzintensität einer Zelle mit der in ihr vorhandenen Zielmolekülkonzentration korreliert. Solche Transkriptionsfaktor-basierten Biosensoren wurden beispielsweise für Lysin [51], Mevalonsäure (Isoprenoid, [52]) und verzweigtkettige Aminosäuren [43] entwickelt.

Bei den Transkriptionsfaktor-basierten Biosensoren tritt das Messsignal zeitlich verzögert auf. So brauchen selbst faltungsverbesserte GFP-Varianten (mit S65T Mutation) noch ca. 30 min, um zu reifen, also ein vollständiges Fluorophor auszubilden [21,23]. Ein großer Vorteil der Transkriptionsfaktor-basierten Systeme

ist, dass diese Systeme in Einzelzellmaßstab verwendet werden können und sich damit einzelne Zellen aufgrund ihrer Produktivität voneinander unterscheiden lassen. So können beispielsweise bei der Entwicklung mikrobieller Produktionsstämme nur die am besten produzierenden Zellen mittels FACS (*Fluorescence activated cell sorting*) zur weiteren Optimierung ausgewählt und so die Entwicklung von neuen Produktionsstämmen beschleunigt werden [44,51]. Eine Limitation dieser Systeme für den quantitativen Ansatz ist die Kalibration: Wenn man extrazellulär eine bestimmte Zielmolekülkonzentration einstellt, kann nicht nachgewiesen werden, welcher Anteil davon in die Zelle gelangt, ob also die extra- und intrazellulären Konzentration übereinstimmen. So kann zwar eine vergleichende qualitative, aber keine absolute Konzentrationsinformation gewonnen werden. Zudem ist diese Art von Sensoren darauf angewiesen, dass es einen natürlichen Transkriptionsfaktor für exakt das gewünschte Zielmolekül gibt.

Darüber hinaus werden **genetisch kodierte, FRET-basierte Biosensoren** zur intrazellulären Analytik eingesetzt. Auf diesem Prinzip beruhen z.B. Sauerstoffsensoren, die ein GFP-basiertes, gelbes Fluoreszenzprotein mit einem blauen, so genannten *"Light-Oxygen-Voltage"* (LOV)-Protein koppeln. Letzteres reift ohne Sauerstoff, während Sauerstoff essentiell für die Ausbildung des GFP-basierten Chromophors ist [35].

Weitere genetisch kodierte, FRET-basierte Biosensoren bestehen aus einem zentralen periplasmatischen Bindeprotein [53,54], das durch Ligandenbindung seine Konformation nach dem Prinzip einer Venus-Fliegenfalle ändert und von zwei Fluoreszenzproteinen flankiert wird. Derartige Biosensoren wurden erstmals 1997 von Miyawaki *et al.* und Romoser *et al.* zum intrazellulären Nachweis von Ca²⁺-Ionen (z.B. im Zytosol oder in einzelnen Organellen) beschrieben [55,56] und sind heute für eine breite Palette an Liganden verfügbar, z.B. für Zucker, Dipeptide oder Metallionen [45,46,57–64]. So gibt es nicht nur eine sehr große Familie von periplasmatischen Bindeproteinen, man kann diese auch durch Mutagenese verändern, sodass sie andere Substrate erkennen können: Dies wurde unter anderem von Marvin und Hellinga durchgeführt, indem sie ein Maltose-bindendes Protein zu einem Zink-bindenden Protein umgebaut haben [65]. FRET-basierte Sensoren wurden auch bereits für verschiedene Aminosäuren beschrieben, darunter

Leucin [66], Methionin [46] und Lysin [67]. Der Lysinsensor von Okada und Ito [67] wurde als Vorlage für die in dieser Arbeit verwendeten Sensoren verwendet.

Ein wichtiger Vorteil der genetisch kodierten, FRET-basierten Biosensoren liegt in dem ratiometrischen Signal der Sensoren (Akzeptorfluoreszenz / Donorfluoreszenz). Da zwei Fluorophore vorhanden sind, kann, ähnlich zu den Translokalisationssensoren, auch bei differierender Sensorkonzentration in der Zelle noch ein Messsignal generiert werden. Zudem sind diese Biosensoren flexibel: Wenn sie einen Liganden gebunden haben, so kann dieser auch wieder abgegeben werden. Das Signal ist also kein reines "Aus-An-System", sondern "dimmbar" und kalibrierbar. Darüber hinaus kann das Messsignal sehr schnell zur Verfügung stehen: Wenn ein System gewählt wird, in dem die genetisch kodierten, FRET-basierten Biosensoren kontinuierlich produziert werden, so können die bereits gefalteten und gereiften Biosensoren die Metabolitkonzentration direkt detektieren und das Messsignal wird durch die stetig neu produzierten Sensoren verstärkt. So konnten FRET-basierte Biosensoren beispielsweise bereits eingesetzt werden, um die durch K⁺-lonen aktivierte Glykolyse in einzelnen Astrozyten bei synaptischer Aktivität durch Glukose-und Laktat-erkennende FRET-basierte Biosensoren nachzuweisen [68].

4.1 Messprinzip der FRET-basierten Biosensoren

Im Folgenden wird die Funktionsweise und das Messprinzip genetische kodierter FRET-basierter Biosensoren näher beschrieben.

Die Liganderkennung der Biosensoren funktioniert nach dem in Abbildung 6 dargestellten Prinzip: auch in der offenen Konformation sind die beiden Fluoreszenzproteine oft bereits in räumlicher Nähe, sodass ein FRET-Ereignis auftreten kann. Dies ist im Emissionsspektrum des Sensors in Abbildung 6, Teil (B) dargestellt. Blau markiert ist hierbei die Fluoreszenz eines cyan-farbenen (z.B. ECFP) und gelb markiert ist die Fluoreszenz eines gelben Fluorophors (z.B. Citrine). Bei Bindung des Liganden überträgt sich die Konformationsänderung des Bindeproteins auf die Fluoreszenzproteine, sodass sich deren relative Orientierung zu einander ändert. Im optimalen Fall wird die FRET-Effizienz so entweder wesentlich stärker oder wesentlich schwächer, sodass man einen Unterschied im Fluoreszenzspektrum erhält (Abbildung 6 (B)). Dabei sinkt entweder die Fluoreszenzemission des Donors

(hier: ECFP), während die Fluoreszenzemission des Akzeptors steigt (hier: Citrine), oder umgekehrt (Abbildung 6 (C)). Zur Bestimmung der Sensoraffinität wird dieser mit steigenden Ligandenkonzentrationen inkubiert und das FRET-Verhältnis (FRETratio) als Quotient der Fluoreszenzintensitäten beider Fluorophore bestimmt:

$$FRET - ratio = \frac{Akzeptor Signal}{Donor Signal}$$
(1)

Auftragen dieser FRET-ratio gegen die logarithmierte Ligandenkonzentration ergibt die typischen S-förmigen Bindungsisothermen (Abbildung 6 (B),(C)). Anhand der Bindungsisothermen kann nicht nur die Sensitivität bestimmt werden, die die Differenz zwischen der FRET-ratio im gesättigten Zustand (R_{sat}) und der FRET-ratio ohne Ligand (R₀) bezeichnet, sondern auch die Affinität des Sensors. Die Affinität beschreibt die Ligandenkonzentration, bei der die FRET-ratio halbmaximal ist (k_D). Zudem kann der **dynamische Bereich** bestimmt werden. Dies ist der Konzentrationsbereich, in dem die FRET-ratio annähernd linear mit der (logarithmisch aufgetragenen) Ligandenkonzentration korreliert. In diesem Bereich ist der Sensor zur Konzentrationsbestimmung einsetzbar. Unter der Voraussetzung, dass der Ligand im Überschuss vorliegt, kann der k_D-Wert mit folgender Formel analog zum k_M einer Michaelis-Menten-Kinetik berechnet werden ([4], nach Formel 19.10):

$$\mathbf{R} = \frac{(\mathbf{R}_{sat} - \mathbf{R}_0) * [S]}{\mathbf{k}_D + [S]} + \mathbf{R}_0$$
(2)

Hierbei bezeichnen R die FRET-ratio, [S] die Ligandkonzentration, k_D die Affinität und R_0 und R_{sat} die minimale und maximale FRET-ratio.



Abbildung 6: Übersicht über die Funktion der genetisch kodierten, FRET-basierten Biosensoren. (A): Schematische Darstellung der offenen (ohne Ligand) und geschlossenen Konformation (mit Ligand). (B): Fluoreszenzintensitätsspektren der beiden Konformationen. (C): Bindungsisotherme mit Angabe der typischen Parameter und Begriffe: Affinität (k_D), minimale und maximale FRET-ratio (R_0 , R_{sat}) sowie der Sensitivität und des dynamischen Bereichs.

Da genetisch kodierte, FRET-basierte Biosensoren baukastenartig aus drei Proteinen aufgebaut sind, gibt es verschiedene Strategien, um die Affinität, den dynamischen Bereich oder die Sensitivität (Signalstärke) zu verändern.

Eine typische Strategie, um die **Affinität** zu verändern, ist das Einführen von Mutationen in der Bindestelle des Bindeproteins. So konnten zum Beispiel Glukosesensoren mit variablen Affinitäten erzeugt werden [69].

Eine Strategie zur Verbesserung der **Sensitivität**, die ebenfalls am Beispiel der Glukosesensoren erfolgreich angewandt wurde, ist die Variation des Abstands zwischen Bindedomäne und Fluorophoren, entweder durch Verkürzung der Termini des Bindeproteins [70] oder durch die Einführung von Linkern. Diese können zwischen den Fluoreszenzproteinen und dem Bindeprotein eingefügt werden, sodass entweder die FRET-ratio in Abwesenheit des Liganden (R₀) sinkt, oder aber im gesättigten Zustand (R_{sat}) steigt und so insgesamt die Sensitivität verbessert wird.

Ein Beispiel für eine solche Variation der Sensitivität ist die Verwendung von (GGS)_n-Linkern in einem Zink-Sensor [71] und in mehreren Kinase-Sensoren [72]. Das (GGS)_n-Motiv wird als sehr flexibler Linker beschrieben [73] und wird daher in der hier vorliegenden Arbeit als "flexibler Linker" bezeichnet. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, den Linker möglichst starr zu gestalten. In einer Studie von Lissandron *et al.* wurden daher verschiedene Sequenzen verglichen und das Motiv X–Y–P–Y–D als besonders steifes Strukturmotiv in Form eines *turns* identifiziert [74]. Die Linkersequenz KLYPYDVPDYA wurde dabei als besonders starr beschrieben und in der hier vorliegenden Arbeit als "starrer Linker" verwendet.

Variationen des Bindeproteins können ebenfalls eine Verbesserung der Sensitivität zur Folge haben. So wurde von Okada *et al.* eine zirkuläre Permutation des LAO-Bindeproteins durchgeführt, um die Sensitivität zu erhöhen [67]. Eine Erhöhung der Sensitivität lässt sich aber auch durch die Insertion von Linkern erzielen.

Eine höhere **Signalstärke und –stabilität** kann durch verbesserte Fluoreszenzproteine erhalten werden. So lässt sich die Quantenausbeute verdreifachen, wenn man ECFP statt CFP verwendet [16]. Oder man kann einen Chlorid-unempfindlicheren Sensor erzeugen, indem man Citrine statt EYFP verwendet [19].

4.2 Limitierungen FRET-basierter Biosensoren

Die FRET-basierten Biosensoren bestehen aus zwei Fluoreszenzproteinen und einem Bindeprotein. Damit können auch alle drei Proteinteile unterschiedlich von den Umgebungsbedingungen beeinflusst werden. Dies ist besonders in Ganzzellsystemen unter Umständen problematisch, da alle Komponenten des Sensors in unterschiedlichem Ausmaß nicht nur durch den zu messenden Zielmetaboliten beeinflusst werden können, wodurch das Messergebnis verfälscht wird. Dieser Tatsache wurde in der Literatur jedoch häufig nicht Rechnung getragen und solche Biosensoren wurden nicht nur für die qualitative, sondern auch für die quantitative intrazelluläre Metabolitanalytik eingesetzt. Die grundlegende Arbeit von Roland Moussa zeigte am Beispiel eines Glukose- und eines Maltosesensors, dass Bindeund Fluoreszenzproteine durch pH-Wert, Ionenstärke, zelluläre Metabolite wie NAD(P)(H), ATP, ein- und zweiwertige Metallionen sowie molekulare Crowding-Effekte beeinflusst werden, was die bisherige Praxis der Nutzung solcher Sensoren

für die quantitative Metabolitanalytik in Frage stellt [75,76]. Die Arbeit ergab jedoch, dass FRET-basierte Biosensoren mit hinreichender Genauigkeit für die quantitative Metabolitbestimmung in gut definierten Systemen einsetzbar sind. Daher stand in dieser Arbeit die exemplarische Evaluierung eines solchen Sensors für die Anwendung in der Zellüberständen im Vordergrund. Die extrazelluläre Anwendung stellt ein bisher kaum erschlossenes Anwendungsgebiet für FRET-basierte Biosensoren dar.

5. Periplasmatische Bindeproteine

Die in den genetisch kodierten, FRET-basierten Biosensoren verwendeten Bindeproteine kommen ursprünglich im Periplasma von Gram-negativen Bakterien vor. Dort erkennen sie Nährstoffe, Metallionen und zelluläre Metaboliten und wechselwirken mit Transportproteinen oder Chemotaxis-Rezeptoren (z. B. [77]). Im Laufe der Evolution fusionierten für die periplasmatischen Bindeproteine (PBP) kodierenden Gene mit Genen von Membranproteinen, sodass zu PBP homologe Bindeproteine auch in anderen Pro- und Eukaryoten vorkommen. Ein ausführlich untersuchtes Beispiel dafür sind die Glutamatrezeptoren [78]. Die PBP bilden eine große Familie mit hoher Sequenzdiversität aber konservierter Tertiärstruktur (Faltungsmotiv) [53,54,79,80]. Sie bestehen aus zwei einzelnen globulären α/β -Domänen, die in der Mitte durch ein "Gelenk" getrennt werden, in dem der Ligand binden kann. Die charakteristische Konformationsänderung bei Bindung des Liganden führte auch zum Name der "Venusfliegenfallen-" oder auch "Pac-Man-Proteinfamilie" [79]. Diese Konformationsänderung ist in Abbildung 7 am Beispiel des in dieser Arbeit verwendeten Lysin- / Arginin- / Ornithin-Bindeproteins dargestellt.

Anhand der Anordnung der β -Stränge in den Domänen lässt sich die Familie der periplasmatischen Bindeproteine in drei Typen unterteilen. Die Charakterisierung in Typ I und II wurde von Fukami-Kobayashi *et al.* 1999 etabliert [81] und im gleichen Jahr von Lee *et al.* um Typ III am Beispiel des Bindeproteins TroA ergänzt [82]. Für **Typ I** ist die Anordnung $\beta_2\beta_1\beta_3\beta_4\beta_5$ typisch, während die Anordnung $\beta_2\beta_1\beta_3\beta_n\beta_4$ für **Typ II** charakteristisch ist. Als β_n wird dabei der erste Strang bezeichnet, der nach der Verbindung der N-terminalen Domäne zur C-terminalen Domäne lokalisiert ist und umgekehrt [81]. In **Typ III** verbindet eine α -Helix als Linker die beiden α/β -

Domänen. In einer neuen Klassifizierung von Berntsson et al. wurden die Bindeproteine durch einen Strukturvergleich in insgesamt 6 Cluster unterteilt, was vor allem aufgrund ihrer Struktureigenschaften, aber auch nach ihren Liganden und ihrer Interaktion mit ABC-Transportern geschah [83]. Bei der Auswahl von nur einigen Beispielen der so klassifizierten Bindeproteine anhand der charakteristischen Merkmale jeder Gruppe wird die große Vielfalt der Bindeproteine deutlich: Cluster A besteht ausschließlich aus Typ III Bindeproteinen, die direkt oder indirekt Metallionen binden (z.B. Zink [84,85], Mangan [86], Eisen [87]), Cluster B enthält nur Typ I Bindeproteine mit Termini an jeweils einer der beiden Domänen, die vor allem Saccharide, aber auch verzweigtkettige Aminosäuren oder Peptide erkennen (z.B. Maltose [88,89], Ribose [90,91], L-Leucin [92–94], Peptide [95,96]). Cluster C, D, E und F bestehen aus Typ II-Bindeproteinen, die aufgrund ihrer Länge oder Art der Gelenkregion in die verschiedenen Cluster eingeteilt wurden. So befinden sich in Cluster C sehr große Bindeproteine (55 bis 70 kDa), die z.B. zu Oligopeptiden [97], Arginin [98], Ni-Ionen [99] oder Cellobiose [100] Affinität zeigen. Auch die Cluster D, E und F zeigen ein vielfältiges Ligandenspektrum, z.B. für Eisenionen [101,102], Oligosaccharide [103], Putrescin [104,105], Phosphate [106,107], Ketosäuren [108], Pyroglutaminsäure [109], Aminosäuren wie Lysin [110,111], Glutamin [112,113], Glutamat [114,115], Methionin [116], Glycin [117], Aspatat [118] oder Dipeptide [119]. Besonders hervorzuheben ist hierbei Cluster F, dem das für diese Arbeit ausgewählte Lysin- / Arginin- / Ornithin-Bindeprotein zugeordnet wurde [111]. Ein besonderes Merkmal dieses Clusters ist die mit 8-10 Aminosäuren lange Gelenkregion.

5.1 Lysin- / Arginin- / Ornithin-Bindeprotein

Das in dieser Arbeit verwendete Lysin- / Arginin- / Ornithin-Bindeprotein (LAO-BP) aus *E. coli* ist homolog zum LAO-BP aus *Salmonella typhimurium*, welches Teil einer periplasmatischen Permease ist [120]. Dieser Transportkomplex besteht aus zwei hydrophoben Proteinen (HisQ und HisM) und zwei Kopien eines hydrophilen ATP-bindenden Proteins HisP [121,122], an das sowohl das Histidin-Bindeprotein (HisJ, [123]), als auch das LAO-BP binden kann [120]. Die Gensequenz des LAO-BP aus *S. typhimurium* wurde 1981 [124] und die erste Reinigung des Proteins 1992

beschrieben [122]. In dieser Veröffentlichung wurden auch Dissoziationskonstanten des LAO-BP für Arginin (14 nM), Lysin (15 nM) und Histidin (500 nM) bestimmt (in 10 mM NaPi, pH 7,0 bei 4 °C, durch Gleichgewichtsdialyse). 1993 wurde dann die Kristallstruktur mit und ohne Lysin als Ligand bestimmt [125] (Abbildung 7). Die beiden Strukturen zeigen die ausgeprägte Konformationsänderung zwischen der offenen und der geschlossenen Konformation. Diese lässt sich für die Konstruktion eines FRET-Sensors nutzen, vorausgesetzt die Konformationsänderung äußert sich ebenfalls in einer entsprechenden Änderung der Position des N- und C-Terminus des zentralen Bindeproteins. Anhand der Struktur in Abbildung 7 sieht man aber, dass die Termini nur auf der Seite einer Domäne liegen, was genau diese Übersetzung des Bindeereignisses in ein FRET-Signal erschweren könnte.



Abbildung 7: LAO-BP aus *S. typhimurium* in offener (oben, pdb-Code: 2LAO) und geschlossener (unten, pdb-Code: 1LST) Konformation mit Lysin als Ligand.

Der Aufbau der Bindetasche des LAO-BP mit verschiedenen Liganden wurde von Oh *et al.* 1994 mittels Kristallstrukturanalyse untersucht [111]. In den Strukturen zeigten sich Wechselwirkungen der Seitenketten von Lysin oder Arginin über die Aminogruppen in der Seitenkette (Abbildung 8). So kann z.B. Ser₆₉ mit einer Hydroxygruppe über ein Wassermolekül mit Lysin eine Wasserstoffbrücke eingehen, Arginin kann zum gleichen Rest zwei Wasserstoffbrücken ausbilden: Eine über eine der beiden primären Aminogruppen und eine über das sekundäre Amin der Guanidinoseitenkette. So kann das Arginin über die Hydroxygruppe und über die Carbonylgruppe des Serins in der Bindetasche stabilisiert werden. Auch das Asp₁₁ kann so direkt mit dem Liganden wechselwirken.



Abbildung 8: Wechselwirkung von Lysin (links) und Arginin (rechts) mit der Bindetasche des LAO-Bindeproteins (Abbildung aus [111] entnommen).

IV. Motivation und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines genetisch kodierten, FRET-basierten Lysin-Sensors als schnelles Messwerkzeug und dessen Evaluierung als schnelles Messsystem in Zellüberständen, z.B. bei der Entwicklung mikrobieller Produktionsstämme.

Die Entwicklung von mikrobiellen Aminosäureproduzenten ist seit vielen Jahren ein Schwerpunkt der Arbeiten des IBG-1. Dabei dient Corynebacterium glutamicum als Standardorganismus [126,127]. C. glutamicum ist von großer industrieller Bedeutung und wird z.B. für die Herstellung von Glutamat oder Lysin verwendet (Produktionsvolumen Glutamat (2009): 2,2 Millionen Tonnen, Produktionsvolumen Lysin (2011): 1,5 Millionen Tonnen, [128]). Die Stammentwicklung erfolgt heutzutage im Hochdurchsatz in Mikrokultivierungseinheiten (BioLector®-System), die eine rasche Durchmusterung verschiedener Stammvarianten und Kultivierungsbedingungen ermöglichen (Abbildung 9). Der BioLector® verfügt über optische Sensoren, so genannte Optoden, die den Sauerstoffgehalt und den pH-Wert des Mediums kontinuierlich verfolgbar machen [129,130]. Die eigentliche Zielgröße, die Konzentration der Zielaminosäure im Kulturüberstand, kann bisher nicht online verfolgt werden. Dies erfolgt mittels instrumenteller Analytik (HPLC), die nicht parallelisierbar und daher sehr zeitaufwendig ist. Alternativ wird der kolorimetrische Ninhydrintest eingesetzt, der zwar schnell und parallelisierbar durchführbar ist, jedoch auf alle primären Amine anspricht. Eine schnelle parallelisierbare Produktspezifische Analytik ist daher für solche Arbeiten dringend gewünscht. In diesem Kontext sollten ausgewählte Lysinsensoren, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurden, als alternatives analytisches Konzept für die Anwendung im BioLector® oder anderen Mikroreaktoren [131] evaluiert werden.



Abbildung 9: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendete Offline- und Online-Analytik bei der Beobachtung von Kulturüberständen von Lysin-produzierenden Zellen.

Zu diesem Zweck sollte ein Prototyp-Biosensor zur Bestimmung von Lysin, basierend auf dem periplasmatischen Bindeprotein für Lysin, Arginin und Ornithin (LAO-PBP) aus *E. coli* [67,132] entwickelt werden. Für den Einsatz der Sensoren in der quantitativen Metabolitanalytik war es wichtig, dass die neuen Sensoren eine hohe Sensitivität ($\Delta R > 0,2$), eine variable Affinität (für diverse Anwendungen) und einen breiten dynamischen Bereich (zum Nachweis von µM bis mM Konzentrationen) aufwiesen (Abbildung 6c). Nach der Charakterisierung des ersten Prototypen sollte daher ein modulares System (Toolbox) von Biosensoren aufgebaut werden, in dem die einzelnen Teile des Sensors (Bindeprotein, Fluoreszenzproteine, Linker) auf molekularbiologischer Ebene in einfacher Weise austauschbar sind.

Anschließend sollten die verschiedenen Sensorderivate charakterisiert werden, um generelle Effekte z.B. für die gezielte Veränderung der Sensitivität oder der Empfindlichkeit ableiten zu können. Aus der so erzeugten Toolbox sollte anschließend ein Sensor für die Evaluierung im BioLector® ausgewählt werden. In diesem Zusammenhang sollte auch geprüft werden, ob der Sensor für diesen Zweck nach der Produktion in *E. coli* gereinigt werden muss oder ob auch ganze Sensor-tragende *E. coli*-Zellen für die Analytik geeignet sind. Letzteres würde eine einfache und kostengünstige Immobilisierung der Biosensoren darstellen; außerdem würden sie so durch die Zellmembran vor äußeren Einflüssen geschützt.

V. Material und Methoden

1. Material

1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien, Lösungen und Präparationskits.

Chemikalien					
Bezeichnung	Summenformel	Molekular- gewicht (g/mol)	Hersteller	Artikel- nummer	
3-N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	C7H15NO₄S	209,27	Roth	6979.4	
Acetonitril	C_2H_3N	41,05	Biosolve	012078	
D,L-α-Aminobuttersäure	$C_4O_2H_9N$	103,12	Sigma-Aldrich	162663	
Agar-Agar	-	-	Merck	101614	
Agarose	-	-	Merck	101236	
Alanin-Alanin-Dipeptid	$C_6H_{12}N_2O_3$	160,17	Bachem	4004429	
Ammoniumchlorid	NH₄CI	53,49	Merck	101142	
Ammoniumsulfat	$(NH_4)_2SO_4$	132,14	Fluka	09978	
Ampicillin-Natriumsalz	C ₁₆ H ₁₈ N ₃ NaO ₄ S	371,39	Roth	K029.2	
Arginin-Alanin-Dipeptid	$C_9H_{19}N_5O_3$	245,28	Bachem	4017629	
Biotin	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	244,32	Merck	851209	
Borsäure	H₃BO₃	61,83	Merck	100162	
Cadaverin Dihydrochlorid	C₅H ₁₄ N₂ · 2 HCI	175,1	Sigma-Aldrich	33220	
Calciumchlorid	CaCl ₂	110,99	Roth	CN93.1	
Calciumchlorid-Dihydrat	$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	147,02	Merck	102391	
Coomassie Brilliant Blue G-250, reinst	C ₄₇ H ₄₈ N ₃ NaO ₇ S ₂ (Na-Salz)	854,02	Serva	42655	
D(+)-Glukose-Monohydrat	$C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$	198,17	Merck	108342	
Di-Kaliumhydrogenphosphat	K ₂ HPO ₄	174,18	Merck	105101	
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	177,99	Merck	137036	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	C₂H₀OS	78,13	Roth	67-68-5	
Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat	FeSO₄	278,02	Merck	103963	
Essigsäure	CH ₃ COOH	60,05	Merck	100063	
Ethanol	C ₂ H ₅ OH	46,07	Roth	T171.3	
Ethidiumbromid	$C_{21}H_{20}BrN_3$	394,32	Merck	111608	
Ethylendiamintetraessigsäure- Natriumsalz (EDTA-Na ₂ -Salz)	C ₁₀ H ₁ 4N ₂ Na ₂ O ₈ · 2 H ₂ O	372,3	Serva	11280	
Glycerin	C ₃ H ₈ O ₃	92,1	Roth	3783.1	
Harnstoff	CH ₄ N ₂ O	60,06	Sigma-Aldrich	U5378	
Hefeextrakt	-	-	Roth	2363.2	
Imidazol	$C_3H_4N_2$	68,08	Sigma-Aldrich	56750	
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	136,08	Merck	104871	
Kanamycinsulfat	C ₁₈ H ₃₆ N₄O ₁₁ ∙ H₂SO₄	582,58	Roth	T832.2	
Kobalt(II)-chlorid-Hexahydrat	$CoCl_2 \cdot 6 H_2O$	237,93	Merck	102539	
Kresolrot	$C_{21}H_{18}O_5S$	382,43	Fluka	32653	

Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	249,68	Merck		102790	
Kupfer(II)-chlorid-Dihydrat	$CuCl_2 \cdot 2 H_2O$	170,48	Merck		102733	
Laktose-Monohydrat	$C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$	360,32	Merck		107660	
L-Arginin	$C_6H_{14}N_4O_2$	174,20	Fluka		11009	
Histidin	$C_6H_9N_3O_2$	155,46	Sigma-	Aldrich	H7750	
L -Lysyl-L-Alanin	$C_9H_{19}N_3O_3$	217,27	Bachen	า	4001389	
L-Lysin-Monohydrochlorid	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ · HCl	182,65	Merck		105700	
Magermilchpulver (skim milk powder)	-	-	Merck		115363	
Magnesiumchlorid-Hexahvdrat	MaCl ₂ · 6 H ₂ O	203.31	Fluka		63064	
Magnesium(II)-sulfat-Heptahydrat	MaSO₄ · 7 H₂O	246.48	Fluka		63140	
Magnetische Beads EcoMag ^{1M} His-Ni	-	-	Bioclon	е	MHN-106	
Methanol	CH₃OH	32.04	Biosolv	e	136805	
Mangan(II)-chlorid-Tetrahvdrat	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	179.91	Sigma-	Aldrich	221279	
Mangan(II)-sulfat	MnSO₄ · 1 H₂O	169.02	Merck		105999	
Natriumchlorid	NaCl	58.44	Roth		3957.2	
Natriumhydroxid	NaOH	40	Merck		106498	
Nickel(II)-chlorid-Hexabydrat	NiCla · 6 HaO	237 7	Merck		106717	
Nickel Hisl ink ^{IM} Protein Purification		201,1	MOTOR		100717	
Resin	-	-	Promeg	ja	V882A	
Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)	-	-	Qiagen		30430	
Ninhvdrin	C₀H₅O₄	178.15	Merck		106762	
ortho-Phosphorsäure, p.a., 85 %	H₂PO₄	98.00	Merck		100573	
Protocatechusäure						
(3.4-Dihvdroxvbenzoesäure)	$C_7H_6O_4$	154,12	Fluka		37528	
Salzsäure	HCI	36,46	Roth		K025.1	
Sephadex G-25 Medium	-	-	GE Healthcare Life Sciences		17-0033	
Tetrahydrofuran	C₄H ₈ O	72,11	Sigma-	Aldrich	401757	
Thiaminhydrochlorid	C ₁₂ H ₁₇ CIN ₄ OS ·	337,27	Sigma-/	Aldrich	47858	
Tris(hydroxymethyl)aminomethan		121 14	Merck		108382	
		121,14	Merck		822184	
Trypton	-	-	Roth		8952.2	
Zink(II)-sulfat-Hentahydrat		287 54	Merck		108883	
	ZnO04 7 1120	136.20	Merck		108816	
	Standard und F				100010	
Nauniche Standard- und Puffenosungen						
Bezeichnung		Hersteller Artike		lnummer		
6x MassRuler™ Loading Dye Solution		Fermentas R0621				
GelPilot [®] Loading Dye, 5x		Qiagen	Qiagen 10374650		0	
GeneRuler® 1 kb Plus		Thermo Scie	Thermo Scientific SM 0313			
PageRuler™ Plus Prestained Protein La	adder (10-250 kDa)	Thermo Scie	Thermo Scientific 26619			
Phthalatdialdehyd Reagenz		Sigma-Aldrich P0532				
Pufferlösung pH 4,00 ± 0,02		Roth	Roth A517.2			
Pufferlösung pH 7,00 ± 0,02		Roth	Roth P713.2			
Pufferlösung pH 9,00 ± 0,02	Roth	Roth P714.1				
	Verwendete K	lits				
Bezeichnung	Herste	Hersteller Artikelr		elnummer		
Gelextraktionskit (Zvmoclean™ Gel DN	Zymoclean	Zymoclean D4002				
Ligationskit (Rapid DNA Dephos & Ligat	Roche 04 898 12		25 001			
Plasmidpräparationskit (QIAprep® Spin	Qiagen	Qiagen 27106				
Plasmidpräparationskit (GeneJET Plasm	nid Miniprep Kit	Thermo Scie	entific	K0502		
Phusion High Fidelity DNA Polymerase	New Englan Biolabs	New England Biolabs M0539L				
Protease-Inhibitor (cOmplete ULTRA. E	DTA-frei)	Roche	Roche 05 892 791 001		91 001	

Kits und Lösungen für SDS-PAGE					
Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer			
NuPAGE® Antioxidant		Life Technologies	NP0005		
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)		Life Technologies	NP0008		
NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20X)		Life Technologies	NP0002		
NuPAGE® Sample Reducing Agent (10X)		Life Technologies	NP0009		
SDS-PAGE-Gele (NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Gele 1	,0 mm)	Life Technologies	NP0321BOX		
SimplyBlue™ SafeStain		Life Technologies	LC6065		
Substanzen fü	r Weste	ern-Blot			
Bezeichnung		Hersteller	Artikelnummer		
Entwicklerlösung für Western-Blot: Amersham. ECL Advance		GE Healthcare	RPN2135		
Anti-GFP-Antikörper aus Kaninchen		Pineda Antikörper- Service			
Anti-His-HRP-Antikörper, polyclonal, N-&C-terminal		Roth	3894.1		
Kits zur Kristallisation					
Bezeichnung (Kurzname)		Hersteller	Artikelnummer		
AmSO ₄	Qiagen		130705		
Crystal I/II	Hampto	on	HR2-110, HR-112		
PEG/Low Ion	Hampto	on	HR2-126		
Wizard I/II	Molecu	lardimensions.com	MD15-C12-B		
PGA/LM-Screen Molecu		lardimensions.com	MD1-50		
Cations Qiagen			130708		
Anions Qiagen			130707		
PEG-Suite I Qiagen			130704		
PEG-Suite II Qiagen			130716		
JCSG I	Qiagen		130924		
JCSG II	Qiagen		130925		
JCSG III	Qiagen		130926		
JCSG IV Qiagen			130927		

1.2 Geräte

Tabelle 2: Geräte und sonstiges Material. Alle nicht hier aufgelisteten Kleingeräte entsprechen den allgemeinen Laborstandards.

Geräte		
Bezeichnung	Hersteller	Nummer
Fluoreszenzspektrometer Fluorolog-3	Horiba Scientific	FL3-11
Image Reader FAS-3000mini	FujiFilm	LAS-3000mini
MikroCal [™] iTC ₂₀₀ System	GE Healthcare	iTC ₂₀₀
Mikrotiterplatten-Lesegerät (Fluoreszenzspektrometer)	Tecan	M200
Pipettierrobotor Freedom EVO 200	Tecan	EVO 200
RoboLector® XL Kultivierungsplattform	m2p-labs	G-RL-800
UV-VIS-Spektrophotometer	Shimadzu	UV-1601
Material		
Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
Ampliseal Abdeckfolie, transparent	Greiner Bio-One	676040
Crystalquick LP Platte, 99-well, quadratische Wells	Greiner Bio-One	609171
MicroWell™ 96-well Platten (klar, flacher Boden)	Nunc	269620
Protein LoBind Tubes 1,5 mL	Eppendorf	0030108116

1.3 Puffer und Medien

Die Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Medien und Puffer sind in Tabelle 3 aufgelistet. Die Medien wurden vor Gebrauch autoklaviert (121 °C, 20 min, 1,3 bar) oder steril filtriert (Celluloseacetat Sterilfilter, 0,2 µm Porendurchmesser).

		Puffer
Bezeichnung (in Kapitel x verwendet)		Rezept
MOPS-Puffer (2.2.4, 2.3.1, 2.3.2, 2.3.8, 2.3.9, 2.3.10, 2.3.12)	20 mM pH 7,3	MOPS-HCI
20 mM MOPS-Puffer, 300 mM NaCl (2.3.1, 2.3.2)	20 mM 300 mM pH 7,3	MOPS-HCI NaCl
20 mM MOPS-Puffer, 300 mM NaCl, 1 M Imidazol (2.3.1, 2.3.2)	20 mM 300 mM 1 M pH 7,3	MOPS-HCI NaCl Imidazol
MgCl ₂ -CaCl ₂ -Lösung (2.2.1)	80 mM 20 mM	MgCl ₂ CaCl ₂
TAE-Puffer (1x) (2.1.4)	100 mL 4,9 L	50x TAE H ₂ O
TAE-Puffer (50x) (2.1.4)	2 M 50 mM 0,91 M	Tris-HCI EDTA Essigsäure
Ethidiumbromid- Verdünnung (10 µg/mL) (2.1.4)	100 μL 99,9 mL	10 mg/mL Ethidiumbromid-Stammlösung H ₂ O
Ethidiumbromid- Färbelösung (0,25 µg/mL) (2.1.4)	5 mL 195 mL	10 μg/mL Ethidiumbromid-Verdünnung H ₂ O
1x Transferpuffer (2.3.7)	25 mM 0,2 M 20 % Mit H ₂ O ad 500	Tris-HCI Glycerin Methanol (v/v) mL auffüllen
10x TBS (Tris Buffered Saline) (2.3.7)	0,2 M 1,39 M Mit H₂O ad 500 pH mit HCl auf [°]	Tris-HCl NaCl mL auffüllen. 7,6 einstellen, bei Gebrauch 1:10 verdünnen.
1xTBS (2.3.7)	100 mL 900 mL	10 x TBS H ₂ O
Blockier-Lösung = 1 x TBS mit 0,1 % Tween-20 und 5 % (w/v) Magermilchpulver (2.3.7)	7,5 g 150 mL 150 μL	Magermilchpulver 1 x TBS Tween® 20
TBST (2.3.7)	1 x TBS + 0,1 %	6 Tween® 20
HPLC-Puffer A (2.3.14)	26 mM 25 mM 0,08 % (v/v)	NaH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ THF
HPLC-Puffer B (2.3.14)	45 % (v/v) 50 % (v/v) 5 % (v/v)	Acetonitril Methanol H ₂ O

Tabelle 3: Verwendete Medien und Puffer.

		Medien
	795 mL	AIM-Medienkomponente
	90 mL	1 M KPi-Puffer, pH 7,0
Autoinduktionsmedium	10 mL	Glukose (50 g/l)
[133] (2.2.3)	100 mL	Laktose (20 g/l)
	5 mL	Glycerin (99%)
	Nach Autoklavi	eren zusammengeben
	12 g	Trypton
AIM-Medienkomponente	24 g	Hefeextrakt
(2.2.3)	mit H ₂ O ad 795	mL auffüllen
	Autokiavieren	
	01,81 g/L	
1 M KPi-Puffer (2.2.3)	95,06 g/L	$K_2 HPO_4 (0, 55 M)$
	pH /	
		1.1 facho COVII Modionkomponento (outokloviert)
	900 ML	
	1,111∟	(autoklaviart, az, 00 mM)
	1.1 ml	(autokiavient, ca. 90 mivi)
1 1 fachos CCXII Modium	1,111∟	250 g/L MgSO ₄ $77 \text{ H}_2\text{O}$ -Stocklosung
[134] (2.2.3)	55 ml oder	(autoklaviert, ca. 1,01 ivi) 200 a/L Glukoselösung (autoklaviert ca. 1 11 M)
[134] (2.2.3)	220 ml	/für 10 oder 40 g/L)
	1 1 ml	200 ma/L Biotinlösung (steril filtriert ca. 0.82 mM)
	2.2 ml	15 g/L Protocatechusäurelösung (steril filtriert ca. 97 mM)
	1 1 ml	CGXII-Sourenelementlösung (steril filtriert)
	22 a/l	$(NH_4)_2$ SQ4 (ca. 166 mM)
	1 1 a/l	$KH_{2}PO_{4}$ (ca. 8.1 mM)
	1,1 g/L	$K_{2}HPO_{4}$ (ca. 6.3 mM)
1,1-fache CGXII-	5.5 g/l	Harnstoff (ca. 92 mM)
Medienkomponente (2.2.3)	46.2 g/L	MOPS (ca. 221 mM)
	Mit H ₂ O ad 900	mL auffüllen.
	pH mit 4 M NaC	DH auf 7,0 einstellen
	20 g/L	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (ca. 72 mM)
	20 g/L	$MnSO_4 \cdot 1H_2O$ (ca. 118 mM)
CGXII-	2 g/L	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (ca. 7 mM)
Spurenelementlösung	0,626 g/L	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (ca. 2,5 mM)
(2.2.3)	0,04 g/L	$NiCl_2 \cdot 6H_2O$ (ca. 0,17 mM)
	Zum Lösen mit	1 M HCl ansäuern
	Steril filtrieren, I	bei -20 °C lagern
I B-Agar (2.2.2)	LB-Medium mit	15 g/L Agar-Agar
	Autoklavieren	
	10 g/L	Trypton
LB-Medium [135]	5 g/L	Hefeextrakt
(2.1.1, 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3)	10 g/L	NaCl
	Autokiavieren	
M9-Agar (2.2.3, 2.2.4)	N9-Nedium mi	15 g/L Agar-Agar
	Den Agar einze	Autokiavieren und zum fertigen M9-Medium geben
	500 ML	1 M MaSO Libourg (autoklaviert)
	0.1 ml	1 M CaCL Lösung (autoklaviert)
	0,1 mL	$0.01 \text{ M} \text{ Eq} \Omega_{-1}$ is und (staril filtriert)
M9-Medium	1 ml	1 a/l Thiaminlösung (steril filtriert)
[136]	1 ml	1 a/L Biotinlösuna (steril filtriert)
(2,2,3,2,2,4)	10 ml	100 x Spurenelementlösung (steril filtriert)
	10 ml	20% (w/v) Glukose (autoklaviert)
	10 mL	20 % (w/v) Laktose (autoklaviert)
	1 mL	100 mg/mL Ampicillin (steril filtriert)
	Mit H ₂ O ad 1 L	auffüllen
	25,6 g/L	Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O (ca. 100 mM)
--	---------------------	--
Zweifache Stocklösung M9-	6 g/L	KH ₂ PO ₄ (ca. 44 mM)
	1 g/L	NaCl (ca. 17 mM)
Medium (2.2.3, 2.2.4)	2 g/L	NH₄CI (ca. 37 mM)
	pH 7	
	Autoklavieren	
	84 mg/L	ZnCl ₂ (ca. 0,62 mM)
100x Spurenelementlösung M9-Medium (2.2.3, 2.2.4)	13 mg/L	CuCl ₂ · 2 H ₂ O (ca. 76 μM)
	10 mg/L	$CoCl_2 \cdot 6 H_2O$ (ca. 42 μ M)
	10 mg/L	H ₃ BO ₃ (ca. 0,16 mM)
	1,6 mg/L	MnCl ₂ · 6 H ₂ O (ca. 7,5 μM)
	pH 7,5	
	Steril filtrieren u	und unter Lichtausschluss lagern

1.4 Expressionssysteme

Die molekularbiologischen Arbeiten, sowie die Produktion der Sensorkonstrukte wurde in den beiden *E. coli*-Stämmen DH5α und BL21 (DE3)-Gold durchgeführt (Tabelle 4). Zusätzlich dazu wurden *C. glutamicum*-Stämme als Referenzstämme und als Lysin-Produzenten verwendet.

Zur Herstellung von lysinarmen Referenzlösungen (Kulturüberstand) wurde der Bielefelder Wildtyp-Stamm verwendet ([127], erstmals sequenziert: [137]). Eine lysinproduzierende *C. glutamicum* Variante ist der Lysinproduzent DM1933, der von Blombach *et al.* konstruiert wurde [126]. Diese Variante wurde für Versuche verwendet, in denen die Produktion von Lysin untersucht werden sollte.

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5α	$F^- \phi 80$ /acZ $\Delta M15 \Delta$ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r_k^-	[138]
	${ m m}^+_{ m k}$) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ^-	
E. coli BL21(DE3)	$F^{\text{-}}$ ompT hsdS_B(r_B^{\text{-}}\ m_B^{\text{-}}) gal dcm (λ lts857ind1 Sam7 nin5 lacUV5-	[139]
	T7 gene1)	
C. glutamicum Wildtyp	WT strain ATCC 13032, biotin-auxotrophic	[127]
C. glutamicum DM1933	pck pyc(P458S) hom(V59A), 2 Kopien lysC(T311I), 2 Kopien asd,	[126]
	2 Kopien dapA, 2 Kopien dapB, 2 Kopien ddh, 2 Kopien lysA,	
	2 Kopien <i>lysE</i> erhalten vom WT <i>C. glutamicum</i>	

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme und deren Genotypen.

1.5 Plasmide und Sensorkonstrukte

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurden auch im Rahmen dieser Arbeit erzeugt. Zur Klonierung der ersten Konstrukte wurden bereits vorhandene Plasmide genutzt. So wurde der in der Arbeit von Moussa [75] näher untersuchte Glukosesensor als Ausgangkonstrukt für das Vektorrückgrat pRSET (Invitrogen, V351-20) und das gelbe Fluoreszenzprotein Citrine verwendet (MP18.1.1, [75]). Aufgrund dieser Vorlage wurden auch die ersten sechs Aminosäuren des Citrines deletiert. Dies erzielte im Glukosesensor eine Erhöhung der Sensitivität. Die Vektorkarten sowie die Liste der Aminosäuresequenzen sind im Anhang zu finden.

Da das Vektorrückgrat pRSET verwendet wurde, befand sich vor den Sensorgenen der T7-Promotor. Die T7-Polymerase, die zur Transkription der Sensorgene benötigt wurde, ist auf den bakteriellen Chromosomen vorhanden, die den Zusatz (DE3) im Namen tragen. In dieser Arbeit wurde für Produktionszwecke daher der Stamm *E. coli* BL21 (DE3) verwendet. Das Gen der T7-Polymerase steht unter der Kontrolle des Lac-Operons, das durch Laktose oder IPTG im Medium die Produktion der T7-Polymerase induziert; mit dieser können dann die Zielgene transkribiert werden. Wenn sich allerdings Glukose im Medium befindet, so wird das Lac-Operon reprimiert, sodass keine T7-Polymerase produziert wird. Da die T7-Promotor-sequenzen sich stark von den *E. coli*-eigenen Promotorsequenzen unterscheiden, wird bei Lac-Operon Repression das Sensorgen nicht durch *E. coli*-eigene Polymerasen transkribiert [140].

Zur Kontrolle der Sequenzen wurden die Plasmide nach jedem Klonierungsschritt bei LGC Genomics sequenziert.

Tabelle 5: Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit erzeugten und verwendeten Plasmide und Sensorkonstrukte. Die synthetisch hergestellten und bei GeneArt® (life technologies) bestellten Konstrukte sind mit (synth.) gekennzeichnet. Der flexible Linker kodierte für die Aminosäuresequenz (GGS)₄, während der starre Linker für die Aminosäuresequenz KLYPYDVPDYA kodierte.

