

**Biochemische Nachweisverfahren**  
**auf der Basis genetischer Regulationselemente:**  
**vom Reporterassay zum Repressor/DNA-Bindungstest**

Von der Fakultät Chemie der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde eines Doktors der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

**Sabine Köhler**

aus Böblingen

Hauptberichter:	Prof. Dr. R. D. Schmid
Mitberichter:	Prof. Dr. D. H. Wolf
Vorsitzender:	Prof. Dr. H. Bertagnolli

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Dezember 2000

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart

2000







Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Schmid für die Überlassung des Themas, die motivierende Unterstützung und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen am Institut, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. Belkin von der Hebrew University, Jerusalem, Israel, für die Bereitschaft zu Diskussionen, die mir Denkanstöße gaben sowie für seine Gastfreundschaft.

Meinen Projektpartnern Yael Rozen und Merav Tauber von der Hebrew University, Jerusalem, Israel, danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Bibi vom Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel, danke ich für die Überlassung der Membranmutante *E. coli* UTL2.

Ich danke meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn Dr. Bachmann für die Unterstützung und Frau Dr. Schmitt für die Diskussionsbereitschaft bei genetischen Fragestellungen.

Herrn Schmucker von der Fraunhofer Gesellschaft, Stuttgart, möchte ich für die MALDI-TOF Messungen danken.

Ebenso danke ich allen Mitgliedern des Institutes, die durch ihre freundschaftliche Zusammenarbeit zum guten Arbeitsklima beigetragen haben und der Forschungspraktikantin Frau Monsathaporn.

Diese Arbeit wurde von der German Israeli Foundation for Scientific Research and Development (GIF I0442-168.09/95) finanziell unterstützt. Im Rahmen einer Kooperation von Herrn Prof. Dr. Schmid, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart, Herrn Prof. Dr. Belkin, Division of Environmental Sciences, Hebrew University, Jerusalem, und Herrn Prof. Dr. Stottmeister, Umweltforschungszentrum, Leipzig-Halle, entstand diese Arbeit im Zeitraum von Oktober 1997 bis Oktober 2000.



---

# Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	7
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	13
1 ZUSAMMENFASSUNG.....	15
2 ABSTRACT .....	16
3 EINLEITUNG .....	17
3.1 Einführung.....	17
3.2 Genetische Regulationselemente.....	18
3.3 Reporterassays.....	19
3.3.1 Vorkommen und Abbau von halogenierten Benzoesäuren.....	22
3.4 Das Tet-Regulationssystem.....	22
3.4.1 Vorkommen und Verwendung von Tetrazyklin .....	22
3.4.2 Tetrazyklin Resistenz .....	23
3.4.3 Tetrazyklin-Repressor .....	25
3.4.4 Operatorbindung .....	26
3.4.5 Induktorbindung.....	27
3.5 Bestimmung von molekularen Wechselwirkungen mit Oberflächenplasmonresonanz .....	29
3.6 Aufgabenstellung.....	30

---

4	MATERIAL UND METHODEN .....	32
4.1	Stämme.....	32
4.2	Plasmide .....	32
4.3	Chemikalien und Enzyme .....	32
4.4	Geräte .....	33
4.5	Verbrauchsmaterialien .....	35
4.6	Primer.....	35
4.7	Medien .....	36
4.7.1	LB-Medium.....	36
4.8	Stammhaltung und Bakterienanzucht .....	37
4.8.1	Stammhaltung .....	37
4.8.2	Bakterienanzucht.....	37
4.8.3	Kultivierung der Zellen für die Immobilisierung.....	37
4.9	Proteinanalytische Methoden.....	38
4.9.1	Induktion des $\lambda$ -Promotors .....	38
4.9.2	Proteinbestimmung des Tetrazyklin-Repressors.....	38
4.9.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	38
4.9.4	Proteinblotting für die N-terminale Sequenzierung.....	39
4.9.5	Reinigung des mit einem Streptag(II) fusionierten TetR.....	40
4.9.6	Faktor Xa Spaltung .....	40
4.9.7	Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	40
4.9.7.1	Peroxidase-Aktivität colorimetrisch .....	40
4.9.7.2	Peroxidase-Aktivität luminometrisch .....	41
4.9.7.3	Luziferase-Aktivität .....	41
4.9.8	Molmassenbestimmung mit MALDI-TOF.....	42
4.10	Molekulargenetische Methoden.....	42
4.10.1	DNA-Isolierung .....	42
4.10.1.1	Plasmidschnellisolierung .....	42
4.10.1.2	Plasmidisolation mit QIAprep Spin oder Midi Plasmid Purification Kit .....	43
4.10.2	Reinigung von PCR-Fragmenten.....	43
4.10.3	Quantitative Bestimmung von DNA-Konzentrationen.....	43
4.10.4	Enzymatische Behandlung von DNA .....	44

---

4.10.4.1	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen .....	44
4.10.4.2	Ligation .....	44
4.10.5	Klonierung von pCYTEXP1-TetR, pCYTEXP1-STetR und pCYTEXP1-TetRS.....	44
4.10.6	Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	45
4.10.7	Transfer von DNA in <i>E. coli</i> .....	46
4.10.7.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	46
4.10.7.2	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA .....	46
4.10.8	DNA-Gelelektrophorese.....	46
4.10.8.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	46
4.10.8.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	47
4.10.8.3	Gel-Mobility-Shift Assay .....	47
4.10.9	Polymerase-Ketten-Reaktion.....	48
4.10.10	Sequenzierung doppelsträngiger DNA.....	49
4.11	Präparative Methoden.....	50
4.11.1	Immobilisierungsmethoden.....	50
4.11.1.1	Immobilisierung in Polyacrylamid.....	50
4.11.1.2	Immobilisierung in Alginat .....	50
4.11.1.3	Immobilisierung in Alginat-Silikon .....	50
4.11.1.4	Adsorptive Immobilisierung von TetR auf Mikrotiterplatten .....	50
4.11.1.5	Kovalente Immobilisierung von TetR auf Mikrotiterplatten .....	51
4.11.2	Spezielle Untersuchungen der immobilisierten Zellen .....	51
4.11.2.1	Einfluß zellwandpermeabilisierender Substanzen und KNO <sub>3</sub> .....	51
4.11.2.2	Kurzzeitige Induktion der Zellen .....	51
4.11.3	Mikrotiterplatten-Assay zur Detektion von Tetrazyklin .....	52
4.11.4	Oberflächenplasmonresonanz-Messungen.....	52
5	ERGEBNISSE.....	54
5.1	Entwicklung des Reporterassays zur Detektion von 4-CBA.....	54
5.1.1	Optimierung der Immobilisierung.....	55
5.1.1.1	Alginat als Immobilisierungsmatrix.....	55
5.1.1.2	Stationäre Wachstumsphase zur Immobilisierung .....	56

---

5.1.1.3	Geringe Zelldichten zur Immobilisierung.....	57
5.1.1.4	Bestimmung des optimalen Volumens der Zell-Alginatmatrix .....	58
5.1.2	Charakterisierung des 4-CBA Assays mit immobilisierten Zellen.....	59
5.1.2.1	Vergleich von freien und immobilisierten Zellen .....	59
5.1.2.2	Zeitlicher Verlauf der Luziferaseexpression.....	60
5.1.2.3	Induktion mit verschiedenen 4-CBA Konzentrationen.....	61
5.1.2.4	Spezifitätsnachweis durch Induktion mit verschiedenen Analyten .....	62
5.1.2.5	Bestimmung der minimalen Induktionszeit .....	63
5.1.2.6	Bestimmung der Lagerungsstabilität .....	64
5.1.3	Optimierung des 4-CBA Reporterassays.....	65
5.1.3.1	Variation des pH-Wertes.....	65
5.1.3.2	Einsatz zellwandpermeabilisierender Substanzen und Erhöhung der Diffusion .....	66
5.1.4	Fazit des Reporterassays .....	68
5.2	Konzept des Repressor/DNA-Bindungstests zur Detektion von Tetrazyklin .....	69
5.2.1	Klonierung, Expression und Reinigung des Tetrazyklin-Repressors .....	71
5.2.2	MALDI-TOF zur Bestimmung der Molmasse des Tetrazyklin-Repressors.....	73
5.3	Gel-Mobility-Shift Assay zur Entwicklung eines Assays für Tetrazyklin .....	74
5.3.1	Fluoreszenzmarkierung der Operator-Fragmente .....	76
5.3.2	Bindung von STetR, TetRS und TetR an O1+O2 .....	76
5.3.3	Tetrazyklinzugabe zum Repressor/Operator-Komplex .....	78
5.3.4	Bindung von STetR, TetRS, and TetR an die Operator-Sequenzen: O1+O2, O1 oder O2.....	79
5.3.5	Bindungseigenschaften von TetR´ an $\beta$ -Galaktosidase markierten Operator O1+O2 .....	80
5.3.6	Bindungseigenschaften von TetR´ an $\beta$ -Galaktosidase markierten Operator O2 .....	82
5.3.7	Erhöhung des Abstandes Operator und $\beta$ -Galaktosidase Markierung.....	83
5.3.8	Variation des enzymatischen DNA Markers .....	85
5.3.9	Fazit aus dem Gel-Mobility-Shift Assay .....	86
5.4	Entwicklung des Mikrotiterplatten-Assays zur Detektion von Tetrazyklin.....	87
5.4.1	Produktion von Operator-DNA.....	88
5.4.2	Einfluß von Tetrazyklin auf die enzymatische Aktivität des Markers POD .....	88

---

5.4.3	Auswahl des geeigneten Blockierungsreagenz .....	89
5.4.4	Vergleich von kovalenter und adsorptiver Immobilisierung von TetR', STetR und TetRS auf Mikrotiterplatten.....	91
5.4.5	Bestimmung der optimalen DNA- und Proteinkonzentration.....	92
5.4.6	Bestimmung der minimalen Repressor/DNA-Bindungszeit.....	93
5.4.7	Detektionslimit und Detektionsbereich für Tetrazyklin.....	94
5.4.8	Auswahl der Mikrotiterplatten .....	96
5.4.9	Einfluß eines Detergenz .....	97
5.4.10	Zellextrakt ohne Blockierung.....	98
5.4.11	Fazit aus der Entwicklung des Mikrotiterplatten-Assays zur Bestimmung von Tetrazyklin .....	99
5.5	Repressor/DNA Bindung detektiert durch Ober-flächenplasmonresonanz .....	100
5.5.1	Bindung des O2 Operators an den SA-Chip und Wechselwirkung mit TetR' .....	100
5.5.2	Tetrazyklin Zugabe zum Repressor/DNA-Komplex .....	101
5.5.3	Regeneration des SA-Chips .....	101
5.5.4	Fazit der Oberflächenplasmonresonanz-Messungen.....	101
6	DISKUSSION .....	102
6.1	Entwicklung eines Reporterassay zur Detektion von 4-CBA .....	102
6.1.1	Einfluß der Immobilisierung auf den 4-CBA Assay.....	102
6.1.1.1	Matrix für Immobilisierung.....	102
6.1.1.2	Vergleich von immobilisierten und freien Zellen .....	103
6.1.1.3	Optimierung der Immobilisierung in Alginat.....	103
6.1.2	Charakterisierung des 4-CBA Assays mit immobilisierten Zellen .....	104
6.1.2.1	Induktionsprofil.....	104
6.1.2.2	Induktionszeit .....	104
6.1.2.3	Meßbereich und Detektionslimit.....	105
6.1.2.4	Spezifität.....	105
6.1.2.5	Lagerungsstabilität .....	106
6.1.3	Optimierung des 4-CBA Assays .....	107
6.1.3.1	Einfluß des pH-Wertes .....	107

---

6.1.3.2	Zusatz von zellwandpermeabilisierenden Substanzen und KNO <sub>3</sub> .....	107
6.2	Gel-Mobility-Shift Assay zur Entwicklung eines Assays für Tetrazyklin .....	108
6.2.1	Klonierung, Expression, Reinigung und Molmassenbestimmung des Tetrazyklin-Repressors.....	108
6.2.2	Funktionalität von Repressoren mit Tag.....	109
6.2.3	Operatorbindung .....	110
6.2.4	Induktorbindung.....	110
6.2.5	Enzymatische DNA Markierung.....	111
6.2.5.1	Wechselwirkung zwischen TetR´ und DNA Marker (β-Gal., POD).....	111
6.2.5.2	Abstand Operator und β-Galaktosidase Markierung .....	113
6.3	Entwicklung eines Mikrotiterplatten-Assays zur Tetrazyklindetektion.....	114
6.3.1	Bestimmung des geeigneten Enzyms zur Markierung der DNA.....	114
6.3.2	Wechselwirkung mit dem Blockierungsreagenz .....	115
6.3.3	Wechselwirkung mit verschiedenen Mikrotiterplatten.....	115
6.3.4	Einfluß des Detergenz.....	116
6.3.5	Wechselwirkung des POD-Markers mit der Mikrotiterplatte.....	116
6.4	Bestimmung der DNA/Repressor-Wechselwirkung mit Oberflächenplasmonresonanz .....	117
6.5	Bewertung der entwickelten Assaysysteme .....	118
6.5.1	Vergleiche von Reportersystemen .....	118
6.5.2	Standardmethoden zur Bestimmung von 4-CBA .....	120
6.5.3	Vergleich der Tetrazyklinbestimmung mit Gel-Mobility-Shift Assay, Mikrotiterplatten-Assay und Oberflächenplasmonresonanz.....	120
6.5.4	Vergleiche von Assaysystemen zur Bestimmung von Tetrazyklin .....	120
6.5.5	Fazit .....	124
7	LITERATUR .....	125

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	kb	Kilobase
Ab-POD	Monoklonales Anti-Biotin Peroxidasekonjugat	Kn <sup>R</sup>	Kanamycinresistenz
AMP	Adenosinmonophosphat	<i>lacZ</i>	Gen für $\beta$ -Galaktosidase
Amp <sup>R</sup>	Ampizillinresistenz	LB	Luria Bertani
APS	Ammoniumpersulfat	<i>luc</i>	Gen für Luziferase aus Leuchtkäfer
ATP	Adenosintriphosphat	<i>luxCDABE</i>	Luziferaseoperon
2-BBA	2-Brombenzoesäure	M	Masse
3-BBA	3-Brombenzoesäure	NADPH	Nikotinamidadenindinukleotid- phosphat (reduziert)
4-BBA	4-Brombenzoesäure	NHS	N-Hydroxysuccinimid
bp	Basenpaar(e)	O1	tet Operator O1
BSA	Rinderserumalbumin	O2	tet Operator O2
c	Konzentration	OD	Optische Dichte
2-CBA	2-Chlorbenzoesäure	ori	Replikationsursprung
3-CBA	3-Chlorbenzoesäure	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
4-CBA	4-Chlorbenzoesäure	PCB	polychlorierte Biphenyle
DMS	Dimethylsulfat	PCR	Polymerasekettenreaktion
DMSO	Dimethylsulfoxid	PEG	Polyethylenglykol
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RLU	Relative Lichteinheit
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat	RU	Resonanzeinheit
DTT	Dithiothreitol	SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	STetR	Tetrazyklinrepressor mit N- terminal fusioniertem Streptag(II)
EDC	N-Ethyl-N'-(3-diethylamino- propyl)carbodiimid	Strep-POD	Streptavidin-Peroxidase-Konjugat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	Tab.	Tabelle
FAD	Flavinadenindinukleotid	Tc	Tetrazyklin
2-FBA	2-Fluorbenzoesäure	TE	Tris-EDTA
3-FBA	3-Fluorbenzoesäure	TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylendiamin
4-FBA	4-Fluorbenzoesäure	TetR	Tetrazyklinrepressor
FMN	Flavinadeninmononukleotid	TetR'	Faktor Xa behandelter Tetrazyklinrepressor STetR
$\beta$ -Gal.	$\beta$ -Galaktosidase	TetRS	Tetrazyklinrepressor mit C- terminal fusioniertem Streptag(II)
GFP	Green fluorescent protein	Tn10	Transposon Tn10
4-HOBA	4-Hydroxybenzoesäure	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
HTH	Helix-Turn-Helix	V	Volumen
2-IBA	2-Iodbenzoesäure	<i>V. fischeri</i>	<i>Vibrio fischeri</i>
3-IBA	3-Iodbenzoesäure		
4-IBA	4-Iodbenzoesäure		

**Einheiten**

A	Ampere
°C	Grad Celsius
Da	Dalton
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
M	Molar
min	Minute
s	Sekunde
V	Volt

**Nukleotide**

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

**Vorsätze**

k	kilo ( $10^3$ )
m	milli ( $10^{-3}$ )
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
n	nano ( $10^{-9}$ )

**Aminosäurenomenklatur nach IUPAC**

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

# 1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde auf der Grundlage von genetischen Regulations-elementen ein *in vivo* Assay und vergleichend hierzu ein *in vitro* Assay entwickelt. Ein rekombinanter *E. coli* Stamm wurde beim *in vivo* Reporterassay zur Detektion von 4-CBA verwendet, der bei Anwesenheit von 4-CBA Luziferase exprimiert. Durch Immobilisierung dieses Stammes konnte ein einfaches und spezifisches Testverfahren im Mikrotiterplattenformat entwickelt werden. Mit den optimierten Immobilisierungsbedingungen und der Verwendung einer Membranmutante von *E. coli* konnte ein Detektionslimit von 28  $\mu\text{M}$  4-CBA in 200 min erreicht werden. Zusätzlich wurde ein von den Eigenschaften der Zelle unabhängiges *in vitro* Assaysystem entwickelt. Da der Mechanismus der Tetrazyklinresistenz in Bakterien bekannt war, wurde Tetrazyklin als Analyt ausgewählt. Im neu zu entwickelnden Assay sollte der durch Tetrazyklin induzierte Abfall des Repressors von der Operator DNA zur quantitativen Bestimmung von Tetrazyklin benutzt werden. Dazu wurde der Tet Repressor mit N-terminal oder C-terminal fusioniertem Tag und nativ in *E. coli* überexprimiert. Die Funktionalität der Repressoren wurde im Gel-Mobility-Shift Assay untersucht. Nur der Repressor ohne Tag sowie der Repressor mit einem durch Proteaseverdau abgespaltenem Tag zeigten volle biologische Aktivität. Im Hinblick auf eine spätere Assay-Entwicklung wurde der Einfluß eines enzymatischen Markers auf die Repressor/Operator-DNA-Bindung mit derselben Methode getestet. Daraus folgte eine Versuchsdurchführung für den Mikrotiterplatten-Assay. Diese beinhaltete die Immobilisierung des Repressors, die Bindung von Tetrazyklin an diesen und die Bindung POD markierter Operator-DNA an tetrazyklinfreie Repressoren. Die Bestimmung der POD Aktivität ließ Rückschlüsse auf die vorhandene Tetrazyklinkonzentration zu. Da dieses Assayformat mit sehr großen Standardabweichungen verbunden war, wurden markerfreie Oberflächenplasmonresonanzmessungen vorgenommen.

## 2 Abstract

The aim of this study was the development of *in vivo* and *in vitro* test systems using genetic regulatory elements. The *in vivo* reporter assay detected 4-CBA with recombinant *E. coli* strains. These strains express luciferase in the presence of 4-CBA, which can be quantified by its enzymatic reaction. Immobilization of the microorganism provided a handy and specific microtiter plate assay. The optimized system had a detection limit of 4-CBA of 28  $\mu\text{M}$  within 200 min using a membrane mutant strain of *E. coli*. The second objective was the development of a cell independent *in vitro* system. The development was based on the mechanism responsible for the tetracycline resistance in microorganisms using it for the detection of tetracycline. Tetracycline induces by its binding to the Tet repressor dissociation of the repressor from the operator. The assay was to use the release of the repressor from the operator by tetracycline to quantify the analyte. The Tet repressor was overexpressed in *E. coli* either without any tag or as N-terminal or C-terminal fusion to Strep-tag(II). The activity of these repressors was checked in gel-mobility-shift assays. All three obtained repressors could bind to the operator, but only the repressor without tag and the repressor with protease digested tag showed dissociation from the DNA after tetracycline addition. In light of the later assay development the influence of an enzymatic label at the end of the operator DNA fragment onto the binding of the repressor was studied as well using a gel-mobility-shift assay. Based on these results a microtiter plate format assay was tested. After immobilization of the repressor binding studies on enzymatic labeled operator DNA were performed. Using POD activity estimation of the tetracycline concentration was possible. Due to the high standard deviations later surface plasmon resonance was used to measure the binding capability of the label free operator DNA fragments.

## 3 Einleitung

### 3.1 Einführung

Die empfindliche und selektive Bestimmung einer Vielzahl von Verbindungen hat sowohl für die Forschung als auch bei Produktionsüberwachungen, in der Lebensmittelindustrie, im Umweltschutz und bei der Diagnose von Erkrankungen große Bedeutung. Durch Fortschritte in der instrumentalen Analytik, z. B. der Gaschromatographie, der Hochdruckflüssigkeitschromatographie, der Massenspektrometrie und der Atomabsorptionsspektroskopie konnten hohe Selektivität in der Spurenanalytik erzielt werden. Diese Methoden sind aber wegen des hohen apparativen Aufwandes nur in Speziallaboratorien einsetzbar. Zusätzlich sind sie für den „on-line-Betrieb“ nur bedingt zu gebrauchen. Deshalb stellt die Entwicklung selektiver und einfach zu bedienender Meßfühler ein Schlüsselproblem der Analytik dar.

Mit isolierten Antikörpern [1], Rezeptoren [2] oder Enzymen [3] lassen sich *in vitro* Assaysysteme entwickeln, bei denen eine oder mehrere Komponenten auf einer Oberfläche immobilisiert sind. Die durch Bindung des Analyten auftretenden Veränderungen werden in einem geeigneten Testformat detektiert. Dadurch entsteht eine Vielzahl von einfachen und sensitiven Tests, die teilweise auch außerhalb eines Labors durchgeführt werden können.

*In vivo* lassen sich mit ganzen Zellen Detektionssysteme entwickeln. Die Vorteile sind die billigen Herstellungskosten, da auf aufwendige Proteinisolationen verzichtet werden kann. Werden ganze Zellen eingesetzt, muß in verstärktem Maße wegen der Fülle von vorhandenen Enzymen und Proteinen auf die Selektivität geachtet werden. Oft zeichnen sich diese mikrobiellen Assaysysteme durch lange Lebensdauer und hohe Lösungsmittelbeständigkeit aus. Zum Beispiel können Veränderungen der Atmungsaktivität nach Zugabe eines Substrates zur Assayentwicklung ausgenutzt werden [4, 5]. Eine andere Möglichkeit besteht in der genetischen Veränderung von Mikroorganismen, die dann auf äußere Veränderungen ein Signal aussenden [6, 7].

Gegenstand dieser Arbeit ist die Entwicklung eines *in vivo* und *in vitro* Assays auf der Grundlage genetischer Regulationselemente.

## 3.2 Genetische Regulationselemente

In vielen molekularbiologischen Systemen spielt die Wechselwirkung von Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Proteinen eine entscheidende Rolle. Die Genexpression sowie die Umsetzung der in der DNA gespeicherten Informationen wird von Proteinen kontrolliert und katalysiert. Die Gruppierung von Genen und ihrer regulatorischen Einheit (bestehend aus Promotor und Operator) in Prokaryonten wird Operon genannt. Bei der Regulation der Transkription spielt der Promotor, die RNA Polymerasebindungsstelle, eine entscheidende Rolle. Bei negativer Kontrolle enthält der Operator die Repressorbindungsstelle. Bindet ein Repressor an die Operatorbindungsstelle, wird die Bindung der RNA-Polymerase behindert und die Transkription verhindert. Bindet der Repressor nicht, so kann die RNA-Polymerase die Transkription des Gens starten. Wird ein Gen positiv kontrolliert, bindet ein Aktivatorprotein an den Operator, der sich vor dem Promotor befindet. Dies ermöglicht die Transkription der RNA-Polymerase. Bindet kein Aktivator an dem Operator, ist keine Transkription möglich. Um die Bindung des Aktivatorproteins oder das Abfallen des Repressorproteins zu erreichen, und dadurch die Transkription zu starten, ist teilweise auch ein Ligand nötig. Zur Analyse von Genregulationssystemen werden häufig Reportergene eingesetzt. Bei diesen Reportersystemen wird hinter die für die Regulation wichtigen Sequenzen ein Gen kloniert, das für ein leicht zu identifizierendes Protein kodiert. Ist der Mechanismus der Genregulation eines bestimmten Gens bekannt, können diese Reportersysteme auch verwendet werden, um Änderungen in Umwelteinflüssen *in vivo* zu detektieren. Meistens dient der Ligand als Analyt, der an den Repressor oder Aktivator bindet und die Expression des darauffolgenden Gens startet. Als Liganden treten anorganische Substanzen, organische Verbindungen oder Proteine auf. Um Aufschluß über die Verhältnisse *in vivo* zu bekommen, können *in vitro* Experimente an gereinigten Protein- und DNA-Proben mögliche molekulare Mechanismen aufzeigen. Sowohl für die *in vivo* als auch die *in vitro* Experimente sind die Gleichgewichtseigenschaften und die Kinetik der untersuchten Wechselwirkungen von Bedeutung.

### 3.3 Reporterassays

Damit eine Bakterienzelle als „mikrobieller Bioreporter“ funktioniert, müssen zwei genetische Elemente vorhanden sein: ein sensorisches und ein Reporter. Das erste nimmt die Anwesenheit des Analyten wahr und schaltet das letztere an, das ein detektierbares Signal aussendet. Das Reporterelement besteht typischerweise aus einem Gen oder einer Gruppe von Genen, die für Proteine kodieren, deren Anwesenheit oder Aktivität leicht zu bestimmen ist. Das sensorische Element ist in jedem bakteriellen Sensor unterschiedlich, und seine Auswahl liegt in der Einzigartigkeit und Spezifität für den nachzuweisenden Analyten. In den meisten Fällen besteht dieses Element aus den regulatorischen Sequenzen eines Gens oder einer Gruppe von Genen, die normalerweise durch eine spezifische Änderung des Umwelteinflusses aktiviert werden. Unter Verwendung dieses Prinzips kann die Expression eines Reportergens unter Kontrolle einer regulatorischen Sequenz (Promotor) erfolgen. Abb. 1 zeigt dieses Prinzip.

Um Umwelteinflüsse mit rekombinanten Mikroorganismen zu detektieren, wurden  $\beta$ -Galaktosidase, Luziferasen, Green fluorescent protein (GFP),  $\beta$ -Glukoronidase,

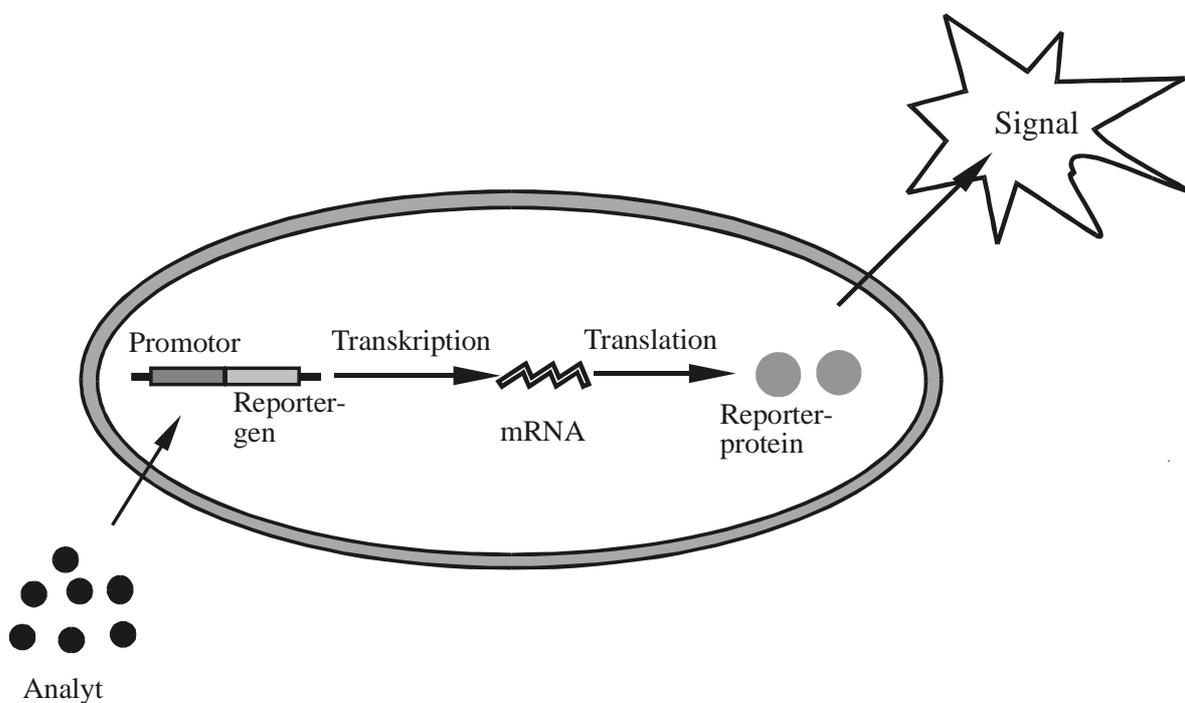


Abb. 1: Funktionsweise der Reporterassay-Systeme: Der Analyt induziert die Expression des Reportergens. Nach der Transkription und Translation kann das Reporterprotein durch seine Aktivität leicht detektiert werden.

$\beta$ -Laktamase und alkalische Phosphatase eingesetzt. Tab. 1 gibt eine Übersicht der eingesetzten Reportergene und der Detektionsmethode ihrer Proteine.

Tab. 1: Reportergene und Reporterproteine

Reporterprotein	Reporter-gen	Ursprung	Substrat	Detektions-methode	Referenz
Bakterielle Luziferase	<i>lux</i>	verschiedene lumineszierende Bakterien	Langkettige Aldehyde	Lumineszenz	[8]
Insekten-luziferase	<i>luc</i>	Leuchtkäfer, Glühwürmchen	Luziferin	Lumineszenz	[8]
$\beta$ -Galaktosidase	<i>lacZ</i>	<i>E. coli</i>	Galakto-pyranoside	Colorimetrie, Elektrochemie, Fluoreszenz, Chemilumineszenz	[9, 10]
Green fluorescent protein	<i>gfp</i>	<i>Aequorea victoria</i>	-	Fluoreszenz	[11]
$\beta$ -Glukoronidase	<i>uidA (gusA, gurA)</i>	<i>E. coli</i>	$\beta$ -Glukoronide	Colorimetrie, Fluoreszenz, Lumineszenz	[12]
$\beta$ -Lactamase	<i>bla</i>	<i>E. coli</i>	Lactamide	Colorimetrie	[10, 13, 14]
Alkalische Phosphatase	<i>phoA</i>	verschiedene	Phosphorylierte organische Verbindungen	Colorimetrie, Chemilumineszenz	[12, 15]

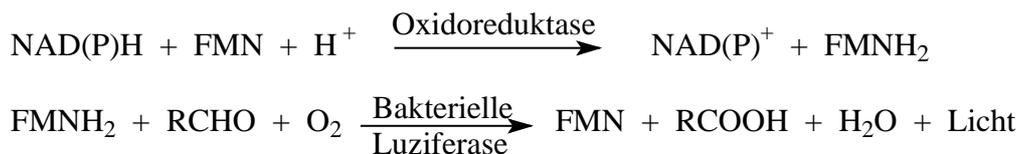
In der Umweltanalytik werden Reporterassays eingesetzt, um definierte anorganische und organische Substanzen ebenso wie Summenparameter zu detektieren (Tab. 2). Hauptsächlich für Schwermetalle, aber auch für Benzolderivate, Streß und Genotoxizität wurden Assays unter Verwendung von entsprechenden Promotoren entwickelt, die auf Analyten als sensorisches Element reagieren. Die meisten Reporterassays benötigen eine Assayzeit von 1-2 Stunden. Das Detektionslimit des Analyten befindet sich im  $\mu\text{M}$ -Bereich.

Bei der Bestimmung von Zink wurde zum Beispiel der Promotor des *smtA* Gens, der die zur Transkriptions- und Translationsinitiation notwendigen Bereiche enthält, vor das Reportergen *lacZ* kloniert [16]. Nach Transformation des Plasmids in *Synechococcus* (PCC7942) konnte Zink bis zur unteren Detektionsgrenze von  $12 \mu\text{M}$  bestimmt werden.

Tab. 2: Reporterassays zur Bestimmung von Summenparametern

Parameter	Promotor	Reporter	Wirt	Referenz
Streß	<i>grpE, dnaK, lon</i>	<i>lux (V. fischeri)</i>	<i>E. coli</i>	[17-19]
Oxidativer Streß	<i>oxyR, micF, katG</i>	<i>lux (V. fischeri)</i>	<i>E. coli</i>	[20-22]
DNA-Beschädigung, Genotoxizität	<i>recA, recN, uvrA,</i> <i>alkA</i> <i>rad54</i> <i>SfiA</i> <i>Umu</i>	<i>lux (V. fischeri)</i> <i>lacZ</i> <i>gfp</i> <i>lacZ</i> <i>lacZ</i>	<i>E. coli</i> <i>Hefe</i> <i>E. coli</i> <i>Salmonella</i>	[23-26] [27, 28] [29, 30] [31]

Das am häufigsten verwendete Reporterprotein in Bioassays ist die Luziferase. Die bakterielle Luziferase katalysiert die aerobe Oxidation des reduzierten Flavinmononukleotids und eines langkettigen Aldehyds zu Flavinmononukleotid und zu der korrespondierenden Carbonsäure, wobei Lichtemission um 490 nm mit einer Quantenausbeute von ungefähr 0,1 auftritt.



Die bakteriellen Luziferasen (*V. fischeri*, *V. harveyi*, *P. luminescens*) werden von den Genen *luxA* und *luxB* des Luziferaseoperons kodiert und die Enzyme für die Synthese des Aldehyds von den Genen *luxCDE* [32]. In Konstrukten, in denen nur *luxAB* anwesend ist, muß der Aldehyd extern zugegeben werden. Die am häufigsten verwendeten Luziferasen wurden aus *Vibrio fischeri* und *Vibrio harveyi* isoliert. In einigen Studien fand auch die Luziferase aus *Photorhabdus (Xenorhabdus) luminescens* Anwendung [33].

Neben der bakteriellen Luziferase findet die Glühwürmchen Luziferase Anwendung, die durch das Gen *luc* kodiert wird. Die sauerstoffabhängige Biolumineszenzreaktion beruht auf dem Energietransfer von ATP zum Substrat, D-Luziferin, unter Bildung von Oxyluziferin, AMP, Kohlenstoffdioxid und Licht einer Wellenlänge 560 nm [34]. Die Quantenausbeute von 0,88 ist die höchste der bekannten Biolumineszenzreaktionen [35]. Ein Nachteil ist die Notwendigkeit der externen Luziferinzugabe zum Assay.



### 3.3.1 Vorkommen und Abbau von halogenierten Benzoesäuren

Durch den Einsatz von Herbiziden, Insektiziden, Fungiziden, Lösungsmitteln, Hydraulikflüssigkeiten, Wärmeübertragungsflüssigkeiten, Weichmachern sowie durch Zwischenprodukte chemischer Synthesen, gelangen halogenierte aromatische Verbindungen in die Umwelt. Auf Grund ihrer Toxizität, Biokonzentration und Persistenz besteht ein Interesse, die Verbreitung halogener Stoffe nachzuweisen und diese aus der Umwelt zu entfernen. Einige dieser Verbindungen können von Mikroorganismen nicht abgebaut werden. Um Aufschlüsse über den mikrobiellen Abbau dieser Verbindungen zu bekommen, wurden leichtabbaubare halogenierte Benzoesäuren als Modellsubstanzen verwendet. Diese halogenierten Benzoesäuren gehören einer Gruppe von Verbindungen an, die durch ihren Einsatz als Herbizide (2,3,6-Trichlorbenzoesäure) oder als Zwischenstufe des mikrobiellen Abbaus von polychlorierten Biphenylen (PCB) in die Umwelt gelangen.

Der Abbau der monohalogenierten 4-Chlorbenzoesäure (4-CBA), bei dem als erster Schritt eine hydrolytische Dechlorierung auftritt, kann beispielsweise durch die Stämme *Arthrobacter* sp. SU [36], SB8 [37], TM-1 [38] und *Pseudomonas* sp. CBS-3 [39, 40] erfolgen. Die am Abbau von 4-CBA beteiligten Enzyme, 4-CBA-CoA Ligase, 4-CBA-CoA Dehalogenase und 4-CBA-CoA Thioesterase des Stammes *Arthrobacter* SU sind bekannt. So ermöglichte dies die Konstruktion eines Reporterassays, der in dieser Arbeit beschrieben wird.

## 3.4 Das Tet-Regulationssystem

### 3.4.1 Vorkommen und Verwendung von Tetrazyklin

In den späten vierziger Jahren dieses Jahrhunderts wurden die Tetrazykline entdeckt. Tetrazykline werden von verschiedenen Streptomycceten produziert und ausgeschieden [41]. Sie hemmen die Proteinbiosynthese, indem sie an die 30S Untereinheit der Ribosomen binden und dort mit der Aminoacyl-tRNA interferieren. 10 Jahre nach ihrer Entdeckung wurden sie in der Veterinärmedizin eingeführt. Sie sind möglicherweise immer noch eines

der meist verwendeten Antibiotika in der Viehzucht. Tetracycline haben ein breites Spektrum gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien.

Von den im Handel befindlichen Tetracyclinen sind in Deutschland Tetracyclin (s. Abb. 2), Chlortetracyclin, Oxytetracyclin und Rolitetracyclin für den veterinärmedizinischen Gebrauch zugelassen. 1968 wurde ihr Einsatz als Wachstumsförderer in der Tiermast kontrovers diskutiert, alarmiert durch den hohen Resistenzstatus in Gram-negativen Bakterien. Seit 1967 wurde ihre Anwendung als Futtermittelzusatzstoff durch die Verschreibungspflicht eingeschränkt. Zur Therapie bakterieller Infektionen werden sie neben Penizillin und Streptomycin nach wie vor am häufigsten eingesetzt. Daher kann mit Tetracyclinrückständen in Lebensmitteln bei unsachgemäßer Handhabung gerechnet werden. Am 1.1.1992 trat die EG-Verordnung 2377/90 in Kraft, in der Höchstmengen (maximum residue limits) für Rückstände antimikrobiell wirksamer Substanzen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs schrittweise festgesetzt wurden. Für Tetracycline wurden vorläufig Höchstmengen von 600 µg/kg in den Nieren, von 300 µg/kg in der Leber und von 100 µg/kg in der Muskulatur festgelegt. Dies macht die Entwicklung von Nachweisverfahren für Tetracyclin nötig.

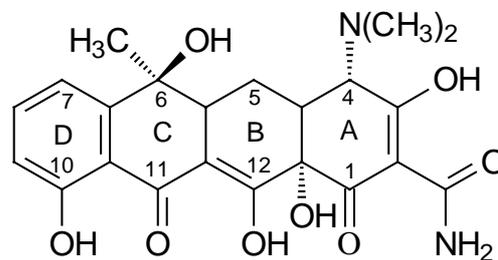


Abb. 2: Strukturformel von Tetracyclin.

### 3.4.2 Tetracyclin Resistenz

Von den Bakterien wurden unterschiedliche Mechanismen entwickelt, dem durch freie Diffusion in die Zelle gelangten Tetracyclin zu begegnen. Drei verschiedene Resistenzmechanismen in Bakterien wurden identifiziert, um die antibiotische Wirkung von Tetracyclin zu vermindern: (1) Schutz der Ribosomen, dem antibiotischen Ziel, (2) Reduktion der intrazellulären Tetracyclinkonzentration und (3) Inaktivierung des Antibiotikums durch modifizierende Enzyme [42]. Resistenzdeterminanten, die mindestens einen dieser Mecha-

nismen besitzen, sind unter allen Genera der Bakterien weitverbreitet. Sie wurden auf Grund von DNA-DNA-Kreuzhybridisierung in sieben Klassen (A-E, G, H) [43] eingeteilt. Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Tetrazyklin-Repressor der Klasse B des Transposons *Tn10*. Ein Transposon enthält DNA Segmente, die sich in das Genom integrieren können. Neben den Sequenzen für die Insertion enthält *Tn10* noch die Gene für die Tetrazyklinresistenz. Dieses Tetrazyklinresistenz Operon, das die regulatorischen Elemente sowie die Resistenzgene enthält, beinhaltet zwei Operatoren, die Bindungstellen des Repressors und die Gene *tetR* und *tetA*, die für den Repressor bzw. den Transporter kodieren (s. Abb. 3). Gram-negative Bakterien, die Tetrazyklin aus der Zelle transportieren, teilen einen gemeinsamen Mechanismus. Die Gene *tetA* und *tetR* sind in gegenläufiger Orientierung angeordnet, wobei die Promotoren überlappen. In der regulatorischen Region zwischen *tetR* und *tetA* befinden sich zwei *tet* Operatoren O1 und O2, an die TetR als Homodimer spezifisch und mit hoher Affinität bindet. Hierbei ist die Affinität gegenüber O2 wesentlich höher als gegenüber O1. Dadurch wird die Transkription der Gene *tetA* und *tetR* durch die divergent überlappenden Promotoren reprimiert [44]. Gelangt Tetrazyklin in die Zelle wird

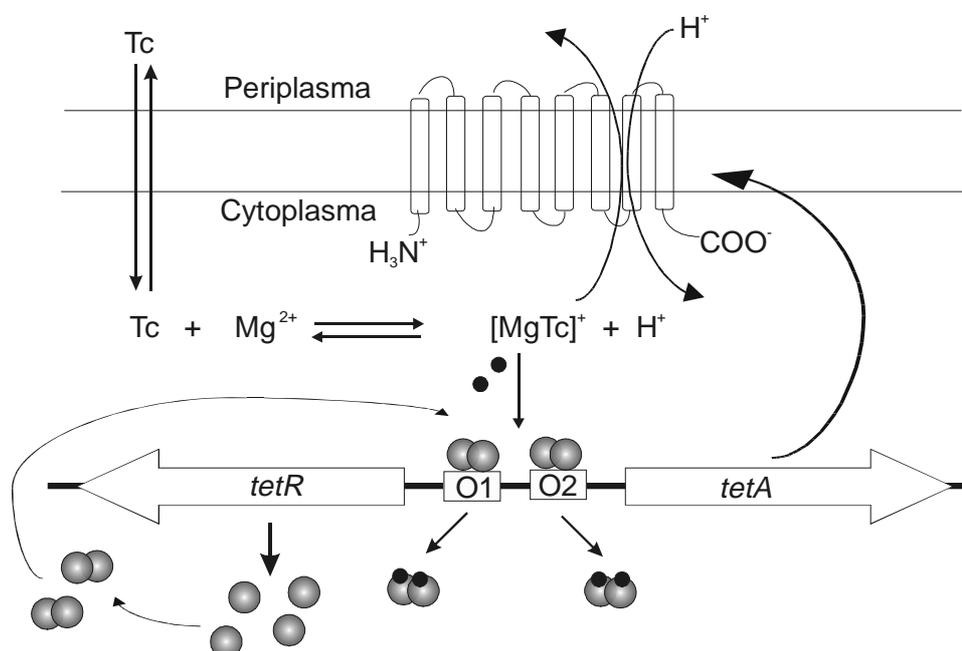


Abb. 3: Genetische Organisation und Mechanismus der Regulation der *Tn10* kodierten Tetrazyklin-Resistenzdeterminante. Es wird angenommen, daß Tetrazyklin in der neutralen Form in die Zelle gelangt. Protonen des Sauerstoffs-11/12 werden durch divalente Kationen im Cytoplasma ersetzt und bilden den  $[MgTc]^+$  Komplex. Dieser Komplex inaktiviert den Tet Repressor, der von *tetR* kodiert wird und als Dimer an die *tet* Operatoren O1 und O2 gebunden ist. Die Bindung von  $[MgTc]^+$  an den TetR/Operator-Komplex löst eine Konformationsänderung aus, die zum Abfallen des Repressors von der DNA führt [44]. Damit wird der Operator frei für die Transkription von *tetR* und *tetA*.

es deprotoniert und mit  $Mg^{2+}$  komplexiert. Durch Bindung des Magnesium/Tetrazyklin-Komplexes an den Repressor/Operator-Komplex erfolgt eine Strukturänderung des Repressors, die zur Dissoziation des Repressors von der Operator-DNA führt. Dies induziert die Expression beider *tet* Gene [44, 45]. TetA transportiert dann das Tetrazyklin aus der Zelle.

### 3.4.3 Tetrazyklin-Repressor

Die Struktur des Tetrazyklin-Repressors wurde durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt (s. Abb. 4) [46, 47]. TetR ist ein dimeres  $\alpha$ -helikales Protein, das aus zehn  $\alpha$ -Helices pro Monomer besteht. Die Dimerisierung des Proteins erfolgt an einer Fläche, die durch die N-terminale Hälfte der  $\alpha$ -Helix 7, den Helices  $\alpha 8$  bis  $\alpha 10$  sowie den Schleifenregionen zwischen den Helices  $\alpha 6/7$  und  $\alpha 8/9$  vermittelt wird [48]. Durch Deletionsanalyse konnten die Aminosäurebereiche 99-151 und 166-201 als für die Dimerisierung wesentliche Bereiche bestimmt werden [49]. Das zentrale Element der Dimerisierung ist ein Vier-Helix-Bündel, das aus den  $\alpha$ -Helices 8, 8', 10 und 10' gebildet wird. Die Untereinheiten des Proteins  $\alpha 1$  bis  $\alpha 3$ , die den DNA-Bindekopf bilden, sind über die Helix  $\alpha 4$  mit dem Proteinkörper ( $\alpha 5$ - $\alpha 10$ ) verbunden. Der Proteinkörper enthält die Tetrazyklin-Bindungsstelle und die Dimerisierungsfläche. Für die DNA-Bindung ist ein Helix-Turn-Helix-Motiv (HTH) verantwortlich ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ). Die Schleife zwischen  $\alpha 8$  und  $\alpha 9$  ist in verschiedenen Repressoren bezüglich Länge und Sequenz nicht konserviert [48].

