



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf



Hochschule für Angewandte
Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences
Fakultät Life Sciences

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

Bachelorthesis

Modifikation des Fluoreszenz-basierten ATP-Sensors ATPOS für das zielgerichtete Andocken an Zelloberflächen

Im Studiengang
B. Sc. Biotechnologie

Vorgelegt von
Ibrahim Inbaieg

Hamburg
17. Mai 2023

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Wacker, Claus-Dieter (Life Sciences, HAW Hamburg)
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Haag, Friedrich (Institut für Immunologie, UKE)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor des Institutes für Immunologie des
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich während meines Bachelorstudiums und besonders in der Anfertigungszeit meiner Bachelorarbeit unterstützt und motiviert haben.

Ein besonderes Dankeschön gilt Herr Prof. Dr. med. Friedrich Haag, der meine Bachelorarbeit mit viel Engagement betreut hat und stets hilfreiche Anregungen gegeben hat. Durch seine hervorragende Betreuung habe ich wertvolle Erfahrungen gesammelt, die meine fachlichen und akademischen Fähigkeiten weiterentwickelt haben. Ebenso bedanke ich mich sehr bei Herrn Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker für die angenehme Betreuung meiner Thesis und die Begutachtung meiner Arbeit. Seine Unterstützung und inspirierenden Vorlesungen an der HAW haben maßgeblich dazu beigetragen, dass ich meine Bachelorarbeit erfolgreich abschließen konnte. Ich bin dankbar für ihre Zeit, ihre fachliche Kompetenz und ihre freundliche Art.

Ich möchte auch meiner gesamten Arbeitsgruppe danken, insbesondere Samantha Eiberg und Fabienne Seyfried, für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und ihre unglaubliche Hilfsbereitschaft. Ein riesiges Dankeschön an Tobias Stähler für seine Betreuung im Labor und die stets verfügbare Unterstützung bei Fragen. Ein weiterer besonderer Dank geht an der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Friedrich Koch-Nolte für die praktische Unterstützung an meinem Projekt. Für die liebevolle Aufnahme im Team des Instituts für Immunologie und der unvergesslichen und erlebnisreichen Zeit im Labor am UKE bedanke ich mich.

Zu guter Letzt möchte ich meinen größten Dank an meine Familie und Freunde richten, auf deren Unterstützung, Geduld und Interesse ich mich jederzeit verlassen konnte. Meine Eltern, Geschwister und Großeltern haben mich mit ihrem Mitgefühl immer liebevoll und unterstützend begleitet. Ich kann nicht in Worte fassen, wie wichtig ihre Unterstützung für mich war.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	vi
Tabellenverzeichnis.....	vii
Formelverzeichnis.....	vii
Abkürzungen.....	viii
Kurzfassung.....	x
Abstract.....	xi
1 Zielsetzung der Arbeit.....	12
2 Einleitung.....	13
2.1 ATP als Signalmolekül.....	13
2.1.1 ATP-Freisetzung.....	14
2.2 ATP-Messung und ATP-Sensoren.....	15
2.2.1 ATPOS ATP-Sensor.....	16
2.3 Modifizierte ATPOS ATP-Sensoren.....	19
2.3.1 TP1170_alfa_ATPOS.....	19
2.3.1.1 Antikörper und Nanobodies.....	20
2.3.2 ATPOS_alfa_SBP.....	22
2.3.2.1 Streptavidin SA.....	22
2.3.3 ATPOS_Sortase.....	23
2.3.3.1 Sortase Enzym.....	23
3 Materialien.....	24
3.1 Antibiotika.....	24
3.2 Antikörper.....	24
3.3 Bakterienstämme.....	24
3.4 Chemikalien und Reagenzien.....	24
3.5 Enzyme.....	25
3.6 Farbstoffe.....	26
3.7 Geräte.....	26
3.8 Kits.....	27
3.9 Lösungen und Nährmedien.....	28
3.10 Plasmide.....	29
3.11 Primer.....	29
3.12 Puffer.....	29
3.13 Protein Marker.....	30
3.14 Software.....	31
3.15 Verbrauchsmaterial.....	31
3.16 Zelllinien.....	31
4 Methoden und Durchführung.....	32
4.1 Klonierung.....	32
4.1.2.1 Verdauen des Inserts sowie des Vektors durch Restriktionsenzyme.....	33
4.1.2.2 Dephosphorylierung.....	34
4.1.2.3 Agarose-Gelelektrophorese.....	34
4.1.2.4 Aufreinigung der Fragmente mit dem MN-Kit (Macherey-Nagel) / Nucleospin Gel and PCR Clean-up.....	36
4.1.2.5 Bestimmung der Konzentration der DNA-Plasmide mittels des Spektralphotometers Nanodrop 2000c.....	36