Plasmidname	Proteinkonstrukt	Kurzname	Antibiotika- resistenz	Plasmid- rückgrat
MP27.0	His-Tag-permutiertes Bindeprotein	0-perm-0	Amp	pRSET
MP27.0.01	His-Tag-permutiertes Bindeprotein-flexibler Linker	0-perm-f	Amp	pRSET

MP27.0.02	His-Tag-permutiertes Bindeprotein-starrer Linker	0-perm-s	Amp	pRSET
MP27.0.10	His-Tag-flexibler Linker- permutiertes Bindeprotein	f-perm-0	Amp	pRSET
MP27.0.11	His-Tag-flexibler Linker- permutiertes Bindeprotein- flexibler Linker	f-perm-f	Amp	pRSET
MP27.0.12	His-Tag-flexibler Linker- permutiertes Bindeprotein-starrer Linker	f-perm-s	Amp	pRSET
MP27.0.20	His-Tag-starrer Linker- permutiertes Bindeprotein	s-perm-0	Amp	pRSET
MP27.0.21	His-Tag- starrer Linker- permutiertes Bindeprotein- flexibler Linker	s-perm-f	Amp	pRSET
MP27.0.22	His-Tag- starrer Linker- permutiertes Bindeprotein-starrer Linker	s-perm-s	Amp	pRSET
MP27.1.1a	ECFP-permutiertes Bindeprotein- His-Tag (synth.)		Km	pMK-RQ
MP27.2	His-Tag-ECFP-permutiertes Bindeprotein-Citrine(ΔAA1-6)	0-perm-0- Sensor	Amp	pRSET
MP27.2.01	His-Tag-ECFP-permutiertes Bindeprotein-flexibler Linker- Citrine(ΔAA1-6)	0-perm-f- Sensor	Amp	pRSET
MP27.2.02	His-Tag-ECFP-permutiertes Bindeprotein-starrer Linker- Citrine(ΔAA1-6)	0-perm-s- Sensor	Amp	pRSET
MP27.2.10	His-Tag-ECFP- flexibler Linker- permutiertes Bindeprotein- Citrine(ΔAA1-6)	f-perm-0- Sensor	Amp	pRSET
MP27.2.11	His-Tag-ECFP-flexibler Linker- permutiertes Bindeprotein- flexibler Linker-Citrine(ΔAA1-6)	f-perm-f- Sensor	Amp	pRSET
MP27.2.12	His-Tag-ECFP- flexibler Linker- permutiertes Bindeprotein-starrer Linker-Citrine(ΔAA1-6)	f-perm-s- Sensor	Amp	pRSET
MP27.2.20	His-Tag-ECFP- starrer Linker- permutiertes Bindeprotein- Citrine(ΔAA1-6)	s-perm-0- Sensor	Amp	pRSET
MP27.2.21	His-Tag-ECFP- starrer Linker- permutiertes Bindeprotein- flexibler Linker-Citrine(ΔAA1-6)	s-perm-f- Sensor	Amp	pRSET
MP27.2.22	His-Tag-ECFP- starrer Linker- permutiertes Bindeprotein-starrer Linker-Citrine(ΔAA1-6)	s-perm-s- Sensor	Amp	pRSET
MP27.6.0	natives Bindeprotein (synth.)		Km	pMK-RQ
MP27.6a	His-Tag-natives Bindeprotein	0-nat-0	Amp	pRSET
MP27.6a.01	His-Tag-natives Bindeprotein- flexibler Linker	0-nat-f	Amp	pRSET

MP27.6a.02	His-Tag-natives Bindeprotein- starrer Linker	0-nat-s	Amp	pRSET
MP27.6a.10	His-Tag-flexibler Linker- natives Bindeprotein	f-nat-0	Amp	pRSET
MP27.6a.11	His-Tag-flexibler Linker-natives Bindeprotein-flexibler Linker	f-nat-f	Amp	pRSET
MP27.6a.12	His-Tag-flexibler Linker-natives Bindeprotein-starrer Linker	f-nat-s	Amp	pRSET
MP27.6a.20	His-Tag-starrer Linker-natives Bindeprotein	s-nat-0	Amp	pRSET
MP27.6a.21	His-Tag- starrer Linker-natives Bindeprotein-flexibler Linker	s-nat-f	Amp	pRSET
MP27.6a.22	His-Tag- starrer Linker-natives Bindeprotein-starrer Linker	s-nat-s	Amp	pRSET
MP27.6.0	His-Tag-ECFP-natives Bindeprotein-Citrine(ΔAA1-6)	0-nat-0- Sensor	Amp	pRSET
MP27.6.01	His-Tag-ECFP-natives Bindeprotein-flexibler Linker- Citrine(ΔAA1-6)	0-nat-f- Sensor	Amp	pRSET
MP27.6.02	His-Tag-ECFP-natives Bindeprotein-starrer Linker- Citrine(ΔAA1-6)	0-nat-s- Sensor	Amp	pRSET
MP27.6.10	His-Tag-ECFP-flexibler Linker- natives Bindeprotein- Citrine(ΔAA1-6)	f-nat-0- Sensor	Amp	pRSET
MP27.6.11	His-Tag-ECFP-flexibler Linker- natives Bindeprotein-flexibler Linker-Citrine(ΔAA1-6)	f-nat-f- Sensor	Amp	pRSET
MP27.6.12	His-Tag-ECFP-flexibler Linker- natives Bindeprotein-starrer Linker-Citrine(ΔAA1-6)	f-nat-s- Sensor	Amp	pRSET
MP27.6.20	His-Tag-ECFP-starrer Linker- natives Bindeprotein- Citrine(ΔAA1-6)	s-nat-0- Sensor	Amp	pRSET
MP27.6.21	His-Tag-ECFP-starrer Linker- natives Bindeprotein-flexibler Linker-Citrine(ΔAA1-6)	s-nat-f- Sensor	Amp	pRSET
MP27.6.22	His-Tag-ECFP-starrer Linker- natives Bindeprotein-starrer Linker-Citrine(ΔAA1-6)	s-nat-s- Sensor	Amp	pRSET
MP29.1	Citrine-His-Tag	Citrine	Km	pRhotHi
MP29.4	His-Tag-ECFP	ECFP	Amp	pET-Duet

2. Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Plasmidpräparation

Plasmide wurden aus einer frisch transformierten Übernacht-Kultur in LB-Medium präpariert. Dazu wurden 4 mL Bakterienlösung (*E. coli* DH5α) verwendet, die nach Herstellerangaben mit dem DNA-Präparationskit QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen präpariert wurden. Die isolierte Plasmid-DNA wurde im Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) bei -20°C gelagert.

Wenn besonders hohe Plasmidkonzentrationen gewünscht wurden (über 200 ng/µL) und zur Präparation des Citrine-Konstrukts (MP29.1), wurde ein verändertes Plasmidpräparationsprotokoll verwendet. Dabei wurden alle Zentrifugationsschritte, die beim Binden oder Waschen der Plasmide auf der Mini-Säule durchgeführt wurden, bei verringerter Geschwindigkeit durchgeführt (5.000 rpm, 2 min). Zusätzlich dazu wurde ein zweiter Trocknungsschritt nach dem letzten Waschen mit Ethanolhaltigem Puffer durchgeführt. Die Ansätze wurden mit offenem Deckel für 5 min bei 37 °C inkubiert, bevor der Elutionspuffer (50 µL) auf die Säulen gegeben wurde und ebenfalls bei 37 °C statt bei Raumtemperatur für 1 min inkubiert wurde.

2.1.2 Polymerasekettenreaktion

Zur *in vitro*-Herstellung von DNA-Fragmenten wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet [141]. Die am häufigsten in dieser Arbeit verwendete PCR-Methode war die Overlap-Extension-PCR, in der 12-15 Basenpaare der Primersequenzen nicht an die zu amplifizierenden DNA-Fragmente banden, sondern neu eingeführt wurden. So konnten die PCR-Fragmente anschließend zur "ligasefreien Klonierung" (2.1.8) verwendet werden. Aber auch zur Herstellung von DNA-Sequenzen, an die Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen angefügt werden sollten, wurde diese Methode verwendet.

Die für die PCR verwendeten Komponenten wurden in Tabelle 6 aufgelistet. Das Temperaturprotokoll ist in Tabelle 7 dargestellt.

Volumen	Substanz
1 µL	Plasmid (mind. 100 ng/µL)
2 * 1 µL	Primer (2,5 pmol/µL)
4 µL	Phusion HF Buffer (5x)
0,4 μL	DMSO
0,4 μL	dNTPs (10 mM/dNTP)
0,2 μL	Phusion High Fidelity DNA-Polymerase
12 µL	ddH ₂ O (steril)

Tabelle 6: Volumina eines einfachen PCR-Ansatzes.

Tabelle 7: Temperaturprofil der PCR.

Schritt	Temperatur	Dauer	
Initial-Denaturierung	98 °C	30 s	-
Denaturierung	98 °C	10 s	
Annealing	70 °C	30 s	30 x
Elongation	72 °C	30 s	
Final-Elongation	72 °C	10 min	
Pause	15 °C		-

2.1.3 DNA-Restriktion

Die Restriktion von DNA durch Restriktionsenzyme wurde zum Nachweis von erfolgreichen Klonierungen und zur Klonierung, speziell zur Herstellung der Sensorplasmide ohne Linkersequenzen (MP27.2, MP27.6a und MP27.6, Tabelle 5), durchgeführt.

Der Ansatz bestand jeweils aus 1 μ l Enzymlösung (Fermentas Fast Digest[®]), 2 μ l Green FD Buffer und 17 μ l Plasmid-DNA (ca. 100 ng/ μ L). Die Restriktion erfolgte durch einstündige Inkubation bei 37 °C.

2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Dazu wurde vernetzte Agarose als Molekularsieb verwendet. Nach Auftragen der DNA-Proben in das Gel wurde eine Spannung angelegt, sodass die negativ geladenen DNA-Fragmente zur Anode wandern. Die Laufgeschwindigkeit durch das Agarosegel ist abhängig von der Größe der DNA-Fragmente. Es wurden sowohl analytische als auch präparative Gelelektrophoresen durchgeführt. Diese unterschieden sich in der Dicke der verwendeten Gele, da bei präparativen Ansätzen größere Probenvolumina eingesetzt wurden.

Zur Herstellung der Agarosegele wurden 1 % Agarose in TAE-Puffer (w/v) unter Hitzeeinwirkung gelöst und in einen Gelschlitten zur Polymerisation gegeben. Nach Aushärten und Abkühlen des Gels wurde es in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gegeben. Bevor die DNA auf das Gel aufgetragen wurde, wurde sie, je nach Probe, entweder 5:1 oder 4:1 mit Ladepuffer versetzt (6x MassRuler™ Loading Dye Solution oder GelPilot® Loading Dye, 5x). Bei Auftrennung der Restriktionsansätze (Kapitel 2.1.3) wurde kein weiterer Ladepuffer hinzugefügt, da der grüne FD-Puffer diese Funktion bereits erfüllt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100, bzw. 120 V 40 bis 90 min, je nach Größe der zu trennenden Fragmente und Dicke des Agarosegels. Anschließend wurden die Gele 5 min in einem Ethidiumbromid-Färbebad (0,25 µg/mL, Tabelle 3) gefärbt, 5 min in Wasser entfärbt und dann bei 254 nm analysiert.

2.1.5 Gel-Elution

Zur Elution von DNA aus einem Agarose-Gel wurde das Gel-Stück, welches die DNA enthält, ausgeschnitten und mit dem Zymoclean[™] Gel DNA Recovery Kit gemäß des Protokolls des Herstellers isoliert.

2.1.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA-Proben wurde mit einem Mikro-Volumen-Spektrophometer (Nanodrop) bestimmt. Dazu wurde die Absorption bei 260 nm gemessen, aus der die DNA-Konzentration bestimmt werden kann (1 $OD_{260 nm} = 40 \,\mu g/mL$, [142]). Zur Kontrolle der Reinheit der Plasmid-DNA wurde auch das Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm bestimmt. Wenn keine Proteinverunreinigungen in der DNA-Probe vorliegen, sollte die $\frac{260 \, nm}{280 \, nm}$ -ratio bei 1,8 liegen. Zur Messung wurden zunächst 1,5 μ L Elutionspuffer (QIAprep® Spin Miniprep Kit) als Kontrolle eingesetzt, dann wurde die Absorption von 1,5 μ L in Elutionspuffer gelöster Plasmid-DNA bestimmt.

2.1.7 Ligation

Zur Ligation von zwei mit Restriktionsenzymen geschnittenen DNA-Fragmenten wurde das Rapid DNA Dephos & Ligation Kit von Roche verwendet. Die Insert DNA wurde gemäß Herstellerprotokoll im dreifachen molaren Überschuss eingesetzt. Mit den frisch ligierten Plasmiden wurden direkt *E. coli* DH5α-Zellen transformiert und nach der Plasmidpräparation (Kapitel 2.1.1) das Klonierungsergebnis mittels Sequenzierung überprüft (Kapitel 2.1.9).

2.1.8 Ligasefreie Klonierung

Die ligasefreie Klonierung ist eine PCR-basierte Methode zur Substituion von DNA-Fragmenten in Plasmiden ohne den Einsatz von Restriktionsenzymen und Ligasen. Dazu werden durch geschicktes Primerdesign in der PCR überlappende DNA-Stücke amplifiziert, die anschließend durch mindestens 12 Basen Überhang ohne Zugabe von Ligase hybridisiert werden können [143–145].

Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, wurde das Vektorrückgrat zunächst mit Primern verlängert, die einen Überhang generierten, dessen komplementäre Sequenz ebenfalls im Insert vorhanden ist. Auch das einzufügende DNA-Fragment wurde mit entsprechenden Primern verlängert, so dass ein zu den Vektorfragmenten passender Überhang angefügt wurde (vgl. Beschreibung der PCR in Kapitel 2.1.2). Nach der PCR wurden die DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.1.4) aufgetrennt, die Bande aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA isoliert (Kapitel 2.1.5). Die gereinigte DNA-Fragmente wurden dann in einem Ansatz äquimolar vereinigt, hitzedenaturiert und mit folgenden Einstellungen hybridisiert (Abbildung 10.3):

$$\begin{array}{cc} \underline{95^\circC} & 3 \text{ min} \\ 65^\circC & 2 \text{ min} \\ \underline{25^\circC} & 15 \text{ min} \\ 4^\circC & \infty \end{array} \Big\} \ 4x$$

In dieser Annealing-Reaktion konnten sich dann die überhängenden Enden der Fragmente aneinanderlagern und es entstanden Plasmide mit jeweils zwei Einzelstrangbrüchen (*nicks*). Diese konnten nach der Transformation von *E. coli* DH5α-Zellen *in vivo* geschlossen werden (Kapitel 2.2.2).



Abbildung 10: Schema der ligasefreien Klonierung (verändert nach [143]).

2.1.9 Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzierung von DNA-Proben wurden die Proben in Elutionspuffer aus dem Plasmidpräparationskit (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) auf eine Konzentration von 100 ng/µL eingestellt und meist mit zwei Primern sequenziert: Einer der beiden Primer bindet am T7-Promotor (TAATACGACTCACTATAGG), der andere Primer bindet am T7-Terminator (GCTAGTTATTGCTCAGCGG). So konnten die Zielgene sowohl in Leserichtung als auch "rückwärts" sequenziert werden, sodass sich auch

sehr lange Fragmente fast vollständig sequenzieren ließen. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma LGC-Genomics (Berlin, Deutschland).

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Herstellung von chemisch-kompetenten Zellen

Zur Herstellung von chemisch-kompetenten Zellen wurde die Calciumchlorid-Methode von Cohen *et al.* [142,146] verwendet. Diese beruht auf der Erhöhung der Membranpermeabilität nach Zugabe von Calciumchlorid.

Zur Herstellung von kompetenten Zellen wurden zuerst E. coli-Zellen (DH5a oder BL21(DE3)) auf einer Agarplatte ohne Antibiotikum ausgestrichen (Tabelle 3) und über Nacht (16 h) bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 100 mL LB-Medium in einem 1 L-Erlenmeyerkolben ohne Schikanen mit einer Einzelzelle inokuliert und für ca. 3 Stunden bei 37 °C und 120 rpm inkubiert. Der Verlauf der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) wurde während der Kultivierung überwacht. Bei einer OD₆₀₀ > 0,35 wurde die Kultur geerntet. Eine OD₆₀₀ von 0,35 entspricht bei optimalem Wachstum ca. 10⁸ Zellen/mL. Zur Ernte wurde die Kultur in zwei vorgekühlte Falcon-Tubes überführt und 10 min auf Eis inkubiert, um dann zentrifugiert zu werden (4.000 rpm, 10 min, 4 °C). Nach Verwerfen des Überstandes durch Dekantieren wurden die Falcon-Tubes 1 min bei Raumtemperatur mit der Öffnung nach unten gelagert, um restliche Flüssigkeit zu entfernen. Anschließend wurden sie in jeweils 30 mL bei 4 °C vortemperierter MgCl₂-CaCl₂-Lösung durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Dann wurden die Zellen erneut zentrifugiert (4.000 rpm, 10 min, 4 °C) und beide Pellets jeweils in 2 mL bei 4 °C vortemperierter 0,1 M CaCl₂-Lösung durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Diese Zellen konnten direkt zur Transformation eingesetzt werden oder wurden pro 4 mL Suspension mit 140 µL DMSO versetzt und in 200 µL-Aliquots bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Transformation von kompetenten Zellen

Die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen wurde nach Hanahan [138] durchgeführt. Dazu wurden 50 µL Zellen mit 1 µL Plasmid (100 ng) 30 min auf

Eis, 90 s bei 42 °C und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 μ L LB-Medium wurden die Zellen 1 h bei 37 °C und 500 rpm kultiviert und anschließend 100 μ L der Suspension auf einer Antibiotikum-haltigen Agar-Platte ausgestrichen. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend für höchstens eine Woche im Kühlschrank gelagert.

2.2.3 Kultivierung von Zellen

a. Zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA

Zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurden frisch transformierte *E. coli* DH5α-Kulturen über Nacht (16 h) auf einer Agarplatte bei 37 °C inkubiert, um daraus 5 mL LB-Medium pro Plasmidpräparationsansatz inokulieren zu können. Dieser wurde über Nacht (16 h) bei 37 °C und 170 rpm kultiviert. Für die Plasmidpräparation wurden dann 4 mL Kultur durch Zentrifugation (13.000 rpm, 2 min, 20 °C) geerntet.

b. Zur Proteinproduktion in Komplexmedium

Zur Herstellung der FRET-Biosensoren oder von einzelnen Fluoreszenzproteinen wurden Zellen in Autoinduktionsmedium nach Studier kultiviert ([133], Tabelle 3). Dies ist ein Hochzelldichtemedium, das sowohl Glukose als auch Laktose enthält. Dadurch können die Zellen zunächst die Glukose metabolisieren und Biomasse produzieren. In dieser Phase reprimiert die Glukose den Lac-Induktor, sodass die unter der Kontrolle des Lac-Operon stehenden Gene nicht transkribiert werden [147,148]. Nach Metabolisierung der Glukose entfällt deren reprimierende Wirkung, sodass die Laktose die Transkription der unter der Kontrolle des Lac-Operon stehenden Gene induzieren kann.

Zur Kultivierung wurden zunächst chemisch-kompetente *E. coli* BL21(DE3) Zellen mit dem entsprechenden Plasmid transformiert. Nach der Inokulation der Zellen auf einer LB-Agarplatte bei 37 °C für 16 h wurde mit einer Einzelkolonie von dieser Platte 20 mL LB-Medium als Vorkultur inokuliert. Diese wurde nach Inkubation bei 37 °C, 120 rpm für 16 h zur Inokulation der Hauptkultur genutzt. Es wurde 1 mL der Vorkultur für 1 L Hauptkultur verwendet. Die Hauptkultur wurde in 500 mL-Aliquots in 2 L-Erlenmeyerkolben mit zwei Schikanen für 2 h bei 37 °C, 90 rpm kultiviert, um dann 2 Tage bei 20 °C und 90 rpm kultiviert zu werden. Zur Ernte wurden die Zellen

zentrifugiert (8.000 rpm, 40 min, 4 °C) und die Zellpellets bis zur Verwendung (in der Regel bis zur Reinigung der Proteine) bei -20 °C gelagert.

c. Zur Proteinproduktion in M9-Medium

Die in M9-Minimalmedium kultivierten *E. coli* BL21(DE3) Zellen sollten für Ganzzellversuche (Kapitel 2.2.4) verwendet werden. Daher wurde versucht, sie ohne die in Komplexmedium vorhandenen Substrate, wie z.B. Aminosäuren zu produzieren und das M9-Medium verwendet. In diesem Fall wurde das M9-Medium wie das Autoinduktionsmedium mit Glukose und Lactose versetzt (Tabelle 3).

Die Kultivierung wurde, bis auf leichte Abweichungen, analog zur Kultivierung in Autoinduktionsmedium durchgeführt: Die Zellen wurden frisch transformiert auf einer M9-Agarplatte ausgestrichen und die Vorkultur wurde direkt in 20 mL M9-Medium kultiviert. Da die Zellen in M9-Medium als Minimalmedium deutlich geringeres Wachstum zeigten, wurden die Zellen aus der Vorkultur durch Zentrifugation geerntet und die Hauptkulturen in 20 mL M9-Medium mit einer definierten optischen Dichte bei 600 nm von 0,5 inokuliert. Dann wurden die Kulturen je nach Versuchsaufbau 2 h bei 37 °C und 120 rpm inkubiert und dann einen oder zwei Tage bei 20 °C. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (4.000 rpm, 20 min, 4 °C).

d. Zur Herstellung von Lysin-Standards in Kulturüberständen

Um den Lysinsensor für die Lysindetektion in komplexen Systemen wie in Kulturüberständen im Biolector® einsetzen zu können, musste er unter möglichst ähnlichen Umständen kalibriert werden (vgl. Ergebniskapitel 2.4). Dazu wurde der Bielefelder Wildtypstamm von C. glutamicum kultiviert und sein Kulturüberstand mit definierten Lysinkonzentrationen versetzt, um SO den Bedingungen im Kulturüberstand des Produktionsstammes möglichst nahe zu kommen. Die Lysinproduktion des Wildtypstammes bei optimalen Bedingungen ist mit maximalen Lysinkonzentrationen von 1,5 mM deutlich geringer als die des Lysinproduzenten DM1933, der unter optimalen Bedingungen bis zu 40 mM Lysin produzieren kann [149,150], daher kann der Wildtypstamm gut als Kontrolle eingesetzt werden.

Die Zellen wurden in 50 mL 1,1-fachem CGXII-Medium ([134], Tabelle 3) mit 10 oder 40 g/L Glukose in Schüttelkolben kultiviert. Nach 24 h wurden sie durch Zentrifu-

gation geerntet (4.000 g, 20 min, 4 °C), der Kulturüberstand filtriert (Celluloseacetat, Porendurchmesser: 0,22 µm) und das Zellpellet verworfen. Der Kulturüberstand wurde dann mit Lysin versetzt und so Standardreihen mit frischem Medium und mit Kulturüberstand angesetzt.

Dazu wurden sowohl das frische Medium als auch die Kulturüberstände jeweils mit 1,1 M Lysin versetzt, der pH-Wert auf pH 7 mit HCl eingestellt und dann in einer Verdünnungsreihe die Proben 1:1 mit frischem Medium bzw. Kulturüberstand versetzt, sodass 16 verschiedene Lysinkonzentrationen erhalten wurden. Von diesen wurden dann in Dreifachbestimmungen 900 μ L Standard- mit 100 μ L Sensorlösung in 48-Well-Platten versetzt, sodass mit folgenden Lysinkonzentrationen eine Standardbindungsisotherme aufgenommen wurde: 1 M; 500 mM; 250 mM; 125 mM; 62,5 mM; 31,25 mM; 15,63 mM; 7,81 mM; 3,91 mM; 1,95 mM; 977 μ M; 488 μ M; 244 μ M; 122 μ M; 61 μ M; 0 μ M. Die Fluoreszenzemissionen wurden im BioLector®-System bei 30 °C und 1000 rpm mit den Filtern ECFP (Anregung 430 nm, Emission 486 nm) und FRET:ECFP/Citrine (Anregung 430 nm, Emission 532 nm) aufgenommen.

Für die online verwendeten Lysin-Standards (Kapitel 2.2.3e) wurden die Probenzeitpunkte von Vorversuchen abgeleitet und die Kulturüberstände der zu erwartenden OD_{600 nm} entsprechend verdünnt. Wenn die OD_{600 nm} ca. der Hälfte der Gesamt-OD_{600 nm} entsprach, wurde der Kulturüberstand 1:1 mit frischem Medium vermischt und anschließend der pH-Wert dem zu erwartenden pH-Wert angepasst. So sollte die Messumgebung mit allen exportierten Metaboliten möglichst genau imitiert werden.

e. Zur Produktion von Lysin im BioLector®-System

Zur Produktion von Lysin im Biolector®-System wurden die *C. glutamicum* DM1933-Zellen in 1,1-fachem CGXII-Medium ([134], Tabelle 3) im BioLector® kultiviert. Dabei wurden die Kulturen direkt aus einer bei -80 °C gelagerten Vorkultur inokuliert $(OD_{600 nm} = 1)$ und das inokulierte 1,1-fache CGXII-Medium in 1300 µL-Aliquots in die BioLector®-Flowerplate gegeben. Dabei wurde nur eine Hälfte (A1-F4) der Flowerplate inokuliert, die zweite Hälfte der Flowerplate wurde mit 1300 µL-Aliquots der Lysin-Standards (Kapitel 2.2.3d) befüllt. Die Kultivierung wurde bei 30 °C und 1000 rpm durchgeführt. Dabei wurden folgende Parameter kontinuierlich bestimmt: pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck (pO₂), Biomassebildung (Streuung bei 620 nm) und die Fluoreszenzintensität von ECFP (bei 486 nm) und Citrine (bei 532 nm) bei Anregung von ECFP (bei 430 nm).

Bei jedem Probennahmezeitpunkt wurden 400 µL einer Reihe der Kultur abgenommen und zentrifugiert (4.000 rpm, 10 min, RT), dann wurde der Kulturüberstand abgenommen und bis zum Ende der Kultivierung bei 4 °C gelagert. Darauf folgte die Zugabe von 100 µL Sensorlösung (in 20 mM MOPS, pH 7,3, $OD_{515 nm} = 0,4$), die zuvor bei 4 °C gelagert waren, zur Zellsuspension, während weiterhin alle Parameter (s.o.) aufgenommen wurden. Da eine Flowerplate 6 Reihen mit jeweils 8 Vertiefungen enthält, konnte so in einer Platte die Lysinkonzentration an 6 Zeitpunkten untersucht werden (0, 4, 8, 12, 16 und 20 h, Abbildung 11).



Abbildung 11: Plattenlayout der Flowerplate zur Produktion von Lysin im BioLector®-Kultivierungssystem. Zu jedem Probennahmezeitpunkt wurde aus einer Reihe Zellsuspension entnommen, diese bis zum Ende der Kultivierung bei 4 °C gelagert und Sensorlösung zu der entsprechenden Reihe gegeben. Dabei waren in einer Reihe jeweils eine Vierfachbestimmung einer *C. glutamicum*-Kultur und vier Lysinstandards mit 0, 1, 10 und 100 mM Lysin positioniert.

Anschließend wurden die zellfreien Kulturüberstände bei -20 °C gelagert, bis die Kulturüberstände auf ihren Lysingehalt überprüft wurden. Für die Lysinanalytik wurde ein kolorimetrischer Test (Ninhydrin-Farbreaktion) und instrumentelle Analytik (HPLC) durchgeführt. Zur Bestimmung der Lysinkonzentration mit dem Biosensor wurde der Quotient der Fluoreszenzintensitäten (FRET-ratio, vgl. Einleitungskapitel 4.1) von ECFP und Citrine gebildet und mit den zuvor aufgenommenen Standardreihen (vgl. Kapitel 2.2.3d) verglichen:

$$FRET - ratio = \frac{Citrine(Signal - Hintergrundsignal)}{ECFP(Signal - Hintergrundsignal)}$$
(3)

2.2.4 Lysinbestimmung mit Sensor-exprimierenden E. coli Zellen

Zum Einsatz von ganzen E. coli-BL21 (DE3)-Sensorzellen wurden die Zellen in M9-Medium kultiviert und durch Zentrifugation geerntet. Die erhaltenen Zellpellets wurden dann mit MOPS-Puffer (20 mM, pH 7,3) gewaschen, um noch vorhandene Medienkomponenten im Zellüberstand zu entfernen. Dafür wurden die Zellen aus 25 mL Bakteriensuspension in einem 50 mL-Falcontube in 30 mL MOPS-Puffer resuspendiert und anschließend durch Zentrifugation vom MOPS-Puffer getrennt (4.000 rpm, 20 min, 4 °C). Dann wurden die Zellen erneut in 20 mL MOPS-Puffer suspendiert und diese Suspension durch Zugabe von MOPS-Puffer auf eine OD_{600 nm} = 2 eingestellt. Dies entspricht ungefähr 2 x 10⁹ Zellen/mL [151]. Zur Messung wurden in einer 96-well Platte (klar, flacher Boden, Nunc) 90 µL Zellsuspension mit 10 µL Ligandlösung versetzt und im Tecan-Reader ECFP bei 428 nm angeregt, um dann die Fluoreszenz von ECFP bei 485 nm und Citrine bei 528 nm zu messen. Zur Aufnahme von Fluoreszenzspektren wurde die Zellsuspension ebenfalls bei 428 nm angeregt – die Emission wurde in 2 nm-Schritten von 460 bis 700 nm aufgenommen. Die Zellen wurden sowohl mit Lysin als freier Aminosäuren aber als mit Dipeptid (Lys-Ala) versetzt. Es wurden zwei unterschiedliche Verdünnungsreihen verwendet: Insgesamt 24 verschiedene Konzentrationen mit den freien Aminosäuren, während 12 verschiedene Konzentrationen der Dipeptide zur Messung eingesetzt wurden (Tabelle 8). Die Konzentrationsangaben in der Tabelle sind die Konzentrationen der zur Messung eingesetzten Stammlösungen. Diese sind um den Faktor 10 höher als die in der Messung. Die Konzentrationsreihen von Arginin und Histidin sind hier mit angegeben, da sie für Affinitätsbestimmungen mit gereinigtem Sensor eingesetzt wurden (vgl. Kapitel 2.3.9).

Tabelle 8: Liste der in diesem und im Kapitel 2.3.9 verwendeten Lysin-, Arginin-, Histidin- und Dipeptid-Konzentrationen (in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3).

Lysin (mM)	Arginin (mM)	Histidin (mM)	Dipeptid (mM)
0	0	0	0
0,0001	0,0001	0,0001	0,0001024
0,0005	0,0005	0,0005	0,000512
0,001	0,001	0,001	0,00256
0,0025	0,0025	0,005	0,0128
0,005	0,005	0,0075	0,064
0,01	0,01	0,01	0,32
0,025	0,025	0,025	1,6
0,05	0,05	0,05	8
0,1	0,1	0,1	40
0,25	0,25	0,25	200
0,5	0,5	0,5	1000
1	1	1	
2,5	2,5	2,5	
5	5	5	
10	10	10	
25	25	12,5	
50	50	25	
75	75	37,5	
100	100	50	
250	125	62,5	
500	250	75	
750	375	87,5	
1000	500	100	

2.2.5 Zellaufschluss durch Ultraschall

Zum Zellaufschluss wurden die Zellen Ultraschall ausgesetzt. Dieser verursachte Kavitationsbläschen in der Zellsuspension, die die Zellen durch Scherkräfte

aufschlossen. Für die unterschiedlichen Methoden wurde der Zellaufschluss nach dem gleichen Prinzip, nur in anderen Maßstäben durchgeführt.

a. Zellaufschluss zur anschließenden Proteinreinigung im Labormaßstab

Aus 20 g Sensor-haltigen Zellen (Feuchtzellmasse, *E. coli* BL21 (DE3)), 80 mL 20 mM MOPS-Puffer (300 mM NaCl, pH 7,3) und einer Proteaseinhibitortablette (Roche, Berlin, Deutschland) wurde eine Suspension hergestellt, die in drei Fraktionen aufgeteilt und zum Zellaufschluss sonifiziert wurde (4 x 1,5 min, 50 % Amplitude, 0,5 Zyklus, auf Eis, S3-Sonotrode). Nach Zentrifugation (20.000 rpm, 40 min, 4 °C) und Filtration (Celluloseacetatmembran, Porendurchmesser: 0,22 µm) zur Abtrennung der Zelltrümmer wurden die drei vereinigten Fraktionen als Rohzellextrakt über Nacht bei 4 °C gelagert, um dann zur affinitätschromatographischen Reinigung eingesetzt werden zu können (vgl. Kapitel 2.3.1).

b. Zellaufschluss zur anschließenden Proteinreinigung im Mini-Maßstab

Vor der Vorbereitung des Rohzellextrakts wurde zunächst eine Proteaseinhibitortablette in 10 mL 20 mM MOPS, 300 mM NaCl, pH 7,3 gelöst. Pro Ansatz wurden dann 0,5 g *E. coli* BL21(DE 3)/MP27.2-Zellen in 5 mL 20 mM MOPS-Puffer 300 mM NaCl, pH 7,3 gelöst und 200 µL Proteaseinhibitor dazu gegeben. Der Zellaufschluss erfolgte auf Eis: Die Zellen wurden zwei Mal eine Minute mit der S3-Sonotrode sonifiziert (40 % Amplitude, Zyklus 0,5). Nach Zentrifugation zur Entfernung der Zelltrümmer (in 2 mL-Fraktionen, 13.000 rpm, 4 °C, 30 min) wurde die Proteinkonzentration des Rohzellextrakts nach Bradford bestimmt, um die Konzentration dann auf 3,6 mg/mL einzustellen – so sollte eine einheitliche Proteinmenge auf den anschließend folgenden Polyacrylamid-Gelen gewährleistet sein, ohne die Säulenmaterialien zu überladen. Dann wurde der Rohzellextrakt zur Mini-Reinigung eingesetzt (vgl. Kapitel 2.3.2).

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Reinigung von Proteinen mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie

Die Reinigung der Sensorproteine erfolgte mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie an Ni-NTA Superflow–Material, (Qiagen, Hilden, Deutschland) über eine N-terminale Hexahistidinfusion (His₆-Tag). Um unspezifische Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial zu vermindern, enthielten der Äquilibrierungs- und der Elutionspuffer 300 mM NaCl. Die Elution erfolgte mit Imidazol (s.u.).

Der Zellaufschluss der 20 g Sensor-haltigen E. coli BL21 (DE3)-Zellen (Biofeuchtmasse) wurde in Kapitel 2.2.5a beschrieben. Der über Nacht bei 4 °C gelagerte Rohzellextrakt wurde für die affinitätschromatographische Reinigung eingesetzt. Die Ni²⁺-NTA-Säule (Durchmesser: 1,6 cm, Höhe des Gelbettes: 10 cm, Volumen: 20 mL) wurde vor Verwendung zunächst mit zwei Säulenvolumen (SV) Wasser gespült, dann mit zwei SV 20 mM MOPS-Puffer (300 mM NaCl, pH 7,3) äquilibriert. Nach Auftrag des Rohzellextrakts (80 mL) wurde das Säulenmaterial mit 20 mM MOPS-Puffer (300 mM NaCl, pH 7,3) gespült, bis im Absorptionssignal bei 280 nm die Grundlinie wieder erreicht wurde (meist ca. 150 mL). Beginnend mit dem Auftrag des Rohzellextrakts auf die Säule wurden 50 mL-Fraktionen gesammelt. Anschließend wurde die Elution der gebundenen Proteine gestartet und die Fraktionsgröße auf 5 mL Volumen verkleinert. Zur Elution wurde ein Gradient von 0-1 M Imidazol in 20 mM MOPS, 300 mM NaCl, pH 7,3 in 1,2 L Volumen angelegt (60 SV). Dieser wurde bis zu einer Imidazolkonzentration von 250 mM linear ausgeführt, und dann stufenweise zunächst auf 300 mM Imidazol (zwei SV) und dann auf 500 mM Imidazol (zwei SV) erhöht, um letzte Sensorproteine vom Säulenmaterial zu eluieren. Abschließend wurde die Imidazolkonzentration auf 1 M erhöht (drei SV).

Bei der Etablierung der Reinigungsmethode für neue Sensorkonstrukte, wurde nach Abschluss der NiNTA-Reinigung eine SDS-PAGE der vermutlich Sensor enthaltenden Elutionsfraktionen durchgeführt, um die Elutionsfraktionen mit

vollständigen Sensormolekülen von denen mit Fragmenten unterscheiden zu können.

Zur Abtrennung der Salze von der Proteinlösung wurden die vereinigten Fraktionen auf eine vorher äquilibrierte Größenausschlusschromatographiesäule gegeben (Durchmesser: 5,0 cm, Höhe des Gelbettes: 50 cm, 1 L Säulenvolumen, äquilibiert mit zunächst 2 L ddH₂O, anschließend 1,5 L 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3). Die Elution der Sensorproteine erfolgte mit 20 mM MOPS-Puffer. Die Säule wurde im Anschluss mit weiteren 2 L 20 mM MOPS-Puffer gespült, dann mit 800 mL 0,2 M NaOH eventuelle Verunreinigungen entfernt, mit 3 L ddH₂O das Säulenmaterial wieder neutralisiert und dann mit 1,5 L 20 % Ethanol gespült und ebenfalls in 20 % Ethanol gelagert.

Die Sensoren wurden auf eine Absorption von 0,2 bei 515 nm eingestellt, was einer Proteinkonzentration von 0,18 mg/mL entsprach (über einen kolorimetrischen Test nach Bradford bestimmt, vgl. Kapitel 2.3.4). Wenn die Sensorlösungen dafür konzentriert werden mussten, wurde dies in einer Amicon-Zelle (Volumen: 180 mL) durchgeführt. Die ist eine Ultrafiltrationseinheit, in der die Proteinlösung in eine Kammer gegeben wird. Diese Kammer ist im unteren Bereich mit einer Ultrafiltrationsmembran verschlossen, durch die Puffer und kleinere Moleküle diffundieren können (Ausschlussvolumen: 30 kDa). Wird nun Überdruck (durch Stickstoff) auf die Kammer gegeben, wird die Proteinlösung konzentriert.

Nach erfolgreicher Reinigung der Sensoren wurden sie direkt zur Aufnahme von Bindungsisothermen und zur Bestimmung ihrer Affinität eingesetzt (vgl. Kapitel 2.3.9). Zur Lagerung wurde die Sensorlösung in 1 und 10 mL Aliquots aufgeteilt und in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3 bei -20 °C gelagert. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden.

Zur affinitätschromatographischen Reinigung der Sensoren mit permutiertem LAO-Bindeprotein (vgl. Ergebniskapitel 1.2) wie auch zur Reinigung des einzelnen permutierten Bindeproteins musste jeweils neues Ni²⁺-NTA-Material verwendet werden, da das permutierte Bindeprotein so fest an das Säulenmaterial bindet, dass selbst 6 M Guanidiniumhydrochlorid mit 0,2 M Essigsäure oder das Lösen der Ni²⁺-Ionen vom NTA-Material mit 100 mM EDTA, pH 8, diese Bindung nicht wieder löst.

2.3.2 Mini-Reinigung von Proteinen mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie

Zur Reinigungsoptimierung wurden Reinigungen im Batch-Verfahren mit möglichst geringem Materialvolumen durchgeführt, da die Ni²⁺-NTA-Materialien im Anschluss an die Reinigung oft nicht mehr verwendet werden konnten. Durch die Methode der Mini-Reinigung konnten diverse Parameteränderungen parallel getestet werden, wie z.B. der Zusatz verschiedener zweiwertiger Ionen, wie Ni²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺ oder Zn²⁺, oder unterschiedliche Pufferzusammensetzungen.

Es wurden 200 μ L-Aliquots des Ni²⁺-NTA-Materials in 2 mL-Eppendorf-Gefäße überführt (200 μ L Ni-NTA-Suspension entsprechen 100 μ L Material mit 0,5 mg Proteinbindekapazität nach Herstellerangaben) und zunächst in einer kleinen Laborzentrifuge kurz zentrifugiert (höchstens 5 s, höchstens 2.000 rpm, RT). Nach Abnahme des Überstands (das Material wird in 20 % Ethanol gelagert) wurden die 100 μ L Chromatographiematerial mit 700 μ L Wasser resuspendiert und nach kurzer Zentrifugation (höchstens 5 s, höchstens 2.000 rpm, RT) der Überstand entfernt. Der Waschschritt mit Wasser wurde wiederholt und erneut nach Zentrifugation der Überstand abgenommen. Nach Äquilibrierung in gleicher Art mit 20 mM MOPS-Puffer (300 mM NaCl, pH 7,3) wurde der vorbereitete Rohzellextrakt (700 μ L) auf das Säulenmaterial gegeben.

Nach der Beladung des Säulenmaterials mit dem Rohzellextrakt wurde eine Probe des Überstandes für die SDS-PAGE abgenommen (19,5 μ L des Überstands wurden mit 7,5 μ L Probenpuffer und 3 μ L Reduktionsmittel (NuPAGE®, Life Technologies, Tabelle 1) versetzt und für 10 min bei 99 °C inkubiert, vgl. Kapitel 2.3.6). Der übrige Überstand wurde verworfen. Dann wurde das Ni²⁺-NTA-Material zweimal mit 700 μ L 20 mM MOPS-Puffer, 300 mM NaCl, pH 7,3 gewaschen (wie oben mit Wasser beschrieben), nach einem Waschschritt mit 40 mM Imidazol im selben Puffer wurde dann der erste Elutionsschritt mit 300 mM Imidazol durchgeführt: Das Material wurde erneut mit 700 μ L Puffer resuspendiert und vom Überstand eine Probe für die SDS-PAGE abgenommen und wie oben beschrieben behandelt. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Material mit 700 μ L 1 M Imidazol (in 20 mM MOPS, 300 mM NaCl, pH 7,3) resuspendiert und eine weitere Probe für die SDS-PAGE entnommen. Nach einem zweiten Waschschritt mit 1 M Imidazol wurde der Überstand verworfen und das Material mit 20 μ L H₂O versetzt. So sollte das Material möglichst konzentriert für die letzte Probenahme vorliegen, in der vom Material 19,5 μ L abgenommen wurden und wie oben beschrieben vorbereitet wurden. Diese vier Proben wurden dann zu einer SDS-PAGE eingesetzt, um den Reinigungserfolg überprüfen zu können (vgl. Kapitel 2.3.6).

2.3.3 Pufferaustausch über Centricons

Zum Entsalzen von kleinen Proteinlösungsvolumina (< 50 mL) oder zum Pufferaustausch wurden Centricon-Filtereinheiten verwendet. Diese wurden in der Größe von 50 mL-Falcon-Tubes verwendet und enthalten in der Mitte des Tubes eine Ultrafiltrationsmembran mit einem Ausschlussvolumen von 10 oder 30 kDa.

Zur Konzentration von Proteinen wurde Protein-haltige Lösung in den oberen Teil der Filtereinheiten gegeben, diese bei 4000 rpm für 20 min bei RT zentrifugiert und der durch die Membran gelangte Puffer verworfen. Die zurückgehaltenen Proteine lagen dann in einem kleineren Puffervolumen vor. Zum Pufferwechsel wurde dann die obere Kammer mit dem zweiten Puffer versetzt und erneut zentrifugiert (wie oben). Für einen vollständigen Pufferwechsel wurde das Volumen der Proteinlösung von 15 mL auf höchstens 1 mL eingeengt, bevor sie mit neuem Puffer versetzt wurden und dieser Austausch drei Mal wiederholt.

2.3.4 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford wurde die Komplexbildung des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau G-250 mit kationischen und unpolaren Seitenketten im sauren Milieu genutzt [152] (Abbildung 12).



Abbildung 12: Strukturformel des Triphenylmethanfarbstoffs (Quelle: wikipedia.org)

Die Bradford-Lösung wurde im 1 L-Maßstab angesetzt und mehrere Monate unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gelagert.

Zur Herstellung wurden 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 in 50 mL Ethanol gelöst, 100 mL Phosphorsäure zugegeben und die Suspension unter Lichtausschluss für 1 h gerührt. Nach Auffüllen mit ddH₂O auf einen Liter wurde die Suspension weitere 5 min gerührt und dann in einer Schottflasche aufgekocht. Nach Abkühlen der Suspension wurde sie durch einen Papierfilter in eine dunkle Flasche filtriert und diese mit Alufolie umwickelt. Nach mindestens einem Tag Lagerung (zur Absetzung weiterer Partikel), wurde die Lösung zur Messung verwendet.

Dazu wurden 100 μ L Proteinlösung (Kontrolle: 100 μ L Wasser oder Puffer) in Dreifachbestimmung mit 900 μ L Bradfordreagenz versetzt, die Lösung bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss 15 min inkubiert und dann die Absorption bei 595 nm aufgenommen. Durch Vergleich mit einer BSA-Standardreihe konnten so Proteinkonzentrationen von 0,01 – 0,1 mg/mL ermittelt werden.

2.3.5 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Absorption bei 280 nm

Eine weitere Methode, die zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet wurde, ist die Konzentrationsbestimmung über die Absorption der Proteinproben bei 280 nm. Hierfür wurde zunächst unter Angabe der Aminosäuresequenz der spezifische Extinktionskoeffizient der jeweiligen Proteine mit dem Programm ProtParam (www.expasy.org) berechnet. Bei 280 nm absorbieren besonders die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan sowie Cystein. Phenylalanin absorbiert bei 280 nm nur gering, sodass es in der Berechnung des Extinktionskoeffizienten (Formel 4) nicht berücksichtigt wird [153]. #Trp, #Tyr und #Cys geben hierbei jeweils die Anzahl der Aminosäuren pro Molekül an:

$$\epsilon_{280 nm}(M^{-1}cm^{-1}) = (\#Trp) * 5500 + (\#Tyr) * 1490 + (\#Cys) * 125$$
(4)

Die Bestimmung der Absorption bei 280 nm wurde im UV-VIS-Spektrometer durchgeführt, indem zunächst mit 1 mL 20 mM MOPS-Puffer (pH 7,3) die Absorption von 250 – 700 nm aufgenommen wurde, um dann jeweils 1 mL der Analytlösung zur Aufnahme des Spektrums einzusetzen. Spektren wurden aufgenommen, da so nach der Reinigung der Sensoren die Proteine direkt auf die gleiche optische Dichte bei 515 nm (Absorptionsmaximum von Citrine) von 0,2 eingestellt werden und die Form des Absorptionsspektrums überprüft werden konnte (siehe 2.3.1). Es wurden die Extinktionskoeffizienten für den 0-perm-0-Sensor ($\epsilon_{Sensor} = 72.575 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und das Bindeprotein 0-perm-0 ($\epsilon_{Bindeprotein} = 22.920 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bestimmt.

Die Konzentration der Proteinlösung wurde mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes berechnet [154–156]:

$$\mathbf{E} = \mathbf{\epsilon} * \mathbf{c} * \mathbf{d} \tag{5}$$

$$\mathbf{c} = \frac{\mathbf{E}}{\mathbf{\epsilon} * \mathbf{d}} \tag{6}$$

2.3.6 SDS-PAGE

Um Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, wurde eine SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nach Laemmli durchgeführt [157]. Die SDS-PAGE wurde mit den Gelen und Puffern von NuPAGE® dem Protokoll des Herstellers entsprechend durchgeführt. Es wurde eine Proteinmenge von 7 µg Protein (nach Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford) in 19,5 µL Puffer gelöst bzw. entsprechend verdünnt und mit 3 µL Reduktionsmittel (*reducing agent*) und 7,5 µL Probenpuffer (*sample buffer*) aus dem Kit versetzt. Nach 10 min Inkubation bei 99 °C wurden 10 µL der Probe pro Tasche des Polyacrylamid-Gels aufgetragen (entspricht 2,3 µg/Spur); als Puffer für die Gelelektrophorese wurde ½ L MES SDS Laufpuffer (*running buffer*) verwendet, der mit 500 µL Antioxidans versetzt war. Nach Anlegen einer Spannung (200 V, 100 mA, 15 W, 50 min) wurde das Polyacrylamidgel in ebenfalls kommerziell erhältlicher Commassie-Lösung (SimplyBlue[™] SafeStain) für 1 h gefärbt und anschließend mit mehreren Wiederholungen in VE-Wasser entfärbt.

2.3.7 Western-Blot

Für einen Western-Blot wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (vgl. Kapitel 2.3.6), die Polyacrylamid-Gele anschließend aber nicht gefärbt, sondern zum Western-Blot eingesetzt [158].