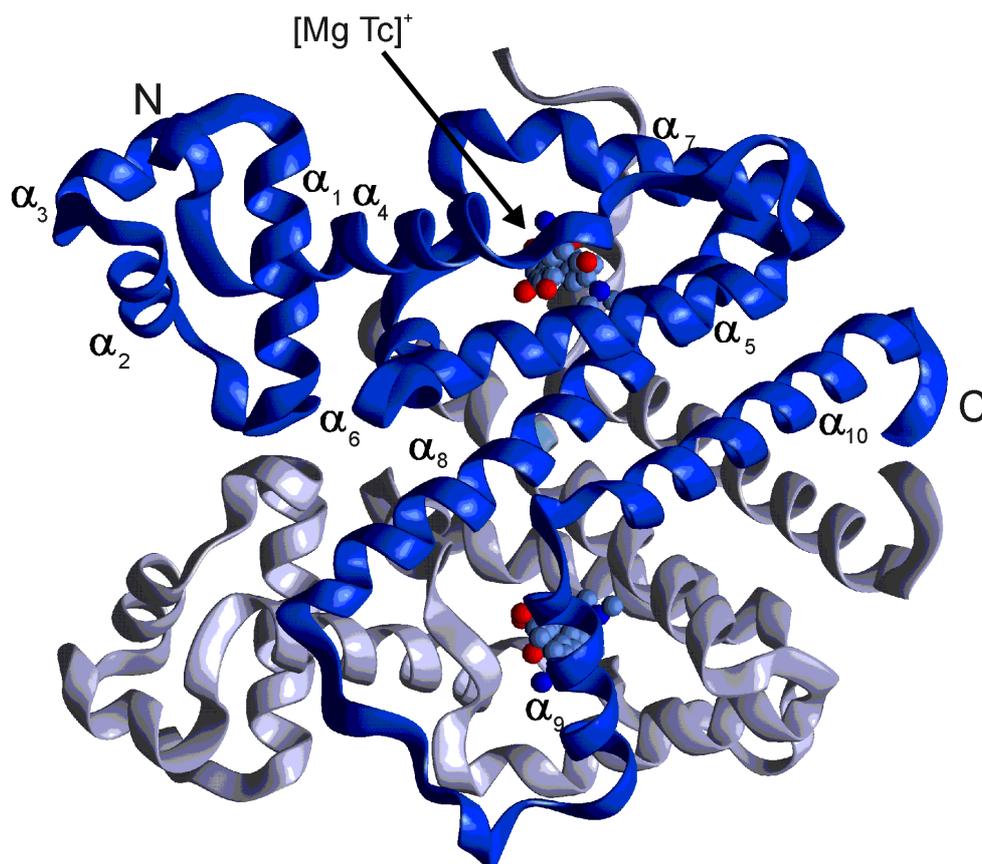


Abb. 4: Schematische Darstellung des Homodimers des Tetrazyklin-Repressors der Klasse D in Komplex mit zwei Induktoren  $[MgTc]^+$ . Ein Monomer ist hellblau, das andere blau dargestellt. Die Helices eines Monomers sind nummeriert [50].

### 3.4.4 Operatorbindung

Die sequenzspezifische Erkennung der DNA spielt eine zentrale Rolle bei der Transkriptionskontrolle aller Organismen. Trotz der strukturellen und funktionalen Vielfalt der DNA-Bindeproteine besteht nur eine limitierte Anzahl von DNA-Bindungs-Motiven, von denen das Helix-Turn-Helix-Motif (HTH) am ausgeprägtesten untersucht wurde [51, 52]. Der Tet Repressor des *Tn10* besitzt ein HTH-Motiv zwischen den Aminosäuren 27 und 47 [53]. Er bindet an den 19 bp langen palindromischen *tet* Operator, dessen Basenpaare 2 bis 6 für die Bindung essentiell sind (s. Abb. 5) [54]. Mutationsanalysen zeigten weiterhin, daß die Aminosäurereste Arg28, Gln38, Pro39 und Thr40 wichtige Funktionen bei der Bindung erfüllen [52, 53]. Ein Modell der Kontakte zwischen den Aminosäuren im HTH-Motiv und den Basen des *tet* Operators wurde erstellt [52, 53, 55-57]. Die Bindekonstante von TetR

an den *tet* Operator beträgt  $7 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$  in 100 mM NaCl [58] und ist somit  $7 \times 10^8$ -fach höher als eine unspezifische Bindung. Die Bindung von  $[\text{MgTc}]^+$  führt zum Herabsetzen dieser Konstante auf etwa  $1 \times 10^3$  bis  $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  [59]. Die Affinität des Tet Repressors gegenüber dem Operator O2 ist drei bis fünffach höher als gegenüber O1 [60].

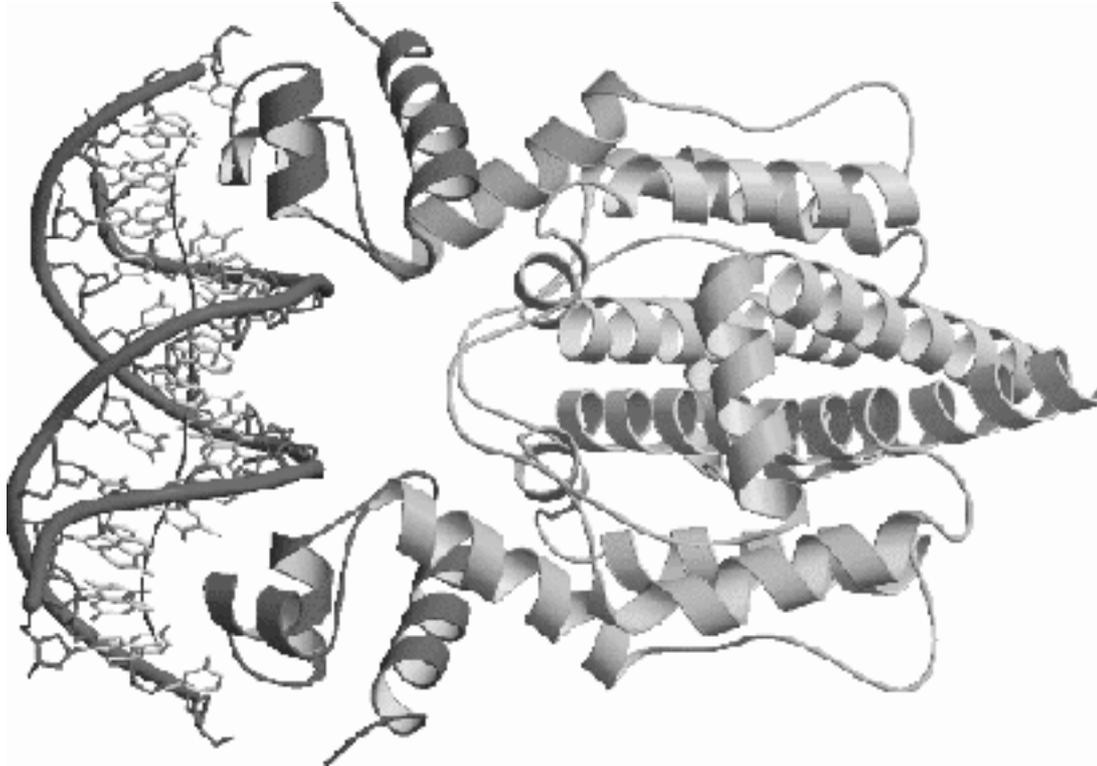


Abb. 5: Schematische Darstellung des Komplexes zwischen dem dimeren TetR der Klasse D und der Operator O1. Die  $\alpha$ -Helices von TetR sind durch Spiralen dargestellt und die O1 DNA ist mit den zugehörigen Basen gezeigt.

### 3.4.5 Induktorbindung

Die Bindung des Tetrazyklins an den Repressor erfolgt als Metallkomplex mit zweiwertigen Kationen [45] im Innern des Proteins. Die Gleichgewichtskonstante für die Bindung dieses Induktor/Repressor-Komplexes von  $10^9 \text{ M}^{-1}$  ist ungewöhnlich hoch [61, 62]. Die Wechselwirkung des Antibiotikums mit dem Repressor kann in hydrophobe und polare Wechselwirkungen unterteilt werden. Jedes Monomer des TetR interagiert sowohl mit dem Tetrazyklin des eigenen Monomers als auch mit dem Tetrazyklin des anderen Monomers. Der Ring D des Tetrazyklins ist von den hydrophoben Aminosäuren Pro105, Arg104 des

einen Monomers und den Seitenketten der Reste Leu170', Leu174' und Met177' des anderen Monomers umgeben (s. Abb. 6). Die Methylgruppe der Position 6 des Rings C bildet einen hydrophoben Kontakt zu Leu131' und zu Ile134' [63]. Die OH-Gruppe der Position 6 steht im Van-der-Waals-Kontakt zu Val113. Im  $[(\text{MgTc})^+]$ -TetR(D)-Komplex ist  $\text{Mg}^{2+}$  oktaedrisch durch die Sauerstoffatome 11 und 12 des Tetrazyklins, sowie durch das Stickstoffatom von His100 und drei Wassermolekülen koordiniert [61]. Zwei der drei Wassermoleküle sind über Wasserstoffbrücken mit Glu147' verbunden. Als möglicher Induktionsmechanismus wurde ein „Schaukelmechanismus“ postuliert. Das C-terminale Ende der  $\alpha$ -Helix 4 bei Induktorbindung würde dabei in den Proteinkern hineingezogen, wodurch sich der N-Terminus, die DNA-Bindungsdomäne, von der Symmetrieachse weg bewegt [63]. Tetrazyklin-Bindung führt zu einer Veränderung des Winkels zwischen den Helices 8 und 10 und den entsprechenden Helices des anderen Monomers. Dies trägt zur Delokalisation der DNA-Bindungsdomäne und somit zur Freisetzung der Operator-DNA bei [64].

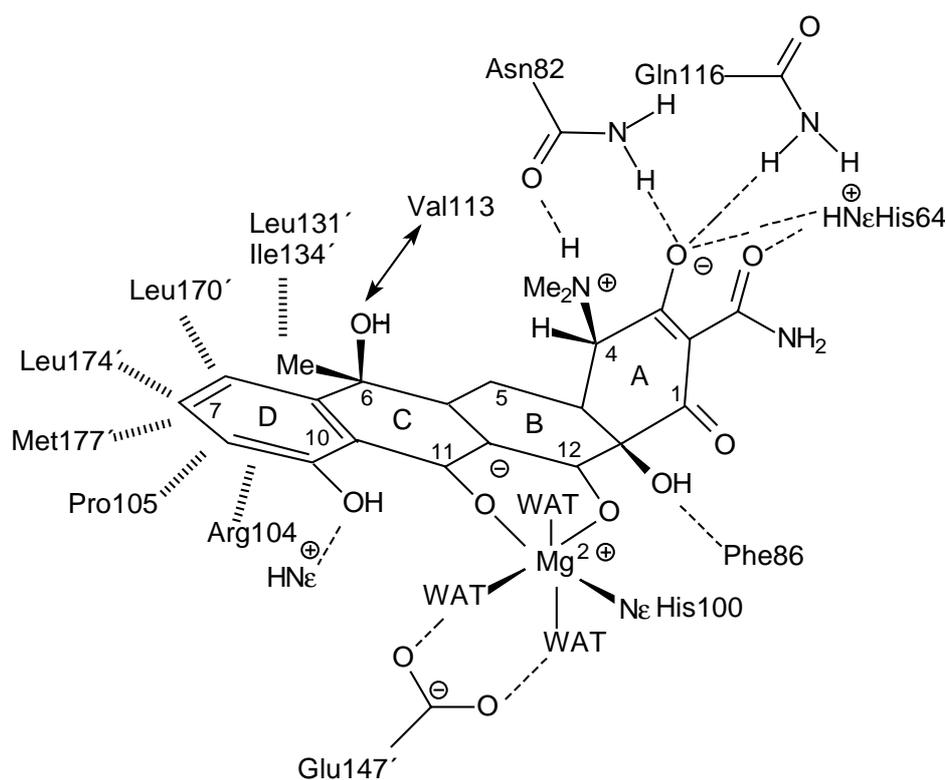


Abb. 6: Wechselwirkung von  $[\text{MgTc}]^+$  mit TetR der Klasse D. Aminosäuren des zweiten TetR-Monomer-Moleküls sind mit (·), Wasserstoffbrückenbindungen durch (- - -) und Van-der-Waals-Kontakte durch (| | |) gekennzeichnet.  $\text{Mg}^{2+}$  ist durch die Sauerstoffatome O11 und O12 von Tc, das His-100-N-Atom und drei Wassermoleküle (WAT) oktaedrisch koordiniert.

### **3.5 Bestimmung von molekularen Wechselwirkungen mit Oberflächenplasmonresonanz**

1983 wurde die Oberflächenplasmonresonanz oder Surface Plasmon Resonance (SPR) entdeckt, eine optische Technik basierend auf Totalreflexion. In den letzten Jahren wurde sie eingesetzt, um markerfrei und einfach makromolekulare Wechselwirkungen zwischen Proteinen [65, 66], Virus und Rezeptor [67] sowie zwischen Protein und DNA [68] zu bestimmen.

Bei der SPR wird die Tatsache ausgenutzt, daß die Energie der Photonen des Lichts auf die Elektronen des Metalls transferiert werden kann. Die Wellenlänge des Lichtes, bei der Kopplung auftritt, ist charakteristisch für das Metall und die Umgebung, die bestrahlt wird. Tritt Resonanz zwischen der Energie der Photonen und den Elektronen der Metalloberfläche auf, erfolgt ein Energieübergang. Dieser Übergang kann durch Messung der Intensität des von der Metalloberfläche reflektierten Lichtes gemessen werden. Die Resonanzwellenlänge wird absorbiert, während das Licht aller anderen Wellenlängen reflektiert wird. Die Kopplung des Lichts in der Metalloberfläche resultiert in der Bildung eines Plasmons, einer Gruppe angeregter Elektronen, die sich wie ein einziges elektrisches Feld verhalten. Das Plasmon seinerseits bildet ein elektrisches Feld mit einer Ausdehnung von 100 nm aus. Jeder Wechsel der chemischen Zusammensetzung in Reichweite des Plasmonenfeldes resultiert in einer Verschiebung der Wellenlänge des Lichts, die absorbiert statt reflektiert wird [69]. Der Winkel des reflektierten Lichts, bei dem SPR beobachtet wird, ist vom Brechungsindex des Mediums in der Nähe der Sensoroberfläche abhängig. Wird ein Protein auf der Sensoroberfläche immobilisiert, so ändert sich der Brechungsindex und damit auch das SPR-Signal, das in RU (Resonanzeinheit) ausgedrückt wird.

In einem BIACORE-Chip wird Gold mit einer 100 nm dicken Schicht von carboxyliertem Dextran modifiziert. Diese hydrophile Oberfläche ist geeignet für die Immobilisierung von Biomakromolekülen wie Proteinen. Zur Immobilisierung der Liganden auf der carboxylierten Dextranoberfläche wird diese mit einem Gemisch aus N-Ethyl-N'-(3-diethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) inkubiert. Die dabei entstandenen NHS-Ester reagieren mit den primären Aminogruppen der Liganden [70].

## 3.6 Aufgabenstellung

Ein grundlegendes Problem der analytischen Chemie ist die Nachweisselektivität vor allem bei niedrigen Konzentrationen und in Gegenwart von interferierenden Substanzen. Viele chemische und physikalische Methoden sind auf teure Geräte wie Gas-, Flüssigkeitschromatographie, Massen- oder Atomabsorptionsspektroskopie angewiesen. Zur Durchführung dieser genauen und sensitiven Techniken werden spezielle Laboratorien benötigt. Zusätzlich können sie keine Aussagen über die Bioverfügbarkeit der Substanz, ihren Effekt auf lebende Systeme, oder ihr synergistisches/antagonistisches Verhalten in komplexen Gemischen treffen. Aus diesen Gründen werden immer häufiger Biosensoren oder Bioassays eingesetzt.

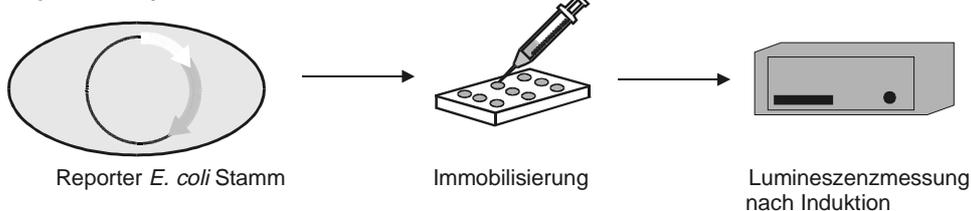
In dieser Arbeit sollte auf der Basis genetischer Regulationselemente ein *in vivo* und ein *in vitro* Assay entwickelt werden. Um den *in vivo* Test zur quantitativen und sensitiven Bestimmung von 4-Chlorbenzoesäure zu verwirklichen, wurde ein Reporterassay verwendet. Dazu wurde ein 1,7 kb großes DNA-Fragment oberhalb des 4-CBA Dehalogenaseoperons von *Arthrobacter* sp. SU durch PCR isoliert. Dieses den putativen Promotor [36] enthaltende Fragment wurde mit dem Luziferaseoperon *luxCDABE* von *Vibrio fischeri* des Plasmids pUCD615 [71] fusioniert [72]. Das so entstandene Plasmid pASU wurde in *E. coli* RFM443 transformiert. Von Rozen *et al.* [72] konnte in Flüssigkultur die Luziferaseproduktion in Abhängigkeit von der Konzentration an 4-CBA gezeigt werden. In dieser Arbeit sollte ein entsprechender Assay mit immobilisierten *E. coli* Zellen etabliert werden, der auch im Feldtest einsetzbar wäre. Zusätzlich zum *E. coli* Wildtyp-Stamm mit unveränderten Membraneigenschaften wurde eine durch UV Behandlung hergestellte Membrantante als Wirt eingesetzt [73]. Nach Optimierung der Immobilisierung sollte die Sensitivität, Selektivität und die minimale Induktionszeit bestimmt, sowie die Möglichkeit zur Lagerung der immobilisierten Zellen untersucht werden. Der Vorteil eines Ganzzellsystems liegt darin, daß die Bioverfügbarkeit einer Substanz bestimmt werden kann. Doch sind hier auch gleichzeitig hinsichtlich der Sensitivität Grenzen gesetzt, da der Analyt von der Zelle aufgenommen werden muß.

Um ein zellunabhängiges System zu entwickeln, sollte ein Assay auf der Grundlage der Analyt/Repressor/DNA-Wechselwirkung außerhalb der Zelle etabliert werden. Da die Regulation des hier entwickelten 4-CBA Assaysystems noch nicht vollständig geklärt ist,

wurde das bekannte Tetrazyklinresistenz-Operon ausgewählt. Die Kenntnis der Funktionsweise der Tetrazyklin-Resistenz in Bakterien sollte zur Entwicklung eines neuen Testsystems ausgenutzt werden. Der Tetrazyklin-Repressor bindet an die Operator-DNA. Ist Tetrazyklin anwesend, wird ein Repressor/Tetrazyklin-Komplex gebildet, der von der DNA abfällt. Diese Dissoziation des Repressors von der DNA sollte im Mikrotiterplatten-Format quantifiziert werden und zur quantitativen Bestimmung von Tetrazyklin führen. Um diesen Assay zu ermöglichen mußten große Mengen Repressor bereitgestellt werden. Dazu sollte der Tetrazyklin-Repressor ohne Tag (TetR) bzw. mit Tag (STetR, TetRS) in einem geeigneten Expressionssystem überexprimiert werden. Die biologische Aktivität dieser Proteine sollte überprüft und ein mögliches Format für den Mikrotiterplatten-Assay mittels Gel-Mobility-Shift Assay vorgeschlagen werden.

Vergleichend zum Mikrotiterplatten-Assay sollte der Vorteil des markerfreien Messens eines optischen Biosensors, wie Oberflächenplasmonresonanz, als Instrument zur Bestimmung von biomolekularen Wechselwirkungen eingesetzt werden. Diese Messungen versprechen durch den Wegfall eines Markers weniger Matrixeffekte und somit einen geringeren Hintergrund und damit höhere Sensitivität. Abb. 7 gibt eine Übersicht der Aufgabenstellung wieder.

**Reporterassay zur Detektion von 4-CBA:**



**Entwicklung eines Repressor/DNA-Bindungstests zur Detektion von Tetrazyklin:**

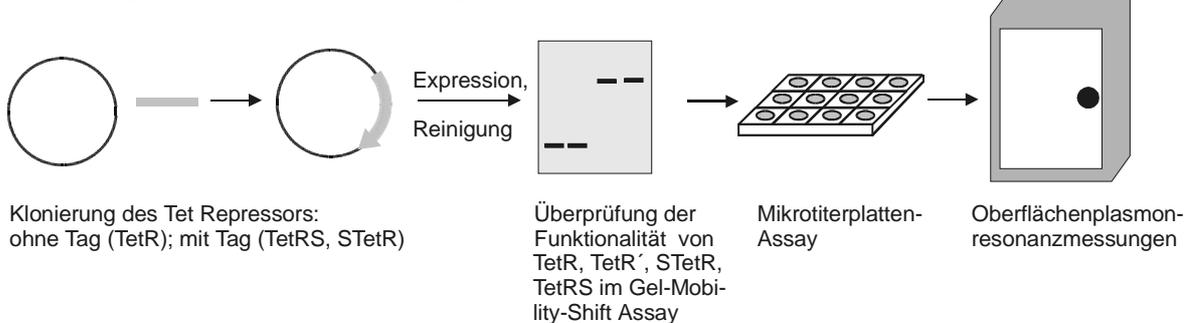


Abb. 7: Schema der Aufgabenstellung

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Stämme

Stamm ( <i>E. coli</i> )	Genotyp	Referenz
JM101	$\Delta(lac-proAB)$ , <i>supE</i> , <i>thi</i> , ( <i>F'</i> , <i>traD36</i> , <i>proAB</i> <sup>+</sup> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> $\Delta$ M15)	[74]
DH5 $\alpha$	F $\Phi$ 80 $\Delta$ lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 <i>deoR</i> <i>recA1</i> , <i>end</i> A1, <i>phoA</i> , <i>hsdR17</i> (rK <sup>-</sup> , mK <sup>*</sup> ) <i>phoA</i> <i>sup</i> E44 $\lambda$ - <i>thi</i> -1 <i>gyrA96</i> <i>rel</i> A1	[75]
RFM443	W3102 Derivat, <i>galK2</i> <i>lac74</i> <i>rpsL200</i>	[76]
UTL2	UT5600-Derivat	[73]

### 4.2 Plasmide

Plasmid	Genotyp/Eigenschaft	Resistenz	Herkunft/Referenz
pCYTEXP1	$\lambda$ -Promotor	Ap <sup>R</sup>	[77]
pASK-IBA-1CA	<i>tet</i> -Promotor	Ap <sup>R</sup>	Institut für Bioanalytik, Göttingen
pASU	<i>fcba::luxCDABE</i>	Kn <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	[72]
pCYTEXP1-TetR	Tetrazyklin-Repressor	Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
pCYTEXP1-STetR	Tetrazyklin-Repressor mit N-terminal fusioniertem Streptag(II)	Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
pCYTEXP1-TetRS	Tetrazyklin-Repressor mit C-terminal fusioniertem Streptag(II)	Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit

### 4.3 Chemikalien und Enzyme

Firma	Chemikalien, Enzyme
ABI, Columbia, USA	Sequencing Kit BigDye/AmpliTaq Terminator
Biolabs, Frankfurt, Deutschland	Restriktionsprotease Faktor Xa
BioRad Laboratories, Richmond, USA	SDS-PAGE-Standard (Low molecular weight)
Boehringer Mannheim, Deutschland	T4 DNA-Ligase, Restriktionsendonukleasen,
Calbiochem, San Diego, USA	Streptavidin Peroxidase Konjugat
DIFCO-Laboratories, Detroit, USA	Trypton
Fluka Chemie, Buchs, Schweiz	Agar, Ampizillin (Na-Salz), Bromphenolblau, CaCl <sub>2</sub> , Coomassie Brilliant Blue R-250, DMSO, EDTA, Ethanol, Hefe-Extrakt, NaCl, PEG 6000, SDS, Tris-(hydroxymethyl)aminomethan, Natrium- dihydrogenphosphat, Dinatriumhydrogenphosphat,

Firma	Chemikalien, Enzyme
Fluka Chemie, Buchs, Schweiz	Lysozym, Lysin, Tetramethylbenzidin, Tetrazklin•HCl, Kanamycin, HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethan-sulfonsäure)
Gibco BRL GmbH, Eggenstein, Deutschland	DNTP, 1 Kb-Ladder (Standard für Agarosegele)
Hewlett Packard/GSG, Karlsruhe, Deutschland	Sinapinsäure, Proteinmischung zur Kalibrierung (0,2 µM Cytochrom C, 0,4 µM Myoglobin, 2,85 µM BSA)
IBA, Göttingen, Deutschland	Streptavidin Peroxidase Konjugat, Streptactinsepharose
Lancaster, Mühlheim, Deutschland	4-Brombenzoborsäure, Natriumluminol
MBI Fermentas, St Leon-Roth, Deutschland	PCR: Puffer, MgCl <sub>2</sub> , Taq-Polymerase Restriktionsendonukleasen
Merck, Darmstadt, Deutschland	4-Chlorbenzoesäure, 4-Bromaldehyd, 2-Brombenzoesäure, Bromessigsäure, 3-Bromphenol, 2-Fluorbenzoesäure, 4-Fluorbenzoesäure, 4-Fluorphenol, Fluoressigsäure, 4-Chlorbenzaldehyd, Natriumsalz der Iodessigsäure, 2-Iodbenzoesäure, 4-Iodbenzoesäure, 4-Fluorbenzaldehyd, 4-Hydroxybenzoesäure, Eisessig
Pharmacia LKB, Freiburg, Deutschland	Ultrapure dNTP-Set
PIERCE, Rockford, USA	ImmunoPure® Avidin β-Galactosidase Konjugat
Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland	Spin-Mini-Plasmid-Präparations-Kit, Midi-Plasmid-Präparations-Kit, Gelextraktions-Kit
Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland	Glycin
Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	Rotiphorese® NF-10x TBE-Puffer Rotiphorese® NF-Harnstoff Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 40% (19:1)
Serva Feinbiochemika GmbH, Heidelberg, Deutschland	Agarose
Sigma Chemie GMBH, Deisenhofen	D-Desthiobiotin, HABA (4-Hydroxyazabenzene-2-carboxylsäure), Rinderalbumin, Albumin aus Hühnererei, Casein, Natriumsalz der Rindermilch, Casein aus Rindermilch, Magermilchpulver, Gelatine von Kaltwasserfischhaut, Gelatine von Rinderhaut, IPTG, Monoklonales Anti-Biotin Peroxidase Konjugat, Natriumalginat, Rinderserum, Fischsperma
Shinetsu, Tokyo, Japan	DNA Silikon

## 4.4 Geräte

Verwendungszweck	Gerätebezeichnung	Firma
PCR	Eppendorf Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrotiterplattenwascher	Titertek Microplate Washer M96V Flow	ICN, Eschwege, Deutschland

Verwendungszweck	Gerätebezeichnung	Firma
Lumineszenzmessung	Lumistar	BMG, Offenburg, Deutschland
Fluoreszenzmessung	Fluostar	BMG, Offenburg, Deutschland
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Photometer	Ultrospec® 3000 UV/Vis	Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Waagen	Basic	Sartorius, Göttingen, Deutschland
	MC Research RC 210 D	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Schüttler	HT	Infors AG, Basel, Schweiz
Zentrifugen	Centrifuge 5417 C, 5403, 5415	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed C;	DuPont Instruments, Leipzig, Deutschland
	Sorvall® GSA Rotor	
	Sorvall® SA-600 Rotor	
	Universal 30F	
	KR22i; Rotor: AK 500-11	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Brutschränke	WTE	Jouan, Unterhaching, Deutschland
	UM 500	Binder, Tuttlingen, Deutschland
pH-Meter	Digital pH-Meter pH 500	Memmert, Schwabach, Deutschland
Thermomixer	Thermomixer 5436	WTW, Weilheim, Deutschland
DNA Sequenzierer	373A DNA Sequencer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
		Applied Biosystems, Frankfurt, Deutschland
Ultraschallgerät	Sonifier 250	Branson, Danbury, USA
DNA-Elektrophorese	DNA Sub Cell™, Mini Sub™	BioRad, München, Deutschland
	DNA Cell, Mini Sub™	
	Cell GT	
	Video Copy Processor P66E	Mitsubishi, Cambridge, USA
	BWM 9X Monitor	Javelin Electronics, Schaumburg, USA
	UV-Leuchttisch	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
PAGE	Minigel-Twin G42	Biometra®, Göttingen, Deutschland
	Model 583 Gel Dryer	BioRad, München, Deutschland
	Power Pac 3000, Power Pac 300, Model 200/2.0 Power Supply	BioRad, München, Deutschland
Western-Blot	Trans-Blot® SD, Semidry transfer cell	BioRad, München Deutschland
	491 Protein sequencer, Proci-se™ Protein Sequencer	Applied Biosystems, Frankfurt, Deutschland
	785 Programmable Absorbance Detector	Applied Biosystems, Frankfurt, Deutschland
	140 C Microgradient System	Applied Biosystems, Frankfurt, Deutschland
Phosphoimager	Storm850	Molecular Dynamics GmbH, Krefeld, Deutschland
Oberflächenplasmonresonanz	BIACORE 3000	Biacore, Freiburg, Deutschland
MALDI-TOF	HP G2025 A MALDI-TOF MS System	Hewlett Packard/GSG, Karlsruhe, Deutschland

## 4.5 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Firma
Combitip	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Fluoro Nunc Maxisorp Mikrotiterplatten: weiß, farblos	Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
Mikrotiterplatten: farblos	Greiner, Fredensborg, Dänemark
Transfermembran (PVDF)	BioRad, München, Deutschland
Quarzglasküvetten	Hellma, Mühlheim, Deutschland
SA-Chip	Biacore, Freiburg, Deutschland

## 4.6 Primer

Name	Sequenz 5' → 3'	Modifikation	Firma
<b><u>Gel-Mobility-Shift Assay:</u></b>			
TR1	CGC CAG CAA CGC GGC		Interactiva
TR4	TAT TTT ACC ACT CCC		Interactiva
B-TR1	CGC CAG CAA CGC GGC	5' Biotin	Interactiva
B-TR2	CCT CGA GGG ATC CCC	5' Biotin	Interactiva
B-TR5	CGC ACA ATG TGC GCC	5' Biotin	Interactiva
Cy5-TR1	CGC CAG CAA CGC GGC	5' Cy5	ARK
Cy5-TR2	CCT CGA GGG ATC CCC	5' Cy5	ARK
Cy5-TR3	GTG GTA AAA TAA CTC	5' Cy5	ARK
Cy5-TR4	TAT TTT ACC ACT CCC	5' Cy5	Interactiva
O2-Cy5	TAC CAC TCC CTA TCA GTG ATA GAG AAA AGT GAA ATG	5' Cy5	Interactiva
O1	GCG GCA TAT GTA TTT TAC CAC TCC CTA TC		ARK
O1-Cy5	GCG GCA TAT GTA TTT TAC CAC TCC CTA TC	5' Cy5	ARK
O2	CGG CGC AAG CTT AAC CAC CGA ACT GCG GGT G		ARK
<b><u>BIACORE:</u></b>			
O2B	TAC CAC TCC CTA TCA GTG ATA GAG AAA AGT GAA ATG	5' Biotin	Interactiva
O2comp	CAT TTC ACT TTT CTC TAT CAC TGA TAG GGA GTG GTA		Interactiva
Kont1	GTT ACA TCG ACA TGG		Interactiva
KontB	TGA CCG GCG TCA ATA	5' Biotin	Interactiva
<b><u>Klonierungen:</u></b>			
N1	CGG CCT TGA ATT GAT AAT ATG CGG ATT AGA AAA AC		ARK
N2	GTT TTT CTA ATC CGC ATA TTA TCA ATT CAA GGC CG		ARK
T1	CGG CGG ATC CAT GAT GTC TCG TTT AG		ARK
T2	GCG CGA ATT CTT AAG ACC CAC TTT C		ARK

Name	Sequenz 5'→3'	Modifikation	Firma
TS	CGC GAA TTC TTA TTT TTC GAA CTG CGG GTG GCT CCA GAT TTC GCC ACG AGA CCC ACT TTC ACA TTT AAG TTG		ARK
TSN	CGG CGG ATC CAT GTG GAG CCA CCC GCA GTT CGA AAA AAT CGA AGG CAG GAT GTC TCG TTT AGA TAA AAG		ARK
TSC	CGG CGA ATT CTT ATT TTT CGA ACT GCG GGT GGC TCC AAG ACC CAC TTT CAC ATT TAA G		ARK
<b>Sequenzierungen:</b>			
SDM 1	CCA ACA CTA CTA CGT TTT AAC TG		ARK
SDM 3	GCG AAC GCC AGC AAG ACG TAG CCC		ARK

Interactiva, Ulm, Deutschland

ARK Scientific GmbH Biosystems, Darmstadt, Deutschland

## 4.7 Medien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Puffer, Lösungen und Medien mit deionisiertem Wasser angesetzt. Anschließend wurden steril benötigte Lösungen im Autoklaven sterilisiert und hitzelabile Lösungen sterilfiltriert.

### 4.7.1 LB-Medium

LB-Medium:            10 g Trypton  
                             5 g Hefeextrakt  
                             5 g NaCl  
                             ad 1 l H<sub>2</sub>O

Für Nährböden wurden 15 g/l Agar zugegeben.

Medienzusätze:

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampizillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	40 mg/ml	40 µg/ml

## **4.8 Stammhaltung und Bakterienanzucht**

### **4.8.1 Stammhaltung**

Für die Herstellung von *E. coli* Dauerkulturen wurden 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. 1 ml dieser Kultur wurde mit 1 ml Glycerin gemischt und bei - 80 °C bis zu mehreren Jahren gelagert.

### **4.8.2 Bakterienanzucht**

Ausgehend von einer Glycerinkultur oder von einer Einzelkultur wurden 3 ml Selektivmedium angeimpft und über Nacht bei entsprechender Temperatur inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurden die Hauptkulturen 1:1000 angeimpft und im Schüttelinkubator bei 37 °C bis zur gewünschten Zelldichte kultiviert. Das Wachstum wurde photometrisch bei OD<sub>578 nm</sub> verfolgt.

### **4.8.3 Kultivierung der Zellen für die Immobilisierung**

Vorkulturen von RFM443(pASU) und UTL2(pASU) mit Luziferase als Reportergen wurden 1:1000 überimpft und bei 30 °C kultiviert. Bei einer OD<sub>578</sub> von 1,0 wurden die Zellen, falls nicht anders angegeben, abzentrifugiert und zur Immobilisierung eingesetzt.

## 4.9 Proteinanalytische Methoden

### 4.9.1 Induktion des $\lambda$ -Promotors [77]

Übernachtskulturen von *E. coli* JM101, die mit einem pCYTEXP1 Derivat transformiert worden waren, wurden verwendet um LB-Selektivmedium 1:1000 anzuimpfen. Die Kultur wurde bei 37 °C bis zu einer OD<sub>578</sub> von 1,0 kultiviert. Darauf wurde sie 3 Stunden bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen. Die Zellen wurden abzentrifugiert und 1 g Zellen in 6 ml Puffer W (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit Ultraschall auf Eis aufgeschlossen und das Rohextrakt zur Entfernung von Zellresten abzentrifugiert.

### 4.9.2 Proteinbestimmung des Tetrazyklin-Repressors [78]

Die Konzentration des gereinigten TetR wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von 38 000 cm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup> bestimmt.

### 4.9.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese [79]

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Gellösung-Zusammensetzungen sind aufgeführt.

#### 12,5 % Trenngel

3,33 ml 30 % (M/V) Acrylamidlösung  
(30:0,8)  
2 ml Lower Tris (4 x)  
2,67 ml H<sub>2</sub>O  
4 µl TEMED  
40 µl 10 % (M/V) APS

#### 5 x Auftragspuffer für SDS-PAGE

320 mM Tris/HCl pH 6,8  
50 % (M/V) Glycerin  
10 % (M/V) SDS  
25 % (M/V) β-Mercaptoethanol  
0,1 % (M/V) Bromphenolblau

#### 12,5 % Sammelgel

0,52 ml 30 % (M/V) Acrylamidlösung  
(30:0,8)  
1 ml Upper Tris (4 x)  
2,47 ml H<sub>2</sub>O  
4 µl TEMED  
40 µl 10 % (M/V) APS

#### SDS-PAGE-Elektrodenpuffer

15 g Tris  
72 g Glycin  
10 % (M/V) SDS  
ad 1 l H<sub>2</sub>O  
pH 8,3

**Lower Tris (4 x)**

36,46 g Tris  
0,8 g SDS  
ad 200 ml H<sub>2</sub>O  
pH 8,8

**Coomassie-Färbelösung**

2,5 g Coomassie-Brilliant Blue R-250  
42,5 % (V/V) Ethanol  
5 % (V/V) Methanol  
10 % (V/V) Eisessig

**Upper Tris (4 x)**

12,11 g Tris  
0,8 g SDS  
ad 200 ml H<sub>2</sub>O  
pH 6,8

**Entfärbelösung**

40 % (V/V) Methanol  
10 % (V/V) Eisessig  
50 % (V/V) H<sub>2</sub>O

#### 4.9.4 Proteinblotting für die N-terminale Sequenzierung

Mit den Proben, die zur Proteinsequenzierung bestimmt waren, erfolgte eine elektrophoretische Trennung durch SDS-PAGE. Das Gel wurde nach der Elektrophorese 15 min in Kathodenpuffer inkubiert. 3 Filterpapiere und die PVDF-Membran wurden auf Größe des Gels zurecht geschnitten. Filterpapier 1 wurde 10 min in Anoden-Puffer 1, Filterpapier 2 in Anoden-Puffer 2 und Filterpapier 3 in Kathoden-Puffer gelegt. Die PVDF-Membran wurde einige Sekunden in 100 % Methanol getaucht, bevor sie 3 min in Anoden-Puffer 2 inkubiert wurde. Von der Anode zur Kathode wurden Filterpapier 1 bis 2, die PVDF-Membran, das Gel und Filterpapier 3 übereinander gelegt. Die Blotzeit betrug 20 min bei 15 V. Die Färbung der PVDF-Membran erfolgte 5 min durch Coomassie-Färbelösung und darauf folgte die vierstündige Entfärbung mit Entfärbelösung. Nach dem Waschen mit Wasser wurde die gewünschte Bande des Blots ausgeschnitten und mit einem Gasphasensequenzierautomaten analysiert. Die Aminosäurezusammensetzung wurde mit einem Aminosäureanalysator nach Instruktionen des Herstellers bestimmt.

**Anoden-Puffer 1**

0,3 M Tris  
10 % (V/V) Methanol  
pH 10,4

**Anoden-Puffer 2**

25 mM Tris  
10 % (V/V) Methanol  
pH 10,4

**Kathoden-Puffer**

25 mM Tris  
40 mM 6-Aminocaprinsäure  
10 % (V/V) Methanol  
pH 9,4

**PVDF Membran-Färbelösung**

0,025 % (M/V) Coomassie Brilliant Blue R-250  
40 % (V/V) Methanol

**PVDF Membran-Entfärbelösung**

50 % (V/V) Methanol

### 4.9.5 Reinigung des mit einem Streptag(II) fusionierten TetR

Um die Proteinreinigung zu vereinfachen, wurde der native Tetrazyklin-Repressor am C-Terminus (TetRS) oder am N-Terminus mit einem Streptag(II) (STetR) versehen. Streptactin bindet mit sehr hoher Affinität Proteine, die diesen Tag besitzen. Durch Zugabe von Desthiobiotin kann das gebundene Protein von einer Streptactinmatrix eluiert werden. Aus dem Rohextrakt der aufgeschlossenen *E. coli* JM101 Zellen, die das Plasmid pCYTEXP1-TetRS oder pCYTEXP1-STetR enthielten, wurde das Protein STetR bzw. TetRS gereinigt. Die Reinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers (Institut für Bioanalytik, Göttingen) mit der Abwandlung, daß das Protein mittels Batchchromatographie gereinigt wurde.

### 4.9.6 Faktor Xa Spaltung

Um den N-terminalen Streptag(II) von STetR abzuspalten wurden 1 mg gereinigtes STetR Protein mit 20 µl 10 x Puffer (1 M NaCl, 40 mM CaCl<sub>2</sub>) und 5 µg Faktor Xa in einem Volumen von 200 µl 5 h bei 23 °C verdaut. Für Oberflächenplasmonresonanz-Messungen wurde das Protein STetR nach dem Faktor Xa Verdau über eine Sephadex-Säule Q10 gereinigt, die mit 50 mM Tris/HCl pH 7,4, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA äquilibriert wurde. Dieser Puffer fand auch bei Elution des Proteins Verwendung, das in 1 ml Fraktionen gesammelt wurde.

### 4.9.7 Bestimmung von Enzymaktivitäten

#### 4.9.7.1 Peroxidase-Aktivität colorimetrisch [80]

Um die Peroxidaseaktivität colorimetrisch zu bestimmen, wurden je Kavität der Mikrotiterplatte 250 µl TMB-Substratlösung pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde die Reaktion mit 100 µl 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und die Absorption bei 450 nm im Fluostar gemessen.

**TMB-Stammlösung**

60 mg TMB  
10 ml DMSO

**0,1 M Acetatpuffer**

0,82 g Natriumacetat  
10 % Zitronensäure pH 5,5

**TMB-Substratlösung**

400 µl TMB-Stammlösung  
25 ml 0,1 M Acetatpuffer pH 5,5  
100 µl 1% (V/V) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

## Geräteeinstellungen Fluostar:

Modus: Well  
Verstärkung: 13  
Intervallzeit: 0,4 s  
Zahl der Blitze: 20

$\lambda_{\text{ex}}$ : 450 nm  
 $\lambda_{\text{em}}$ : Leer  
Platte: Nunc Maxisorp

**4.9.7.2 Peroxidase-Aktivität luminometrisch [81]**

Die Aktivität der Peroxidase-Konjugate wurde luminometrisch bestimmt, indem ein Luminolmix aus 9 ml Luminol-Reagenz und 1 ml Brombenzoborsäure-Reagenz hergestellt wurde. Von diesem Luminolmix wurden 100 µl in jede Kavität der weißen Mikrotiterplatte mit der im Lumistar vorhandenen Pumpe gespritzt. Die Lumineszenz wurde gemessen und in RLU (relative Lichteinheiten) angegeben.

**Luminol-Reagenz**

12,5 mg Natriumluminol  
50 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8,6  
15,5 µl 30 % (V/V) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Brombenzoborsäure-Reagenz**

15,44 mg 4-Bromphenolborsäure  
100 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8,6

## Geräteeinstellungen Lumistar:

Modus: Plate  
Verstärkung: 125  
Meßzeit/Kavität: 4 s  
Zyklenzahl: 8

Zykluszeit: 500 s  
Substrateinspritzung: Zyklus 2  
Platte: Nunc Maxisorp

**4.9.7.3 Luziferase-Aktivität**

In Mikrotiterplatten immobilisierte Zellen von RFM443(pASU) und UTL2(pASU) enthielten Luziferase als Reportergen. Die Expression dieser Luziferase wurde von einem 4-CBA induzierbaren Promotor kontrolliert. Deshalb konnte durch Zugabe von 10 µl 4-CBA (in 1 M NaOH gelöst und pH 7 mit Essigsäure eingestellt) die Expression der Luziferase induziert werden. Danach erfolgte sofort die Lumineszenzmessung im Lumistar bei 26 °C mit den Einstellungen:

---

Geräteeinstellungen Lumistar:			
Modus:	Slow	Meßzeit/Kavität:	5 s
Verstärkung:	100	Schütteln:	15 s
Zykluszeit:	999 oder 900 s	Platte:	Nunc Maxisorp
Zyklen:	25 – 50		

Wurde mit anderen Analyten (ebenfalls in 1 M NaOH gelöst und pH 7 mit Essigsäure eingestellt) als 4-CBA induziert, erfolgte die Inkubation der Zellen in einem Schüttelinkubator bei 26 °C. UTL2(pASU) wurde 130 min und RFM443(pASU) 180 min induziert, bevor die Lumineszenz gemessen wurde. Die Aktivitäten wurden in RLU (relative Lichteinheiten) angegeben.