Inhaltsverzeichnis

4.1.2.6 Ligation des Inserts mit dem Vektor.....	37
4.2 DNA-Sequenzierung.....	38
4.2.1 Transformation der rekombinanten DNA-Plasmide in <i>E.coli</i> XL 1-Blue Zellen	38
4.2.1.2.1 Screening und Kultivierung der <i>E.coli</i> Zellen.....	39
4.2.2 Plasmid Präparation.....	39
4.2.2.2 Präparation bei dem Mini Kit (QIAprep®Spin Miniprep).....	40
4.2.2.3 Präparation bei dem Maxi Kit (NucleoBond Xtra Maxi EF).....	40
4.2.3 Sequenzierung der aufgereinigten Plasmide mittels des <i>Mix2Seq</i> Kits.....	42
4.3 Proteinproduktion.....	43
4.3.1 Produktion der rekombinanten Proteine in <i>E.coli</i> Zellen.....	43
4.3.1.1 Transformation der rekombinanten Plasmide in <i>E.coli</i> BL 21-DE3 Zellen (<i>Single Cells_Novagen</i>).....	43
4.3.1.2 Kultivierung der Vorkultur und Hauptkultur.....	44
4.3.2 Produktion der rekombinanten Proteine in <i>HEK</i> -Zellen.....	45
4.3.2.1 Transfektion der rekombinanten Plasmide in die <i>HEK</i> -Zelllinie.....	45
4.4 Aufreinigung der rekombinanten Proteine.....	47
4.4.1 Lyse der Bakterienzellen.....	47
4.4.2 Aufreinigung durch Ni-NTA Säulen (Protino Ni-TED 1000 Packed Columns)	48
4.4.3 Aufkonzentrieren der eluierten Proteine durch Ultrafiltrationstubes (Amicon- Säulen).....	49
4.4.4 Verdauen der rekombinanten Proteine.....	49
4.4.5 Aufreinigung durch die ALFA Selector PE Matrix.....	50
4.4.6 Proteinreinigung durch Dialyse mittels Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette.....	51
4.5 Auftrennung und Nachweis der Proteine.....	53
4.5.1 SDS-PAGE.....	53
4.5.2 Western Blot.....	54
4.6 Markierung der ATPOS ATP-Sensoren mit einem fluoreszierenden Farbstoff.....	56
4.7 Detektion der hergestellten ATPOS ATP-Sensoren.....	57
4.7.1 Austestung der Bindungsfähigkeit der ATPOS durch Biolayer-Interferometrie (BLItz)	57
4.7.2 Durchflusszytometrie.....	59
4.7.2.2 Kopplung der ATPOS-Sensoren an Streptavidin beschichtete Beads (Perlen) und Analyse ihrer Bindung mit dem Durchflusszytometer (FACS).....	61
4.7.3 Untersuchung der Bindung der ATPOS ATP-Sensoren mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Leica TCS SP8X „DMi8“)......	61
4.7.3.1 Zellen Aufteilen und Aufreinigung.....	62
4.7.3.2 Zellzahlbestimmung.....	63
4.7.3.3 Kopplung der ATPOS ATP-Sensoren mit den Antikörpern an die Zellen.....	64
5 Ergebnisse.....	65
5.1 Klonierung der rekombinanten DNA-Plasmide.....	66
5.1.1 Verdau durch Restriktionsenzyme.....	66
5.1.2 Agarose Gel-Elektrophorese.....	67
5.1.3 Ligation.....	68
5.1.4 Sequenzierung der rekombinanten DNA-Plasmide.....	69
5.2 Herstellung der rekombinanten Proteine.....	69
5.2.1 Transformation der rekombinanten Proteine in <i>E.coli</i> BL21-Zellen und die Kultivierung der Zellen.....	69