Dieser diente im Rahmen dieser Arbeit zum Nachweis von His-Tag oder GFP-Fragmenten. Dazu wurden Whatman-Papier und Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran in der Größe des zu blottenden Polyacrylamid-Gelstreifens für 10 min in Transferpuffer getränkt (Tabelle 3). Anschließend wurden zwei getränkte Whatman-Papierlagen auf die Anode gelegt, darauf die Membran, darüber das Polyacrylamid-Gel und darüber wieder zwei getränkte Lagen Whatman-Papier. Darauf wurde die Kathode platziert und ein Strom angelegt (15 V, 200 mA, 45 min (0,8 V/pro cm² Blot)). Nach dem Blotten wurde das Polyacrylamid-Gel wie oben beschrieben mit Coomassie gefärbt (vgl. Kapitel 2.3.6) und die Membran zunächst 5 min bei Raumtemperatur (RT) mit TBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit 25 mL Blockier-Lösung für 1 h bei RT inkubiert. Nach einem 5 min-Waschschritt mit TBST wurde die Membran mit 25 mL Antikörper-Lösung (Pineda Antikörper-Service oder Roth) 1 h bei RT inkubiert (Anti-GFP: 1:50.000 verdünnt). Anschließend wurde die Membran 3 · 10 min mit TBST bei RT gewaschen und mit der zweiten Antikörper-Lösung 1 h bei RT inkubiert (15 mL, Anti-Rabbit gekoppelt mit Peroxidase, 1:15.000 verdünnt). Nach drei abschließenden Waschschritten bei RT mit TBST (3 · 10 min) wurden je 750 µL der beiden Entwicklerlösungen in einem Eppendorf-Gefäß vermischt, auf die Membran gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Dann wurde die Lumineszenz der Membran mit dem LAS-3000mini Image Reader aufgenommen (Tabelle 2).

2.3.8 Stabilitätsuntersuchung von Biosensoren

Für die Untersuchung der Temperaturstabilität der Biosensoren wurden gereinigte Sensorfraktionen aliquotiert (250 µL Aliquots, $OD_{515 nm} = 0,2$, ca. 0,18 mg/mL) und bei -20 °C, 8 °C und 25 °C inkubiert. Zusätzlich dazu wurde noch eine Charge bei -20 °C gelagert und bei jedem Probezeitpunkt aufgetaut und erneut eingefroren. Von den vier verschiedenen Lagerbedingungen wurden nach 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10 und 11 Tagen jeweils 2 x 90 µL für Aufnahmen von Fluoreszenzspektren am TECAN-Reader (Tabelle 2) und 22,5 µL für die SDS-PAGE abgenommen. Ein 90 µL-Aliquot wurde mit 10 µL 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3, das andere mit 10 µL 1 M Lysin in 20 mM MOPS, pH 7,3 versetzt und dann Fluoreszenzspektren aufgenommen (Extinktion: 428 nm (Bandbreite 20 nm), Emission: 460-700 nm, 2 nm Schritte (Bandbreite 10 nm), Verstärkungsfaktor 70, 10 Blitze pro Messpunkt, 20 µs Integrationszeit). So konnte die FRET-ratio der beiden Grenzzustände R₀ (0 mM Lysin) und R_{sat} (100 mM Lysin) bei gleichbleibender Proteinkonzentration aufgenommen werden. Die 22,5 µL für die SDS-PAGE wurden mit 7,5 µL Probenpuffer versetzt und 1 min bei 99 °C inkubiert.

Für die Bestimmung der Stabilität bei höheren Temperaturen wurden kürzere Probenzeiträume verwendet: So wurden 10 Aliquots mit 250 μ L gereinigtem Sensor (OD_{515 nm} = 0,2, ca. 0,18 mg/mL) verwendet, und diese bei 25, 50 und 75 °C inkubiert. Nach 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 und 300 min wurden erneut 2 x 90 μ L und einmal 22,5 μ L aus den Aliquots entnommen und wie oben beschrieben behandelt. So konnten die Fluoreszenzsignale mit der Größenverteilung der Proteinfraktionen auf dem Polyacrylamid-Gel verglichen werden.

2.3.9 Bestimmung der Affinität eines FRET-Sensors mittels FRET-Signaländerung

Zur Bestimmung der Affinität eines FRET-Sensors wurden 24 verschiedene Lysin-, Arginin- und Histidinkonzentrationen in 96-deep-well-Platten mit dem TECAN-Robotersystem in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3 vorbereitet (800 µL Gesamtvolumen, der pH-Wert der höchsten Ligandkonzentrationen wurde mit HCI eingestellt,

Konzentrationen siehe Tabelle 8). Von diesen wurden dann 10 µL in einer 96-well-Platte mit flachem, transparentem Boden mit 90 µL Sensorlösung versetzt, die auf eine OD_{515nm} von 0,2 (ca. 0,18 mg/mL) eingestellt worden war. Der TECAN-Reader M200 und die Lösungen wurden auf 25 °C vortemperiert und dann Einzelfluoreszenzmessungen der Proteinfraktionen durchgeführt: Der Donor ECFP wurde angeregt, dann wurde die Fluoreszenz von ECFP und Citrine aufgenommen (Extinktion: 428 nm (Bandbreite 20 nm), Emission: 485 und 528 nm (Bandbreite 20 nm), Verstärkungsfaktor 70, 10 Blitze pro Messpunkt, 20 µs Integrationszeit). So konnte die FRET-ratio $\frac{Citrine-Signal}{ECFP-Signal}$ bestimmt werden, die gegen die Lysinkonzentrationen aufgetragen wurde. Mit der im Einleitungskapitel 4.1 beschriebenen Formel (2) konnten so die Dissoziationskonstante k_D als Maß für die Affinität des Sensors zum Liganden und die Sensitivität R_{sat} – R₀ bestimmt werden. Die eingesetzten Lysin- und Argininkonzentrationen sind in Tabelle 8 angegeben.

2.3.10 Bestimmung des pH-Wertes mittels Kresolrot

Der pH-Wert in Mikrotiterplatten wurde basierend auf der Änderung des Absorptionsspektrums von Kresolrot bei unterschiedlichen pH-Werten bestimmt [159].

Dafür wurden 10 mg Kresolrot in 1 mL Ethanol (>99 %) gelöst, Puffer mit pH-Werten von 6,5 bis 9 mit der Kresolrot-Lösung versetzt (Messkonzentration des Kresolrots: 0,1 g/L) und die drei Absorptionsmaxima von Kresolrot im TECAN-Reader gemessen: Die Absorption bei 573 nm steigt bei steigendem pH-Wert, während die Absorption bei 438 nm sinkt und die Absorption bei 680 nm gleich bleibt. Daraus wird noch Formel 7 das Kresolrot-Verhältnis berechnet.

Kresolrot - Verhältnis =
$$\frac{A_{573nm} - A_{680nm}}{A_{438nm} - A_{680nm}}$$
 (7)

Die Kalibration wurde im pH-Bereich von 6,5 bis 9,0 in 20 mM MOPS-Puffer (pH 6,5 – 7,9) und 20 mM TRIS-Puffer (pH 7,5 – 9,0) durchgeführt [160,161] (Abbildung 13). Anschließend wurden die Lysin- und Argininstammlösungen (10 μ L) mit dem Kresolrot-haltigen Puffer (90 μ L) versetzt, das jeweilige Kresolrot-Verhältnis pH-abhängig bestimmt und die Messpunkte mit der in Formel 8 angegeben Funktion angepasst. Diese Kalibrationskurve diente zur Bestimmung der pH-Werte in den verschiedenen Lysin- und Argininlösungen.

(8)



Abbildung 13: Fit der Kalibration des Kresolrot-Verhältnisses zur Berechnung des pH.

2.3.11 Kristallisation der Sensorproteine

Damit die Struktur der Sensorproteine mittels Kristallstrukturanalyse aufgelöst werden konnte, wurde in einer Kooperation mit Renu Batra-Safferling (ICS-6, Forschungszentrum Jülich) versucht, die Sensorproteine zu kristallisieren. Dazu wurden die Sensorproteine mit zirkulär permutiertem Bindeprotein zunächst bis zur Löslichkeitsgrenze in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3 in einer Amicon-Zelle konzentriert (Volumen: zunächst 180 mL, dann 10 mL). Diese war bei einer Konzentration von 5 mg/mL (62 µM) erreicht. Die konzentrierte Proteinlösung wurden vor Einsatz zur Kristallisation 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, um eventuelle unlösliche Aggregate zu sedimentieren, dann wurde der Überstand für die Kristallisationsansätze verwendet. Wichtig hierbei war ein staubfreies Arbeiten, da jede Fremdfaser als Kristallisationskeim für polykristallines Wachstum fungieren kann.

Als Kristallisationsmethode wurde das *"sitting drop"*-Verfahren genutzt (Abbildung 14). Dafür wurden in 96-well-Kristallisationsplatten in einer Kristallisationskammer Proteintropfen mit dem gleichen Volumen Puffer- oder Lösungsmittel vermischt. Im gleichen Raum war ein zweites Reservoir, in dem der Puffer oder das Lösungsmittel in größerem Volumen vorlag. Die beiden Bereiche wurden luftdicht verschlossen,

sodass sich ein Gleichgewicht zwischen Puffer- oder Lösungsmittelgehalt in der Luft, im Reservoir und im Proteintropfen bilden konnte.

Es wurden 0,7 µL Proteinlösung mit 0,7 µL Reservoirlösung vermischt und im Reservoir 75 µL Lösung eingesetzt. Als Reservoir- oder Pufferlösungen wurden kommerzielle Kits verwendet – in diesen sind z.B. die Komponenten enthalten, mit denen bisher am häufigsten Kristallisationserfolge nach Auswertung von über 500.000 Kristallisationsversuchen erreicht wurden (JCSG = Joint Center for Structural Genomics, [162]). Nachdem ein erster Kristallisationserfolg erreicht wurde, wurde diese Bedingung mit Feinscreenings variiert. Diese wurden dann mit unterschiedlichen Konzentrationen von Protein und Ligand versetzt. Zur Kristall-bildung wurden die 96-well-Platten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gelagert und alle zwei Wochen im Mikroskop überprüft.



Abbildung 14: Schematische Darstellung des "*sitting drop*"-Verfahrens.

Nachdem Kristalle in den Sensorlösungen gewachsen waren, wurden die Kristalle von Joachim Granzin (ICS-6) mit Nylon-Loops gefischt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Die folgenden Diffraktionsexperimente an der Beamline in Grenoble wurden ebenfalls von Joachim Granzin durchgeführt und nach Berechnung der Einheitszelle die Struktur der kristallisierten Proteine aufgelöst.

2.3.12 Isothermale Titrationskalorimetrie

Zur Bestimmung der Affinität des Sensorkonstrukts mit einer fluoreszenzunabhängigen Methode wurde die isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) verwendet. In einem isothermalen Titrationskalorimeter wird die Temperatur einer mit Wasser gefüllten Referenzzelle mit der Temperatur einer Messzelle verglichen. Zu Beginn der Messung wird die Messzelle mit Sensorlösung befüllt und beide Zellen auf exakt die gleiche Temperatur temperiert (25°C). Dabei liegen beide Zellen nicht adiabatisch sondern isobar vor. Da immer etwas Wärmeenergie an die Umgebung abgegeben wird, muss die Zelle beständig in sehr geringem Maß (Größenordnung µcal/min) nachgeheizt werden, um die Temperatur konstant zu halten. Wird nun die Sensorlösung graduell mit Ligand versetzt, so ändert sich die Temperatur in der Messzelle: Bei einer exothermen Reaktion wird die Messlösung wärmer, bei einer endothermen Reaktion nimmt die Temperatur ab. Das Gerät erkennt Temperaturänderungen zwischen Mess- und Referenzzelle und heizt die Messzelle entsprechend mehr oder weniger nach, um sie weiterhin auf der Messtemperatur zu halten.

Zur Auswertung wird die Energie, die benötigt wird, um die Messzelle bei der Messtemperatur zu halten, gegen das molare Verhältnis von Sensor und Ligand aufgetragen. Man erhält die in Abbildung 39 gezeigten Kurven aus denen sich Parameter wie die Affinität, die Bindungsstöchiometrie und die Enthalpie einer Bindung bestimmen lassen [163]. Dazu kann folgende Gleichung verwendet werden [164]:

 $\mathbf{Q} = V_0[\mathbf{M}]_t \Sigma(\mathbf{n}_i \Delta \mathbf{H}_i \mathbf{K}_{ai}[\mathbf{L}]) / (1 + \mathbf{K}_{ai}[\mathbf{L}])$ (9)

(Q = Gesamtbindungswärme, V₀ = Zellvolumen, ΔH = Bindungsenthalpie pro Mol Ligand, [M]_t = Gesamtkonzentration der Makromoleküle (gebunden und freie), K_a = $1/k_D$ = Bindungskonstante, [L] = Konzentration von freien Ligandmolekülen, n = Bindestellen)

<u>Durchführung:</u> Zur Messung wurden 200 μ L Proteinlösung (60 μ M Sensor mit permutiertem Bindeprotein oder 22 μ M permutiertes Bindeprotein) in die Messzelle gegeben. Die Ligandenlösung (100 μ M, 1 mM, 5 mM und 10 mM Lysin in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3) wurde mit der Spritze zugepulst (1 μ L in 2 s, 38 Injektionen, 240 s zwischen den Pulsen) während sich die Paddel-förmige Spritze mit 500 rpm drehte.

Um die ITC als Messmethode nutzen zu können, muss allerdings entweder die Affinität des Sensors zum Liganden sehr hoch sein (k_D im µM-Bereich oder darunter) oder sich das Sensormolekül sehr stark konzentrieren lassen, damit ein molares Verhältnis der beiden Bindepartner vorliegt, bei dem nicht nach dem ersten Ligandenpuls bereits alle Moleküle gesättigt sind oder die Wärmebildung zu gering ist, um messbar zu sein. Dies war bei dem in dieser Arbeit untersuchten Lysinsensor (0-perm-0-Sensor) nicht gegeben, da dieser nur bis maximal 62 µM konzentriert werden konnte. Daher konnten im Fall des Lysinsensors dessen Affinität zu Lysin nur

abgeschätzt und nicht genau bestimmt werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Messergebnisse in der richtigen Größenordnung liegen, ist allerdings sehr hoch, da Experimente an unterschiedlichen Tagen mit verschiedenen Sensorlösungen sehr ähnliche Ergebnisse zeigten.

2.3.13 Nachweis von Lysin mittels Ninhydrin-Farbreaktion

Die in der Kultivierung von *C. glutamicum* DM1933 erhaltenen zellfreien Kulturüberstände wurden mit der Ninhydrin-Farbreaktion auf ihren Lysingehalt getestet. Dazu wurde die Farbreaktion im Mikrotiterplattenmaßstab durchgeführt ([150], Abbildung 15).



Abbildung 15: Reaktion von Ninhydrin mit Aminosäuren (nach [150]).

Zunächst wurde die Lysinkonzentration der erhaltenen Lösungen geschätzt und die Lösungen auf ca. 1,5-25 mM Lysin verdünnt. Anschließend wurde der Mikrotiterplattentest wie in der Publikation von Unthan *et al.* [150] beschrieben durchgeführt.

2.3.14 Nachweis von Lysin mittels HPLC

Als Referenzbestimmung für Lysinkonzentrationen wurde die *Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography* (RP-HPLC) durchgeführt. Die Lysin-haltigen Proben wurden mit sterilem H₂O auf Konzentrationen zwischen 5-100 μ M verdünnt und an Michael Limberg (IBG-1) weitergegeben, der die Messungen durchführte. Es wurde das Agilent 110 Infinity-System mit einer Kinetex Core-Shell (C18)-Säule und einem Fluoreszenzdetektor verwendet (Anregung: 230 nm, Emission: 460 nm). Als interner Standard zur Überprüfung der Derivatisierung mit Phthalatdialdehyd wurde α-Aminobuttersäure verwendet.

Zur Vorbereitung der Proben wurden zunächst die Lysinkonzentrationen der Proben mit der Ninhydrin-Farbreaktion abgeschätzt (2.3.13), um dann die Proben in den Konzentrationsbereich zwischen 5-100 μ M Lysin mit ddH₂O verdünnen zu können. Diese wurden dann 1:1 mit dem internen Standard (100 μ M α -Aminobuttersäure in ddH₂O) verdünnt und zur Messung eingesetzt. Wenn diese nicht direkt erfolgen konnte, wurden die gefüllten HPLC-Probengefäße bei -20 °C gelagert.

Die HPLC-Säule wurde bei 30 °C und einem Fluss von 0,85 mL/min verwendet. Vor Injektion der Probe auf die Säule wurden 5 μ L Probenvolumen mit 20 μ L Derivatisierungsreagenz versetzt (Phthalatdialdehyd-Reagenz) und dann die vollen 25 μ L injiziert. Dann wurde mit einem Gradient der beiden HPLC-Puffer A und B gearbeitet (Liste der Komponenten in Tabelle 3):

Zeit (min)	% HPLC-Puffer B
0	0
2	22
12	25
13	46
23	50
24,5	70
26	70
29	100
33	100
35	0

Anschließend wurde die Fläche des Lysinsignals mit zuvor durchgeführten Konzentrationsreihen definierter Konzentration verglichen und so dessen Konzentration bestimmt.

VI. Ergebnisse und Diskussion

1. Design genetisch kodierter FRET-basierter Lysinsensoren

Wie in der Einleitung beschrieben, gibt es periplasmatische Bindeproteine für eine Vielzahl von Metaboliten. Für die Konstruktion eines FRET-basierten Lysinsensors wurde das LAO-BP aus *E. coli* [132] ausgewählt, das dem aus *S. typhimurium* sequentiell und vermutlich auch strukturell sehr ähnlich ist, denn eine entsprechende Kristallstruktur wurde bisher noch nicht gelöst. Abbildung 16 zeigt einen Sequenzvergleich zwischen beiden LAO-BP. Die Aminosäuresequenzen unterscheiden sich nur in 16 von 238 Aminosäuren (6,8 %). Zudem beruhen viele der Sequenzunterschiede auf homologer Substitution durch Aminosäuren mit ähnlichen Seitenketten.

Abbildung 16: Vergleich der Aminosäuresequenzen der LAO-BP aus *S. typhimurium* und *E. coli.* Markiert sind die homologen Substitutionen (grün) und die nicht-homologen Substitutionen (rot). Die in der Bindung der Seitenkette von Lysin beteiligten Aminosäuren sind unterstrichen.

Da beide Termini des Bindeproteins an der gleichen Domäne lokalisiert sind (vgl. Abbildung 7), was die FRET-Effizienz nachteilig beeinflussen kann, wurde das Bindeprotein in nativer Form (vgl. Kapitel 1.1), aber auch in zirkulär permutierter Form nach Vorbild von Okada *et al.* [67] verwendet (vgl. Kapitel 1.2). Zirkulär permutiert bedeutet hierbei, dass die N- und C-Termini des Proteins verbunden werden und neue N- und C-Termini durch Öffnung der Peptidkette an anderer Stelle geschaffen werden. Dies kann auf Proteinebene geschehen [165] oder auf molekularbiologischer Ebene entweder über eine randomisierte Genbibliothek [166] oder, wie in diesem Fall, gerichtet basierend auf dreidimensionalen Strukturdaten des LAO-BP aus *S. typhimurium*.

S. typhimurium
 ALPQTVRIGT DTTYAPFSSK DAKGEFI GFD IDLGNEMCKR MQVKCTWVAS DFDALIPSLK

 E. coli
 ALPETVRIGT DTTYAPFSSK DAKGDFVGFD IDLGNEMCKR MQVKCTWVAS DFDALIPSLK

 S. typhimurium
 AKKIDAIISS LSITDKRQQE IAFSDKLYAA DSRLIAAKGS PIQPTLESLK GKHVGVLQGS

 E. coli
 AKKIDAIISS LSITDKRQQE IAFSDKLYAA DSRLIAAKGS PIQPTLDSLK GKHVGVLQGS

 S. typhimurium
 TQEAYANDNW RTKGVDVVAY ANQDLI YSDL TAGRLDAALQ DEVAASEGFL KQPAGKEYAF

 E. coli
 TQEAYANETW RSKGVDVVAY ANQDLVYSDL AAGRLDAALQ DEVAASEGFL KQPAGKDFAF

S. typhimurium AGPSVKDKKY FGDGTGVGLR KDDTELKAAF DKALTELRQD GTYDKMAKKY FDFNVYGD E. coli AGSSVKDKKY FGDGTGVGLR KDDAELTAAF NKALGELRQD GTYDKMAKKY FDFNVYGD

Das Design des ersten FRET-basierten Biosensors basierte auf den in der Arbeit von Moussa [75] ausführlich charakterisierten Zuckersensoren [69,167], bei denen der Einfluss verschiedener Umgebungsbedingungen und Metaboliten auch auf die einzelnen Fluoreszenzproteine untersucht wurde. Auch im Falle des dort untersuchten Glukosesensors (FLII12Pglu-600) wurden ECFP und Citrine als FRET-Paar verwendet. Daher wurde auch für die in dieser Arbeit konstruierten Lysinsensoren dieses FRET-Paar gewählt.

Darüber hinaus wurde bei dem Glukosesensor durch Deletion der ersten sechs Aminosäuren des Citrines ein starker Anstieg der FRET-Effizienz beobachtet, daher wurde dieselbe Modifikation auch bei der Konstruktion der Lysinsensoren übernommen. Der Effekt beruht vermutlich auf einer besseren Übertragung der Konformationsänderung des Bindeproteins auf das Fluoreszenzprotein [69]. Die Sequenz des LAO-BP wurde mit den beiden Restriktionsschnittstellen *BamH* I und *Sal* I als synthetisches Gen bei Life Technologies bestellt und in das bereits vorhandene Gerüst aus His₆-Tag, ECFP und Citrine kloniert (erhalten aus dem Glukosesensorplasmid). Diese Arbeiten erfolgten im Rahmen der laufenden Masterarbeit von Julia Otten, die im Rahmen dieser Doktorarbeit betreut wurde [168].

1.1 Sensor mit nativem Lysin- / Arginin- / Ornithin-Bindeprotein aus E. coli

Abbildung 17 zeigt ein Modell des vollständigen Lysinsensors mit nativem LAO-BP und Lysin als Liganden. Obwohl im nativen LAO-BP N- und C-Terminus an derselben Domäne lokalisiert sind und sich ihr relativer Abstand vermutlich nur wenig bei Bindung des Liganden ändert, so erscheint doch eine relative Orientierungsänderung der beiden Fluoreszenzproteine durch Ligandenbindung möglich, was einen entsprechenden FRET-ratio *Shift* bewirken könnte (vgl. Einleitungskapitel 4.1, Abbildung 6). Um dies zu testen, untersuchte Julia Otten in ihrer Masterarbeit [168], die Expression und Reinigung verschiedener Lysinsensoren mit nativem LAO-BP. Hier exemplarisch beschrieben sind die Untersuchungen mit dem in Abbildung 17 dargestellten Prototypen ohne Linker (0-nat-0-Sensor) zwischen LAO-BP und Fluoreszenzproteinen durchgeführt.



Abbildung 17: Aufbau des Sensors bestehend aus ECFP, *E. coli*-LAO-BP und Citrine (A): Schematische Darstellung der Gensequenz mit Schnittstellen. (B): Strukturmodell des Sensors durch Kombination bekannter Strukturelemente von ECFP (pdb-Code: 2WSN), LAO-BP aus *S. typhimurium* (pdb-code: 1LST) und Citrine (pdb-code: 1HUY).

Das erhaltene Konstrukt wurde in *E. coli* produziert (vgl. M.M.-Kapitel 2.2.3b) und mittels Affinitätschromatographie (vgl. M.M.-Kapitel 2.3.1) gereinigt. Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, konnte dabei die Position der Proteine auf der Säule visuell verfolgt werden.



Bindung





nach Elution

Abbildung 18: Bilder der Ni²⁺-NTA-Säule während und nach der Reinigung des 0-nat-0-Biosensors. Das Chromatogramm der Reinigung (Abbildung 19) zeigt, dass nach dem Auftrag des Rohzellextraktes und dem Waschen ohne Imidazol durch den Elutionsgradienten zunächst ein hochkonzentrierter Waschpeak und dann fast basisliniengetrennt das Zielprotein eluiert wurde. Beim anschließenden Waschen mit 1 M Imidazol (grün dargestellt), wurden nur noch geringe Verunreinigungen eluiert (vgl. M.M.-Kapitel 2.3.1).



Abbildung 19: Chromatogramm der Affinitätsreinigung des 0-nat-0-Sensors: Auftrag der Absorption bei 280 nm (blau), der Absorption bei 488 nm (pink), der Leitfähigkeit (braun) und der Imidazolkonzentration (grün) gegen das verwendete Volumen und die gesammelten Fraktionen (rot). Der Elutionsbereich des FRET-Sensors ist umrahmt. Die Reinigung wurde wie im M.M.-Kapitel 2.3.1 beschrieben mit dem optimierten Protokoll durchgeführt – dabei lag in allen Puffern bei der affinitätschromatographischen Reinigung 20 mM MOPS und 300 mM NaCl bei pH 7,3 vor. Eluiert wurde mit einem Imidazolgradient von 0-1 M Imidazol in 60 SV (1200 mL). Nach vollständiger Elution des Sensors (Abs_{280 nm} wieder unter 100 mAU) wurde die Imidazolkonzentration in einer Stufe auf 1 M angehoben.

Die an die Entsalzung anschließende SDS-PAGE (vgl. M.M.-Kapitel 2.3.1, 2.3.6) zeigte die hohe Reinheit des Sensors von ca. 90% (Spur 8, Abbildung 20), mit der erwarteten Bande bei 81 kDa und geringen Verunreinigungen bei ca. 70 kDa.



Abbildung 20: Überprüfung des Reinigungserfolgs des 0-nat-0 Sensors mittels SDS-PAGE.

Da das LAO-Bindeprotein aus S. typhimurium eine Affinität von 15 nM für Lysin aufwies [122] (vgl. Einleitungskapitel 5.1), wurde eine vergleichbare Affinität beim LAO-Bindeprotein aus *E. coli* vermutet. Daher wurde im Anschluss an die Reinigung eine Bindungsisotherme des FRET-basierten Lysinsensors mit Lysinkonzentrationen zwischen 10⁻⁵–10 mM aufgenommen (vgl. M.M.-Kapitel 2.3.9). Die Bindungsisotherme zeigte nur einen sehr geringen negativen FRET-ratio shift $\Delta R = -0.05$ mit einer apparenten Affinität von $k_D = 0,1 \mu M$ (Abbildung 21, vgl. Einleitungskapitel 4.1). Anhand dieser Daten wurde deutlich, dass das Messfenster zur Bestimmung des k_D-Wertes ungünstig gewählt wurde, da nur drei Messpunkte im R₀-Bereich (vgl. Abbildung 21) lagen. Um Messfehler auszuschließen, wurde die Messung mit frisch angesetzten, geringeren Lysinkonzentrationen wiederholt. Bis diese hergestellt waren, wurde der Sensor bei -20 °C in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3 eingefroren. Die erneute Affinitätsmessung nach 6 Tagen ergab dieselbe Affinität, allerdings ging durch die Lagerung bei -20 °C Sensitivität verloren: Nach Auftauen des Sensors konnte nur noch ein FRET-ratio Shift von $\Delta R = -0,02$ detektiert werden. Eine partielle Denaturierung von Proteinen durch Einfrieren und Auftauen ist ein bekanntes Phänomen, das unter anderem durch die Bildung von Eiskristallen oder temperaturbedingte pH-Verschiebungen erklärt werden kann [169].


Abbildung 21: Bindungsisothermen des 0-nat-0-Sensors. Direkt nach der Affinitätsreinigung wurde eine Konzentrationsreihe von 10^{-5} mM bis 10 mM verwendet (links). Mit geringeren Lysinkonzentrationen aufgenommene Bindungsisotherme nach Lagerung bei -20 °C (rechts). Die Datenpunkte sind Mittelwerte aus drei Messreihen, die in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3 bei 25 °C mit einer Sensorkonzentration von OD_{515 nm} = 0,2 aufgenommen wurden (entsprach 0,18 mg/mL).

Zur Untersuchung der Stabilität wurde der Sensor bei verschiedenen Temperaturen gelagert und nach verschiedenen Zeiten die Fluoreszenzintensität der beiden Fluoreszenzproteine sowie die daraus resultierende FRET-ratio bestimmt. Darüber hinaus wurde eine SDS-PAGE Analyse durchgeführt, um einen möglichen thermisch bedingten Zerfall des Sensors (der z.B. unter gleichen Bedingungen beim Sensor mit permutiertem LAO-BP beobachtet wurde, vgl. Kapitel 1.3) zu erfassen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt. Die SDS-PAGE zeigt, dass keine der untersuchten Bedingungen zu einer Änderung der Größenverteilung in der Probe führt. D.h., dass weder die Konzentration des gelösten Sensors in nennenswerter Weise abnimmt, noch dass eine Degradation des Proteins beobachtet wird. Die Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften des Sensors ergab ein konstantes FRET-Verhältnis (FRET-ratio R₀ ohne Lysin) nach Lagerung des Sensors bei -20°C bzw. bei 4°C über 12 Tage (Abbildung 22 E). Anders war dies bei 25 °C wo sich ein deutlicher Abfall der FRET-ratio nach mehr als einem Tag zeigte. Dies ist durch eine leichte Abnahme des Citrine-Signals bedingt, während das ECFP-Signal stabil bleibt. Daraus lässt sich schließen, dass entweder das Citrine bei 25 °C weniger stabil ist als das ECFP oder sich die Konformation des Bindeproteins ändert, sodass die FRET-Effizienz sinkt. Die Sensitivität wurde aus der Differenz von R₀ (ohne Lysin) und R_{sat} (mit 1 mM Lysin) bestimmt. Wie in Abbildung 22 dargestellt ist, konnte keine stabile Sensitivität nachgewiesen werden, da der in Abbildung 20 gezeigte geringe FRET-Effekt durch die Proteindenaturierung während der Lagerung weiter vermindert und somit nicht mehr signifikant nachweisbar ist.



Abbildung 22: Der 0-nat-0-Sensor wurde bis zu 12 Tage bei -20 °C mit wiederholtem Auftauen und Einfrieren, bei -20 °C mit einmaligem Auftauen, bei 4 °C und bei 25 °C gelagert und Proben für SDS-PAGE und Fluoreszenzspektren abgenommen. Die daraus resultierenden SDS-PAGE zur Kontrolle der Größenverteilung der 0-nat-0-Sensorfraktionen nach Lagerung bei -20 °C und 9 mal wiederholtem Auftauen und Einfrieren (A), bei einmaligem Auftauen (B), bei 4 °C (C) und bei 25 °C (D) sind hier dargestellt. (E): Änderung der minimalen FRET-ratio R₀ nach bis zu 12 Tagen Inkubationszeit. Die in den SDS-PAGE aufgetragenen Proben entsprechen dabei den Datenreihen schwarz (A), rot (B), grün (C) und blau (D). (F): Analog zu (E) wurden die Sensitivitäten (Δ R) der Datenreihen aufgetragen.

Der Sensor mit nativem Lysin- / Arginin- / Ornithin-Bindeprotein und ohne Linker (0-nat-0-Sensor) ließ sich einfach mittels Affinitätschromatographie reinigen und zeigte eine zufriedenstellende Stabilität. Bei 25 °C zeigte er unter den gewählten Bedingungen für ca. einen Tag stabile Fluoreszenzeigenschaften. Die Änderung des FRET-Verhältnisses durch die Lysinbindung war jedoch sehr gering und konnte nur mit frisch gereinigtem Sensor sicher beobachtet werden. Durch Lagerung bei -20°C und 4°C kam es zur partiellen Denaturierung, die sich zwar nicht in einer Degradation des Sensors äußerte, aber in einer Verringerung der Sensitivität resultierte. Die aus der Bindungsisotherme bestimmte Affinität lag bei 0,1 µM.

1.2 Zirkuläre Permutation des Bindeproteins und Verwendung im FRET-Sensor

Aufgrund der erzielten geringen Sensitivität des Sensors mit dem nativen LAO-BP wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit wie oben beschrieben ein permutiertes LAO-Bindeprotein verwendet.

Damit in dem LAO-BP die beiden Termini nicht in direkter Nachbarschaft lokalisiert sind (Abbildung 7), wurde die Gensequenz so verändert, dass zwischen den nativen N- und C-Termini ein Linker von 12 Aminosäuren ((GGS)₄) eingefügt wurde (schwarz markiert in Abbildung 23). Um nun die beiden neuen Termini in verschiedenen Domänen zu lokalisieren und die Konformationsänderung des Bindeproteins in eine ausgeprägtere Änderung der relativen Orientierung der Fluoreszenzproteine zueinander übersetzen zu können, wurde der in Abbildung 23 rot markierte Bereich deletiert. Allerdings verband die beiden Domänen nun nur noch eine Proteinkette, statt zuvor zwei.



Abbildung 23: Modell der zirkulären Permutation basierend auf der dreidimensionalen Struktur des PBP aus *S. typhimurium* mit gebundenem Lysin (pdb-Code: 1LST). Die beiden nativen Termini wurden mit einem (GGS)₄-Linker verbunden und der rot markierte Abschnitt deletiert. Dieser war zuvor eine der beiden Verbindungen zwischen den Domänen. Die beiden Kreise zeigen die Position der beiden neuen Termini.

Ein Modell des Lysinsensors mit permutiertem LAO-BP ist in Abbildung 24 gezeigt.



Abbildung 24: Mögliche Konformation der kombinierten Proteinelemente im Sensor mit permutiertem Bindeprotein (0-perm-0-Sensor). Dargestellt sind die Strukturen von Citrine (pdb-Code: 1HUY), dem LAO-BP aus *S. typhimurium* mit seinem Liganden Lysin (pdb-Code: 1LST) und ECFP (pdb-Code: 2WSN).

Ein erster Produktions- und Reinigungsversuch zeigte nur eine sehr geringe Ausbeute bei der Reinigung des Sensorkonstrukts (Abbildung 25). Das Protein ließ sich leider nicht vollständig vom Säulenmaterial eluieren, sondern zeigte eine sehr starke Bindung zum Säulenmaterial, sodass selbst nach Elution mit 100 mM Imidazol und Waschen mit Ethanol das Säulenmaterial noch gelb statt blau war. Weiterführende Tests zeigten, dass auch eine Behandlung mit 0,5 M NaOH oder Entfernen der Ni²⁺-Ionen vom Säulenmaterials durch EDTA-Behandlung die Proteine nicht vollständig vom Säulenmaterial trennen konnten. Dies deutete auf eine bindende Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial hin, die über die spezifischen Wechselwirkungen über den His-Tag hinausgehen. Die Kontrolle der Reinigung mittels SDS-PAGE ergab, dass neben der erwarteten Bande bei 80,7 kDa zahlreiche Verunreinigungen zu erkennen waren (Abbildung 26). Eine erste Vermutung, dass das Protein bei Vorbereitung für die SDS-PAGE durch das Erhitzen im Probenpuffer fragmentiert wurde, wie vereinzelt in der Literatur beschrieben [170], konnte durch entsprechende Kontrollen bei niedrigerer Inkubationstemperatur (70°C statt 99°C) und eine Verkürzung der Denaturierungszeit von 10 min auf 1 min ausgeschlossen (Abbildung 26). Dies dass werden bedeutet. das Protein sich durch Affinitätsreinigung nicht so reinigen ließ, wie der vergleichbare Sensor mit nativem LAO-BP (vgl. Kapitel 1.1). Da der einzige Unterschied zwischen beiden das Bindeprotein ist, müssen diese Unterschiede darauf zurückgehen. Es ist denkbar, dass aufgrund der durchgeführten Permutation des Bindeproteins hydrophobe Proteinbereiche an die Oberfläche gelangten, die in der nativen Form im Proteininneren lokalisiert waren. Dies würde eine Anfälligkeit für hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Chromatographiematerial und vermutlich auch anderen Materialien erklären. Weiterhin kann die Permutation die Proteinstabilität nachteilig beeinflusst haben. Wie bereits oben beschrieben, werden die beiden Domänen im zirkular permutierten Bindeprotein nicht mehr durch zwei Proteinketten, sondern nur noch durch eine verbunden. Die SDS-PAGE Analyse der "gereinigten" Sensorfraktion lässt zudem vermuten, dass in der mit Imidazol eluierten Fraktion auch Sensorfragmente vorhanden sind, denn es ist zu vermuten, dass die so eluierten Proteine einen His-Tag tragen. Wie diese Sensorfragmente zustande kommen (während der Proteinbiosynthese, durch proteolytischen Abbau in der Zelle oder beim Zellaufschluss) konnte bisher nicht geklärt werden.



Abbildung 25: Chromatogramm der Affinitätsreinigung des 0-perm-0-Sensors mit zirkulär permutiertem Bindeprotein: Gezeigt ist die Absorption bei 280 nm (blau) und die Leitfähigkeit (braun) bezogen auf die gesammelten Fraktionen bzw. das Elutionsvolumen (rot). Der Elutionsbereich des FRET-Sensors ist umrahmt. Die Reinigung wurde mit dem noch nicht optimierten Protokoll mit einer 15 mL-Säule durchgeführt – dabei lag in allen Puffern 20 mM MOPS bei pH 7,3 vor. Zunächst wurden mit drei Imidazolkonzentrationen (0, 5, 10 mM) die nicht spezifisch gebundenen Proteine von dem Säulenmaterial gewaschen (Waschfraktionen), dann folgte die Elution mit 20 mL 100 mM Imidazol in 20 mM MOPS, pH 7,3. Nach Elution des Sensors wurde das Säulenmaterial mit 40 mL 20 % Ethanol in ddH₂O gewaschen.



Abbildung 26: Links: Ausschnitt der SDS-PAGE der im Chromatogramm (Abbildung 25) eingerahmten Fraktionen mit Sensor (Spur 2). Spur 1: Proteinmarker (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder). Rechts: Stabilitätsvergleich der Proteinproben für die SDS-PAGE bei unterschiedlicher Denaturierungstemperatur und Inkubationszeit in Probenpuffer.

Ehe die Reinigung des Sensors weiter optimiert wurde, wurde zunächst mit der angereinigten Fraktion untersucht, ob die zirkuläre Permutation die gewünschte Änderung der Sensitivität verursacht und welchen Einfluss sie auf die Affinität zu verschiedenen Liganden hat. Dazu wurden mit dem angereinigten Sensorkonstrukt Bindungsisothermen mit Lysin, Arginin und Histidin aufgenommen, da auch das verwandte LAO-BP aus S. typhimurium Affinität zu diesen Aminosäuren zeigt [122]. Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, wurde schon mit der angereinigten Proteinfraktion eine sehr hohe Sensitivität des Sensorkonstrukts mit einem FRET-ratio Shift von 0,36 erreicht – die Affinität zu Arginin und Lysin betrug k_{DArg} = 13 µM und k_{DLys} = 60 µM. Bei Histidin war die Löslichkeitsgrenze eher erreicht als der gesättigte Bereich der FRET-ratio, daher kann die Affinität zu Histidin nur abgeschätzt werden LAO-BP S. $(k_{D His} > 3 \text{ mM}).$ Die für das aus typhimurium ermittelten Dissoziationskonstanten aus der Literatur betrugen 14 nM (Arginin), 15 nM (Lysin) und 500 nM (Histidin) [122] und unterschieden sich damit um eine Größenordnung (für Arginin und Lysin), bzw. um fast zwei Größenordnungen (für Histidin) von den hier bestimmten Werten mit dem LAO-BP aus E. coli. Allerdings wurden die Dissoziationskonstanten von Nikaido et al. nur mit einem einzelnen Bindeprotein ohne Fluoreszenzproteine durch Gleichgewichtsdialyse bestimmt. Die abweichenden in den sich Affinitäten sind vermutlich unterscheidenden Messmethoden, Proteinkonstrukten und Ursprungsorganismen begründet.



Abbildung 27: Links: Bindungsisothermen des angereinigten 0-perm-0-Sensors mit zirkulär permutiertem Bindeprotein mit den drei potentiellen Liganden Lysin, Arginin und Histidin. Rechts: Strukturformeln der drei Liganden.

Auch wenn die Reinigung schwierig war, wurde bereits mit dem angereinigten Konstrukt eine sehr hohe Sensitivität von $\Delta R = 0,36$ erreicht (laut Zielsetzung sollte mindestens $\Delta R = 0,2$ erreicht werden). Daher wurde nach der ersten Affinitätsbestimmung zunächst die Reinigung optimiert, um die weitere Charakterisierung mit möglichst reinem Sensor durchführen zu können.

Der angereinigte 0-per-0-Sensor mit zirkulär permutiertem Lysin- / Arginin- / Ornithin-Bindeprotein ohne Linker zeigt eine hohe Sensitivität ($\Delta R = 0,36$) bei einer Affinität von k_{D Arg} = 13 µM und k_{D Lys} = 60 µM. Die zirkulare Permutation wirkt sich allerdings nachteilig auf das Reinigungsverhalten und möglicherweise auch auf die Stabilität aus.

1.3 Reinigungsoptimierung und Stabilität des FRET-Sensors mit zirkulärer Permutation

Der erste Schritt der Reinigungsoptimierung war ein Imidazolgradient (0-300 mM), Proteinfraktion die wodurch eine eluiert werden. wesentlich weniaer Verunreinigungen enthielt als im ersten Versuch, in dem die Proteine isokratisch mit 100 mM Imidazol eluiert wurden (Abbildung 28). Der Erfolg ist in der SDS-PAGE (Abbildung 28) anhand der starken Bande bei 80,6 kDa zu erkennen, allerdings finden sich auch hier immer noch Verunreinigungen im Bereich von 27-35 kDa. Eine weitere Reinigung, bei der allen Puffern 300 mM NaCl zugesetzt wurde, um unspezifische Wechselwirkungen mit der Matrix zu verringern, wurde angeschlossen und zeigte eine ähnliche Verteilung der Proteinbanden in der gereinigten Fraktion. Daher wurde mit einem Western-Blot überprüft, ob diese Proteinfragmente aus Teilen des Sensorproteins bestanden oder ob es sich um E. coli-eigene Proteine handelte.



Abbildung 28: Polyacrylamid-Gel der Fraktionen der Reinigung des 0-perm-0-Sensors mit Imidazolgradient. Spur 1: Proteinmarker (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder). Spur 2: Resuspendiertes Pellet, das nach Aufschluss und Abtrennung der Zelltrümmer verworfen wurde (unlösliche Fraktion). Spur 3: Zur Reinigung eingesetzter Rohzellextrakt. Spur 4: Proteinfraktion, die direkt und ohne Bindung an das Säulenmaterial beim Auftrag des Rohzellextrakts gesammelt werden konnte. Spur 5: Waschfraktion die direkt vor Elution der Proteine eluiert werden konnte. Spur 6: Sensorfraktion, die nach der affinitätschromatographischen Reinigung und anschließendem Entsalzen über Centricons erhalten wurde (vgl. M.M.-Kapitel 2.3.3).

Dazu wurden beide Sensorfraktionen aus den oben beschriebenen Chromatographien zweimal nebeneinander auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und nach der Elektrophorese (vgl. M.M-Kapitel 2.3.6) auf PVDF-Membran geblottet (vgl. M.M-Kapitel 2.3.7). Ein Teil der Membran wurde anschließend mit Coomassie-Lösung gefärbt (vgl. M.M-Kapitel 2.3.6), während der andere mit einem Anti-His-Tag-Antikörper behandelt wurde (vgl. M.M-Kapitel 2.3.7). Das Ergebnis in Abbildung 29 zeigt, dass alle Proteinfragmente auf dem Polyacrylamidgel einen His-Tag aufwiesen, also vermutlich Fragmente des Zielproteins (Sensor) sind. Dies kann bedeuten, dass der Sensor im Produktionsorganismus nicht stabil vorliegt oder dass der Sensor beim Zellaufschluss oder bei der Reinigung zerfällt. Abbildung 29 zeigt auch, dass die eluierten Proteine alle über die gewünschte Wechselwirkung (His-Tag) an das Trägermaterial Ni-NTA-Agarose gebunden hatten. Da die Säule nach der Elution jedoch deutlich gelb war, muss darüber hinaus auch noch eine andere bindende Wechselwirkung vorhanden sein.



Abbildung 29: Links: Polyacrylamid-Gel (vgl. M.M.-Kapitel 2.3.6) der gereinigten 0-perm-0-Sensorfraktionen. Als Proteinmarker wurde die PageRuler Plus Prestained Protein Ladder verwendet. Die Proteinfraktionen wurden mit einem Gradienten von 0-300 mM Imidazol eluiert, in der linken Fraktion war kein NaCl im Reinigungspuffer vorhanden, in der rechten Fraktion war 300 mM NaCl in allen Puffern, die bei der Reinigung verwendet wurden, vorhanden. Mitte: Immundetektion mit Anti-His-Tag Antikörper im Western Blot (vgl. M.M.-Kapitel 2.3.7). Rechts: Mit Coomassie gefärbter Western-Blot zur Detektion aller Proteinfraktionen auf dem Blot.

Um näheren Aufschluss über die Stabilität des Sensors zu erhalten, wurde zunächst dessen Stabilität bei verschiedenen Temperaturen untersucht, ehe weitere Versuche zur Reinigung unternommen wurden. Dazu wurden Sensorfraktionen unterschiedlichen Lagerbedingungen ausgesetzt: in MOPS-Puffer (20 mM, pH 7,3) (A) bei -20 °C und einmaligem Auftauen vor der Messung, (B) bei -20 °C wobei vor jeder Messung alle Fraktionen aufgetaut und anschließend wieder bei -20 °C eingefroren wurden, (C) bei 8 °C und (D) bei 25 °C. Die strukturelle Stabilität der Proben wurde 11 Tage lang durch Fluoreszenzmessungen und mittels SDS-PAGE untersucht. Außerdem wurde ein Kurzzeit-Test bei höheren Temperaturen (25 °C, 50 °C, 75 °C) durchgeführt, um die möglicherweise thermisch induzierte Fragmentierung der Sensoren zu beschleunigen. Die Ergebnisse der Stabilitätstests sind in Abbildung 30 und Abbildung 31 dargestellt. So zeigte sich durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen keine stärkerer Abbau des Sensors, bei -20 °C (Abbildung 30A, B). Bei 8 °C erkennt man nach 7 Tagen bereits eine Zunahme der Sensorfragmente im Bereich von 27 kDa (Abbildung 30C). Dieser Abbau ist bei 25 °C bereits nach einem Tag vollständig (Abbildung 30D). Dabei entsteht offensichtlich nur eine Bande mit ca. 27 kDa. Da dies den Molekulargewichten sowohl der Fluoreszenzproteine als auch des permutierten LAO-BP entspricht, deutet das Ergebnis auf einen thermischen Zerfall des Sensors in seine drei Bestandteile hin.