### 4.9.8 Molmassenbestimmung mit MALDI-TOF

Für die MALDI-TOF MS-Bestimmung wurden die Proteinproben (ca. 10 µM) TetRS und STetR mit Sinapinsäure im Verhältnis 1:1 oder 1:10 gemischt. 1 µl dieser Mischung wurde auf das Proben target aufgegeben und sofort mit Vakuum die Kristallisation eingeleitet. Für alle Massenbestimmungen wurde das Spektrometer durch externe Massenkalisierung mit einer Proteinmischung aus Cytochrom C, Myoglobin und BSA kalibriert. Für die massenspektroskopischen Bestimmungen wurden die Meßparameter für UV-Laserwellenlänge, Laserenergie, Beschleunigungsspannung und Detektionsempfindlichkeit, wie vom Hersteller empfohlen, verwendet.

## 4.10 Molekulargenetische Methoden

### 4.10.1 DNA-Isolierung

#### 4.10.1.1 Plasmidschnellisolierung

Für Untersuchungen von Plasmid-DNA, z.B für Restriktionsanalysen, wurde die Plasmidschnellisolierung zur Plasmid isolation eingesetzt. Die Zellen einer 3 ml Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation geerntet und in 250 µl Resuspensionspuffer aufgenommen.

men. Danach erfolgte die alkalische Lyse mit 250 µl Lysepuffer. Durch 250 µl Neutralisationslösung wurde die Lösung neutralisiert. Durch Zentrifugation erfolgte die Abtrennung der Zelltrümmer. Die im Überstand der Lösung enthaltene Plasmid-DNA wurde mit Isopropanol gefällt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet getrocknet.

**Resuspensionspuffer**

10 mM Tris/HCl pH 7,5  
10 mM EDTA  
400 µg/ml RNaseI

**Lysepuffer**

0,2 M NaOH  
1 % (M/V) SDS

**Neutralisationslösung**

3 M KAc  
11,5 ml Eisessig  
ad 100 ml H<sub>2</sub>O

#### 4.10.1.2 Plasmid isolation mit QIAprep Spin oder Midi Plasmid Purification Kit

Der QIAprep Spin Purification Kit diente der Isolierung sehr sauberer Plasmid-DNA wie sie für Sequenzierungsreaktionen benötigt werden. Aus 3 ml einer Übernachtskultur wurden nach Angaben des Herstellers Qiagen Plasmid-DNA isoliert. Für größere Mengen Plasmid DNA wurden aus 50 ml einer Übernachtskultur mittels Midi Plasmid Purification Kit, wie im Protokoll des Herstellers Qiagen beschrieben, Plasmid-DNA isoliert.

#### 4.10.2 Reinigung von PCR-Fragmenten

PCR-Fragmente wurden nach Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Gel-Extraktions-Kit von QIAGEN gereinigt. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

#### 4.10.3 Quantitative Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Die DNA-Konzentration wurde durch Messung der Absorption einer DNA-Lösung bei 260 nm bestimmt. Dabei entspricht eine OD von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

## 4.10.4 Enzymatische Behandlung von DNA

### 4.10.4.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Zur Restriktionsanalyse wurden 0,2-0,5 µg DNA in einem Volumen von 10 µl mit dem vom Hersteller mitgelieferten 10 x Reaktionspuffer und 1 U Restriktionsenzym 1-2 h bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Nach der Spaltung wurde der Ansatz mit 2 µl Auftragspuffer für die DNA-Elektrophorese versetzt und durch Agarosegelelektrophorese analysiert. Für präparative Ansätze zur Isolierung einzelner DNA-Fragmente aus dem Gel wurde 1-2 µg DNA in bis zu 150 µl für 3 h mit 2 U Enzym verdaut.

### 4.10.4.2 Ligation

Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10 µl. Ein 3:1 molares Verhältnis von Insert- und Vektor-DNA wurden mit 1 µl 10 x Ligasepuffer, 2 µl PEG 6000 und 1 µl T4-Ligase (1 U) versetzt. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

## 4.10.5 Klonierung von pCYTEXP1-TetR, pCYTEXP1-STetR und pCYTEXP1-TetRS

Als Quelle für den Tet Repressor diente das Plasmid pASK-IBA-1CA, aus dem das Tetrazyklin-Repressorgen durch PCR isoliert wurde. Hierfür wurde das native Tet Repressorgen mit dem Primer T1, der eine *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle enthielt und T2 mit einer *Eco*RI-Restriktionsstelle herausamplifiziert. Um eine spätere Aufreinigung zu erleichtern, wurde mittels PCR die Sequenz des nativen Tet Repressors am 5'-Ende mit der Streptag(II) kodierenden Sequenz fusioniert. Zusätzlich wurde zwischen die Streptag(II)-Sequenz und die *tetR* Sequenz eine Protease-Restriktionsschnittstelle (Faktor Xa) eingeführt, die ein späteres Abspalten des Tags ermöglichen sollte. Dieses Gen wurde mittels den Primern TSN mit *Bam*HI Restriktionsstelle und T2 aus pASK-IBA-1CA herausamplifiziert und *stetR* genannt. Zum Vergleich wurde auch ein 3. Gen hergestellt, bei dem am 3'-Ende eine Streptag(II) kodierende Sequenz eingeführt wurde. Hierfür wurden die Pri-

mer T1 und TSC mit *EcoRI* Schnittstelle verwendet und das entstehende Fragment *tetRs* genannt. Die drei erhaltenen PCR-Produkte wurden nach Gelextraktion *BamHI* und *EcoRI* verdaut und nochmals durch Gelextraktion aufgereinigt. Die *BamHI* und *EcoRI* verdauten PCR-Produkte wurden in den ebenfalls *BamHI*, *EcoRI* verdauten Vektor pCYTEXP1 kloniert und in den *E. coli*-Stamm JM101 transformiert. Der Vektor pCYTEXP1 enthält den hitzeinduzierbaren  $\lambda$ -Promotor, der die Expression der Tet Repressoren kontrolliert. Die Tab. 3 gibt die verwendeten Primer und Größe der PCR-Produkte an.

Tab. 3: Für die Amplifikation der Fragmente *tetR*, *stetR*, *tetRs* benötigten Primer

Primer 1 5' → 3'	Primer 2 5' → 3'	Produkt/ Größe (bp)
T1 ( <i>BamHI</i> ): CGGGCGGATCCATGATGTCTCGTT TAG	T2 ( <i>EcoRI</i> ): GCGCGAATTCTTAAGACCAACTTTC	<i>tetR</i> / 648
TSN ( <i>BamHI</i> , Faktor Xa Restriktions- schnittstelle, <u>Streptag(II)-Sequenz</u> ): CGGCGGATCCATGTGGAGCCACCC GCAGTTCGAAAAAATCGAAGGCA GGATGTCTCGTTTAGATAAAAG	T2 ( <i>EcoRI</i> ): GCGCGAATTCTTAAGACCAACTTTC	<i>stetR</i> / 683
T1 ( <i>BamHI</i> ): CGGGCGGATCCATGATGTCTCGTT TAG	TSC ( <u>Streptag(II)-Sequenz</u> , <i>EcoRI</i> ): CGGCGAATTCTTATTTTTTCGAACTG CGGGTGGCTCCAAGACCCACTTTC ACATTTAAG	<i>tetRs</i> / 673

#### 4.10.6 Hybridisierung von Oligonukleotiden [82]

Zur Herstellung eines 36 bp O2 Operatorfragmentes wurden 20  $\mu$ l 100 pmol Oligo O2B und 20  $\mu$ l 100 pmol Oligo O2compl in 310  $\mu$ l Hybridisierungspuffer (1 M NaCl, 10 mM Phosphatpuffer pH 7,6, 0,1 mM EDTA) im Wasserbad auf 95 °C 10 min erhitzt und langsam abgekühlt.

## **4.10.7 Transfer von DNA in *E. coli***

### **4.10.7.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen [83]**

50 ml LB-Medium wurden mit einer Vorkultur von *E. coli* DH5 $\alpha$  oder JM101 1:1000 angeimpft. Diese Kultur wurde im Schüttelkolben bei 37 °C bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,4-0,7 geschüttelt und abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 2 ml eiskaltem TSS resuspendiert und nach 15 min Inkubation auf Eis sofort zur Transformation eingesetzt. Kompetente Zellen wurden stets frisch hergestellt.

**TSS**  
10 g PEG 6000  
5 ml DMSO  
5 ml 1 M MgCl<sub>2</sub>  
ad 100 ml LB-Medium

### **4.10.7.2 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA**

Jeweils 50-100 ng DNA in 10  $\mu$ l wurden zu 200  $\mu$ l kompetenter Zellen gegeben, vorsichtig gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Nun wurde der gesamte Ansatz für 30-40 s bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen. Unmittelbar danach erfolgte die Zugabe von 0,8 ml LB-Medium und eine Inkubation von 1 h bei 37 °C im Schüttelinkubator. Auf Selektivagar ausplattiert, erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C.

## **4.10.8 DNA-Gelelektrophorese**

### **4.10.8.1 Agarose-Gelelektrophorese [84]**

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte je nach Größe der zu trennenden Fragmente in Gelen mit einem Agarosegehalt von 1-2 % in 1 x TAE Puffer und 0,05 % (V/V) Ethidiumbromid. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Auftragspuffer versetzt und bei 120 mV 30 min im elektrischen Feld aufgetrennt. Als Molekulargewichtstandard diente 1 Kb-Ladder von Life Technologies.

<b>1 x TE</b> 10 mM Tris/HCl pH 8,0 0,1 mM EDTA	<b>50 x TAE</b> 242 g Tris/HCl pH 8,0 100 ml 0,5 M EDTA 57,1 g Eisessig ad 1 l H <sub>2</sub> O
---	---

**6 x Auftragspuffer DNA-Elektrophorese**  
30 % (M/V) Glycerin  
0,2 % (M/V) Bromphenolblau  
25 mM EDTA pH 7,5

#### 4.10.8.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese [85]

Die Auftrennung der Gel-Mobility-Shift Assays erfolgte in 6 % nativen Polyacrylamidgelen mit vertikalen Elektrophoresekammern.

<b>6 % Polyacrylamidgel</b> 4 ml 30 % Acrylamidlösung (30:0,8) 0,4 ml 50 x TAE 15,4 ml H <sub>2</sub> O 0,2 ml 10 % (M/V) APS 10 µl TEMED	<b>Gel-Mobility-Shift Assay Puffer</b> 50 mM Tris/HCl pH 7,5 250 mM KCl 250 µg/ml BSA 25 µg/ml Fischsperma-DNA 25 % (M/V) Glycerin 1 mM MnCl <sub>2</sub>
--	---

**5 x Auftragspuffer für native PAGE**  
wie für SDS-PAGE, ohne SDS und β-Mercaptoethanol

#### 4.10.8.3 Gel-Mobility-Shift Assay [86, 87]

Interaktionen von Proteinen und DNA können durch verminderte elektrophoretische Mobilität der Protein/DNA-Komplexe gegenüber freier DNA in Polyacrylamidgelen beobachtet werden.

Mit Hilfe einer PCR-Reaktion mittels Cy5 markierten Primern wurden DNA-Fragmente an ihren Enden fluoreszenzmarkiert. Anschließend wurde das gewünschte DNA-Fragment über Agarose-Gelelektrophorese isoliert und nach Ausschneiden der entsprechenden Bande mit dem Gelextraktions-Kit von Qiagen gereinigt. Durch eine Verdünnungsreihe der DNA (1:5, 1:10, 1:25), von der 1 µl des Verdünnungsschrittes zur Elektrophorese eingesetzt wurde, ließ sich die optimale DNA-Konzentration für die Gel-Mobility-Shift Assays für weitere Versuche bestimmen. Für Experimente zur Untersuchung der Bindung des Proteins an die DNA, wurden in einem 10 µl Ansatz 1 µl markiertes DNA-Fragment (ca. 1 ng) mit

2  $\mu\text{l}$  Gel-Mobility-Shift Assay Puffer, 1  $\mu\text{l}$  10 mM  $\text{MnCl}_2$  und 1-4  $\mu\text{l}$  Proteinlösung (ca. 0,5-50 ng) in gewünschter Verdünnung in der entsprechenden Menge  $\text{H}_2\text{O}$  für 45 min im Dunkeln inkubiert. Für die Dissoziation des DNA/Protein-Komplexes wurden einem 8  $\mu\text{l}$  Ansatz mit an die DNA gebundenem Protein 2  $\mu\text{l}$  Tetrazyklin in 50 mM Tris/HCl pH 7, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  zugefügt und weitere 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. In eine Tasche des Polyacrylamidgels wurden 2  $\mu\text{l}$  blauer Auftragspuffer für native PAGE als Referenz pipettiert, um den Fortschritt der Elektrophorese zu beobachten. In die anderen Spuren wurde das gesamte Volumen des Gel-Mobility-Shift Assays aufgetragen. Nach dem Lauf (22 mA, 1,5 h) wurde das Gel in einem Phosphoimager analysiert.

Protokoll für die PCR für Cy5 Markierung von DNA

Wiederholung des Programmschrittes	Denaturierung	DNA-Annealing	Elongation/DNA-Synthese
1	95 °C, 7 min		
30	95 °C, 1 min	58 °C, 1,5 min	72 °C, 1 min
1			72 °C, 7 min

#### 4.10.9 Polymerase-Ketten-Reaktion [88]

Zur Amplifikation von DNA-Sequenzen wurde die PCR (Polymerase Chain Reaction) eingesetzt. In einem Endvolumen von 100  $\mu\text{l}$  wurden 10  $\mu\text{l}$  10 x PCR-Reaktionspuffer, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , ca. 50 ng Template DNA, 100 pmol jedes Primers, 0,2 mM dNTP, 1  $\mu\text{l}$  Taq-Polymerase (2 U) und die entsprechende Menge  $\text{H}_2\text{O}$  gemischt und die PCR-Reaktion in einem Thermocycler von Eppendorf durchgeführt.

Protokoll für PCR-Reaktionen

Wiederholung des Programmschrittes	Denaturierung	DNA-Annealing	Elongation/DNA-Synthese
1	95 °C, 7 min		
25-33	95 °C, 1-1,5 min	56-58, 5 °C, 1,5-3 min	72 °C, 1-1,5 min
1			72 °C, 7 min

#### 4.10.10 Sequenzierung doppelsträngiger DNA [89]

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA erfolgte nach der fluoreszenzmarkierten Didesoxymethode. Mit Hilfe eines Kits von ABI, der Ampli-Taq-DNA-Polymerase, dNTPs und die einzelnen fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide enthielt, wurde die Sequenzierungsreaktion durchgeführt. Hierfür wurden 5 µl des Plasmids aus der QIAprep Spin-Plasmidisolation mit 4 µl Sequencing Kit von ABI, 1 µl 4 pmol Primer und 10 µl H<sub>2</sub>O eingesetzt.

##### Sequenzierungsreaktion

Wiederholung des Programmschrittes	Denaturierung	DNA-Annealing	Elongation/DNA-Synthese
1	95 °C, 7 min		
25	95 °C, 40 s	53 °C, 30 s	60 °C, 4min
1			72 °C, 4 min

Die Proben zur Sequenzierung wurden nach der Sequenzierungsreaktion mit Ethanol gefällt. Die getrocknete DNA wurde in 4 µl einer 5:1 Mischung aus Formamid und 25 mM EDTA, pH 8 aufgenommen. Nach 5 min Denaturierung bei 95 °C wurden die Proben sofort auf Eis gekühlt und danach in die Taschen eines 5,25 % Polyacrylamidgels pipettiert. Die Durchführung der Elektrophorese zur Sequenzierung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

##### 5,25 % Polyacrylamidgel

18,0 g Harnstoff  
 6,6 ml 40 % PAGE-PLUS Lösung  
 5,0 ml 10 x TBE Puffer  
 ad 50 ml bidest. H<sub>2</sub>O  
 250 µl 10 % (M/V) APS  
 25 µl TEMED

## 4.11 Präparative Methoden

### 4.11.1 Immobilisierungsmethoden

#### 4.11.1.1 Immobilisierung in Polyacrylamid

0,18 g *E. coli* Zellen der Stämme RFM443(pASU) und UTL2(pASU) mit Luziferase als Reportergen ( $OD_{578 \text{ nm}}$  0,9) wurden in 8 ml LB resuspendiert. Danach wurden 4 ml 40 % ige Acrylamid 40 und 35  $\mu$ l TEMED zugegeben und anschließend die Polymerisation durch Zugabe von 190  $\mu$ l APS gestartet. Je 75  $\mu$ l des Reaktionsgemisches wurden in jede Kavität einer weißen Mikrotiterplatte pipettiert, bevor die Polymerisation eintrat. Nun erfolgte nach Zugabe von 100  $\mu$ l LB-Medium die Induktion des Reportergens mit 50  $\mu$ l Lösungen unterschiedlicher Konzentration 4-CBA.

#### 4.11.1.2 Immobilisierung in Alginat

Das Pellet der bei  $OD_{578 \text{ nm}}$  1,2 geernteten *E. coli* Zellen der Stämme RFM443(pASU) und UTL2(pASU) mit Luziferase als Reportergen wurde mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % (M/V) NaCl-Lösung) gewaschen und resuspendiert, wobei die  $OD_{578 \text{ nm}}$  auf 0,1 eingestellt wurde. 5 ml dieser Zellsuspension wurden mit 5 ml 4 % (M/V) Natriumalginat gemischt und 75  $\mu$ l davon in die Kavitäten einer weißen Mikrotiterplatte pipettiert. Durch Zugabe von 50  $\mu$ l 0,1 M  $CaCl_2$  erfolgte das Ausgelatisieren. Nach Zugabe von 50  $\mu$ l 40 mM Tris/HCl Puffer pH 7 und 100  $\mu$ l LB-Medium (3 x konzentriert) wurden die immobilisierten Zellen mit 10  $\mu$ l 4-CBA (0-3,6 mM) induziert.

#### 4.11.1.3 Immobilisierung in Alginat-Silikon

Die Alginat-Silikon Immobilisierung erfolgte entsprechend der Alginat Immobilisierung. Zu der Alginatsuspension wurden 10 % Silikon von Shinetsu gemischt.

#### 4.11.1.4 Adsorptive Immobilisierung von TetR auf Mikrotiterplatten

Zur Beschichtung der Mikrotiterplatten wurde eine  $10^{-8}$  M Lösung des gereinigten und mit Faktor Xa verdauten Tetrazyklin-Repressors in Tris-Puffer (50 mM Tris/HCl, 5 mM

MgCl<sub>2</sub>, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) hergestellt. 250 µl dieser Lösung wurden in jede Kavität der Platte pipettiert und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.

#### 4.11.1.5 Kovalente Immobilisierung von TetR auf Mikrotiterplatten [90]

Zur kovalenten Immobilisierung des gereinigten und Faktor Xa behandelten STetR Repressors (TetR<sup>+</sup>) wurde jede Kavität der Fluoro Nunc Maxisorp Mikrotiterplatten 16 h mit 250 µl 3,5 M HCl bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde mit Wasser, 0,1 M Carbonatpuffer (pH 9,5) und mit 10 mM Phosphatpuffer (pH 7) gewaschen. Die Platte wurde 2 h mit 8 % (V/V) Glutarialdehyd-Lösung behandelt, bevor erneut mit Wasser gewaschen wurde. 250 µl der 10<sup>-8</sup> M Tetrazyklinrepressor-Lösung in Tris-Puffer (50 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) wurden über Nacht bei 4 °C an die Mikrotiterplatte gekoppelt.

### 4.11.2 Spezielle Untersuchungen der immobilisierten Zellen

#### 4.11.2.1 Einfluß zellwandpermeabilisierender Substanzen und KNO<sub>3</sub>

Um die Aufnahme von 4-CBA ins Innere der Zelle zu erleichtern, wurden zu 4 ml Alginat-Zell-Suspension je Experiment einzeln folgende Mengen und Substanzen zugegeben:

20 % (V/V) Ethanol	100 µl
	300 µl
2 mg/ml Lysozym (84850 U/mg) in	250 µl
0,5 M Tris/HAc Puffer pH 7	750 µl
0,5 M KNO <sub>3</sub>	80 µl
	250 µl
25 % (M/V) SDS	160 µl
10 % (V/V) Triton X-100	40 µl

#### 4.11.2.2 Kurzzeitige Induktion der Zellen

Die Zellen wurden wie beschrieben in Alginat immobilisiert und durch CaCl<sub>2</sub> quervernetzt. Die hergestellten Kügelchen aus Matrix und Zellen wurden in einen Erlenmeyerkolben mit 75 ml LB-Medium (4 x konzentriert), 25 ml 40 mM Tris/HCl Puffer pH 7, 200 ml Wasser

und 3,6 mM 4-CBA gegeben. 4 uninduzierte immobilisierte Zellproben wurden direkt in eine Mikrotiterplatte mit 150  $\mu$ l LB-Medium pro Kavität überführt. Alle 25 min wurden weitere 4 Kügelchen mit immobilisierten Zellen aus dem bei 26 °C geschüttelten Kolben entnommen, mit 0,9 % (M/V) NaCl-Lösung gewaschen und in dieselbe Mikrotiterplatte in die noch freien Kavitäten zu 150  $\mu$ l LB-Medium transferiert. Nach jeder Zugabe neuer Alginatzellkügelchen wurde die Lumineszenz gemessen. Dieser Vorgang wurde 11 mal wiederholt. Danach wurde weitere 6 Stunden alle 25 min die Lumineszenz gemessen.

### 4.11.3 Mikrotiterplatten-Assay zur Detektion von Tetrazyklin

Zur Beschichtung der Mikrotiterplatten wurde eine  $10^{-8}$  M Lösung des gereinigten und mit Faktor Xa verdauten Tetrazyklin-Repressors STetR in Tris-Puffer (50 mM Tris/HCl, 5 mM  $MgCl_2$ , 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) hergestellt. 250  $\mu$ l dieser Lösung wurden in jede Kavität der Platte pipettiert und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Die mit Tetrazyklin-Repressor beschichteten Platten wurden mit Waschpuffer (50 mM Tris/HCl, 5 mM  $MgCl_2$ , 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) im Mikrotiterplattenwaschautomaten gewaschen. Anschließend wurden 250  $\mu$ l Natriumcaseinlösung zum Blockieren der freien Bindungsstellen je Kavität pipettiert und für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Ein zweiter Waschschrift mit Puffer und die Induktion mit einer Tetrazyklinverdünnungsreihe ( $10^{-3}$ - $10^{-12}$  M) in Waschpuffer für eine Stunde folgten. Um die biotinylierte DNA mit Enzym zu markieren, wurden  $10^{-7}$  M (40  $\mu$ g/ml) der O2 Operator-DNA 45 min mit POD-Enzym-Konjugat inkubiert (2,5 ng/ml Ab-POD bzw. 3 ng/ml Strep-POD). Von dieser Lösung wurden 250  $\mu$ l je Kavität zur Bindung an den Repressor pipettiert. Nach einer Bindungszeit von 1 Stunde bei Raumtemperatur wurde gewaschen und anschließend die POD-Aktivität luminometrisch bzw. colorimetrisch bestimmt.

### 4.11.4 Oberflächenplasmonresonanz-Messungen

Ein SA-Chip (Biacore, Uppsalla, Schweden) wurde mit einem Fluß von 5  $\mu$ l/min durch dreimalige Zugabe von 10  $\mu$ l 50 mM NaOH, 1 M NaCl gewaschen. Als Laufpuffer wurden 50 mM Tris/HCl pH 7,4, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA verwendet. Mit einem Fluß von

5  $\mu\text{l}/\text{min}$  wurde entweder ein durch PCR hergestelltes und gereinigtes 130 bp langes O2 Operator-Fragment oder ein durch Hybridisierung entstandenes 36 bp O2 Operator-Fragment zugegeben bis ca. 500 RU (Resonanzeinheiten) erreicht waren. Mit gleichem Fluß wurde TetR' (STetR gereinigt und Faktor Xa gespalten) 30 min sowohl auf die Spur mit spezifischer DNA als auch auf die Kontrollspur des Chips injiziert. Als Kontrollen dienten für die 36 bp lange DNA eine unbehandelte Streptavidinspur, während für das 130 bp Fragment eine unspezifische Kontroll DNA der gleichen Länge verwendet wurde. Danach erfolgte die Zugabe von Tetrazyklin verschiedener Konzentrationen in demselben Puffer mit 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , um das Ablösen des Repressors zu messen.

Primer 1	Primer 2	Fragmentgröße in bp	Fragmentcharakteristik
O2B	O2comp	36	Fragment mit O2
Kont1	KontB	130	Kontroll DNA
TR4	B-TR2	130	Fragment mit O2

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Entwicklung des Reporterassays zur Detektion von 4-CBA

Um 4-CBA möglichst einfach nachweisen zu können, wurde ein *E. coli* Reportersystem benutzt, das bei Anwesenheit von 4-CBA Luziferase exprimiert, die durch ihre enzymatische Aktivität bestimmt werden kann. Hierzu wurde das Plasmid pASU verwendet, das neben dem Luziferaseoperon Resistenzgene für die Antibiotika Ampizillin und Kanamycin besitzt. Ein 1,7 kb großes DNA-Fragment, das oberhalb des 4-CBA Dehalogenaseoperons von *Arthrobacter* sp. SU lokalisiert ist und den putativen Promotor enthält [36], wurde mit dem Luziferaseoperon *luxCDABE* von *Vibrio fischeri* des Plasmids pUCD615 [71] fusioniert [72]. In Anwesenheit von 4-CBA wird Luziferase (kodiert durch *luxAB*) exprimiert. Das Licht, das bei der enzymatischen Umsetzung eines langkettigen Aldehyds (Enzyme zur Synthese des Aldehyds kodiert durch *luxCDE*) entsteht, kann gemessen werden [72]. Dieses Reporterplasmid pASU (s. Abb. 8) wurde in die *E. coli* Stämme RFM443 und UTL2 transformiert. RFM443 ist ein Membranwildtyp, während es sich bei UTL2(pASU)

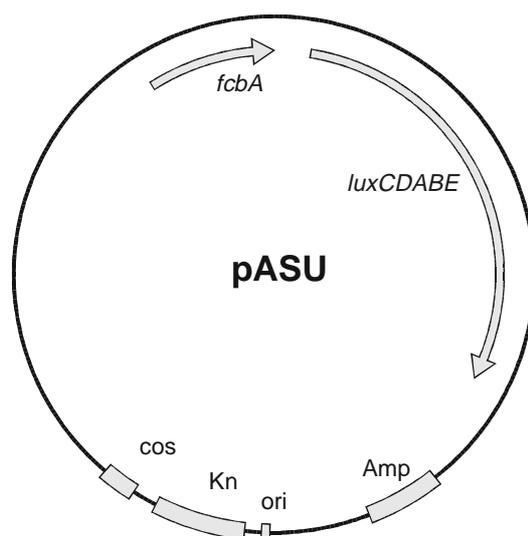


Abb. 8: Plasmid pASU: *fcba* enthält den putativen Promotor des Operons für den 4-CBA Abbau von *Arthrobacter* SU, *luxCDABE* Luziferaseoperon, Amp Ampizillinresistenz, Kn Kanamycinresistenz und ori Replikationsursprung [61].

um eine Membranmutante mit verbesserten Aufnahmemöglichkeiten von Substanzen handelt [73]. Die Verwendung von UTL2 sollte zu einer Verbesserung des Detektionslimits führen. Da für den Feldeinsatz Flüssigkulturen wenig geeignet sind, wurden die Möglichkeiten und Grenzen der Immobilisierung dieser Reporterstämme getestet.

## 5.1.1 Optimierung der Immobilisierung

### 5.1.1.1 Alginate als Immobilisierungsmatrix

In einem Vorversuch wurden die Immobilisierungsmatrizes Polyacrylamid, Alginate und Alginate-Silikon auf ihre Eigenschaften bezüglich Induzierbarkeit der immobilisierten Zellen getestet. Bei der Verwendung von Polyacrylamid stellte sich heraus, daß weder beim Wildtypstamm RFM443(pASU) noch bei der Membranmutante UTL2(pASU) nach Induktion mit 3,6 mM 4-CBA Lumineszenz über 200 RLU gemessen werden konnte. Ein in Abb. 9 dargestellter Vergleich der Immobilisierungsmatrizes Alginate und Alginate-Silikon zeigte eine höhere Induzierbarkeit, wenn Alginate allein als Matrix verwendet wurde. Für den Stamm RFM443(pASU) wurden 2,5 fache und für den Stamm UTL2(pASU) 35 fach

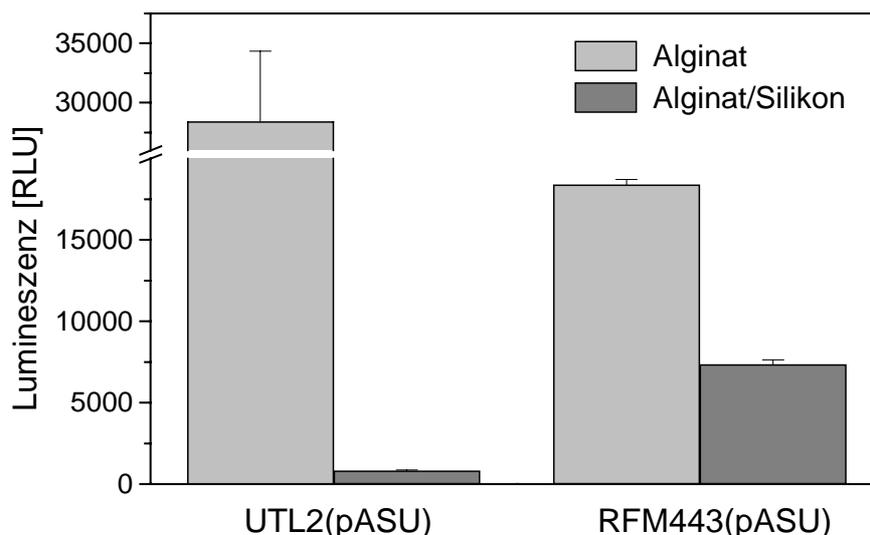


Abb. 9: RFM443(pASU) und UTL2(pASU) wurden nach Immobilisierung in Alginate bzw. Alginate-Silikon (Zelldichte OD 0.1) mit 3,6 mM 4-CBA induziert. Die Lumineszenz wurde nach 200 min gemessen.

höhere Lumineszenzwerte gemessen, wenn in Alginat statt in Alginat/Silikon immobilisiert wurde. Da sich von den untersuchten Immobilisierungsmatrizes Alginat als die am vielversprechendste herausstellte, wurden alle weiteren Experimente zur Optimierung mit dieser durchgeführt.

### 5.1.1.2 Stationäre Wachstumsphase zur Immobilisierung

Mit dem folgenden Experiment sollte die optimale Wachstumsphase für die Zellernte der zu immobilisierenden Zellen bestimmt werden. Dazu wurden die Zellen beider mit pASU transformierten Stämme zu verschiedenen Wachstumsphasen geerntet, immobilisiert und induziert. In der logarithmischen Phase ( $OD_{578\text{ nm}}$  0,3 und 0,6) geerntete Zellen zeigten geringere Lumineszenzwerte als in der stationären Phase geerntete (s. Abb. 10). Nach einer Meßzeit von 200 min stellte sich der Beginn der stationären Phase bei  $OD_{578\text{ nm}}$  1,2 als optimal heraus. In dieser Phase konnte mit der geringen Standardabweichung von 5 % für beide Stämme eine relativ hohe Lumineszenz gemessen werden, während bei  $OD_{578\text{ nm}}$  1,8

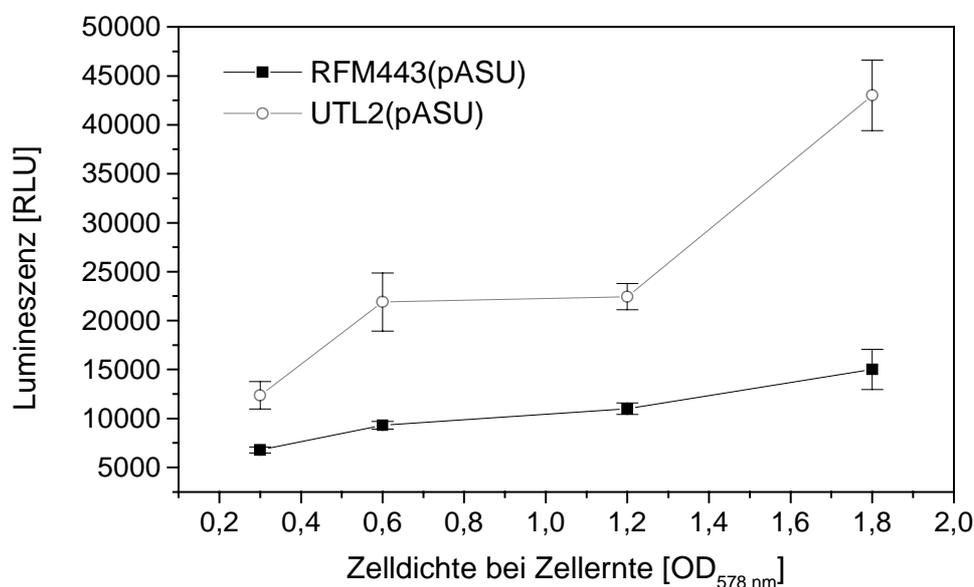


Abb. 10: RFM443(pASU) und UTL2(pASU) wurden bei verschiedenen Zelldichten geerntet und nach Immobilisierung in Alginat bei einer Zelldichte von  $OD_{578\text{ nm}}$  0,1 mit 3,6 mM 4-CBA induziert. Die Lumineszenz wurde nach 200 min gemessen.

geerntete Zellen des Stammes RFM443(pASU) eine Standardabweichung von 13 % und UTL2(pASU) von 8 % zeigten. Für alle weiteren Untersuchungen wurden zur Immobilisierung Zellen zu Beginn der stationären Phase ( $OD_{578\text{ nm}} 1,2$ ) verwendet.

### 5.1.1.3 Geringe Zelldichten zur Immobilisierung

Der Einfluß der zur Immobilisierung eingesetzten Zelldichte der Zellresuspension wurde im Hinblick auf die resultierende Lumineszenz nach Induktion und Standardabweichung der Meßergebnisse untersucht. Um exakte Zelldichten von 0,1, 0,4, 0,7 und 1,0 zu erhalten, wurde das Pellet einer bei OD 1,2 geernteten Kultur in 0,9 % (M/V) NaCl resuspendiert und auf die entsprechende OD bei 578 nm eingestellt. Diese Suspension wurde zur Immobilisierung eingesetzt. Abb. 11 zeigt die gemessenen Lumineszenzwerte der verschiedenen Zelldichten nach 200 min Induktion mit 3,6 mM 4-CBA. Da die höheren Lumineszenzwerte der hohen Zelldichten mit hohen Fehlern verbunden waren, wurde die Zelldichte

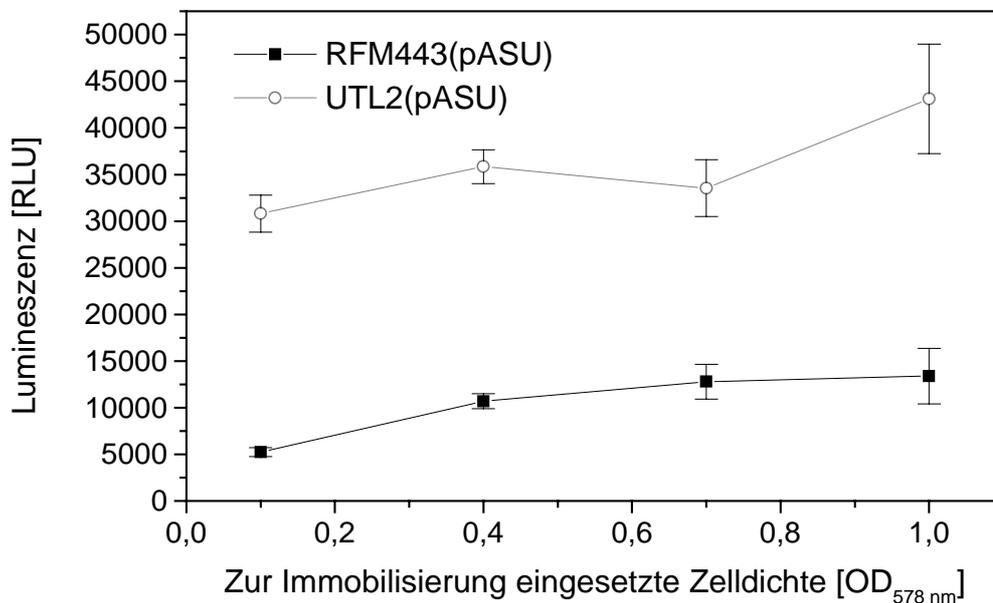


Abb. 11: RFM443(pASU) und UTL2(pASU) wurden bei  $OD_{578\text{ nm}} 1,2$  geerntet, das resuspendierte Pellet auf verschiedene Zelldichten eingestellt, bevor mit Alginat gemischt wurde. 75  $\mu\text{l}$  dieser Mischung wurden zur Immobilisierung verwendet und mit 3,6 mM 4-CBA induziert. Die Lumineszenz wurde nach 200 min gemessen.

von  $OD_{578\text{ nm}}$  für weitere Untersuchungen verwendet. Mit dem Stamm RFM443(pASU) konnte eine Standardabweichung von nur 4,6 % und mit UTL2(pASU) von 6 % berechnet werden.

#### 5.1.1.4 Bestimmung des optimalen Volumens der Zell-Alginatmatrix

Der Zusammenhang zwischen dem Volumen der Zell-Alginatmischung und der resultierenden Lumineszenz nach Induktion wurde untersucht. Zu 25, 50, 75 oder 100  $\mu\text{l}$  Zell-Alginat-Mischung wurden 50  $\mu\text{l}$  0,1 M  $\text{CaCl}_2$ , 50  $\mu\text{l}$  3 x LB-Medium pipettiert und mit 40 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 auf 225  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  4-CBA, so daß die Endkonzentration 3,6 mM 4-CBA betrug. Abb. 12 zeigt einen Anstieg der Lumineszenz mit zunehmendem Volumen von 25  $\mu\text{l}$  bis 75  $\mu\text{l}$  der Zell-Alginat-Mischung. Von 75  $\mu\text{l}$  zu 100  $\mu\text{l}$  ergab sich ein geringer Anstieg der Lumineszenz, der mit einer erhöhten Standardabweichung von 8,6 % für RFM443(pASU) bzw. 21 % für UTL2(pASU) verbunden war. Für die weiteren Experimente wurden 75  $\mu\text{l}$  Zell-Alginat-Mischung wegen ihrer geringeren Standardabweichung von 5,6 % ausgewählt.

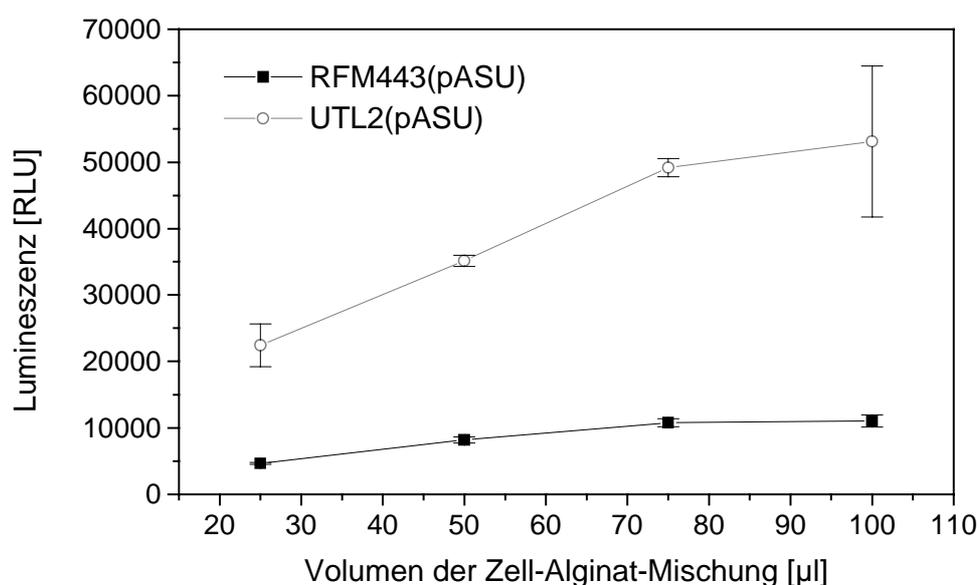


Abb. 12: RFM443(pASU) und UTL2(pASU) wurden bei  $OD_{578\text{ nm}}$  1,2 geerntet und mit einer Zelldichte von  $OD_{578\text{ nm}}$  0,1 immobilisiert. Die Volumen der Zell-Alginat-Mischung wurden variiert und anschließend mit 3,6 mM 4-CBA induziert. Die Lumineszenz wurde nach 200 min gemessen.

## 5.1.2 Charakterisierung des 4-CBA Assays mit immobilisierten Zellen

### 5.1.2.1 Vergleich von freien und immobilisierten Zellen

Der Einfluß der Immobilisierung im Vergleich zu freien Zellen wurde getestet. Damit sollte festgestellt werden, ob diese auf Grund von Diffusionsbarrieren das Induktionspotential verschlechtert. Um gleiche Bedingungen für freie und immobilisierte Zellen zu erhalten, wurde statt Alginate physiologische Kochsalzlösung zu den freien Zellen gegeben, damit die Zelldichten zu Beginn der Messung gleich waren. Abb. 13 zeigt den Vergleich der Lumineszenzwerte von freien und immobilisierten Zellen. Immobilisierte Zellen ergaben sowohl für RFM(pASU) als auch UTL2(pASU) 1,5-fach höhere Lumineszenz als freie. Zu Beginn der Induktion und mit uninduzierten Zellen wurden vergleichbare Lumineszenzwerte gemessen. Damit konnte dieser Effekt nicht auf den Hintergrund zurückgeführt werden. Immobilisierte Zellen des Stammes RFM443(pASU) zeigten eine höhere Standardabweichung als freie, während die Membranmutante UTL2(pASU) in der geringeren Standardabweichung von 7 % im immobilisierten und von 17 % im freien Zustand resultierte.

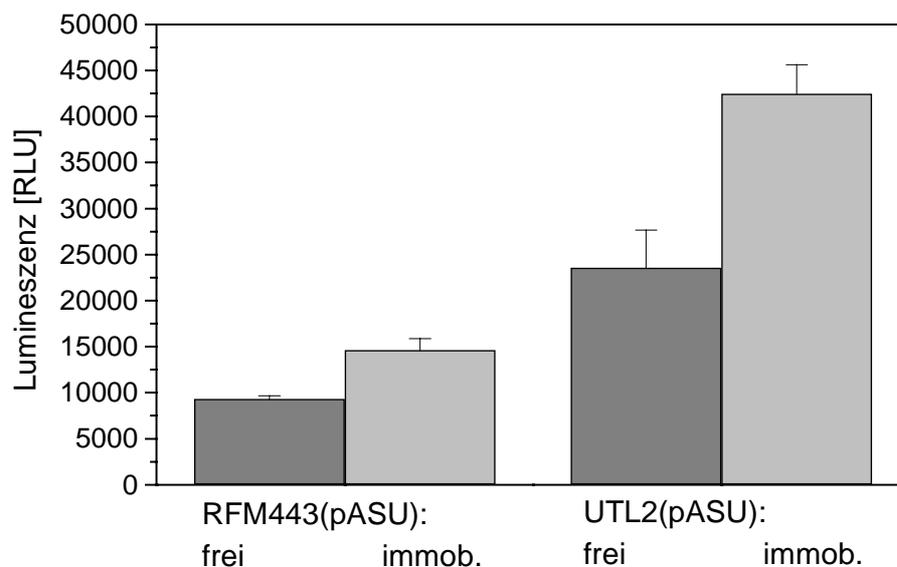


Abb. 13: RFM443(pASU) und UTL2(pASU) wurden bei  $OD_{578\text{ nm}} 1,2$  geerntet und jeweils  $75\ \mu\text{l}$  Suspension mit einer Zelldichte von  $OD_{578\text{ nm}} 0,1$  immobilisiert. Nach Induktion mit  $3,6\ \text{mM}$  4-CBA wurde die Lumineszenz nach 200 min gemessen.

### 5.1.2.2 Zeitlicher Verlauf der Luziferaseexpression

Die Luziferaseexpression der mit verschiedenen 4-CBA Konzentrationen induzierten immobilisierten Stämme wurde in Abhängigkeit der Zeit gemessen. Eine Verschiebung des Maximums der Lumineszenz nach längeren Zeiten für höhere Konzentrationen von 0,45 bis 7,27 mM 4-CBA trat auf. Das Erreichen des Maximums der Lumineszenz war zeitabhängig und bei Messungen über mehrere Stunden stieg der Fehler der Messung stark an (s. Abb. 14, Tab. 4). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Lumineszenz nach 200 min zur Auswertung der Ergebnisse benutzt.