Inhaltsverzeichnis

5.2.2 Lyse der Bakterienzellen	70
5.2.3 Transfektion der rekombinanten Plasmide in die <i>HEK</i> -Zelllinie <i>HEK</i> -293 6E..	71
5.3 Aufreinigung und Quantifizierung der Proteine.....	73
5.3.1 Aufreinigung durch NiNTA-Säulen und Verdauen der Proteine.....	73
5.3.2 Aufreinigung durch ALFA-Matrix.....	75
5.3.3 Verlust-Berechnung und Bestimmung der Konzentrationen aus den Gelen.....	76
5.4 Markierung der Proteine.....	77
5.4.1 Berechnung der Volumina für die Cy3-Kopplung.....	77
5.4.2 Fluoreszenz-Mikroskops (IVIS - <i>In Vivo</i> Imaging System).....	77
5.5 Charakterisierung der ATPOS ATP-Proteinsensoren.....	78
5.5.1 Biolayer-Interferometrie (BLItz)	78
5.5.2 Nachweis der Bindung von ATPOS_SBP an SA-Beads in der Durchflusszytometrie (FACS).....	80
5.5.3 Nachweis der Bindung von ATPOS_SBP an SA-Beads in der EVOS- Zellbildungsgebungssystem.....	81
5.5.4 Untersuchung der ATP-Reaktivität der ATPOS ATP-Sensoren mittels eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica TCS SP8X „DMi8“)......	82
6 Diskussion.....	85
6.1 Herstellung und Aufreinigung der ATP-Proteinsensoren.....	85
6.2 Markierung der ATP-Proteinsensoren und Nachweis ihrer Bindung an ihre Interaktionspartner.....	86
6.2.1 TP1170_alfa_ATPOS.....	86
6.2.2 ATPOS_alfa_SBP.....	87
6.3 Andocken der ATP-Proteinsensoren an Partikel oder Zellen.....	87
6.3.1 TP1170_alfa_ATPOS_ <i>E.coli</i>	87
6.3.2 ATPOS_alfa_SBP_ <i>E.coli</i>	88
7 Zusammenfassung und Ausblick.....	89
Literaturverzeichnis.....	90
Eidesstattliche Erklärung.....	97
Anhang.....	98
1 Klonierte DNA-Sequenzen.....	98
2 Verdauter DNA-Fragmente.....	102