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen korrelieren erwartungsgemäß mit diesen Beobachtungen. Ein Vergleich der FRET-ratio R₀ (ohne Lysin, Abbildung 30E), zeigte bereits nach einem Tag Inkubation bei 25 °C eine minimale FRET-ratio R₀ von 0,6. Diese lag deutlich unter der anfänglichen minimalen FRET-ratio R₀ von 0,9. Die Zugabe von Lysin ergab hier erwartungsgemäß keine Änderung mehr, da der Sensor unter diesen Bedingungen ja vollständig zerfallen war (Abbildung 30D). Bei 8 °C konnte eine lineare Abnahme der FRET-ratio über 11 Tage beobachtet werden, was ebenfalls mit den Ergebnissen in der SDS-PAGE (Abbildung 30C) korreliert. Die Fluoreszenzintensität bei 528 nm (Citrine Signal) blieb hingegen in allen vier Ansätzen über elf Tage stabil bei 19.000 ± 2000 AU. Da allerdings bei diesen Messungen immer das ECFP angeregt wurde und nicht das Citrine, bedeutet dies, dass vermutlich zumindest ein Teil der Fluoreszenzproteine noch in räumlicher Nähe und stabil vorliegt, während das Gesamtkonstrukt sukzessive seine Funktionalität verliert. Ein weiterer Hinweis dafür ist auch die sinkende Sensitivität in Abbildung 30F. Sie bezeichnet die Differenz zwischen der saturierten FRET-ratio R_{sat} nach Zugabe von 100 mM Lysin und der minimalen FRET-ratio R₀ nach Zugabe von Puffer ohne Lysin und ist also ein Maß für die Funktionalität des Sensors (siehe Abbildung 6). Wie in Abbildung 30 zu sehen ist, bleibt die Sensitivität nur bei der Lagerung bei -20 °C stabil – wobei wiederholtes Einfrieren und Auftauen ebenfalls die Funktionalität des Sensors beeinträchtigt.



Abbildung 30: Der Sensor mit permutiertem Bindeprotein (0-perm-0-Sensor) wurde bis zu 11 Tage bei -20 °C mit wiederholtem Auftauen und Einfrieren, bei -20 °C mit einmaligem Auftauen, bei 8 °C und bei 25 °C gelagert und Proben für SDS-PAGE und Fluoreszenzspektren abgenommen (vgl. M.M.-Kapitel 2.3.8). Die daraus resultierenden SDS-PAGE zur Kontrolle der Größenverteilung der Sensorfraktionen mit permutiertem LAO-BP nach Lagerung bei -20 °C und 9 mal wiederholtem Auftauen und Einfrieren (A), bei einmaligem Auftauen (B), bei 8 °C (C) und bei 25 °C (D) sind hier dargestellt. (E): Änderung der minimalen FRET-ratio R₀ nach bis zu 11 Tagen Inkubationszeit. Die in den SDS-PAGE aufgetragenen Proben entsprechen dabei den Datenreihen schwarz (A), rot (B), grün (C) und blau (D). (F): Analog zu (E) wurden die Sensitivitäten (Δ R) der Datenreihen aufgetragen.

Um abzuschätzen, inwieweit der Sensor für Anwendungen bei 25 °C oder darüber eingesetzt werden kann, wurde die Stabilität über 5 h bei 25 °C, 50 °C und 75 °C nach dem oben beschriebenen Verfahren untersucht. Wie in Abbildung 31 zu sehen ist, ist auch hier die Größe der Sensorfraktionen nicht linear mit deren Funktionalität verknüpft: Durch Inkubation bei 25 °C zeigt sich nach 5 h Inkubation kaum ein Abfall der FRET-ratio ohne Ligand (R₀), allerdings bereits ein leichter Abfall der Sensitivität (ΔR). Bei der 50 °C-Probe zeigte sich in der SDS-PAGE ebenfalls noch kein deutlicher Abbau der Sensorproteine, R₀ und ΔR sanken allerdings. Bei der 75 °C Probe erkennt man nach 2-6 h die Bildung höhermolekularer Aggregate in der SDS-PAGE, danach werden alle Banden kontinuierlich schwächer. Es kommt nicht zu einer Akkumulation der Bande bei 27 kDa, die in der 25 °C-Probe nach einem Tag beobachtet wurde (Abbildung 30D). Der Grund hierfür ist vermutlich, dass in der 75 °C-Probe bereits nach kurzer Zeit das Protein durch Aggregation sukzessive ausfiel und somit in der SDS-PAGE Analyse auch nicht mehr erfasst wurde, da hier nur der lösliche Teil der Probe aufgetragen wurde.

Die Stabilitätsuntersuchungen bei verschiedenen Temperaturen ergaben, dass das zirkular permutierte Bindeprotein das Gesamtkonstrukt im Vergleich zum Sensor mit nativem Bindeprotein deutlich destabilisiert. Die Ergebnisse zeigen, dass es bereits bei moderaten Temperaturen zur Fragmentierung des Sensors kommt. Bereits vorher tritt ein Funktionsverlust in Lösung auf, was anhand von Abbildung 31F deutlich wird. Bei 75 °C scheint die thermisch induzierte Aggregation zu überwiegen, der vermutlich eine partielle Entfaltung des Proteins vorausgeht, erkenntlich an dem raschen Funktionsverlust innerhalb von 15 min (Abbildung 31F).



Abbildung 31: Der Sensor mit permutiertem Bindeprotein (0-perm-0-Sensor) wurde bis zu 5 Stunden bei 25 °C, 50 °C und 75 °C inkubiert (vgl. M.M.-Kapitel 2.3.8) und Proben für SDS-PAGE und Fluoreszenzspektren abgenommen. Die daraus resultierenden SDS-PAGE zur Kontrolle der Größenverteilung der Sensorfraktionen mit permutiertem LAO-BP nach Inkubation bei 25 °C (A), 50 °C (B) und 75 °C (C) sind hier dargestellt. (D): Änderung der minimalen FRET-ratio R₀ nach bis zu 5 h Inkubationszeit. Die in den SDS-PAGE aufgetragenen Proben entsprechen dabei den Datenreihen schwarz (A), rot (B) und grün (C). (E): Analog zu (D) wurden die Sensitivitäten (Δ R) der Datenreihen aufgetragen.

Der Sensor mit permutiertem Bindeprotein wurde durch die Permutation deutlich destabilisiert. Er kann nur bei -20 °C stabil gehalten werden und zerfällt bei 25 °C innerhalb von einem Tag fast vollständig in die Bestandteile ECFP, Citrine und Bindeprotein, die alle eine Größe von ca. 27 kDa haben.

Nachdem die Stabilität des Sensors mit permutiertem Bindeprotein nun besser verstanden war, wurden die Versuche zur Optimierung des Reinigungsprotokolls fortgesetzt. Diese Arbeiten wurden im kleinen Maßstab (100 µL Bettvolumen, beschrieben in M.M.-Kapitel 2.3.2) durchgeführt, um zunächst Bedingungen zu finden, unter denen das Sensorprotein möglichst vollständig und in höchst möglicher Reinheit vom Säulenmaterial eluiert werden konnte. Dazu wurden verschiedene Parameter getestet:

- Verschiedene Trägermaterialien (Agarose-basiertes Ni²⁺-NTA-Material, Magnetpartikel auf Silica-Basis [171] und nichtmagnetisches Material, in dem Ni²⁺-Ionen mit Silica komplexiert vorliegen)
- Zugabe von 300 oder 500 mM NaCl
- Zugabe von Proteaseinhibitor
- Abhängigkeit des Reinigungserfolges von der Temperatur (8 °C oder 20 °C)
- Verschiedene zweiwertige Ionen (Ni²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺) als Zentralion in der IMAC

Für die Reinigungsoptimierung wurde sowohl mit Rohzellextrakt als auch mit bereits gereinigtem Protein gearbeitet. So sollte getestet werden, ob auch Sensorprotein an dem Säulenmaterial haften bleibt, das bereits einmal vom Ni²⁺-NTA-Säulenmaterial eluiert wurde. In Abbildung 32 - 34 sind die vier während der Mini-Reinigung gesammelten Fraktionen dargestellt:

- 1. Der Proteinüberstand nach Bindung an das Trägermaterial.
- 2. Die mit 300 mM Imidazol eluierte Fraktion (in 20 mM MOPS, 300 mM NaCl, pH 7,3).
- 3. Die mit 1 M Imidazol eluierte Fraktion (in 20 mM MOPS, 300 mM NaCl, pH 7,3).
- 4. Das Säulenmaterial nach der Reinigung.

Die verschiedenen Reinigungsverläufe wurden auf mehreren Polyacrylamidgelen aufgetrennt, sie wurden in der Abbildung aber gleich skaliert. Wie zu sehen ist, zeigte sich kein Unterschied zwischen der Reinigung von Rohzellextrakt, bereits einmal gereinigtem Protein oder der Reinigung mittels Agarose- oder Silica-basiertem Material (Abbildung 32: Ni²⁺-NTA, links oder Ni²⁺-Silica, rechts). Bei beiden

Materialien verblieb nach der Elution mit 1 M Imidazol noch Protein auf dem Trägermaterial. Agarose-basiertes NTA-Material, dessen Ni²⁺-Ionen mittels Zugabe von EDTA entfernt worden waren, zeigte allerdings keine Bindung der Sensorproteine. Dies bedeutet, dass die Proteine mit den Ni²⁺-Ionen wechselwirken und nicht mit dem Agarosematerial. Da das Sensorprotein aber durch Waschen mit hohen Imidazolkonzentrationen nicht vollständig vom Säulenmaterial entfernt werden konnte, bedeutet das, dass einige dieser Wechselwirkungen der Verdrängung durch Imidazol offensichtlich nicht zugänglich sind. Dies könnte auf unterschiedliche Sensorkonformationen hindeuten. Beim Test der Magnetpartikel hingegen zeigte sich eine starke Bindung der Proteine an die Magnetpartikel sowohl mit als auch ohne Ni²⁺-Ionen. Dies weist darauf hin, dass der Hexahistidin-Tag des Sensorproteins mit dem Eisen der magnetischen Beads ebenfalls eine starke Bindung eingeht.



Abbildung 32: Überprüfung des Reinigungserfolgs des 0-perm-0-Sensors an verschiedenen Trägermaterialien (NTA und magnetische Beads jeweils mit und ohne Ni²⁺-Ionen, Ni²⁺-Silica-Material) mittels SDS-PAGE. Es wurde jeweils der Überstand der nicht gebundenen Proteine (1), die mit 300 mM Imidazol (in 20 mM MOPS, 300 mM NaCl, pH 7,3) eluierte Fraktion (2), die mit 1 M Imidazol (in 20 mM MOPS, 300 mM NaCl, pH 7,3) eluierte Fraktion (3) und das Trägermaterial (4) aufgetragen. Durch den Balken markiert ist die Höhe des Sensorproteins bei 80,6 kDa. Es wurde sowohl mit Rohzellextrakt (RZE), als auch mit gereinigtem Protein (ger. Protein) gearbeitet (vgl. M.M.-Kapitel 2.3.2).

Im weiteren Verlauf wurden weitere Parameter auf Änderung des Reinigungsergebnisses getestet – dazu gehörten eine geringere Temperatur (8 °C statt 20 °C), die Verwendung von Proteaseinhibitorcocktail (ohne EDTA) oder die Verwendung von höheren NaCl-Konzentrationen in allen Puffern (500 mM statt 300 mM). Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 zusammengefasst. Ob 300 der 500 mM NaCl, die Verwendung von Proteaseinhibitor oder die Reinigung bei einer niedrigeren Temperatur – es zeigte sich das gleiche Reinigungsergebnis. Leider waren die Proteinmengen im auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragenen Säulenmaterial zu gering, als dass sie nach dem Einscannen der Gele noch sichtbar gewesen wären. Durch Betrachtung der Gele war allerdings in allen Trägermaterialfraktionen noch Sensorprotein sichtbar.



Abbildung 33: Zusammenfassung der Reinigungen des 0-perm-0-Sensors bei 8 °C, 20 °C, mit und ohne Proteaseinhibitor (PI) und mit 300 oder 500 mM NaCl in allen Reinigungspuffern. Als Matrix wurde Ni²⁺-NTA-Material verwendet. Es wurde jeweils der Überstand der nicht gebundenen Proteine (1), die mit 300 mM Imidazol (in 20 mM MOPS, 300 bzw. 500 mM NaCl, pH 7,3) eluierte Fraktion (2), die mit 1 M Imidazol (in 20 mM MOPS, 300 bzw. 500 mM NaCl, pH 7,3) eluierte Fraktion (3) und das Trägermaterial (4) aufgetragen. Durch den Balken markiert ist die Höhe des Sensorproteins bei 80,6 kDa (vgl. M.M.-Kapitel 2.3.2).

Um eine verbesserte Reinigung des 0-perm-0-Sensors zu erhalten und eine vollständige Elution des Sensors vom Säulenmaterial zu erreichen, wurden im nächsten Schritt die Bindungseigenschaften verschiedener zweiwertiger Zentralionen in der IMAC getestet. Da in den vorangegangenen Untersuchungen keine Unterschiede mit oder ohne Proteaseinhibitor oder mit 300 oder 500 mM NaCl in den Reinigungspuffern erkennbar waren, sind in Abbildung 34 Versuche ohne Proteaseinhibitor und mit 300 mM NaCl in allen Puffern gezeigt.

Beim Vergleich der zweiwertigen Zentralionen gab es entscheidende Unterschiede in den einzelnen Reinigungen. Die Reinigung mit Ni²⁺-NTA, die auch schon in Abbildung 33 dargestellt wurde, dient hier als Vergleich. Bei der Nutzung von Cu²⁺- Ionen wurde das Zielprotein stärker gebunden als an den Ni²⁺-Ionen – es verblieb mehr Proteine am Material als eluiert werden konnten. Das gleiche Phänomen trat mit Zn²⁺-Ionen auf. Bei Verwendung von Mn²⁺-Ionen hingegen konnte keine Bindung der Proteine an das Säulenmaterial beobachtet werden. So wurde das Ni²⁺-NTA-Säulenmaterial für die weiteren Reinigungen ausgewählt. Aufgrund der Ergebnisse

der Reinigungsoptimierung wurden bei allen weiteren Reinigungen 300 mM NaCl in allen Puffern verwendet, sowie auch Proteaseinhibitorcocktail zugegeben. Dieser zeigte keinen negativen Effekt auf den Reinigungserfolg und sollte das Zielprotein vor eventuell mitgereinigten Proteasen schützen. Zur optimalen Elution mit möglichst geringer Anzahl von Fremdbanden im Polyacrylamid-Gel wurde ein Imidazolgradient von 0-1 M Imidazol angelegt. Die erzielte Reinheit des Sensorproteins lag mit diesem Verfahren bei ca. 90 %.



Abbildung 34: Zusammenfassung der Reinigungen des 0-perm-0-Sensors mit verschiedenen zweiwertigen Ionen, welche in der NTA-Matrix komplexiert vorlagen. Hier gezeigt sind die Reinigungen mit 300 mM NaCI in allen Puffern und ohne Proteaseinhibitor. Es wurde jeweils der Überstand der nicht gebundenen Proteine (1), die mit 300 mM Imidazol (in 20 mM MOPS, 300 mM NaCI, pH 7,3) eluierte Fraktion (2), die mit 1 M Imidazol (in 20 mM MOPS, 300 NaCI, pH 7,3) eluierte Fraktion (3) und das Trägermaterial (4) aufgetragen. Durch den Balken markiert ist die Höhe des Sensorproteins bei 80,6 kDa (vgl. M.M.-Kapitel 2.3.2).

Trotz umfassender Optimierung der Reinigungsparameter konnte der 0-perm-0-Sensor mit permutiertem Bindeprotein nicht vollständig vom Chromatographiematerial eluiert werden. Am besten geeignet war Ni-NTA-Agarose (Qiagen). Die Reinigung konnte aber durch Einsatz eines Imidazolgradienten und durch Zusatz von NaCI wesentlich verbessert werden.

1.4 Aufbau und Charakterisierung der Sensortoolbox

Um die Sensitivität des Sensors mit permutiertem Bindeprotein verändern zu können, wurde eine Toolbox mit Linkern erstellt. Das Einfügen von Linkern zwischen Fluoreszenzproteinen und Bindeprotein kann sowohl positive als auch negative Effekte auf die resultierenden FRET-Verhältnisänderungen haben. Durch einen langen und flexiblen Linker kann sich die Änderung des FRET-Verhältnisses sowohl verstärken, als auch verringern: Zum einen kann die FRET-ratio im ungebundenen Zustand möglichst gering gehalten werden, sodass im Ligand-gebundenen Zustand auch schon durch geringen FRET-Zuwachs eine wesentlich höhere FRET-ratio und damit eine bessere Sensitivität des Sensors entstehen. Zum anderen kann den Fluoreszenzproteinen so aber auch die Möglichkeit gegeben werden, sich freier zu bewegen, sodass auch bei einem Bindeereignis am Bindeprotein keine Änderung in der Ausrichtung der Fluoreszenzproteine zueinander zustande kommt und der Sensor damit unbrauchbar würde. Außerdem kann durch lange, flexible Linker eine Dimerisierung der beiden Fluoreszenzproteine begünstigt werden. Durch Lokalisation am gleichen Protein sind die beiden Fluoreszenzproteine in räumlicher Nähe zu einander. Wenn sie nun ausreichend Bewegungsspielraum haben, kann eine Dimerisierung der beiden β-Fassstrukturen nicht ausgeschlossen werden. So kann die maximale FRET-ratio vergrößert werden. Dies wird begünstigt, da beide Fluorophore keinen A206K-Austausch aufweisen, der laut Literatur die Dimerisierung von GFP-Varianten verhindern kann [172].

Starre, längere Linker können eine Änderung des FRET-Ereignisses verstärken, da so ein stärkerer Hebel entstehen kann oder die Orientierung der beiden Fluorophore stärker fixiert sein kann. Ein vergleichbarer Effekt kann aber auch durch Deletion einiger Aminosäuren an den Enden der zum Sensor verbundenen Proteine erreicht werden, wodurch die Sensitivität im Falle z.B. des bereits erwähnten FLII12Pglu-600-Glukosesensors erhöht werden konnte [70]. Dies soll zur Erhöhung der Starre der einzelnen Bestandteile beitragen und sowohl die Rotationsbewegung, als auch die Abstandsänderung in ein FRET-Signal übersetzen.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Linkersequenzen verwendet (vgl. Einleitungskapitel 4.1): eine starre Linkersequenz, die in Simulationen eine Kurvenform (*turn*) beschrieb (KLYPYDVPDYA) [74], sowie eine sich wiederholende Abfolge von je zwei Glycinen und einem Serin (GGS)₄ [67]. Diese Kombination ist aufgrund ihrer kleinen Aminosäuren und der wiederkehrenden Abfolge besonders flexibel [58,71,73,173,174].

87

Durch Kombination der beiden Linker entstanden zusammen mit dem Linker-freien Prototyp des Sensors (0-perm-0), der bereits oben beschrieben wurde, neun verschiedene Sensorvarianten, die in Tabelle 9 dargestellt sind.

Tabelle 9: Übersicht über die neun Sensorvarianten der Sensortoolbox mit permutiertem Bindeprotein und flexiblen und starren Linker. Die im Text verwendeten Abkürzungen der einzelnen Sensoren sind jeweils über den Piktogrammen dargestellt.

		N-terminal						
		Kein Linker	Flexibler Linker	Starrer Linker				
	Kein Linker	0-perm-0-Sensor	f-perm-0-Sensor	s-perm-0-Sensor				
C-terminal	Flexibler Linker	0-perm-f-Sensor	f-perm-f-Sensor	s-perm-f-Sensor				
	Starrer Linker	0-perm-s-Sensor	f-perm-s-Sensor	s-perm-s-Sensor				

Es wurden die flexiblen und die starren Linkersequenzen sowohl einzeln, als auch in Kombination miteinander getestet. Zur Herstellung der Sensoren mit den unterschiedlichen Linkerkombinationen wurden die Linkersequenzen im Rahmen der Bachelorarbeit von Susann Engelmann über ligasefreie Klonierung an das Bindeprotein angefügt und dann die kodierenden Gene der Linker-Bindeproteinkombinationen mittels Restriktionsverdau und anschließender Ligation in das Vektorkonstrukt mit den beiden Fluoreszenzproteinen kloniert [175]. Die neun Konstrukte wurden mit der optimierten Reinigungsmethode gereinigt (beschrieben in 2.3.1), sodass sie in gereinigter Form zur Sensitivitäts- und Affinitätsbestimmung mit Lysin eingesetzt werden konnten. Wie in den Polyacrylamid-Gelen zu sehen ist, konnten die Sensoren mit der optimierten Methode in einer wesentlich höheren Reinheit gereinigt werden, als bei den ersten Reinigungen des Sensorprototyps mit permutiertem Bindeprotein ohne Linker (Abbildung 35).



Abbildung 35: SDS-PAGE zur Kontrolle des Reinigungserfolgs aller Sensorkonstrukte mit permutiertem Bindeprotein in Tabelle 9 mittels Affinitätschromatographie. Es wurden die in M.M.-Kapitel 2.3.1 beschriebenen optimierten Reinigungsbedingungen verwendet.

Von den neun Sensorkonstrukten wurden Bindungsisothermen mit Lysin als Ligand aufgenommen (Abbildung 36). Um die Bindungsisothermen der Sensorvarianten besser vergleichen zu können, wurden sie gruppiert dargestellt und in jedem der drei Graphen die Bindungsisotherme des Prototyps ohne Linker (0-perm-0-Sensor) abgebildet: Oben sind die Bindungsisothermen der Sensoren ohne N-terminalen Linker dargestellt (A), in der Mitte die mit flexiblen N-terminalen Linker (B) und unten die mit starrem N-terminalem Linker (C).



Abbildung 36: Bindungsisothermen der neun Sensorvarianten mit Kombinationen aus flexiblen und starren Linkern mit Lysin. Zum besseren Vergleich wurden in jeder Abbildung der Bindungsisothermen die Bindungsisotherme des Prototyps ohne Linker (schwarz) dargestellt. A: Sensoren ohne Linker in N-terminaler Position (zwischen ECFP und Bindeprotein). B: Sensoren mit flexiblem Linker in N-terminaler Position. C: Sensoren mit starrem Linker in Nterminaler Position.

Die Ergebnisse zeigen, dass nicht nur die Sensitivität durch das Einfügen der Linker verändert wird, sondern auch die (scheinbare) Affinität der Sensorvarianten. Man sollte in diesem Zusammenhang von scheinbarer Affinität sprechen, da das Bindeprotein bis auf die Permutation nicht weiter verändert wurde und daher die "echte" Affinität des Bindeproteins ohne Linker nicht durch Mutationen beeinflusst wurde.

A. Sensoren ohne Linker in N-terminaler Position (zwischen ECFP und Bindeprotein) In Abbildung 36A ist der Einfluss eines Linkers zwischen Bindeprotein und Citrine (am C-Terminus des Bindeproteins) dargestellt: Mit einem flexiblen Linker (**0-perm-f-Sensor**) sinkt die Sensitivität ($\Delta R = 0,32$ statt 0,57 beim Prototyp **0-perm-0-Sensor**), während sich die scheinbare Affinität erhöht ($k_D = 6 \mu M$ statt 161 μM). Ein starrer Linker in C-terminaler Position hingegen (**0-perm-s-Sensor**) löscht die Sensitivität fast ganz aus ($\Delta R = 0,08$). Alle ermittelten Parameter sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Die verringerte Sensitivität der Sensoren kann durch eine bessere Ausrichtung der Fluoreszenzproteine zueinander auch ohne Ligand bedingt sein. So ist auch die höhere Grund-FRET-ratio (R_0) erklärbar. Die verbesserte scheinbare Affinität kann durch eine höhere Flexibilität oder bessere Zugänglichkeit des Bindeproteins bedingt sein - die Fluoreszenzproteine und das Bindeprotein sind mit ca. 30 kDa alle gleich groß und daher kann der Linker zwischen Fluoreszenzprotein und Bindeprotein eine eventuell auftretende sterische Hinderung während der Konformationsänderung des Bindeproteins durch das Bindeereignis ausgleichen.

Zusätzlich zur Änderung der Sensitivität und der scheinbaren Affinität lässt sich ein Abfall der FRET-ratio bei höheren Lysinkonzentrationen beobachten. Dies kann durch eine Änderung des pH-Wertes bei höheren Lysinkonzentrationen bedingt sein. Durch eine pH-Messung mit dem Kresolrot-Test (vgl. M.M.-Kapitel 2.3.10) konnte ermittelt werden, dass nach Zugabe von Lysin oder Arginin in Konzentration von >10 mM der pH-Wert um bis zu 0,2 pH-Einheiten steigt (Abbildung 37), da die Konzentrationen der Liganden die Pufferkonzentration (20 mM) übersteigen und Aminosäuren selber puffernde Eigenschaften haben. Da jedoch die k_D-Werte der hier untersuchten Sensoren alle deutlich niedriger als 10 mM lagen, wurde die Pufferkapazität nicht angepasst.

91



Abbildung 37: Änderung der pH-Werte der für die Aufnahme von Bindungsisothermen angesetzten Lysin- und Argininlösungen (in 20 mM MOPS, pH 7,3 mit 0,1 g/L Kresolrot) mit verschiedenen Konzentrationen zwischen 10 nM bis 100 mM. Das Kresolrot wurde in 20 mM MOPS-Puffer vorgelegt und nach Mischung von 90 μ L Kresolrot-haltigem Puffer mit 10 μ L Ligand-haltigem Puffer die Absorptionen bei 438, 583 und 680 nm gemessen (vgl. M.M.-Kapitel 2.3.10).

Zudem haben Studien von Moussa *et al.* [76] gezeigt, dass 20 mM MOPS-Puffer ein geeignetes Puffersystem für FRET-basierte Biosensoren mit diesen Fluorophoren (ECFP und Citrine) ist und eine höhere Pufferkonzentration nicht förderlich für die Sensitivität der in dieser Studie untersuchten Glukose- und Maltosesensoren war. Da die verwendeten Fluoreszenzeigenschaften von ECFP und Citrine pH-abhängig sind, kann durch die Änderung des pH-Wertes eine Änderung der FRET-ratio hervorgerufen werden, ohne dass dies mit einer Konformationsänderung des Bindeproteins korreliert. Der Abfall der FRET-ratio bei höheren Konzentrationen kann auch im Fluoreszenzquenching begründet sein: Je höher die lonenstärke der Lösung ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Fluoreszenzproteine nicht ihre maximale Fluoreszenzintensität zeigen, sondern Energie durch Stöße an die Umgebung abgeben.

B. Sensoren mit flexiblem Linker in N-terminaler Position (zwischen Bindeprotein und ECFP)

Durch Einfügen eines flexiblen Linkers war die Sensitivität der Sensoren entweder ähnlich hoch wie beim Sensor ohne Linker (**f-perm-s-Sensor** vs. **0-perm-0-Sensor**) oder wurde bis zu 1,75-fach erhöht ($\Delta R = 1,1$ statt 0,57) (Abbildung 36 B). Auch die scheinbare Affinität wurde durch Einfügen der Linker variiert: Durch Einfügen eines N-terminalen flexiblen Linkers konnte die scheinbare Affinität bereits von 161 μ M (Prototyp: **0-perm-0-Sensor**) auf 65 μ M erhöht werden, mit einem zweiten flexiblen C-terminalen Linker betrug die scheinbare Affinität sogar 3 μ M. Dies bedeutet, dass sich der **f-perm-f-Sensor** 54-fach affiner zu Lysin zeigt, als der Prototyp. Bei Verwendung eines flexiblen Linkers in N-terminaler Position und eines starren Linkers in C-terminaler Position glich die Sensitivität des **f-perm-s-Sensors** dem des Prototyps ohne Linker – die scheinbare Affinität war mit 35 μ M allerdings ähnlich hoch wie beim **f-perm-f-Sensor**.

Durch das Einfügen eines N-terminalen flexiblen Linkers scheint also nicht nur die Sensitivität der Sensoren, sondern auch die scheinbare Affinität der Sensoren verbessert zu werden. Eine weitere Erhöhung der scheinbaren Affinität kann durch das Einfügen von C-terminalen Linkern erreicht werden, wobei der flexible Linker dabei die hohe Sensitivität erhält, während der starre Linker die Sensitivität wieder auf die Ausgangssensitivität senkt.

C: Sensoren mit starrem Linker in N-terminaler Position (zwischen Bindeprotein und ECFP)

In Abbildung 36C zeigt sich mit einem starren Linker an N-terminaler Position eine vollständige Auslöschung der Sensitivität – dieses Ergebnis ist ähnlich zu dem Ergebnis mit dem Sensor mit nur einem starren Linker an C-terminaler Position 0-perm-s-Sensor. Die vollständige Auslöschung der Sensitivität kann dadurch bedingt sein, dass die Konformationsänderung des Bindeproteins nicht mehr in einer Orientierungs- und Distanzänderung der beiden Fluoreszenzproteine zueinander resultiert. Für diese These spricht, dass der Sensor wieder einen messbaren FRETratio Shift zeigt, sobald man dem Konstrukt einen zweiten Linker hinzufügt – ob nun flexibel oder starr. Tatsächlich zeigte das Konstrukt mit einem starren Linker und einem flexiblen Linker (s-perm-f-Sensor) die höchste Sensitivität innerhalb der neun Sensoren ($\Delta R = 1,45$) der Toolbox und auch eine im Vergleich zum Konstrukt ohne Linker verdoppelte scheinbare Affinität ($k_D = 82 \mu M$ statt 161 μM). Die starken Sensitivitätsunterschiede zwischen s-perm-0-Sensor und s-perm-f-Sensor könnten z.B. durch eine Dimerisierung der beiden Fluoreszenzproteine oder eine ähnlich stabile Anordnung bedingt sein, da beide Fluoreszenzproteine nicht den die Dimerisierung behindernden Austausch A206K aufweisen [172]. Bei Einfügen eines

93

flexiblen Linkers wird in der offenen Form des Bindeproteins dann eine für den FRET-Effekt günstige relative Ausrichtung der beiden Fluoreszenzproteine verhindert – daher auch die geringere FRET-ratio ohne Ligand verglichen mit dem **s-perm-0-Sensor**. Nach Konformationsänderung des Bindeproteins bei Ligandbindung können sich die beiden Fluoreszenzproteine dann räumlich näher kommen bzw. optimaler zueinander orientieren.

Bei Verwendung von zwei starren Linkern im **s-perm-s-Sensor** sind beide Fluoreszenzproteine bereits ohne Ligand für eine bessere FRET-Effizienz orientiert und lokalisiert. So weist der **s-perm-s-Sensor** zwar eine höhere Sensitivität auf ($k_D = 18 \mu$ M) und ist damit scheinbar 8,9-fach affiner als das Konstrukt ohne Linker **0-perm-0-Sensor**, zeigt aber durch die hohe Grund-FRET-ratio R₀ eine dem Prototypen ohne Linker vergleichbare Sensitivität von $\Delta R = 0,6$.

	0-perm- 0-Sensor	0-perm-f- Sensor	0-perm-s- Sensor	f-perm-0- Sensor	f-perm-f- Sensor	f-perm-s- Sensor	s-perm-0- Sensor	s-perm-f- Sensor	s-perm-s- Sensor
R ₀	1,49	1,95	2,30	1,51	1,48	1,45	2,20	1,75	2,25
R _{sat}	2,08	2,27	2,38	2,61	2,58	2,08	2,20	3,20	2,85
ΔR	0,59	0,32	0,08	1,10	1,10	0,63	0	1,45	0,60
k	161	6	3	65	3	35		82	18
۳D	± 16 μΜ	±1μΜ	± 0,3 μΜ	± 2 μΜ	± 0,2 μΜ	± 0,3 μΜ	-	± 0,1 μΜ	± 2 μΜ

Tabelle 10: Parameter der mit Lysin aufgenommenen Bindungsisothermen der Sensortoolbox.

Die eingefügten Linker beeinflussen sowohl die Sensitivität als auch die scheinbare Affinität der Sensoren. Es wurden Sensoren erhalten, bei denen die Sensitivität komplett eliminiert wurde (nur ein starrer Linker), bei denen eine 2,5-fach höhere Sensitivität relativ zum Linker-freien Prototyp erreicht wurde (**s-perm-f-Sensor**) und Sensoren, bei denen eine bis zu 54-fach höhere Affinität im Vergleich zum Prototyp erhalten wurde (**f-perm-f-Sensor**). Damit konnte ohne weitere Mutationen des Bindeproteins eine Toolbox von Sensorproteinen für diverse Affinitätsbereiche mit einer hohen Sensitivität generiert werden. Der dynamische Bereich konnte von 20 μ M – 2 mM (Prototyp) auf 0,3 μ M – 2 mM Lysin erweitert werden.

Um eine molekulare Erklärung für die starken Einflüsse der Linker auf die Sensitivität und die scheinbare Affinität der Sensoren zu erhalten, wurde die Wechselwirkung der zirkulären Permutation und der Linker anhand des in Abbildung 38 dargestellten dreidimensionalen Modells des LAO-Bindeproteins betrachtet. In diesem Modell ist die dreidimensionale Struktur des Bindeproteins aus S. *typhimurium* grün dargestellt, mit dem dunkelgrünen Bogen wird die für die zirkuläre Permutation notwendige neue Verbindung zwischen den "alten" Termini symbolisiert. Die so neu entstandenen Termini sind schwarz markiert. Die Aminosäurereste, die näher als 4 Å am grau dargestellten Lysin positioniert sind und damit ihm räumlich so nah sind, dass Wechselwirkungen möglich sind, sind in der Stäbchendarstellung abgebildet. Sie bilden die Bindetasche aus. Alle hier markierten Aminosäuren sind in den LAO-BP von *E. coli* und *S. typhimurium* identisch (vgl. Abbildung 16). Auch die Termini sind in beiden Proteinen identisch. Der schwarz markierte N-Terminus liegt mit einem Abstand von ca. 8 Å in direkter Nähe zur Aminogruppe des Lysins. Die Seitenkette des Lysins liegt in der vom Betrachter entfernten Position. Der C-Terminus des Bindeproteins ist in der Abbildung rechts im Bild dargestellt, hier endet in der nicht permutierten Struktur ein β -Faltblatt. Dieses Faltblatt wird vermutlich in der permutierten Struktur nicht mehr ausgebildet.



Abbildung 38: Dreidimensionales Modell des zirkulär permutierten LAO-Bindeproteins aus *E. coli*. Basis dieses Modelles war die Kristallstruktur des LAO-BP aus *S. typhimurium* (pdb-Code: 1LST). Schwarz markiert sind die beiden neuen Enden auf beiden Seiten der Bindetasche. Grau dargestellt ist der Ligand Lysin, um den Liganden herum sind die an der Komplexbildung beteiligten Aminosäuren als Stäbchenmodelle dargestellt. Die dunkelgrüne Verbindung zwischen den beiden alten Termini des Bindeproteins versinnbildlicht die wegen der zirkulären Permutation eingefügte Linkersequenz.

Durch die Permutation wurde, wie bereits erwähnt, die Anzahl der Proteinketten, die die beiden Domänen des Bindeproteins (die beiden Hälften der Venusfliegenfalle) verbinden, von zwei auf eine halbiert. Das könnte die Flexibilität des zirkular permutierten Bindeproteins gegenüber der nativen Form erhöhen, was vermutlich auch in einer geringeren Thermostabilität resultiert (wie in Kapitel 1.3 diskutiert). Es ist wahrscheinlich, dass die Fusion der beiden Fluoreszenzproteine an den neuen Termini einen unmittelbaren Einfluss auf die Konformation und Flexibilität des Bindeproteins nimmt, denn alle drei Komponenten des Sensors haben dieselbe Größe. Insbesondere aufgrund der Nähe des neuen N-Terminus zur Ligandenbindetasche ist aber außerdem ein Einfluss auf die Affinität des Bindeproteins durch Fusion der fassförmigen Fluoreszenzproteine denkbar. Werden nun Linker am N-Terminus des Bindeproteins eingebaut, so ist das Protein an dieser Stelle flexibler und kann die Bindetasche vermutlich besser stabilisieren. So kann eine verbesserte Affinität erklärt werden. Eine höhere Sensitivität kann durch eine bessere Übertragung der Konformationsänderung des Bindeproteins bedingt sein: Wenn das Fluoreszenzprotein ohne Linker am N-Terminus lokalisiert ist, so besteht die Wahrscheinlichkeit, dass das Fluoreszenzprotein sehr nahe an der Bindetasche, aber auch am gesamten Bindeprotein lokalisiert ist. So kann es sein, dass das Fluoreszenzprotein in einer für den FRET-Effekt ungeeigneten Orientierung positioniert wird. Auch hier kann ein Linker zwischen dem Bindeprotein und dem Fluoreszenzprotein sich günstig auswirken. Bei der Einführung eines Linkers in C-terminaler Position ist die Änderung der Sensitivität durch z.B. die Ermöglichung der Ausbildung des β-Faltblatts wahrscheinlich. Wenn das β-Faltblatt ausgebildet werden kann, so ist das Bindeprotein etwas weniger flexibel, sodass das Fluoreszenzprotein in einer Position "verankert" werden kann.

Diese Betrachtungen zeigen, dass die Affinität des Bindeproteins durch die Fusion mit den Fluoreszenzproteinen unmittelbar beeinflusst werden könnte. Um dies zu überprüfen, wurde die intrinsische Affinität des Bindeproteins als Einzelprotein und im 0-perm-0-Sensor mit einer fluoreszenz-unabhängigen Methode vermessen. Dies wird im nächsten Kapitel beschrieben.

96

Durch die Permutation rückt insbesondere der N-Terminus des permutierten Bindeproteins in direkte räumliche Nähe zur Bindetasche. Dadurch und durch die Tatsache, dass die fassförmigen Fluoreszenzproteine dieselbe Größe wie das Bindeprotein haben, sind direkte Einflüsse der Fluoreszenzproteine auf die Affinität und Sensitivität, sowie der Einfluss von Linkern, erklärbar.

1.5 Vergleichende Bestimmung der Affinität des isolierten permutierten LAO-Bindeproteins und im entsprechenden FRET-Sensor ohne Linker

Um nun die scheinbare Affinität des Sensors mit der tatsächlichen Affinität des Bindeproteins vergleichen und damit den Einfluss der fusionierten Fluoreszenzbestimmen proteine versucht. zu können, wurde mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC, vgl. M.M.-Kapitel 2.3.12) die Affinität des kompletten 0perm-0-Sensors und die des permutierten Bindeproteins fluoreszenzunabhängig zu messen, um tatsächlich nur die bindende Wechselwirkung in der Bindetasche zu erfassen. Bei der Vorbereitung der Messung zeigte sich allerdings eine Komplikation im Messaufbau: Da das Prinzip der ITC auf den Temperaturunterschieden in der Proteinlösung bei Zugabe des Liganden beruht, muss das Protein für die Messung hoch konzentriert vorliegen. Der Lysinsensor (0-perm-0-Sensor) hat allerdings ein Molekulargewicht von 81 kDa und erreicht daher bei seiner Löslichkeitsgrenze von ca. 5 mg/mL nur eine Konzentration von 62 µM. Um mit dieser Sensorkonzentration noch messbare Temperaturunterschiede messen zu können, mussten direkt Pulse mit 1 mM Lysin zugegeben werden, mit denen allerdings keine komplette Bindungsisotherme aufgenommen werden konnte und daher der untere Konzentrationsbereich fehlt, in dem nur wenige Sensormoleküle mit dem Liganden gesättigt sind. Daher kann nur die Größenordnung der Affinität des kompletten Sensorkonstrukts abgeschätzt werden.

Beim Bindeprotein hingegen zeigte sich ebenfalls eine geringe Löslichkeit, aber auch eine höhere Affinität, sodass hier der Wendepunkt in der S-förmigen Bindungsisotherme und damit die Affinität des Konstrukts ohne Fluoreszenzproteine (**0-perm-0**) genauer bestimmt werden konnte.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 39 dargestellt. Hier sind jeweils oben die Energieeinträge ins System in µcal/s über die Dauer der Messung dargestellt,

97

woraus die Affinität, die Bindungsenthalpie, die Bindungsentropie und die Bindungsstellen pro Bindungspartner berechnet werden können. Unten sind die zugehörigen Bindungsisothermen dargestellt – hier wurde die Bindungsenthalpie pro Mol Ligand über das molare Verhältnis von Bindungspartner (Sensor oder Bindeprotein) und Ligand (Lysin) aufgetragen. Links ist eine typische mit dem Bindeprotein aufgenommene Bindungsisotherme dargestellt, während rechts Daten einer Messung mit dem kompletten Sensorkonstrukt dargestellt sind.



Abbildung 39: Mittels ITC aufgenommene Bindungsisothermen des permutierten Bindeproteins (links, 0-perm-0) und des Sensorkonstrukts mit permutiertem Bindeprotein (0-perm-0-Sensor). Die Aufnahme der Messungen wurden im M.M.-Kapitel 2.3.12 beschrieben.

Für das permutierte Bindeprotein (**0-perm-0**) allein wurde eine Affinität von 1,5 μ M (K = 6,65·10⁻⁵ M⁻¹), eine Bindungsenthalpie von Δ H= -5,3 · 10⁻⁴ cal/mol= -223 kJ/mol und 0,37 Bindestellen pro Bindeprotein bestimmt. Außerdem wurde die pro Mol Bindung abnehmende Entropie mit -153 cal/mol/°C = -641 J/mol/°C bestimmt.

Mit dem kompletten Sensorkonstrukt 0-perm-0-Sensor hingegen wurde eine Affinität M⁻¹), 98 иM $(K = 1,02 \cdot 10^{-4})$ eine von kп = Bindungsenthalpie von $\Delta H = -1.75 \cdot 10^{-4}$ cal/mol = -73,3 kJ/mol und eine abnehmende Entropie von $\Delta S = -40 \text{ cal/mol/}^{\circ}C = -169 \text{ J/mol/}^{\circ}C$ bestimmt. Um einen Fit zu ermöglichen, wurde die Anzahl der Bindestellen nach Vorbild des einzelnen Bindeproteins auf N = 0,3 festgesetzt. Ohne Festsetzung der Bindestellen strebte der Wert bei jeder Neuberechnung gegen 0, wurde also unendlich klein. Dies ist durch die nicht vollständig aufzunehmende Bindungsisotherme zu erklären. Wäre es möglich gewesen, vollständige S-förmige Isothermen aufzunehmen, hätte auch dieser Faktor bestimmt werden können.

Die geringe Anzahl mit 0,3 für das Bindeprotein ermittelten Bindestellen impliziert, dass die Proteinkonzentration nicht korrekt bestimmt wurde (sie wurde mittels Absorptionsmessungen bei 280 nm durchgeführt, die aber nur bei denaturierten Proteinen genaue Konzentrationsbestimmung erlaubt) oder dass nur eines von drei Molekülen funktional war. Dann würden sich zwei von drei Molekülen zwar in der Lösung befinden, aber z.B. wegen Fehlfaltung oder Präzipitation keinen Liganden binden können.

Die bestimmten Bindungsenthalpien zeigen, dass die Bindung von Lysin exotherm erfolgt. Die freiwerdende Energie bei Bindung des Liganden durch das **0-perm-0**-Bindeprotein liegt mit -223 kJ/mol sehr hoch (zum Vergleich: Die Bindungsenthalpie von gasförmigem Wasser liegt bei -242 kJ/mol [176]). Dies ist vermutlich der Fall, da nicht nur die Bindung des Lysins, sondern auch die Konformationsänderung des Bindeproteins zu der frei werdenden Energie beitragen. Die Bindungsenthalpie des kompletten Sensorkonstrukts beträgt mit -73 kJ/mol etwa ein Drittel der Enthalpie des einzelnen Bindeproteins. Wahrscheinlich ist die Bindungsenthalpie hier geringer, da nur ein Drittel des gesamten Sensors (das Bindeprotein) eine große Konformations-änderung durchläuft und die beiden Fluoreszenzproteine nur anders lokalisiert werden.

Die mittels ITC bestimmte Affinität des Bindeproteins zu Lysin ist etwa 65-fach höher als die Affinität des Sensorkonstrukts mit Fluoreszenzproteinen (1,5 μ M vs. 98 μ M). Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Affinität des Bindeproteins reproduzierbar messbar war (vierfacher Messansatz, auch mit unterschiedlichen injizierten Lysinkonzentrationen ergab $k_D = 1,6 \pm 0,12 \mu$ M), während mit dem

99

kompletten **0-perm-0-Sensor**konstrukt je nach zugegebener Lysinkonzentration Affinitäten von 59, 73 und 98 μ M bestimmt wurden. Hierbei wurde der k_D = 98 μ M bei dem Ansatz bestimmt, bei dem der Bereich der S-förmigen Bindungsisotherme im geringen molaren Verhältnis am besten aufgelöst werden konnte und der auch in Abbildung 39 dargestellt wurde. Mit noch geringeren Lysinkonzentrationen zu arbeiten war leider nicht möglich, da das Signal / Rausch-Verhältnis dann zu gering gewesen wäre. Trotz der unterschiedlichen Genauigkeit der Messung kann festgestellt werden, dass das permutierte Bindeprotein ohne Fluoreszenzproteine eine wesentlich höhere Affinität (ca. 1-2 Größenordnungen) zum Liganden Lysin zeigt als das komplette Sensorkonstrukt. Dies unterstützt die im vorherigen Kapitel aufgestellte These, dass das permutierte Bindeprotein durch die Fluoreszenzproteine in seiner Konformation und Beweglichkeit beeinflusst wird. Daher kann es sein, dass durch Insertion von Linkern dem Bindeprotein wieder mehr Flexibilität gewährt wird. Dies resultiert dann in einer Erhöhung der scheinbaren Affinität.

Die fluoreszenzunabhängigen ITC-Messungen zeigten eine wesentlich höhere (65-fache) Affinität des Bindeproteins zu Lysin als das gesamte Sensorkonstrukt zeigte. Die Fluoreszenzproteine scheinen das Bindeprotein in seiner Konformation zu beeinflussen.

1.6 Aufbau und Charakterisierung der Sensortoolbox mit nativem Bindeprotein

Um die Theorie der Beeinflussung der Sensitivität und scheinbaren Affinität der Sensoren durch die Nähe zur Bindetasche zu überprüfen, wurde die Linker-Toolbox im Rahmen der Masterarbeit von Julia Otten [168] mit dem Sensor mit nativem Bindeprotein kombiniert. Beim nativen Bindeprotein sind die Termini nicht in direkter räumlicher Nähe zur Ligandenbindetasche (vgl. Abbildung 7), sodass hier nur die Flexibilität der Fluoreszenzproteine variiert werden dürfte, sollte diese Theorie zutreffen.

Bei den bisherigen Messungen der Variante ohne Linker (0-nat-0-Sensor) mit Lysinkonzentrationen bis zu 10 mM konnte eine nur sehr geringe negative Sensitivität bei einer Affinität von 0,1 µM beobachtet werden (vgl. Kapitel 1.1).

Von den neun möglichen Sensorkonstrukten der Toolbox konnten sieben hergestellt und untersucht werden. Ein Überblick über die unterschiedlichen Reaktionen auf hohe Lysinkonzentrationen (50-500 mM) ist in Abbildung 40 dargestellt, die daraus bestimmten Parameter in Tabelle 11.



Abbildung 40: Titrationskurven der sieben Sensorvarianten mit nativem Bindeprotein mit Kombinationen aus flexiblen und starren Linkern mit Lysin. Zum besseren Vergleich wurden in beiden Abbildungen die Bindungsisotherme des Ausgangskonstrukts ohne Linker (schwarz) dargestellt. Links: Sensoren mit flexiblem Linker in N-terminaler Position. Rechts: Sensoren mit starrem Linker in N-terminaler oder C-terminaler Position.