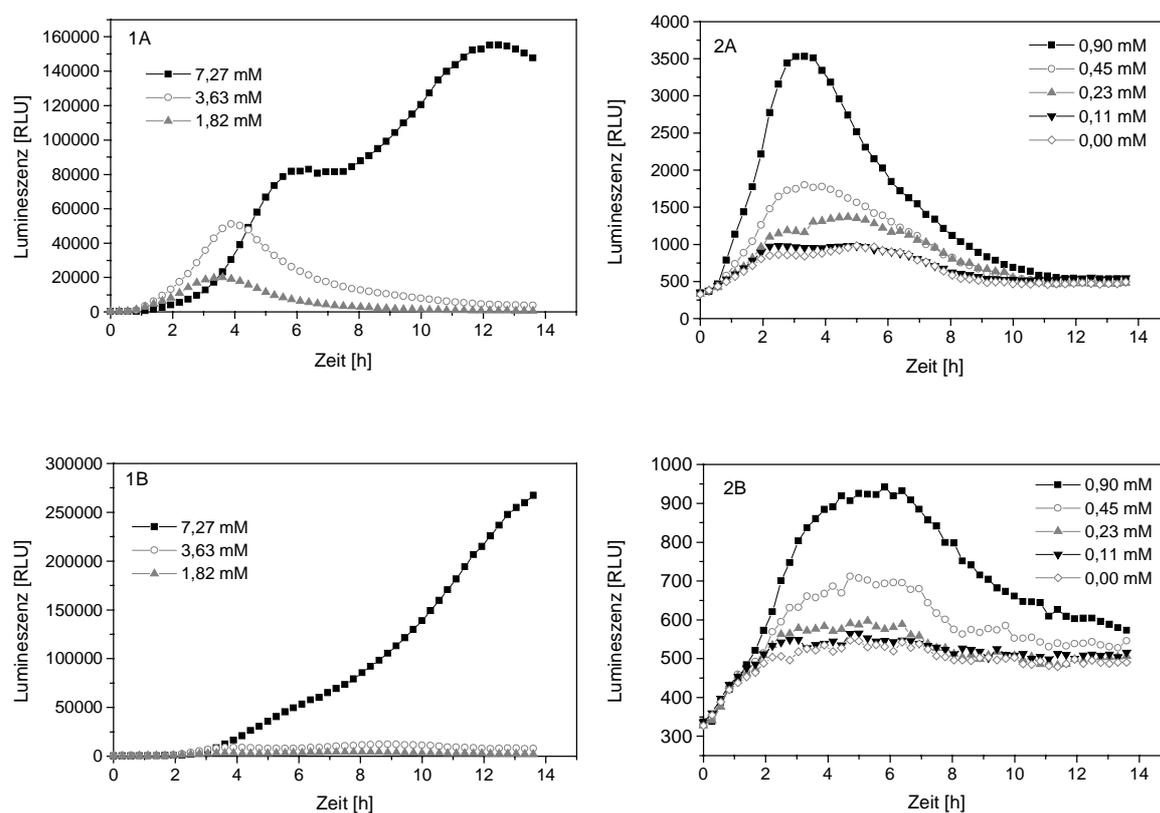


Abb. 14: Einfluß verschiedener 4-CBA Konzentrationen auf die zeitliche Lumineszenzentwicklung. Stamm UTL2(pASU) 1A, 2A und RFM443(pASU) 1B, 2B.

Tab. 4: Bestimmung der Zeit, die benötigt wird um das Maximum der Lumineszenz nach Induktion mit verschiedenen Konzentrationen zu erreichen.

Konzentration 4-CBA (mM)	Zeit zum Erreichen des Lumineszenzmaximums in h:	
	RFM443(pASU):	UTL2(pASU):
7,27	> 14	12,2
3,63	8,88	3,9
1,82	8,0	3,6
0,90	5,8	3,3
0,45	4,7	3,3
0,23	4,7	4,4
0,11	4,99	2,8
0,05	> 14	3,33

### 5.1.2.3 Induktion mit verschiedenen 4-CBA Konzentrationen

Immobilisierte Zellen wurden mit 4-CBA Standardlösungen verschiedener Konzentrationen von 0 bis 3,6 mM 4-CBA induziert. Die gemessenen Lumineszenzwerte waren stark von der Kultur abhängig. Dies bedeutete, daß die resultierende Lumineszenz der mit 3,6 mM 4-CBA induzierten Zellen in unabhängigen Experimenten bis zu 40% variierten.

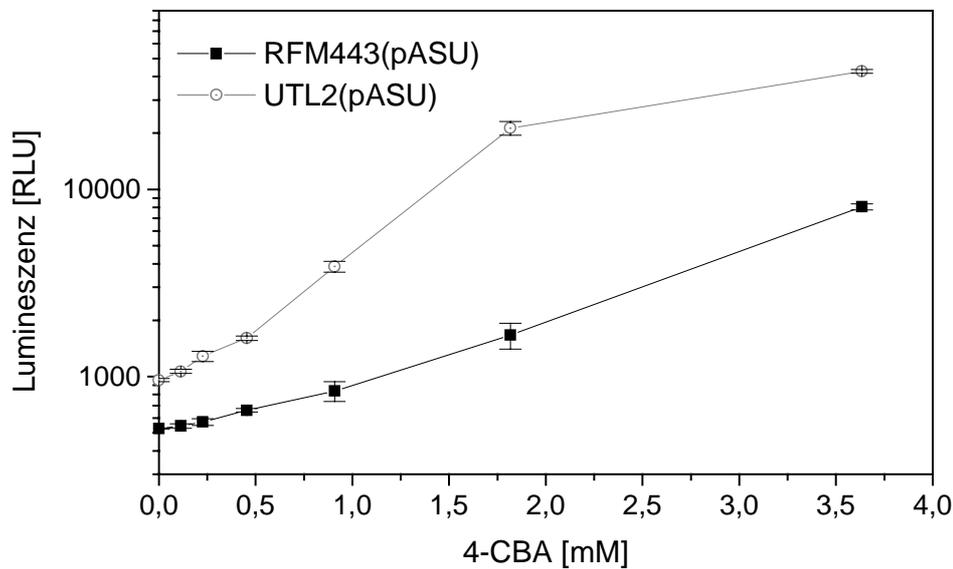


Abb. 15: Einfluß der 4-CBA Konzentration auf die Lumineszenz. Stamm RFM443(pASU) und UTL2(pASU) wurden 200 min mit verschiedenen Konzentrationen 4-CBA inkubiert und die Lumineszenz gemessen.

Bei Proben unbekannter Konzentration mußte stets eine Standardreihe von 4-CBA mitbestimmt werden. Detektionslimit und Bereich waren jedoch in unterschiedlichen Experimenten gleich. In Abb. 15 ist die Abhängigkeit der Lumineszenzwerte für verschiedene 4-CBA Konzentrationen nach 200 min dargestellt. Im untersuchten Bereich wurde diese logarithmisch aufgetragen. 200 min Induktionszeit wurde als Kompromiß zwischen Erreichen des Maximums für niedrige 4-CBA Konzentrationen und langen Inkubationszeiten ausgewählt. Als Detektionslimit konnte für Stamm RFM443(pASU) 227  $\mu\text{M}$  und für Stamm UTL2(pASU) 113  $\mu\text{M}$  4-CBA ermittelt werden, das aus der dreifachen Standardabweichung der Lumineszenzwerte berechnet wurde.

#### 5.1.2.4 Spezifitätsnachweis durch Induktion mit verschiedenen Analyten

Das Induktionspotential anderer Analyten als 4-CBA wurde untersucht, um die Spezifität für 4-CBA nachzuweisen. Die Membranmutante UTL2(pASU) zeigte eine geringere Spezifität. Mit 4-BBA (4-Brombenzoesäure) wurden noch 70 % der Lumineszenz von 4-CBA induziert (s. Abb. 16). 4-FBA konnte 25 % der Lumineszenz von 4-CBA induzieren. Alle

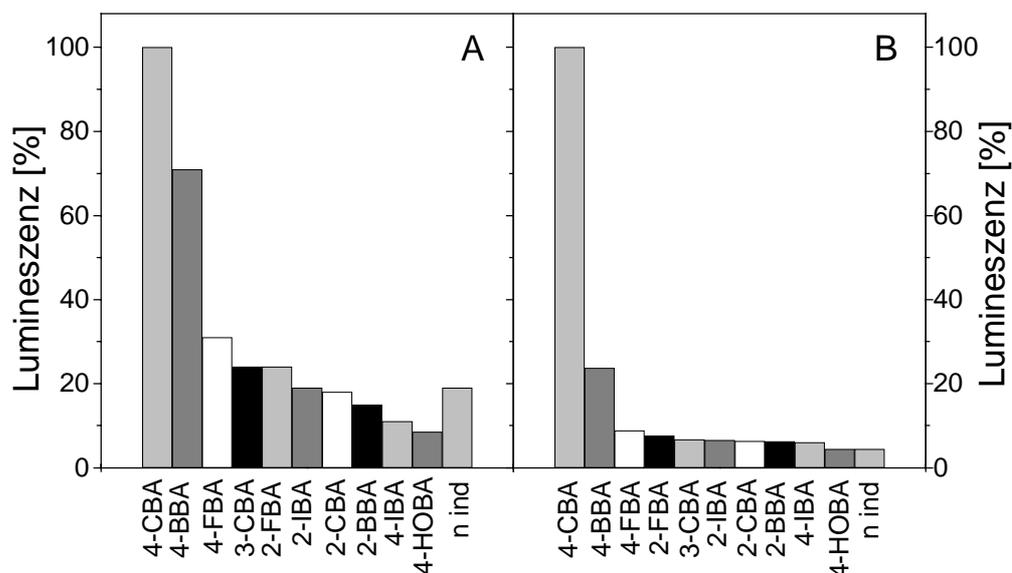


Abb. 16: UTL2(pASU) (A) und RFM443(pASU) (B) wurden mit 3,6 mM des angegebenen Analyten induziert und die Lumineszenz gemessen. Die maximale Lumineszenz von 4-CBA wurde als 100 % gesetzt und alle anderen Meßwerte darauf bezogen. 4-BBA (4-Brombenzoesäure), 4-FBA (4-Fluorbenzoesäure), 3-CBA (3-Chlorbenzoesäure), 2-FBA (2-Fluorbenzoesäure), 2-IBA (2-Iodbenzoesäure), 2-CBA (2-Chlorbenzoesäure), 2-BBA (2-Brombenzoesäure), 4-IBA (4-Iodbenzoesäure), 4-HOBA (4-Hydroxybenzoesäure), n ind (nicht induziert).

anderen getesteten Analyten lagen unter 20 %. Der Stamm RFM443(pASU) erzielte ein besseres Ergebnis. Hier wurde nur noch 20 % der Lumineszenz, die mit 4-CBA Induktion erreicht wurde, durch 4-BBA induziert. Die anderen Analyten lagen unter 4 %. Sie zeigten durch Meßungenauigkeiten verursachte Signale unterhalb des Hintergrundes.

### 5.1.2.5 Bestimmung der minimalen Induktionszeit

Da sich die Zellen durch 4-CBA nur relativ langsam induzieren ließen, wurde untersucht, ob der Analyt 4-CBA permanent anwesend sein muß, oder ob auch eine kurze Kontaktzeit zur Induktion ausreicht. Um dieses Experiment zu verwirklichen wurde die Immobilisierung wie üblich durchgeführt. Danach wurden die immobilisierten Zellkugeln in einen

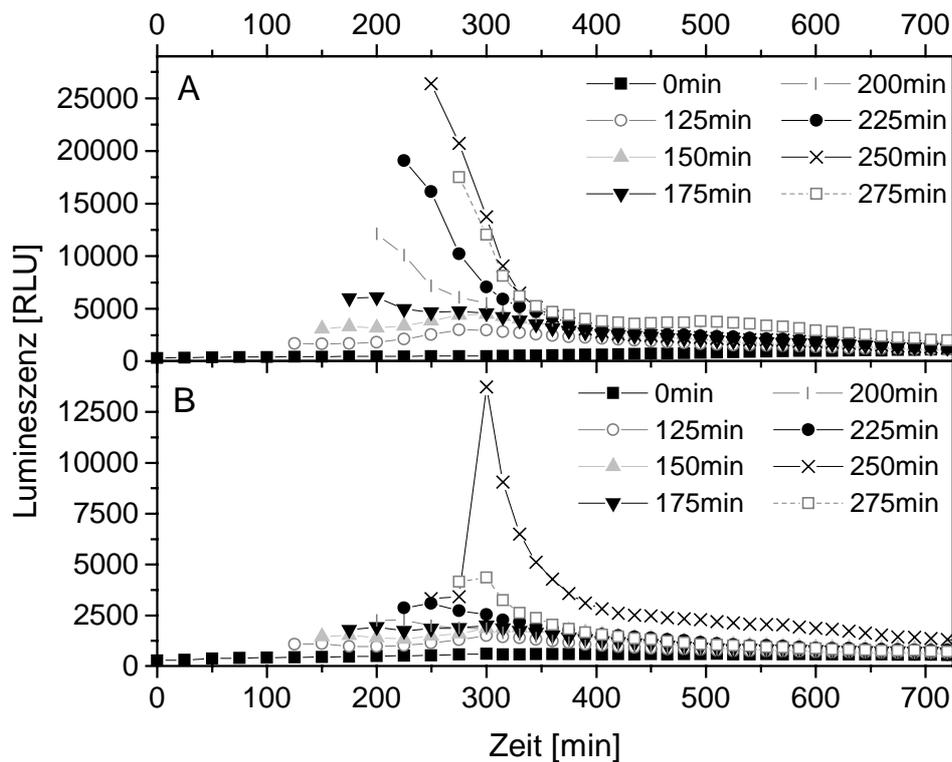


Abb. 17: UTL2(pASU) (A) und RFM443(pASU) (B) wurden in Alginat immobilisiert. Die ausgelatisierten Matrixkugeln wurden danach in einen Kolben mit LB-Medium, Tris-Puffer und 3,6 mM 4-CBA gegeben. Nach 125 min wurden alle 25 Minuten 4 Kugeln gewaschen und in eine Mikrotiterplatte mit LB-Medium gegeben, worauf die Lumineszenz alle 25 Minuten gemessen wurde.

Kolben transferiert und induziert. Dabei sollte gewährleistet werden, daß alle unter den gleichen Bedingungen inkubiert wurden. Jeweils nach 25 min wurden 4 Kügelchen entnommen, gewaschen und die Lumineszenz daraufhin im Abstand von 25 min gemessen. Die Abb. 17 zeigt die minimale Induktionszeit von 125 min. Nach Entnahme der Zellkügelchen ergab sich aus dem Induktormedium kein zeitverzögerter Anstieg der Lumineszenz. RFM443(pASU) zeigte nach Entnahme aus dem Medium mit 4-CBA bis auf eine Meßreihe nach 250 min Induktion nur geringe Anstiege der Lumineszenz. Längere Induktionen als 250 min führten in beiden Fällen zu keiner weiteren Erhöhung der Lumineszenz. Die durchschnittliche Halbwertszeit der Lebensdauer der Luziferase beträgt 25 min [91]. Nach Entfernung aus dem 4-CBA haltigen Medium konnte nur ein Abfall des Signals beobachtet werden, da keine zusätzliche Luziferase mehr produziert wurde.

#### **5.1.2.6 Bestimmung der Lagerungsstabilität**

Zellen einer Kultur wurden wie beschrieben immobilisiert und ein Teil der Zellen direkt anschließend mit verschiedenen Konzentrationen 4-CBA induziert. Der restliche Teil der immobilisierten Zellen wurde bei 4 °C 4 Tage in Puffer mit LB-Medium oder ohne LB-Medium zur Verhinderung von Kontaminationen gelagert. Nach der Lagerung wurden die in Puffer gelagerten Zellen mit LB-Medium versetzt. Vor Induktion erfolgte eine einstündige Inkubation bei 26 °C. Für Stamm RFM443(pASU) konnte schon nach 4 Tagen Lagerung sowohl mit als auch ohne LB-Medium keine Lumineszenz über dem Hintergrund gemessen werden. Bei Lagerung ohne LB-Medium zeigte die Membranmutante mit hohen Induktionskonzentrationen wie 3,6 mM 4-CBA nur eine 22 % geringere Lumineszenz als ungelagert. Für Konzentrationen unter 0,9 mM konnten keine konzentrationsabhängigen Lumineszenzwerte gemessen werden (s. Tab. 5). Lagerung der Zellen in LB-Medium ergab auch für UTL2(pASU) nach Induktion nur Hintergrundlumineszenz. Bezüglich Lagerungsstabilität erwies sich das System als ungeeignet.

Tab. 5: Zur Lagerung wurden die in Alginat immobilisierten Zellen von RFM443(pASU) und UTL2(pASU) in Tris-Puffer ohne LB-Medium (-LB) oder in Tris-Puffer mit LB-Medium (+LB) gelagert. Die Tabelle zeigt den Vergleich sofort induzierter Zellen der gleichen Kultur ohne und nach 4 Tagen Lagerung. Es wurde mit den angegebenen Konzentrationen 4-CBA induziert und die Lumineszenz nach 200 min gemessen.

4-CBA-Konzentration (mM)	Lumineszenz in RLU nach			
	RFM443(pASU) 0 Tagen	RFM443(pASU) 4 Tagen + LB (- LB)	UTL2(pASU) 0 Tagen	UTL2(pASU) 4 Tagen + LB (- LB)
3,6	16777	736 (636)	3209	706 (3050)
1,8	4123	731 (684)	2818	774 (1333)
0,9	1582	651 (683)	2127	654 (942)

### 5.1.3 Optimierung des 4-CBA Reporterassays

#### 5.1.3.1 Variation des pH-Wertes

Der pH-Wert des Tests wurde über einen Bereich von pH 5 bis 7 variiert, um optimale Bedingungen für die Aufnahme von 4-CBA in die Zellen herauszufinden. Ein Kompromiß zwischen niedrigen pH-Werten, die einen Protonengradienten erzeugten, der die 4-CBA Aufnahme erleichterte und den optimalen Lebensbedingungen für die Zellen, mußte geschlossen werden. PH-Werte 5 und 8 zeigten für beide Stämme vergleichbar niedrige Lumineszenzwerte unter 2000 RLU (s. Abb. 18). Bei pH 6 trat bei beiden Stämmen für 1,8 mM 4-CBA verglichen mit pH 7 höhere Lumineszenz auf. Deshalb wurden die günstigsten Bedingungen bei pH 6 besonders für die niedrige Analytkonzentration für weitere Optimierungen verwendet.

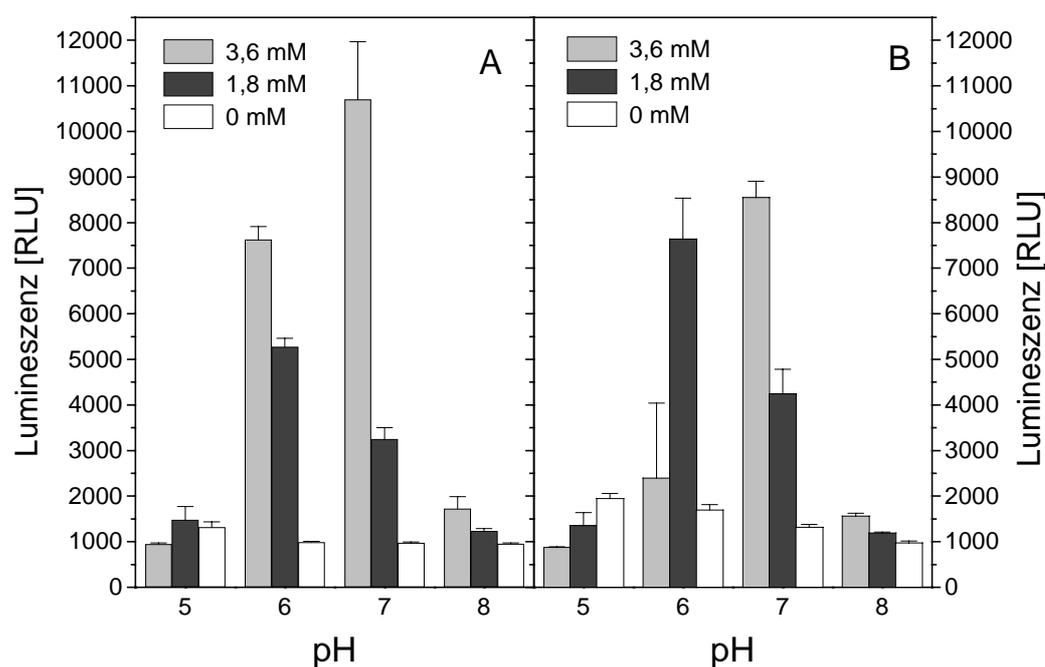


Abb. 18: UTL2(pASU) (A) und RFM443(pASU) (B) wurden mit 3,6 mM, 1,8 mM oder 0 mM 4-CBA bei verschiedenen pH-Werten induziert und die Lumineszenz nach 200 min gemessen.

### 5.1.3.2 Einsatz zellwandpermeabilisierender Substanzen und Erhöhung der Diffusion

Die Zellen wurden vor der Immobilisierung mit Substanzen behandelt, die die Permeabilität der Zellmembranen beeinflussen. Dadurch sollte die Aufnahme von 4-CBA in die Zellen erleichtert werden. Nach Induktion sollten die Proben mit permeabilisierenden Agenzien eine Erhöhung der Lumineszenz aufweisen. Abb. 19 zeigt diese Lumineszenzzunahme als Faktor bezogen auf die Lumineszenz des unbehandelten immobilisierten Stammes. Ethanol erhöhte die Lumineszenz 1,2 mal, während das Detergenz Triton X-100 (0,1 %) einen negativen Effekt zeigte. SDS (1 %) erhöhte die Lumineszenz von UTL2(pASU) und erniedrigte die von RFM443(pASU). Lysozym ließ den Lumineszenzwert um den Faktor 1,3 bei RFM443(pASU) und um 1,5 bei UTL2(pASU) ansteigen.  $\text{KNO}_3$  wurde zugegeben, um außerhalb der Zelle höhere Ionenkonzentrationen zu erreichen. Diffusionslimitierungen sollten damit verhindert und die Aufnahme von 4-CBA erleichtert werden. 50 mM oder 150 mM dieser Substanz erhöhte die Lumineszenz mindestens 12 mal verglichen mit

Tab. 6: Die resuspendierten Zellen UTL2(pASU) und RFM443(pASU) wurden mit Alginat gemischt und die angegebenen Substanzen in der angegebenen Konzentration zugegeben. Nach Gelatisierung, Pufferzugabe und LB-Mediumzugabe wurde mit 3,6 mM 4-CBA induziert und die Lumineszenz nach 200 min gemessen. Lumineszenzzunahme wurde als Faktor bezogen auf die Lumineszenz des unbehandelten immobilisierten Stammes ausgedrückt.

	RFM443(pASU)	UTL2(pASU)
0,1 % Triton X-100	0,4	1,2
1 % SDS	0,8	0,6
0,45 % EtOH	1,0	1,2
0,15 % EtOH	1,2	1,2
150 mM KNO <sub>3</sub>	3,8	12,8
50 mM KNO <sub>3</sub>	4,5	12,9
300 µg/ml Lysozym	1,3	1,5
100 µg/ml Lysozym	1,3	1,5

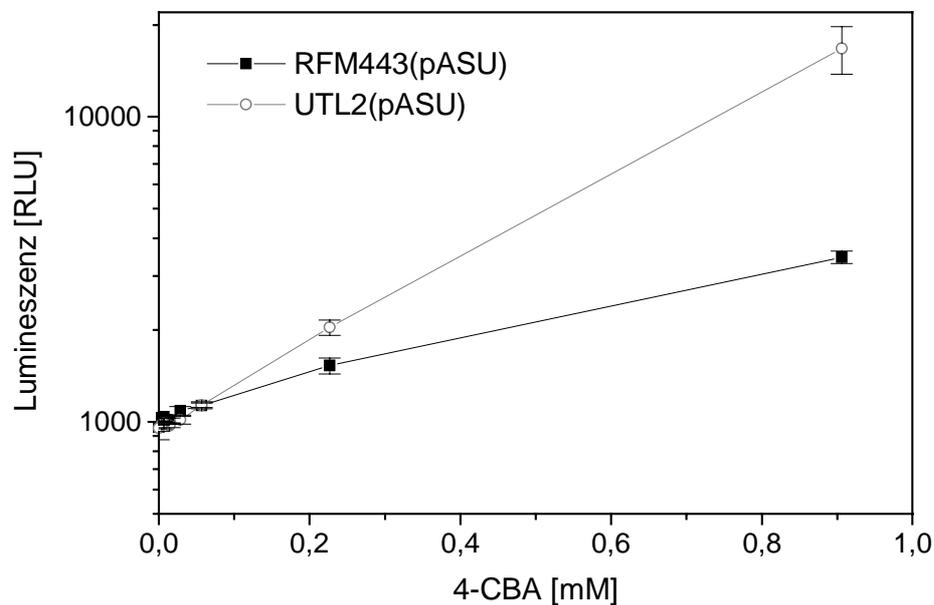


Abb. 19: Einfluß der 4-CBA Konzentration auf die Lumineszenz, wenn 150 mM KNO<sub>3</sub> der Immobilisierungsmatrix zugegeben und pH 6 eingestellt wurde. Stamm RFM443(pASU) und UTL2(pASU) wurden 200 min mit verschiedenen Konzentrationen 4-CBA inkubiert und die Lumineszenz gemessen.

---

der unbehandelten Probe von UTL2(pASU). Mit Stamm RFM443(pASU) trat nur eine 4,5 fache Erhöhung auf. Mit den optimierten Bedingungen pH 6 und 150 mM KNO<sub>3</sub> konnte das Detektionslimit für UTL2(pASU) auf 28 µM und für RFM443(pASU) auf 60 µM 4-CBA gesenkt werden (s. Abb. 19).

#### **5.1.4 Fazit des Reporterassays**

Die Immobilisierung der rekombinanten *E. coli* Stämme konnte mit Erfolg durchgeführt werden. Die Stärke des Reporterassays zur Bestimmung von 4-CBA lag deutlich in der hohen Spezifität. Mit den optimierten Parametern konnte 4-CBA in 200 min von 3,6 mM bis 28 µM bestimmt werden. Dies war eine deutliche Verbesserung gegenüber den freien Zellen.

## 5.2 Konzept des Repressor/DNA-Bindungstests zur Detektion von Tetrazyklin

Ein Assaysystem zur Detektion von Tetrazyklin sollte auf der Grundlage der Repressor/DNA-Wechselwirkung entwickelt werden. Der Tetrazyklin-Repressor bindet an die Operator-DNA. Ist Tetrazyklin anwesend tritt auf Grund der Komplexbildung des Repressors mit Tetrazyklin ein Konformationswechsel des Proteins ein, das den Abfall des Repressors von der Operator-DNA induziert. Dieser Abfall von der DNA sollte auf verschiedene Weisen detektiert werden können (s. Abb. 20):

- a) Ausgehend von der Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung könnte ein mit Biotin markiertes Operator-DNA-Fragment auf einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte immobilisiert werden. An diese immobilisierte DNA könnte der enzymatisch markierte Repressor gebunden werden. Das Markieren des mit dem Streptag(II) fusionierten Repressors würde erfolgen, indem er an ein mit Streptactin markiertes Enzym (z.B.  $\beta$ -Galaktosidase, Peroxidase) gebunden würde. Wird dem Repressor/DNA-Komplex Tetrazyklin zugesetzt, wird dadurch der Abfall des Repressors von der DNA erreicht. Die Bestimmung der Enzymaktivität des an der DNA zurückbleibenden Enzym/Repressor-Komplexes, würde ein umso kleineres Signal liefern, je mehr Tetrazyklin der Probe zugesetzt würde.
- b) Eine andere Alternative wäre, den Repressor adsorptiv auf einer Mikrotiterplatte zu immobilisieren und daran Tetrazyklin zu binden. Die Zugabe markierter DNA würde zur Bildung des Repressor/DNA-Komplexes der tetrazyklinfreien Repressoren führen. Würde die Enzymaktivität bestimmt, könnte ein zur Tetrazyklinkonzentration umgekehrt proportionales Signal der Enzymaktivität resultieren.

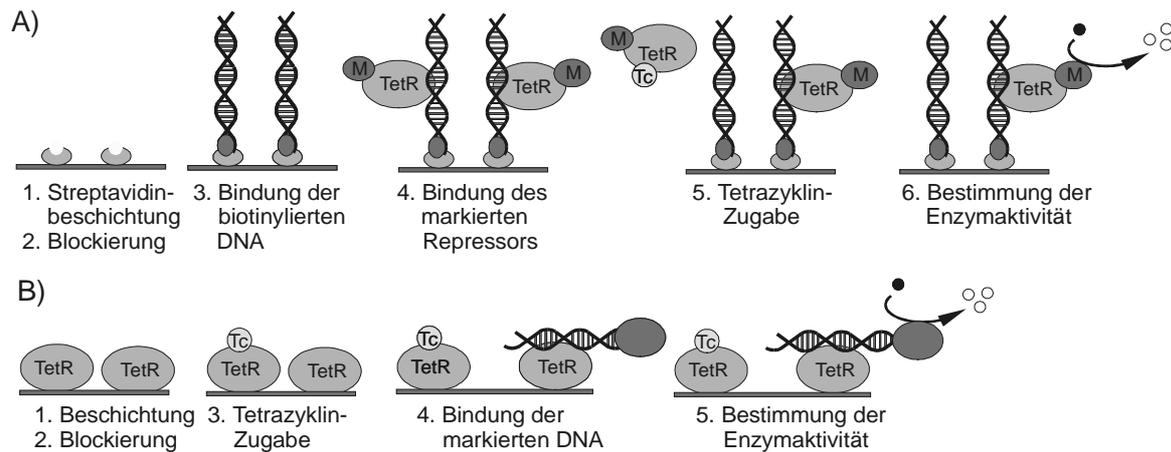


Abb. 20: Assaysysteme zur Detektion von Tetrazyklin. A) Die mit Streptavidin beschichtete Platte wird blockiert, danach wird die biotinylierte Operator-DNA gebunden. Im nächsten Schritt erfolgt die Bindung des enzymatisch markierten Repressors (M = Markierung). Nach Zugabe von Tetrazyklin löst sich dieser von der DNA und die Enzymaktivität der verbleibenden Repressoren kann bestimmt werden. B) Direkt nach der Beschichtung der Mikrotiterplatten mit TetR und Blockierung erfolgt die Tc-Bindung. Durch Zugabe von markierter DNA können die nicht an Tc gebundenen Repressoren mit der DNA in Wechselwirkung treten. Darauf erfolgt die enzymatische Bestimmung der gebundenen DNA.

Diese beiden hier theoretisch vorgestellten Möglichkeiten zur quantitativen Bestimmung von Tetrazyklin wurden durch einige Vorversuche mittels Gel-Mobility-Shift Assays auf ihre Realisierbarkeit geprüft. Die folgenden Untersuchungen sollten folgende Fragestellungen klären:

- a) Beeinflusst das Streptag(II) am Repressor die Repressor/DNA-Wechselwirkung?
- b) Beeinflusst die Bindung eines enzymatischen Markers (POD) an den Repressor die Repressor/DNA-Wechselwirkung?
- c) Beeinflusst der Marker an der biotinylierten DNA die Repressor/DNA-Wechselwirkung?

Zu Beginn der Assay-Entwicklung mußte der Repressor und der Operator bereitgestellt werden. Darauf erfolgte die Überprüfung der biologischen Funktionalität des Repressors im Gel-Mobility-Shift. Die Abb. 21 zeigt das Konzept zur Entwicklung des Mikrotiterplatten-Assays.

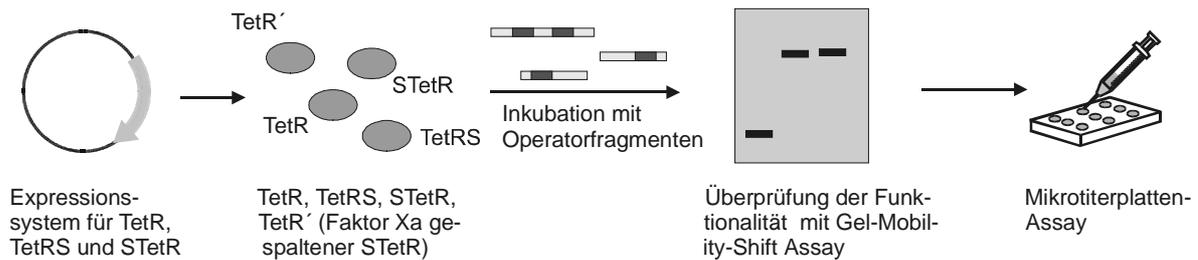


Abb. 21: Konzept zur Entwicklung des Mikrotiterplatten-Assays.

### 5.2.1 Klonierung, Expression und Reinigung des Tetrazyklin-Repressors

Aus dem Plasmid pASK-IBA-1CA wurde das Tetrazyklin-Repressorgen durch PCR isoliert. Als Expressionsvektor diente pCYTEXP1, der den hitzeinduzierbaren  $\lambda$ -Promotor enthält. Es wurden drei verschiedene Konstrukte zur Expression des Tet Repressors hergestellt. pCYTEXP1-TetR enthält den nativen Repressor. Um eine spätere Aufreinigung zu erleichtern, wurde die Sequenz des nativen Tet Repressors am 5'-Ende mit der Streptag(II) kodierenden Sequenz fusioniert. Zusätzlich wurde zwischen die Streptag(II)-Sequenz und die *tetR* Sequenz eine Protease-Restriktionsschnittstelle (Faktor Xa) eingeführt, die ein späteres Abspalten des Tags ermöglichen sollte. Dieses Konstrukt wurde als pCYTEXP1-STetR bezeichnet. Der Vektor pCYTEXP1-TetRS enthält am 3'-Ende des *tetR* Gens eine Streptag(II) kodierende Sequenz. Alle Konstrukte wurden durch DNA-Sequenzierung überprüft.

Die in den *E. coli* Wirt JM101 transformierten Konstrukte des Tetrazyklin-Repressors mit N-terminalem (STetR), C-terminalem (TetRS) oder ohne Streptag(II) (TetR) wurden auf die Expression des Repressors untersucht. Mit dem pCYTEXP1 Expressionssystem konnte eine Überexpression der gewünschten drei Proteine erreicht werden (s. Abb. 22). Die Aufreinigung der Streptag(II) enthaltenen Proteine wurde mittels Affinitätschromatographie mit einer Streptactin-Sepharose-Matrix durchgeführt (s. Abb. 22, Spur 5, 8). Aus Absorptionmessungen konnte berechnet werden, daß ca. 2,2 mg/g Pellet gereinigtes Protein isoliert wurden. Die Sequenz der gereinigten STetR, TetRS und des ungereinigten TetR Proteins wurden durch N-terminale Sequenzierung überprüft. Da die Fragmente in die *Bam*HI

und *EcoRI* Schnittstelle des Vektors pCYTEXP1 kloniert wurden, befanden sich am N-terminalen Ende der exprimierten Proteine TetR, STetR und TetRS 8 zusätzliche Aminosäuren, die nicht Bestandteil des nativen Repressors waren (s. Tab. 7). Durch den Verdau des gereinigten N-terminalen Streptag(II)-Repressor-Fusionsproteins STetR mit der Protease Faktor Xa konnte der native Repressor (TetR') hergestellt werden. Abb. 22 Spur 10 zeigt die erfolgreiche Spaltung des Tags durch eine Bande deren Mobilität höher war (Abb. 22, Spur 9).

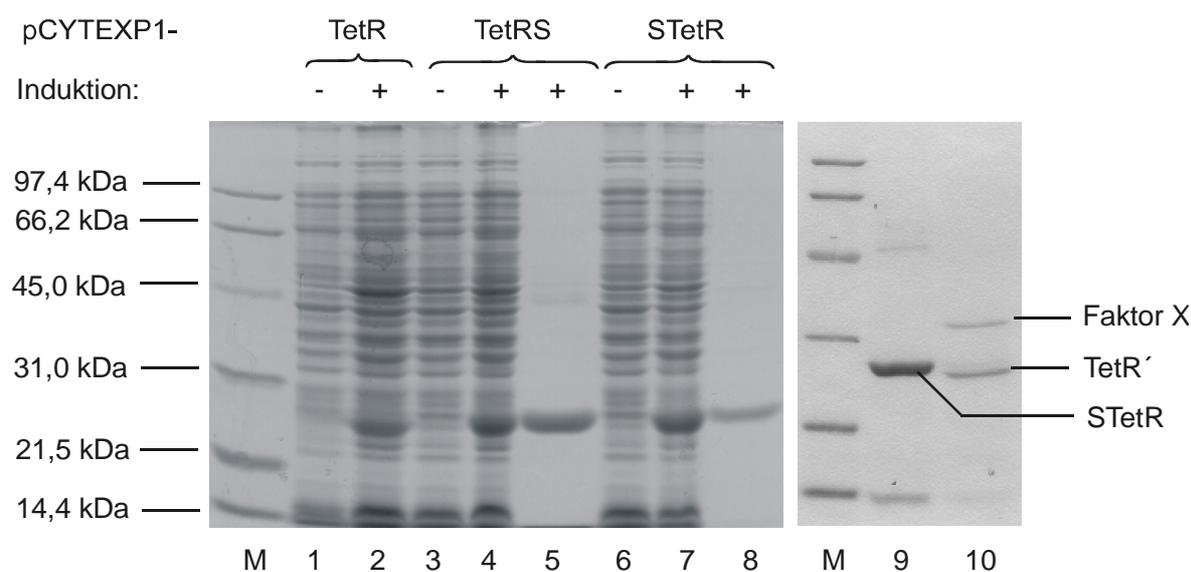


Abb. 22: SDS-PAGE der Expression von TetR, STetR und TetRS unter der Kontrolle des  $\lambda$ -Promotors. Die Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blue R-250 gefärbt. M: Proteinstandard; 1: pCYTEXP1-TetR vor Induktion; 2: pCYTEXP1-TetR nach Induktion; 3: pCYTEXP1-TetRS vor Induktion; 4: pCYTEXP1-TetRS nach Induktion; 5: pCYTEXP1-TetRS gereinigt; 6: pCYTEXP1-STetR vor Induktion; 7: pCYTEXP1-STetR nach Induktion; 8, 9: pCYTEXP1-STetR gereinigt; 10: pCYTEXP1-STetR gereinigt und mit der Protease Faktor Xa behandelt.

Tab. 7: Berechnete Molmasse und Aminosäuresequenz der exprimierten TetR, STetR und TetRS Repressoren. Kleine Buchstaben der Aminosäuren symbolisieren die zusätzlichen Aminosäuren, die durch die Klonierung der entsprechenden Gene in den Vektor pCYTEXP1 eingeführt wurden.

Protein	Masse (kDa)	Aminosäuresequenz
TetR	24,06	mactgtgsMSRL.....CESGS
STetR (Streptag(II), Faktor Xa Restriktionsschnittstelle, TetR)	25,69	mactgtgsMWSHPQFEKIEGRMSRLDKS....
TetRS (Streptag(II), TetR)	25,23	mactgtgsMSRL.....CESGSWSHPQFEK

## 5.2.2 MALDI-TOF zur Bestimmung der Molmasse des Tetrazyklin-Repressors

Zur Molmassenbestimmung von TetRS und STetR wurden MALDI-TOF Experimente mit den gereinigten Proteinen durchgeführt. Diese Experimente sollten Aufschluß geben, ob der Streptag(II) eine Protein-Dimerisierung verhindert. Nur Repressor-Dimere besitzen die Fähigkeit, an die Operator-DNA zu binden. Ein ausgeprägter Peak für die Monomere und nur ein kleiner für die Dimere konnte gemessen werden. Mit einem Fehler von weniger als 0,5 % konnte die Masse für STetR zu 25786 Da und für TetRS zu 25349 Da bestimmt werden (s. Abb. 23). TetR ließ sich wegen geringerer Reinheit nicht eindeutig bestimmen.

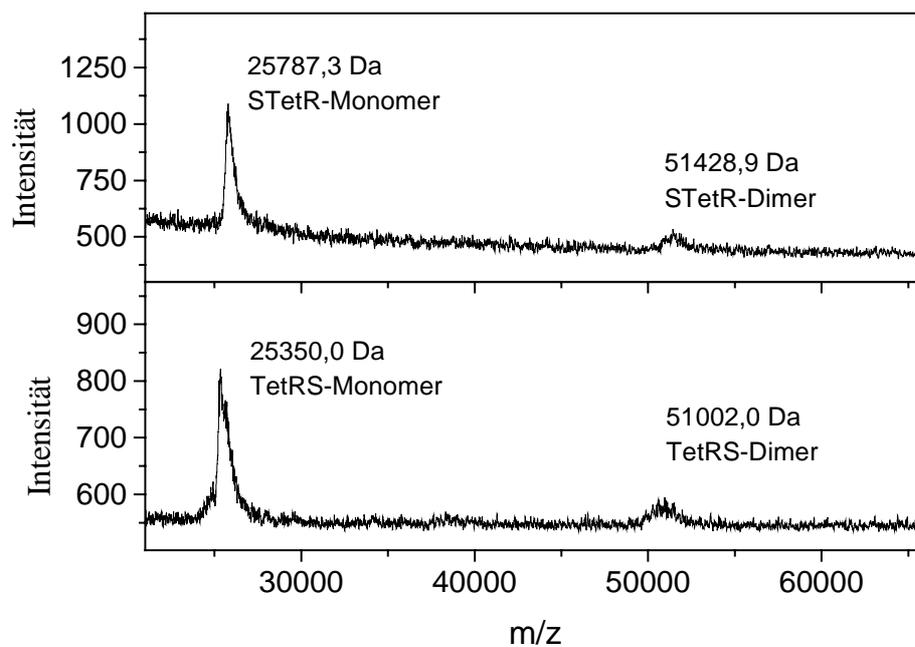


Abb. 23: MALDI-TOF Spektrum von TetRS und STetR

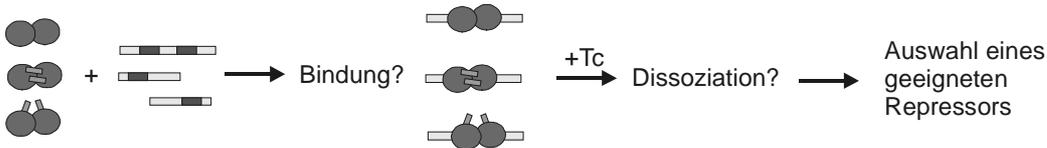
### 5.3 Gel-Mobility-Shift Assay zur Entwicklung eines Assays für Tetrazyklin

Die exprimierten Proteine TetR, STetR und TetRS wurden auf ihre Bindungsfähigkeit an den Operator untersucht. Zunächst wurde die Bindung an den palindromischen Operator O1+O2 getestet. Dieser besitzt die beiden Bindungsstellen O1 und O2, die jeweils ein Repressordimer binden können. Zusätzlich wurden auch die Bindungen an die einzelnen Operator-Fragmente O1 bzw. O2 untersucht. Als erstes sollte geklärt werden, ob die Tags die Bindung des Repressors an die DNA beeinflussen. Deshalb wurden die Operator/Repressor-Bindungseigenschaften mittels Gel-Mobility-Shift Assays analysiert. Die geeigneten Konzentrationen des Operators, Repressors und des Tetrazyklins mußten für jede Versuchsreihe neu getestet werden, da wiederholtes Auftauen und Einfrieren die Aktivität des Repressors veränderte. Deshalb treten unterschiedliche Tetrazyklinkonzentrationen in den folgenden Versuchsbeschreibungen auf. Alle drei Fragmente (O1, O2, O1+O2) wurden untersucht, um Vergleiche im Bindungsverhalten ziehen zu können. Zusätzlich wurde der Einfluß eines an die DNA endständig gebundenen Enzyms, eines DNA Markers, auf eventuell auftretende sterische Hinderungen geprüft. Dieser enzymatische Marker wurde an das Biotin markierte Fragment über Streptavidin-Wechselwirkung gekoppelt. Es wurden Untersuchungen mit unterschiedlich langen Operator-Fragmenten vorgenommen, bei denen der Abstand zwischen Enzym und Operatorbindungsstelle von 100 bp auf 200 bp verlängert wurde. Für den späteren Einsatz im Assay scheinen die einzelnen Operator-Fragmente geeigneter, da so Konkurrenzreaktionen zwischen den einzelnen Operator-Sequenzen verhindert werden. Die Repressorbindungsstelle O2 besitzt eine höhere Affinität zum Tet Repressor als die Sequenz O1, weshalb sie für die Assay-Entwicklung ausgewählt wurde. Mit diesem Fragment wurden deshalb zusätzliche Experimente, wie die Variation des enzymatischen Markers und die Variation der Reihenfolge Zugabe der Reagenzien durchgeführt. In Tab. 8 werden die in dieser Arbeit untersuchten Komplexe aufgeführt. Die Abb. 24 zeigt ein Schema der Untersuchungen der Komplexe zwischen den verschiedenen Operator-Fragmenten und den Tet Repressoren.

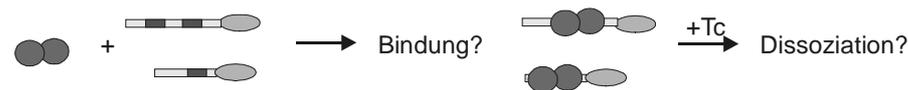
Tab. 8: Übersicht über die untersuchten Komplexe der Operatoren O1+O2, O1, O2, O12w (w = der Abstand zwischen Marker und Operator betrug nicht wie sonst 100 bp, sondern 200 bp) und O2w mit den Repressoren TetR, STetR, TetRS und TetR' (STetR Faktor Xa gespalten). Es wurden teilweise enzymatische Marker an die DNA gebunden und der Einfluß der Tetrazyklin-Zugabe getestet. TetRS, STetR und TetR wurden als ungeereinigte Rohextrakte verwendet, während TetR' gereinigt eingesetzt wurde.