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Dreidimensionale Proteinstruktur der modifizierten ATPOS ATP-Sensoren.....	12
Abbildung 2: Struktur von Adenosintriphosphat und seinen Metaboliten.....	13
Abbildung 3: Mechanismen der ATP-Freisetzung aus Zellen der Blutgefäßwand.....	15
Abbildung 4: ATP Optical Sensor (ATPOS).....	17
Abbildung 5: TP1170_alfa_ATPOS.....	19
Abbildung 6: Aufbau eines Antikörpers und dessen rekombinante Fragmente.....	21
Abbildung 7: ATPOS_alfa_SBP.....	22
Abbildung 8: ATPOS_Sortase.....	23
Abbildung 9: Schematischer Überblick über den Restriktionsverdau und die Ligation.....	33
Abbildung 10: Ausschneiden der Vektor-Bande aus dem Agarose-Gel.....	35
Abbildung 11: Prinzip der Bio-Layer-Interferometrie.....	58
Abbildung 12: Schematische Darstellung des FACS-Messprinzips und Datenanalyse.....	60
Abbildung 13: Schema der Zellzahlbestimmung.....	63
Abbildung 14: Arbeitsablauf für die Klonierung, Expression, Aufreinigung und ATP-Bindungsexperimente der ATPOS ATP-Sensoren.....	65
Abbildung 15: Agarose Gel des Vektors pH14N8_myc_alfa_ATPOS.....	67
Abbildung 16: Agarose Gel für zwei Vektor-Plasmide.....	67
Abbildung 17: Eine Kanamycin-haltige Agarplatte.....	70
Abbildung 18: SDS für die Proteinexpression der klonierten DNA-Konstrukte in <i>HEK</i> -Zellen....	72
Abbildung 19: Transfektion in <i>HEK</i> -293 6E Zellen.....	72
Abbildung 20: SDS-PAGE für die NiNTA-Aufreinigung und für das Verdauen der Proteine.....	74
Abbildung 21: SDS-PAGE und Western Blot für die NiNTA-Aufreinigung.....	74
Abbildung 22: SDS-PAGE für die Aufreinigung durch ALFA-Matrix 1.....	75
Abbildung 23: SDS-PAGE für die Aufreinigung durch ALFA-Matrix 2.....	76
Abbildung 24: Überprüfung der Farbstoffkopplung.....	77
Abbildung 25: Bindungsverlauf des TP1170_alfa_ATPOS_ <i>E.coli</i>	78
Abbildung 26: Bindungsverlauf des TP1170_alfa_ATPOS_ <i>HEK</i>	79
Abbildung 27: Bindungsverlauf der ATPOS_alfa_SBP (<i>E.coli</i> und <i>HEK</i>).....	79
Abbildung 28: Darstellung der mit ATPOS_alfa_SBP inkubierten, SA-beschichteten Beads im Durchflusszytometer.....	80
Abbildung 29: Nachweis der Bindung des ATPOS_alfa_SBP an die mit SA-beschichteten Beads.....	81
Abbildung 30: Gekoppelte SA-beschichteten Beads mit ATPOS_alfa_SBP.....	81
Abbildung 31: Mit ATPOS_alfa_SBP_ <i>E.coli</i> gekoppelte Jurkat Zellen.....	83
Abbildung 32: Mit ATPOS_alfa_SBP_ <i>E.coli</i> gekoppelte Jurkat Zellen vor und nach ATP-Zugabe.....	83
Abbildung 33: Mit TP1170_alfa_ATPOS_ <i>E.coli</i> gekoppelte CD4+ Zellen.	84
Abbildung 34: Gen-Karte pH14N8_TP1170_alfa_ATPOS. Erstellt mit Snap Gene.....	100
Abbildung 35: Gen-Karte pCSE2.5_TP1170_alfa_ATPOS. Erstellt mit Snap Gene.....	100
Abbildung 36: Gen-Karte pH14N8_ATPOS_alfa_SBP. Erstellt mit Snap Gene.....	101
Abbildung 37: Gen-Karte pCSE2.5_ATPOS_alfa_SBP. Erstellt mit Snap Gene.....	101
Abbildung 38: Gen-Karte pCSE2.5_ATPOS_Sortase. Erstellt mit Snap Gene.....	102

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antibiotika.....	24
Tabelle 2: Antikörper.....	24
Tabelle 3: Bakterienstämme.....	24
Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien.	24
Tabelle 5: Enzyme.....	25
Tabelle 6: Farbstoffe.....	26
Tabelle 7: Geräte.....	26
Tabelle 8: Kits.....	27
Tabelle 9: Lösungen und Nährmedien.	28
Tabelle 10: Plasmide.....	29
Tabelle 11: Primer.....	29
Tabelle 12: Puffer.....	29
Tabelle 13: Protein Marker.....	30
Tabelle 14: Software.....	31
Tabelle 15: Verbrauchsmaterial.....	31
Tabelle 16: Zelllinien.....	31
Tabelle 17: Die Konzentrationen und Volumina der verdauten Vektoren während des Klonierungsprozesses.....	66
Tabelle 18: Die Konzentrationen und Volumina der bei der Klonierung ligierten DNA-Fragmente und Plasmide.....	68
Tabelle 19: Die gemessenen Konzentrationen der mittels Miniprep Kit isolierten Plasmide und die darauf basierend berechneten Volumina für die Sequenzierung.....	69
Tabelle 20: Die gemessenen optischen Dichten und die berechneten Volumina für die Zellkulturen.....	69
Tabelle 21: Das Gewicht des Pellets der Zellkultur und das berechnete Puffer-Volumen.....	70
Tabelle 22: Die gemessenen Konzentrationen der mittels Maxi Kit isolierten Plasmide und die berechneten Volumina für die Transfektion.....	71
Tabelle 23: Die abgeschätzte Konzentrationen aus dem SDS-Gel und die Berechnung des Protein-Verlusts.....	76
Tabelle 24: Berechnung der Volumina für die Farbstoffkopplung.....	77
Tabelle 25: Übersicht verdauter Insert-DNA-Fragmente 1.....	102
Tabelle 26: Übersicht verdauter Insert-DNA-Fragmente 2.....	103
Tabelle 27: Übersicht verdauter Vektoren.....	103