	0-nat-0- Sensor	0-nat-s- Sensor	f-nat-0- Sensor	f-nat-f- Sensor	f-nat-s- Sensor	s-nat-f- Sensor	s-nat-s- Sensor
R ₀	2,27	2,12	2,44	1,92	2,32	3,15	2,61
R _{sat}	1,21	1,60	1,52	1,28	1,62	1,65	1,65
ΔR	-1,06	-0,52	-0,92	-0,64	-0,70	-1,50	-0,96
k _D	438 ± 103 mM	73 ± 18 mM	33 ± 5 mM	43 ± 10 mM	42 ± 8 mM	31 ± 4 mM	70 ± 12 mM

Tabelle 11: Parameter der mit Lysin aufgenommenen Bindungsisothermen der Sensortoolbox mit nativem Bindeprotein.

Bei genauer Untersuchung der Toolbox zeigte sich, dass das native Bindeprotein im µM-Bereich eine aufgrund der geringen Sensitivität nur schwach zu erkennende Affinität zu Lysin zeigte, die auch nicht durch Einfügen der Linker beeinflusst wurde. Da diese Affinität in der gewählten y-Achsenskalierung nicht sichtbar war, wird sie hier nicht gezeigt. Der Abfall der FRET-ratio bei hohen Lysinkonzentrationen aber war von der Anzahl und Art der Linker abhängig. Dies bedeutet, dass man so eine zweite Toolbox erhält, die wahrscheinlich auf einem anderen molekularen Mechanismus basiert und einem dynamischen Bereich zwischen 10 und 400 mM Lysin zeigt. Wie in Abbildung 40 zu sehen ist, konnten nicht alle Sensorkonstrukte bis zum Erreichen des unteren Plateaus vermessen werden, besonders der **0-nat-0-Sensor**. Dies wurde durch die Löslichkeitsgrenze von Lysin bei 1 M in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3 bedingt. Bei einem Standardansatz wurden 90 μ L Sensorlösung mit 10 μ L Lysinlösung eingesetzt – damit die Sensoren nicht zu hoch konzentriert werden mussten und trotzdem ein ausreichend starkes Messsignal detektierbar war. Bei den hier dargestellten Messungen wurden die Sensorlösungen 1,8-fach konzentriert (auf 0,32 mg/mL) und dann 50 μ L Sensorlösung mit 50 μ L Lysinlösung versetzt. So blieb die Sensorkonzentration im Messansatz gleich, es konnten aber Bindungsisothermen mit Lysinkonzentrationen bis 0,5 M aufgenommen werden.

Dass die FRET-ratio nicht bis zum unteren Plateau aufgenommen werden konnte war besonders bei der Bestimmung der Affinität des **0-nat-0-Sensors** von Belang: Durch Anpassung der Messwerte mit Funktion (2) (vgl. Einleitungskapitel 4.1) wurde das Erreichen des Plateaus für eine FRET-ratio von 1,21 abgeschätzt. Diese Bindungsisotherme konnte hingegen nur bis R = 1,71 aufgenommen werden. Das heißt, dass in diesem Fall die Affinität nicht genau bestimmt werden kann. Dies ist ebenfalls in Tabelle 11 durch die hohe Standardabweichung erkennbar (k_D = 438 ± 103 mM). Deutlich erkennbar ist allerdings, dass bei dieser Toolbox die scheinbaren Affinitäten (bis auf die Affinität des Sensors ohne Linker, der nicht bis zum Erreichen des Plateaus gemessen werden konnte) nur um einen Faktor 2 schwankten (s-nat-f-Sensor mit einer scheinbaren Affinität von 31 mM vs. 0-nat-s-Sensor mit einer scheinbaren Affinität von 73 mM). Dies bestätigt die Vermutung, dass die Linker, da sie nicht in direkter Nähe zur Bindetasche positioniert sind, vor allem die Flexibilität und Positionierung der Fluoreszenzproteine beeinflussen. So wird sowohl die FRETratio ohne Ligand R₀ durch die Linker beeinflusst (Schwankung zwischen 1,92 und 3,15), als auch die Sensitivität (ΔR von 0,52 bis 1,50). Die höchste Sensitivität wurde, wie bei der Sensortoolbox mit permutiertem Bindeprotein, beim Einsatz eines starren Linkers in N-terminaler und eines flexiblen Linkers in C-terminaler Position erhalten. Die niedrigen Affinitäten der Toolbox mit nativem Bindeprotein lassen allerdings auf eine unterschiedliche Beeinflussung der Fluoreszenzproteine schließen, anstelle der Modulation der scheinbaren Affinität des Bindeproteins. Dies kann z.B. durch unterschiedlich starkes Fluoreszenzquenching oder unterschiedliche Wechselwirkungen der Fluoreszenzproteine auf pH-Wertänderungen in der Lösung bedingt sein. Diese ist wahrscheinlich, da bereits bei Verwendung von bis zu 100 mM Lysin eine pH-Wertänderung um bis zu 0,2 Einheiten festgestellt werden konnte (vgl. Abbildung 37).

Um diese Effekte ohne den Einfluss des Bindeproteins untersuchen zu können, wurden ebenfalls im Rahmen der Masterarbeit von Julia Otten [168] die beiden Fluoreszenzproteine Citrine und ECFP einzeln gereinigt und dann in äquimolarem Verhältnis zur "Affinitätsmessung" mit Lysin eingesetzt. Wie in Abbildung 41 zu sehen ist, konnte auch hier eine scheinbare Bindungsisotherme aufgenommen werden. Dies bedeutet, dass die Fluoreszenzproteine tatsächlich unterschiedlich auf die hohen Lysinkonzentrationen reagieren – aber auch, dass durch die Anwesenheit des Bindeproteins dieser Effekt moduliert werden konnte. Durch die Anordnung der Fluoreszenzproteine mit den verschiedenen Linkern ist der FRET-Effekt möglich und wird entweder verstärkt (f-nat-0-Sensor) oder verringert (f-nat-f-Sensor). FRET tritt bei den beiden in der Lösung frei vorliegenden Fluoreszenzproteinen wahrscheinlich nicht auf, allerdings ändern sich die Fluoreszenzsignale der einzelnen Fluoreszenzproteine unterschiedlich bei der Zugabe von Lysin. Dies bedeutet, dass die in Abbildung 41 gezeigten Kurven auch durch die unterschiedlichen Eigenschaften der einzelnen Fluoreszenzproteine ECFP und Citrine bedingt sind, genauer durch ihre Antwort auf hohe Konzentrationen von Lysin und den daraus resultierenden pH-Wertänderungen (vgl. Abbildung 37) und der dort beobachtete Effekt durch die unterschiedliche Distanz durch die Linker und das Bindeprotein moduliert wird.



Abbildung 41: Änderung der FRET-ratio einer äquimolaren Citrine/ECFP-Mischung in Gegenwart von hohen Lysinkonzentrationen. Messungen in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3 bei 25 °C, dargestellt sind Mittelwerte aus drei Messungen.

Durch die Kombination der Linker-Toolbox mit dem Sensorkonstrukt mit nativem Bindeprotein konnte eine weitere Sensortoolbox geschaffen werden. Sie ist für die Detektion von hohen Lysinkonzentrationen (10 bis 400 mM) geeignet. Der Lysinerkennende Mechanismus beruht hier vor allem auf der Wechselwirkung der Fluoreszenzproteine mit den Umgebungsbedingungen und weniger auf der Konformationsänderung des Bindeproteins bei Lysinbindung.

1.7 Versuche zur Strukturuntersuchung der neuen Lysinsensoren

Die bisherigen Erklärungsversuche des Einflusses der Linkerkombinationen auf die Sensorparameter waren insbesondere durch die fehlende Strukturinformation limitiert. Da bisher noch keine Kristallstrukturanalysen von FRET-basierten Biosensoren mit ECFP und Citrine als Fluorophore existieren, sondern nur die Hüllstruktur eines ähnlichen Sensors mittels SAXS (*small angle x-ray scattering*) bestimmt wurde [177], wurde versucht, zunächst den Prototyp (**0-perm-0-Sensor**) zu kristallisieren.

Nachdem die ersten Kristalle gezüchtet werden konnten (1:1-Verhältnis 15 % PEG 6000, 5 % Glycerol, 30-68 Tage Wachstumszeit), wurde die Struktur von PD Dr. Joachim Granzin (ICS-6, Forschungszentrum Jülich) gelöst. Dabei zeigte sich, dass die Sensorproteine nach der langen Kristallisationszeit nicht mehr vollständig vorlagen und nur noch die beiden Fluoreszenzproteine in den Kristallen vorhanden waren. Hierbei lagen beide Fluoreszenzproteine ECFP und Citrine in einem Kristall vor: Es konnten jeweils Aminosäuren aus beiden Fluoreszenzproteinen nachgewiesen werden. Die Struktur ist in Abbildung 42 dargestellt. Die in der Abbildung markierten Aminosäuren übereinstimmten. Die erwartete Aminosäuresequenz wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz translatiert.



Abbildung 42: Bei der Kristallisation von Sensorproteinen gewachsene orthorhombische Kristalle. Links: ohne Ligand gewachsen, ca. 0,2 cm lang. Mitte: mit 10 mM Arginin in der Lösung gewachsen, ca. 0,05 cm lang. Rechts: Aus den Kristallen errechnete Kristallstruktur der Proteine. Die Struktur entspricht bis auf die markierten Aminosäuren einem ECFP.

Von den nicht passenden Aminosäuren konnten zwei in der Sequenz des Citrine gefunden werden, daher wurde auf eine Kokristallisation von ECFP und Citrine geschlossen. Dies ist möglich, da die beiden Fluoreszenzproteine sich nur durch wenige Aminosäureaustausche unterscheiden, es wurde allerdings für GFP-Varianten noch nicht beschrieben. So können die in der Struktur und der Aminosäuresequenz gelb markierten Austausche I \rightarrow N und T \rightarrow Y entstanden sein. Die Aminosäure, die weder im Citrine noch im ECFP vorkommt, ist das rot hervorgehobene Isoleucin, das laut Gensequenz ein Aspartat sein sollte. Dieses ist aber direkt am äußeren Rand des β-Fasses lokalisiert und kann sich daher in verschiedene Konformationen gedreht haben, sodass die Elektronendichte nicht eindeutig war (Vergleich Aspartat und Isoleucin in Abbildung 43). Das Bindeprotein ließ sich in der aufgelösten Kristallstruktur nicht mehr nachweisen, daher wurde aus diesem Kristallisationsansatz eine Proteinprobe mittels SDS-PAGE analysiert. Hier war eine ähnliche Größenverteilung zu sehen wie in Abbildung 30, Lagerung bei 25 °C: Es konnte nur noch eine Proteinbande bei ca. 25 kDa nachgewiesen werden. Dies ist die Größe, bei der sowohl die Fluoreszenzproteine als auch das einzelne Bindeprotein mit jeweils 27 kDa nachgewiesen werden könnten. Das bedeutet, dass das Sensorkonstrukt in seine drei Proteinteile zerfällt. Diese Beobachtung deckt sich mit den in Kapitel 1.3 beschriebenen Untersuchungen zur Stabilität des Sensors.

GEELFTGVVPILVILLIGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFIC TTGKLPVPWPTLVTTLTWGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMP EGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKED GNILGHKLEYN NYHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSV QLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLGYQSALSKDPNEKRDH MVLLEFVTAAGI



Abbildung 43: Oben: Aminosäuresequenz des kristallisierten Teils von ECFP. Die Aminosäureaustausche in der Sequenz sind farblich hervorgehoben. Unten: Kalottenmodell zur Veranschaulichung der ähnlichen Struktur von Aspartat und Isoleucin.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die Fluoreszenzproteine gut zu kristallisieren sind und dass ein erneuter Kristallisationsversuch erst mit einem stabileren Bindeprotein zu empfehlen ist.
2. Lysinbestimmung in Kulturüberständen

Zur Lysinbestimmung in Kulturüberständen sollten FRET-basierte Biosensoren eingesetzt werden, um das in Kapitel IV beschriebene vorhandene Methodenspektrum aus instrumenteller und kolorimetrischer Analytik für die Lysindetektion zu erweitern und eine Atline- oder Online-Analytik für Lysin zu etablieren. Als **Online-Analytik** wird hierbei eine kontinuierliche Analytik bezeichnet, die während des kompletten Prozesses ohne Zeitverzögerung gemessen wird [178]. Dies wäre möglich, wenn der Biosensor in den Kulturüberstand gegeben werden könnte und mit diesem kontinuierlich die Produktbildung detektiert werden könnte. Als **Atline-Analytik** wird in diesem Kontext die Detektion von Lysin in der *Flowerplate* in einem nicht-kontinuierlichen Prozess bezeichnet. Dazu wurde zunächst der Einfluss des pH-Wertes auf den Biosensorprototyp (**0-perm-0-Sensor**) und dann der Einsatz und die Stabilität des 0-perm-0-Sensors in den zur Kultivierung eingesetzten Kultivierungsplatten (48-well *Flowerplates*, vgl. M.M.-Kapitel 2.2.4e) und dem entsprechenden Medium getestet. Anschließend wurde dann ein Verfahren zur Atline-Bestimmung von Lysin entwickelt (vgl. Kapitel 2.4).

Als Vorarbeiten zur Etablierung eines schnellen Screeningsystems zur Auswahl von Biosensoren mit hoher Sensitivität und geeigneter Affinität wurde die Anwendung von Sensor-exprimierenden *E. coli*-Zellen ("Sensorzellen") ebenfalls evaluiert (vgl. Kapitel 2.5).

2.1 Varianz des Sensorsignals

Der **0-perm-0-Sensor** zeigte durch die Verwendung des permutierten Bindeproteins eine verringerte Stabilität (vgl. Kapitel 1.3), aber auch eine sehr hohe Sensitivität von $\Delta R = 0.36$ (in angereinigter Form, Abbildung 27), bzw. $\Delta R = 0.57$ (in gereinigter Form, Abbildung 36). Ebenso wie die Sensitivität wird auch die Form der Bindungsisotherme und die daraus abgeleitete Sensitivität und Affinität dieses Sensors durch Lagerung bei -20 °C oder durch die Reinheit des Proteinkonstrukts beeinflusst (Abbildung 44). Dies ist vermutlich durch die verringerte Stabilität und den dadurch unterschiedlichen Anteil von funktionalen Sensormolekülen und Sensorfragmenten im System bedingt und zeigte sich auch bei der ITC-basierten

Bestimmungen der Affinität (k_D ungefähr 100 µM, vgl. Kapitel 1.5). So wurde mit den in Abbildung 44 dargestellten Fraktionen für den angereinigten Sensor Affinitäten von 60 µM (angereinigter Sensor), 160 µM (frisch gereinigter Sensor) und 180 µM (bei -20 °C gelagerter gereinigter Sensor) erhalten. Außerdem zeigt sich auch eine veränderte Kurvenform, sobald der Sensor einmal bei -20 °C gelagert wurde: der dynamische Bereich verbreitert sich und die Kurve erreicht ihr Plateau erst bei höheren Lysinkonzentrationen. Daher ist es vorteilhafter, die Messung eines bereits einmal bei -20 °C gelagerten Sensors mit einer um einen Faktor für die Bindestellen erweiterten Form der Affinitätsgleichung zu berechnen. Wird die oben angegebene Formel nun um die Anzahl der Bindestellen **n** ergänzt (was hier als Näherung für den Anteil von aktiven und inaktiven Proteinen im System angenommen werden kann), so entspricht sie einer Hill-Gleichung [179]:



Abbildung 44: Bindungsisothermen des 0-perm-0-Sensors mit permutiertem Bindeprotein in unterschiedlichen Reinigungs- und Lagerungszuständen. Es wurden immer die gleichen Absorptionen eingestellt ($OD_{515 nm} = 0.2$, entspricht 0.18 mg/mL), um so unabhängig vom Reinigungszustand die gleiche Menge an Sensor in der Lösung zu erhalten. Es wurden ein angereinigtes Konstrukt, das bereits in Abbildung 27 gezeigt wurde (schwarz), ein frisch gereinigtes Konstrukt, das bereits in Abbildung 36 gezeigt wurde (rot) und ein bei -20 °C gelagertes Konstrukt (grün) dargestellt. Der bei -20 °C gelagerte Sensor wurde 2 Monate bei -20 °C gelagert, bevor er zur Messung mit Lysin eingesetzt wurde. Zusätzlich zur Auswertung mit Gleichung 2 wurde hier im dritten Fall auch eine Auswertung mit der Hill-Gleichung durchgeführt (dunkelgrüne Datenanpassung).

Mit der erweiterten Gleichung konnte die Form der mit der gelagerten Fraktion aufgenommenen Bindungsisotherme sehr gut beschrieben werden (Abbildung 44, dunkelgrüne Kurve). So wurde eine Affinität der Sensorfraktion von $k_D = 200 \ \mu M$ erhalten.

Es handelt sich bei der hier gezeigten Studie um die Untersuchung eines Biosensorprototyps, bei dem die verringerte Stabilität im Austausch gegen eine höhere Sensitivität in Kauf genommen wurde. Bei weiteren Anwendungen von FRETbasierten Biosensoren zur Metabolitanalytik kann ein anderes, stabileres Bindeprotein gewählt werden, um diese Stabilitätsprobleme zu umgehen. Allerdings müssen diese Sensoren bei der Anwendung in komplexen Systemen ohnehin in jedem System kalibriert werden, da die Messsignale von vielen verschiedenen Faktoren abhängig sind – beispielhaft wird daher im nächsten Kapitel der Einfluss des pH-Wertes auf die Bindungsisothermen dargestellt.

Die Sensorparameter, wie Affinität und Sensitivität, ändern sich während des Reinigungs- und Lagerungsprozesses, dies ist vermutlich durch die Permutation des Bindeproteins und die damit verbundene Destabilisierung bedingt. Bei Verwendung des Sensors muss daher mit jeder Messung eine frische Kalibration durchgeführt werden.

2.2 Einfluss des pH-Wertes

Wie bereits von Moussa *et al.* [75,76] untersucht, werden die genetisch kodierten Biosensoren von den Umgebungsbedingungen stark beeinflusst. So zeigte z.B. der von ihm untersuchte Glukosesensor veränderte Affinitäten und Sensitivitäten bei pH-Werten von 6,3 – 8,3. Auch die Ionenstärke führte zu veränderten Bindungsisothermen, ebenso wie die Anwesenheit von ein- und zweiwertigen Ionen oder von anderen Metaboliten. Zu den extrazellulären Faktoren, die sich bei einer Kultivierung von *C. glutamicum* am stärksten ändern, gehören sowohl der pH-Wert, als auch die Konzentration von Glukose, organischen Säuren wie Acetat oder Lactat und natürlich die Lysinkonzentration (bei Lysinproduzenten). Als ein Beispielfaktor wurde der Einfluss des pH-Wertes auf den **0-perm-0-Sensor** untersucht. Die Ergebnisse der Aufnahme von Bindungsisothermen bei pH 6,7 bis 7,2 sind in Abbildung 45 dargestellt. Links sind die Bindungsisothermen unverändert zu sehen, rechts sind die Kurven zum direkten Vergleich der Sensitivität normiert dargestellt (aufgetragene Werte: $R-R_0$). Besonders deutlich ausgeprägt ist die Abhängigkeit der FRET-ratios ohne Ligand (R_0) vom pH-Wert: Diese variieren zwischen 1,15 bei pH 7,2 und 1,88 bei pH 6,7. Auch die FRET-ratio im gesättigten Zustand (R_{sat}), die Sensitivität und die Affinität variieren stark. Es sind zwei Trends in der Darstellung zu erkennen: Je höher der pH-Wert ist, desto höher ist die Sensitivität und je höher der pH-Wert ist, desto geringer ist die Affinität des Sensors zum Liganden Lysin.

Die in Abbildung 45 dargestellten Regressionskurven wurden nicht mit der in der Einleitung angegebenen Formel (2) auf Seite 21 bestimmt, da diese nur bei Bindungsisothermen mit steilerem Anstieg angewendet werden kann. Die Formel beruht auf der Theorie, dass an jedem Bindungspartner genau eine Bindestelle verfügbar ist. Für die Messung bei verschiedenen pH-Werten musste der Sensor umgepuffert werden, was mittels dreifachem Pufferaustauschs in Centricons durchgeführt wurde (vgl. M.M.-Kapitel 2.3.3). So wurden die Sensormoleküle während der Zentrifugationsschritte Scherkräften ausgesetzt, was zur partiellen Inaktivierung führen konnte. Dies würde bedeuten, dass die Zahl aktiver Sensorproteine nicht mit der Zahl löslicher Proteine übereinstimmt, was ein Grund zu sein scheint, warum die Bindungsisothermen in den hier dargestellten Messungen flacher waren. Ein ähnliches Verhalten der Sensorproteine wurde auch bei den ITC-Messungen angenommen (vgl. Kapitel 1.5) und in Kapitel 1.3 als Folge der Lagerung bei -20 °C beschrieben. Daher wird die in Kapitel 2.1 eingeführte Formel (10) zur Auswertung der Kurven verwendet.

So konnten trotz der flacheren Kurven die Affinitäten des Sensors bei den verschiedenen pH-Werten bestimmt werden (Tabelle 12). Allerdings zeigte sich auch, dass durch den Pufferwechsel Affinität verloren ging. Dabei spielt vermutlich nicht nur der pH-Wechsel sondern auch die mechanische Belastung eine Rolle. So konnte nach dem Pufferaustausch in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,2 nur noch eine Affinität von 1,66 \pm 0,56 mM bestimmt werden, während ohne Pufferaustausch der Sensor bei pH 7,3 noch eine Affinität von 161 μ M zeigte (Tabelle 10). Da die Sensorfraktionen beim Pufferaustausch alle gleich behandelt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die in Abbildung 45 gezeigten Trends auch auf Sensoren zutreffen, die vollständig aktiv sind.



Abbildung 45: Bindungsisothermen des 0-perm-0-Sensors mit gleicher $OD_{515 nm} = 0.2$ (entspricht 0,18 mg/mL) bei pH-Werten von 6,7 bis 7,2 in 20 mM MOPS-Puffer. Links: Bindungsisothermen (nicht normiert). Rechts: Normierte Bindungsisothermen zum besseren Vergleich der Sensitivität bei den verschiedenen pH-Werten. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 Messungen.

Die normierte Darstellung der Bindungsisothermen in Abbildung 45 zeigt, dass der Abstand zwischen R₀ und R_{sat}, also die Sensitivität des Sensors, mit dem pH-Wert steigt. Die höhere Sensitivität bei höheren pH-Werten ist vermutlich durch den unterschiedlichen Einfluss des pH-Werts auf die Einzelfluoreszenzproteine bedingt (siehe [75,76]). Die geringere Affinität bei höheren pH-Werten ist hingegen vermutlich durch die Wechselwirkung von Bindeprotein und Ligand bedingt. Diese basiert auf der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, bei denen geladene Gruppen miteinander interagieren (Abbildung 8). Dies ist stark pH-abhängig, da bereits geringe Unterschiede im pH einen großen Einfluss auf die Ladung der Aminosäurereste haben können. Lysin selbst hat mit 9,2 für die α-Aminogruppe und 10,8 für die ϵ -Aminogruppe pK_S-Werte, die weit von dem getesteten pH-Bereich von 6,7-7,2 entfernt liegen [180]. Auch die pK_S-Werte der Aminosäureseitenketten in der Bindetasche (2 Serin- und 2 Aspartatreste, Abbildung 16) liegen weit entfernt von dem untersuchten pH-Bereich (z.B. Aspartat mit $pK_{S(B-COOH)} = 3,9$ [180,181]). Allerdings tritt bei Aminosäuren in Peptidketten oft eine Verschiebung des pKs-Wertes der Aminosäurereste durch die Umgebung der Aminosäuren auf. Eine Übersicht über die verschiedenen beeinflussenden Parameter gibt z.B. Jensen in einem Review [182]. So kann in der Bindetasche die Dissoziation von Protonen erleichtert werden und es können die elektrostatischen Interaktionen zwischen Protein und Ligand durch die veränderten pK_S-Werte bereits zwischen pH 6,7 und 7,2 stark beeinflusst werden.

Dieser Effekt muss bei der Messung in Kulturüberständen berücksichtigt werden: Da Bakterien während des Wachstums z.B. organische Säuren wie Acetat exportieren oder wieder aufnehmen, variiert der pH-Wert während einer Kultivierung. Wenn nun der Biosensor bei unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten und damit bei verschiedenen pH-Werten eingesetzt wird, muss er so genau wie möglich kalibriert werden, um die damit verbundenen Änderungen in Sensitivität und Affinität ausgleichen zu können.

Tabelle 12: Parameter der mit Lysin aufgenommenen Bindungsisothermen des 0-perm-0-Sensors mit permutiertem Bindeprotein bei unterschiedlichen pH-Werten in 20 mM MOPS-Puffer.

рН	6,7	6,8	6,9	7,0	7,1	7,2
R ₀	1,88	1,78	1,59	1,55	1,21	1,15
R _{sat}	2,15	2,10	2,00	1,99	1,76	1,69
ΔR	0,27	0,32	0,41	0,44	0,55	0,54
k _D	22 ± 5 µM	50 ± 7 µM	177 ± 30 μM	152 ± 47 μM	1,99 ± 0,65 mM	1,66 ± 0,56 mM

Die Aufnahme von Bindungsisothermen bei unterschiedlichen pH-Werten zeigte, dass sich Affinität und Sensitivität des Biosensors (0-perm-0-Sensor) pH-abhängig ändern. Dabei treten zwei Trends auf: Bei höheren pH-Werten zeigte sich eine höhere Sensitivität und eine geringere Affinität zum Liganden Lysin.

2.3 Sensorstabilität in unterschiedlichen Mikrotiterplattendesigns

Zur Vorbereitung der Messung in Kulturüberstand von Lysin-produzierenden Zellen wurde zunächst die Stabilität des Sensorprototyps (**0-perm-0-Sensor**) im Messsystem ohne Zellen untersucht.

Dazu wurde der Sensor in eine *Flowerplate* gegeben (48-Well Platte, dargestellt in Abbildung 9) und 1:1 mit dem CGXII-Kultivierungsmedium versetzt, das standardmäßig zur Kultivierung der Lysin-produzierenden *C. glutamicum* Zellen verwendet wird [134]. Dann wurde im BioLector®-Kultivierungssystem die zeitabhängige Änderung der Bindungsisothermen aufgenommen (Abbildung 46), um die Stabilität des Sensors im Messsystem zu untersuchen. Es zeigte sich, dass die Sensitivität des Sensors bereits nach 16 min nachließ und nach 21 min keine definierte Bindungsisotherme mehr detektiert werden konnte.



Abbildung 46: Zeitabhängige Änderung der mit definierten Lysinkonzentrationen in CGXII-Medium in *Flowerplates* aufgenommenen Bindungsisothermen mit dem 0-perm-0-Sensor. Mischung von 500 μ L CGXII-Medium mit 10 g/L Glukose und 500 μ L Sensor in 20 mM MOPS, pH 7,3. Sensorkonzentration im Messansatz: OD _{515 nm} = 0,1 (entspricht 0,09 mg/mL). Zunächst wurde das Lysin-haltige Medium vorgelegt, dann mit der Sensorlösung vermischt und anschließend bei 30°C, 1000 rpm gemessen. Dabei wurden die Fluoreszenzemissionen alle 5 min aufgenommen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 Messungen.

In den *Flowerplates* zeigte sich nach der Messung Proteinpräzipitat. Daraus wurde geschlossen, dass der verwendete Sensor entweder wegen des CGXII-Mediums oder der simulierten Kultivierungsbedingungen präzipitierte. Zur optimalen Simulation der Kultivierungsbedingungen wurden die Experimente bei 30 °C und 1000 rpm durchgeführt – dies resultiert in starken Scherkräften besonders an den Schikanen in der *Flowerplate*. Um auszuschließen, dass das CGXII-Medium oder eines seiner Komponenten für die geringe Stabilität des Sensors verantwortlich war, wurde die Sensorstabilität in 13 verschiedenen Variationen des Mediums, in denen jeweils eine

der Komponenten weggelassen wurde, überprüft. Außerdem wurde die Sensorkonzentration verfünffacht und der pH-Wert von 7 auf pH 7,3, wie für alle bisherigen Messungen verwendet, erhöht. Diese Maßnahmen änderten jedoch an der beobachteten Instabilität nichts. Daher wurden zur *Flowerplate* alternative Plattendesigns getestet.

Zunächst wurde die Stabilität des Sensorsignals in 96-well-Platten mit runden Vertiefungen (Volumen pro Well 100 µL) getestet, um bei gleicher Rotationsgeschwindigkeit die durch die "Schikanen" in den *Flowerplates* erzeugten Scherkräfte zu vermindern. Wie in Abbildung 47 dargestellt ist, zeigte sich tatsächlich ein bis zu 90 min stabiles Signal, anschließend wurde das Messsignal schwächer.



Abbildung 47: Zeitabhängige Änderung der mit definierten Lysinkonzentrationen in CGXII-Medium mit 10 g/L Glukose in 96-well Platten aufgenommenen Bindungsisothermen mit dem 0perm-0-Sensor bei 1000 rpm, 30 °C. Mischung von 90 μ L Medium und 10 μ L Sensor in 20 mM MOPS, pH 7,3. Sensorkonzentration im Messansatz: OD_{515 nm} = 0,03. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 Messungen.

Dies bedeutet, dass tatsächlich die Scherkräfte einen großen Einfluss auf die Sensorstabilität im Messsystem ausüben. Da die Scherkräfte nicht nur vom Durchmesser, sondern auch von der Anzahl der Schikanen abhängig sind [183–185], wurden 48-well Platten mit runden Vertiefungen (*"Roundplates"*) (Volumen pro well 1 mL) verwendet. So sollten die Scherkräfte so gering wie möglich gehalten werden, aber trotzdem ein größeres Probevolumen genutzt werden können. Wie die *Flowerplates* sind auch die *Roundplates* mit Optoden verfügbar. Leider zeigte ein

Stabilitätstest in den *Roundplates*, dass in ihnen das Sensorsignal mit bis zu 20 min nur wenig stabiler als in den *Flowerplates* war (Abbildung 48).

Da FRET-basierte Biosensoren generell empfindlich auf eine Umgebungsänderung reagieren, zeigten sich im CGXII-Medium (pH 7,0) gegenüber dem für die vorherigen Untersuchungen verwendeten MOPS-Puffer (pH 7,3) veränderte Werte. Im Medium unter den Kultivierungsbedingungen wurden im Vergleich zum Puffer die folgenden Parameter $R_0 = 0.87$ (MOPS: 1,50), $R_{sat} = 1.35$ (MOPS: 2,07) und $k_D = 1.28 \pm 0.05$ mM (MOPS: 160 μ M) bestimmt. Dies kann auf unterschiedliche Wechselwirkungen der Fluoreszenzproteine und des Bindeproteins auf hohe Ionenstärken, pH-Wertänderungen (7,0 statt 7,3), verschiedene Ionen und Metabolite zurückgeführt werden. So beeinflusst z.B. das im Medium vorhandene Phosphat [76] die Emission der Fluoreszenzproteine (Rezept des Mediums: siehe Tabelle 3). Für Metabolite wie ATP, GTP, NADP⁺ und NADPH und diverse Ionen konnte dieses Verhalten ebenfalls nachgewiesen werden [50,76,186].



Abbildung 48: Zeitabhängige Änderung der mit definierten Lysinkonzentrationen in CGXII-Medium in *Roundplates* aufgenommenen Bindungsisothermen mit dem 0-perm-0-Sensor. Mischung von 900 μ L CGXII-Medium mit 10 g/L Glukose und 100 μ L Sensor in 20 mM MOPS, pH 7,3. Sensorkonzentration im Messansatz: OD _{515 nm} = 0,03. Die Messungen wurden bei 1000 rpm, 30 °C durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 Messungen.

Zudem zeigte sich bei den Versuchen in den *Roundplates* ein neues Phänomen: Nach Abschluss der Versuche hatten die Proteinpräzipitate die Form von fluoreszenten Ringen angenommen (Abbildung 49), die sich als erstaunlich stabil erwiesen. So konnten sie mit einem Stab aus der Lösung entnommen und in eine andere Lösung überführt werden. Leider zeigten diese Sensorpräzipitate zwar noch Fluoreszenz, aber keine Sensitivität für Lysin mehr – dies weist darauf hin, dass die Sensorproteine nur teilweise denaturiert waren, vermutlich war auch hier das Bindeprotein das strukturell schwächste Glied. Die Größe der Präzipitatringe wies darauf hin, dass sie an der Grenze zwischen Medium und Luft entstanden sind – beim Schütteln der Platte bei 1000 rpm entspricht die Ringgröße dem Meniskusdurchmesser.



Abbildung 49: Nach Abschluss der Messung in den *Roundplates* beobachteter präzipitierter 0perm-0-Sensor in Ringform.

Da in allen Plattendesigns bei Kultivierungsbedingungen der Lysinsensor (**0-perm-0-Sensor**) nicht über einen kompletten Kultivierungszyklus von mindestens 24 h, besser 30 h stabil blieb, wurde für die nächsten Versuchsreihen der Sensor zu definierten Zeitpunkten zum Medium oder zur Kulturbrühe gepulst. So konnte der Sensor bei 4 °C gelagert und zum Messzeitpunkt verwendet werden. Dies ergab zwar kein online, aber ein atline-Signal: So war noch eine Messung direkt in der *Flowerplate* möglich.

Der **0-perm-0-Sensor** zeigt im CGXII-Medium eine Affinität zu Lysin von 1,28 mM, allerdings in den verschiedenen Plattendesigns nur eine Stabilität von bis zu 90 min (96-well Platten) oder bis zu 20 min bei größeren Volumina (48-well *Roundplate*, *Flowerplate*). Daher wurde eine Pulsstrategie für atline-Messungen vorgeschlagen.

- 2.4 Konzeptvalidierung der Lysinbestimmung während einer Kultivierung im BioLector®-Bioreaktor
- a. Die Verwendung von FRET-Sensoren erfordert eine komplexe Kalibrierung

In den vorherigen Kapiteln wurde auf die Stabilität des Messsignals bei unterschiedlichen Plattendesigns und pH-Werten eingegangen. Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass der hier untersuchte Sensorprototyp bei einer Schüttelfrequenz von 1000 rpm in 48-well Platten nicht stabil eingesetzt werden kann und daher zu definierten Zeitpunkten zur Kultivierung zugegeben werden sollte. Der Einfluss des pH-Wertes auf die Affinität und die Sensitivität des Sensors zeigt, dass er für optimale Messergebnisse für die zu erwartenden pH-Werte beim jeweiligen Messzeitpunkt im Verlauf der Kultivierung kalibriert werden muss. Da davon ausgegangen werden kann, dass außer dem pH-Wert auch Metaboliten und Ionen im Zellüberstand das Messsignal beeinflussen werden, deren genaue Zusammensetzung sich während der Kultivierung ändert und deren Komplexität nicht bestimmt werden konnte, wurde Zellüberstand einer C. glutamicum Wildtypkultur verwendet, um diesen Hintergrund zu berücksichtigen. Der C. glutamicum-Wildtypstamm produziert nur bis zu 1,5 mM Lysin. Dieser Wert liegt deutlich unter dem optimierter Lysinproduzenten DM1933, der unter optimalen Bedingungen bis zu 40 mM Lysin produzieren kann [149,150]. Der Wildtypstamm wurde in CGXII-Medium bis zum Erreichen der stationären Phase kultiviert und der Kulturüberstand anschließend zur Herstellung der Lysin-Standards verwendet.

Dafür wurde der Kulturüberstand mit definierten Mengen an Lysin versetzt und anschließend der pH-Wert eingestellt, um die Zugabe des Lysins auszugleichen. Dann wurden Standard-Reihen in frischem, mit Lysin versetzen CGXII-Medium und mit Lysin-haltigem Kulturüberstand angesetzt, diese mit Sensorlösung versetzt und anschließend im BioLector®-System die FRET-ratio aufgenommen. Wie in Abbildung 50 deutlich wird, zeigten sich bei der Messung in frischem Medium und in Kulturüberstand deutliche Unterschiede – sowohl in der Signalstabilität als auch in der Sensitivität. Bei der Messung in frischem Medium ergab die Dreifachbestimmung bereits nach 11 min kein stabiles Signal mehr (Abbildung 50 A) – bei der Messung mit Kulturüberstand hingegen war die Sensitivität erst nach 11 min komplett entwickelt. Dies weist darauf hin, dass mehrere Komponenten im frischen CGXII-Medium die Sensorproteine destabilisieren. Es kann aber auch sein, dass Metabolite,

die von den *C. glutamicum*-Zellen in den Kulturüberstand abgegeben worden waren, den Sensor stabilisieren. An dem Verbrauch der Glukose wird die gesteigerte Stabilität wahrscheinlich nicht liegen, da bereits die Sensorstabilität im Medium ohne Glukose getestet wurde und dies keine verbesserte Stabilität zeigte (Daten nicht gezeigt).

Die Sensitivität nahm im Kulturüberstand leicht ab ($\Delta R = 0,15$ statt 0,21 im frischen Medium, Tabelle 13), wobei auch bereits das frische Medium die Sensitivität relativ zum MOPS-Puffer deutlich reduzierte ($\Delta R = 0,57$, Tabelle 10). Dies zeigt den komplexen Einfluss der Zusammensetzung des Mediums und des pH-Werts auf die Fluoreszenzparameter. Die k_D-Werte waren mit 0,37 und 0,63 mM in der gleichen Größenordnung, es zeigte sich also kein so deutlicher Unterschied wie bei den Versuchen mit MOPS-Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten (Tabelle 12).

Tabelle 13: Sensitivität und der Affinität des 0-perm-0-Sensors in frischem CGXII-Medium und in Kulturüberstand einer Wildtyp *C. glutamicum* Kultur. Gezeigt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, die in *Flowerplates* bei 1000 rpm und 30 °C bestimmt wurden. Zum Vergleich wurden die in 96-Well Platten in 20 mM MOPS-Puffer ermittelten Parameter ebenfalls aufgeführt (vgl. Kapitel 1.4).

	R₀	R _{sat}	ΔR	k _D	pH-Wert
Frisches Medium	0,63 ± 0,01	0,84 ± 0,01	0,21	0,37 ± 0,04 mM	7,0
Kulturüberstand	0,93 ± 0,02	1,08 ± 0,00	0,15	0,63 ± 0,14 mM	7,5
MOPS-Puffer	1,50 ± 0,00	2,07 ± 0,00	0,57	161 ± 14 μM	7,3

Etwas ungünstig ist die im CGXII-Medium geringere Sensitivität von bis zu $\Delta R = 0,21$. Derselbe Sensor, der frisch gereinigt in Puffer vermessen wurde, zeigte dort noch eine Sensitivität von 0,57 (Abbildung 36). Die unterschiedlichen Sensitivitäten, die in frischem Medium und in Kulturüberstand bestimmt worden sind (0,21 vs. 0,15), sowie die unterschiedlichen FRET-ratios ohne Zugabe von Ligand (R₀), zeigen eine weniger starke Verschiebung der Bindungsisotherme als bei verschiedenen pH-Werten in reinem MOPS-Puffer (vgl. Tabelle 12). Dies bedeutet aber auch, dass für die Bestimmung von Produktkonzentrationen in einer "echten" Kultivierung mehr als nur die beiden Grenzzustände "frisches Medium" und "Kulturüberstand einer Kultur in der stationären Phase" kalibriert werden müssen. Um die zeitliche Änderung der Zusammensetzung im Kultivierungsmedium auch in der Kalibration abzubilden, wurde frisches Medium und Kulturüberstand vermischt und damit Lysinstandards angesetzt (vgl. Kapitel 2.4c).



Abbildung 50: In *Flowerplates* aufgenommene Bindungsisothermen mit dem 0-perm-0-Sensor in frischem Medium und Kulturüberstand. 900 μ L Medium oder Kulturüberstand wurden mit 100 μ L Sensorlösung versetzt und direkt im BioLector®-Kultivierungssystem beobachtet. (A): Bindungsisothermen in frischem CGXII-Medium mit 10 g/L Glukose, Kurvenverlauf 1, 11 und 21 min nach Beginn der Messung. Sensorkonzentration OD_{515 nm} = 0,04. (B): Bindungsisothermen in Kulturüberstand, hergestellt mit CGXII-Medium mit 10 g/L Glukose, Kurvenverlauf 1, 11 und 21 min nach Beginn der Messung. Sensorkonzentration OD_{515 nm} = 0,04. (C): Direkter Vergleich der Bindungsisothermen des 0-perm-0-Sensors in frischem Medium mit 10 g/L Glukose (schwarz, nach 1 min) und in Kulturüberstand (rot, nach 11 min). Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 Messungen.

Die Bindungsisothermen in frischem Medium und in Kulturüberstand zeigten ähnliche Affinitäten bei 0,37 und 0,63 mM – dies ist für die geplanten Messungen fast ein wenig zu sensitiv. Da die für einen Lysin-produzierenden Prozess interessanten Lysinkonzentrationen zwischen 10 und 60 mM Lysin liegen, wäre eine geringere Affinität von Vorteil. Allerdings kann der Sensor nach Verdünnung konzentrierterer Proben durchaus eingesetzt werden.

Die Bindungsisothermen in frischem CGXII-Medium und in Kulturüberstand wiesen unterschiedliche R_0 und R_{sat} -Werte auf – die Sensitivität und die Affinität der Sensoren blieben dabei in der gleichen Größenordnung. Allerdings unterschieden sich die Werte deutlich von denen in MOPS-Puffer. Bei korrekter Kalibration der Sensoren sind Messungen bis zu 5 mM Lysin möglich.

b. Einsatz der Biosensoren zum Lysinnachweis im BioLector®

Um nun in einem Modellprozess die Produktion von Lysin überprüfen zu können, wurde in Kooperation mit Simon Unthan und Andreas Radek (Arbeitsgruppe Bioprozesse und Bioanalytik, IBG-1, Forschungszentrum Jülich) ein Versuchsaufbau entwickelt, in dem ein gut bekannter Lysinproduzent (*C. glutamicum* DM1933) eingesetzt wurde. Bei diesem wurde die Lysinproduktion im Zellüberstand mit drei Analyseverfahren parallel überwacht: Mit dem FRET-basierten Biosensor, mit einem kolorimetrischen Ninhydrin-Test und mittels HPLC (die HPLC-Analysen wurden von Michael Limberg durchgeführt). Da für die Messungen entweder Kulturüberstand abgenommen werden musste (Ninhydrin-Test und HPLC-Analytik) oder der Biosensor (**0-perm-0-Sensor**) in die Flowerplate injiziert werden musste, wurde eine definiert auf OD_{600 nm} = 1 inokulierte *C. glutamicum* DM1933-Kultur in einer Hälfte einer *Flowerplate* aliquotiert vorgelegt und während der Kultivierung zu vorher definierten Zeitpunkten Proben für die offline-Analytik entnommen und anschließend Biosensorlösung zu den Zellsuspensionen gegeben. So konnten zu jedem Zeitpunkt vierfach-Messungen durchgeführt werden (Abbildung 51).



Abbildung 51: Übersicht über den neu entwickelten Versuchsaufbau mit der etablierten und neuen online-, atline- und offline-Analytik.

c. Herstellung geeigneter Standards

Als online-Vergleich für die Auswertung der Biosensorsignale wurden vor der Kultivierung Lysin-Standards hergestellt. Dafür wurden frisches Medium und Kulturüberstand mit Lysin versetzt, sodass zweimal vier verschiedene Standards mit 0, 1, 10 und 100 mM Lysin erhalten wurden. Da der *C. glutamicum*-Stamm DM1933 ein im IBG-1 gut untersuchter Modellstamm ist, konnte vorhergesagt werden, zu welchen Zeitpunkten er in welchem Wachstumsstadium ist und wie die optische Dichte voraussichtlich mit der endgültig zu erreichenden optischen Dichte korreliert. So wurden dann Wachstumsphasen-spezifische Lysin-Standards aus Mischungen der jeweils vier Standards aus frischem Medium und Kulturüberstand hergestellt, um die geänderte Metabolitzusammensetzung im Standard so genau wie möglich zu simulieren. Das bedeutet bei einer erwarteten optischen Dichte von einem Drittel der endgültig zu erreichenden optischen Dichte von einem Drittel der endgültig zu erreichenden optischen Dichte von einem Drittel der endgültig zu erreichenden optischen Dichte von einem Drittel der endgültig zu erreichenden optischen Dichte von einem Drittel der endgültig zu erreichenden optischen Dichte von einem Drittel der endgültig zu erreichenden optischen Dichte von einem Drittel der endgültig zu erreichenden optischen Dichte wurde der Standard mit 2/3 frischem Medium und mit 1/3 Kulturüberstand gemischt und dann der pH auf den zu erwartenden pH eingestellt. In dieser Art wurden für alle Probezeitpunkte Standards hergestellt.

Für den ersten Probenzeitpunkt wurden dabei 100 % frisches Medium (pH 7) eingesetzt, nach 4 h wurden 67 % frisches Medium und 33 % Kulturüberstand verwendet (pH 7), nach 8 h wurden 33 % frisches Medium und 67 % Kulturüberstand verwendet (pH 7,5), für die drei letzten Probezeitpunkte (nach 12, 16 und 20 h) wurden die Standards nur aus Kulturüberstand hergestellt. Diese jeweils vier Standards pro Probezeitpunkt wurden mit in die *Flowerplate* gegeben – so konnte eine gleiche Behandlung der Lysin-Standards und der Kultursuspension auch bei der Probennahme gewährleistet werden und es wurden für alle Zeitpunkte Standards mit 0, 1, 10 und 100 mM Lysin erhalten. Mit diesen konnten dann die Bindungs-isothermen, die in Abbildung 50 gezeigt wurden, angepasst werden.

d. Atline Einsatz des Biosensors bei der Lysinproduktion

Um nun die Produktion von Lysin zu beobachten, wurden die Vertiefungen der *Flowerplate* mit 1,3 mL Kultursuspension gefüllt, das Medium für diese Suspension wurde 1,1-fach konzentriert. Im Fall der Probenahme wurde zu jedem Zeitpunkt jeweils eine Reihe der Kulturplatte verwendet und zunächst 400 µL abgenommen und anschließend 100 µL Biosensor in 20 mM MOPS, pH 7,3, zur Kultur gegeben.

Dies ergab eine einfache Medienkonzentration mit 1 mL Füllvolumen pro Vertiefung. Die abgenommenen Fraktionen wurden zentrifugiert, der Überstand (300 µL) abgenommen und bei 4 °C gelagert. Durch geschickten Programmaufbau konnte der Sensor in derselben 96-deep well Platte bei 4 °C gelagert werden, in der auch die Kulturüberstandsproben während der Kultivierung gelagert wurden.

Mit diesem Aufbau konnte nun die Produktion von Lysin verfolgt werden. In Abbildung 52 ist eine typische Wachstumskurve der *C. glutamicum* DM1933-Kultur am Beispiel der Mittelwerte der vier Vertiefungen, die als letztes beprobt wurden, dargestellt. Ebenfalls abgebildet sind der Sauerstoffpartialdruck pO₂ und der pH-Wert – diese beiden Parameter wurden während der gesamten Messung über die beiden im Boden positionierten Optoden detektiert.



Abbildung 52: Verlauf der Kultivierung von *C. glutamicum* DM1933 am Beispiel der Vertiefungen, bei denen nach 20 h ein Teil der Kulturbrühe abgenommen und der 0-perm-0-Sensor zugepulst wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Verläufe der gebildeten Biomasse (blau, linke y-Achse), des Sauerstoffpartialdrucks pO_2 (grün, linke y-Achse) und des pH-Wertes (rot, rechte y-Achse).