Fragestellung	Operator	Repressor	Marker	Tc	Kapitel
Einfluß der Tags auf Operator-Bindung	O1+O2	TetR, STetR, TetRS	-	-	5.3.2
Dissoziation Repressoren von Operator durch Tc-Zugabe	O1+O2	TetR, STetR, TetRS, TetR'	-	+	5.3.3
Verschiedene Tc-Konzentrationen	O1+O2, O1, O2	TetR	-	+	5.3.3
Vergleich der Bindungseigenschaften der Repressoren	O1+O2, O1, O2	TetR, STetR, TetRS	-	-	5.3.4
Einfluß eines Markers	O1+O2	TetR'	β-Gal.	+	5.3.5
Einfluß eines Markers	O2	TetR'	β-Gal.	+	5.3.6
Einfluß der Distanz zwischen Promotor und Marker	O1+O2, O12w, O2, O2w	TetR'	β-Gal.	+	5.3.7
Einfluß verschiedener Marker	O2	TetR'	Ab-POD, Strep-POD	+	5.3.8

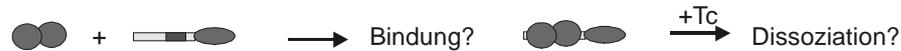
Bindungsverhalten von STetR, TetRS, TetR und TetR' an O1, O2 und O1+O2:



Enzymatische Markierung des DNA-Fragmentes:



Variation des Markers:



Vergrößerung Abstand: Marker und Operator:

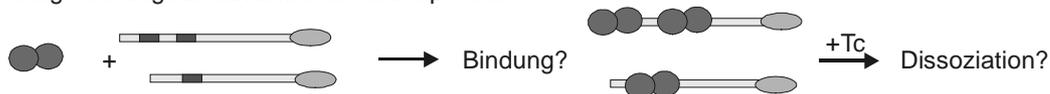


Abb. 24: Untersuchte Komplexe zwischen den Operator-Fragmenten O1+O2, O1, O2, O12w und O2 und den Repressoren TetR, STetR, TetRS, TetR' mit oder ohne endständig gebundenen Marker. Aus Platzgründen wurden nicht alle möglichen Bindungen gezeigt.

### 5.3.1 Fluoreszenzmarkierung der Operator-Fragmente

Zur Bestimmung der Operator-Repressor Bindungseigenschaften der Proteine TetR, STetR, STetR und TetRS wurden Gel-Mobility-Shift Assays durchgeführt. Aus dem Vektor pASK-IBA-1CA wurden verschiedene Cy5 bzw. Cy5 und Biotin markierte Operator-Fragmente herausamplifiziert. Tab. 9 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Operator-Fragmente, ihre Länge und die verwendete Markierung.

Tab. 9: Zur Amplifikation aus pASK-IBA-1CA und Markierung der Operator-Fragmente verwendete Primer und die Größe der PCR-Produkte. Bei O12w und O2w betrug der Abstand zwischen Operator und Marker anstatt 100 bp 200 bp.

Operator	Primer 1	Primer 2	Modifikation	Größe
O1+O2	Cy5-TR1	Cy5-TR2	Cy5	256 bp
O1	Cy5-TR1	Cy5-TR3	Cy5	127 bp
O2	Cy5-TR4	Cy5-TR2	Cy5	130 bp
O1+O2	Cy5-TR1	B-TR2	Cy5, Biotin	256 bp
O12w	Cy5-TR1	B-TR5	Cy5, Biotin	356 bp
O2	Cy5-TR4	B-TR2	Cy5, Biotin	130 bp
O2w	Cy5-TR4	B-TR5	Cy5, Biotin	230 bp

### 5.3.2 Bindung von STetR, TetRS und TetR an O1+O2

Zellrohextrakte nach Expression der Proteine TetR, STetR und TetRS wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, an die Cy5 markierte Operator-DNA O1+O2 zu binden. Abb. 25 zeigt Gel-Mobility-Shift Assays mit ansteigender Proteinkonzentration und gleichbleibender Operator-Konzentration O1+O2. Sowohl mit den Streptag(II) Fusionsproteinen als auch mit dem nativen Repressor (ohne Tag) konnte DNA-Bindung erreicht werden. Das zeigt sich im Shift der Banden in Abb. 25 in Spur A3, B4 und C6. Die Kontrolle, bei der Zellrohextrakt ohne exprimierten Repressor mit Operator inkubiert wurde, zeigt Abb. 26.

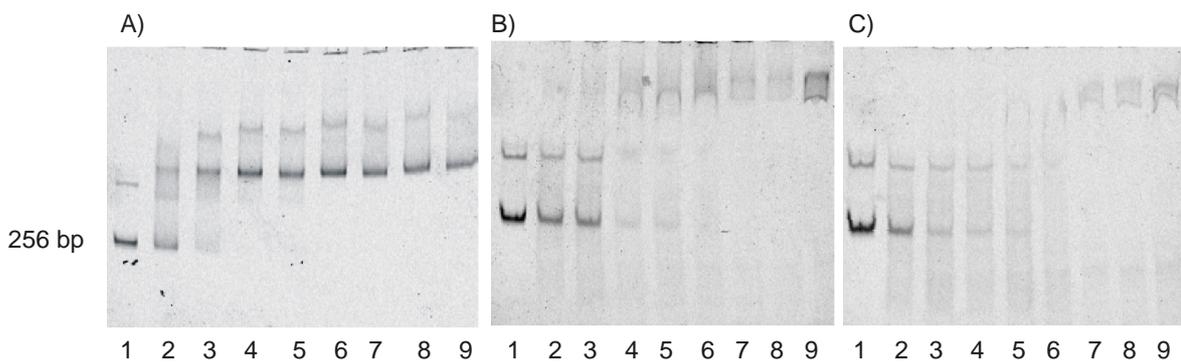


Abb. 25: Titrationsexperiment des Cy5 markierten O1+O2 DNA Fragments mit Zellrohextrakt aus TetR (A), TetRS (B) und STetR (C) exprimiert in *E. coli*. Der Reaktionsansatz wurde in einem 6 % igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Banden wurden durch einscannen mit einem Phosphoimager sichtbar gemacht. Verwendete  $\mu$ l Zellextrakt: Spuren: 1: 0; 2: 0,2; 3: 0,4; 4: 0,6; 5: 0,8; 6: 1; 7: 2; 8: 3; 9: 4, die in einem konstanten Volumen von 10  $\mu$ l inkubiert wurden.

In einem weiteren Experiment wurde geprüft, ob die Zugabe von Tetracyclin das Ablösen des Repressors von der DNA ermöglicht. Dazu wurden die Proteine TetR, STetR und TetRS aus dem Rohextrakt eingesetzt, sowie das gereinigte und Faktor Xa gespaltene Protein STetR (TetR'). Aus Abb. 26 ist ersichtlich, daß nur für die nicht mit Streptag(II) versehenen Proteine eine Dissoziation von der DNA möglich war (Abb. 26, Spur 7, 9), da nur hier das 256 bp Fragment des freien Operators O1+O2 nachgewiesen werden konnte. Die Komplexe des Operators mit TetR oder TetR' (Abb. 26, Spur 7, 8) hatten vermutlich aufgrund des Unterschiedes von 8 Aminosäuren, um die TetR größer als TetR' ist, etwas unterschiedliche Mobilität. Um unspezifische Bindungen von Fremdproteinen des Zellextrakts auszuschließen, wurde als Kontrolle ein Rohextrakt aus *E. coli* Zellen hergestellt, die den Vektor pCYTEXP1 ohne Insert enthielten. Wie erwartet war keine Bindung sichtbar (Abb. 26, Spur 10). Als weitere Kontrolle wurde 1 mg/ml BSA zur Cy5 markierten DNA gegeben (Abb. 26, Spur 11). Auch hier zeigte sich keine Änderung in der Mobilität der freien Operator-Bande. Dieses Experiment zeigte, daß der Streptag(II) nicht zur Markierung in dem später zu entwickelnden Mikrotiterplatten-Assay verwendet werden kann.

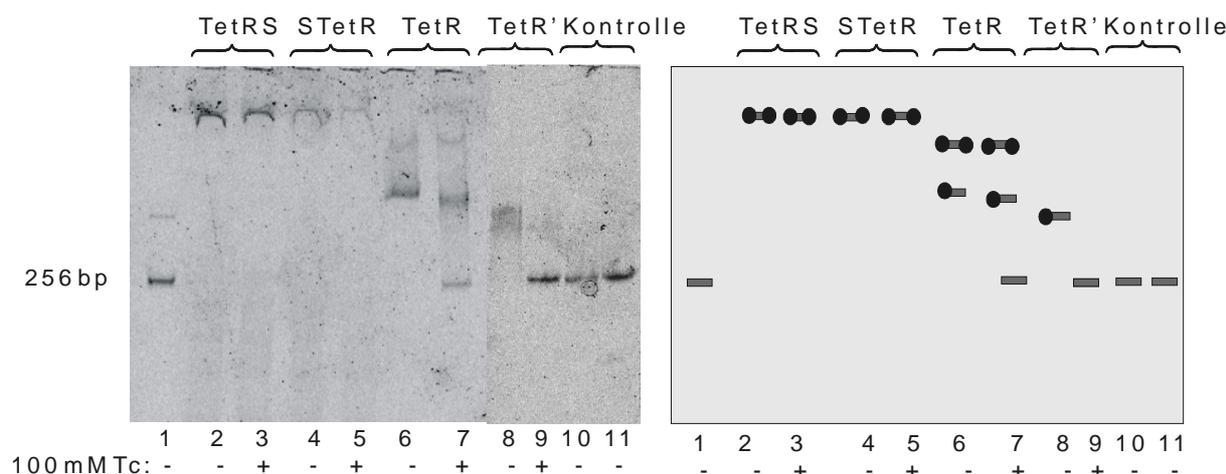


Abb. 26: Analyse der Wechselwirkung von TetR, TetR', STetR und TetRS mit dem Cy5 markierten palindromischen Operator O1+O2. Zellextrakte von *E. coli* Zellen, die TetR, STetR und TetRS exprimieren, wurden zusammen mit dem Operator-Fragment inkubiert. Zusätzlich wurden gereinigtes und Faktor Xa verdautes Protein von STetR eingesetzt (Spur 8, 9). Die Dissoziation des Repressors vom Operator O1+O2 wurde durch Zugabe von 0,1 M Tc (+) induziert. Als Negativkontrolle dienten Zellextrakte von *E. coli* (pCYTEXP1) (Spur 10) und 1 mg/ml BSA (Spur 11). Die Reaktionsansätze wurden in einem 6 % igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Im rechten Schema sind die vermuteten Komplexe dargestellt. Der graue Balken symbolisiert das Operator-Fragment, die schwarzen Kugeln stehen für den Repressor.

### 5.3.3 Tetrazyklinzugabe zum Repressor/Operator-Komplex

Da der TetR ohne Streptag(II) in der Lage war, nach Tc-Zugabe von dem Operator zu dissoziieren, wurde in den folgenden Experimenten die minimale Tc-Konzentration bestimmt, die unter den gegebenen Bedingungen nötig war, um den Repressor von der DNA zu lösen. Hierfür wurden dem gebildeten Repressor/DNA-Komplex unterschiedliche Konzentrationen an Tetrazyklin ( $10^{-3}$ - $10^{-15}$  M) zugegeben. Mit einer Tetrazyklinkonzentration von  $10^{-5}$  M (Abb. 27 A, Spur 3) konnte der Repressor von dem Operator O1+O2 abgelöst werden. Für den Komplex mit O1 waren dazu  $10^{-9}$  M (Abb. 27 B, Spur 5) und für O2  $10^{-7}$  M (Abb. 27 C, Spur 4) nötig.

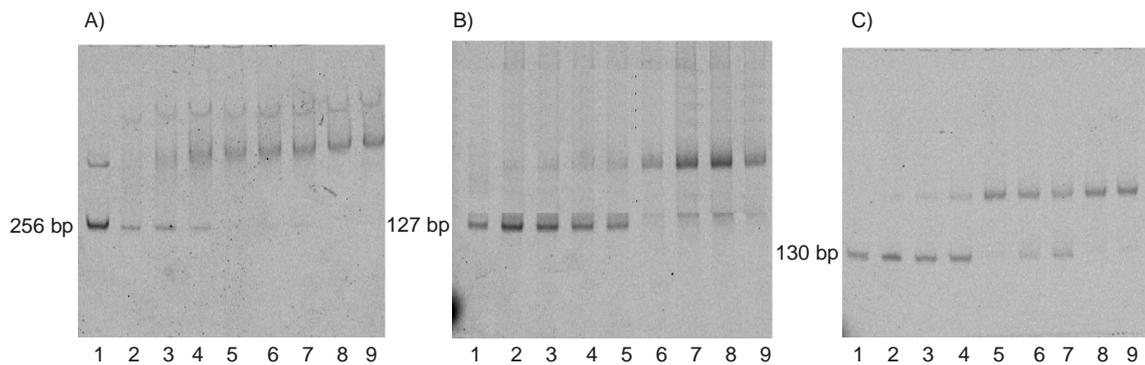


Abb. 27: Den TetR/DNA-Komplexen TetR/O1+O2 (A), TetR/O1 (B) und TetR/O2 (C) wurden ansteigende Tc-Konzentrationen zugegeben. Der Reaktionsmix wurde in einem 6 % igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Banden durch einen Phosphoimager sichtbar gemacht. Spur 1: Operator ohne TetR; Tc-Konzentrationen in mol/l 1: 0; 2:  $10^{-3}$ ; 3:  $10^{-5}$ ; 4:  $10^{-7}$ ; 5:  $10^{-9}$ ; 6:  $10^{-11}$ ; 7:  $10^{-13}$ ; 8:  $10^{-15}$ ; 9: 0.

### 5.3.4 Bindung von STetR, TetRS, and TetR an die Operator-Sequenzen: O1+O2, O1 oder O2

Die Bindungseigenschaften der Repressoren TetR, STetR, TetRS an die palindromische Operator-Sequenz O1+O2 und an die einzelnen Operator-Sequenzen O1 und O2 wurden untersucht. Bindet TetR an den palindromischen Operator O1+O2 sind zwei Banden mit unterschiedlicher Mobilität sichtbar (Abb. 28, Spur 4). Die Bande mit geringerer Mobilität würde dann durch die zusätzliche Repressor-Bindung der zweiten Bindungsstelle zustande kommen. Bindung von TetR an die einzelnen Operator-Sequenzen O1 (Abb. 28, Spur 5) oder O2 (Abb. 28, Spur 6) führten zu nur einer Bande. Wurden die Proteine STetR oder TetRS an die einzelnen Operator-Sequenzen O1 oder O2 gebunden, ergab sich eine Bande (Abb. 28, Spur 8, 9, 11, 12), die in ihrer Mobilität der Bindung an die palindromische Operator-Sequenz entsprach (Abb. 28, Spur 7, 10). Die Mobilität dieser Bande war ein wenig geringer als die des TetR/O1+O2 Operator-Komplexes (Abb. 28, Spur 4). Erwartet wurde der gleiche Shift wie in Abb. 28 Spur 5 und 6, da nur eine Bindungsstelle für den Repressor vorhanden ist.

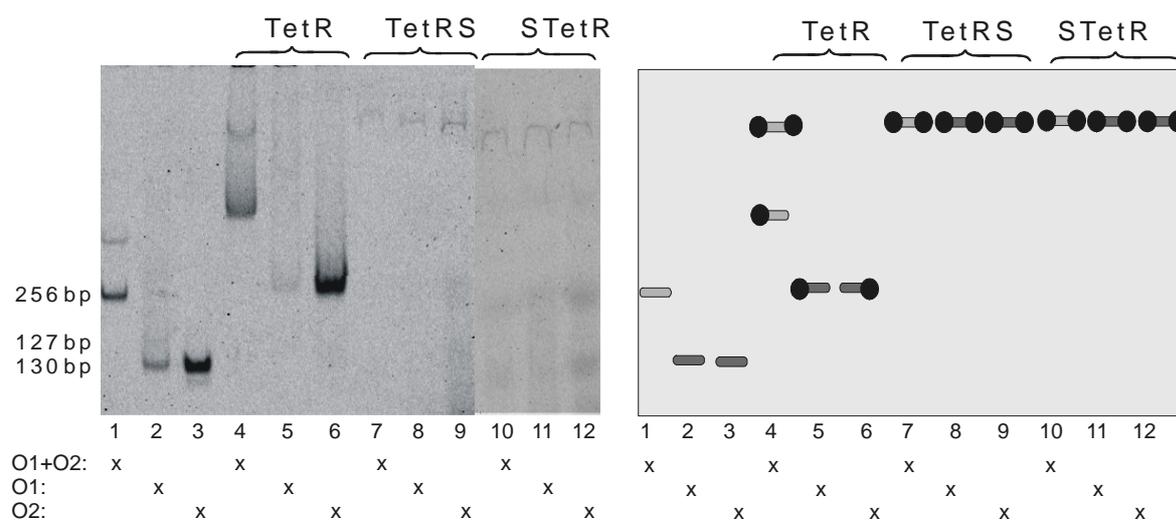


Abb. 28: 6 % iges Polyacrylamidgel zur Analyse der TetR, TetRS und TetRS Wechselwirkung mit den Cy5 markierten Operator-Sequenzen O1+O2 (Spuren 1, 4, 7, 10) und der einzelnen *tet* Operatoren O1 (Spuren 2, 5, 8, 11) und O2 (Spuren 3, 6, 9, 12). In dem rechten Schema sind die vermuteten Komplexe dargestellt. Der graue Balken symbolisiert das Operator-Fragment, die schwarzen Kugeln stehen für den Repressor.

### 5.3.5 Bindungseigenschaften von TetR' an $\beta$ -Galaktosidase markierten Operator O1+O2

Für den zu entwickelnden Assay im Mikrotiterplattenformat mußte die DNA markiert werden. Da die Fluoreszenzintensität des Cy5 Markers nicht ausreichte, in den zur verfügbaren Mikrotiterplattenlesegeräten detektiert zu werden, wurde eine enzymatische Markierung gewählt. Aus diesem Grund erfolgte die Untersuchung des Einflusses eines an das DNA-Ende gebundenen Enzyms auf die Repressor/Operator-Bindung durch Gel-Mobility-Shift Assays. In den ausgeführten Experimenten wurde an die biotinylierte und Cy5 markierte DNA zuerst ein  $\beta$ -Galaktosidase-Streptavidin-Konjugat ( $\beta$ -Gal.) und danach der Repressor gebunden. Zum Vergleich wurden auch Versuche durchgeführt bei denen zuerst die DNA/Repressor Bindung ermöglicht, und dann die DNA enzymatisch markiert wurde. In allen Experimenten fand der gereinigte und Faktor Xa gesplante Repressor STetR (TetR') Verwendung, da im Mikrotiterplatten-Assay auch dieses Protein eingesetzt werden sollte. Bindung des Repressors an die  $\beta$ -Galaktosidase markierte O1+O2 DNA war möglich (Abb. 29, Spur 5). Es waren zwei Banden sichtbar. Eine kam vermutlich durch die Repressor-Bindung an enzymatisch unmarkierte DNA zustande und die an-

dere durch die Repressor-Bindung an enzymatisch markierte DNA. (Abb. 29, Spur 5). Repressor/Operator Dissoziationsexperimente mit Tetrazyklin zeigten zusätzlich zur Freisetzung des Repressors von der DNA auch die Dissoziation der  $\beta$ -Galaktosidase-Markierung, da nur das freie O1+O2 Fragment nachweisbar war (Abb. 29, Spur 6). Die Bande des nicht enzymatisch gebundenen Repressor/Operator-Komplexes verschwand ganz, während die Bande des enzymatisch gebundenen Repressor/Operator-Komplexes an Intensität verlor. Der Einfluß von Tetrazyklin auf die  $\beta$ -Galaktosidase/DNA Bindung wurde getestet. Hierzu wurde zu  $\beta$ -Galaktosidase markierter O1+O2 Operator-DNA Tetrazyklin gegeben (Abb. 29, Spur 9). Die Banden sollten, wenn Tetrazyklinzugabe keinen Einfluß hat, denen in Spur 4 entsprechen. Der Einfluß von Tetrazyklin allein, ohne die Anwesenheit eines Repressors, erschien auf die Bindung unbedeutend, da dadurch kein Abspalten des Enzyms nachgewiesen werden konnte (Abb. 29, Spur 9). In dem gleichen Experiment wurde zuerst der Repressor an die Operator-DNA gebunden. Danach erfolgte die Markierung der DNA

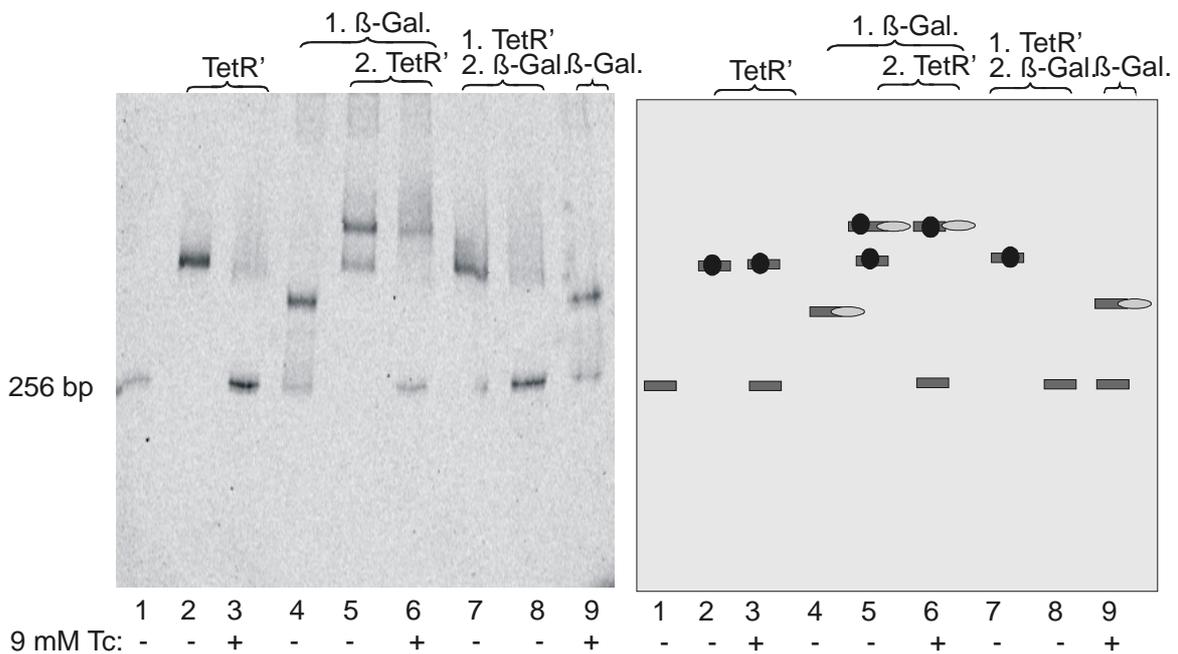


Abb. 29: Bindungsstudien des Faktor Xa gespaltenen STetR (TetR') an  $\beta$ -Galaktosidase und Cy5 markierte O1+O2 Operator-DNA. Spur 4-6: der Operator wurde zuerst mit  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal.) markiert, bevor mit TetR inkubiert wurde. Spur 7-8: der Repressor wurde an den Operator gebunden, gefolgt von  $\beta$ -Galaktosidase Markierung. Mit 9 mM Tc Lösung wurde die Induktion des Repressors durchgeführt. Spur 1: O1+O2; 2: O1+O2 + TetR'; 3: O1+O2 + TetR' + Tc; 4: O1+O2- $\beta$ -Gal.; 5, 7: O1+O2- $\beta$ -Gal. + TetR'; 6, 8: O1+O2- $\beta$ -Gal. + TetR' + Tc; 9:  $\beta$ -Gal. + Tc. In dem rechten Schema sind die vermuteten Komplexe dargestellt. Der graue Balken symbolisiert das Operator-Fragment, die schwarzen Kugeln stehen für den Repressor und die grauen Ellipsen symbolisieren die  $\beta$ -Galaktosidase.

mit  $\beta$ -Galaktosidase (Abb. 29, Spur 7, 8). Die Markierung der bereits an den Repressor gebundenen DNA mit  $\beta$ -Galaktosidase war nicht möglich (Abb. 29, Spur 7, 8). Dies bedeutet für den Mikrotiterplatten-Assay, daß die Operator-DNA vor der Bindung an den Repressor markiert werden muß.

### 5.3.6 Bindungseigenschaften von TetR' an $\beta$ -Galaktosidase markierten Operator O2

Die Eigenschaften des  $\beta$ -Galaktosidase markierten Operator-Fragmentes O2 mit nur einer Bindestelle für den Repressor, wurden bezüglich Repressorbindungsverhalten ebenfalls getestet. Abb. 30 zeigt in Spur 4, daß TetR' an den markierten Operator O2 band. In Spur 5 wurde mit Tc ein teilweises Ablösen des Markers sowie des Repressors durch das Auftreten der Bande bei 130 bp sichtbar. Dies bedeutete keine signifikanten Unterschiede im

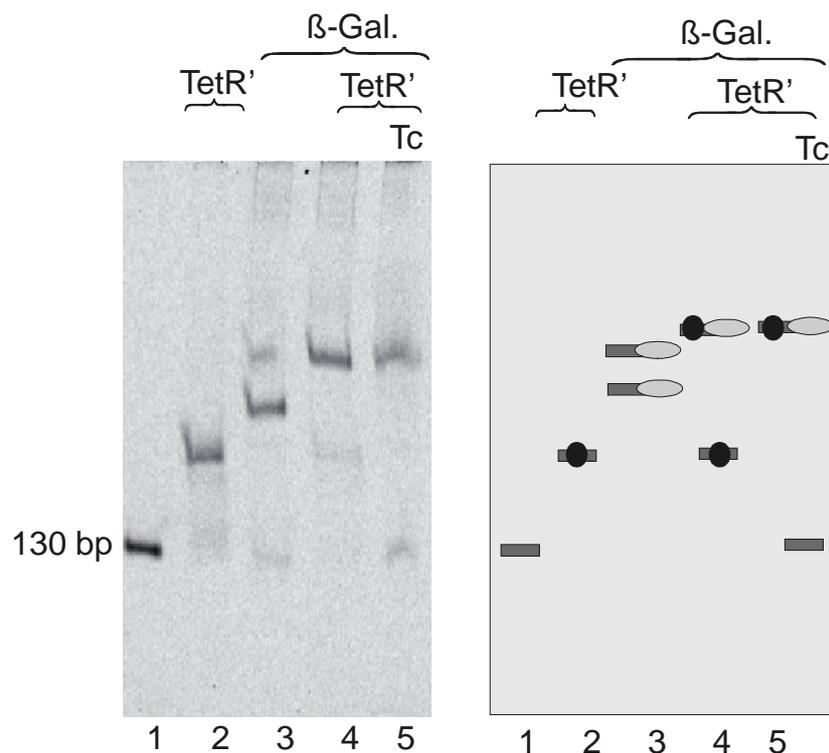


Abb. 30: Bindungsstudien des Faktor Xa gespaltenen STetR (TetR') an  $\beta$ -Galaktosidase und Cy5 markierte O2 Operator-DNA. Spur 1: O2; 2: O2 + TetR'; 3: O2- $\beta$ -Gal.; 4: O2- $\beta$ -Gal. + TetR'; 5: O2- $\beta$ -Gal. + TetR' + Tc. Die Tc-Konzentration betrug 18 mM. In dem rechten Schema sind die vermuteten Komplexe dargestellt. Der graue Balken symbolisiert das Operator-Fragment, die schwarzen Kugeln stehen für den Repressor und die grauen Ellipsen symbolisieren die  $\beta$ -Galaktosidase.

Bindungsverhalten zwischen dem markierten Operator O1+O2 und O2. Abb. 30, Spur 3 zeigt die Bindung der  $\beta$ -Galaktosidase an O2. Es traten zwei Banden auf, die vermutlich beide dieser Bindung zugeordnet werden können. Dieser Effekt wurde in Kapitel 5.3.8 ebenfalls beobachtet.

### **5.3.7 Erhöhung des Abstandes Operator und $\beta$ -Galaktosidase Markierung**

Der Abstand zwischen Repressorbindungsstelle und  $\beta$ -Galaktosidase-Markierung wurde von 100 bp auf 200 bp durch Vergrößern des PCR-Produktes erweitert. Dadurch sollte getestet werden, ob das Ablösen des Repressors durch Tetrazyklinzugabe ebenfalls die  $\beta$ -Galaktosidase-Bindung beeinflusst. Dafür wurde ein 356 bp Operator-Fragment für O1+O2 (O12w) (Abb. 31, Spur 5) und ein 230 bp für O2 (O2w) (Abb. 31, Spur 13) amplifiziert und mit den kurzen Fragmenten 256 bp O1+O2 (Abb. 31, Spur 1) und 130 bp O2 (Abb. 31, Spur 9) verglichen. Für alle Operator-Fragmente konnte die Bindung der  $\beta$ -Galaktosidase an Biotin markierte DNA gezeigt werden (Abb. 31, Spur 2, 6, 10, 14). Ebenso war die Bindung des Tetrazyklin-Repressors an die Operator-DNA möglich (Abb. 31, Spur 3, 7, 11, 15). Für die längeren Operator-Fragmente stellte sich die Dissoziation des Repressors von der DNA als schwieriger induzierbar heraus (Abb. 31, Spur 8, 16), da die Banden des Repressor/DNA-Komplexes bei gleicher Konzentration von Repressor und Operator verglichen mit den Spuren 4 und 12 weniger stark abnahmen. Bei den langen Operator-Fragmenten (Abb. 31, Spur 8, 16) konnte im Gegensatz zu den kurzen Fragmenten (Abb. 31, Spur 4, 12) kein Ablösen des  $\beta$ -Galaktosidase-Markers durch Tetrazyklinzugabe nach Repressorbindung festgestellt werden.

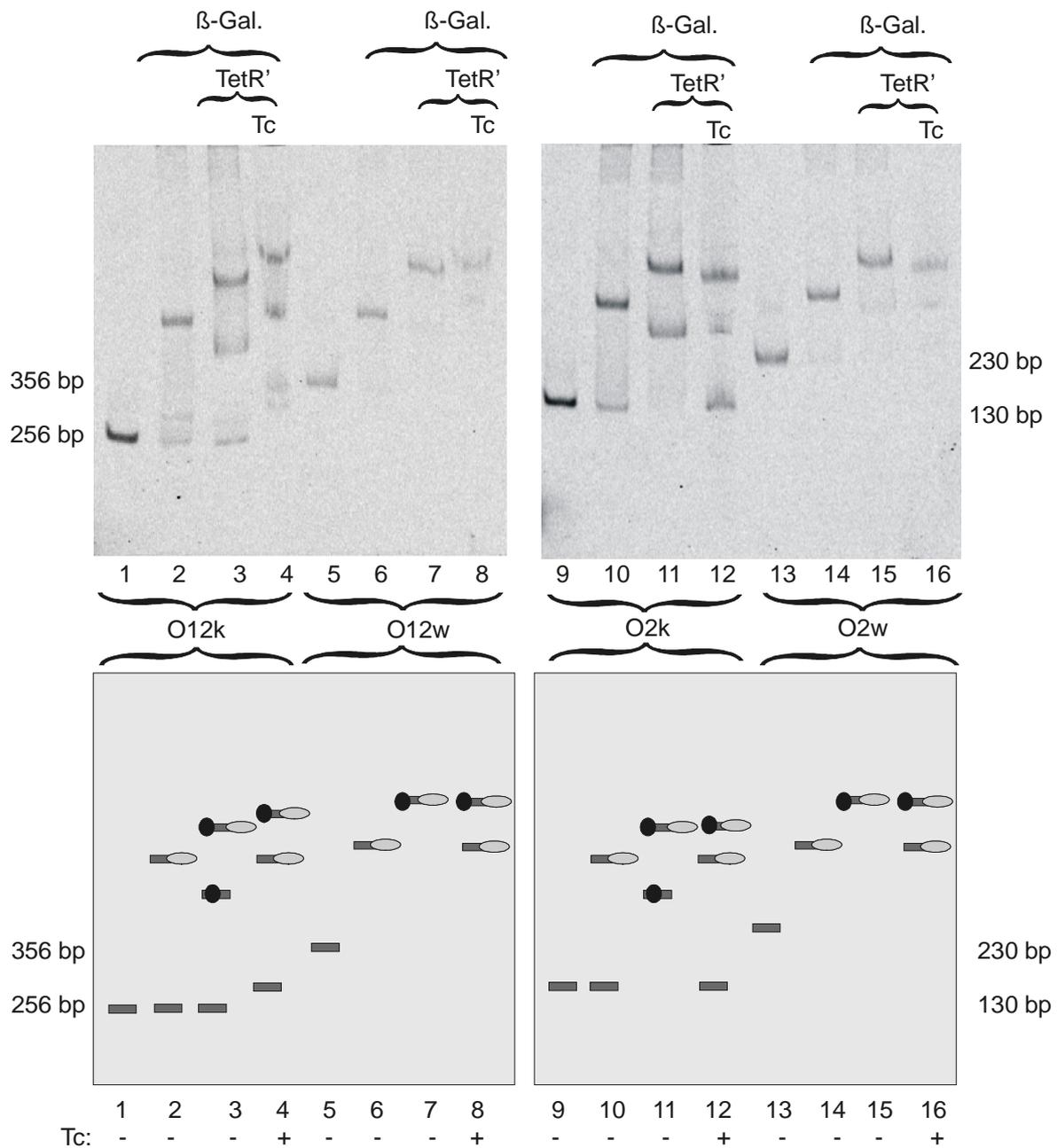


Abb. 31: Polyacrylamidgel zur Analyse der Bindung des Tet Repressors (TetR') an ein 356 bp (O12w) und ein 256 bp (O12k) Cy5 und Biotin markiertes DNA Fragment, das die Operatoren O1 und O2 enthält (links). Bindung des Tet Repressors (TetR') an ein 230 pb (O2w) und 130 pb (O2k) Cy5 und Biotin markiertes DNA Fragment, das den Operator O2 enthält (rechts). W: Abstand von Repressorbindungsstelle und Markierung ist 200 bp. K: Abstand von Repressorbindungsstelle und Markierung ist 100 bp. Spur 1: O12k; 2: O12k-β-Gal.; 3: O12k-β-Gal. + TetR'; 4: O12k-β-Gal. + TetR' + Tc; 5: O12w; 6: O12w-β-Gal.; 7: O12w-β-Gal. + TetR'; 8: O12w-β-Gal. + TetR' + Tc; 9: O2k; 10: O2k-β-Gal.; 11: O2k-β-Gal. + TetR'; 12: O2k-β-Gal. + TetR' + Tc; 13: O2w; 14: O2w-β-Gal.; 15: O2w-β-Gal. + TetR'; 16: O2w-β-Gal. + TetR' + Tc. Die Tetrazyklinkonzentration betrug 16 mM in Spur 4+8 und 21 mM in Spur 12+16. Um eine Ablösung des Repressors zu erreichen waren für die weite Distanz größere Tc-Konzentrationen nötig. In den unteren Schemata sind die vermuteten Komplexe dargestellt. Der graue Balken symbolisiert das Operator-Fragment, die schwarzen Kugeln stehen für den Repressor und die grauen Ellipsen symbolisieren die β-Galaktosidase.

### 5.3.8 Variation des enzymatischen DNA Markers

An Stelle von  $\beta$ -Galaktosidase wurde ein Streptavidin-POD Konjugat (Strep-POD), das aufgrund der Biotin-Streptavidin Wechselwirkung an die biotinylierte O2 DNA binden kann und ein Anti-Biotin-POD-Antikörper (Ab-POD) zur Markierung von O2 eingesetzt. Mit diesem Experiment sollte untersucht werden, ob sich diese Markierungen durch die Freisetzung des Repressors nach Tetrazyklinzugabe ebenfalls von der DNA ablösen. Das Antikörperkonjugat hatte an der O2 DNA nur teilweise gebunden (Abb. 32, Spur 3). Unerklärlicherweise waren zwei Banden der markierten O2 DNA sichtbar. Da in Spur 1 schon zwei Banden auftraten, konnte vermutet werden, daß das Antikörperkonjugat an beide DNA-Fragmente gebunden hatte. Unklar blieb wodurch die Bande mit höherer Mobilität in Spur 1 verursacht wurde. Dieser Effekt wurde auch in anderen Fällen beobachtet (Abb. 25; Abb. 27, Spur 1A; Abb. 28, Spur 1). Das Auftreten von zwei Banden konnte in Spur 2 bei der Bindung von TetR' an O2 auch beobachtet werden. Bindet nun Repressor TetR' an den Antikörper markierten Operator O2 (Abb. 32, Spur 4) war Bindung möglich. Zugabe von Tetrazyklin führte zum Ablösen des Repressors. Dies war in dem Auftreten der Banden der markierten O2 DNA sichtbar (Abb. 32, Spur 5). Wurde Streptavidin markierte POD als Marker benutzt, waren auch hier zwei Banden erkennbar, deren Zustandekommen durch den markierten Operator O2 denkbar war (Abb. 32, Spur 6). Bindung mit TetR' ergab eine Bindung an den Operator, der mit einem Strep-POD Enzym markiert war (Abb. 32, Spur 7), während markierter Operator O2 ungebunden blieb. Tetrazyklinzugabe löste TetR' teilweise von O2 ab. Dies wurde durch das Auftreten von Banden sichtbar, die durch markierten O2 zustande kamen (Abb. 32, Spur 8). Die geringe Tetrazyklinkonzentration löste den Repressor nicht komplett vom Operator O2. Aus diesem Experiment ergab sich die bessere Eignung von Strep-POD und Ab-POD zur Markierung der DNA gegenüber  $\beta$ -Galaktosidase.

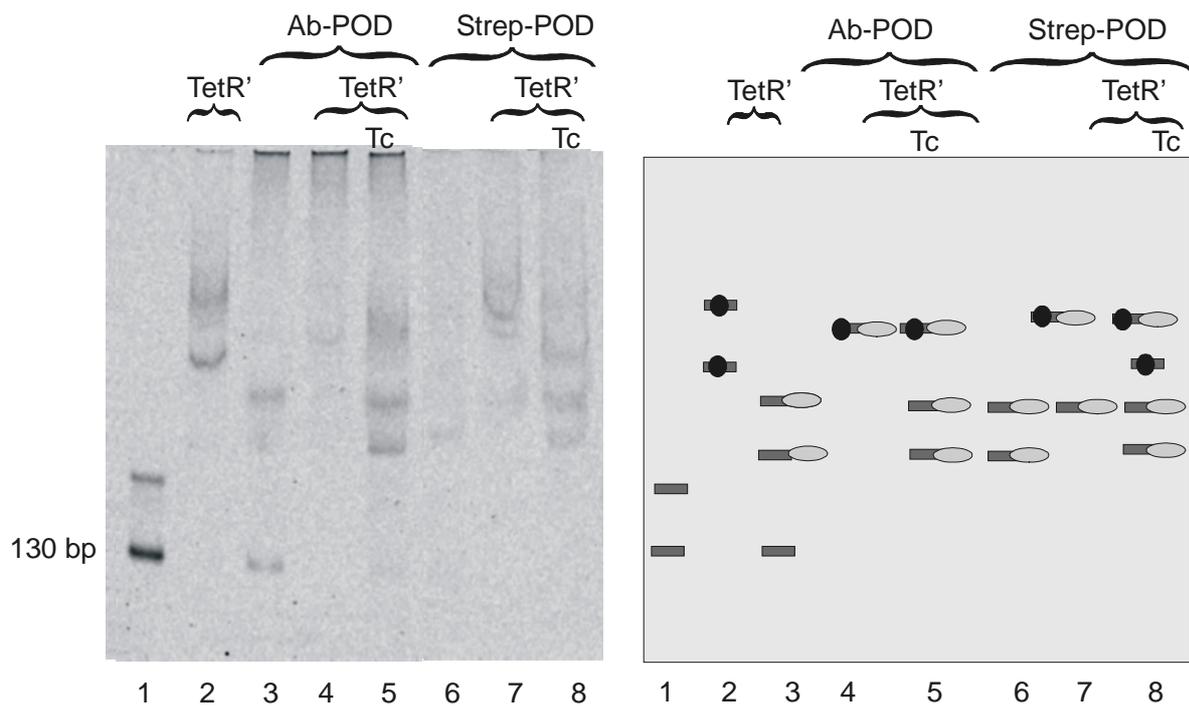


Abb. 32: Polyacrylamidgel zur Analyse der unterschiedlichen enzymatisch markierten DNA-Fragmente. Markierung des Operators O2 mit Ab-POD bzw. Strep-POD und Untersuchung der Tetrazyklin-Repressor (TetR')-Bindungseigenschaften. Spur 1: O2; 2: O2 + TetR'; 3: O2-Ab-POD; 4: O2-Ab-POD + TetR'; 5: O2-Ab-POD + TetR' + Tc; 6: O2-Strep-POD; 7: O2-Strep-POD + TetR'; 8: O2-Strep-POD + TetR' + Tc. Die Endkonzentration Tc betrug 6 mM. In dem rechten Schema sind die vermuteten Komplexe dargestellt. Der graue Balken symbolisiert das Operator-Fragment, die schwarzen Kugeln stehen für den Repressor und die grauen Ellipsen symbolisieren die  $\beta$ -Galaktosidase.

### 5.3.9 Fazit aus dem Gel-Mobility-Shift Assay

Die am Anfang des Kapitels gestellten Fragen können nun beantwortet werden:

- a) Beeinflußt das Streptag(II) am Repressor die Repressor/DNA-Wechselwirkung?

Der Tag verhindert das Ablösen des Repressors von der DNA, nicht die Bindung an die DNA.

- b) Beeinflußt der Marker am Repressor die Repressor/DNA-Wechselwirkung?

Da schon der Tag störte, wurde eine Bindung des Streptactin-POD-Konjugates an den Repressor STetR und TetRS nicht weiter untersucht. Somit schied für die Assayentwicklung die Möglichkeit aus, über den Tag den Repressor durch ein Streptactin-Konjugat direkt zu markieren und einen direkten Nachweis des markierten Repressors über die Enzymaktivität zu führen. Als Konsequenz mußte die DNA zur Assay-Entwicklung markiert werden.

c) Beeinflusst der Marker an der DNA die Repressor/DNA-Wechselwirkung?

Der Marker wird teilweise durch Tc/Repressor Interaktionen abgelöst, besonders bei der Verwendung von  $\beta$ -Galaktosidase. Wurde ein Anti-Biotin-POD-Konjugat oder ein Streptavidin-POD-Konjugat zur Markierung benutzt, schienen die Wechselwirkungen geringer.

Auf der Grundlage der Ergebnisse der Gel-Mobility-Shift Assays sollte ein Format für einen Mikrotiterplatten-Assay zur Bestimmung von Tetrazyklin entwickelt werden, der auf der Repressor/Operator Wechselwirkung basierte. Aus den bisherigen Ergebnissen waren alle Operator-Fragmente (O1+O2, O1, O2) zur Entwicklung des Assays denkbar. Das Operator-Fragment O2 wurde, wegen seiner in der Literatur beschriebenen höheren Affinität zu TetR und um Konkurrenz zwischen O1 und O2 zu vermeiden, ausgewählt [60]. Da TetRS und STetR sich durch Zugabe von Tetrazyklin nicht von der Operator-DNA lösen ließen, wurde der gereinigte und mit Faktor Xa gespaltene Repressor STetR (TetR<sup>'</sup>) eingesetzt. Tetrazyklinzugabe zum Repressor/ $\beta$ -Galaktosidase-Operator-Komplex führte zur Dissoziation sowohl von Repressor als auch  $\beta$ -Galaktosidase. POD stellte sich als Enzym zur Markierung der O2 DNA gegenüber  $\beta$ -Galaktosidase als stabilerer Marker heraus. Deshalb wurde diese Markierung nachfolgend näher untersucht.

## 5.4 Entwicklung des Mikrotiterplatten-Assays zur Detektion von Tetrazyklin

Bei dem angestrebten Format für den Mikrotiterplatten-Assay sollte der gereinigte und Faktor Xa gespaltene Repressor STetR (TetR<sup>'</sup>) auf der Mikrotiterplatte immobilisiert werden. Danach würde Tetrazyklin an den Repressor gebunden werden. Die Zugabe der enzymatisch markierten O2 Operator-DNA würde zur Bindung an die tetrazyklinfreien TetR<sup>'</sup> führen. Danach könnte die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der gebundenen O2 DNA erfolgen.

In den anschließenden Versuchen wurden Tests durchgeführt, durch die das geeignete Blockierreagenz, Immobilisierungsverfahren, TetR<sup>'</sup> Konzentration und O2 DNA-Konzentration bestimmt werden sollten.

### 5.4.1 Produktion von Operator-DNA

Zur Bereitstellung großer Mengen an markierter Operator-DNA wurde O2 mittels PCR aus dem Vektor pASK-IBA-1CA mit einem biotinylierten Oligo B-TR2 und dem Oligo TR4 amplifiziert. Die PCR-Reaktion wurde so optimiert, daß kaum Reste von Primern übrig blieben. Nach Auftragen des PCR-Produktes auf ein Agarosegel und anschließender optischer Auswertung wurden Bedingungen gewählt, bei denen keine Primer im Gel mehr sichtbar waren. Je PCR-Reaktion konnten zwischen 400 µg/ml und 650 µg/ml DNA erhalten werden, wie durch photometrische Messungen bei  $\lambda=260$  nm bestimmt wurde.