Formelverzeichnis

Formel 1: DNA-Sequenzierung.....	42
Formel 2: Volumen der Hauptkultur für die Transformation.....	44
Formel 3: Plasmidvolumen für die Transfektion.....	45
Formel 4: Volumen der ALFA-Beads.....	50
Formel 5: Zellkonzentration.....	63
Formel 6: Volumen der verdauten Vektoren während des Klonierungsprozesses.....	66
Formel 7: Volumen der ligierten DNA-Fragmente und Plasmide.....	68

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ADO	Adenosin
ADP	Adenosine Diphosphate
AK	Antikörper
AMP	Adenosine Monophosphate
AP	Antarktische Phosphatase
ATP	Adenosine Triphosphate
ATPOS	ATP - Optical Sensor
Bp	Basenpaare
ca	Circa
Ca ²⁺	Calcium Ionen
Carb	Carbenicillin
Cy3	Cyanin-3-Maleimid
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
diH ₂ O	deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence-activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	Forward scatter
GFP	Green Fluorescent Protein
h	Hour (Stunde)
H ₂ O	Wasser
<i>HEK</i>	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HF®	High Fidelity
HRP	Horseradish Peroxidase
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactoside
Kana	Kanamycin
kb	kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KDS	Kaliumdodecylsulfat
L	Liter
LDS	Loading Dye Solution
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
NEDP1	NEDD8-Specific Protease 1
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetic-Acid
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte

Abkürzungen

PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pH	Potentia Hydrogenii
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
RFP	Red Fluorescent Protein
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SdAb	Single-Domain-Antikörper
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
sec	Sekunde
SOC	Super optimal broth with catabolite repression
SRA	Sample Reducing Agent
SSC	Side scatter
Tab.	Tabelle
TAE	Tris Base-Acetic
UV	Ultraviolet
V	Volt
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter

Kurzfassung

Adenosintriophosphat (ATP) ist ein essenzielles Molekül, das neben seiner intrazellulären Funktion als Energiespeicher auch extrazellulär als Signalmolekül bei verschiedenen physiologischen Prozessen wie Zellatmung, Photosynthese und DNA-Synthese wirkt. Da die für diese Prozesse relevanten ATP-Konzentrationen an der Zelloberfläche im oberen nanomolaren Bereich liegen, stellt deren Messung eine technische Herausforderung dar. *Kitajima et al. (2020)* haben einen Protein-basierten fluoreszierenden ATP Sensor (ATP optical sensor, ATPOS) entwickelt, der sich zur Visualisierung von extrazellulärem ATP im submikromolaren Bereich eignet. Allerdings ist die Bindung dieses Sensors an definierte Proteine auf Zelloberflächen schwierig. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, die ATPOS ATP-Sensoren so zu modifizieren, dass sie spezifisch an die Oberfläche von Zellen binden können und damit in der Lage sind, lokale ATP-Konzentrationen durch Bildgebung in lebenden Zellen nachzuweisen.