Beim Signal der blau dargestellten Biomasse lassen sich die verschiedenen Wachstumsphasen der Zellen erkennen: während der ersten vier Stunden sind die Zellen noch in der Lag-Phase, während sie dann in den nächsten 8 h exponentiell wachsen. Nach etwas über 12 h gehen die Zellen in die stationäre Phase über, dies ist auch deutlich am Sauerstoffpartialdruck (grün) zu erkennen, der in der

exponentiellen Phase sprunghaft ansteigt. An dem Verlauf der Biomassebildung zeigt sich auch, warum der vierstündige Probenahme-Rhythmus verwendet wurde: So konnten zwei Proben in der Lag-Phase entnommen werden, eine in der exponentiellen Phase, eine direkt vor dem Übergang von der exponentiellen Phase zur stationären Phase und dann noch zwei Proben in der stationären Phase. Die aus vorherigen Kultivierungen geschätzten Lysinkonzentrationen betrugen dabei zu Beginn 0 mM Lysin, nach 4 h 1-8 mM Lysin, nach 8 h 5-10 mM Lysin und zu den anderen drei Zeitpunkten (nach 12, 16 und 20 h) zwischen 10 und 20 mM Lysin [150].

Der pH-Wert (rot) stieg während der Kultivierung moderat an, ca. 2 h nach Erreichen der stationären Wachstumsphase zeigte auch das pH-Wert-Signal ein Plateau. Der pH-*Shift* in den basischen Bereich kann durch das exportierte basische Lysin bedingt sein. Außerdem werden in späteren Wachstumsphasen die vorher exportierten Säuren wie Acetat oder Lactat wieder aufgenommen und verstoffwechselt. So kann der pH-Wert im weiteren Verlauf der Kultivierung ebenfalls steigen.

In Abbildung 52 sind zwei Trends zu erkennen: Zum einen unterscheiden sich die Kultivierungen in den unterschiedlichen Vertiefungen kaum, was anhand der sehr geringen Standardabweichungen deutlich wird. Zweitens zeigt das Signal des Sauerstoffpartialdrucks ab der Probenentnahme und dem Biosensorpuls zu hohe Werte an (über 100 % Sauerstoffpartialdruck). Während der Probenahme wird die die Platte verschließende Folie durchstochen und die Wells sind nicht mehr von der umgebenden Atmosphäre abgeschirmt. Außerdem wird mehr Zellsuspension aus den Kultivierungsansätzen für die Analytik im Ninhydrintest und mittels HPLC entnommen (400 µL) als Sensorlösung zugepulst wird (100 µL), so unterscheiden sich die Füllhöhen. Dies bedingt beides das pO₂-Signal. Auch in dem Biomassesignal lässt sich der Zeitpunkt der Probenahme ablesen – dies ist vermutlich durch die Verdünnung der Suspension bedingt. Der pH-Wert ändert sich ebenfalls – der Biosensor liegt gelöst bei 4 °C in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3 vor. Wenn nun der kalte Biosensor-haltige Puffer (100 µL) in die Kulturbrühe (900 µL) gegeben wird, ändert dies den pH-Wert. In dem in Abbildung 52 dargestellten Kulturverlauf beträgt diese pH-Wertänderung 0,1.

Während der Kultivierung konnten so kontinuierlich Sauerstoffpartialdruck, Zelldichte, pH und FRET-ratio aufgenommen werden. Nachdem die Kultivierung abgeschlossen

war, wurden dann auch die bei 4 °C gelagerten zellfreien Kulturüberstände zur Lysinbestimmung mittels Ninhydrintest und HPLC-Analyse eingesetzt. Die Ergebnisse der vergleichenden Lysinbestimmungen sind in Tabelle 14 dargestellt.

Zeit (h)	FRET-ratio	Lysin (mM) - FRET -	Lysin (mM) - Ninhydrin -	Lysin (mM) - HPLC -
0 h	0,69 ± 0,01	0 mM	0 mM	0 mM
4 h	0,68 ± 0,01	1 mM	1,6 mM	0,7 mM
8 h	0,73 ± 0,01	3 mM	2,8 mM	3,0 mM
12 h	0,78 ± 0,01	15 mM	8,5 mM	9,6 mM
16 h	0,78 ± 0,01	15 mM	12,2 mM	13,2 mM
20 h	0,76 ± 0,01	12 mM	14,6 mM	12,3 mM

Tabelle 14: Aus den Kulturüberständen mittels Biosensor, Ninhydrin-Test und HPLC-Analyse bestimmte Lysinkonzentrationen im vierstündigen Probenahmerhythmus und die dazu gehörigen FRET-Signale.

Die gemessenen FRET-ratios innerhalb der vier Messungen eines Probennahmezeitpunkts variierten nur sehr gering (Standardabweichungen bei nur 0,01), was trotz des Zellhintergrunds erreicht wurde. Durch den Vergleich mit den zuvor festgelegten die Standards für jeden Zeitpunkt, auf ähnliche pH-Werte und Metabolitkonzentrationen eingestellt wurden, konnten dann die Lysinkonzentrationen in den Zellüberständen abgeschätzt werden. Diese zeigten auch tatsächlich Werte im gleichen Bereich, wie die mittels Ninhydrin- und HPLC-Analysen bestimmten Lysinkonzentrationen. So gelang es, die Lysinkonzentrationen für die Zeitpunkte nach 0, 4 und 8 h durch die geeignete Standard-Auswahl nicht nur in der richtigen Größenordnung, sondern sogar die millimolaren Konzentrationen korrekt abzuschätzen. Bei den Proben nach 12, 16 und 20 h konnten mit Konzentrationen von 15, bzw. 12 mM Lysin noch Werte in der gleichen Größenordnung bestimmt werden, obwohl sich diese Proben bereits außerhalb des dynamischen Bereichs befinden. Hier kann die Verwendung eines anderen Lysinsensors aus den Toolboxen (vgl. Kapitel 1.4 und 1.6) oder eine genauere Kalibration die Messung vermutlich noch verbessern: Die für die Lysin-Standards verwendeten Kulturüberstände wurden im Schüttelkolben hergestellt und hatten daher leicht andere Wachstumsbedingungen als die sehr gut mit Sauerstoff versorgten Zellen in der BioLector®-Flowerplate.

e. Vergleich der etablierten Methoden zur Lysinbestimmung im Vergleich zum FRET-Biosensor

Beim Vergleich der nun zur Verfügung stehenden Analysemethoden zeigt sich, dass alle drei Methoden Vor- und Nachteile aufweisen: Der Ninhydrin-Test ist sehr schnell, für Hochdurchsatzsysteme geeignet und hat mit 1,5 – 25 mM einen linearen Bereich, der genau auf die Anwendung in dieser Kultivierung angepasst ist. Er ist aber eine offline Analysemethode und erkennt alle primären Amine. Beim Screening von noch nicht optimierten Produktionsstämmen ist das möglicherweise problematisch, da es auch sehr viele falschpositive Treffer geben kann. Die HPLC-Analyse ist sehr genau und man kann in einem HPLC-Chromatogramm fast alle vorkommenden Aminosäuren in einem Konzentrationsbereich von 5-100 µM voneinander trennen. Allerdings wird die HPLC offline betrieben und die einzelne Messung dauert mit ca. 30 min sehr lang. Damit ist diese Methode ein Nadelöhr bei der Optimierung von Produktionsstämmen im höheren Durchsatz. Die FRETbasierten Biosensoren sind sehr schnelle Messwerkzeuge und lassen sich sogar in der Kultivierungsplatte einsetzen - mit einem linearen Bereich von 1-10 mM kann man so den Beginn der Lysinproduktion sehr gut ohne weitere Verdünnungsschritte nachweisen. Dass der Biosensor im untersuchten Fall auch Arginin nachweisen kann, ist hier übrigens nicht von Nachteil, weil die Argininkonzentration in den Überständen von Lysinproduzenten mit unter 100 µM sehr gering ist und daher nicht stört.

Augenblicklich ist die Kalibration der Sensoren noch sehr komplex und die Konzentrationsbestimmung gelingt nur, wenn der Medienhintergrund in der Kalibration möglichst genau abgebildet wird. Mit diesen ersten erfolgreichen Versuchen konnte jedoch gezeigt werden, dass dies prinzipiell möglich ist.

Es konnte gezeigt werden, dass nun eine atline-Analytik existiert, mit der z.B. in größeren Screenings der Biosensor zu den Kultivierungen gegeben werden kann und direkt die Produktion der gewünschten Metabolite überwacht werden kann. Dies wurde nun am Beispiel des Lysins gezeigt. Die periplasmatischen Bindeproteine, die man zum Design eines entsprechenden FRET-basierten Biosensors benötigt, sind aber auch für eine Vielzahl von anderen Metaboliten verfügbar. So können analytisch schwer nachzuweisende Stoffe schnell mittels eines Biosensors in der Produktion überwacht werden.

Es konnte ein atline-Verfahren zum Nachweis von Lysin in *C. glutamicum* Kulturen im BioLector® etabliert werden, mit dem die Lysinkonzentrationen in den *Flowerplates* direkt abgeschätzt werden konnten. Durch Berücksichtigung des Medienhintergrunds bei der Lysin-Kalibration, war es möglich, zur etablierten offline-Analyik vergleichbare Konzentration zu bestimmen.

Die prinzipielle Eignung von FRET-basierten Biosensoren für den Einsatz in Zellüberständen wurde damit erfolgreich gezeigt.

2.5 Lysinbestimmung mit Sensor-exprimierenden E. coli Zellen

Wie im ersten Teil dieser Arbeit beschrieben, ist die Herstellung von FRET-basierten Biosensoren insbesondere wegen der chromatographischen Reinigung ein aufwendiges Verfahren. Ganz besonders, wenn die Sensoren, wie in diesem Fall, auch noch eine geringe Stabilität aufweisen. Es sollte daher getestet werden, ob die genetisch kodierten FRET-basierten Biosensoren in E. coli-Zellen produziert und direkt zur Lysinbestimmung eingesetzt werden können. Hierfür lassen sich diverse potentielle Anwendungsgebiete vorstellen. Zum einen ist die Immobilisierung in Ganzzellsystemen eine kostengünstige und schnelle Möglichkeit der Immobilisierung von Proteinen [187], zum anderen können verbesserte Proteinstabilitäten erhalten werden, da die Proteine intrazellulär vor z.B. Scherkräften geschützt sind. Eine potentielle Anwendungsmöglichkeit wäre also die Zugabe von Sensorzellen direkt in die Lösung, in der eine Metabolitkonzentration bestimmt werden soll. Dies kann ein Kulturüberstand sein, denkbar ist aber auch eine Kultivierung von Sensorzellen parallel mit Produzentenzellen, die z.B. durch Mikrokanäle verbunden sind. In der Mikrofluidik werden immer neue Messinstrumente gesucht, die auch im pL-Maßstab Messungen ermöglichen. Wenn nun die Biosensoren in einer Zelle konzentriert vorliegen, kann diese als Sensorzelle verwendet werden.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der Ganzzellmessungen besteht auch im schnelleren und kostengünstigeren Screening von neuen Sensorvarianten. So könnte man mit Sensorzellen Hochdurchsatzscreenings auf Biosensoren durchführen, die entweder eine bestimmte Affinität zu ihrem Liganden aufweisen oder besonders sensitiv sind.

Ein weiteres potentielles Anwendungsgebiet ist der Einsatz von Ganzzellsystemen, die auf ihre Produktivität überprüft werden sollen. So sind bereits diverse Hochdurchsatzscreenings mit promotorbasierten Sensorsystemen via FACS bekannt (z.B. [44,51]). Diese benötigen aber ein Promotorsystem, das für den entsprechenden Metabolit spezifisch ist. Mit dem Einsatz von FRET-basierten Biosensoren wäre hier mit den periplasmatischen Bindeproteinen eine neue Proteinklasse mit einem breiteren Anwendungsspektrum als Sensorproteine verfügbar (vgl. Einleitungskapitel 4).

In der Arbeit von Roland Moussa wurde gezeigt, dass intrazelluläre, quantitative Messungen mit großen Risiken verbunden sind, da FRET-Sensoren durch diverse Faktoren beeinflusst werden [75]. Zu diesen Faktoren gehören, wie bereits diskutiert, nicht nur pH und Temperatur, sondern auch die Konzentration diverser Ionen und Metabolite, sowie molekulares *crowding*. Es ist daher nicht möglich, aufgrund der intrazellulären Umgebung ein quantitatives Messsignal zu erhalten. Relative Änderungen eines Metaboliten sind jedoch durchaus messbar. Es wurde daher im Folgenden untersucht, ob man reproduzierbar mit Sensorzellen extrazelluläre Lysinkonzentrationen einem intrazellulären FRET-Signal zuordnen kann. Hierbei ist wichtig, dass die extrazelluläre Lysinkonzentration nicht gleich der intrazellulären Konzentration sein muss, um diese Messungen durchzuführen.

a. Evaluierung Sensorzellen für die extrazelluläre Lysin-Analytik

Zunächst wurde untersucht, ob der FRET-Sensor (0-perm-0-Sensor) einen intrazellulären FRET-ratio Shift als Antwort auf eine extrazelluläre Änderung der Lysinkonzentration zeigt. Dafür wurden zunächst E. coli BL21(DE3)-Zellen in M9-Minimalmedium kultiviert. da das sonst zur Kultivierung verwendete Autoinduktionsmedium als Komplexmedium auch Lysin enthalten kann, was die Messung beeinflussen würde. Außerdem sollte so der Einfluss von eventuell fluoreszierenden oder absorbierenden Medienkomponenten möglichst ausgeschlossen werden. Um eine zu schnelle und starke Induktion der Sensorproduktion zu vermeiden und so möglichst wenig inaktive Sensormoleküle in der Zelle zu erhalten, wurde eine Autoinduktionsvariante des M9-Mediums mit Glukose und Lactose verwendet. Nachdem die Zellen so kultiviert wurden (für 24 und 48 h),

wurden sie vom Medium getrennt, gewaschen und in Puffer mit Lysin versetzt. Es wurde ein Zeitverlauf der FRET-ratio aufgenommen (Abbildung 53 A, B). Um zu überprüfen, ob die Zellen noch intakt oder lysiert sind, wurden auch der zellfreie Kulturüberstand mit Lysin versetzt und die FRET-ratio dieser Fraktionen gemessen (Abbildung 53 C, D).



Abbildung 53: Messung von extrazellulären Lysinkonzentrationen mit Sensorzellen (oben), die 24 h (A) oder 48 h (B) den 0-perm-0-Sensor produziert haben. Dazu wurden Bindungsisothermen zu den angegebenen Zeiten nach der Zugabe von Lysin aufgenommen. Die Zellen wurden vor der Messung auf OD_{600 nm} = 2 eingestellt, wiesen im Messansatz also OD_{600 nm} = 1,8 auf. Unten: Leckagekontrollmessung mit zellfreiem Überstand (24 h-Überstand: C, 48 h Überstand: D). Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 Messungen, die in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3 aufgenommen wurden.

Wie in Abbildung 53 zu sehen ist, zeigen beide zellfreien Kulturüberstände keine Bindungsisothermen. Dies bedeutet, dass eine mögliche Aktivität freier FRET-Sensoren im Überstand (z.B. durch Zelllyse) unter den gewählten Bedingungen vernachlässigt werden kann. Die FRET-ratios der zellfreien Überstände wiesen eine Differenz von 0,1 auf – dies war durch geringere Fluoreszenzemissionen der 48 h-Überstände bedingt: die Fluoreszenzemissionen im Überstand betrugen nach 24 h $\frac{\text{Citrine-Signal}}{\text{ECFP-Signal}} = \frac{2935\pm286}{1716\pm161} \text{ und nach } 48 \text{ h} \frac{\text{Citrine-Signal}}{\text{ECFP-Signal}} = \frac{2469\pm257}{1323\pm122}.$ Dies korreliert mit den Zelldichten der Kulturen: die 24 h-Kultur wies eine OD_{600 nm} von 3,6 auf, während die 48 h-Kultur eine OD_{600 nm} von 3,2 erreichte. Generell wuchsen die Sensorzellen im M9-Minimalmedium nicht reproduzierbar, hier ist noch Optimierungspotential.

Bei den aufgenommenen Bindungsisothermen mit Lysin (Abbildung 53) zeigte sich ein sehr ähnliches Verhalten bei beiden Zellsuspensionen: Direkt nach Zugabe von Lysin ist kaum eine Bindungsisotherme zu erkennen, weil sich die intrazellulare Lysinkonzentration erst einstellen muss. Bereits nach 15 min (grüne Dreiecke) war die Bindungsisotherme deutlich sichtbar und nach 30 min (blaue Kreise) stabil nachweisbar. Bei beiden Ansätzen blieb die Bindungsisotherme bis zu 90 min stabil. In den ersten 30 min erkennt man eine Verschiebung der Bindungsisothermen zu höheren Konzentrationen. Dies kann durch eine Verstoffwechselung des Lysins durch die Sensorzellen, die zum Zeitpunkt der Messung noch vital waren, erklärt werden. Die Sensitivität und Affinität waren bei beiden Ansätzen ähnlich: ΔR betrug bei beiden Ansätzen 0,35, die Affinität lag bei ca. 10 µM (Abbildung 55, Tabelle 15).

Um zu gewährleisten, dass diese Messungen tatsächlich intrazellulär erfolgen und dass die Zellen noch intakt sind, wurden die Zellen auch mit dem Dipeptid L-Lysyl-L-Alanin (Lys-Ala) versetzt. Durch Zugabe von Dipeptiden kann die intrazelluläre Konzentration einer Aminosäure erhöht werden [51,188]. Dazu müssen die Dipeptide von den Zellen aufgenommen werden, dort von intrazellulären Peptidasen in Lysin und Alanin gespalten werden, bevor das Lysin vom Biosensor erkannt werden kann [189]. In Kontrollexperimenten wurde zuvor überprüft, dass Lys-Ala kein Ligand für den 0-perm-0-Sensor ist.



Abbildung 54: Oben: Messung von Lys-Ala-Dipeptidkonzentrationen mit *E. coli*-Sensorzellen, die 24 h (A) oder 48 h (B) den 0-perm-0-Sensor produziert haben. Die Zellen wurden vor der Messung auf $OD_{600 \text{ nm}} = 2$ eingestellt, wiesen im Messansatz also $OD_{600 \text{ nm}} = 1,8$ auf. Unten: Aufschlüsselung der FRET-ratio in die beiden Fluoreszenzemissionen von Citrine (C, 528 nm) und ECFP (D, 485 nm). Aufgeschlüsselt wurde die Messung mit 24 h-Zellen nach Zugabe von Lys-Ala. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 Messungen, die in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3 aufgenommen wurden.

Die Ergebnisse der Messungen mit Lys-Ala sind in Abbildung 54 (A, B) dargestellt. Wie auch bei den mit Lysin erhaltenen Bindungsisothermen beobachtet (Abbildung 53), zeigt sich erneut ein sehr ähnliches Verhalten der 24 h und 48 h kultivierten Zellen: Die Zellsuspensionen benötigen auch hier 30 min um die endgültigen Bindungsisothermen auszubilden. Diese sind dann bis mindestens 90 min nach Beginn der Messung stabil. Um den Grund für die sinkende FRET-ratio bei geringen Ligandenkonzentrationen eingrenzen zu können, wurden auch die ermittelten Fluoreszenzemissionen von Citrine (Abbildung 54C) und ECFP (Abbildung 54D) aufgetragen. Beim Vergleich der beiden Emissionsverläufe ist dabei klar zu sehen, dass das fallende Citrine-Signal der Grund für die fallenden FRET-ratios ist: Die ECFP-Signale bleiben im Verlauf der Messung im Vergleich zu den Citrine-Emissionen sehr stabil – nur nach 90 min sinkt die Fluoreszenzemission um ca. 10 %. Bei der Citrine-Emission hingegen zeigt sich ein Abfall der Emissionen außer bei den mit 0,8 und 4 mM Lys-Ala aufgenommenen Werten. Das Citrine-Signal (z.B. bei $1,02 \cdot 10^{-5}$ mM) sinkt bis 15 min nach Messbeginn, bleibt dann bis zu 60 min auf diesem Niveau und sinkt dann erneut.

Dass gerade das Citrine-Signal am Anfang der Messung stark sinkt, kann durch das Messsystem bedingt sein: Die Zellen werden bei Beginn der Messung in 20 mM MOPS-Puffer suspendiert und in die 96-Well Platte gegeben. Durch das regelmäßige Schütteln der Platte vor jeder Messung (alle 7,5 min) werden die Zellen so immer wieder im Puffer mit der geringen Ionenstärke resuspendiert. Dadurch kann es zu Diffusion von Wasser in den Zellen oder einer intrazellulären pH-Wertänderung kommen. Durch diese leichten Veränderungen der Umgebung, deren Gleichgewicht sich zunächst einstellen muss, scheint das Citrine-Signal stärker betroffen zu sein wenn sich der Sensor nicht in der gebundenen (geschlossenen) Konformation befindet.

Um die Aufnahme und den Nachweis von einzeln vorliegendem Lysin oder Lysin aus Lys-Ala-Dipeptid besser vergleichen zu können, wurden die nach 60 min Messzeit aufgenommenen Bindungsisothermen in Abbildung 55 aufgetragen. Die daraus bestimmten Parameter finden sich in Tabelle 15. Wie zu sehen ist, sind sich die mit gleichen Liganden bestimmten Parameter trotz des Einsatzes von Ganzzellsystemen sehr ähnlich: so wird mit Lysin eine Sensitivität von $\Delta R = 0.36$ und eine Affinität von ca. 10 µM bestimmt. Die hohe Affinität von ca. 10 µM ist vermutlich durch einen additiven Effekt bedingt: Die E. coli-Zellen nehmen mehr Lysin auf als sie exportieren, daher kann die intrazelluläre Lysinkonzentration wesentlich höher sein als die extrazelluläre. So können wenig sensitive Sensoren in Ganzzellsystemen auch genutzt werden, um geringe Ligandenkonzentrationen zu detektieren. Dies wurde für Dipeptide z.B. von Tavori et al. beschrieben [188]. Unter der Annahme, dass das Dipeptid in ähnlicher Konzentration wie das einzelne Lysin in die Zelle aufgenommen wird und dass es komplett gespalten wird, ist die bestimmte Affinität für Lysin aus Lys-Ala mit ca. 50 µM etwas geringer – dies kann durch langsame enzymatische Spaltung der Dipeptide durch die intrazellulären Peptidasen bedingt sein oder durch ein anderes Gleichgewicht in der Aufnahme der Dipeptide. Das bedeutet, dass entweder in der Zelle weniger Lysin aus Lys-Ala vorliegt als im vorherigen Versuch Lysin oder dass eine ähnliche Lys-Ala-Konzentration vorliegt, aber nicht 100 % des Lysins aus Lys-Ala für den Biosensor verfügbar ist.



Abbildung 55: Vergleich der Bindungsisothermen, die mit Lys-Ala (schwarz, rot) und Lysin (grün, blau) mit Sensorzellen (0-perm-0-Sensor) aufgenommen wurden. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 Messungen. Die Messungen wurden in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3 bei 25 °C durchgeführt. Durch den Einsatz von auf $OD_{600 nm} = 2$ eingestellte Zellsuspensionen wurde in den Messansätzen eine $OD_{600 nm} = 1,8$ erreicht (90 µL Zellsuspension + 10 µL Ligandlösung).

	Ligand	R ₀	R _{sat}	ΔR	k _D
24 h Kultur	Lysin	1,29	1,65	0,36	8 ± 3 µM
48 h Kultur	Lysin	1,37	1,71	0,34	10 ± 3 µM
24 h Kultur	Lysin (aus Lys-Ala)	1,32	1,76	0,44	65 ± 20 μM
48 h Kultur	Lysin (aus Lys-Ala)	1,36	1,80	0,44	45 ± 8 µM

Tabelle 15: In den Ganzzellexperimenten ermittelte Bindungsparameter mit Lysin und Lys-Ala (vgl. Abbildung 55).

Um zu bestätigen, dass die Messung intrazellulär stattfindet und die Zellen nicht während der Messung lysieren, wurde der Überstand der Sensorzellen (mit 0-perm-0-Sensor) nach einer Inkubationszeit von 30 min untersucht. Dazu wurden 24 und 48 h kultivierte Sensorzellen mit Lys-Ala versetzt und 30 min inkubiert. Zum Nachweis, dass die Sensoren aktiv und sensitiv sind und Affinität zum Lysin aus Lys-Ala zeigen, wurden Bindungsisothermen mit Aliquots der Zellen nach der Inkubationszeit aufgenommen. Währenddessen wurden die Zellen durch Zentrifugation von ihrem Überstand getrennt und anschließend der Überstand zur Aufnahme von Bindungsisothermen eingesetzt. Das heißt. dass die und "Zellüberstand 30 min Bindungsisothermen "Zellen 30 min Inkubation" Inkubation" in der Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 56 aus den gleichen

Ansätzen stammen. Nur wurden die Ansätze nach der ersten Messung zentrifugiert und die resultierenden zellfreien Lösungen zur Messung eingesetzt. Die Zellen zeigten, wie in den oben dargestellten Messreihen, nach 30 min eine ausgeprägte Bindungsisotherme mit einer Sensitivität von 0,2 und einer Affinität von 24 \pm 7 µM (für 24 h und 48 h-Zellen). Der inkubierte zellfreie Überstand zeigte hingegen keine Sensitivität. Wenn die *E. coli* Zellen in nennenswertem Ausmaß permeabilisiert bzw. Iysiert vorgelegen hätten, so hätte das durch die Spaltung von Lys-Ala intrazellulär vorliegende Lysin mit den Sensoren im Überstand vorgelegen. Denn wenn vor der Trennung von Zellen und Überstand die Bindungsisothermen ausgebildet waren, konnten die Sensoren freies Lysin nachweisen. Wenn diese extrazellulär vorgelegen hätten, hätten die Überstandsfraktionen die gleiche Bindungsisotherme zeigen müssen wie die Zellfraktionen. Dies bedeutet, dass die Zellen wahrscheinlich nicht Iysiert vorlagen und keine Sensorproteine in den Zellüberstand gelangt sind.



Abbildung 56: Bindungsisothermen der Sensorzellsuspensionen (schwarz, rot, dunkel- und hellblau) nach Lys-Ala-Inkubation und Signale der Zellüberstände nach 30 min Inkubation (grün, purpur). Die Zellen wurden vor der Messung auf $OD_{600 \text{ nm}} = 2$ eingestellt, wiesen im Messansatz also $OD_{600 \text{ nm}} = 1,8$ auf. Sie wurden im Verhältnis 90 % Zellsuspension mit 10 % Ligandenlösung vermischt (mit 10 verschiedenen Lys-Ala-Konzentrationen versetzt, also 10 x 1 mL), bei 25 °C inkubiert und dann nach 5 und 30 min in eine 96 well-Platte gegeben und im Tecan-Reader ihre Fluoreszenz aufgenommen (Anregung bei 428 nm, Emission bei 528 nm und 485 nm). Nach 30 min Inkubationszeit wurde ein Teil der Ansätze in die 96 well-Platte überführt, der Rest wurde zentrifugiert, um so den zellfreien Überstand zu erhalten. Dieser wurde dann ebenfalls in die 96 well-Platte gegeben und die Fluoreszenzemissionen aufgenommen.

Es ist möglich, die genetisch kodierten FRET-basierten Biosensoren in *E. coli*-Ganzzellsystemen als Sensorzellen zur Lysindetektion in Zellüberständen einzusetzen.

Basierend auf den vielversprechenden Versuchen mit frischen Sensorzellen, die direkt nach der Kultivierung geerntet und eingesetzt wurden, wurden anschließend entsprechende Versuche mit gefriergetrockneten Sensorzellen durchgeführt.

Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abbildung 57 zusammengefasst. Die mit Lysin aufgenommenen Bindungsisothermen zeigten ein ähnliches Verhalten, wie die mit frischen Zellen aufgenommenen Bindungsisothermen. Es konnte allerdings keine Affinität gemessen werden, wenn Lys-Ala als Substrat eingesetzt wurde. Mit Lysin zeigte sich auch bei den lyophilisierten Zellsuspensionen noch eine deutliche Sensitivität von $\Delta R = 0.32$ mit einer Affinität zu Lysin von 156 ± 22 μ M. Die Ausbildung der vollständigen Bindungsisotherme war mit 15 min allerdings doppelt so schnell wie mit nicht lyophilisierten frischen Zellen (Abbildung 53). Daher konnten in Abbildung 57 zur besseren Übersicht weniger Zeitpunkte dargestellt werden, denn die Messungen zwischen 15 und 91 min zeigten keinen Unterschied. Die beschleunigte Ausbildung der Bindungsisotherme bei lyophilisierten, also unter Umständen auch geschädigten Zellen, weist auf ein Gleichgewichtsphänomen als Ursache für das Absinken der FRET-ratio hin. Dass die Zellmembran nicht mehr vollständig intakt war, konnte durch einen Test mit zellfreien Überständen nachgewiesen werden: Diese zeigten, dass bereits direkt nach der Resuspendierung der Zellen Sensorproteine im Überstand vorhanden waren und sich die maximale Sensorkonzentration nach 20 min im Überstand befand. So kann nicht nur die schnellere Ausbildung der Bindungsisothermen erklärt werden, sondern auch die nicht mehr vorhandene Affinität wenn Lys-Ala als Substrat eingesetzt wurde, denn mangels des entsprechenden Enzyms im Überstand wurde das Dipeptid nicht gespalten. Durch das Austreten der Sensorproteine sind die Suspensionen mit lyophilisierten Zellen eher mit Rohzellextrakten als mit Ganzzellsuspensionen vergleichbar. So konnten die extrazellulären Sensorproteine das freie Lysin direkt erkennen, das im Dipeptid gebundene Lysin allerdings nicht. Das zeigt, dass die Gefriertrocknung und das vorherige Einfrieren nicht nur die Zellmembran sondern auch die Enzyme geschädigt haben, die für die Spaltung von Lys-Ala benötigt

werden. Sicher kann das Protokoll zur Gefriertrocknung noch optimiert werden, doch ist die Verwendung frischer Sensorzellen für weitergehende Versuche sicherer.



Abbildung 57: Mit Lysin und lyophilisierten Sensorzellen aufgenommene Bindungsisothermen 0, 8, 15 und 91 min nach Messbeginn. Die Zellen wurden vor der Messung in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3 auf OD_{600 nm} = 2 eingestellt, wiesen im Messansatz also OD_{600 nm} = 1,8 auf. Sie wurden im Verhältnis 90 % Zellsuspension mit 10 % Ligandsuspension vermischt und ihre Fluoreszenz bei 25 °C alle 7,5 min detektiert (Anregung bei 428 nm, Emission bei 528 nm und 485 nm). Zum Vergleich wurde auch die Bindungsisotherme mit lyophilisierten Zellen und Lys-Ala nach 91 min dargestellt – diese zeigte keine Sensitivität mehr (purpurne Kreuze).

Lyophilisierte Sensorzellen können zur Lysindetektion, aber nicht zur Sensorimmobilisierung eingesetzt werden. Da die Zellen nicht mehr intakt sind, kann der Sensor aus den Zellen austreten.

b. Evaluierung von Ganzzellsystemen zum Sensorscreening

Abschließend sollte getestet werden, ob die Ganzzellsysteme zum Sensorscreening genutzt werden können. So können Sensorbibliotheken schnell und ohne Reinigungsaufwand auf verbesserte Affinität oder Sensitivität überprüft werden.

Als Beispiel wurden drei Biosensoren aus der Biosensortoolbox mit permutiertem Bindeprotein in *E. coli* produziert (**0-perm-0-Sensor, f-perm-f-Sensor und s-perm-s-Sensor**, Tabelle 9, die Versuche wurden im Rahmen der in dieser Dissertation betreuten Masterarbeit von Julia Otten durchgeführt [168]) und vergleichend gemessen. Wie in Abbildung 58 und Tabelle 16 dargestellt ist, zeigen sich nur

geringe Unterschiede in der Affinität der Sensorkonstrukte. In der Sensitivität hingegen zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Varianten mit zwei Linkern (flexiblen und starren) und dem Sensor ohne Linker: die Sensitivität der Varianten mit Linkern ist doppelt so hoch. Das bedeutet, dass man im Ganzzellsystem vermutlich keine Varianten mit höheren Affinitäten selektieren kann, da die Eigenschaft der Zellen, den Liganden intrazellulär zu akkumulieren, die Affinität der Sensoren verfälscht. Ein Einsatz von lyophilisierten Zellen bei der Suche nach affineren Sensorvarianten ist allerdings nicht auszuschließen. Hier würde der verfälschende Einfluss der intrazellulären Ligandenakkumulation wegfallen, da sich lyophilisierte Zellen, wie im vorherigen Kapitel gezeigt, eher wie Zellrohextrakte verhalten. Ein Screening auf höhere Sensitivitäten hingegen ist mit intakten Sensorzellen möglich, da dies eine spezifische Eigenschaft der Sensoren ist, die eine unterschiedliche Zellumgebung in ähnlicher Weise beeinflusst.



Abbildung 58: Mit Sensorzellen mit drei Varianten aus der Sensortoolbox mit permutiertem Bindeprotein und Lysin aufgenommene Bindungsisothermen 60 min nach Messbeginn. Die Messungen wurden wie im M.M.-Kapitel 2.2.4 beschrieben durchgeführt. Dazu wurden die Sensor-enthaltenden Zellen, die in M9-Minimalmedium mit Glukose und Laktose für 26 h kultiviert worden waren, geerntet und in 20 mM MOPS-Puffer (pH 7,3) auf eine OD_{600 nm} = 2 eingestellt. Nachdem sie mit den verschiedenen Lysinkonzentrationen (90 μ L Zellsuspension + 10 μ L Lysinlösung, Messkonzentrationen bis zu 100 mM, in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7,3) versetzt wurden, wurden sie im Tecan-Reader alle 7,5 min bei 428 nm angeregt und die Fluoreszenzemission bei 528 nm und bei 485 nm bei 25 °C aufgenommen. Die daraus resultierenden Citrine/ECFP-ratios wurden gegen die logarithmierten Lysinkonzentrationen aufgetragen. Als Beispielvarianten wurden aus der Toolbox mit permutiertem Bindeprotein der Sensor ohne Linker (0-perm-0-Sensor), mit zwei flexiblen Linkern (f-perm-f-Sensor) und mit zwei starren Linkern (s-perm-s-Sensor).

Tabelle 16: In den Ganzzellexperimenten mit den drei Varianten der Sensortoolbox mit permutiertem Bindeprotein ermittelte Bindungsparameter.

	R ₀	R _{sat}	ΔR	k _D
0-perm-0-Sensor	1,26	1,63	0,37	19 ± 3 µM
f-perm-f-Sensor	1,97	2,56	0,59	8 ± 1 µM
s-perm-s-Sensor	1,59	2,17	0,58	7 ± 2 µM

Ganzzellversuche können zum Screening auf höhere Sensitivität der Sensoren, aber nicht zur Selektion von Affinitätsvarianten verwendet werden.

VII. Zusammenfassung und Ausblick

Für die schnelle, einfache und genaue Detektion von Metaboliten werden beständig neue Arten von Biosensoren benötigt.

Daher wurden in dieser Arbeit am Beispiel eines Lysin-detektierenden FRETbasierten genetisch kodierten, Biosensors zwei Sensor-Toolboxen generiert, die auf verschiedenen molekularen Prinzipien beruhen. Eine Sensor-Toolbox wurde mit dem nativen LAO-Bindeprotein aus *E. coli* hergestellt, bei dem beide Termini an derselben Domäne lokalisiert waren. Bei Kombination des nativen Bindeproteins mit flexiblen oder starren Linkern und den beiden Fluoreszenzproteinen ECFP und Citrine konnten bei hohen Lysinkonzentrationen Unterschiede in der Sensitivität der Sensorvarianten beobachtet werden, die auf unterschiedlich flexible Verbindungen zwischen den Fluoreszenzproteinen zurückgeführt wurden, jedoch nicht auf ein Bindeereignis von Lysin am LAO-Bindeprotein. Diese Sensortoolbox ist im Konzentrationsbereich von 10 – 400 mM Lysin einsetzbar.

In der zweiten Sensortoolbox (mit permutiertem Bindeprotein) zeigten sich Affinitätsund Sensitivitätsvariationen, die durch flexible und starre Linker zu beiden Seiten des zentralen Bindeproteins moduliert werden konnten. So konnten bis zu 50-fache Verbesserungen der scheinbaren Affinität erreicht werden. Diese zweite Toolbox ist im Konzentrationsbereich 0,3 μ M – 2 mM für die Lysindetektion einsetzbar.

Die so gewonnenen Toolboxen können nun bei Bedarf mit weiteren Bindeproteinen kombiniert und angewandt werden – eine veränderte Sensitivität ist dabei sehr wahrscheinlich. Eine Modulation der Affinität ist hingegen stark von der Position der Termini und dem Aufbau des Bindeproteins abhängig. Durch den modularen Aufbau der Toolboxen können auch die Fluoreszenzproteine schnell und einfach gegen andere FRET-Partner ausgetauscht werden. So kann für jede Anwendung schnell eine passende Fluoreszenzprotein-Linker-Bindeprotein-Kombination gefunden werden.

Exemplarisch wurde der gereinigte Linker-freie Biosensor-Prototyp (0-perm-0-Sensor) aus der 2. Toolbox zur Lysindetektion im BioLector®-Kultivierungssystem eingesetzt. Aufgrund der zirkularen Permutation im LAO-Bindeprotein sind die Sensoren dieses Typs jedoch nicht ausreichend stabil, um über längere Zeit stabile Signale zu liefern. Daher konnte dieser FRET-Biosensor noch nicht als Online-Detektionssystem genutzt werden, aber bereits als Atline-Analyt verwendet werden.

Die Messung von extrazellulären Lysinkonzentrationen in *C. glutamicum*-Überständen gelang mit überraschender Genauigkeit im Vergleich zur offline Analytik mit Ninhydrin bzw. HPLC. So konnte bereits in der *Flowerplate* direkt die Lysinkonzentration abgeschätzt werden, bevor die offline-Analytik durchgeführt wurde. Hierbei ist eine richtige Kalibration der Sensoren entscheidend, die den Medienhintergrund berücksichtigt.

Ein Einsatz von anderen genetisch kodierten, FRET-basierten Biosensoren mit stabilerem Bindeprotein ist daher zukünftig auch online denkbar. Eine andere Möglichkeit besteht in der Immobilisierung der Sensoren zur Verbesserung ihrer Stabilität. Die Immobilisierung der Sensoren ist nicht einfach zu realisieren, da das Immobilisat transparent sein müsste und gleichzeitig die Biosensoren noch ausreichend flexibel für ihre spezifische Konformationsänderung sein müssten.

In dieser Arbeit wurden Grundlagen gelegt, um FRET-Biosensorzellen als Messzellen verwenden zu können. Es zeigte sich, dass die Sensorzellen extrazelluläre Lysinkonzentrationen durch die intrazellulären Sensoren reproduzierbar anzeigen können. Leider lysieren die lyophilisierten Zellen, sodass nur die frisch kultivierten Zellen den Biosensor intrazellulär lokalisiert halten. Eine Anwendung dieser Sensorzellen ist sehr interessant – man kann die Sensorzellen immobilisieren und als Sensorzellen-Patch verwenden oder man kann die Zellen in µ-Chips oder Fermentationsüberständen einsetzen. Detektion eines Wachstumsfaktors mit Sensorzellen findet sich beispielsweise in der humanen Zelltherapie [190]. Zum Sensitivitätsscreening sind die Ganzzellsysteme ebenfalls gut geeignet – dies zeigte ein Test mit drei Vertretern der Sensortoolbox mit permutiertem Bindeprotein.

Insgesamt konnten Biosensortoolboxen mit modulierten Affinitäten und Sensitivitäten für Lysin aufgebaut werden, in denen Bindeprotein, Fluoreszenzproteine und Linker frei austauschbar sind. Diese Biosensoren wurden in gereinigter Form zur Messung von Kulturüberständen eingesetzt. Zudem wurde der Einsatz der Biosensoren in Ganzzellsystemen getestet, welche zukünftig in der Metabolitanalytik oder zum Screening angewandt werden können.

VIII. Literaturverzeichnis

- [1] Herschel, J. F. W., On a case of superficial colour presented by a homogeneous liquid internally colourless, *Philos. Trans. R. Soc. London* **135** (1845) 143–145.
- [2] Stokes, G. G., On the change of refrangibility of light, *Philos. Trans. R. Soc. London* **142** (1852) 463–562.
- [3] Jabłoński, A., Efficiency of anti-stokes fluorescence in dyes, *Nature* **131** (1933) 839–840.
- [4] Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3. ed., (Springer US, 2006).
- [5] Breitmaier, E., and Jung, G., *Organische Chemie*, (Thieme Verlag, 2005).
- [6] Förster, T., Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz, *Ann. Phys.* **2** (1948) 55–75.
- [7] Dale, R. E., Eisinger, J., and Blumberg, W. E., Orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer, *Biophys. J.* **26** (1979) 161–193.
- [8] Aoki, K., Kamioka, Y., and Matsuda, M., Fluorescence resonance energy transfer imaging of cell signaling from *in vitro* to *in vivo*: basis of biosensor construction, live imaging, and image processing, *Dev. Growth Differ.* 55 (2013) 515–522.
- [9] Shimomura, O., Johnson, F. H., and Saiga, Y., Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*, *J. Cell. Comp. Physiol.* **59** (1962) 223–239.
- [10] Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., and Cormier, M. J., Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein, *Gene* **111** (1992) 229–233.
- [11] Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., and Prasher, D., Green fluorescent protein as a marker for gene expression, *Science* 263 (1994) 802– 805.
- [12] Inouye, S., and Tsuji, F. I., Aequorea Green Fluorescent Protein expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein, Febs Lett. 341 (1994) 277–280.
- [13] Chalfie, M., GFP: lighting up life (Nobel Lecture), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (2009) 5603–5611.

- [14] Shimomura, O., Discovery of green fluorescent protein (GFP) (Nobel Lecture), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48** (2009) 5590–5602.
- [15] Tsien, R. Y., Constructing and exploiting the fluorescent protein paintbox (Nobel Lecture), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48** (2009) 5612–5626.
- [16] Heim, R., and Tsien, R. Y., Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer, *Curr. Biol.* **6** (1996) 178–182.
- [17] Heim, R., Prasher, D. C., and Tsien, R. Y., Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91** (1994) 12501–12504.
- [18] Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y., and Remington, S. J., Crystal structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein, *Science* 273 (1996) 1392–1395.
- [19] Griesbeck, O., Baird, G. S., Campbell, R. E., Zacharias, D. A., and Tsien, R. Y., Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein, *J. Biol. Chem.* **276** (2001) 29188–29194.
- [20] Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A., and Tsien, R. Y., Understanding, improving and using green fluorescent proteins, *Trends Biochem. Sci.* **20** (1995) 448–455.
- [21] Tsien, R. Y., The green fluorescent protein, *Annu. Rev. Biochem.* **67** (1998) 509–544.
- [22] Reid, B. G., and Flynn, G. C., Chromophore formation in Green Fluorescent Protein, *Society* **36** (1997) 6786–6791.
- [23] Heim, R., Cubitt, A. B., and Tsien, R. Y., Improved green fluorescence, *Nature* 373 (1995) 663–664.
- [24] Hyun Bae, J., Rubini, M., Jung, G., Wiegand, G., Seifert, M. H. J., Azim, K. M., Kim, J.-S., Zumbusch, A., Holak, T. A., Moroder, L., Huber, R., and Budisa, N., Expansion of the genetic code enables design of a novel "Gold" class of green fluorescent proteins, *J. Mol. Biol.* **328** (2003) 1071–1081.
- [25] Chudakov, D. M., Matz, M. V, Lukyanov, S., and Lukyanov, K. A., Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues, *Physiol. Rev.* **90** (2010) 1103–1163.
- [26] Newman, R. H., Fosbrink, M. D., and Zhang, J., Genetically encodable fluorescent biosensors for tracking signaling dynamics in living cells, *Chem. Rev.* **111** (2011) 3614–3666.
- [27] Loening, A. M., Fenn, T. D., and Gambhir, S. S., Crystal structures of the Luciferase and Green Fluorescent Protein from *Renilla reniformis*, *J. Mol. Biol.*

374 (2007) 1017–1028.

- [28] Peelle, B., Gururaja, T. L., Payan, D. G., and Anderson, D. C., Characterization and use of green fluorescent proteins from *Renilla mulleri* and *Ptilosarcus guernyi* for the human cell display of functional peptides, *J. Protein Chem.* **20** (2001) 507–519.
- [29] Shagin, D. A., Barsova, E. V, Yanushevich, Y. G., Fradkov, A. F., Lukyanov, K. A., Labas, Y. A., Semenova, T. N., Ugalde, J. A., Meyers, A., Nunez, J. M., Widder, E. A., Lukyanov, S. A., and Matz, M. V, GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: evolution of functional features and structural complexity, *Mol. Biol. Evol.* **21** (2004) 841–850.
- [30] Drepper, T., Eggert, T., Circolone, F., Heck, A., Krauss, U., Guterl, J. K., Wendorff, M., Losi, A., Gartner, W., and Jaeger, K. E., Reporter proteins for *in vivo* fluorescence without oxygen, *Nat. Biotechnol.* **25** (2007) 443–445.
- [31] Circolone, F., Granzin, J., Jentzsch, K., Drepper, T., Jaeger, K. E., Willbold, D., Krauss, U., and Batra-Safferling, R., Structural basis for the slow dark recovery of a full-length LOV protein from *Pseudomonas putida*, *J. Mol. Biol.* **417** (2012) 362–374.
- [32] Conrad, K. S., Manahan, C. C., and Crane, B. R., Photochemistry of flavoprotein light sensors, *Nat. Chem. Biol.* **10** (2014) 801–809.
- [33] Kumagai, A., Ando, R., Miyatake, H., Greimel, P., Kobayashi, T., Hirabayashi, Y., Shimogori, T., and Miyawaki, A., A bilirubin-inducible fluorescent protein from eel muscle, *Cell* **153** (2013) 1602–1611.
- [34] Drepper, T., Huber, R., Heck, A., Circolone, F., Hillmer, A. K., Büchs, J., and Jaeger, K. E., Flavin mononucleotide-based fluorescent reporter proteins outperform Green Fluorescent Protein-like proteins as quantitative *in vivo* realtime reporters, *Appl. Environ. Microbiol.* **76** (2010) 5990–5994.
- [35] Potzkei, J., Kunze, M., Drepper, T., Gensch, T., Jaeger, K. E., and Büchs, J., Real-time determination of intracellular oxygen in bacteria using a genetically encoded FRET-based biosensor, *Bmc Biol.* **10** (2012) 1–13.
- [36] Nagel, B., Dellweg, H., and Gierasch, L. M., Glossary for chemists of terms used in biotechnology (IUPAC Recommendations 1992), *Pure Appl. Chem.* 64 (1992) 143–168.
- [37] Clark, L. C., and Lyons, C., Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **102** (1962) 29–45.
- [38] Bandodkar, A. J., Jia, W., Ramírez, J., and Wang, J., Biocompatible enzymatic roller pens for direct writing of biocatalytic materials: "Do-it-Yourself" electrochemical biosensors, *Adv. Healthc. Mater.* (2015) 1–10.
- [39] Bohunicky, B., and Mousa, S. A., Biosensors: The new wave in cancer
diagnosis, Nanotechnol. Sci. Appl. 4 (2011) 1–10.