Wiederholung des Programmschrittes	Denaturierung	DNA-Annealing	Elongation/DNA-Synthese
1	95 °C, 7 min		
34	95 °C, 1 min	58,5 °C, 3 min	72 °C, 1,5 min
1			72 °C, 7 min

### 5.4.2 Einfluß von Tetrazyklin auf die enzymatische Aktivität des Markers POD

Um den Einfluß von Tetrazyklin auf den Marker POD zu testen, wurde die Peroxidase-Enzymaktivität nach Inkubation mit Tetrazyklin gemessen (s. Abb. 33). Dazu wurden 50 µl Tetrazyklinlösung mit 50 µl Ab-POD (78 pg/ml) 2 Stunden inkubiert. Danach erfolgte die Messung der Peroxidaseaktivität mit TMB bzw. Luminol als Substrat. Die Bestimmung der POD-Aktivität zeigte für beide Substrate eine Abhängigkeit von der Tetrazyklinkonzentration. Wurde Luminol als Substrat benutzt, konnte für Tetrazyklinkonzentrationen unter  $10^{-5}$  M eine Erhöhung der Aktivität beobachtet werden, die vermutlich durch Lumineszenzverstärkung zustande kam. Für Konzentrationen unter  $10^{-5}$  M war die Lumineszenz geringer als für eine Probe, die kein Tetrazyklin enthielt. Vermutlich inhibierten hohe Tetrazyklinkonzentrationen die Aktivität der POD. Mit TMB als Substrat konnte eine Erhöhung der OD verglichen mit der Probe ohne Tetrazyklin gefunden werden. Da Tetrazyklin gelb ist wurde eine Addition der gelben Farbe von Tetrazyklin zur gelben Farbe des enzymatisch umgesetzten TMB gemessen.

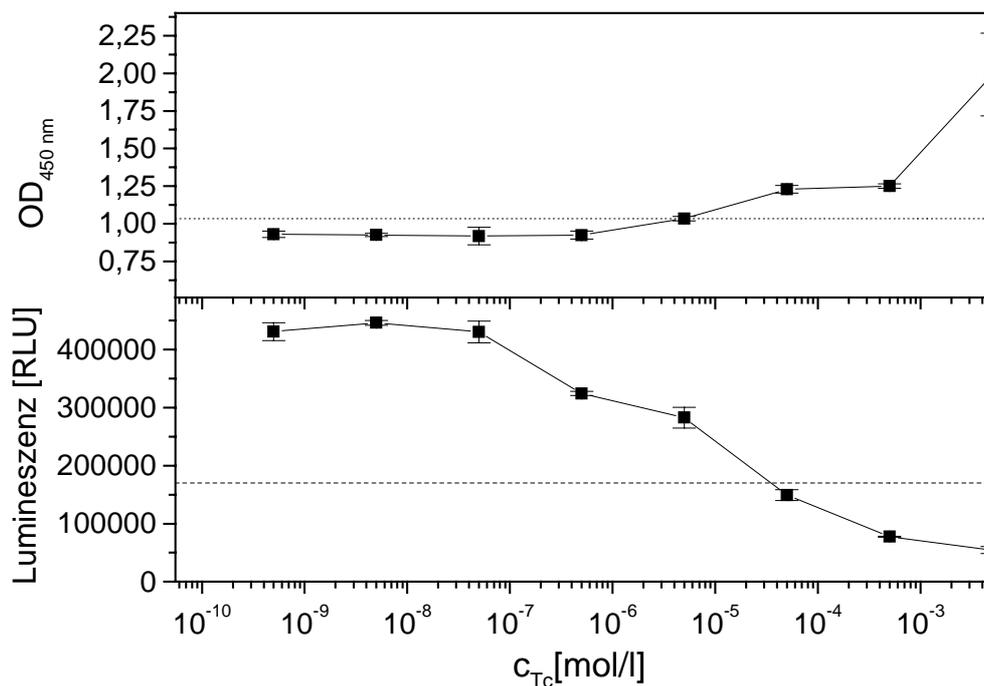


Abb. 33: Ab-POD wurde mit verschiedenen Konzentrationen Tetrazyklin inkubiert. Danach wurde die Enzymaktivität durch die Reaktion mit A) TMB und stoppen durch Schwefelsäure bzw. B) durch Reaktion mit Luminol bestimmt. Die gestrichelten Linien geben die POD-Aktivität ohne Zugabe von Tetrazyklin an.

### 5.4.3 Auswahl des geeigneten Blockierungsreagenz

Um zu testen, welche Blockierungsreagenzien geeignet sind, die nicht mit Protein besetzten Stellen der beschichteten Mikrotiterplatten zu blockieren, wurden 1 % ige Lösungen von Ovalbumin, Natriumcasein, Casein, Milchpulver, Fischgelatine und Gelatine hergestellt. Von diesen wurden 250  $\mu$ l je Kavität der Mikrotiterplatte pipettiert und 1 h bei 4 °C inkubiert. Mikrotiterplatten wurden sowohl mit  $10^{-8}$  M TetR' beschichtet als auch unbeschichtet verwendet. Nach Blockierung wurde gewaschen und mit Ab-POD oder Strep-POD markierter DNA inkubiert. Als Kontrolle wurde mit Ab-POD oder Strep-POD inkubiert, die nicht an O2 DNA gebunden waren. Eine zusätzliche Kontrolle stellte Ab-POD bzw. Strep-POD dar, die mit einer unspezifischen Kontroll DNA verbunden waren. Nach 2 h wurde die Platte wieder gewaschen und die Enzymaktivität mit TMB gemessenen (s. Abb. 34). Die unbeschichtete Platte zeigte besonders für POD, die nicht an DNA gebunden war, hohe Signale. Mit Fischgelatine, Gelatine, und Milchpulver waren besonders

für Strep-POD große unspezifische Wechselwirkungen sichtbar. Das zeigte sich in den höheren Signalen aller anderen Bindungen gegenüber der Bindung von Strep-POD-O2 an TetR'. Für Ab-POD traten für diese Blockiersubstanzen besonders hohe Standardabweichungen auf. Ovalbumin zeigte, wenn Operator O2 an TetR' gebunden wurde, ebenfalls sehr hohe Standardabweichungen. Weitere Substanzen wie Lysozym, Lysin oder Rindereserum verursachten noch höhere Hintergrundsignale als die unblockierte Platte. Für weitere Versuche wurde Natriumcasein verwendet. Mit Natriumcasein konnte das beste Verhältnis zwischen dem Hintergrundsignal und dem Signal bestimmt werden.

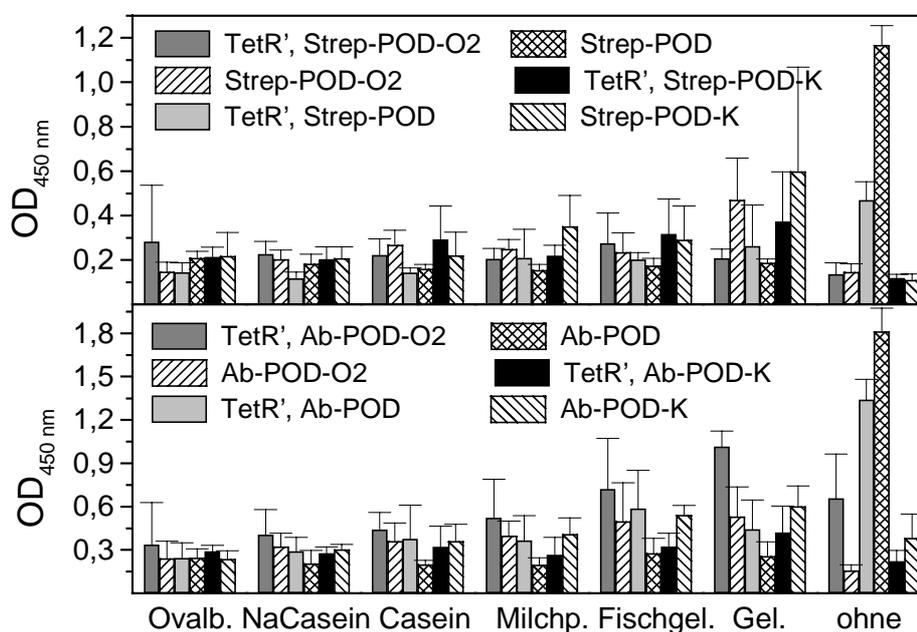


Abb. 34: Eine Mikrotiterplatte, die mit TetR' beschichtet oder unbeschichtet war, wurde 1 h mit 250  $\mu$ l 1 % (M/V) Blockierungsreagenz inkubiert. Ovalb.: Ovalbumin, NaCasein: Natriumcasein, Milchp.: Milchpulver, Fischgel.: Fischgelatine, Gel.: Gelatine, ohne: ohne Blocker. Nach dem Waschen und Zugabe von 250  $\mu$ l Ab-POD-O2, Ab-POD, Ab-POD-K (Bindung von Ab-POD an unspezifische Kontroll DNA) bzw. Strep-POD-O2, Strep-POD, Strep-POD-K (Bindung von Strep-POD an unspezifische Kontroll DNA) wurde nach 2 h gewaschen und die Enzymaktivität mit TMB bestimmt. Ausgefüllte Balken: TetR' beschichtet, schraffierte Balken: unbeschichtete Platte.

#### 5.4.4 Vergleich von kovalenter und adsorptiver Immobilisierung von TetR', STetR und TetRS auf Mikrotiterplatten

Die kovalente und adsorptive Immobilisierung des Repressors auf Mikrotiterplatten wurde verglichen. Dazu wurden die Repressoren TetR', STetR und TetRS auf den Platten immobilisiert. Das Ziel der Verwendung von TetRS und STetR war, diese Proteine über den Tag direkt an ein Streptactin-POD-Konjugat zu binden. Dieser Versuch sollte eine quantitative Aussage machen mit welcher Methode (adsorptive oder kovalente Immobilisierung) mehr Repressor (STetR, TetRS) auf der Platte haften wird, unter der Voraussetzung, daß der Tag zugänglich wäre. Je mehr Streptactin-Konjugat an den Repressor gebunden hatte, um so höher war die Enzymaktivität nach Abzug des Hintergrundes. Diese Ergebnisse sollten einen Hinweis liefern, wie sich TetR' bei der Immobilisierung verhalten könnte. Da alle drei Repressoren TetR, STetR, TetRS die Eigenschaft besaßen O<sub>2</sub> zu binden, wie in den Gel-Mobility-Shift Assays bestimmt, wurden hier die Bindung aller Repressoren an O<sub>2</sub> überprüft. Dazu wurde auf einer mit Glutardialdehyd aktivierten Mikrotiterplatte (kovalente Immobilisierung) sowie auf einer unbehandelten Platte (adsorptive Immobilisierung)

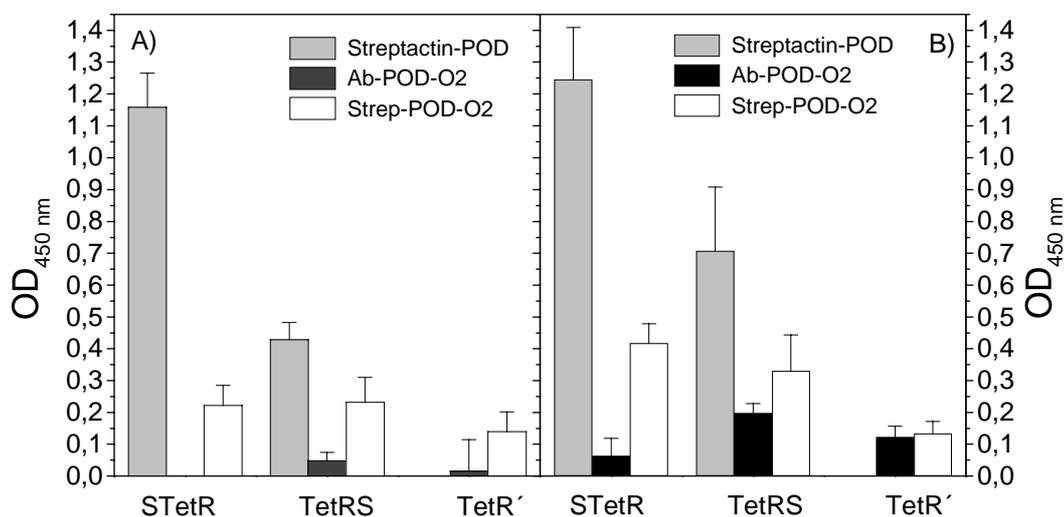


Abb. 35: Kovalente A) und adsorptive B) Immobilisierung von gereinigten TetRS, STetR und TetR'. An den Tag von TetRS und STetR wurde nach der Blockierung mit Natriumcasein an Streptactin-POD gekoppelt, um einen quantitativen Anhaltspunkt der immobilisierten Proteinmenge zu bekommen. Die Proteine TetR', STetR, und TetRS wurden mit Ab-POD markiertem Operator-Fragment O<sub>2</sub> bzw. mit Strep-POD markiertem Operator-Fragment O<sub>2</sub> inkubiert. Nach 2 h wurden die POD-Aktivitäten mit TMB als Substrat bestimmt. Die Enzymaktivität, die in Kavitäten ohne Protein gemessen wurde, wurde als Hintergrund definiert und von den Enzymaktivitäten der Kavitäten mit Protein abgezogen.

die gereinigten Proteine STetR, TetRS und TetR' immobilisiert. Nach Immobilisierung und Blockierung der freien Bindungsstellen mit Natriumcasein wurde Streptactin-POD an die Streptag(II) enthaltenden Proteine gekoppelt. Um zu überprüfen, ob DNA Bindung möglich war, wurde Ab-POD und Strep-POD markierte O2 DNA auf die mit Repressor beschichteten Mikrotiterplatten gegeben. Abb. 35 zeigt die gleiche Zugänglichkeit des Streptag(II) von STetR bei kovalenter als auch bei adsorptiver Immobilisierung. In beiden Fällen band Streptactin-POD in vergleichbarem Maße an ihn. Im Gegensatz dazu war das Streptactin-POD-Konjugat weniger leicht an den Tag von TetRS zu binden, unter der Annahme, daß genausoviel der  $10^{-8}$  M Lösung von TetRS bzw. STetR an der Mikrotiterplatte haftete. Die adsorptive Immobilisierung stellte sich in diesem Fall als günstiger heraus, da höhere Enzymaktivitäten gemessen werden konnten. Der Versuch Ab-POD markierte O2 Operator-DNA zu binden, zeigte bei kovalenter Immobilisierung an STetR und TetR' praktisch keine DNA-Bindung. Bei adsorptiver Immobilisierung wurde markierte DNA gebunden. Streptavidin-POD gebundener Operator O2 konnte sowohl an kovalente als auch an adsorptiv immobilisierte Proteine gebunden werden.

#### 5.4.5 Bestimmung der optimalen DNA- und Proteinkonzentration

Zur Einstellung geeigneter DNA und Proteinkonzentrationen zur Immobilisierung wurden Verdünnungsreihen von TetR' und O2 DNA aus Stammlösungen hergestellt, deren Konzentration photometrisch bestimmt wurden. Für den Repressor-DNA-Bindungstest wurden TetR' Konzentrationen von  $10^{-7}$  M bis  $10^{-10}$  M über Nacht auf der Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Blockierung der freien Bindungsstellen mit Natriumcasein wurden POD markierte O2 Operator-DNA-Konzentrationen von  $10^{-7}$  M bis  $10^{-9}$  M gebunden. Sowohl bei der Verwendung von Streptavidin-POD wie Anti-Biotin-POD konnte für eine DNA-Konzentration von  $10^{-7}$  M das höchste Signal gemessen werden (s. Abb. 36). Innerhalb der Fehlergrenze erschienen alle getesteten TetR' Konzentrationen geeignet. Für die weiteren Versuche wurde die TetR' Konzentration von  $10^{-8}$  M ausgewählt. Sie konnte durch eine 1:1000 Verdünnung der gereinigten Lösung hergestellt werden und war gegenüber einer  $10^{-7}$  M Lösung sparsamer.

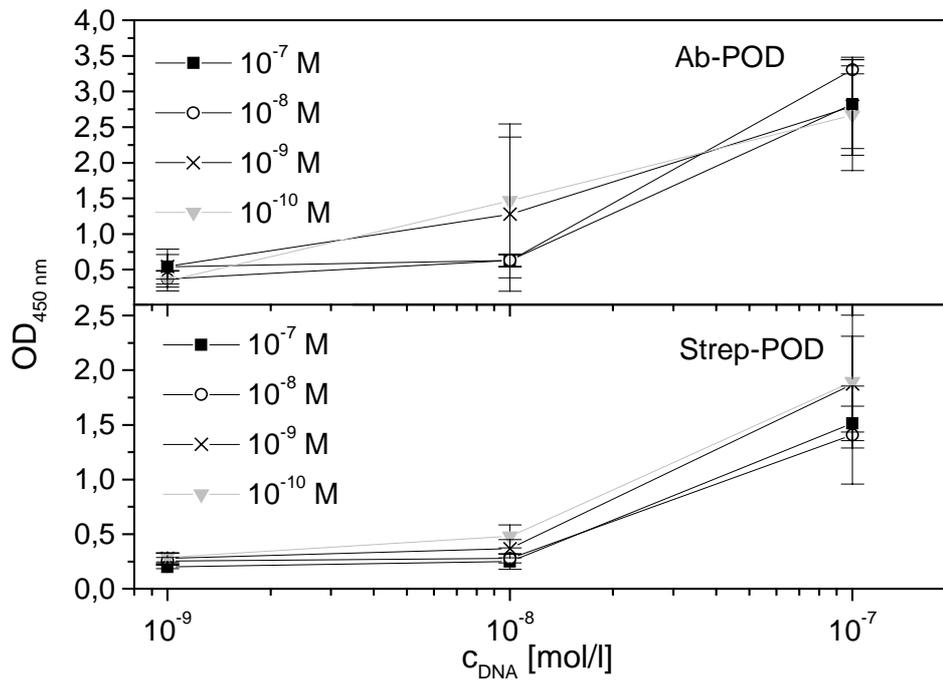


Abb. 36: Titration der Operator-DNA-Konzentration gegen die TetR´ Konzentration. Verschiedene Verdünnungen von TetR´ wurden über Nacht adsorptiv immobilisiert. Nach einem Waschschrift erfolgte die Bindung unterschiedlicher POD markierter Operator-O2-DNA-Konzentrationen.

#### 5.4.6 Bestimmung der minimalen Repressor/DNA-Bindungszeit

Der folgende Versuch sollte Aufschluß darüber geben, wieviel Zeit für die DNA-Protein-Bindung nötig war. Dazu wurde eine mit TetR´ beschichtete und mit Natriumcasein blockierte Platte verwendet. Anschließend wurde die Platte verschiedene Zeiten (0-175 min) mit POD markierter O2 DNA inkubiert. Mindestens 45 min wurden für die Bindung benötigt (s. Abb. 37).

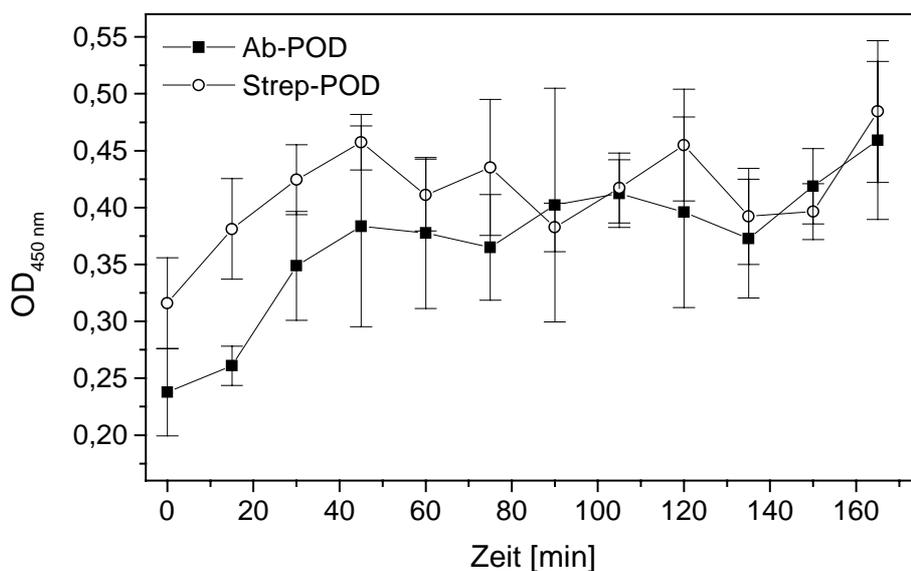


Abb. 37: Zeitabhängige Messung der Bindung von TetR' an die Ab-POD-O2 bzw Strep-POD-O2. Eine mit TetR' beschichtete und mit Natriumcasein blockierte Mikrotiterplatte wurde verschiedene Zeiten mit POD markierter O2 DNA inkubiert. Danach wurde gewaschen und die POD-Aktivität bestimmt.

#### 5.4.7 Detektionslimit und Detektionsbereich für Tetrazyklin

Nach TetR'-Immobilisierung, Blockieren der freien Stellen, Inkubation mit verschiedenen Tetrazyklinkonzentrationen und Bindung POD markierter DNA an TetR', erfolgte die Bestimmung der POD-Aktivität. Dieses Experiment sollte Hinweise für einen möglichen Detektionsbereich liefern. In diesem Assay wurde im Unterschied zur Bestimmung des Einflusses von Tetrazyklin auf die POD-Aktivität Tetrazyklin nicht direkt mit dem Enzym versetzt und nicht in der gleichen Lösung die Aktivität bestimmt (Kapitel 5.4.2). Durch die Waschschrte in diesem Assay waren geringe Konzentrationen von Tetrazyklin an den Repressor gebunden. Damit sollte die Eigenfarbe von Tetrazyklin bei der Aktivitätsbestimmung des Enzyms keinen Einfluß auf das Ergebnis haben. In allen Fällen resultierten Kurven mit sehr hoher Standardabweichung (Abb. 38, Abb. 39). Wurde Strep-POD als Marker verwendet und Luminol als Substrat (Abb. 39), konnte keine Tetrazyklinkonzentrationsabhängigkeit bestimmt werden. Für alle anderen Varianten von Substrat (TMB, Luminol) und Marker (Ab-POD, Strep-POD) konnte ein tendenzieller Abfall der Aktivität mit höherer Tetrazyklinkonzentration beobachtet werden. Je weniger Tetrazyklin vorhan-

den war, umso mehr TetR´ war tetrazyklinfrei. Daraus resultierten größere Mengen gebundener O2 DNA und damit höhere POD-Aktivitäten. Zur Konzentrationsbestimmung von unbekanntem Proben waren diese Kurven als Eichkurven ungeeignet.

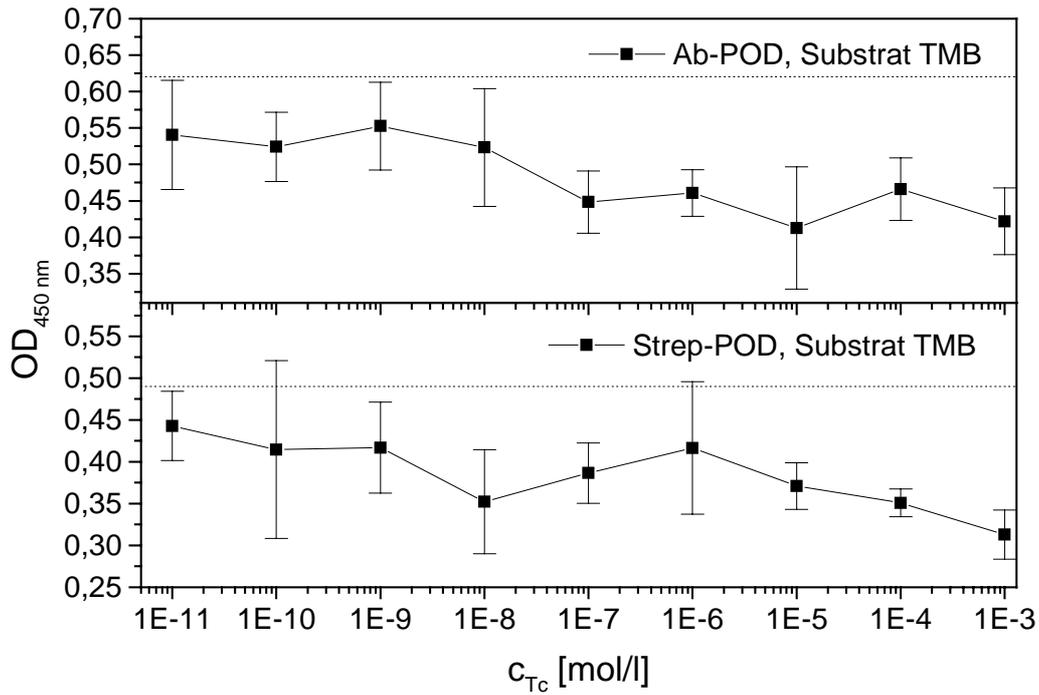


Abb. 38: Bestimmung des Detektionsbereichs für Tetrazyklin mit TMB. Eine TetR´ beschichtete und mit Natriumcasein blockierte Mikrotiterplatte wurde mit Tetrazyklinlösungen verschiedener Konzentration inkubiert. Danach erfolgte die Bindung der markierten Operator-DNA und die Bestimmung der POD-Aktivität mit TMB als Substrat. Die punktierte Linie gibt die Aktivität ohne Tc-Zugabe an.

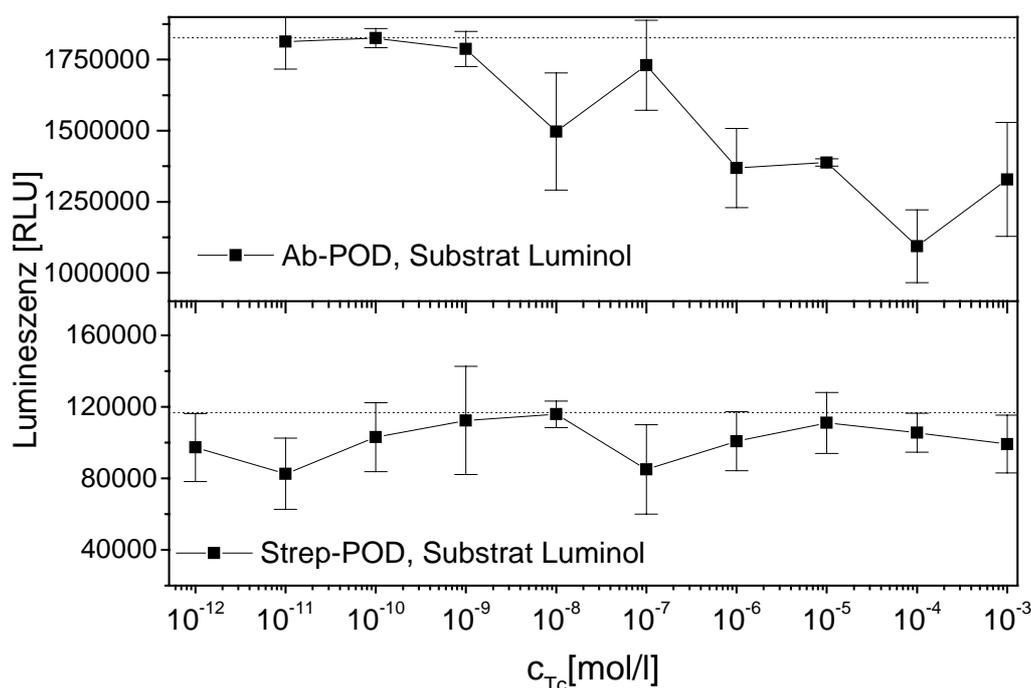


Abb. 39: Bestimmung des Detektionsbereichs für Tetrazyklin mit Luminol. Eine TetR' beschichtete und mit Natriumcasein blockierte Mikrotiterplatte wurde mit Tetrazyklinlösungen verschiedener Konzentration inkubiert. Danach erfolgte die Bindung der markierten Operator-DNA und die Bestimmung der POD-Aktivität mit Luminol als Substrat. Die punktierte Linie gibt die Aktivität an, die mit der Probe ohne Tetrazyklinzugabe gemessen wurde.

#### 5.4.8 Auswahl der Mikrotiterplatten

Maxisorpplatten sollten mit Polysorpplatten hinsichtlich ihrer Eignung für den Assay verglichen werden. Die Eigenschaften der Mikrotiterplatten spielen eine entscheidende Rolle bei der Immobilisierung von Proteinen. Polysorpplatten haben hydrophobe Eigenschaften, während Maxisorpplatten für die Immobilisierung von hydrophilen Proteinen geeignet sind. Maxisorpplatten enthalten mehr sauerstoffenthaltende funktionelle Gruppen auf ihrer Oberfläche. Neben der Fähigkeit Proteine zu binden, besitzt jede Mikrotiterplatte ein Potential DNA zu binden. DNA wird auf Grund ihrer negativen Ladung im allgemeinen sehr gut adsorbiert. Das Verhältnis von an TetR' gebundener DNA gegenüber der an der Mikrotiterplattenoberfläche gebundenen DNA wurde bestimmt. Dazu wurde O<sub>2</sub> DNA an TetR' bzw. die Mikrotiterplatte ohne TetR' gebunden. Ab-POD (ohne O<sub>2</sub>) wurde ebenfalls an TetR' bzw an die Mikrotiterplatte gebunden. Nach dem Waschen wurde die Aktivität

der POD beider Ansätze bestimmt. Mit Maxisorpplatten wurden in allen Fällen die höchsten Signale erhalten. Wurde Ab-POD-O2 an TetR' oder die Platte gebunden, wurde stets mehr als mit Ab-POD, die nicht an O2 gebunden war, adsorbiert (s. Abb. 40). Vergleichbare Mengen Ab-POD-O2 wurden an TetR' und an die Mikrotiterplatte gebunden.

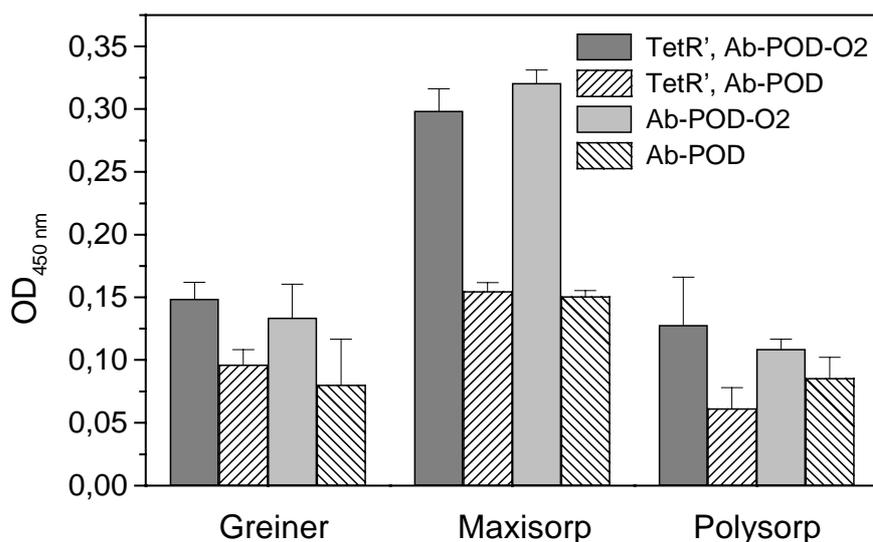


Abb. 40: Auf Mikrotiterplatten von Greiner, Polysorp bzw. Maxisorpplatten von Nunc wurde TetR' in einer Verdünnung von  $10^{-8}$  M immobilisiert. Nach dem Waschen wurde Ab-POD-O2 an den immobilisierten Repressor (TetR', Ab-POD-O2) und an die Platte ohne immobilisierten TetR' (Ab-POD-O2) gebunden. Als Kontrolle wurden an TetR' (TetR', Ab-POD) bzw. an die Platte Ab-POD ohne O2 DNA (Ab-POD) gebunden. Nach erneutem Waschen wurde die Aktivität der POD mit TMB als Substrat bestimmt.

#### 5.4.9 Einfluß eines Detergenz

Durch Zugabe des Detergenz Tween 20 in einer Endkonzentration von 0,05 % zum Waschpuffer für den DNA/Protein-Bindungstest sollte geprüft werden, ob sich dadurch die Standardabweichungen verringern ließen. Um unspezifische Wechselwirkungen zwischen der Platte und der O2 DNA zu vermindern, wurde das Detergenz Tween 20 verwendet. Abb. 41 zeigt, daß trotz Detergenzverwendung sehr große Fehler bei der Messung auftraten. Zusätzlich konnten sehr große Hintergrundsignale gemessen werden.

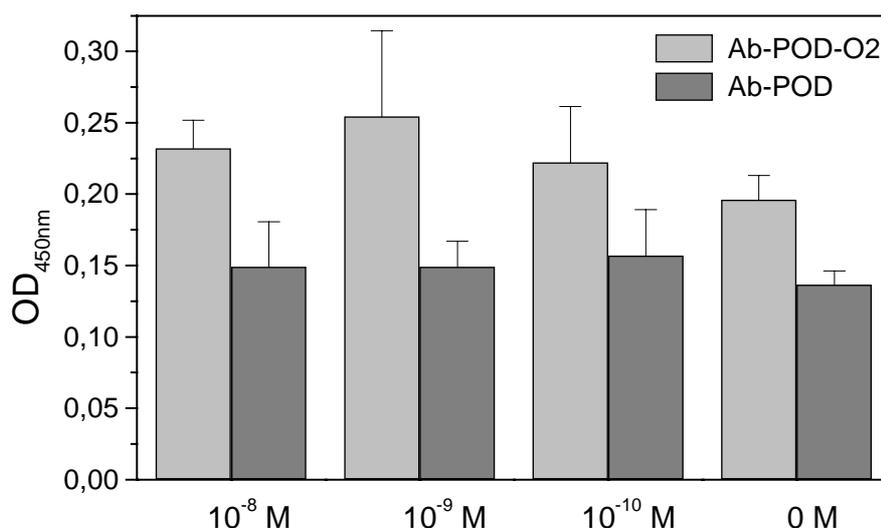


Abb. 41: Auf einer Maxisorp-mikrotiterplatte wurden TetR<sup>+</sup> Konzentrationen von 10<sup>-8</sup> bis 10<sup>-10</sup> M immobilisiert. Danach wurde Ab-POD markierte O<sub>2</sub> DNA (Ab-POD-O<sub>2</sub>) oder Ab-POD ohne O<sub>2</sub> DNA (Ab-POD) gebunden. Für die Waschschrte wurde ein 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 mM NaCl, 0,05 % Tween 20 Puffer pH 7,5 verwendet. 0 M TetR<sup>+</sup> bezieht sich auf eine Platte, auf der kein Repressor immobilisiert wurde.

#### 5.4.10 Zellextrakt ohne Blockierung

Um die sehr hohen Hintergrundsignale zu minimieren wurde versucht, ungereinigten Zellaufschluß von *E. coli* Zellen, die TetR exprimierten, zu immobilisieren. Möglicherweise könnten die anderen Proteine in der Zelle als geeignete Blockierungssubstanzen auftreten. Als Kontrolle wurden Zellaufschlüsse von JM101 und die Platte ohne Zellextrakt eingesetzt. Alle immobilisierten Zellextrakte und die Platte ohne Zellextrakt wurden mit POD markierter O<sub>2</sub> DNA oder nur mit POD inkubiert. In diesem Experiment wurde sowohl mit Polysorp- als auch mit Maxisorpplatten gearbeitet. Abb. 42 zeigt für die unbehandelte Platte sowie die Zellaufschlüsse von JM101 sehr wenig Strep-POD, Strep-POD-O<sub>2</sub> und Ab-POD-O<sub>2</sub> Aktivität. In beiden Platten ohne Proteine konnte eine hohe Bindung von Ab-POD an die Platte gemessen werden, welche sich durch das Vorhandensein von Proteinen verringerte, die als Blockierung wirkten. Zellaufschlüsse von JM101 auf beiden Platten zeigten kaum Bindung der Ab-POD-O<sub>2</sub> bzw. Strep-POD-O<sub>2</sub> oder POD-Konjugate. Auf den Maxisorpplatten konnte eine Bindung von Ab-POD-O<sub>2</sub> an beide Proteinkonzentrationen gezeigt werden. Strep-POD zeigte eine hohe unspezifische Bindung. Auf der Poly-

sorplatte konnte nur für die Proteinverdünnung 1:1000 signifikante Bindung festgestellt werden. Hier traten geringere unspezifische Wechselwirkungen mit POD-Strep und Ab-POD auf.

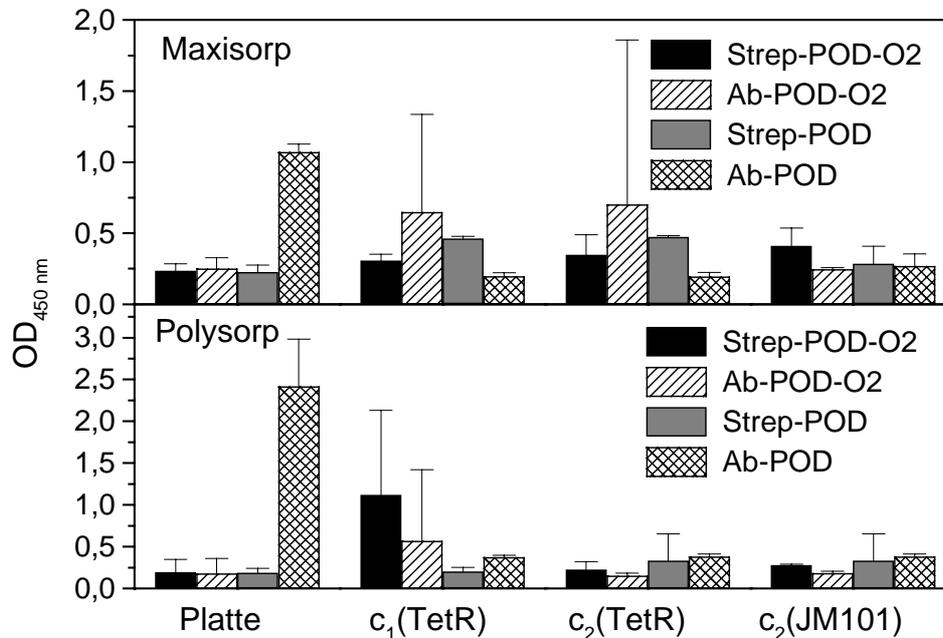


Abb. 42: Immobilisierung auf Maxisorp- bzw Polysorplatten von Zellaufschlüssen von JM101 und induzierten JM101(pT-TetR). Die Zellrohextrakte von JM101(pT-TetR) wurden in zwei verschiedenen Verdünnungen 1:1000 (c<sub>1</sub>(TetR)) und 1:10000 (c<sub>2</sub>(TetR)) eingesetzt. JM101 wurde 1:10000 verdünnt (c<sub>2</sub>(JM101)). Nach der Immobilisierung der Zellrohextrakte wurde O<sub>2</sub>-POD-Konjugate oder das POD-Konjugat ohne Operator-DNA an die Proteine bzw. die unbehandelte Platte (Platte) gebunden.

#### 5.4.11 Fazit aus der Entwicklung des Mikrotiterplatten-Assays zur Bestimmung von Tetrazyklin

Die Durchführung, den Tetrazyklinrepressor auf einer Mikrotiterplatte zu adsorbieren und daran spezifisch die Operator-DNA zu binden, gestaltete sich wegen vieler unspezifischer Wechselwirkungen als sehr schwierig. Eine Tendenz für die Zunahme der Protein/DNA-Bindung mit der Zeit sowie verminderte DNA-Bindung an den Repressor, der Tetrazyklin gebunden hatte, ließ sich feststellen. Hohe Standardabweichungen und Hintergrundsignale verhinderten die Entwicklung eines zuverlässigen Assays.

## 5.5 Repressor/DNA Bindung detektiert durch Oberflächenplasmonresonanz

Da der Mikrotiterplatten-Assay zur Bestimmung von Tetrazyklin unspezifische Wechselwirkungen aufwies, sollte mit einer anderen Methode überprüft werden, ob sich diese reduzieren ließen. Dazu wurde der Vorteil der markerfreien Detektion der Oberflächenplasmonresonanz ausgenutzt. Auf einen Streptavidin-Chip (SA-Chip) wurde die biotinylierte DNA gebunden. Danach erfolgte die Bindung des Repressors und die Zugabe von Tetrazyklin.

### 5.5.1 Bindung des O2 Operators an den SA-Chip und Wechselwirkung mit TetR'

Ein 130 bp langes DNA-Fragment, das die Operator-Sequenz O2 enthält, wurde auf einen SA-Chip aufgebracht, bis 1000 RU erreicht waren. Die Kontrollspur enthielt ein gleichlanges operatorloses Fragment gleicher Menge (1000 RU). Wurde nun über beide Spuren Repressor geleitet, band dieser auf beiden Spuren in gleicher Größenordnung. Dies war aus einem Anstieg weiterer 100 RU ersichtlich. Bei der Verwendung von BSA statt Repressor, das nicht an die DNA binden sollte, konnten ebenfalls auf beiden Spuren ein Anstieg von 100 RU gemessen werden. Diese unspezifischen Wechselwirkungen ließen sich weder durch den Wechsel von Tris-Puffer zu HEPES-Puffer (10 mM HEPES, 0,3 M NaCl, pH 7,4) noch durch Verwendung dieser Puffer mit 0,05% Tween reduzieren. Auch pH Werte von 7, 7,4 oder 8 verbesserten dieses Ergebnis nicht. Lange Kontaktzeiten von über 45 min des Repressors mit der DNA zeigten keinen positiven Effekt.

Um zu überprüfen, ob dieses relativ lange DNA-Fragment durch die langen Enden möglicherweise die Protein-Bindung behindert, wurde ein kürzeres O2 Operator-Fragment von nur 36 bp eingesetzt, das die Repressorbindungsstelle enthielt. Mit diesem Operator-Fragment konnte durch Immobilisierung auf dem SA-Chip ein Anstieg auf 300 RU erreicht werden. Hier wurde keine unspezifische DNA als Kontrolle eingesetzt, sondern die unbeladene Streptavidinspur verwendet. Über die Kontrollspur und die Spur mit immobilisierter O2 DNA wurde TetR' injiziert. Auf beiden Spuren band in gleicher Größenordnung Pro-

tein (100 RU). Das bedeutet, daß auch hier unspezifische Bindung in beiden Fällen auftrat. Dieser Effekt konnte mit den oben beschriebenen Methoden wie Variation von Puffern und Zugabe von Detergenz ebenfalls nicht vermindert werden.

### **5.5.2 Tetrazyklin Zugabe zum Repressor/DNA-Komplex**

Tetrazyklin wurde in Puffer (Tris, HEPES) mit 0,05 mM MgCl<sub>2</sub> in Konzentrationen von 10<sup>-3</sup> bis 10<sup>-12</sup> M gelöst. Diese Lösung wurde über die Kontrollspur und die Spur mit DNA und TetR´ gepumpt. Durch Zugabe von Tetrazyklin erhöhten sich die relativen Einheiten sowohl von der Kontrollspur als auch der zu analysierenden Spur. Dies war unverständlich, da durch Zugabe von Tetrazyklin TetR´ abfallen sollte. Das sollte sich durch eine Verringerung der relativen Einheiten bemerkbar machen und wies auf die unspezifische Bindung von Tetrazyklin an den Chip hin. Hierbei spielte es keine Rolle, welche Tetrazyklinkonzentration verwendet wurde oder in welchem Puffer Tetrazyklin gelöst wurde.

### **5.5.3 Regeneration des SA-Chips**

Dreimalige Zugabe von 10 µl 0,05 % SDS Lösung lösten sowohl Tetrazyklin als auch Proteine vom Chip. Das Ausgangslevel nach DNA Immobilisierung an relativen Einheiten konnte durch diesen Waschschrift wieder erreicht werden.

### **5.5.4 Fazit der Oberflächenplasmonresonanz-Messungen**

Aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen konnten keine Bindungen des Repressors an die O2 DNA mit dieser Versuchsanordnung bestimmt werden. Zur Reduktion dieser Wechselwirkungen wäre eine kovalente Immobilisierung der DNA auf einem Dextran-Chip denkbar. Dadurch könnte eine Protein-Protein-Interaktion ausgeschaltet werden, wie sie möglicherweise beim Streptavidin-Chip vorliegt.

## 6 Diskussion

### 6.1 Entwicklung eines Reporterassay zur Detektion von 4-CBA

Der Abbau von halogenierten Benzoesäuren durch *Arthrobacter* SU ist bereits gut untersucht. Die für den Abbau verantwortlichen Enzyme wurden identifiziert. Die Gene dieser Enzyme sind in einem Operon organisiert [36]. Dies ermöglichte die Konstruktion eines rekombinanten *E. coli* Stammes, der bei Anwesenheit von 4-CBA Luziferase exprimiert [72]. Ein 1,7 kb großes DNA Fragment oberhalb des Dehalogenaseoperons von *Arthrobacter* SU, das den putativen Promotor enthält, wurde mit dem Luziferasegen von *Vibrio fischeri* fusioniert und in *E. coli* RFM443 transformiert. In Flüssigmedium konnte dieses System als hoch spezifisch, aber wenig sensitiv charakterisiert werden. Der Ausgangspunkt dieser Arbeit war, dieses hoch spezifische Assaysystem bezüglich Sensitivität und im Hinblick auf einen möglichen Einsatz im Feldtest zu optimieren. Um dies zu erreichen, wurden die Zellen immobilisiert. Die Membranmutanten von *E. coli* UTL2 [73], deren Membran durch UV-Bestrahlung verändert wurde, sollte eine erleichterte Aufnahme des Analyten ermöglichen.