Während dieser Arbeit werden drei ATPOS-basierte Fusionsproteine namens TP1170_alfa_ATPOS, ATPOS_alfa_SBP und ATPOS_Sortase entwickelt, die sowohl in bakteriellen als auch humanen Zellen produziert, aufgereinigt und mit dem Farbstoff Cy3-Maleimid markiert werden. Die erste Variante beinhaltet die Fusion von ATPOS mit dem Nanobody TP1170, der von *Pleiner et al. (2018)* entwickelt wurde und gegen die Kappa-Kette von Maus-Antikörpern gerichtet ist. Dieser Sensor kann so an definierte Proteine auf humanen Zellen herangeführt werden, die vorher mit einem Maus-Antikörper markiert worden sind. Die anderen Varianten stellen zwei Möglichkeiten dar, die Bindung von ATPOS an Streptavidin zu vermitteln. In dem einen Fall wird ATPOS an das Streptavidin-bindende Peptid (SBP) fusioniert, im anderen Fall mit einem Sortase-tag versehen, welcher eine enzymatisch vermittelte, präzise lokalisierte Biotinylierung ermöglicht. Um diese beiden Varianten an die Zellen zu binden, werden sie an Streptavidin gekoppelt. Da Streptavidin über vier Biotin-Bindungsstellen verfügt, kann das mit ATPOS beladene Streptavidin über einen biotinylierten Antikörper, der auf der Zielzelle sitzt, an die Zelloberfläche herangeführt werden. Schließlich wird die Bindung der TP1170- und SBP-Fusionsproteine an Zellen bzw. an Streptavidin-Beads mittels Durchflusszytometrie und Mikroskopie untersucht, und erste Versuche zum Einsatz der Sensoren im Live-Cell Imaging werden unternommen.

Abstract

Adenosine triphosphate (ATP) is an essential molecule that, besides its critical intracellular role as "energy currency" of the cell also plays a crucial role extracellularly as a signaling molecule in various physiological processes such as cellular respiration, photosynthesis, and DNA synthesis. Since the cell surface ATP concentrations relevant to these processes are in the nanomolar to low micromolar range, measuring them is a technical challenge.

Kitajima et al. (2020) have developed a protein-based fluorescent ATP sensor (ATP optical sensor, ATPOS) that is suitable for the visualization of extracellular ATP in the submicromolar range. However, targeting this sensor to defined proteins on cell surfaces is difficult. The aim of this study is therefore to modify the ATPOS ATP sensors to specifically bind to the surface of cells and thus be able to detect local ATP concentrations by imaging in living cells. During this study, three ATPOS-based fusion proteins named TP1170_alfa_ATPOS, ATPOS_alfa_SBP, and ATPOS_Sortase will be developed, produced in both bacterial and human cells, purified, and labeled with the dye Cy3-maleimide. The first variant involves the fusion of ATPOS with the TP1170 nanobody, developed by *Pleiner et al. (2018)*, which targets the kappa chain of mouse antibodies. This sensor can thus be targeted to defined proteins on human cells that have previously been marked with a mouse antibody. The other variants represent two strategies for coupling the sensor to streptavidin. In one case ATPOS is fused to the streptavidin-binding peptide (SBP), in the other case it is fused to the Sortase-tag, which enables the enzyme-mediated site-specific biotinylation of the sensor. To bind these two variants to cells, they are first coupled with streptavidin. Since streptavidin has four biotin binding sites, the ATPOS/streptavidin complex can be targeted to cells via a biotinylated antibody directed against a cell surface molecule. Finally, the binding of the TP1170- and SBP-containing ATP protein sensors to cells or streptavidin-coated beads will be investigated by flow cytometry and microscopy, and first attempts will be made to examine the suitability of the sensors in live cell imaging experiments.

1 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollen Varianten des von *Kitajima et al. (2020)* entwickelten Protein-basierten, fluoreszierenden ATP-Sensors ATPOS (ATP Optical Sensor) hergestellt werden, um seine Bindung an Zelloberflächen zu ermöglichen und damit seinen Einsatz in der Live-Imaging Mikroskopie zu erleichtern. Dabei soll der ATPOS-Sensor an unterschiedliche Bindungsdomänen fusioniert werden: das Streptavidin-bindende Peptid (SBP), ein Einzeldomänen-Antikörper (Nanobody) gegen die Kappa Kette von Maus Immunglobulinen, und schließlich der „Sortase-tag“, eine kurze Aminosäuresequenz, die eine Enzym-vermittelte Biotinylierung an einer definierten Stelle ermöglicht (siehe Abb. 1).