- [40] Horvath, G., Young, S., and Latz, E., Toll-like receptor interactions imaged by FRET microscopy and GFP fragment reconstitution, *Methods Mol. Biol.* 517 (2009) 33–54.
- [41] Depry, C., Mehta, S., and Zhang, J., Multiplexed visualization of dynamic signaling networks using genetically encoded fluorescent protein-based biosensors, *Pflugers Arch.* 465 (2012) 373–381.
- [42] Zal, T., Visualization of protein interactions in living cells, *Adv. Exp. Med. Biol.*640 (2008) 183–197.
- [43] Mustafi, N., Grünberger, A., Kohlheyer, D., Bott, M., and Frunzke, J., The development and application of a single-cell biosensor for the detection of lmethionine and branched-chain amino acids., *Metab. Eng.* 14 (2012) 449–57.
- [44] Binder, S., Siedler, S., Marienhagen, J., Bott, M., and Eggeling, L., Recombineering in *Corynebacterium glutamicum* combined with optical nanosensors: a general strategy for fast producer strain generation, *Nucleic Acids Res.* **41** (2013) 6360–6369.
- [45] Okumoto, S., Jones, A., and Frommer, W. B., Quantitative imaging with fluorescent biosensors, *Annu. Rev. Plant Biol.* **63** (2012) 663–706.
- [46] Mohsin, M., and Ahmad, A., Genetically-encoded nanosensor for quantitative monitoring of methionine in bacterial and yeast cells, *Biosens. Bioelectron.* 59 (2014) 358–364.
- [47] Awaji, T., Hirasawa, A., Shirakawa, H., Tsujimoto, G., and Miyazaki, S., Novel green fluorescent protein-based ratiometric indicators for monitoring pH in defined intracellular microdomains, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289 (2001) 457–462.
- [48] Llopis, J., McCaffery, J. M., Miyawaki, A., Farquhar, M. G., and Tsien, R. Y., Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95** (1998) 6803– 6808.
- [49] Palmer, A. E., Qin, Y., Park, J. G., and McCombs, J. E., Design and application of genetically encoded biosensors, *Trends Biotechnol.* **29** (2011) 144–152.
- [50] Borst, J. W., Willemse, M., Slijkhuis, R., van der Krogt, G., Laptenok, S. P., Jalink, K., Wieringa, B., and Fransen, J. A. M., ATP changes the fluorescence lifetime of cyan fluorescent protein via an interaction with His148, *PLoS One* 5 (2010) e13862.
- [51] Binder, S., Schendzielorz, G., Stäbler, N., Krumbach, K., Hoffmann, K., Bott, M., and Eggeling, L., A high-throughput approach to identify genomic variants of bacterial metabolite producers at the single-cell level, *Genome Biol.* **13**

(2012) 1–12.

- [52] Tang, S. Y., and Cirino, P. C., Design and application of a mevalonateresponsive regulatory protein, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **50** (2011) 1084–1086.
- [53] Tam, R., and Saier, M. H., Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria, *Microbiol. Rev.* 57 (1993) 320–346.
- [54] Dwyer, M. A., and Hellinga, H. W., Periplasmic binding proteins: a versatile superfamily for protein engineering, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14** (2004) 495–504.
- [55] Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J. A., Ikura, M., and Tsien, R. Y., Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin, *Nature* **388** (1997) 882–887.
- [56] Romoser, V. A., Hinkle, P. M., and Persechini, A., Detection in living cells of Ca²⁺-dependent changes in the fluorescence emission of an indicator composed of two green fluorescent protein variants linked by a calmodulinbinding sequence - A new class of fluorescent indicators, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 13270–13274.
- [57] de Lorimier, R. M., Smith, J. J., Dwyer, M. A., Looger, L. L., Sali, K. M., Paavola, C. D., Rizk, S. S., Sadigov, S., Conrad, D. W., Loew, L., and Hellinga, H. W., Construction of a fluorescent biosensor family, *Protein Sci.* **11** (2002) 2655–2675.
- [58] Lin, C.-W., and Ting, A. Y., A genetically encoded fluorescent reporter of histone phosphorylation in living cells, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **43** (2004) 2940–2943.
- [59] Hessels, A. M., and Merkx, M., Genetically-encoded FRET-based sensors for monitoring Zn²⁺ in living cells, *Metallomics* 7 (2015) 258–266.
- [60] Hamers, D., van Voorst Vader, L., Borst, J. W., and Goedhart, J., Development of FRET biosensors for mammalian and plant systems, *Protoplasma* 251 (2014) 333–347.
- [61] Okumoto, S., Quantitative imaging using genetically encoded sensors for small molecules in plants, *Plant J.* **70** (2012) 108–117.
- [62] San Martín, A., Ceballo, S., Baeza-Lehnert, F., Lerchundi, R., Valdebenito, R., Contreras-Baeza, Y., Alegría, K., and Barros, L. F., Imaging mitochondrial flux in single cells with a FRET sensor for pyruvate, *PLoS One* **9** (2014) e85780.
- [63] San Martín, A., Ceballo, S., Ruminot, I., Lerchundi, R., Frommer, W. B., and Barros, L. F., A genetically encoded FRET lactate sensor and its use to detect the Warburg effect in single cancer cells, *PLoS One* 8 (2013) e57712.

- [64] Veetil, J. V, Jin, S., and Ye, K., A glucose sensor protein for continuous glucose monitoring, *Biosens. Bioelectron.* **26** (2010) 1650–1655.
- [65] Marvin, J. S., and Hellinga, H. W., Conversion of a maltose receptor into a zinc biosensor by computational design, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 4955–4960.
- [66] Mohsin, M., Abdin, M. Z., Nischal, L., Kardam, H., and Ahmad, A., Genetically encoded FRET-based nanosensor for *in vivo* measurement of leucine, *Biosens. Bioelectron.* **50** (2013) 72–77.
- [67] Okada, S., Ota, K., and Ito, T., Circular permutation of ligand-binding module improves dynamic range of genetically encoded FRET-based nanosensor, *Protein Sci.* 18 (2009) 2518–2527.
- [68] Barros, L. F., San Martin, A., Sotelo-Hitschfeld, T., Lerchundi, R., Fernandez-Moncada, I., Ruminot, I., Gutierrez, R., Valdebenito, R., Ceballo, S., Alegria, K., Baeza-Lehnert, F., and Espinoza, D., Small is fast: astrocytic glucose and lactate metabolism at cellular resolution, *Front. Cell. Neurosci.* 7 (2013) 1–8.
- [69] Deuschle, K., Okumoto, S., Fehr, M., Looger, L. L., Kozhukh, L., and Frommer, W. B., Construction and optimization of a family of genetically encoded metabolite sensors by semirational protein engineering, *Protein Sci.* 14 (2005) 2304–2314.
- [70] Takanaga, H., Chaudhuri, B., and Frommer, W. B., GLUT1 and GLUT9 as major contributors to glucose influx in HepG2 cells identified by a high sensitivity intramolecular FRET glucose sensor, *Biochim. Biophys. Acta -Biomembr.* **1778** (2008) 1091–1099.
- [71] van Dongen, E. M., Evers, T. H., Dekkers, L. M., Meijer, E. W., Klomp, L. W., and Merkx, M., Variation of linker length in ratiometric fluorescent sensor proteins allows rational tuning of Zn(II) affinity in the picomolar to femtomolar range, *J. Am. Chem. Soc.* **129** (2007) 3494–3495.
- [72] Komatsu, N., Aoki, K., Yamada, M., Yukinaga, H., Fujita, Y., Kamioka, Y., and Matsuda, M., Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases, *Mol. Biol. Cell* **22** (2011) 4647–4656.
- [73] Evers, T. H., van Dongen, E. M., Faesen, A. C., Meijer, E. W., and Merkx, M., Quantitative understanding of the energy transfer between fluorescent proteins connected via flexible peptide linkers, *Biochemistry* **45** (2006) 13183–13192.
- [74] Lissandron, V., Terrin, A., Collini, M., D'alfonso, L., Chirico, G., Pantano, S., and Zaccolo, M., Improvement of a FRET-based indicator for cAMP by linker design and stabilization of donor-acceptor interaction, *J. Mol. Biol.* **354** (2005) 546–555.
- [75] Moussa, R., Eine kritische Evaluierung FRET-basierter Biosensoren als Werkzeuge für die quantitative Metabolitanalytik, Dissertation, Heinrich-Heine-

Universität Düsseldorf, (2012).

- [76] Moussa, R., Baierl, A., Steffen, V., Kubitzki, T., Wiechert, W., and Pohl, M., An evaluation of genetically encoded FRET-based biosensors for quantitative metabolite analyses *in vivo*, *J. Biotechnol.* **191** (2014) 250–259.
- [77] Cangelosi, G. A., Ankenbauer, R. G., and Nester, E. W., Sugars induce the Agrobacterium virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 6708– 6712.
- [78] O'Hara, P. J., Sheppard, P. O., Thogersen, H., Venezia, D., Haldeman, B. A., McGrane, V., Houamed, K. M., Thomsen, C., Gilbert, T. L., and Mulvihill, E. R., The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins, *Neuron* **11** (1993) 41–52.
- [79] Felder, C. B., Graul, R. C., Lee, A. Y., Merkle, H.-P., and Sadee, W., The venus flytrap of periplasmic binding proteins: An ancient protein module present in multiple drug receptors, *AAPS PharmSci* **1** (1999) 7–26.
- [80] Quiocho, F. A., and Ledvina, P. S., Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: Variation of common themes, *Mol. Microbiol.* **20** (1996) 17–25.
- [81] Fukami-Kobayashi, K., Tateno, Y., and Nishikawa, K., Domain dislocation: a change of core structure in periplasmic binding proteins in their evolutionary history., *J. Mol. Biol.* **286** (1999) 279–290.
- [82] Lee, Y. H., Deka, R. K., Norgard, M. V, Radolf, J. D., and Hasemann, C. A., *Treponema pallidum* TroA is a periplasmic zinc-binding protein with a helical backbone, *Nat. Struct. Biol.* 6 (1999) 628–633.
- [83] Berntsson, R. P. A., Smits, S. H. J., Schmitt, L., Slotboom, D. J., and Poolman, B., A structural classification of substrate-binding proteins, *FEBS Lett.* 584 (2010) 2606–2617.
- [84] Lawrence, M. C., Pilling, P. A., Epa, V. C., Berry, A. M., Ogunniyi, A. D., and Paton, J. C., The crystal structure of pneumococcal surface antigen PsaA reveals a metal-binding site and a novel structure for a putative ABC-type binding protein, *Structure* **6** (1998) 1553–1561.
- [85] Linke, C., Caradoc-Davies, T. T., Young, P. G., Proft, T., and Baker, E. N., The laminin-binding protein Lbp from *Streptococcus pyogenes* is a zinc receptor, *J. Bacteriol.* **191** (2009) 5814–5823.
- [86] Rukhman, V., Anati, R., Melamed-Frank, M., and Adir, N., The MntC crystal structure suggests that import of Mn²⁺ in cyanobacteria is redox controlled, *J. Mol. Biol.* **348** (2005) 961–969.
- [87] Sun, X., Baker, H. M., Ge, R., Sun, H., He, Q. Y., and Baker, E. N., Crystal

structure and metal binding properties of the lipoprotein MtsA, responsible for iron transport in *Streptococcus pyogenes*, *Biochemistry* **48** (2009) 6184–6190.

- [88] Quiocho, F. A., Spurlino, J. C., and Rodseth, L. E., Extensive features of tight oligosaccharide binding revealed in high-resolution structures of the maltodextrin transport/chemosensory receptor, *Structure* 5 (1997) 997–1015.
- [89] Tonozuka, T., Sogawa, A., Yamada, M., Matsumoto, N., Yoshida, H., Kamitori, S., Ichikawa, K., Mizuno, M., Nishikawa, A., and Sakano, Y., Structural basis for cyclodextrin recognition by *Thermoactinomyces vulgaris* cyclo/maltodextrinbinding protein, *FEBS J.* 274 (2007) 2109–2120.
- [90] Björkman, A. J., and Mowbray, S. L., Multiple open forms of ribose-binding protein trace the path of its conformational change, *J. Mol. Biol.* **279** (1998) 651–664.
- [91] Cuneo, M. J., Beese, L. S., and Hellinga, H. W., Ligand-induced conformational changes in a thermophilic ribose-binding protein, *BMC Struct. Biol.* 8 (2008) 1– 14.
- [92] Magnusson, U., Salopek-Sondi, B., Luck, L. A., and Mowbray, S. L., X-ray structures of the leucine-binding protein illustrate conformational changes and the basis of ligand specificity, *J. Biol. Chem.* **279** (2004) 8747–8752.
- [93] Sack, J. S., Trakhanov, S. D., Tsigannik, I. H., and Quiocho, F. A., Structure of the L-leucine-binding protein refined at 2.4 A resolution and comparison with the Leu/Ile/Val-binding protein structure, *J. Mol. Biol.* **206** (1989) 193–207.
- [94] Trakhanov, S., Vyas, N. K., Luecke, H., Kristensen, D. M., Ma, J., and Quiocho, F. A., Ligand-free and -bound structures of the binding protein (LivJ) of the *Escherichia coli* ABC leucine/isoleucine/valine transport system: Trajectory and dynamics of the interdomain rotation and ligand specificity, *Biochemistry* 44 (2005) 6597–6608.
- [95] Dunten, P., and Mowbray, S. L., Crystal structure of the dipeptide binding protein from *Escherichia coli* involved in active transport and chemotaxis, *Protein Sci.* **4** (1995) 2327–2334.
- [96] Berntsson, R. P.-A., Doeven, M. K., Fusetti, F., Duurkens, R. H., Sengupta, D., Marrink, S.-J., Thunnissen, A.-M. W. H., Poolman, B., and Slotboom, D.-J., The structural basis for peptide selection by the transport receptor OppA, *EMBO J.* 28 (2009) 1332–1340.
- [97] Levdikov, V. M., Blagova, E. V., Brannigan, J. A., Wright, L., Vagin, A. A., and Wilkinson, A. J., The structure of the oligopeptide-binding protein, AppA, from *Bacillus subtilis* in complex with a nonapeptide, *J. Mol. Biol.* **345** (2005) 879– 892.
- [98] Mackenzie, A. K., Valegård, K., Iqbal, A., Caines, M. E. C., Kershaw, N. J., Jensen, S. E., Schofield, C. J., and Andersson, I., Crystal structures of an

oligopeptide-binding protein from the biosynthetic pathway of the β -lactamase inhibitor clavulanic acid, *J. Mol. Biol.* **396** (2010) 332–344.

- [99] Heddle, J., Scott, D. J., Unzai, S., Park, S. Y., and Tame, J. R. H., Crystal structures of the liganded and unliganded Nickel-binding protein NikA from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 50322–50329.
- [100] Cuneo, M. J., Beese, L. S., and Hellinga, H. W., Structural analysis of semispecific oligosaccharide recognition by a cellulose-binding protein of *Thermotoga maritima* reveals adaptations for functional diversification of the oligopeptide periplasmic binding protein fold, *J. Biol. Chem.* **284** (2009) 33217– 33223.
- [101] Koropatkin, N., Randich, A. M., Bhattacharyya-Pakrasi, M., Pakrasi, H. B., and Smith, T. J., The structure of the iron-binding protein, FutA1, from *Synechocystis* 6803, *J. Biol. Chem.* **282** (2007) 27468–27477.
- [102] Bruns, C. M., Anderson, D. S., Vaughan, K. G., Williams, P. A., Nowalk, A. J., McRee, D. E., and Mietzner, T. A., Crystallographic and biochemical analyses of the metal-free *Haemophilus influenzae* Fe³⁺-binding protein, *Biochemistry* **40** (2001) 15631–15637.
- [103] Higgins, M. A., Abbott, D. W., Boulanger, M. J., and Boraston, A. B., Blood group antigen recognition by a solute-binding protein from a serotype 3 strain of *Streptococcus pneumoniae*, *J. Mol. Biol.* **388** (2009) 299–309.
- [104] Sugiyama, S., Matsuo, Y., Maenaka, K., Vassylyev, D. G., Matsushima, M., Kashiwagi, K., Igarashi, K., and Morikawa, K., The 1.8-A X-ray structure of the *Escherichia coli* PotD protein complexed with spermidine and the mechanism of polyamine binding, *Protein Sci.* 5 (1996) 1984–1990.
- [105] Vassylyev, D. G., Tomitori, H., Kashiwagi, K., Morikawa, K., and Igarashi, K., Crystal structure and mutational analysis of the *Escherichia coli* putrescine receptor. Structural basis for substrate specificity, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 17604–17609.
- [106] Tanabe, M., Mirza, O., Bertrand, T., Atkins, H. S., Titball, R. W., Iwata, S., Brown, K. A., and Byrne, B., Structures of OppA and PstS from Yersinia pestis indicate variability of interactions with transmembrane domains, Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. 63 (2007) 1185–1193.
- [107] Vyas, N. K., Vyas, M. N., and Quiocho, F. A., Crystal structure of *M. tuberculosis* ABC phosphate transport receptor: Specificity and charge compensation dominated by ion-dipole interactions, *Structure* **11** (2003) 765–774.
- [108] Gonin, S., Arnoux, P., Pierru, B., Lavergne, J., Alonso, B., Sabaty, M., and Pignol, D., Crystal structures of an Extracytoplasmic Solute Receptor from a TRAP transporter in its open and closed forms reveal a helix-swapped dimer requiring a cation for alpha-keto acid binding, *BMC Struct. Biol.* **7** (2007) 1–14.

- [109] Rucktooa, P., Antoine, R., Herrou, J., Huvent, I., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., Villeret, V., and Bompard, C., Crystal structures of two *Bordetella pertussis* periplasmic receptors contribute to defining a novel pyroglutamic acid binding DctP subfamily, *J. Mol. Biol.* **370** (2007) 93–106.
- [110] Vahedi-Faridi, A., Eckey, V., Scheffel, F., Alings, C., Landmesser, H., Schneider, E., and Saenger, W., Crystal structures and mutational analysis of the arginine-, lysine-, histidine-binding protein ArtJ from *Geobacillus stearothermophilus*. Implications for interactions of ArtJ with its cognate ATPbinding cassette transporter, Art(MP)₂, *J. Mol. Biol.* **375** (2008) 448–459.
- [111] Oh, B.-H., Ames, G. F.-L., and Kim, S.-H., Structural basis for multiple ligand specificity of the periplasmic lysine, arginine, ornithine-binding protein, *J. Biol. Chem.* **269** (1994) 26323–26330.
- [112] Sun, Y. J., Rose, J., Wang, B. C., and Hsiao, C. D., The structure of glutaminebinding protein complexed with glutamine at 1.94 A resolution: comparisons with other amino acid binding proteins, *J. Mol. Biol.* **278** (1998) 219–229.
- [113] Hsiao, C., Sun, Y., Rose, J., and Wang, B., The crystal structure of glutaminebinding protein from *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.* **262** (1996) 225–242.
- [114] Armstrong, N., Sun, Y., Chen, G. Q., and Gouaux, E., Structure of a glutamatereceptor ligand-binding core in complex with kainate, *Nature* **395** (1998) 913– 917.
- [115] Hogner, A., Kastrup, J. S., Jin, R., Liljefors, T., Mayer, M. L., Egebjerg, J., Larsen, I. K., and Gouaux, E., Structural basis for AMPA receptor activation and ligand selectivity: Crystal structures of five agonist complexes with the GluR2 ligand-binding core, *J. Mol. Biol.* **322** (2002) 93–109.
- [116] Kasper, C., Frydenvang, K., Naur, P., Gajhede, M., Pickering, D. S., and Kastrup, J. S., Molecular mechanism of agonist recognition by the ligandbinding core of the ionotropic glutamate receptor 4, *FEBS Lett.* **582** (2008) 4089–4094.
- [117] Yao, Y., Harrison, C. B., Freddolino, P. L., Schulten, K., and Mayer, M. L., Molecular mechanism of ligand recognition by NR3 subtype glutamate receptors., *EMBO J.* 27 (2008) 2158–2170.
- [118] Müller, A., León-Kempis, M. D. R., Dodson, E., Wilson, K. S., Wilkinson, A. J., and Kelly, D. J., A bacterial virulence factor with a dual role as an adhesin and a solute-binding protein: the crystal structure at 1.5 Å resolution of the PEB1a protein from the food-borne human pathogen *Campylobacter jejuni*, *J. Mol. Biol.* **372** (2007) 160–171.
- [119] Williams, W. A., Zhang, R. G., Zhou, M., Joachimiak, G., Gornicki, P., Missiakas, D., and Joachimiak, A., The membrane-associated lipoprotein-9 GmpC from *Staphylococcus aureus* binds the dipeptide GlyMet via side chain

interactions, *Biochemistry* **43** (2004) 16193–16202.

- [120] Kustu, S. G., McFarland, N. C., Hui, S. P., Esmon, B., and Ames, G. F.-L., Nitrogen control in *Salmonella typhimurium*: Co-regulation of synthesis of glutamine synthetase and amino acid transport systems, *J. Bacteriol.* **138** (1979) 218–234.
- [121] Kustu, S. G., and Ames, G. F.-L., The *hisP* protein, a known histidine transport component in *Salmonella typhimurium*, is also an arginine transport component, *J. Bacteriol.* **116** (1973) 107–113.
- [122] Nikaido, K., and Ames, G. F.-L., Purification and characterization of the periplasmic lysine-binding, arginine-binding, ornithine-binding protein (LAO) from *Salmonella typhimurium*, *J. Biol. Chem.* **267** (1992) 20706–20712.
- [123] Ames, G. F.-L., and Lever, J., Components of histidine transport: histidinebinding proteins and *hisP* protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 66 (1970) 1096–1103.
- [124] Higgins, C. F., and Ames, G. F.-L., Two periplasmic transport proteins which interact with a common membrane receptor show extensive homology: Complete nucleotide sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am. Sci.* 78 (1981) 6038–6042.
- [125] Oh, B. H., Pandit, J., Kang, C. H., Nikaido, K., Gokcen, S., Ames, G. F.-L., and Kim, S. H., Three-dimensional structures of the periplasmic lysine/arginine/ornithine-binding protein with and without a ligand, *J. Biol. Chem.* **268** (1993) 11348–11355.
- [126] Blombach, B., Hans, S., Bathe, B., and Eikmanns, B. J., Acetohydroxyacid synthase, a novel target for improvement of L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*, *Appl. Environ. Microbiol.* **75** (2009) 419–427.
- [127] Kinoshita, S., Udaka, S., and Shimono, M., Studies on the amino acid fermentation. Part 1. Production of L-glutamic acid by various microorganisms., *J. Gen. Appl. Microbiol.* **50** (1957) 331–343.
- [128] Bott, M., and Brocker, M., Two-component signal transduction in *Corynebacterium glutamicum* and other *corynebacteria*: On the way towards stimuli and targets, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94** (2012) 1131–1150.
- [129] Samorski, M., Müller-Newen, G., and Büchs, J., Quasi-continuous combined scattered light and fluorescence measurements: A novel measurement technique for shaken microtiter plates, *Biotechnol. Bioeng.* **92** (2005) 61–68.
- [130] Duetz, W. A., Microtiter plates as mini-bioreactors: miniaturization of fermentation methods, *Trends Microbiol.* **15** (2007) 469–475.
- [131] Szita, N., Zanzotto, A., Boccazzi, P., Sinskey, A. J., Schmidt, M. A., and Jensen, K. F., Monitoring of cell growth, oxygen and pH in microfermentors,

microTAS (2002) 9–10.

- [132] Nonet, M. L., Marvel, C., and Tolan, D. R., The *hisT-purF* region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. Identification of additional genes of the *hisT* and *purF* operons, *J. Biol. Chem.* **262** (1987) 12209–12217.
- [133] Studier, F. W., Protein production by auto-induction in high density shaking cultures, *Protein Expr. Purif.* **41** (2005) 207–234.
- [134] Unthan, S., Grünberger, A., van Ooyen, J., Gätgens, J., Heinrich, J., Paczia, N., Wiechert, W., Kohlheyer, D., and Noack, S., Beyond growth rate 0.6: What drives *Corynebacterium glutamicum* to higher growth rates in defined medium, *Biotechnol. Bioeng.* **111** (2014) 359–371.
- [135] Bertani, G., Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* **62** (1951) 293–300.
- [136] Harwood, C. R., *Molecular Biological Methods for Bacillus*, (John Wiley & Sons Ltd, 1990).
- [137] Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B. J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Krämer, R., Linke, B., McHardy, A. C., Meyer, F., Möckel, B., Pfefferle, W., Pühler, A., Rey, D. A., Rückert, C., Rupp, O., Sahm, H., Wendisch, V. F., Wiegräbe, I., and Tauch, A., The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins, *J. Biotechnol.* 104 (2003) 5–25.
- [138] Hanahan, D., Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J. Mol. Biol.* **166** (1983) 557–580.
- [139] Studier, F. W., and Moffatt, B. A., Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, *J. Mol. Biol.* **189** (1986) 113–130.
- [140] Madigan, M. T., and Martinko, J. M., *Biology of microorganisms*, 11th ed., (Addison-Wesley Longman, 2006).
- [141] Mullis, K. B., The polymerase chain reaction (Nobel Lecture), *Angew. Chemie Int.* **92037** (1994) 1209–1213.
- [142] Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., *Molecular cloning*, (Cold Spring Harbor Laboratory, 2002).
- [143] Tillett, D., and Neilan, B. A., Enzyme-free cloning: a rapid method to clone PCR products independent of vector restriction enzyme sites, *Nucleic Acids Res.* 27 (1999) e26.
- [144] Shevchuk, N. A., Bryksin, A. V, Nusinovich, Y. A., Cabello, F. C., Sutherland,

M., and Ladisch, S., Construction of long DNA molecules using long PCRbased fusion of several fragments simultaneously, *Nucleic Acids Res.* **32** (2004) e19.

- [145] Yamabhai, M., Sticky PCR: A PCR-based protocol for targeted protein engineering, *Biotechnol. J.* **4** (2009) 544–553.
- [146] Cohen, S. N., Chang, A. C., and Hsu, L., Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69 (1972) 2110–2114.
- [147] Meadow, N. D., Fox, D. K., and Roseman, S., The bacterial phosphoenolpyruvate: glycose phosphotransferase system, *Annu. Rev. Biochem.* **59** (1990) 497–542.
- [148] Postma, P. W., Lengeler, J. W., and Jacobson, G. R., Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria, *Microbiol. Rev.* 57 (1993) 543–594.
- [149] Sindelar, G., Globale Expressionsanalysen zur Charakterisierung der Lysin-Produktion in *Corynebacterium glutamicum*, Dissertation, Düsseldorf, (2003).
- [150] Unthan, S., Radek, A., Wiechert, W., Oldiges, M., and Noack, S., Bioprocess automation on a mini pilot plant enables fast quantitative microbial phenotyping, *Microb. Cell Fact.* **14** (2015) 1–11.
- [151] Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidmann, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K., Short protocols in molecular biology. A compendium of methods from current protocols in molecular biology, 5th ed., (WILEY-VCH Verlag, 2002).
- [152] Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72** (1976) 248–254.
- [153] Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T., How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein, *Protein Sci.* 4 (1995) 2411–2423.
- [154] Bouguer, P., *Essai d'optique sur la gradation de la lumière*, (Claude Jombert Verlag, Paris, 1729).
- [155] Lambert, J. H., Photometrie: photometria, sive de mensura et gradibus luminis, colorum et umbrae, *Bavar. State Libr.* (1760) 1.
- [156] Beer, A., Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten, *Ann. Der Phys. Und Chemie* **86** (1852) 78–88.
- [157] Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4., *Nature* **227** (1970) 680–685.

- [158] Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76** (1979) 4350–4354.
- [159] Bowie, L., Esters, F., Bolin, J., and Gochman, N., Development of an aqueous temperature-indicating technique and its application to clinical laboratory instrumentation, *Clin. Chem.* **22** (1976) 449–455.
- [160] Good, N. E., Winget, G. D., Winter, W., Connolly, T. N., Izawa, S., and Sing, R. M. M., Hydrogen ion buffers for biological research, *Biochemistry* 5 (1966) 467–477.
- [161] AppliChem, Biological Buffers, *Applichem* (2008) 1–20.
- [162] Lesley, S. A., and Wilson, I. A., Protein production and crystallization at the Joint Center for Structural Genomics, *J. Struct. Funct. Genomics* 6 (2005) 71– 79.
- [163] Freyer, M. W., and Lewis, E. A., Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions, *Methods Cell Biol.* **84** (2008) 79–113.
- [164] Pierce, M. M., Raman, C. S., and Nall, B. T., Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions, *Methods* **19** (1999) 213–221.
- [165] Goldenberg, D. P., and Creighton, T. E., Circular and circularly permuted forms of bovine pancreatic trypsin inhibitor, *J. Mol. Biol.* **165** (1983) 407–413.
- [166] Graf, R., and Schachman, H. K., Random circular permutation of genes and expressed polypeptide chains: application of the method to the catalytic chains of aspartate transcarbamoylase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93** (1996) 11591–11596.
- [167] Fehr, M., Frommer, W. B., and Lalonde, S., Visualization of maltose uptake in living yeast cells by fluorescent nanosensors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 9846–9851.
- [168] Otten, J., Modifikation des Bindeproteins in einem FRET-basierten Biosensor und die daraus resultierenden Effekte, Masterarbeit, RWTH Aachen, (2015).
- [169] Bischof, J. C., and He, X., Thermal stability of proteins, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1066** (2005) 12–33.
- [170] Rittenhouse, J., and Marcus, F., Peptide mapping by polyacrylamide gel electrophoresis after cleavage at aspartyl-prolyl peptide bonds in sodium dodecyl sulfate-containing buffers, *Anal. Biochem.* **138** (1984) 442–448.
- [171] Jussen, D., Development and characterization of a microfluidic magnetic oscillation reactor for enzymes, Dissertation, RWTH Aachen, (2014).

- [172] Zacharias, D. A., Violin, J. D., Newton, A. C., and Tsien, R. Y., Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells, *Science* 296 (2002) 913–916.
- [173] Ting, A. Y., Kain, K. H., Klemke, R. L., and Tsien, R. Y., Genetically encoded fluorescent reporters of protein tyrosine kinase activities in living cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98** (2001) 15003–15008.
- [174] Lin, C.-W. W., Jao, C. Y., and Ting, A. Y., Genetically encoded fluorescent reporters of histone methylation in living cells, *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004) 5982–5983.
- [175] Engelmann, S., Herstellung und Charakterisierung FRET-basierter Biosensoren, Bachelorarbeit, RWTH Aachen, (2013).
- [176] http://webbook.nist.gov/cgi/inchi/InChI%3D1S/H2O/h1H2, *Natl. Inst. Stand. Technol.* (2011).
- [177] Mertens, H. D., Piljic, A., Schultz, C., and Svergun, D. I., Conformational analysis of a genetically encoded FRET biosensor by SAXS, *Biophys. J.* **102** (2012) 2866–2875.
- [178] Dagge, L., Harr, K., Paul, M., and Schnedl, G., Classification of process analysis: offline, atline, online, inline, *Cem. Int.* **7** (2009) 72–81.
- [179] Hofmeyr, J.-H., and Cornish-Bowden, A., The reversible Hill equation: how to incorporate cooperative enzymes into metabolic models., *Comput. Appl. Biosci.* 13 (1997) 377–385.
- [180] Berg, J. M., Tymoczko, J. L., and Stryer, L., *Biochemistry*, 5th ed., (W H Freeman, 2002).
- [181] Horton, H. R., Moran, L. A., Scrimgeour, K. G., Perry, M. D., and Rawn, J. D., *Biochemie*, 4. ed., (Addison-Wesley Verlag, 2008).
- [182] Jensen, J. H., Calculating pH and salt dependence of protein-protein binding, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **9** (2008) 96–102.
- [183] Lattermann, C., Funke, M., Hansen, S., Diederichs, S., and Büchs, J., Crosssection perimeter is a suitable parameter to describe the effects of different baffle geometries in shaken microtiter plates, *J. Biol. Eng.* **8** (2014) 1–10.
- [184] Giese, H., Klöckner, W., Peña, C., Galindo, E., Lotter, S., Wetzel, K., Meissner, L., Peter, C. P., and Büchs, J., Effective shear rates in shake flasks, *Chem. Eng. Sci.* **118** (2014) 102–113.
- [185] Lattermann, C., and Büchs, J., Microscale and miniscale fermentation and screening, *Curr. Opin. Biotechnol.* **35** (2015) 1–6.

- [186] Willemse, M., Janssen, E., de Lange, F., Wieringa, B., and Fransen, J., ATP and FRET a cautionary note, *Nat. Biotechnol.* **25** (2007) 170–172.
- [187] Tufvesson, P., Lima-Ramos, J., Nordblad, M., and Woodley, J. M., Guidelines and cost analysis for catalyst production in biocatalytic processes, *Org. Process Res. Dev.* **15** (2011) 266–274.
- [188] Tavori, H., Kimmel, Y., and Barak, Z., Toxicity of leucine-containing peptides in Escherichia coli caused by circumvention of leucine transport regulation, J. Bacteriol. 146 (1981) 676–683.
- [189] Erdmann, A., Weil, B., and Krämer, R., Lysine secretion by wild-type *Corynebacterium glutamicum* triggered by dipeptide uptake, *J. Gen. Microbiol.* **139** (1993) 3115–3122.
- [190] Zhao, W., Schafer, S., Choi, J., Yamanaka, Y. J., Lombardi, M. L., Bose, S., Carlson, A. L., Phillips, J. A., Teo, W., Droujinine, I. A., Cui, C. H., Jain, R. K., Lammerding, J., Love, J. C., Lin, C. P., Sarkar, D., Karnik, R., and Karp, J. M., Cell-surface sensors for real-time probing of cellular environments, *Nat. Nanotechnol.* 6 (2011) 524–531.

IX. Anhang

1. Vektorkarten

Die für die Klonierung und Expression verwendeten Sensorkonstrukte lagen im pRSET-Vektor vor. Daher wird hier nur einmal das komplette Vektorkonstrukt gezeigt, anschließend nur noch der DNA-Abschnitt, der auch tatsächlich in eine Proteinsequenz übersetzt wurde. Alle His-Tags sind **fett** dargestellt, alle ECFP-Konstrukte blau, die Bindeproteine grün, die Citrine-Konstrukte orange, die flexiblen Linker purpur und die starren Linker rot. Die Restriktionsschnittstellen sind <u>unterstrichen</u>.

0-perm-0-Sensor (Plasmid MP27.2)

Gesamtes Plasmid (T7 Promotor und Terminator sind grau dargestellt):

CAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGGGGGGCTCCCAGGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAG TCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGGCGG AGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGGCTTTTGCTGGCCTTTTGC TGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGA GCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGATCTCGATCC CGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGATAATTTTGTTTA ACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCGGGGTTCT**CATCATCATCATCATCAT**GGTATGGCTGAT ACTCGCATTGGTGTAACAATCTATAAGTCGGCTGGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCA CCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGT CCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCG GCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTGCAGTGCTTCA GCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGT CCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTC GAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAAC ATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGC AGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCT CGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCCGGACAACCA CTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTG CTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCGGGATCCGGCACCGGTGTAGGGCTACGTAAAGATGAT GCTGAACTGACGGCTGCCTTCAATAAGGCGCTTGGCGAGCTGCGTCAGGACGGCACCTACGACA AAGTGGCGGAAGCGCGCTACCGGAGACGGTACGTATCGGAACCGATACCACCTACGCACCGTT CTCATCGAAAGATGCTAAAGGTGATTTTGTTGGCTTTGATATCGATCTCGGTAACGAGATGTGCAA ACGGATGCAGGTGAAATGTACCTGGGTTGCCAGTGACTTTGACGCGCTGATCCCCTCACTGAAA GCGAAAAAATCGACGCTATTATTTCGTCGCTTTCCATTACCGATAAACGTCAGCAGGAGATTGC CTTCTCCGACAAGCTGTACGCCGCAGATTCTCGTTTGATTGCGGCCAAAGGTTCACCGATTCAGC CAACGCTGGATTCACTGAAAGGTAAACATGTTGGTGTGCTGCAGGGATCAACCCAGGAAGCTTAC GCTAACGAGACCTGGCGTAGTAAAGGCGTGGATGTGGTGGCCTATGCCAACCAGGATTTGGTCT ATTCCGATCTGGCTGCAGGACGTCTGGATGCTGCGTTACAAGATGAAGTTGCTGCCAGCGAAGG ATTCCTCAAGCAACCTGCTGGTAAAGATTTCGCCTTTGCT<u>GTCGAC</u>GAGCTGTTCACCGGGGTGG TGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGG GCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGC CCGTGCCCTGGCCCACCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGATGTGCTTCGCCCGCTACCC CGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGC ACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACA

CCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGC ACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGG CATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCAC TACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCT ACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGT GACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAAGCTTGATCCGGCTGCT AACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACC CCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGGATCTG GCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAA TGGGACGCGCCTGTAGCGCGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACC CGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGAGCTTTAC GGCACCTCGACCGCAAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATA GACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGG AACAACACTCAACCCTATCGCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTA TTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAATATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAA TTTCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCATACAGGTGGC ACTTTTCGGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATC CGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTC AACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAG AAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACT GGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCA CTTTTAAAGTTCTGCTATGTGATACACTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTC GCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACG GATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAA CTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGGATC TAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGAATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGC TCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCG GTATCATTGCAGCACTGGGGGCCAGATGGTAAGCGCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGG GAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGC AAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCG TTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGC GCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTC TAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTG CTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAG ACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAG CTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACG CTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGG

Kodierende DNA:

GGAGACGGTACGTATCGGAACCGATACCACCTACGCACCGTTCTCATCGAAAGATGCTAAAGGT GATTTTGTTGGCTTTGATATCGATCTCGGTAACGAGATGTGCAAACGGATGCAGGTGAAATGTAC CTGGGTTGCCAGTGACTTTGACGCGCTGATCCCCTCACTGAAAGCGAAAAAAATCGACGCTATTA TTTCGTCGCTTTCCATTACCGATAAACGTCAGCAGGAGATTGCCTTCTCCGACAAGCTGTACGCC GCAGATTCTCGTTTGATTGCGGCCAAAGGTTCACCGATTCAGCCAACGCTGGATTCACTGAAAGG TAAACATGTTGGTGTGCTGCAGGGATCAACCCAGGAAGCTTACGCTAACGAGACCTGGCGTAGT AAAGGCGTGGATGTGGTGGCCTATGCCAACCAGGATTTGGTCTATTCCGATCTGGCTGCAGGAC GTCTGGATGCTGCGTTACAAGATGAAGTTGCTGCCAGCGAAGGATTCCTCAAGCAACCTGCTGG TAAAGATTTCGCCTTTGCTGTCGACGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTG GACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC GGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTC GTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGATGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACG ACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGA CGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGA GCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTAC AACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGAT CCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCAT CGGCGACGGCCCCGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAA AGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCAC TCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

Proteinsequenz:

MRGSHHHHHHGMADTRIGVTIYKSAGMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTWGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNY KTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYISHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQ LADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGI<u>GS</u>GTGVGLRKDDAELT AAFNKALGELRQDGTYDKMAKKYFDFNVYGDGGSGGSGGSGGSGGSALPETVRIGTDTTYAPFSSKDAK GDFVGFDIDLGNEMCKRMQVKCTWVASDFDALIPSLKAKKIDAIISSLSITDKRQQEIAFSDKLYAADSR LIAAKGSPIQPTLDSLKGKHVGVLQGSTQEAYANETWRSKGVDVVAYANQDLVYSDLAAGRLDAALQ DEVAASEGFLKQPAGKDFAFAVDELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTT GKLPVPWPTLVTTFGYGLMCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEG DTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK

0-perm-f-Sensor (Plasmid MP27.2.01):

Kodierende DNA:

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTGATACTCGCATTGGTGTAACAATC TATAAGTCGGCTGGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTG GTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT GCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGC CCACCCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAA GCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTC AAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAAC CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAG TACAACTACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAA CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC ACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC **GGGATCCGGATCC**GGCACCGGTGTAGGGCTACGTAAAGATGATGCTGAACTGACGGCTGCCTTCA ATAAGGCGCTTGGCGAGCTGCGTCAGGACGGCACCTACGACAAGATGGCGAAAAAGTATTTCGA GGAGACGGTACGTATCGGAACCGATACCACCTACGCACCGTTCTCATCGAAAGATGCTAAAGGT GATTTTGTTGGCTTTGATATCGATCTCGGTAACGAGATGTGCAAACGGATGCAGGTGAAATGTAC CTGGGTTGCCAGTGACTTTGACGCGCTGATCCCCTCACTGAAAGCGAAAAAAATCGACGCTATTA TTTCGTCGCTTTCCATTACCGATAAACGTCAGCAGGAGATTGCCTTCTCCGACAAGCTGTACGCC GCAGATTCTCGTTTGATTGCGGCCAAAGGTTCACCGATTCAGCCAACGCTGGATTCACTGAAAGG TAAACATGTTGGTGTGCTGCAGGGATCAACCCAGGAAGCTTACGCTAACGAGACCTGGCGTAGT

AAAGGCGTGGATGTGGTGGCCTATGCCAACCAGGATTTGGTCTATTCCGATCTGGCTGCAGGAC GTCTGGATGCTGCGTTACAAGATGAAGTTGCTGCCAGCGAAGGATTCCTCAAGCAACCTGCTGG TAAAGATTTCGCCTTTGCTGGAGGCTCTGGTGGTAGCGGCGGGGGGTGGTGGTAGTGTCGACGAG CTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGT AGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGC ACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGATG TGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAG GCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGAGGT GAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGA CGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCC GACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCG TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCCCG ACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCCAACGAGAAGCGCGATCACAT GGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

Proteinsequenz:

MRGSHHHHHHGMADTRIGVTIYKSAGMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTWGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNY KTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYISHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQ LADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGIGSGTGVGLRKDDAELT AAFNKALGELRQDGTYDKMAKKYFDFNVYGDGGSGGSGGSGGSALPETVRIGTDTTYAPFSSKDAK GDFVGFDIDLGNEMCKRMQVKCTWVASDFDALIPSLKAKKIDAIISSLSITDKRQQEIAFSDKLYAADSR LIAAKGSPIQPTLDSLKGKHVGVLQGSTQEAYANETWRSKGVDVVAYANQDLVYSDLAAGRLDAALQ DEVAASEGFLKQPAGKDFAFAGGSGGSGGSGGSGGSVDELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGD ATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLMCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDD GNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIED GSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK

0-perm-s-Sensor (Plasmid MP27.2.02):

Kodierende DNA:

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTGATACTCGCATTGGTGTAACAATC TATAAGTCGGCTGGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTG GTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT GCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGC CCACCCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAA GCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTC AAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAAC CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAG TACAACTACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAA CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC ACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC CTGAGCAAAGACCCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC **GGGATCGGATCC**GGCACCGGTGTAGGGCTACGTAAAGATGATGCTGAACTGACGGCTGCCTTCA ATAAGGCGCTTGGCGAGCTGCGTCAGGACGGCACCTACGACAAGATGGCGAAAAAGTATTTCGA GGAGACGGTACGTATCGGAACCGATACCACCTACGCACCGTTCTCATCGAAAGATGCTAAAGGT GATTTTGTTGGCTTTGATATCGATCTCGGTAACGAGATGTGCAAACGGATGCAGGTGAAATGTAC CTGGGTTGCCAGTGACTTTGACGCGCTGATCCCCTCACTGAAAGCGAAAAAAATCGACGCTATTA TTTCGTCGCTTTCCATTACCGATAAACGTCAGCAGGAGATTGCCTTCTCCGACAAGCTGTACGCC GCAGATTCTCGTTTGATTGCGGCCAAAGGTTCACCGATTCAGCCAACGCTGGATTCACTGAAAGG TAAACATGTTGGTGTGCTGCAGGGATCAACCCAGGAAGCTTACGCTAACGAGACCTGGCGTAGT AAAGGCGTGGATGTGGTGGCCTATGCCAACCAGGATTTGGTCTATTCCGATCTGGCTGCAGGAC GTCTGGATGCTGCGTTACAAGATGAAGTTGCTGCCAGCGAAGGATTCCTCAAGCAACCTGCTGG TAAAGATTTCGCCTTTGCTAAGTTGTACCCATATGACGTTCCGGACTATGCGGTCGACGAGCTGT TCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCG TGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCA CCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGATGTGCTT CGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTAC

GTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGT TCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCA ACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAA GCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAG CTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAAC CACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCC TGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

Proteinsequenz:

MRGSHHHHHHGMADTRIGVTIYKSAGMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTWGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNY KTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYISHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQ LADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGIGSGTGVGLRKDDAELT AAFNKALGELRQDGTYDKMAKKYFDFNVYGDGGSGGSGGSGGSALPETVRIGTDTTYAPFSSKDAK GDFVGFDIDLGNEMCKRMQVKCTWVASDFDALIPSLKAKKIDAIISSLSITDKRQQEIAFSDKLYAADSR LIAAKGSPIQPTLDSLKGKHVGVLQGSTQEAYANETWRSKGVDVVAYANQDLVYSDLAAGRLDAALQ DEVAASEGFLKQPAGKDFAFAKLYPYDVPDYAVDELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDAT YGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLMCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGN YKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGS VQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK

f-perm-0-Sensor (Plasmid MP27.2.10):

Kodierende DNA:

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTGATACTCGCATTGGTGTAACAATC TATAAGTCGGCTGGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTG GTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT GCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGC CCACCCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAA GCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTC AAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAAC CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAG TACAACTACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAA CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC ACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC GGGATCGGATCCGGTGGTTCTGGCGGTTCAGGTGGCTCTGGTGGGTCTGGCACCGGTGTAGGG CTACGTAAAGATGATGCTGAACTGACGGCTGCCTTCAATAAGGCGCTTGGCGAGCTGCGTCAGG ACGGCACCTACGACAAGATGGCGAAAAAGTATTTCGACTTTAATGTCTACGGTGACGGTGGCAGT GGAGGGAGCGGTGGAAGTGGCGGAAGCGCGCTACCGGAGACGGTACGTATCGGAACCGATAC CACCTACGCACCGTTCTCATCGAAAGATGCTAAAGGTGATTTTGTTGGCTTTGATATCGATCTCGG TAACGAGATGTGCAAACGGATGCAGGTGAAATGTACCTGGGTTGCCAGTGACTTTGACGCGCTG ATCCCCTCACTGAAAGCGAAAAAAATCGACGCTATTATTTCGTCGCTTTCCATTACCGATAAACGT CAGCAGGAGATTGCCTTCTCCGACAAGCTGTACGCCGCAGATTCTCGTTTGATTGCGGCCAAAG GTTCACCGATTCAGCCAACGCTGGATTCACTGAAAGGTAAACATGTTGGTGTGCTGCAGGGATCA ACCCAGGAAGCTTACGCTAACGAGACCTGGCGTAGTAAAGGCGTGGATGTGGTGGCCTATGCCA ACCAGGATTTGGTCTATTCCGATCTGGCTGCAGGACGTCTGGATGCTGCGTTACAAGATGAAGTT GCTGCCAGCGAAGGATTCCTCAAGCAACCTGCTGGTAAAGATTTCGCCTTTGCTGTCGACGAGCT GTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAG CGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCAC CACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGATGTG CTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGC TACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGA AGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACG GCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGA CAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTG CAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCCCGAC AACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGG TCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