#### 6.1.1 Einfluß der Immobilisierung auf den 4-CBA Assay

##### 6.1.1.1 Matrix für Immobilisierung

Von den getesteten Immobilisierungsmatrices Polyacrylamid, Alginat-Silikon und Alginat zeigten die in Polyacrylamid immobilisierten Zellen RFM443(pASU) und UTL2(pASU) keinerlei Lumineszenz nach Induktion mit 4-CBA. Dies könnte auf die Toxizität von Acrylamid oder auf behinderte Diffusion des 4-CBA durch die Matrix zurückgeführt werden. Die höhere Expression der Luziferase der in Alginat immobilisierten Zellen gegen-

über der in Alginat-Silikon immobilisierten Zellen, ließ sich vermutlich auf die erhöhte Diffusion von 4-CBA durch die größeren Poren der Matrix zurückführen. Alginat ist ein nicht toxisches und biologisch abbaubares Polysaccharid [92]. Von Inukai *et al.* [92] wurde die Permeabilität von Alginatmembranen mit Natriumbenzoat untersucht. Die Diffusion von Natriumbenzoat durch eine Alginatmembran wurde bestimmt, indem die Anfangskonzentration (0,01 M) auf der einen Seite der Membran bekannt war, und die Zunahme der Konzentration von Natriumbenzoat auf der anderen Seite zeitabhängig gemessen wurde. Nach 2 h waren 97 % des eingesetzten Natriumbenzoats durch die Membran (0,905-0,922 cm) diffundiert. Da sich Natriumbenzoat strukturell nicht wesentlich von 4-CBA unterscheidet, kann angenommen werden, daß 4-CBA mit ähnlicher Geschwindigkeit durch Alginat diffundiert.

#### **6.1.1.2 Vergleich von immobilisierten und freien Zellen**

Die Immobilisierung der Stämme RFM443(pASU) und UTL2(pASU) in Alginat führte zu einem erhöhten Lumineszenzwert der induzierten immobilisierten Stämme verglichen mit den freien Zellen. Zu Beginn der Induktion lagen die freien Zellen und die immobilisierten in stationärer Wachstumsphase und in gleicher Zelldichte ( $OD_{578\text{ nm}} 0,1$ ) vor. Heipieper *et al.* [93] verglichen den Einfluß der toxischen Substanz 4-Chlorphenol auf das Wachstum von freien und immobilisierten *E. coli* Zellen. Immobilisierte Zellen zeigten eine geringere Wachstumshemmung als freie Zellen. Immobilisierte Zellen waren durch die Alginatmatrix geschützt. Daraus könnte gefolgert werden, daß die immobilisierten Zellen RFM443(pASU) und UTL2(pASU) bei Anwesenheit von 4-CBA besser geschützt waren und schneller weiter wuchsen als freie Zellen. Damit könnte durch die erhöhte Zellzahl größere Lumineszenz gemessen werden.

#### **6.1.1.3 Optimierung der Immobilisierung in Alginat**

Hohe Zelldichten in der Matrix resultierten in hohen Standardabweichungen der Messungen. Je mehr Zellen eingesetzt wurden, desto größer war der Fehler. Große Matrixvolumi-

na enthielten mehr Zellen. Dies resultierte in höheren Lumineszenzwerten nach der Induktion. In einem Bereich von 0 bis 75  $\mu\text{l}$  der Alginatzellsuspension konnte ein Anstieg der Lumineszenz gemessen werden. Mit einem Volumen von  $> 75 \mu\text{l}$  war ein stationärer Zustand erreicht. Das bedeutete keinen weiteren Anstieg der Lumineszenz. Zwei Diffusionsschritte könnten bei der Induktion der Zellen auftreten, die beide limitierende Eigenschaften haben. Zuerst diffundiert 4-CBA in die Alginatmatrix und danach durch die Zellmembran in die Zellen. Vermutlich traten Diffusionslimitierungen von 4-CBA im Alginatgel auf, durch die wahrscheinlich nur Zellen an der Oberfläche der Matrix induziert wurden.

## **6.1.2 Charakterisierung des 4-CBA Assays mit immobilisierten Zellen**

### **6.1.2.1 Induktionsprofil**

Wurden die Reporterstämme mit unterschiedlichen Konzentrationen an 4-CBA induziert, wurde das Maximum der Luziferaseexpression für jede 4-CBA Konzentration zu einem anderen Zeitpunkt erreicht. Die Ursache, weshalb sich das Maximum für höhere 4-CBA Konzentrationen zu längeren Induktionszeiten verschob, konnte bis jetzt noch nicht geklärt werden. Derselbe Effekt trat auch bei freien Zellen für Konzentrationen größer 6,3 mM auf. Da hohe Konzentrationen von 4-CBA wahrscheinlich toxisch sind, müssen sich die Zellen diesen drastischen Bedingungen bei hohen Konzentrationen erst anpassen.

### **6.1.2.2 Induktionszeit**

Die relativ langen Induktionszeiten zur Expression der Luziferase könnten in der langsamen Aufnahme der Zellen von 4-CBA oder an der langsamen Expression liegen. Deshalb wurde die minimale Induktionszeit der Zellen bestimmt. Dazu wurden aus dem 4-CBA haltigen Medium nach verschiedenen Zeitintervallen immobilisierte Zellen entfernt. Nach kurzzeitiger Induktion wurde nur wenig Luziferase exprimiert. Daraus konnte die Aufnahme des Analyten in die Zellen als geschwindigkeitsbestimmender Schritt angenommen

werden. Da *E. coli* vermutlich keinen spezifischen Mechanismus besitzt, um 4-CBA aufzunehmen, gelangte diese Verbindung wahrscheinlich über passive Diffusion über längere Zeit in die Zelle. Der schnelle Abfall des Lumineszenzwertes nach Entfernen der Zellen aus dem 4-CBA haltigen Medium, könnte in der geringen Lebensdauer der Luziferase zu suchen sein. Die Halbwertszeit der Luziferase beträgt 25 min [91]. Dies ergab einen schnellen Abfall des Signals, wenn kein Analyt mehr anwesend war.

### 6.1.2.3 Meßbereich und Detektionslimit

Die Membran der Membranmutante UTL2(pASU) wurde durch UV-Bestrahlung hergestellt [73]. Diese bedeutenden Veränderungen in der äußeren Membranpermeabilitätsbarriere verursachten eine erleichterte Freigabe von Periplasmaproteinen und eine erhöhte Sensitivität gegenüber Cytostatika [73]. UTL2 nimmt vermutlich den Analyten 4-CBA leichter auf als RFM443 und zeigte deshalb eine erhöhte Expression der Luziferase. Dies resultierte in einem um den Faktor zwei besseren Detektionslimit (113  $\mu\text{M}$  4-CBA) gegenüber dem Membranwildtyp. Diese Annahme stützt die Tatsache, daß die 4-CBA Aufnahme in die Zelle der limitierende Faktor ist. Eine erhöhte Aufnahme von Pestiziden durch eine Membranmutante von *E. coli* wurde von Lee *et al.* [94] beschrieben. Bei der von diesen Autoren verwendeten Membranmutante handelte es sich um eine Mutation eines Teils des *tol* Transportsystems, das für die Aufnahme von Colicinen verantwortlich ist. Die Membranmutante von *E. coli* wurde mit einem Plasmid transformiert, indem die Luziferase unter Kontrolle des RSVLTR Promotors exprimiert wurde. Halogenierte Pestizide, wie Propyl, wurden bestimmt, indem die Abnahme der Lumineszenzintensität nach Zugabe von Luziferin nach 10 min Inkubation bei 37 °C festgestellt wurde [94].

### 6.1.2.4 Spezifität

Die erleichterte Aufnahme des Analyten durch die Membranmutante UTL2(pASU) resultierte in einer geringeren Spezifität gegenüber 4-CBA verglichen mit dem Membranwildtyp RFM443(pASU). Die Membran könnte eine zentrale Rolle bei der Aufnahme spielen.

Bis jetzt sind jedoch keine Mechanismen für die Aufnahme von 4-CBA in *E. coli* Zellen in der Literatur beschrieben. Da relativ hohe Konzentrationen ( $>10 \mu\text{M}$  4-CBA) zur Induktion benötigt wurden, kann ein natürlicher Mechanismus zur Aufnahme von 4-CBA wahrscheinlich ausgeschlossen werden. Vielmehr gelangten die Analyten durch Diffusion in die Zellen. Auffallend war die Bevorzugung der para Position des Halogens der Benzoate. Dies könnte sterische Gründe haben, da die ortho und meta substituierten Verbindungen sperriger sind. Da Chlor kleiner als Brom ist, diffundiert 4-CBA gegenüber 4-BBA vermutlich leichter in die Zelle. Ist die Membran mutiert, so besitzt sie wahrscheinlich größere Poren als der Membranwildtyp und 4-BBA kann leichter in die Zelle gelangen. Dies würde die höhere Spezifität von RFM443(pASU) erklären.

#### 6.1.2.5 Lagerungsstabilität

Die Instabilität der Alginatmatrix oder die geringe Lebensfähigkeit der Zellen könnte die Ursache für das Scheitern der Lagerung der immobilisierten Zellen unter den untersuchten Bedingungen sein. Von Davidov *et al.* [95] konnten jedoch immobilisierte *E. coli* Zellen bis zu zwei Monate gelagert werden. Ein von Marincs und White [96] in Alginat immobilisiertes System zeigte die Möglichkeit der Lagerung von Zellen. Dazu wurde ein *lux* Gen von *Xenorhabdus luminescens* unter Kontrolle des *lac* Promotors in *E. coli* DH5 kloniert. Die Zellen exprimierten spontan ohne Induktion Luziferase. Nach zwei Wochen Lagerung konnten 48 % der ursprünglichen Lumineszenz erhalten werden, obwohl die Lebensfähigkeit der Zellen auf 3,5 % fiel. Dies verstärkte die Annahme, daß in dem Assaysystem für 4-CBA die Zellen die Lagerung nicht überlebten und aus diesem Grund kaum induzierbar waren.

### 6.1.3 Optimierung des 4-CBA Assays

#### 6.1.3.1 Einfluß des pH-Wertes

Der positive Effekt einer Erniedrigung des pH-Wertes auf das Detektionslimit war möglicherweise in einer verbesserten Diffusion in die Zelle durch eine Erhöhung des Protonengradienten zu suchen. Durch die pH abhängige intrazelluläre Akkumulation des Induktors 4-CBA wirkten sich vermutlich erhöhte Konzentrationen toxisch auf die Zellen aus. Zusammenfassend stellte sich durch die erleichterte Aufnahme des Analyten ein niedrigeres Detektionslimit heraus. Möglicherweise verschlechterte die geringere Löslichkeit von 4-CBA bei kleinem pH den Meßbereich nach oben. Im sauren pH-Bereich ließ sich die Substanz schlechter lösen als im alkalischen. Für die Messungen bei  $\text{pH} < 7$  konnten nur geringe Konzentrationen von 4-CBA eingesetzt werden.

#### 6.1.3.2 Zusatz von zellwandpermeabilisierenden Substanzen und $\text{KNO}_3$

Konzentrationsunterschiede innerhalb und außerhalb der Zelle waren vermutlich auch die Ursache für die verbesserte Aufnahme von 4-CBA, wenn  $\text{KNO}_3$  zugesetzt wurde. Von Groenewegen *et al.* [97] wurde die erleichterte Aufnahme von 4-CBA in *Coryneforme Bacterium* NTB 1 durch Zusatz von 60 mM  $\text{KNO}_3$  beschrieben. 4-CBA wurde als lipophile schwache Säure mit hohem Permeabilitätskoeffizienten charakterisiert, für die die passive Diffusion der offensichtlichste Aufnahmemechanismus ist. Zellwandpermeabilisierende Substanzen wie Detergenzien, Lysozym oder Ethanol zeigten kaum Effekte, da sie keine Ionen- oder Protonen-Konzentrationsgradienten aufbauen können.

## 6.2 Gel-Mobility-Shift Assay zur Entwicklung eines Assays für Tetrazyklin

Aus Vorversuchen, die in dem folgenden Abschnitt diskutiert werden, sollte ein Assay mit Mikrotiterplatten basierend auf der Repressor/Operator-DNA-Wechselwirkung entwickelt werden.

### 6.2.1 Klonierung, Expression, Reinigung und Molmassenbestimmung des Tetrazyklin-Repressors

Der Tetrazyklin-Repressor wurde aus dem Plasmid pASK-IBA-1CA isoliert und in das *E. coli* Expressionsystem pCYTEXP1 kloniert (pCYTEXP1-TetR). Um eine spätere Reinigung mittels Affinitätschromatographie zu erleichtern, wurde zusätzlich ein zweites Konstrukt mit Streptag(II) und Protease Faktor Xa Schnittstelle am N-Terminus des TetR (pCYTEXP1-STetR) sowie ein drittes Konstrukt mit Streptag(II) am C-Terminus hergestellt (pCYTEXP1-TetRS). An Stelle des häufig verwendeten His-tags wurde der Streptag(II) ausgewählt, denn dieser Tag ist für die Reinigung von Metalloenzymen besonders geeignet [98]. Da der Tetrazyklin-Repressor im induktorgebundenen Zustand  $Mg^{2+}$  bindet, könnte ein His-tag möglicherweise die Bindung des Induktors Tc behindern. Dadurch könnte Konkurrenz zwischen der Komplexbildung  $[MgTc]^+$  und HisTc auftreten.

Die Expression der Streptagfusionsproteine sowie des Repressors ohne Tag war möglich. Nach der nicht optimierten Reinigung konnte mit Hilfe des Streptag(II) eine Ausbeute von 2,2 mg/g Zellen sowohl für das N-terminal als auch C-terminal Streptag(II) enthaltene Protein erhalten werden. Die Abspaltung des Tags von STetR mit der Protease Faktor Xa wurde ebenfalls erfolgreich durchgeführt.

Die Klonierung und Reinigung des Tetrazyklin-Repressors verschiedener Klassen wurde von einigen Autoren beschrieben [99-104]. Die Aufreinigungen erfolgten in mehreren Schritten, die fraktionierte Ammoniumsulfatfällungen und mehrere Chromatographieschritte über Sephadexsäule beinhalteten. Ettner *et al.* [102] exprimierten TetR unter Kontrolle des *tac* Promotors, um die Expression von unlöslichem TetR zu vermeiden. 10 mg Protein konnten aus 4,5 g Zellen (= 2 mg/g Zellen) erhalten werden. Oehmichen *et*

*al.* [100] gelang die Expression von TetR unter Kontrolle des  $\lambda$ -Promotors mit einer Ausbeute von 250 mg aktivem TetR aus 10 l Kultur (= 25 mg/l). In diesen Studien wurden keine Tags zur Reinigung des Repressors verwendet.

MALDI-TOF-Experimente zur Molmassenbestimmung von TetRS und STetR wurden durchgeführt. Im Prinzip eignen sich MALDI-TOF Experimente, um nicht kovalente Komplexe zu untersuchen, wie z.B. die nicht kovalenten homo-oligomeren Komplexe von Streptavidin [105]. Doch konnten im Fall von TetRS oder STetR nur Monomere und wenige Dimere nachgewiesen werden. Es besteht die Möglichkeit, daß durch die Energie des Lasers die Dimere zerstört werden könnten. Zusätzlich könnten durch Kristallisation in der Sinnapinsäurematrix Dimere oder Tetramere getrennt werden. Aus den MALDI-TOF-Messungen konnten weder Trimerisierung oder Tetramerisierung ausgeschlossen noch bestätigt werden.

Die Struktur des Proteins war aufgeklärt [46-48, 63, 106, 107]. Aus ihr konnte die Bedeutung des C-Terminus für die Dimerisierung und des N-Terminus für die DNA-Bindung des Proteins abgeleitet werden. Diese Tatsache machte eine Überprüfung der Aktivität der TetR mit fusioniertem Streptag(II) notwendig.

## 6.2.2 Funktionalität von Repressoren mit Tag

Da in der Literatur die Reinigung des Tetrazyklin-Repressors mit Hilfe von Tags nicht beschrieben war, waren auch keinerlei Informationen über den Einfluß von an den TetR fusionierten Tags auf die Bindung an den Operator oder des Induktors verfügbar. Mutationsanalysen zeigten den Einfluß bestimmter Regionen auf die Affinität der Operator-Bindung. Mit Mutationsstudien im Helix-Turn-Helix-Motiv konnten die kritischen Aminosäuren für die Operator-Bindung bestimmt werden [53]. Wurden Deletionsanalysen am N-Terminus des TetR durchgeführt, führten diese zu einer schwächeren Repression des Operons [108]. Dies verdeutlichte die Bedeutung des N-Terminus für die Operator-Bindung. Mutationen der Aminosäuren am Loop, die in Kontakt zu Tetrazyklin treten, zeigten die Wichtigkeit dieses Bereiches für die Induzierbarkeit mit Tetrazyklin, während die Operator-Bindung kaum beeinflusst wurde [108]. Zusätzlich war die Rolle des C-Terminus für die Dimerisierung des Repressors bekannt [44].

Von Shaw *et al.* [109] wurde die Reinigung des Bm3R1 Repressors, der die Expression des Cytochrom P450<sub>Bm-3</sub> Gens in *Bacillus megaterium* reguliert, durch Nickelionenaffinitätschromatographie beschrieben. Dieser Repressor wurde sowohl N-terminal als auch C-terminal mit einem 6 x His-tag fusioniert. In beiden Fällen bedeutete dies keinen Verlust der Operator-Bindungs-fähigkeit. Allerdings bildet dieser Repressor kein Dimer. Dies ermöglichte deshalb keinen direkten Vergleich mit TetR.

Die Bindungs-fähigkeiten bzw. Funktionalität der Proteine STetR, TetRS und TetR bezüglich Operator-Bindung und Induktorbindung wurden mittels Gel-Mobility-Shift Assays untersucht und in den folgenden Abschnitten verglichen.

### 6.2.3 Operatorbindung

Der Vergleich des Bindungsverhaltens der Repressoren TetRS, STetR, TetR und TetR' (Faktor Xa gespaltener STetR) an die Operator-Fragmente O1+O2, O1 und O2 resultierte in einem ungewöhnlichen Bindungsverhalten von TetRS und STetR. Die Repressoren mit Streptag(II) zeigten nach Bindung an O1 bzw. O2 im Gel-Mobility-Shift Assay eine Bande mit ungewöhnlich geringer Mobilität. Die Mobilität war vergleichbar mit der Mobilität der Bindung an den Operator O1+O2, der beide Promotor-Sequenzen enthielt. Die Ursache könnte eine Trimerisierung oder Tetramerisierung der Streptagfusionsproteine der Repressoren sein. Von der Röntgenstruktur des Repressordimers war jedoch ersichtlich, daß beide Monomere ineinander verzahnt sind. Das würde die Trimerisierung bzw. Tetramerisierung des Proteins ausschließen (s. Abb. 4). Eine andere Möglichkeit wäre die Dimerisierung des Operator-Fragmentes O1 bzw. O2. In einigen Polyacrylamidgelen traten zwei Banden des Operatorfragmentes auf. Dies könnte die Theorie der Dimerisierung stützen.

### 6.2.4 Induktorbindung

Experimente, bei denen der Repressor/Operator-Komplex durch Zugabe von Tetrazyklin gelöst werden sollte, zeigten den Abfall von TetR und TetR' (Faktor Xa gespaltener STetR) von der DNA. Die Streptag(II) enthaltenden Repressoren TetRS und STetR dissoziierten nicht von der DNA. Es spielte keine Rolle, ob die mit Streptag(II) fusionierten

Repressoren an die Operator-Fragmente O1+O2, O1 oder O2 gebunden waren. Die 8 zusätzlichen Aminosäuren am N-Terminus von TetR, die durch die Klonierung eingeführt wurden, beeinflussten die biologische Funktion nicht. STetR enthielt zusätzliche 21 Aminosäuren, die die DNA-Bindung nicht behinderten, jedoch die Freisetzung von der DNA nach Tetrazyklin-Zugabe. Der Induktor  $[MgTc]^+$  wird tief in der Tasche beider Monomere gebunden. Durch die Tetrazyklin-Bindung wird ein Konformationswechsel induziert. Der Tetrazyklin bindende Zustand entspricht der geschlossenen Form, während die DNA-bindende Form als offene Form bezeichnet wird. Wahrscheinlich behinderten die Tags von TetRS und STetR den Eintritt von Tetrazyklin in die Bindungstasche oder ließen keinen Konformationswechsel zu. Da der native Tet Repressor ohne Tag (konnte durch Faktor Xa Spaltung aus STetR hergestellt werden) biologisch aktiv war, mit sehr hoher Affinität an den Operator band, und durch geringe Konzentrationen Tetrazyklin sich wieder ablöste, wurde er für die weiteren Versuche verwendet.

## 6.2.5 Enzymatische DNA Markierung

Die Einflüsse einer enzymatischen Operator-DNA-Markierung von O1+O2 bzw. O2 auf die Repressorbindungseigenschaften und das Induktionsverhalten durch Tetrazyklin wurden getestet. Dazu wurden die Operator-Fragmente am 5' Ende mit Biotin versehen. An dieses Biotin konnte dann entweder über die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung ein POD markierter Anti-Biotin Antikörper oder auf Grund der Streptavidin bzw. Avidin-Biotin-Wechselwirkung eine Streptavidin markierte Peroxidase oder eine Avidin markierte  $\beta$ -Galaktosidase gebunden werden.

### 6.2.5.1 Wechselwirkung zwischen TetR' und DNA Marker ( $\beta$ -Gal., POD)

Tetrazyklin verursachte ein Ablösen des Repressors vom Operator, das zum Ablösen der  $\beta$ -Galaktosidase Markierung, jedoch nicht zum Ablösen der POD Markierung führte. Wie die sehr starke Avidin-Biotin-Wechselwirkung mit einer Affinitätskonstante von  $K_a \approx 10^{-15} \text{ M}^{-1}$  [110] gespaltet wurde, blieb unklar. Starke Bindungen werden normalerweise

nur durch drastische Bedingungen gespalten, wie Guanidin/HCl, die in der Affinitätschromatographie benutzt werden [111]. Gegenüber der Avidin-Biotin-Bindung ist die Bindung von TetR an die DNA mit einer Bindungskonstante von  $2 \times 10^{-11} \text{ M}^{-1}$  relativ schwach. Die Kontrolle, bei der Tetrazyklin ohne Repressor zur markierten DNA gegeben wurde, resultierte in keinem Ablösen des Markers. Damit konnten Lösungsmittelleffekte ausgeschlossen werden. Der Grund für das Lösen der Markierungen lag vermutlich nicht an der Bindungsstärke, sondern an der Konformation der DNA. Abb. 43 zeigt die in der Literatur beschriebenen möglichen Anordnungen der zwei Repressoren an der DNA [112]. Die Bindung eines Markerenzym an ein Ende der DNA könnte wegen seiner räumlichen Ausdehnung die Bindung des Repressors erschweren. Dies erklärt auch, weshalb ein repressorgebundenes DNA-Fragment später nicht mehr zu markieren war. Wurden Ab-POD oder Strep-POD als Marker verwendet, konnte kein Ablösen der Markierung in Anwesenheit des Repressors durch Tetrazyklin-Zugabe beobachtet werden. Das Ablösen der  $\beta$ -Galaktosidase scheint hier ein Zufall zu sein.

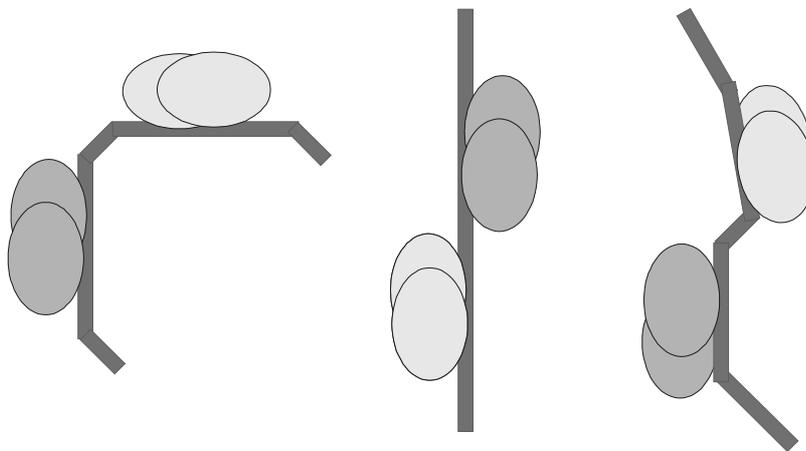


Abb. 43: Schematische Skizze der möglichen Anordnung der zwei Tet Repressordimere auf der *tet* Operator-DNA [112].

DNA, die nach Proteinbindungen ihre Konformation ändert, wurde auch in anderem Zusammenhang untersucht. Bei der Steady-State-Fluoreszenz wird die Eigenschaft ausgenutzt, daß DNA bei der Proteinbindung verdreht wird [113]. Bei der Bindung eines Proteins (z. B. cAMP Rezeptor) an die fluoreszenzmarkierte DNA wird diese verdreht und das Fluorophor nähert sich dem Bindeprotein, worauf Energie-Transfer zwischen dem Fluorophor und dem gebundenen Protein auftritt. Wird statt dem kleinen Fluorophor ein Markerprotein verwendet, sind Interaktionen denkbar. Kleine Moleküle wie Fluorescein, die als

---

Fluorophor an die DNA gebunden sind, beeinflussen die Bindungscharakteristik kaum. Im Vergleich mit der Größe eines Markerproteins treten keine bindungsstörenden Wechselwirkungen auf. Dies erklärt auch, weshalb im Gel-Mobility-Shift Assay die Cy5 Markierungen die Bindung des Repressors und sein Ablösen trotzdem ermöglichte. Diese sterischen Hinderungen, die auf Grund der Größe des Markerproteins auftraten, machten die Unmöglichkeit der Markierung der DNA nach Repressorbindung verständlich.

#### **6.2.5.2 Abstand Operator und $\beta$ -Galaktosidase Markierung**

Wurde der Abstand zwischen der  $\beta$ -Galaktosidase Markierung und der Repressorbindungsstelle von 100 bp auf 200 bp erhöht, wurde die Markierung durch Tetrazyklinzugabe nicht gelöst. Das Ablösen des Repressors war schwieriger als bei kurzen Fragmenten, da bei gleichen Konzentrationsverhältnissen die Bande des TetR' Operator-Komplexes verglichen mit dem kürzeren Fragment weniger stark abnahmen. Dies galt sowohl für das Fragment O1+O2 als auch für das Fragment O2. Möglicherweise lag der Grund in den längeren Enden des DNA-Fragmentes, die sich TetR' nähern konnten und die Dissoziation nach Tetrazyklinzugabe behinderten.

## 6.3 Entwicklung eines Mikrotiterplatten-Assays zur Tetrazyklindetektion

Aus den Vorversuchen der Gel-Mobility-Shift Assays der Tetrazyklin-Repressor/Operator-DNA-Bindung und Tetrazyklin-Induktion konnte der Vorteil von der enzymatischen Markierung der DNA gegenüber der Markierung des TetR gezeigt werden. Da mit Tag versehene Tet Repressoren nicht von der Operator-DNA nach Zugabe von Tetrazyklin dissoziieren konnten, wurde TetR' zur Assayentwicklung verwendet. Die Markierung mit Cy5 war wegen der geringeren Sensitivität des Mikrotiterplatten-Fluorimeters gegenüber dem Phosphoimager nicht möglich. Die Markierung mit Peroxidase wurde der mit  $\beta$ -Galaktosidase vorgezogen, weil POD stabiler an die Operator-DNA gebunden werden konnte. Es folgte für den Assay im Mikrotiterplattenformat folgende Versuchsdurchführung (s. Abb. 20 B):

- 1) Adsorption des Repressors auf der Platte
- 2) Blockierung der freien Bindungsstellen
- 3) Bindung von Tetrazyklin (bzw. Testlösung) an den Repressor
- 4) Bindung der markierten O2 DNA an die Tet Repressoren, die kein Tetrazyklin gebunden hatten
- 5) Bestimmung der Enzymaktivität der gebundenen und markierten O2 DNA
- 6) Auswertung: je mehr Tetrazyklin anwesend, desto weniger DNA kann binden, desto geringer ist die Enzymaktivität

### 6.3.1 Bestimmung des geeigneten Enzyms zur Markierung der DNA

Um das geeignete Enzym für die Bindung an die Biotin markierte DNA zu finden, wurde der Einfluß von Tetrazyklin auf den Marker getestet. Hohe Tetrazyklinkonzentrationen zeigten inhibitorische Wirkungen auf POD, wenn die Enzymaktivität mit Luminol als Substrat bestimmt wurde. Benutzte man TMB als Substrat konnten höhere Aktivitäten für hohe Tetrazyklinkonzentrationen gemessen werden. Der Grund war, daß sich die gelbe Farbe von Tetrazyklin mit der des umgesetzten Substrats addierte. Um diesen Effekt gering zu

halten, wurde Tetrazyklin vor der DNA-Bindung an den Repressor gebunden. Nach einem Waschschrift erfolgte die Bindung der POD markierten DNA. Damit wurde der inhibitorische Effekt von Tetrazyklin auf die POD und der Effekt der farblichen Addition annähernd ausgeschaltet. In den folgenden Versuchen wurde TMB als Substrat ausgewählt.

### **6.3.2 Wechselwirkung mit dem Blockierungsreagenz**

Die freien Stellen der Mikrotiterplatten, die mit TetR' beschichtet waren, mußten vor der Bindung der DNA blockiert werden. Die Auswahl eines geeigneten Blockierungsreagenzes gestaltete sich als sehr schwierig. Sehr hohe Signale wurden gemessen, wenn POD in O<sub>2</sub> ungebundenem Zustand oder eine Kontroll DNA verwendet wurde. Dies konnte auf eine unspezifische Wechselwirkung der negativ geladenen DNA mit der Platte bzw. den Blockierungssubstanzen zurückgeführt werden. Bei der Entwicklung des Assays mußte immer eine Konkurrenz zwischen der Bindung an die Platte und der Bindung an das Repressorprotein mitberücksichtigt werden. Da die Bindungskonstante für die Repressor/DNA-Bindung sehr hoch war, ließ sich vermuten, daß möglicherweise ein größerer Teil der DNA an den Repressor gebunden wurde.

### **6.3.3 Wechselwirkung mit verschiedenen Mikrotiterplatten**

Zur Verbesserung des Hintergrundes und zur Reduktion unspezifischer Wechselwirkungen wurden verschiedene Mikrotiterplatten getestet. Platten von Greiner waren ungeeignet, da sie keine Oberfläche für die Immobilisierung von Proteinen besaßen. Die geringen Signale waren vermutlich auf geringe Mengen immobilisiertes Protein zurückzuführen. In Maxisorpplatten mit hydrophilen Eigenschaften konnten hohe POD Aktivitäten gemessen werden, begründet durch hohe Adsorption von DNA auf ihrer Oberfläche, als auch durch Bindung an TetR. Hydrophobe Polysorpplatten banden wahrscheinlich weniger Repressor als Maxisorpplatten. Gleichzeitig wurde auch weniger O<sub>2</sub> DNA gebunden, erkennbar an den geringen POD Signalen. Die großen Fehler der Messungen ließen nur tendenzielle Aussagen zu. Eine Ursache hierfür könnte die statistische Verteilung der Repressoren auf der Plattenoberfläche sein. Aus der Struktur des Repressors war ersichtlich, daß Aminosäuren

mit funktionellen Gruppen wie Lysin, die zur Bindung an die Platte geeignet sind, sich auf der Seite der DNA-Bindung des Proteins befanden. Vermutlich sind viele Repressoren in einer für die DNA unzugänglichen Position immobilisiert. Zusammenfassend führte die Variation verschiedener Mikrotiterplatten zu keiner entscheidenden Verbesserung.

### **6.3.4 Einfluß des Detergenz**

Der Einsatz von 0,05 % Tween 20 zum Waschpuffer ergab keine Verbesserung in Bezug auf die Verringerung der Standardabweichung oder die Herabsetzung des Hintergrundes. Der Hintergrund wurde aus der Differenz der POD-Aktivitäten von POD-DNA/TetR/Platte und der POD-DNA/Platte bestimmt. Unspezifische Wechselwirkungen mit der Mikrotiterplatte konnten nicht ausgeschlossen werden, und die Standardabweichungen zeigten keine Verbesserung gegenüber den Messungen, bei denen der Waschpuffer kein Detergenz enthielt. Um unspezifische Wechselwirkungen zu beseitigen wären vermutlich höhere Detergenzkonzentrationen nötig. Doch werden diese vermutlich entweder den Repressor denaturieren oder die Repressor/DNA-Bindung verhindern.

### **6.3.5 Wechselwirkung des POD-Markers mit der Mikrotiterplatte**

Eine Möglichkeit den Hintergrund zu bestimmen war die Wechselwirkung verschiedener Konjugate mit der leeren Mikrotiterplatte zu prüfen. Wurde das Potential von Strep-POD-O<sub>2</sub>, Strep-POD, Ab-POD-O<sub>2</sub> und Ab-POD an die Maxisorp- bzw. Polysorpplatte, an den TetR-Repressor oder an Zellproteine von *E. coli* JM101 zu binden getestet, konnten weitere Aussagen über unspezifische Wechselwirkungen gemacht werden. Als unspezifische Wechselwirkungen kommen Bindung der O<sub>2</sub> DNA an die Platte, Bindung des Enzyms POD an den Repressor und an die Platte in Frage. Für die Assayentwicklung mußten störende unspezifische Bindungen von POD auch berücksichtigt werden. POD war eventuell bei der POD-DNA Markierung im Überschuß vorhanden und band an der Platte oder TetR´.

## 6.4 Bestimmung der DNA/Repressor-Wechselwirkung mit Oberflächenplasmonresonanz

Mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz (SPR) sollte eine zweite Möglichkeit geschaffen werden, Tetrazyklin zu bestimmen. Durch die markerfreie Messung sollten die durch den enzymatischen Marker zustande kommenden Probleme bei der Bindung der DNA an den Repressor beseitigt werden.

Um dies zu erreichen, wurde biotinylierte Operator-DNA auf der Oberfläche eines Streptavidin-Chips immobilisiert, worauf die Repressorbindung erfolgte. Durch Zugabe von Tetrazyklin sollte dieser von der DNA freigesetzt werden. Auch mit dieser Methode konnte das Ziel einen Assay für Tetrazyklin zu entwickeln nicht erreicht werden. Die Ursachen könnten in der unspezifischen Bindung von TetR´ an der Oberfläche des Chips oder an unspezifischen elektrostatischen Wechselwirkungen des Proteins und der DNA liegen. Zusätzlich schien Tetrazyklin ebenfalls auf der Streptavidinoberfläche gebunden zu werden. Geringe Signalunterschiede bei Repressor/DNA-Wechselwirkungen erschwerten die Messungen.

In der Literatur wurden einige Protein/DNA-Wechselwirkungen mit SPR bestimmt [114-117]. Blaesing *et al.* [117] untersuchten die Bindung von DnaA, einem Schlüsselprotein bei der chromosomalen Replikation in *E. coli*, an seine Konsensussequenz. Dazu wurde solange biotinylierte DNA über den Chip geleitet bis 700 RU erreicht waren. Abhängig von der Konzentration des Proteins konnten durch Bindung des Proteins weitere 20 bis 120 RU erhalten werden. Als Referenz diente hier eine Spur des Chips, die keine DNA enthielt. Parsons *et al.* [114, 115] immobilisierten DNA nur bis zu 40-100 RU auf dem Streptavidin-Chip, um die Wechselwirkung des Methionin-Repressors mit seiner Konsensus Operator-Sequenz zu bestimmen. Hier konnte im besten Fall nur ein kleines Signal von 90 RU, das durch die Repressorbindung zustand kam, gemessen werden.

Das von diesen Autoren vorgestellte Verfahren zeigte gleiche Größenordnungen an immobilisierter DNA und gebundenem Protein wie die in der eigenen Arbeit durchgeführten Messungen. Auch die in der Literatur beschriebenen Messungen zeigten geringe Signaländerungen. Dies erforderte eine Messung mit geringen Fehlern und Schwankungen. Selbst geringe unspezifische Wechselwirkungen, wie sie im eigenen System auftraten, müssen zum Scheitern der Bindungsbestimmung führen.

## 6.5 Bewertung der entwickelten Assaysysteme

### 6.5.1 Vergleiche von Reportersystemen

Immobilisierte Reportersysteme sind nicht häufig in der Literatur beschrieben. Jedoch sind zwei Publikationen bekannt, die die Immobilisierung von lumineszierenden *E. coli* Stämmen [96, 118] zum Gegenstand haben. Zur Detektion von Benzolderivaten wurden *E. coli* Zellen an der Spitze einer Glasfaser immobilisiert, die eine Polycarbonatmembran oder Dialysemembran trug [118]. Bei diesem System waren Induktionszeiten von 10 Stunden nötig. Dies bedeutet, daß mit einer Induktionszeit von 200 min im eigenen Assaysystem ein deutlich besseres Ergebnis erzielt wurde. Dagegen waren die von Marincs und White [96] in Alginat immobilisierten *E. coli* Reporterstämme wegen des undichten *lac* Promotors sofort lumineszent und ermöglichten eine umgehende Lumineszenzmessung.

Von Rozen *et al.* [72] wurde für die freien RFM443(pASU) Zellen ein Detektionslimit von 380  $\mu\text{M}$  beschrieben. Dieses Ergebnis konnte in der eigenen Arbeit durch Immobilisierung und durch Verwendung des Stammes UTL2(pASU) verbessert werden. Assayzeit (200 min) und Detektionslimit (28  $\mu\text{M}$ ) des immobilisierten Assays der eigenen Arbeit waren in vergleichbaren Bereichen mit anderen in der Literatur beschriebenen nicht immobilisierten Reportersystemen (s. Tab. 10). Von Yoon *et al.* wurde zum Beispiel ein Reporterassay zur Bestimmung von Cadmium mit einer Assayzeit von 1,5 h und einem Detektionsbereich von 0,5 bis 100  $\mu\text{M}$  beschrieben [119]. Dieses System von Yoon *et al.* [119] war nicht immobilisiert, zeigte aber für Reportersysteme repräsentative lange Assayzeiten und ein Detektionslimit im  $\mu\text{M}$  Bereich. Tab. 10 zeigt eine Übersicht über die Detektionslimits und Assayzeiten.

Tab. 10: Reportersysteme, ihre Assayzeit und Konzentrationsbereiche

Analyt	Konstrukt	Wirt	Assayzeit	Konzentration	Referenz
<u>Anorganische Verbindungen</u>					
Aluminium	<i>fliC::luxAB</i>	<i>E. coli</i>	20 min	40-400 µM	[120]
Antimonit, Arsenit	<i>ArsRD::lacZ</i>	<i>E. coli</i>	17 h 30 min	100 µM 10 <sup>-15</sup> M	[121]
Arsenat, Arsenit	<i>arsR::luc</i>	<i>S. aureus</i>	1 h	0,01-10 µM	[122]
Cadmium	<i>cadA::luxAB</i>	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	1-2 h	1-100 µM	[123]
	<i>cadA::blaZ</i> <i>cadC::blaZ</i> <i>cadC::luc</i>	<i>S. aureus</i> <i>B. subtilis</i> <i>S. aureus</i>	1,5 h 3 h 2 h	0,5-100 µM 10 nM 3,3 nM	[119] [124]
	<i>chr::lux</i>	<i>A. eutrophus</i>	1-2 h	1-50 nM	[125]
Chromat	<i>chr::lux</i>	<i>A. eutrophus</i>	1-2 h	1-50 nM	[125]
Eisen	<i>pupA::luxCDABE</i>	<i>P. putida</i>	Stunden	0,01-1 µM	[126]
Quecksilber	<i>mer::luc</i>	<i>E. coli</i>		0,02-0,2 µM	[127]
	<i>mer::luxAB</i>	<i>E. coli</i>	2-3 min	10 nM	[128]
	<i>mer::luxCDABE</i>	<i>E. coli</i>	40 min	0,5-5 µM	[129]
	<i>mer::lux</i>	<i>E. coli</i>	30 min	0,1 nM-1 µM	[130]
	<i>merR-T::luxCDABE</i>	<i>E. coli</i>	70 min	0,025 nM	[131]
Nitrat	<i>narG::luxCDABE</i>	<i>E. coli</i>	4 h	0,05-50 µM	[132]
Zink	<i>smtA::luxCDABE</i>	<i>Synechococcus</i>	4 h	0,5-4 µM	[133]
	<i>smtA::lacZ</i>	<i>Synechococcus</i>	2 h	12 µM	[16]
<u>Organische Verbindungen</u>					
Alkane	<i>alkB::luxAB</i>	<i>E. coli</i>	15 min	24-100 nM	[134]
Benzolderivate:					
m-Xylol	<i>Ps::luc</i>	<i>E. coli</i>	2 h	5 µM	[135]
	<i>Ps::luc</i>	<i>E. coli</i>	1 h	0,05-1 mM	[118]
	<i>xylR, Pu::luc</i>	<i>E. coli</i>	0,5-1 h	10-20 µM (Toluol)	[136]
Hydro- carbone	<i>xyl::luxCDABE</i>	<i>P. putida</i>	Stunden	3 µM (3-Xylol)	[137]
	<i>ibp::luxCDABE</i>	<i>E. coli</i>	1-4 h	1-100 µM (Iso- propylbenzol) 0,1-10 µM (Naphthalin)	[138]
Organisches Quecksilber	<i>merG::lacZ</i>	<i>E. coli</i>		0,3 nM	[139]
Naphthalin	<i>nahG::luxCDABE</i>	<i>P. fluorescens</i>	8-24 min	12-120 µM	[140]
Salicylat	<i>nahG::luxCDABE</i>	<i>P. fluorescens</i>	8-24 min	36 µM	[140]
PCB	<i>orf0-bphA1:: luxCDABE</i>	<i>R. eutropha</i>	1-3 h	0,8 µM (4-Chlorbi- phenyl)	[141]

### **6.5.2 Standardmethoden zur Bestimmung von 4-CBA**

Gegenüber Bioassays sind Standardmethoden wie Gaschromatographie in der Regel viel sensitiver. Zur Bestimmung von 4-CBA gibt es wegen des geringen Auftretens dieser Verbindung in der Natur keine beschriebene Standardmethode. Deshalb kann kein direkter Vergleich mit einer Standardmethode gezogen werden. Es ist aber eine der Pestizidbestimmung analoge Methode denkbar. Um 4-CBA gaschromatographisch analog zur Pestizidbestimmung durchzuführen, ist eine chemische Derivatisierung nötig. Das Detektionslimit für Pestizide liegt bei ca. 0,05  $\mu\text{M}$  [142]. Dies ist viel sensitiver als das beschriebene Reportersystem. Doch haben Assays mit ganzen Zellen Vorteile, wie die billige und einfache Durchführung, sowie die Möglichkeit die Bioverfügbarkeit einer Substanz zu testen. 4-CBA wurde hier als Modellanalyt für das breite Spektrum an halogenierten organischen Verschmutzungen ausgewählt, deren Abbau durch Mikroorganismen nur teilweise geklärt ist.

### **6.5.3 Vergleich der Tetrazyklinbestimmung mit Gel-Mobility-Shift Assay, Mikrotiterplatten-Assay und Oberflächenplasmonresonanz**

Die Bestimmung von Tetrazyklin war nur im Gel-Mobility-Shift Assay möglich. Der Vorteil dieser Methode war, daß keine Wechselwirkungen mit Oberflächen zu erwarten waren, während sich dieser Assay nicht für den Feldtest oder Hochdurchsatzscreening eignete. Methoden wie Oberflächenplasmonresonanz oder der Mikrotiterplatten-Assay bieten viele Möglichkeiten, unspezifische Wechselwirkungen mit Oberflächen einzugehen. In beiden Fällen waren geringe Signalhöhen zusätzlich ein Problem.

### **6.5.4 Vergleiche von Assaysystemen zur Bestimmung von Tetrazyklin**

Schnelle Antibiotika-Assays werden in vielen Situationen benötigt. So werden Assays beispielsweise zur Detektion von Antibiotika in Fleisch, Milch und bei der Antibiotikaherstellung eingesetzt. Die allgemeinen Assays wie Radioimmunoassay oder ELISA brauchen

mehrere Stunden zur Durchführung. Die HPLC-Methode benötigt Extraktions- und Aufreinigungsschritte. Dies macht sie sehr teuer und zeitaufwendig [143]. Der Inhibitionstest, für den eine mit *B. subtilis* bewachsene Agarplatte benötigt wird, ist eine billige Screeningmethode für Tetrazyklinderivative für eine große Anzahl von Proben [144]. In Tab. 11 ist eine Übersicht von Tetrazyklin-Tests aufgelistet. Diese Tests sind sehr genau und reproduzierbar. Der in dieser Arbeit vorgestellte Mikrotiterplatten-Assay ist noch nicht vollständig ausgereift und wird erst in Zukunft einem detaillierten Vergleich mit anderen Assays standhalten. Manche Tests ähneln in ihrem Aufbau jedoch diesem Mikrotiterplatten-Test.