Proteinsequenz:

MRGSHHHHHHGMADTRIGVTIYKSAGMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTWGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNY KTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYISHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQ LADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGI<u>GS</u>GGSGGSGGSGGS GTGVGLRKDDAELTAAFNKALGELRQDGTYDKMAKKYFDFNVYGDGGSGGSGGSGGSGGSGSGSGS GTGVGLRKDDAELTAAFNKALGELRQDGTYDKMAKKYFDFNVYGDGGSGGSGGSGGSGSGSALPETVRIG TDTTYAPFSSKDAKGDFVGFDIDLGNEMCKRMQVKCTWVASDFDALIPSLKAKKIDAIISSLSITDKRQ QEIAFSDKLYAADSRLIAAKGSPIQPTLDSLKGKHVGVLQGSTQEAYANETWRSKGVDVVAYANQDLV YSDLAAGRLDAALQDEVAASEGFLKQPAGKDFAFA<u>VD</u>ELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEG DATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLMCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDD GNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIED GSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK

f-perm-f-Sensor (Plasmid MP27.2.11):

Kodierende DNA:

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTGATACTCGCATTGGTGTAACAATC TATAAGTCGGCTGGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTG GTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT GCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGC CCACCCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAA GCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTC AAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAAC CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAG TACAACTACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAA CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC ACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC CTGAGCAAAGACCCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC GGGATCCGGATCCGGTGGTTCTGGCGGTTCAGGTGGCTCTGGTGGGTCTGGCACCGGTGTAGGG CTACGTAAAGATGATGCTGAACTGACGGCTGCCTTCAATAAGGCGCTTGGCGAGCTGCGTCAGG ACGGCACCTACGACAAGATGGCGAAAAAGTATTTCGACTTTAATGTCTACGGTGACGGTGGCAGT GGAGGGAGCGGTGGAAGTGGCGGAAGCGCGCTACCGGAGACGGTACGTATCGGAACCGATAC CACCTACGCACCGTTCTCATCGAAAGATGCTAAAGGTGATTTTGTTGGCTTTGATATCGATCTCGG TAACGAGATGTGCAAACGGATGCAGGTGAAATGTACCTGGGTTGCCAGTGACTTTGACGCGCTG ATCCCCTCACTGAAAGCGAAAAAAATCGACGCTATTATTTCGTCGCTTTCCATTACCGATAAACGT CAGCAGGAGATTGCCTTCTCCGACAAGCTGTACGCCGCAGATTCTCGTTTGATTGCGGCCAAAG GTTCACCGATTCAGCCAACGCTGGATTCACTGAAAGGTAAACATGTTGGTGTGCTGCAGGGATCA ACCCAGGAAGCTTACGCTAACGAGACCTGGCGTAGTAAAGGCGTGGATGTGGTGGCCTATGCCA ACCAGGATTTGGTCTATTCCGATCTGGCTGCAGGACGTCTGGATGCTGCGTTACAAGATGAAGTT GCTGCCAGCGAAGGATTCCTCAAGCAACCTGCTGGTAAAGATTTCGCCTTTGCTGGAGGCTCTG GTGGTAGCGGCGGGAGTGGTGGTAGTGTCGACGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGG TCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATG CCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCC CACCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGATGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAG CAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCA AGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACC GCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGT ACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAC TTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACA CCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCC TGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCG GGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

Proteinsequenz:

MRGSHHHHHHGMADTRIGVTIYKSAGMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTWGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNY KTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYISHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQ LADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGI<u>GS</u>GGSGGSGGSGGS GTGVGLRKDDAELTAAFNKALGELRQDGTYDKMAKKYFDFNVYGDGGSGGSGGSGGSGGSALPETVRIG TDTTYAPFSSKDAKGDFVGFDIDLGNEMCKRMQVKCTWVASDFDALIPSLKAKKIDAIISSLSITDKRQ QEIAFSDKLYAADSRLIAAKGSPIQPTLDSLKGKHVGVLQGSTQEAYANETWRSKGVDVVAYANQDLV YSDLAAGRLDAALQDEVAASEGFLKQPAGKDFAFAGGSGGSGGSGGSG<u>VD</u>ELFTGVVPILVELDGDV NGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLMCFARYPDHMKQHDFFKSAMP EGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTA AGITLGMDELYK

f-perm-s-Sensor (Plasmid MP27.2.12):

Kodierende DNA:

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTGATACTCGCATTGGTGTAACAATC TATAAGTCGGCTGGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTG GTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT GCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGC CCACCCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAA GCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTC AAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAAC CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAG TACAACTACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAA CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC ACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC **GGGATCGGATCCGGTGGTTCTGGCGGTTCAGGTGGCTCTGGTGGGTCTGGCACCGGTGTAGGG** CTACGTAAAGATGATGCTGAACTGACGGCTGCCTTCAATAAGGCGCTTGGCGAGCTGCGTCAGG ACGGCACCTACGACAAGATGGCGAAAAAGTATTTCGACTTTAATGTCTACGGTGACGGTGGCAGT GGAGGGAGCGGTGGAAGTGGCGGAAGCGCGCTACCGGAGACGGTACGTATCGGAACCGATAC CACCTACGCACCGTTCTCATCGAAAGATGCTAAAGGTGATTTTGTTGGCTTTGATATCGATCTCGG TAACGAGATGTGCAAACGGATGCAGGTGAAATGTACCTGGGTTGCCAGTGACTTTGACGCGCTG ATCCCCTCACTGAAAGCGAAAAAAATCGACGCTATTATTTCGTCGCTTTCCATTACCGATAAACGT CAGCAGGAGATTGCCTTCTCCGACAAGCTGTACGCCGCAGATTCTCGTTTGATTGCGGCCAAAG GTTCACCGATTCAGCCAACGCTGGATTCACTGAAAGGTAAACATGTTGGTGTGCTGCAGGGATCA ACCCAGGAAGCTTACGCTAACGAGACCTGGCGTAGTAAAGGCGTGGATGTGGTGGCCTATGCCA ACCAGGATTTGGTCTATTCCGATCTGGCTGCAGGACGTCTGGATGCTGCGTTACAAGATGAAGTT GCTGCCAGCGAAGGATTCCTCAAGCAACCTGCTGGTAAAGATTTCGCCTTTGCTAAGTTGTACCC ATATGACGTTCCGGACTATGCGGTCGACGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAG CTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACC TACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCC TCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGATGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCA CGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGAC GACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATC GAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACT ACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAG ATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCC ATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGC AAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATC ACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

Proteinsequenz:

MRGSHHHHHHGMADTRIGVTIYKSAGMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTWGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNY KTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYISHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQ LADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGI<u>GS</u>GGSGGSGGSGGSG GTGVGLRKDDAELTAAFNKALGELRQDGTYDKMAKKYFDFNVYGDGGSGGSGGSGGSGGSGSALPETVRIG TDTTYAPFSSKDAKGDFVGFDIDLGNEMCKRMQVKCTWVASDFDALIPSLKAKKIDAIISSLSITDKRQ QEIAFSDKLYAADSRLIAAKGSPIQPTLDSLKGKHVGVLQGSTQEAYANETWRSKGVDVVAYANQDLV YSDLAAGRLDAALQDEVAASEGFLKQPAGKDFAFAKLYPYDVPDYAVDELFTGVVPILVELDGDVNGH KFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLMCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGY VQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGI KVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGI TLGMDELYK

s-perm-0-Sensor (Plasmid MP27.2.20):

Kodierende DNA:

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTGATACTCGCATTGGTGTAACAATC TATAAGTCGGCTGGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTG GTCGAGCTGGACGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT GCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGC CCACCCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAA GCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTC AAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAAC CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAG TACAACTACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAA CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC ACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC CTGAGCAAAGACCCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC GGGATCGGATCCAAACTGTACCCGTACGATGTGCCAGATTACGCCGGCACCGGTGTAGGGCTAC GTAAAGATGATGCTGAACTGACGGCTGCCTTCAATAAGGCGCTTGGCGAGCTGCGTCAGGACGG CACCTACGACAAGATGGCGAAAAAGTATTTCGACTTTAATGTCTACGGTGACGGTGGCAGTGGAG GGAGCGGTGGAAGTGGCGGAAGCGCGCTACCGGAGACGGTACGTATCGGAACCGATACCACCT ACGCACCGTTCTCATCGAAAGATGCTAAAGGTGATTTTGTTGGCTTTGATATCGATCTCGGTAACG AGATGTGCAAACGGATGCAGGTGAAATGTACCTGGGTTGCCAGTGACTTTGACGCGCTGATCCC CTCACTGAAAGCGAAAAAAACGACGCTATTATTTCGTCGCTTTCCATTACCGATAAACGTCAGCA GGAGATTGCCTTCTCCGACAAGCTGTACGCCGCAGATTCTCGTTTGATTGCGGCCAAAGGTTCAC CGATTCAGCCAACGCTGGATTCACTGAAAGGTAAACATGTTGGTGTGCTGCAGGGATCAACCCA GGAAGCTTACGCTAACGAGACCTGGCGTAGTAAAGGCGTGGATGTGGTGGCCTATGCCAACCAG GATTTGGTCTATTCCGATCTGGCTGCAGGACGTCTGGATGCTGCGTTACAAGATGAAGTTGCTGC CAGCGAAGGATTCCTCAAGCAACCTGCTGGTAAAGATTTCGCCTTTGCTGTCGACGAGCTGTTCA CCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGT CCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCG GCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGATGTGCTTCGC CCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTC CAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCG AGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACA TCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCA GAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTC GCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCCGGCCACAACCAC TACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGC TGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

Proteinsequenz:

MRGSHHHHHHGMADTRIGVTIYKSAGMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTWGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNY KTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYISHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQ LADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGI<u>GS</u>KLYPYDVPDYAGTG VGLRKDDAELTAAFNKALGELRQDGTYDKMAKKYFDFNVYGDGGSGGSGGSGGSGGSALPETVRIGTDT TYAPFSSKDAKGDFVGFDIDLGNEMCKRMQVKCTWVASDFDALIPSLKAKKIDAIISSLSITDKRQQEIA FSDKLYAADSRLIAAKGSPIQPTLDSLKGKHVGVLQGSTQEAYANETWRSKGVDVVAYANQDLVYSD LAAGRLDAALQDEVAASEGFLKQPAGKDFAFA<u>VD</u>ELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDAT YGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLMCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGN YKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGS VQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK

s-perm-f-Sensor (Plasmid MP27.2.21):

Kodierende DNA:

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTGATACTCGCATTGGTGTAACAATC TATAAGTCGGCTGGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTG GTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT GCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGC CCACCCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAA GCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTC AAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAAC CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAG TACAACTACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAA CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC ACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC CTGAGCAAAGACCCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC GGGATCGGATCCAAACTGTACCCGTACGATGTGCCAGATTACGCCGGCACCGGTGTAGGGCTAC GTAAAGATGATGCTGAACTGACGGCTGCCTTCAATAAGGCGCTTGGCGAGCTGCGTCAGGACGG CACCTACGACAAGATGGCGAAAAAGTATTTCGACTTTAATGTCTACGGTGACGGTGGCAGTGGAG GGAGCGGTGGAAGTGGCGGAAGCGCGCTACCGGAGACGGTACGTATCGGAACCGATACCACCT ACGCACCGTTCTCATCGAAAGATGCTAAAGGTGATTTTGTTGGCTTTGATATCGATCTCGGTAACG AGATGTGCAAACGGATGCAGGTGAAATGTACCTGGGTTGCCAGTGACTTTGACGCGCTGATCCC CTCACTGAAAGCGAAAAAAACGACGCTATTATTTCGTCGCTTTCCATTACCGATAAACGTCAGCA GGAGATTGCCTTCTCCGACAAGCTGTACGCCGCAGATTCTCGTTTGATTGCGGCCAAAGGTTCAC CGATTCAGCCAACGCTGGATTCACTGAAAGGTAAACATGTTGGTGTGCTGCAGGGATCAACCCA GGAAGCTTACGCTAACGAGACCTGGCGTAGTAAAGGCGTGGATGTGGTGGCCTATGCCAACCAG GATTTGGTCTATTCCGATCTGGCTGCAGGACGTCTGGATGCTGCGTTACAAGATGAAGTTGCTGC CAGCGAAGGATTCCTCAAGCAACCTGCTGGTAAAGATTTCGCCTTTGCTGGAGGCTCTGGTGGTA GCGGCGGGAGTGGTGGTAGTGTCGACGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGC TGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCT ACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCT CGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGATGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAC GACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACG ACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCG AGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTA CAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGA TCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCA TCGGCGACGGCCCCGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCA AAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCA CTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

Proteinsequenz:

MRGSHHHHHHGMADTRIGVTIYKSAGMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTWGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNY KTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYISHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQ LADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGI<u>GS</u>KLYPYDVPDYAGTG VGLRKDDAELTAAFNKALGELRQDGTYDKMAKKYFDFNVYGDGGSGGSGGSGGSGSALPETVRIGTDT TYAPFSSKDAKGDFVGFDIDLGNEMCKRMQVKCTWVASDFDALIPSLKAKKIDAIISSLSITDKRQQEIA FSDKLYAADSRLIAAKGSPIQPTLDSLKGKHVGVLQGSTQEAYANETWRSKGVDVVAYANQDLVYSD LAAGRLDAALQDEVAASEGFLKQPAGKDFAFAGGSSGGSGGSGSGS<u>VD</u>ELFTGVVPILVELDGDVNGH KFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLMCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGY VQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGI KVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGI TLGMDELYK

s-perm-s-Sensor (Plasmid MP27.2.22):

Kodierende DNA:

 GCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTC AAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAAC CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAG TACAACTACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAA CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC ACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC GGGATCGGATCCAAACTGTACCCGTACGATGTGCCAGATTACGCCGGCACCGGTGTAGGGCTAC GTAAAGATGATGCTGAACTGACGGCTGCCTTCAATAAGGCGCTTGGCGAGCTGCGTCAGGACGG CACCTACGACAAGATGGCGAAAAAGTATTTCGACTTTAATGTCTACGGTGACGGTGGCAGTGGAG GGAGCGGTGGAAGTGGCGGAAGCGCGCTACCGGAGACGGTACGTATCGGAACCGATACCACCT ACGCACCGTTCTCATCGAAAGATGCTAAAGGTGATTTTGTTGGCTTTGATATCGATCTCGGTAACG AGATGTGCAAACGGATGCAGGTGAAATGTACCTGGGTTGCCAGTGACTTTGACGCGCTGATCCC CTCACTGAAAGCGAAAAAAACGACGCTATTATTTCGTCGCTTTCCATTACCGATAAACGTCAGCA GGAGATTGCCTTCTCCGACAAGCTGTACGCCGCAGATTCTCGTTTGATTGCGGCCAAAGGTTCAC CGATTCAGCCAACGCTGGATTCACTGAAAGGTAAACATGTTGGTGTGCTGCAGGGATCAACCCA GGAAGCTTACGCTAACGAGACCTGGCGTAGTAAAGGCGTGGATGTGGTGGCCTATGCCAACCAG GATTTGGTCTATTCCGATCTGGCTGCAGGACGTCTGGATGCTGCGTTACAAGATGAAGTTGCTGC CAGCGAAGGATTCCTCAAGCAACCTGCTGGTAAAGATTTCGCCTTTGCTAAGTTGTACCCATATG ACGTTCCGGACTATGCGGTCGACGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGG ACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACG GCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGT GACCACCTTCGGCTACGGCCTGATGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGAC TTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACG GCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGC TGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAA CAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCC GCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCG GCGACGGCCCCGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAG ACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCT CGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

Proteinsequenz:

MRGSHHHHHHGMADTRIGVTIYKSAGMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTWGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNY KTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYISHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQ LADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGI<u>GS</u>KLYPYDVPDYAGTG VGLRKDDAELTAAFNKALGELRQDGTYDKMAKKYFDFNVYGDGGSGGSGGSGGSGGSALPETVRIGTDT TYAPFSSKDAKGDFVGFDIDLGNEMCKRMQVKCTWVASDFDALIPSLKAKKIDAIISSLSITDKRQQEIA FSDKLYAADSRLIAAKGSPIQPTLDSLKGKHVGVLQGSTQEAYANETWRSKGVDVVAYANQDLVYSD LAAGRLDAALQDEVAASEGFLKQPAGKDFAFAKLYPYDVPDYAVDELFTGVVPILVELDGDVNGHKFS VSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLMCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQ ERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKV NFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITL GMDELYK

0-nat-0-Sensor (Plasmid MP27.6)

Kodierende DNA:

ATGCGGGGTTCT**CATCATCATCATCATGGTATGGCTGATACTCGCATTGGTGTAACAATC** TATAAGTCGGCTGGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTG GTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT GCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGC CCACCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAA GCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTC AAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGGTGAAGTTCGAGGGGCGACACCCTGGTGAAC CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAG TACAACTACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAA CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC

ACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC GGGATCGGATCCGCGCTACCGGAGACGGTACGTATCGGAACCGATACCACCTACGCACCGTTCT CATCGAAAGATGCTAAAGGTGATTTTGTTGGCTTTGATATCGATCTCGGTAACGAGATGTGCAAAC GGATGCAGGTGAAATGTACCTGGGTTGCCAGTGACTTTGACGCGCTGATCCCCTCACTGAAAGC GAAAAAAATCGACGCTATTATTTCGTCGCTTTCCATTACCGATAAACGTCAGCAGGAGATTGCCTT CTCCGACAAGCTGTACGCCGCAGATTCTCGTTTGATTGCGGCCAAAGGTTCACCGATTCAGCCAA CGCTGGATTCACTGAAAGGTAAACATGTTGGTGTGCTGCAGGGATCAACCCAGGAAGCTTACGC TAACGAGACCTGGCGTAGTAAAGGCGTGGATGTGGCGCCTATGCCAACCAGGATTTGGTCTAT TCCGATCTGGCTGCAGGACGTCTGGATGCTGCGTTACAAGATGAAGTTGCTGCCAGCGAAGGAT TCCTCAAGCAACCTGCTGGTAAAGATTTCGCCTTTGCTGGCTCATCAGTAAAAGACAAAAAATACT TCGGTGATGGCACCGGTGTAGGGCTACGTAAAGATGATGCTGAACTGACGGCTGCCTTCAATAA GGCGCTTGGCGAGCTGCGTCAGGACGGCACCTACGACAAGATGGCGAAAAAGTATTTCGACTTT AATGTCTACGGTGACGTCGACGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGAC GGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGC AAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGA CCACCTTCGGCTACGGCCTGATGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTT CTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGC AACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTG AAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACA GCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCG CCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGG CGACGGCCCCGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAGA CCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTC GGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

Proteinsequenz:

MRGSHHHHHHGMADTRIGVTIYKSAGMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTWGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNY KTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYISHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQ LADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGI<u>GS</u>ALPETVRIGTDTTYA PFSSKDAKGDFVGFDIDLGNEMCKRMQVKCTWVASDFDALIPSLKAKKIDAIISSLSITDKRQQEIAFSD KLYAADSRLIAAKGSPIQPTLDSLKGKHVGVLQGSTQEAYANETWRSKGVDVVAYANQDLVYSDLAA GRLDAALQDEVAASEGFLKQPAGKDFAFAGSSVKDKKYFGDGTGVGLRKDDAELTAAFNKALGELR QDGTYDKMAKKYFDFNVYGD<u>VD</u>ELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTT GKLPVPWPTLVTTFGYGLMCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEG DTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK

0-nat-f-Sensor (Plasmid MP27.6.01):

Kodierende DNA:

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTGATACTCGCATTGGTGTAACAATC TATAAGTCGGCTGGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTG GTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT GCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGC CCACCCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAA GCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTC AAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAAC CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAG TACAACTACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAA CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC ACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC CTGAGCAAAGACCCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC GGGATCGGATCCTCCGCGCTACCGGAGACGGTACGTATCGGAACCGATACCACCTACGCACCGT TCTCATCGAAAGATGCTAAAGGTGATTTTGTTGGCTTTGATATCGATCTCGGTAACGAGATGTGCA AACGGATGCAGGTGAAATGTACCTGGGTTGCCAGTGACTTTGACGCGCTGATCCCCTCACTGAA AGCGAAAAAAATCGACGCTATTATTTCGTCGCTTTCCATTACCGATAAACGTCAGCAGGAGATTGC CTTCTCCGACAAGCTGTACGCCGCAGATTCTCGTTTGATTGCGGCCAAAGGTTCACCGATTCAGC

CAACGCTGGATTCACTGAAAGGTAAACATGTTGGTGTGCTGCAGGGATCAACCCAGGAAGCTTAC GCTAACGAGACCTGGCGTAGTAAAGGCGTGGATGTGGTGGCCTATGCCAACCAGGATTTGGTCT ATTCCGATCTGGCTGCAGGACGTCTGGATGCTGCGTTACAAGATGAAGTTGCTGCCAGCGAAGG ATTCCTCAAGCAACCTGCTGGTAAAGATTTCGCCTTTGCTGGCTCATCAGTAAAAGACAAAAAAA CTTCGGTGATGGCACCGGTGTAGGGCTACGTAAAGATGATGCTGAACTGACGGCTGCCTTCAAT AAGGCGCTTGGCGAGCTGCGTCAGGACGGCACCTACGACAAGATGGCGAAAAAGTATTTCGACT TTAATGTCTACGGTGACGGAGGCTCTGGTGGTAGCGGCGGGAGTGGTGGTAGTCGACGAGC TGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCA GCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCA CCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGATGT GCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGG CTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGAGGTG AAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGAC GGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCG ACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGT GCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCCCGA CAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCCAACGAGAAGCGCGATCACATG GTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA Proteinsequenz:

MRGSHHHHHHGMADTRIGVTIYKSAGMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTWGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNY KTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYISHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQ LADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGI<u>GS</u>SALPETVRIGTDTTY APFSSKDAKGDFVGFDIDLGNEMCKRMQVKCTWVASDFDALIPSLKAKKIDAIISSLSITDKRQQEIAFS DKLYAADSRLIAAKGSPIQPTLDSLKGKHVGVLQGSTQEAYANETWRSKGVDVVAYANQDLVYSDLA AGRLDAALQDEVAASEGFLKQPAGKDFAFAGSSVKDKKYFGDGTGVGLRKDDAELTAAFNKALGELR QDGTYDKMAKKYFDFNVYGDGGSGGSGGSGGSGSVDELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGD ATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLMCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDD GNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIED GSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK

0-nat-s-Sensor (Plasmid MP27.6.02):

Kodierende DNA:

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTGATACTCGCATTGGTGTAACAATC TATAAGTCGGCTGGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTG GTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT GCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGC CCACCCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAA GCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTC AAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAAC CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAG TACAACTACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAA CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC ACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC CTGAGCAAAGACCCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC GGGATCGGATCCTCCGCGCTACCGGAGACGGTACGTATCGGAACCGATACCACCTACGCACCGT TCTCATCGAAAGATGCTAAAGGTGATTTTGTTGGCTTTGATATCGATCTCGGTAACGAGATGTGCA AACGGATGCAGGTGAAATGTACCTGGGTTGCCAGTGACTTTGACGCGCTGATCCCCTCACTGAA AGCGAAAAAAATCGACGCTATTATTTCGTCGCTTTCCATTACCGATAAACGTCAGCAGGAGATTGC CTTCTCCGACAAGCTGTACGCCGCAGATTCTCGTTTGATTGCGGCCAAAGGTTCACCGATTCAGC CAACGCTGGATTCACTGAAAGGTAAACATGTTGGTGTGCTGCAGGGATCAACCCAGGAAGCTTAC GCTAACGAGACCTGGCGTAGTAAAGGCGTGGATGTGGTGGCCTATGCCAACCAGGATTTGGTCT ATTCCGATCTGGCTGCAGGACGTCTGGATGCTGCGTTACAAGATGAAGTTGCTGCCAGCGAAGG ATTCCTCAAGCAACCTGCTGGTAAAGATTTCGCCTTTGCTGGCTCATCAGTAAAAGACAAAAAATA CTTCGGTGATGGCACCGGTGTAGGGCTACGTAAAGATGATGCTGAACTGACGGCTGCCTTCAAT AAGGCGCTTGGCGAGCTGCGTCAGGACGGCACCTACGACAAGATGGCGAAAAAGTATTTCGACT TTAATGTCTACGGTGACAAGTTGTACCCATATGACGTTCCGGACTATGCGGTCGACGAGCTGTTC

ACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTG TCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACC GGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGATGTGCTTC GCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACG TCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTT CGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAA CATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAG CAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAG CAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGC TCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACC ACTACCTGAGCTACCAGTCGGCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCT GCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCCGGCATGGACGAGCGCGAGCAGCAA

Proteinsequenz:

MRGSHHHHHHGMADTRIGVTIYKSAGMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTWGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNY KTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYISHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQ LADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGI<u>GS</u>SALPETVRIGTDTTY APFSSKDAKGDFVGFDIDLGNEMCKRMQVKCTWVASDFDALIPSLKAKKIDAIISSLSITDKRQQEIAFS DKLYAADSRLIAAKGSPIQPTLDSLKGKHVGVLQGSTQEAYANETWRSKGVDVVAYANQDLVYSDLA AGRLDAALQDEVAASEGFLKQPAGKDFAFAGSSVKDKKYFGDGTGVGLRKDDAELTAAFNKALGELR QDGTYDKMAKKYFDFNVYGDKLYPYDVPDYAVDELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLMCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNY KTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSV QLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK

f-nat-0-Sensor (Plasmid MP27.6.10):

Kodierende DNA:

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTGATACTCGCATTGGTGTAACAATC TATAAGTCGGCTGGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTG GTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT GCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGC CCACCCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAA GCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTC AAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAAC CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAG TACAACTACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAA CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC ACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC **GGGATCGGATCC**GGTGGTTCTGGCGGTTCAGGTGGCTCTGGTGGGTCTTCCGCGCTACCGGAG ACGGTACGTATCGGAACCGATACCACCTACGCACCGTTCTCATCGAAAGATGCTAAAGGTGATTT TGTTGGCTTTGATATCGATCTCGGTAACGAGATGTGCAAACGGATGCAGGTGAAATGTACCTGGG TTGCCAGTGACTTTGACGCGCTGATCCCCTCACTGAAAGCGAAAAAAATCGACGCTATTATTTCG TCGCTTTCCATTACCGATAAACGTCAGCAGGAGATTGCCTTCTCCGACAAGCTGTACGCCGCAGA TTCTCGTTTGATTGCGGCCAAAGGTTCACCGATTCAGCCAACGCTGGATTCACTGAAAGGTAAAC ATGTTGGTGTGCTGCAGGGATCAACCCAGGAAGCTTACGCTAACGAGACCTGGCGTAGTAAAGG CGTGGATGTGGTGGCCTATGCCAACCAGGATTTGGTCTATTCCGATCTGGCTGCAGGACGTCTG GATGCTGCGTTACAAGATGAAGTTGCTGCCAGCGAAGGATTCCTCAAGCAACCTGCTGGTAAAGA TTTCGCCTTTGCTGGCTCATCAGTAAAAGACAAAAAATACTTCGGTGATGGCACCGGTGTAGGGC TACGTAAAGATGATGCTGAACTGACGGCTGCCTTCAATAAGGCGCTTGGCGAGCTGCGTCAGGA CGGCACCTACGACAAGATGGCGAAAAAGTATTTCGACTTTAATGTCTACGGTGACGTCGACGAGC TGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCA GCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCA CCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGATGT GCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGG AAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGAC GGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCG

ACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGT GCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCCCGA CAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCCAACGAGAAGCGCGATCACATG GTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA Proteinsequenz:

MRGSHHHHHHGMADTRIGVTIYKSAGMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTWGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNY KTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYISHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQ LADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGI<u>GS</u>GGSGGSGGSGGS SALPETVRIGTDTTYAPFSSKDAKGDFVGFDIDLGNEMCKRMQVKCTWVASDFDALIPSLKAKKIDAIIS SLSITDKRQQEIAFSDKLYAADSRLIAAKGSPIQPTLDSLKGKHVGVLQGSTQEAYANETWRSKGVDV VAYANQDLVYSDLAAGRLDAALQDEVAASEGFLKQPAGKDFAFAGSSVKDKKYFGDGTGVGLRKDD AELTAAFNKALGELRQDGTYDKMAKKYFDFNVYGD<u>VD</u>ELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEG DATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLMCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDD GNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIED GSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK

f-nat-f-Sensor (Plasmid MP27.6.11):

Kodierende DNA:

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTGATACTCGCATTGGTGTAACAATC TATAAGTCGGCTGGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTG GTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT GCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGC CCACCCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAA GCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTC AAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAAC CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAG TACAACTACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAA CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC ACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC CTGAGCAAAGACCCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC GGGATCGGATCCGGTGGTTCTGGCGGTTCAGGTGGCTCTGGTGGGTCTGCGCTACCGGAGACG GTACGTATCGGAACCGATACCACCTACGCACCGTTCTCATCGAAAGATGCTAAAGGTGATTTTGT TGGCTTTGATATCGATCTCGGTAACGAGATGTGCAAACGGATGCAGGTGAAATGTACCTGGGTTG CCAGTGACTTTGACGCGCTGATCCCCTCACTGAAAGCGAAAAAATCGACGCTATTATTTCGTCG CTTTCCATTACCGATAAACGTCAGCAGGAGATTGCCTTCTCCGACAAGCTGTACGCCGCAGATTC TCGTTTGATTGCGGCCAAAGGTTCACCGATTCAGCCAACGCTGGATTCACTGAAAGGTAAACATG TTGGTGTGCTGCAGGGATCAACCCAGGAAGCTTACGCTAACGAGACCTGGCGTAGTAAAGGCGT GGATGTGGTGGCCTATGCCAACCAGGATTTGGTCTATTCCGATCTGGCTGCAGGACGTCTGGAT GCTGCGTTACAAGATGAAGTTGCTGCCAGCGAAGGATTCCTCAAGCAACCTGCTGGTAAAGATTT CGCCTTTGCTGGCTCATCAGTAAAAGACAAAAATACTTCGGTGATGGCACCGGTGTAGGGCTAC GTAAAGATGATGCTGAACTGACGGCTGCCTTCAATAAGGCGCTTGGCGAGCTGCGTCAGGACGG CACCTACGACAAGATGGCGAAAAAGTATTTCGACTTTAATGTCTACGGTGACGGAGGCTCTGGTG GTAGCGGCGGGAGTGGTGGTAGTGTCGACGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCG AGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCA CCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCAC CCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGATGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAG CACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGG ACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCA TCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAA CTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCA AGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCC CCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGA GCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGA TCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

Proteinsequenz:

MRGSHHHHHHGMADTRIGVTIYKSAGMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTWGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNY KTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYISHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQ LADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGI<u>GS</u>GGSGGSGGSGGS ALPETVRIGTDTTYAPFSSKDAKGDFVGFDIDLGNEMCKRMQVKCTWVASDFDALIPSLKAKKIDAIISS LSITDKRQQEIAFSDKLYAADSRLIAAKGSPIQPTLDSLKGKHVGVLQGSTQEAYANETWRSKGVDVV AYANQDLVYSDLAAGRLDAALQDEVAASEGFLKQPAGKDFAFAGSSVKDKKYFGDGTGVGLRKDDA ELTAAFNKALGELRQDGTYDKMAKKYFDFNVYGDGGSGGSGGSGGS<u>VD</u>ELFTGVVPILVELDGDVN GHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLMCFARYPDHMKQHDFFKSAMPE GYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKN GIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAA GITLGMDELYK

f-nat-s-Sensor (Plasmid MP27.6.12):

Kodierende DNA:

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTGATACTCGCATTGGTGTAACAATC TATAAGTCGGCTGGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTG GTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT GCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGC CCACCCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAA GCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTC AAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAAC CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAG TACAACTACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAA CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC ACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC CTGAGCAAAGACCCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC GGGATCGGATCCGGTGGTTCTGGCGGTTCAGGTGGCTCTGGTGGGTCTTCCGCGCTACCGGAG ACGGTACGTATCGGAACCGATACCACCTACGCACCGTTCTCATCGAAAGATGCTAAAGGTGATTT TGTTGGCTTTGATATCGATCTCGGTAACGAGATGTGCAAACGGATGCAGGTGAAATGTACCTGGG TTGCCAGTGACTTTGACGCGCTGATCCCCTCACTGAAAGCGAAAAAAATCGACGCTATTATTTCG TCGCTTTCCATTACCGATAAACGTCAGCAGGAGATTGCCTTCTCCGACAAGCTGTACGCCGCAGA TTCTCGTTTGATTGCGGCCAAAGGTTCACCGATTCAGCCAACGCTGGATTCACTGAAAGGTAAAC ATGTTGGTGTGCTGCAGGGATCAACCCAGGAAGCTTACGCTAACGAGACCTGGCGTAGTAAAGG CGTGGATGTGGTGGCCTATGCCAACCAGGATTTGGTCTATTCCGATCTGGCTGCAGGACGTCTG GATGCTGCGTTACAAGATGAAGTTGCTGCCAGCGAAGGATTCCTCAAGCAACCTGCTGGTAAAGA TTTCGCCTTTGCTGGCTCATCAGTAAAAGACAAAAAATACTTCGGTGATGGCACCGGTGTAGGGC TACGTAAAGATGATGCTGAACTGACGGCTGCCTTCAATAAGGCGCTTGGCGAGCTGCGTCAGGA CGGCACCTACGACAAGATGGCGAAAAAGTATTTCGACTTTAATGTCTACGGTGACAAGTTGTACC CATATGACGTTCCGGACTATGCGGTCGACGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGA GCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCA CCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCAC CCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGATGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAG CACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGG ACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCA TCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAA CTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCA AGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCC CCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGA GCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGA TCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

Proteinsequenz:

MRGSHHHHHHGMADTRIGVTIYKSAGMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTWGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNY KTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYISHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQ LADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGI<u>GS</u>GGSGGSGGSGGSGSS SALPETVRIGTDTTYAPFSSKDAKGDFVGFDIDLGNEMCKRMQVKCTWVASDFDALIPSLKAKKIDAIIS SLSITDKRQQEIAFSDKLYAADSRLIAAKGSPIQPTLDSLKGKHVGVLQGSTQEAYANETWRSKGVDV VAYANQDLVYSDLAAGRLDAALQDEVAASEGFLKQPAGKDFAFAGSSVKDKKYFGDGTGVGLRKDD AELTAAFNKALGELRQDGTYDKMAKKYFDFNVYGDKLYPYDVPDYAVDELFTGVVPILVELDGDVNG HKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLMCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEG YVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNG IKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGI TLGMDELYK

s-nat-0-Sensor (Plasmid MP27.6.20):

Kodierende DNA:

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTGATACTCGCATTGGTGTAACAATC TATAAGTCGGCTGGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTG GTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT GCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGC CCACCCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAA GCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTC AAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAAC CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAG TACAACTACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAA CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC ACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC GGGATCGGATCCAAACTGTACCCGTACGATGTGCCAGATTACGCCTCCGCGCTACCGGAGACGG TACGTATCGGAACCGATACCACCTACGCACCGTTCTCATCGAAAGATGCTAAAGGTGATTTTGTT GGCTTTGATATCGATCTCGGTAACGAGATGTGCAAACGGATGCAGGTGAAATGTACCTGGGTTGC CAGTGACTTTGACGCGCTGATCCCCTCACTGAAAGCGAAAAAATCGACGCTATTATTTCGTCGC TTTCCATTACCGATAAACGTCAGCAGGAGATTGCCTTCTCCGACAAGCTGTACGCCGCAGATTCT CGTTTGATTGCGGCCAAAGGTTCACCGATTCAGCCAACGCTGGATTCACTGAAAGGTAAACATGT TGGTGTGCTGCAGGGATCAACCCAGGAAGCTTACGCTAACGAGACCTGGCGTAGTAAAGGCGTG GATGTGGTGGCCTATGCCAACCAGGATTTGGTCTATTCCGATCTGGCTGCAGGACGTCTGGATG CTGCGTTACAAGATGAAGTTGCTGCCAGCGAAGGATTCCTCAAGCAACCTGCTGGTAAAGATTTC GCCTTTGCTGGCTCATCAGTAAAAGACAAAAAATACTTCGGTGATGGCACCGGTGTAGGGCTACG TAAAGATGATGCTGAACTGACGGCTGCCTTCAATAAGGCGCTTGGCGAGCTGCGTCAGGACGGC ACCTACGACAAGATGGCGAAAAAGTATTTCGACTTTAATGTCTACGGTGACGTCGACGAGCTGTT CACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGT GTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCAC CGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGATGTGCTTC GCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACG TCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTT CGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAA CATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAG CAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGC TCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACC ACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCT GCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA Proteinsequenz:

MRGSHHHHHHGMADTRIGVTIYKSAGMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTWGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNY KTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYISHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQ LADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGI<u>GS</u>KLYPYDVPDYASAL PETVRIGTDTTYAPFSSKDAKGDFVGFDIDLGNEMCKRMQVKCTWVASDFDALIPSLKAKKIDAIISSLS ITDKRQQEIAFSDKLYAADSRLIAAKGSPIQPTLDSLKGKHVGVLQGSTQEAYANETWRSKGVDVVAY ANQDLVYSDLAAGRLDAALQDEVAASEGFLKQPAGKDFAFAGSSVKDKKYFGDGTGVGLRKDDAEL TAAFNKALGELRQDGTYDKMAKKYFDFNVYGD<u>VD</u>ELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDAT YGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLMCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGN

YKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGS VQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK

s-nat-f-Sensor (Plasmid MP27.6.21):

Kodierende DNA:

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTGATACTCGCATTGGTGTAACAATC TATAAGTCGGCTGGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTG GTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT GCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGC CCACCCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAA GCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTC AAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAAC CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAG TACAACTACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAA CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC ACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC CTGAGCAAAGACCCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC **GGGATCGGATCCAAACTGTACCGTACGATGTGCCAGATTACGCCTCCGCGCTACCGGAGACGG** TACGTATCGGAACCGATACCACCTACGCACCGTTCTCATCGAAAGATGCTAAAGGTGATTTTGTT GGCTTTGATATCGATCTCGGTAACGAGATGTGCAAACGGATGCAGGTGAAATGTACCTGGGTTGC CAGTGACTTTGACGCGCTGATCCCCTCACTGAAAGCGAAAAAATCGACGCTATTATTTCGTCGC TTTCCATTACCGATAAACGTCAGCAGGAGATTGCCTTCTCCGACAAGCTGTACGCCGCAGATTCT CGTTTGATTGCGGCCAAAGGTTCACCGATTCAGCCAACGCTGGATTCACTGAAAGGTAAACATGT TGGTGTGCTGCAGGGATCAACCCAGGAAGCTTACGCTAACGAGACCTGGCGTAGTAAAGGCGTG GATGTGGTGGCCTATGCCAACCAGGATTTGGTCTATTCCGATCTGGCTGCAGGACGTCTGGATG CTGCGTTACAAGATGAAGTTGCTGCCAGCGAAGGATTCCTCAAGCAACCTGCTGGTAAAGATTTC GCCTTTGCTGGCTCATCAGTAAAAGACAAAAAATACTTCGGTGATGGCACCGGTGTAGGGCTACG TAAAGATGATGCTGAACTGACGGCTGCCTTCAATAAGGCGCTTGGCGAGCTGCGTCAGGACGGC ACCTACGACAAGATGGCGAAAAAGTATTTCGACTTTAATGTCTACGGTGACGGAGGCTCTGGTGG TAGCGGCGGGGGTGGTGGTGGTGGTCGACGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGA GCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCA CCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCAC CCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGATGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAG CACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGG ACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCA TCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAA CTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCA AGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCC CCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGA GCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGA TCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

Proteinsequenz:

MRGSHHHHHHGMADTRIGVTIYKSAGMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTWGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNY KTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYISHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQ LADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGI<u>GS</u>KLYPYDVPDYASAL PETVRIGTDTTYAPFSSKDAKGDFVGFDIDLGNEMCKRMQVKCTWVASDFDALIPSLKAKKIDAIISSLS ITDKRQQEIAFSDKLYAADSRLIAAKGSPIQPTLDSLKGKHVGVLQGSTQEAYANETWRSKGVDVVAY ANQDLVYSDLAAGRLDAALQDEVAASEGFLKQPAGKDFAFAGSSVKDKKYFGDGTGVGLRKDDAEL TAAFNKALGELRQDGTYDKMAKKYFDFNVYGDGGSGGSGGSGGSGSGS<u>VD</u>ELFTGVVPILVELDGDVNGH KFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLMCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGY VQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGI KVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGI TLGMDELYK

s-nat-s-Sensor (Plasmid MP27.6.22):

Kodierende DNA:

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTGATACTCGCATTGGTGTAACAATC TATAAGTCGGCTGGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTG GTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT GCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGC CCACCCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAA GCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTC AAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAAC CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAG TACAACTACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAA CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC ACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC **GGGATCGGATCCAAACTGTACCCGTACGATGTGCCAGATTACGCCTCCGCGCTACCGGAGACGG** TACGTATCGGAACCGATACCACCTACGCACCGTTCTCATCGAAAGATGCTAAAGGTGATTTTGTT GGCTTTGATATCGATCTCGGTAACGAGATGTGCAAACGGATGCAGGTGAAATGTACCTGGGTTGC CAGTGACTTTGACGCGCTGATCCCCTCACTGAAAGCGAAAAAATCGACGCTATTATTTCGTCGC TTTCCATTACCGATAAACGTCAGCAGGAGATTGCCTTCTCCGACAAGCTGTACGCCGCAGATTCT CGTTTGATTGCGGCCAAAGGTTCACCGATTCAGCCAACGCTGGATTCACTGAAAGGTAAACATGT TGGTGTGCTGCAGGGATCAACCCAGGAAGCTTACGCTAACGAGACCTGGCGTAGTAAAGGCGTG GATGTGGTGGCCTATGCCAACCAGGATTTGGTCTATTCCGATCTGGCTGCAGGACGTCTGGATG CTGCGTTACAAGATGAAGTTGCTGCCAGCGAAGGATTCCTCAAGCAACCTGCTGGTAAAGATTTC GCCTTTGCTGGCTCATCAGTAAAAGACAAAAAATACTTCGGTGATGGCACCGGTGTAGGGCTACG TAAAGATGATGCTGAACTGACGGCTGCCTTCAATAAGGCGCTTGGCGAGCTGCGTCAGGACGGC ACCTACGACAAGATGGCGAAAAAGTATTTCGACTTTAATGTCTACGGTGACAAGTTGTACCCATAT GACGTTCCGGACTATGCGGTCGACGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTG GACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC GGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTC GTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGATGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACG ACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGA CGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGA GCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTAC AACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGAT CCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCAT CGGCGACGGCCCCGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAA AGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCAC TCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

Proteinsequenz:

MRGSHHHHHHGMADTRIGVTIYKSAGMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTWGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNY KTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYISHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQ LADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGI<u>GS</u>KLYPYDVPDYASAL PETVRIGTDTTYAPFSSKDAKGDFVGFDIDLGNEMCKRMQVKCTWVASDFDALIPSLKAKKIDAIISSLS ITDKRQQEIAFSDKLYAADSRLIAAKGSPIQPTLDSLKGKHVGVLQGSTQEAYANETWRSKGVDVVAY ANQDLVYSDLAAGRLDAALQDEVAASEGFLKQPAGKDFAFAGSSVKDKKYFGDGTGVGLRKDDAEL TAAFNKALGELRQDGTYDKMAKKYFDFNVYGDKLYPYDVPDYAVDELFTGVVPILVELDGDVNGHKF SVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLMCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYV QERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIK VNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITL GMDELYK

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Apl. Prof. Dr. Martina Pohl für die Bereitstellung und Betreuung dieses spannenden, interdisziplinären Themas und die zahlreichen, stets motivierenden sowie hilfreichen Diskussionen, ebenso Herrn Prof. Dr. Michael Bott für seine wertvolle Unterstützung im Rahmen dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. Wolfgang Wiechert danke ich für die Möglichkeit, während meiner Promotionszeit am Institut für Bio- und Geowissenschaften (IBG-1: Biotechnologie) am Forschungszentrum Jülich zu forschen.

Besonderer Dank gebührt an dieser Stelle allen Mitarbeitern des IBG-1, insbesondere Frau Apl. Prof. Dr. Martina Pohl, Frau Juniorprof. Dr. Dörte Rother und der gesamten Arbeitsgruppe Biokatalyse und Biosensoren für die immer sehr gute und fruchtbare Arbeitsatmosphäre.

Bei Herrn Dr. Roland Moussa, der dieses Thema vor mir bearbeitete, möchte ich mich für die sehr hilfreiche Einarbeitung in das spannende Gebiet der Biosensoren bedanken.

Ein spezieller Dank geht natürlich auch an Frau Annika Blaszak, Frau Susann Engelmann und Frau Julia Otten. Vielen Dank, dass Ihr stets motiviert die "AG Biosensor" unterstützt habt!

Für Ihre Unterstützung und die gute (Büro-)Atmosphäre, vor allem während stressigerer Berichtsphasen, möchte ich mich besonders bei Anna Baierl, Aischarya Brahma, Vanessa Erdmann und Justyna Kulig bedanken.

Für stetigen Support und Hilfe in allen Labor- und Lebenslagen möchte ich mich auch speziell bei Frau Lilia Arnold, Frau Ilona Frindi-Wosch, Frau Doris Hahn, Frau Ursula Mackfeld und Frau Heike Offermann bedanken – zusammen mit Frau Apl. Prof. Dr. Martina Pohl und Frau Juniorprof. Dr. Dörte Rother sind sie das Herz der Arbeitsgruppe.

Für die zahlreichen Diskussionen, aus denen viele neue Anregungen hervorgingen, möchte ich auch meinen Mitstreitern Saskia Bock, Alana Dreßen, Dr. Tina Gerhards, Dr. Andre Jakoblinnert, Dr. Daniel Jussen, Dr. Zaira Maugeri, Dr. Torsten Sehl und Jochen Wachtmeister danken. Es war eine wirklich schöne gemeinsame Promotionszeit.

Spezieller Dank gebührt selbstverständlich auch meinen Kooperationspartnern: Frau PD Dr. Renu Batra-Safferling, Herrn PD Dr. Joachim Granzin und Herrn Vladimir Arinkin möchte ich besonders danken für ihre Anleitung zur Kristallisation von Proteinen und ihre Hilfe bei der Strukturaufklärung der gewonnen Kristalle. Herrn PD Dr. Bernd König danke ich für die Einweisung in die mikroscale Thermophorese und die isothermale Titrationskalorimetrie, sowie seine Hilfe bei einigen wichtigen Experimenten.

Besonderer Dank gilt auch Dr. Simon Unthan und Andreas Radek für die Einweisung in das Kultivierungssystem RoboLector® und die gemeinsamen Experimente daran, sowie Michael Limberg für die HPLC-Analysen meiner Proben.

Meinen Freunden und meiner Familie gebührt mein spezieller Dank: Besonders danke ich meinen Eltern Daniela und Robert Steffen sowie meiner Schwester Alexandra, die mich stets motiviert und unterstützt haben. Ganz besonders danke ich zu guter Letzt meinem Partner, Dr. Ralph Jung, für die moralische Unterstützung und auch die fachlichen Diskussionen.