Im indirekten ELISA von Lang *et al.* [145] wurden die Mikrotiterplatten mit Tetrazyklin- $\beta$ -Casein-Konjugat beschichtet und mit Casein blockiert. Die Tetrazyklin Probe und Antiserum gegen Tetrazyklin wurden in diesem kompetitiven Assay gleichzeitig zugegeben und zwei Stunden inkubiert. Nach dem Waschen erfolgte der Nachweis des gebundenen Antikörpers mit Hilfe eines POD-markierten zweiten Antikörpers. Dieser Test war mit einer Nachweisgrenze von 0,1 ng/ml Puffer sehr empfindlich. Allerdings wurden mit Chlortetrazyklin und Rolitetrazyklin hohe Kreuzreaktivitäten gemessen.

Der Charm-Test ist ein Rezeptortest zur Bestimmung von Tetrazyklinen in Milch [146]. Er basiert auf der Kompetition zwischen einem radioaktiv markierten Tracer und dem Analyten in der Probe um den Rezeptor. Wird das Rezeptor-Bindungsreagenz für Tetrazyklin der Probe zugefügt, die mit Tetrazyklin kontaminiert ist, bindet Tetrazyklin an den Rezeptor und verhindert die Bindung des markierten Tetrazyklins. Nach einem Zentrifugationsschritt und Aufnahme des Pellets in Scintillationsflüssigkeit wird die Menge an radioaktiv markiertem Tetrazyklin bestimmt, wobei mit einer Nullprobe verglichen wird [147]. Vergleichend zum hier entwickelten Test läßt sich neben der sehr hohen Sensitivität der Nachteil des Arbeitens mit radioaktivem Material anführen.

Zur Detektion von Tetrazyklin wurde ein Reportersystem entwickelt. Als Reporter wurde *luxCDABE* von *P. luminescens* unter der Kontrolle des *tetA* Promotors des Transposons *Tn10* kloniert. Die dichte Repression der Expression kam durch die Einführung von *tetR* an einer Stelle des Plasmids zustande. Die Vorteile dieses Sensors waren seine Assayzeit von wenigen Minuten und die Sensitivität von 2 ng/Probe [148]. Dieses System benutzt die gleichen regulatorischen Elemente, wie der in dieser Arbeit entwickelte Mikrotiterplatten-Assay. *In vivo* liegt der Vorteil in der einfachen Durchführung des Assays. Die Ergebnisse aus den Gel-Mobility-Shift Assays der eigenen Arbeit zeigten Shifts bei Konzentrationen

zwischen  $10^{-5}$  und  $10^{-9}$  M. Der eigens entwickelte Mikrotiterplatten-Assay sollte als Modell dienen, um den *in vivo* Reporterassay mit einem *in vitro* Test zu vergleichen. Der Mikrotiterplatten-Assay ließ auf hohe Sensitivitäten aufgrund der Ergebnisse aus dem Gel-Mobility-Shift Assay hoffen.

In der Literatur ist ein Test beschrieben, der nicht bezüglich des Analyten, sondern bezüglich der Durchführung dem in dieser Arbeit entwickelten nahe kommt. Dieser ELDIA Test (Enzyme-linked DNA/protein interaction assay) ermöglichte die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten der DNA-Bindung eines Helicase ähnlichen Transkriptionsfaktors (GST-6D3; 48 kDa) [149]. In diesem Test wurde die Helicase (0,1-20  $\mu\text{g/ml}$ ) auf der Mikrotiterplatte immobilisiert. Die nicht besetzten Stellen der Mikrotiterplatte wurden mit 5 % Magermilch blockiert. Nun wurde mit biotinylierter DNA inkubiert, an die nach dem Waschen ein Streptavidin-POD-Konjugat zur Bindung an die biotinylierte DNA (27 bp) zugegeben wurde. In einer Variante des Assays wurde die biotinylierte DNA an eine mit Streptavidin beschichtete Platte gebunden. Danach erfolgte die Bindung der Helicase. Nach dem Waschen wurde ein Antikörper gegen Biotin und ein zweiter Antikörper gegen diesen Anti-Biotin-Antikörper gebunden, der mit POD gekoppelt war. Die Dissoziationskonstante  $K_d$  der Helicase von der DNA wurde zu 1 nM bestimmt. Das entsprach dem Ergebnis aus dem Gel-Mobility-Shift der Helicase und der DNA. Dieser Test zeigte, daß Protein/DNA-Wechselwirkungen im Mikrotiterplattenformat bestimmt werden können und vergleichbare Ergebnisse wie im Gel-Mobility-Shift Assay liefern. Die Erklärung weshalb der eigene Test unbefriedigend funktionierte, kann nur in den ungünstigen Eigenschaften des Tetrazyklin-Repressors zu suchen sein. Wahrscheinlich wird dieser in einer Position auf der Mikrotiterplatte immobilisiert, die DNA-Bindung nur schwer ermöglichte. Außerdem lassen sich die Eigenschaften der Helicase und des Repressors kaum vergleichen. Die Helicase besitzt eine ganz andere Struktur und gehört nicht zu den DNA-Bindeproteinen, die ein HTH Motiv besitzen. Die Helicase könnte in einer günstigeren Anordnung auf der Mikrotiterplatte immobilisiert sein. In dem Helicase Assay wurde ein viel kürzeres DNA-Fragment benutzt als in der eigenen Arbeit. Dies könnte ebenfalls eine Ursache für Unterschiede sein.

Tab. 11: Nachweisverfahren und ihre Detektionsgrenzen zur Bestimmung von Tetrazyklin

Nachweisverfahren	Prinzip	Detektionslimit	Referenz
LacTek	Competitiver ELISA	100 µg/kg	[150, 151]
Snap Test	ELISA	1,2 µg/l	IDEXX-Laboratories, Inc., USA
Titrimetrisch	m-Dinitobenzol als Farbgebungsreagenz		[152]
Fiberoptisch	Fluoreszenzquenching	200 mg/l	[153]
ELISA	ELISA	5 µg/kg Milch	[145]
Flüssigchromatographie		0,25 mg/l Urin	[154]
HPLC		7 µg/kg	[151]
HPLC		45 µg/l Milch	[147]
Valio T102-Test	Abnahme der Biolumineszenz		Valio Ltd., Finland
<i>E. coli</i> (pTetLux1)	Reporterassay	2 ng/Probe	[148]
CharmTest II	Isotopischer Rezeptor Assay	400 fg/l Milch	[155]
Charm HVS-8100	Rezeptor Assay	10 µg/kg	[151]
Mikrobieller Rezeptor Assay	Rezeptor Assay	2 mg/l	Charm Sciences, USA
Delvo Test SP		300 µg/kg	[151]
			Gist-Procades, Niederlande
Tetrazyklin-Galaktosidase-Test	Inhibition der β-Galaktosidase Biosynthese in <i>E. coli</i>	70 µg/kg	[151, 156]
Verbesserter Tetrazyklin-Galaktosidase-Test	Inhibition der β-Galaktosidase Biosynthese in <i>E. coli</i>	50 µg/kg	[151]
Toxi Chromotest	Inhibition der β-Galaktosidase Biosynthese in <i>E. coli</i>		EBPI, Canada
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 <i>mycoi-des</i> Test System	Wachstumshemmung von <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	30 µg/l	[147]
<i>Bacillus cereus</i> Mikrotitertest	Wachstumshemmung von <i>Bacillus cereus</i>	75 µg/kg	[151]
Disc Assay	Wachstumshemmung von <i>Bacillus stearothermophilus</i>	1300 µg/l Milch	[155]

### 6.5.5 Fazit

Mit dem hier vorgestellten immobilisierten Reportersystem ließen sich spezifisch und quantitativ 4-CBA bestimmen. Bei diesem System handelte es sich um einen *in vivo* Test, der von den Eigenschaften der Zelle abhängig war. Das Potential zur Aufnahme des Analyten in die Zelle und die Promotorstärke beeinflussen Sensitivität und Assayzeit.

In einem von den Beschaffenheiten der Zelle unabhängigen Assay wurden *in vitro* Repressor/DNA-Wechselwirkungen zur Detektion von Tetrazyklin ausgenutzt. In unimmobilisierten Systemen, wie beim Gel-Mobility-Shift Assay konnte mit hoher Sensitivität ein Nachweis geführt werden. Wurde der Repressor (Mikrotiterplatten Assay) oder die DNA (Oberflächenplasmonresonanz) immobilisiert, mußten unspezifische Wechselwirkungen mit den Oberflächen in Kauf genommen werden.

## 7 Literatur

- [1] N. V. Coung, T. T. Bachmann, J. W. Metzger, R. D. Schmid (1999) *Development of an immuno dipstick assay for quantitative determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in real water, fruit and urine samples*. Fresenius J. Anal. Chem. 364: 584-589.
- [2] M. Seifert, S. Haindl, B. Hock (1998) *In vitro analysis of xenoestrogens by enzyme linked receptor assays (ELRA)*. Adv. Exp. Med. Biol. 444: 113-117.
- [3] T. T. Bachmann, R. D. Schmid (1999) *A disposable multielectrode biosensor for the discrimination of organophosphate and carbamate insecticides in the submicromolar range using native and recombinant variants of acetylcholinesterase*. Anal. Chim. Acta 401: 95-103.
- [4] T. T. Bachmann, U. Bilitewski, R. D. Schmid (1998) *A microbial sensor based on Pseudomonas putida for phenol, benzoic acid and their monochlorinated derivatives which can be used in water and n-hexan*. Anal. Letters 31: 2361-2373.
- [5] A. König, T. T. Bachmann, J. W. Metzger, R. D. Schmid (1999) *Disposable sensor for measuring the biochemical oxygen demand for nitrification and inhibition of nitrification in waste water*. Appl. Environ. Biotech. 51: 112-117.
- [6] S. Köhler, S. Belkin, R. D. Schmid (2000) *Reporter gene bioassays in environmental analysis*. Fresenius J. Anal. Chem. 366: 769-779.
- [7] P. Schreiter, O. Gillor, A. Post, S. Belkin, R. D. Schmid, T. T. Bachmann *Monitoring of phosphorus bioavailability in water by immobilized luminescent cyanobacterial reporter strain*. Biosensors&Bioelektronics : submitted.
- [8] I. Bronstein, J. Fortin, P. E. Stanley, G. S. A. B. Stewart, L. J. Kricka (1994) *Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays*. Anal. Biochem. 219: 169-181.
- [9] I. Bronstein, C. S. Martin, J. J. Fortin, C. E. M. Olesen, J. C. Voyota (1996) *Chemiluminescence: sensitive detection technology for reporter gene assays*. Clin. Chem. 42: 1542-1546.
- [10] C. P. Cartwright, Y. Li, Y.-S. Zhu, Y.-S. Kang, D. J. Tipper (1994) *Use of  $\beta$ -lactamase as a secreted reporter of promoter function in yeast*. Yeast 10: 497-508.

- [11] S. R. Kain, P. Kitts (1997) *Expression and detection of green fluorescent protein (GFP)*. *Methods Mol. Biol.* 63: 305-324.
- [12] I. Bronstein, J. J. Fortin, J. C. Voyta, R.-R. Juo, B. Edwards, C. E. M. Olseen, N. Lijam, L. J. Kricka (1994) *Chemiluminescent reporter gene assays: sensitive detection of GUS and SEAP gene products*. *BioTechniques* 17: 172-177.
- [13] J. T. Moore, S. T. Davis, I. K. Dev (1997) *The development of  $\beta$ -lactamase as a highly versatile genetic reporter for eukaryotic cells*. *Anal. Biochem.* 247: 203-209.
- [14] R. Sikorski, R. Peters (1998) *Lactamase live!* *Science* 279: 412.
- [15] R. Beck, H. Burtscher (1994) *Expression of human alkaline phosphatase in Escherichia coli*. *Prot. Express. Purif.* 5: 192-197.
- [16] J. W. Huckle, A. P. Morby, J. S. Turner, N. J. Robinson (1993) *Isolation of a prokaryotic metallothionein locus and analysis of transcriptional control by trace metal ions*. *Mol. Microbiol.* 7: 177-187.
- [17] T. K. v. Dyk, W. R. Majarian, K. B. Konstantinov, R. M. Young, P. S. Dhurjati, R. A. LaRossa (1994) *Rapid and sensitive pollutant detection by induction of heat shock gene-bioluminescence gene fusion*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60.
- [18] T. K. v. Dyk, S. Belkin, A. C. Vollmer, D. R. Smulski, T. R. Reed, R. A. LaRossa (1994) *Fusions of Vibrio fischeri lux gene to Escherichia coli stress promoters: detection of environmental stress*, in *Bioluminescence and Chemiluminescence: Fundamentals and Applied Aspects*, A. K. Campbell, L. J. Kricka, P. E. Stanley, Editors. John Wiley and Sons: Chichester: 147-150.
- [19] T. K. v. Dyk, T. R. Reed, A. C. Vollmer, R. A. LaRossa (1995) *Synergetic induction of the heat shock response in Escherichia coli by simultaneous treatment with chemical inducers*. *J. Bacteriol.* 177: 6001-6004.
- [20] S. Belkin (1998) *Detection of oxidants using lux fusions to oxidative stress promoters*, in *Methods in Molecular Biology/Bioluminescence*, R.A. LaRossa, Editor. The Humana Press: Totowa, NJ: 189-197.
- [21] S. Belkin, A. C. Vollmer, T. K. v. Dyk, D. R. Smulski, T. R. Reed, R. A. LaRossa (1994) *Oxidative and DNA damaging agents induce luminescence in E. coli harboring lux fusions to stress promoters*, in *Bioluminescence and Chemiluminescence: Fundamentals and Applied Aspects*, A. K. Campbell, L. J. Kricka, P. E. Stanley, Editors. John Wiley and Sons: Chichester: 509-512.

- 
- [22] S. Belkin, D. R. Smulski, A. C. Vollmer, T. K. v. Dyk, R. A. LaRossa (1996) *Oxidative stress detection with Escherichia coli harboring a katG':lux fusion*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2252-2256.
- [23] A. C. Vollmer, S. Belkin, D. R. Smulski, T. K. v. Dyk, R. A. LaRossa (1997) *Detection of DNA damage by use of Escherichia coli carrying recA':lux, uvrA':lux, or alkA':lux reporter plasmids*. Appl. Environ. Microbiol. 63(7): 2566-2571.
- [24] D. v. d. Lelie, L. Regniers, B. Borremans, A. Provoost, L. Verschaeve (1997) *The VITOX test, an SOS bioluminescence Salmonella typhimurium test to measure genotoxicity kinetics*. Mut. Res. 389: 279-290.
- [25] D. v. d. Lelie, B. M. F. Borremans, A. I. A. Provoost, L. A. L. J. B. Regniers, L. P. E. Verschaeve (1997) *Recombinant nucleic acid sequences and methods for determining both genotoxicity and mutagenicity of a sample and the kinetics of the genotoxicity*, WO97/41251.
- [26] L. Verschaeve, J. V. Gompel, L. Thilemans, L. Regniers, R. Vanparys, D. v. d. Lelie (1999) *VITOTOX bacterial genotoxicity and toxicity test for the rapid screening of chemicals*. Environ. Mol. Mutagen 33: 240-248.
- [27] R. M. Walmsley, N. Billinton, W.-D. Heyer (1997) *Green fluorescent protein as a reporter for the DNA damage-induced gene RAD54 in Saccharomyces*. Yeast 13: 1535-1545.
- [28] N. Billinton, M. G. Barker, C. E. Knight, A. W. Goddard, N. J. Fielden, P. R. Walmsley (1998) *Development of a green fluorescent protein reporter for a yeast genotoxicity biosensor*. Biosens. Bioelectron. 13: 831-8.
- [29] P. Quillardet, M. Hofnung (1993) *The SOS chromotest: a review*. Mut. Res. 297: 235-279.
- [30] P. Quillardet, O. Huisman, R. D'Ari, M. Hofnung (1982) *SOS chromotest, a direct assay of induction of SOS function in Escherichia coli K-12 to measure genotoxicity*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 5971-5975.
- [31] Y. Oda, S. Nakamura, I. Oki, T. Kato, H. Shinagawa (1985) *Evaluation of the new system (umu-test) for detection of environmental mutagens and carcinogens*. Mut. Res. 147: 219-229.
- [32] E. A. Meighen, P. V. Dunlap (1993) *Physiological, biochemical and genetic control of bacterial bioluminescence*. Adv. Microbiol. Physiol. 34: 1-67.

- 
- [33] E. A. Meighen, R. B. Szittner (1992) *Multiple repetitive elements and organisation of the lux operons of luminescent terrestrial bacteria*. J. Bacteriol. 174: 5371-5381.
- [34] J. Lampinen, L. Koivisto, M. Wahlsten, P. Mäntsälä, M. Karp (1992) *Expression of luciferase genes from different origins in Bacillus subtilis*. Mol. Gen. Genet. 232: 498-504.
- [35] S. J. Gould, S. Subramani (1988) *Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology*. Anal. Biochem. 175: 5-13.
- [36] A. Schmitz, K.-H. Gartemann, J. Fiedler, E. Grund, R. Eichenlaub (1992) *Cloning and sequence analysis of genes for dehalogenation of 4-chlorobenzoate from Arthrobacter sp. strain SU*. Appl. Environ. Microbiol. 58: 4068-4071.
- [37] M. Shima, S. Onishi, S. Mizumori, N. Kato, C. Sakazawa (1989) *Degradation of 4-chlorobenzoate by facultatively alkalophilic Arthrobacter sp. strain SB8*. Appl. Environ. Microbiol. 55: 478-482.
- [38] T. S. Marks, A. R. W. Smith, A. V. Quirk (1984) *Degradation of 4-chlorobenzoic acid by Arthrobacter sp.* Appl. Environ. Microbiol. 48: 1020-1025.
- [39] K.-H. Chang, P.-H. Liang, W. Beck, J. D. Scholten, D. Dunaway-Mariano (1992) *Isolation and characterization of the three polypeptide components of 4-chlorobenzoate dehalogenase from Pseudomonas sp. strain CBS-3*. Biochemistry 31: 5605-5610.
- [40] P. Savard, L. Péloquin, M. Sylvestre (1986) *Cloning of Pseudomonas sp. strain CBS3 genes specifying dehalogenation of 4-chlorobenzoate*. J. Bacteriol. 168: 81-85.
- [41] S. B. Levy (1988) *Tetracycline resistance determinants are widespread*. ASM News 54: 418-421.
- [42] D. Schnappinger, W. Hillen (1996) *Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms*. Arch. Microbiol. 165: 359-369.
- [43] B. Mendez, C. Tachibana, S. B. Levy (1980) *Heterogeneity of tetracycline resistance determinants*. Plasmid 3: 99-108.
- [44] W. Hillen, C. Berens (1994) *Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance*. Annu. Rev. Microbiol. 48: 345-369.
- [45] M. Takahashi, L. Altschmied, W. Hillen (1986) *Kinetic and equilibrium characterization of the tet repressor-tetracycline complex by fluorescence measurement*. J. Mol. Biol. 187: 341-348.

- [46] P. Orth, C. Alings, D. Schnappinger, W. Saenger, W. Hinrichs (1998) *Crystallization and preliminary X-ray analysis of the Tet-repressor/operator complex*. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 54: 99-100.
- [47] P. Orth, D. Schnappinger, P.-E. Sum, G. A. Ellestad, W. Hillen, W. Saenger, W. Hinrichs (1999) *Crystal structure of the tet repressor in complex with novel tetracycline, 9-(N,N-dimethylglycylamido)-6-demethyl-6-deoxy-tetracycline*. J. Mol. Biol. 285: 455-461.
- [48] W. Hinrichs, C. Kisker, M. Düvel, A. Müller, K. Tovar, W. Hillen, W. Saenger (1994) *Structure of the tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance*. Science 264: 418-420.
- [49] C. Berens, K. Pfleiderer, V. Helbl, W. Hillen (1995) *Deletion mutagenesis of Tn10 Tet repressor-localization of regions important for dimerization and inducibility*. Mol. Microbiol. 18: 437-448.
- [50] W. Saenger, P. Orth, C. Kisker, W. Hillen, W. Hinrichs (2000) *Der Tetracyclin-Repressor - das Musterbeispiel für einen biologischen Schalter*. Angew. Chem. 112: 2122-2133.
- [51] S. C. Harrison (1991) *A structural taxonomy of DNA-binding domains*. Nature 353: 715-719.
- [52] R. Baumeister, V. Helbl, W. Hillen (1992) *Contacts between Tet repressor and tet operator revealed by new recognition specificities of single amino acid replacement mutants*. J. Mol. Biol. 226: 1257-1270.
- [53] A. Wissmann, R. Baumeister, G. Müller, B. Hecht, K. Pfleiderer, W. Hillen (1991) *Amino acids determining operator binding specificity in helix-turn-helix motif of Tn10 Tet repressor*. EMBO J. 10: 4145-4152.
- [54] C. Sizemore, A. Wissmann, U. Gülland, W. Hillen (1990) *Quantitative analysis of Tn10 Tet repressor binding to a complete set of tet operator mutants*. Nucl. Acids Res. 18: 2875-2880.
- [55] V. Helbl, C. Berens, W. Hillen (1995) *Proximity probing of Tet repressor to tet operator by dimethylsulfate reveals protected and accessible functions for each recognized base-pair in the major groove*. J. Mol. Biol. 245: 538-548.
- [56] V. Helbl, W. Hillen (1998) *Stepwise selection of tetR variants recognizing tet operator 4C with high affinity and specificity*. J. Mol. Biol. 276: 313-318.

- [57] V. Helbl, B. Tiebel, W. Hillen (1998) *Stepwise selection of TetR variants recognizing tet operator 6C with high affinity and specificity*. J. Mol. Biol. 276: 319-324.
- [58] C. Kleinschmidt, K. Tovar, W. Hillen, D. Porschke (1988) *Dynamics of repressor-operator recognition: the Tn10-encoded tetracycline resistance control*. Biochemistry 27: 1094-1104.
- [59] T. Lederer, M. Kintrup, M. Takahashi, P.-E. Sum, G. A. Ellestad, W. Hillen (1996) *Tetracycline analogs affecting binding to Tn10-encoded tet repressor trigger the same mechanism of induction*. Biochemistry 35: 7439-7446.
- [60] C. Kleinschmidt, K. Tovar, W. Hillen (1991) *Computer simulations and experimental studies of gel mobility patterns for weak and strong non-cooperative protein binding to two targets on the same DNA: application to binding of Tet repressor variants to multiple and single tet operator sites*. Nucl. Acid. Res. 19: 1021-1028.
- [61] W. Hinrichs, C. Kisker, M. Düvel, A. Müller, K. Tovar, W. Hillen, W. Saenger (1994) *Antibiotic resistance: structure of the tet repressor-tetracycline complex and mechanism of induction*. Science 264: 418-420.
- [62] M. Takahashi, J. Degenkolb, W. Hillen (1991) *Determination of the equilibrium association constant between Tet repressor and tetracycline at limiting Mg<sup>2+</sup> concentrations: a generally applicable method for effector-dependent high-affinity complexes*. Anal. Biochem. 199: 197-202.
- [63] C. Kisker, W. Hinrichs, K. Tovar, W. Hillen, W. Saenger (1995) *The complex formed between tet repressor and tetracycline-Mg<sup>2+</sup> reveals mechanism of antibiotic resistance*. J. Mol. Biol. 247: 260-280.
- [64] G. Müller, B. Hecht, V. Helbl, W. Hinrichs, W. Saenger, W. Hillen (1995) *Characterization of non-inducible Tet repressor mutants suggests conformational changes necessary for induction*. Nature Struct. Biol. 2: 693-702.
- [65] M. Corr, A. E. Slanetz, L. F. Boyd, M. T. Jelonek, S. Khilko, B. K. al-Ramadi, Y. S. Kim, S. E. Maher, A. L. Bothwell, D. H. Margulies (1994) *T cell receptor-MHC class I peptide interactions: affinity, kinetics, and specificity*. Science 265: 946-949.
- [66] S. N. Khilko, M. T. Jelonek, M. Corr, L. F. Boyd, A. L. Bothwell, D. H. Margulies (1993) *Measuring interactions of MHC class I molecules using surface plasmon resonance*. J. Biol. Chem. 268: 77-94.

- 
- [67] J. M. Casasnovas, T. A. Springer (1995) *Kinetics and thermodynamics of virus binding to receptor. Studies with rhinovirus, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and surface plasmon resonance*. J. Biol. Chem. 270: 13216-13224.
- [68] K. Bondeson, A. Frostell-Karlsson, L. Fagerstam, G. Magnusson (1993) *Lactose repressor-operator DNA interactions: kinetic analysis by a surface plasmon resonance biosensor*. Anal. Biochem. 214: 245-251.
- [69] I. Chaiken, S. Rose, R. Karlsson (1992) *Analysis of molecular interactions using immobilized ligands*. Anal. Biochem. 201: 197-210.
- [70] D. J. O'Shannessy, M. Brigham-Burk, K. Peck (1992) *Immobilization chemistries suitable for use in the BIAcore surface plasmon resonance detector*. Anal. Biochem. 205: 132-136.
- [71] P. M. Rogowsky, T. J. Close, J. A. Chimera, J. J. Shaw, C. J. Kado (1987) *Regulation of the vir genes of Agrobacterium tumefaciens plasmid pTiC58*. J. Bacteriol. 169: 5101-5112.
- [72] Y. Rozen, A. Nejidat, K.-H. Garteman, S. Belkin (1999) *Specific detection of p-chlorobenzoic acid by Escherichia coli bearing a plasmid-borne fcbA':lux fusion*. Chemosphere 38: 633-641.
- [73] O. Béjà, E. Bibi (1996) *Functional expression of mouse Mdr1 in an outer membrane permeability mutant of Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 5969-5974.
- [74] C. Yanisch-Perron, J. Vieira, J. Messing (1985) *Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors*. Gene 33: 103-119.
- [75] D. Hanahan (1985) *Technique of transformation of E. coli in DNA cloning. A practical Approach*: Oxford, IRL Press.
- [76] R. Menzel (1989) *A microtiter plate-based system for semiautomated growth and assay of bacterial cells for  $\beta$ -galactosidase activity*. Anal. Biochem. 181: 40-50.
- [77] T. N. Belev, M. Singh, J. E. G. McCarthy (1991) *A fully modular vector system for the optimization of gene expression in Escherichia coli*. Plasmid 26: 147-150.
- [78] D. Hansen, W. Hillen (1987) *Tryptophan in  $\alpha$ -helix 3 of tet repressor forms a sequence-specific contact with tet operator in solution*. J. Biol. Chem. 262: 12269-12274.

- [79] U. K. Laemmli (1970) *Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacterial phage T4*. Nature 227: 680-685.
- [80] P. D. Josephy, T. Eling, R. P. Mason (1982) *The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine*. J. Biol. Chem. 257: 3669-3675.
- [81] L. J. Kricka, M. Cooper, X. Ji (1996) *Synthesis and characterization of 4-iodo-phenylboronic acid: a new enhancer for horseradish peroxidase-catalyzed chemiluminescent oxidation of luminol*. Anal. Chem. 240: 119-125.
- [82] V. LeTilly, C. A. Royer (1993) *Fluorescence anisotropy assay implicate protein-protein interactions in trp repressor binding*. Biochemistry 32: 7753-7758.
- [83] C. T. Chung, S. L. Niemela, R. H. Miller (1989) *One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution*. Proc. Natl. Acad. Sci USA 86: 2172-2175.
- [84] P. A. Sharp, B. Sudgen, J. Sambrook (1973) *Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose ethidium bromide electrophoresis*. Biochemistry 12: 2331-2339.
- [85] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis (1989) *Molecular cloning - a laboratory manual*. Second Edition ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [86] L. M. Shewchuk, J. D. Heinemann, W. Ross, S. J. Park, A. O. Summers, C. T. Walsh (1989) *Transcriptional switching by the MerR protein: activation and repression mutants implicate distinct DNA and mercury(II)binding domains*. Biochemistry 28: 2340-2344.
- [87] L. M. Shewchuk, G. L. Verdine, C. T. Walsh (1989) *Transcriptional switching by the metalloregulatory MerR protein: initial characterization of DNA and mercury(II)binding activities*. Biochemistry 28: 2331-2339.
- [88] K. B. Mullis, F. A. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. T. Horn, H. A. Ehrlich (1986) *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction*. Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 51: 1053-1059.
- [89] F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson (1977) *DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc. Natl. Sci. USA 74: 5463-5467.
- [90] R. M. Hendry, J. E. Herrmann (1980) *Immobilization of antibodies on nylon for use in enzyme-linked immunoassay*. J. Immunol. Methods 35: 285-96.

- 
- [91] N. K. AbouKhair, M. M. Ziegler, T. O. Baldwin (1985) *Bacterial luciferase: demonstration of a catalytically competent altered conformational state following a single turnover*. *Biochemistry* 24: 3942-3947.
- [92] M. Inukai, M. Yonese (1999) *Effects of charge density on drug permeability through alginate gel membranes*. *Chem. Pharm. Bull* 47: 1059-1063.
- [93] H. J. Heipieper, H. Keweloh, H. J. Rehm (1991) *Influence of phenols on growth and membrane permeability of free and immobilized Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1213-1217.
- [94] S. Lee, M. Suzuki, E. Tamiya, I. Karube (1992) *Sensitive bioluminescent detection of pesticides utilizing membrane mutant of Escherichia coli and recombinant DNA technology*. *Anal. Chim. Acta* 257: 183-188.
- [95] Y. Davidov, R. Rozen, R. D. Smulski, T. K. V. Dyk, A. C. Vollmer, D. A. Elsemore, R. A. LaRossa, S. Belkin (2000) *Improved bacterial SOS promoter&Colon; lux fusions for genotoxicity detection*. *Mut. Res.* 466: 97-107.
- [96] F. Marincs, D. W. White (1994) *Immobilization of Escherichia coli expressing the lux genes of Xenorhabdus luminescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3862-3863.
- [97] P. E. J. Groenewegen, A. J. M. Driessen, W. N. Konings, J. A. M. d. Bont (1990) *Energy-dependent uptake of 4-chlorobenzoate in the Coryneform bacterium NTB-1*. *J. Bacteriol.* 172: 419-423.
- [98] T. Maier, N. Drapal, M. Thanbichler, A. Böck (1998) *Strep-TagII affinity purification: an approach to study intermediates of metalloenzyme biosynthesis*. *Anal. Biochem.* 259: 68-73.
- [99] G. Klock, B. Unger, C. Gatz, W. Hillen, J. Altenbuchner, K. Schmid, R. Schmitt (1985) *Heterologous repressor-operator recognition among four classes of tetracycline resistance determinants*. *J. Bacteriol.* 161: 326-332.
- [100] R. Oehmichen, G. Klock, L. Altschmied, W. Hillen (1984) *Construction of an E. coli strain overproducing the Tn10-encoded TET repressor and its use for large scale purification*. *EMBO J.* 3: 539-543.
- [101] W. Hillen, G. Klock, I. Klaffenberger, L. V. Wray, W. S. Reznikoff (1982) *Purification of the tet repressor and tet operator from the transposon Tn10 and characterization of their interaction*. *J. Biol. Chem.* 257: 6605-6613.

- [102] N. Ettner, G. Müller, C. Berens, H. Backes, D. Schnappinger, T. Schreppel, K. Pfeleiderer, W. Hillen (1996) *Fast large-scale purification of tetracycline repressor variants from overproducing Escherichia coli strains*. J. Chrom. A 742: 95-105.
- [103] B. Unger, J. Becker, W. Hillen (1984) *Nucleotide sequence of the gene, protein purification and characterization of pSC101-encoded tetracycline resistance-gene-repressor*. Gene 31: 103-108.
- [104] B. Unger, G. Klock, W. Hillen (1984) *Nucleotide sequence of the repressor gene of the RAI tetracycline resistance determinant: structural and functional comparison with three related Tet repressor genes*. Nucl. Acids Res. 12: 7693-7703.
- [105] L. R. H. Cohen, K. Strupat, F. Hillenkamp (1997) *Analysis of quarternary protein ensembles by matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 8: 1046-1052.
- [106] P. Orth, F. Cordes, D. Schnappinger, W. Hillen, W. Saenger, W. Hinrichs (1998) *Conformational changes of the tet repressor induced by tetracycline trapping*. J. Mol. Biol. 279: 439-447.
- [107] B. Tiebel, L. M. Aung-Hilbrich, D. Schnappinger, W. Hillen (1998) *Conformational changes necessary for gene regulation by tet repressor assayed by reversible disulfide bond formation*. EMBO J. 17: 5112-5119.
- [108] C. Berens, L. Altschmied, W. Hillen (1992) *The role of the N terminus in tet repressor for tet operator binding determined by mutational analysis*. J. Biol. Chem. 267: 1945-1952.
- [109] G. C. Shaw, C. H. Sun, A. Chiang (1995) *Purification and characterization of 6xHis-tagged Bm3R1 repressor of Bacillus megaterium*. Biochem. Mol. Biol. Int. 37: 1197-1205.
- [110] O. Livnah, E. A. Bayer, M. Wilchek, J. L. Sussman (1993) *Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 90: 5076-80.
- [111] A. A. Qureshi, A. A. Bulich, D. L. Isenberg (1998) *Microtox toxicity test system - where they stand today*, in Methods in Molecular Biology/Bioluminescence, R. A. LaRossa, Editor. The Humana Press, Inc.: Totowa, NJ: 185-199.
- [112] H. Lederer, K. Tovar, G. Baer, R. P. May, W. Hillen, H. Heumann (1989) *The quarternary structure of Tet repressors bound to the Tn10-encoded tet gene control region determined neutron solution scattering*. EMBO J. 8: 1257-1263.

- 
- [113] E. A. Pyles, J. C. Lee (1998) *Escherichia coli* cAMP receptor protein-DNA complexes. 2. Structural asymmetry of DNA bending. *Biochemistry* 37: 5201-10.
- [114] I. D. Parsons, B. Persson, A. Mekhalfia, G. M. Blackburn, P. G. Stockley (1995) *Probing the molecular mechanism of action of co-repressor in the E. coli methionine repressor-operator complex using surface plasmon resonance (SPR)*. *Nucl. Acid Res.* 23: 211-216.
- [115] I. D. Parsons, P. G. Stockley (1997) *Quantitation of the Escherichia coli methionine repressor-operator interaction by surface plasmon resonance is not affected by the presence of a dextran matrix*. *Anal. Biochem.* 245: 82-87.
- [116] P. G. Stockley, A. J. Baron, C. M. Wild, I. D. Parsons, C. M. Miller, C. A. M. Holtham, S. Baumberg (1998) *Dissecting the molecular details of prokaryotic translational control by surface plasmon resonance: the methionine and arginine repressor proteins*. *Biosens. Bioelectron.* 13: 637-650.
- [117] F. Blaesing, C. Weigel, M. Welzeck, W. Messer (2000) *Analysis of the DNA-binding domain of Escherichia coli DnaA protein*. *Mol. Microbiol.* 36: 557-569.
- [118] Y. Ikariyama, S. Nishiguchi, T. Koyama, E. Kobatake, M. Aizawa (1997) *Fiber-optic-based biomonitoring of benzene derivatives by recombinant E. coli bearing luciferase gene-fused TOL-plasmid immobilized on the fiber-optic end*. *Anal. Chem.* 69: 2600-2605.
- [119] K. P. Yoon, T. K. Misra, S. Silver (1991) *Regulation of the cadA cadmium resistance determinant of Staphylococcus aureus plasmid pI258*. *J. Bacteriol.* 173: 7643-7649.
- [120] J. Guzzo, A. Guzzo, M. S. DuBow (1992) *Characterization of the effects of aluminium on luciferase biosensors for the detection of ecotoxicity*. *Tox. Lett.* 64/65: 686-693.
- [121] D. L. Scott, S. Ramanathan, W. Shi, B. P. Rosen, S. Daunert (1997) *Genetically engineered bacteria: electrochemical sensing systems for antimonite and arsenite*. *Anal. Chem.* 69: 16-20.
- [122] M. Virta, S. Tauriainen, M. Karp (1998) *Bioluminescence-based metal detectors*, in *Methods in Molecular Biology/Bioluminescence.*, R. A. LaRossa, Editor. The Humana Press, Inc: Totowa, NJ: 259-268.

- [123] P. Corbisier, G. Ji, M. Mergeay, S. Silver (1993) *luxAB* gene fusions with the arsenic and cadmium resistance operons of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. FEMS Microbiol. Lett. 110: 231-238.
- [124] S. Tauriainen, M. Karp, W. Chang, M. Virta (1998) Luminescent bacterial sensor for cadmium and lead. Biosens. Bioelectron. 13: 931-938.
- [125] N. Peitzsch, G. Eberz, D. H. Nies (1998) *Alcaligenes eutrophus* as a bacterial chromate sensor. Appl. Environ. Microbiol. 64: 453-458.
- [126] Y.-H. Khang, Z. K. Yang, R. S. Burlage (1997) Measurement of iron-dependence of *pupA* promoter activity by a *pup-lux* bioreporter. J. Microbiol. Biotechnol. 7: 325-355.
- [127] D. A. Rouch, J. Parkhill, N. L. Brown (1995) Induction of bacterial mercury- and copper-responsive promoters: functional differences between inducible systems and implications for their gene-fusions for in vivo metal biosensors. J. Ind. Microbiol. 14: 349-353.
- [128] C. W. Condee, A. O. Summers (1992) A *mer-lux* transcriptional fusion for real-time examination of in vivo gene expression kinetics and promoter response to altered superhelicity. J. Bacteriol. 174: 8094-8101.
- [129] O. Selifonova, R. Burlage, T. Barkay (1993) Bioluminescent sensors for detection of bioavailable Hg(II) in the environment. Appl. Environ. Microbiol. 59: 3083-3090.
- [130] L. Tescione, G. Belfort (1993) Construction and evaluation of a metal ion biosensor. Biotechnol. Bioeng 42: 945-952.
- [131] T. Barkay, R. R. Turner, L. D. Rasmussen, C. A. Kelly, J. W. M. Rudd (1998) Luminescence facilitated detection of bioavailable mercury in natural waters, in Methods in Molecular Biology/Bioluminescence., R. A. LaRossa, Editor. The Humana Press, Inc: Totowa, NJ: 231-246.
- [132] A. G. Prest, M. K. Winson, J. R. Hammond, G. S. Stewart (1997) The construction and application of a *lux*-based nitrate biosensor. Lett. Appl. Microbiol. 24(5): 355-360.
- [133] J. L. Erbe, A. C. Adams, K. B. Taylor, L. M. Hall (1996) Cyanobacteria carrying an *smt-lux* transcriptional fusion as biosensors for the detection of heavy metal cations. J. Ind. Microbiol. 17: 80-83.

- [134] P. Sticher, M. C. M. Jaspers, K. Stemmler, H. Harms, A. J. B. Zehnder, J. R. v. d. Meer (1997) *Development and characterization of a whole-cell bioluminescent sensor for bioavailable middle-chain alkanes in contaminated groundwater samples*. Appl. Env. Microbiol. 63: 4053-4060.
- [135] E. Kobatake, T. Niimi, T. Haruyama, Y. Ikariyama, M. Aizawa (1995) *Biosensing of benzene derivatives in the environment by luminescent Escherichia coli*. Biosens. Bioelectron. 10: 601-605.
- [136] B. M. Willardson, J. F. Wilkins, T. A. Rand, J. M. Schrupp, K. K. Hill, P. Keim, P. J. Jackson (1998) *Development and testing of a bacterial biosensor for toluene-based environmental contaminants*. Appl. Environ. Microbiol. 64: 1006-1012.
- [137] R. S. Burlage (1998) *Organic contaminant detection and biodegradation characteristics*, in Methods in Molecular Biology/Bioluminescence, R. A. LaRossa, Editor. The Humana Press, Inc: Totowa, NJ: 259-268.
- [138] O. V. Selifonova, R. W. Eaton (1996) *Use of an ipb-lux fusion to study regulation of the isopropylbenzene catabolism operon of pseudomonas putida RE204 and to detect hydrophobic pollutants in the environment*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 778-783.
- [139] J. Klein, J. Altenbuchner, R. Mattes (1997) *Genetically modified Escherichia coli for colorimetric detection of inorganic and organic Hg compounds*, in Frontiers in Biosensorics, F. W. Scheller, F. Schubert, J. Fedrowitz, Editors. Birkhäuser Verlag: Basel: 133-151.
- [140] A. Heitzer, K. Malachowsky, J. E. Thonnard, P. R. Bienkowski, D. C. White, G. S. Sayler (1994) *Optical biosensor for environmental on-line monitoring of naphthalene and salicylate bioavailability with an immobilized bioluminescent catabolic reporter bacterium*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1487-1494.
- [141] A. C. Layton, M. Muccini, M. M. Ghosh, G. S. Sayler (1998) *Construction of a bioluminescent reporter strain to detect polychlorinated biphenyls*. Appl. Environ. Microbiol. 64: 5023-5026.
- [142] J. Harvey, G. Zweig (1980) *Pesticide analytical methodology*. American Chemical Society, Washington DC 12: 231-249.
- [143] N. Furusawa (1999) *Rapid liquid chromatographic determination of oxytetracycline in milk*. J. Chrom. A 839: 247-251.

- [144] K. D. Wasch, L. Okerman, S. Croubels, H. D. Brabander, J. V. Hoof, P. D. Backer (1998) *Detection of residues of tetracycline antibiotics in pork and chicken meat: correlation between results of screening and confirmatory tests*. Analyst 123: 2737-2747.
- [145] B. Lang, E. Märtelbauer, G. Terplan (1992) *Ein enzymimmunologischer Nachweis von Tetracyclinen in Milch*. Arch. Lebensmittelhyg. 43: 77-80.
- [146] S. E. Charm, R. Chi (1988) *Microbial receptor assay for rapid detection and identification of seven families of antimicrobial drugs in milk: collaborative study*. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71: 304-316.
- [147] J. F. Nouws, G. Loeffen, J. Shouten, H. v. Egmont, H. Keukens, H. Stegman (1998) *Testing of raw milk for tetracycline residues*. J. Dairy Sci. 81: 2341-2345.
- [148] M. T. Korpela, J. S. Kurittu, J. T. Karvinen, M. T. Karp (1998) *A recombinant Escherichia coli sensor strain for the detection of tetracyclines*. Anal. Chem. 70: 4457-4462.
- [149] A. M. Benotmane, M. F. Hoylaerts, D. Collen, A. Belayew (1997) *Nonisotopic quantitative analysis of protein-DNA interactions at equilibrium*. Anal. Biochem. 250: 181-185.
- [150] J. M. Mitchell, A. J. Yee, W. B. McNab, M. W. Griffiths, S. A. McEwen (1999) *Validation of the LacTek test applied to spiked extracts of tissue samples: determination of performance characteristics*. J. AOAC Int. 82: 79-84.
- [151] E. D'Haese, H. J. Nelis, W. Reybroeck, H. De Ruyck (1999) *Evaluation of a modified enzymatic test for the detection of tetracyclines in milk*. J. Food Prot. 62: 632-6.
- [152] S. A. Nabi, E. S. M. Abu-Nameh, N. Rahman, M. I. H. Helaleh (1998) *Field method for micro-quantitative determination of tetracycline in human urine*. Fresenius J. Anal. Chem. 360: 140-141.
- [153] W. Liu, Y. Wang, J. Tang, G. Shen, R. Yu (1998) *Optical fiber sensor for tetracycline antibiotics based on fluorescence quenching of covalent immobilized anthracene*. Analyst 123: 365-369.
- [154] J. P. Sharma, R. F. Bevill (1978) *Improved high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of tetracyclines in plasma, urine and tissues*. J. Chrom. 166: 213-220.

- 
- [155] D. L. Collins-Thompson, D. S. Wood, I. Q. Thomson (1988) *Detection of antibiotic residues in consumer milk in North America using Charm Test II procedure*. J. Food Protect. 51: 632-633.
- [156] E. D'Haese, H. J. Nelis, W. Reybroeck (1998) *Chemiluminometric  $\beta$ -galactosidase detection as basis for a tetracycline screening test in milk*. J. Biolumin. Chemilumin. 13: 279-283.



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Stuttgart, den 1. Oktober 2000



## Lebenslauf

Name: Köhler  
Vorname: Sabine  
Wohnort: 70327 Stuttgart, Selmaweg 10  
Geburtsdatum: 7. Januar 1972  
Geburtsort: Böblingen  
Nationalität: deutsch

### Ausbildung:

8/1978 – 6/1982 Ludwig-Uhland-Schule, Böblingen  
8/1982 – 12/1984 Albert-Einstein-Gymnasium, Böblingen  
1/1985 – 6/1991 Württemberg-Gymnasium, Stuttgart  
10/1991 – 8/1997 Chemiestudium an der Universität Stuttgart mit Abschluß als  
Diplom-Chemikerin  
Diplomarbeit am Institut für Technische Biochemie an der Universität Stuttgart unter Leitung von Prof. Rolf D. Schmid: *Isolierung einer mikrobiellen Phospholipase*  
10/1997 – 10/2000 Doktorarbeit am Institut für Technische Biochemie an der Universität Stuttgart unter Leitung von Prof. Rolf D. Schmid

### Publikationen:

S. Köhler, S. Belkin, R. D. Schmid (2000) *Reporter gene bioassays in environmental analysis*. Fresenius J. Anal. Chem. 366: 769-779.

S. Köhler, T. T. Bachmann, J. Schmitt, S. Belkin, R. D. Schmid (2000) *Detection of 4-chlorobenzoate using immobilized recombinant E. coli reporter strains*. Sensors & Actuators B 70: 139-144.

Stuttgart, den 1. Oktober 2000