Um die Expression in einem bakteriellen und einem Säugetier-Expressionssystem zu vergleichen, sollen zwei der Varianten (ATPOS_alfa_SBP und TP1170_alfa_ATPOS) sowohl in *Escherichia coli (E.coli)* als auch in der humanen Zelllinie *HEK (human embryonic kidney)* produziert werden. Dazu sollen die für die Fusionsproteine kodierenden DNA-Sequenzen zunächst in bakterielle bzw. eukaryontische Expressionsplasmide kloniert werden. Die produzierten Proteine werden mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt und an einem freien Cysteinrest mit dem Farbstoff Cy3 gekoppelt. Schließlich soll die Fähigkeit der Sensoren, ihre jeweiligen Zielproteine auf der Oberfläche einer festen Matrix (Bead oder Zelle) zu binden, untersucht werden.

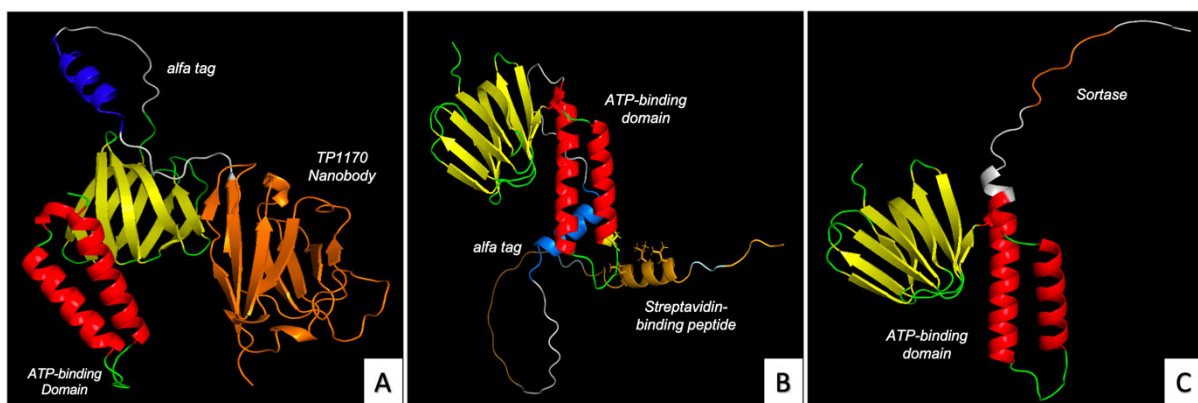


Abbildung 1: Dreidimensionale Proteinstruktur der modifizierten ATPOS ATP-Sensoren. (A) TP1170_alfa_ATPOS. (B) ATPOS_alfa_SBP. (C) ATPOS_Sortase. (Erstellt mit *AlphaFold 2*, von W.Schäfer).

2 Einleitung

Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) ist die zentrale Energiequelle für den intrazellulären Stoffwechsel aller lebenden Systeme (siehe Abb. 2). Es dient dem Transport von Energie durch den Organismus und ist demnach für die meisten Zellen und Proteine von entscheidender Bedeutung, um ihre jeweiligen Funktionen zu erfüllen. Aus diesem Grund wird ATP oft als "die Währung des Lebens" bezeichnet.^[1] ATP besitzt darüber hinaus eine wichtige Funktion als extrazelluläres Signalmolekül bei diversen physiologischen und pathologischen Prozessen, einschließlich der Neurotransmission,^[2] der Signalübertragung zwischen Neuronen und Gliazellen,^{[3][4]} der Gewebedurchblutung,^{[5][6]} der Regulierung des Immunsystems,^{[7][8]} sowie der Entwicklung von Krebs.^[9]

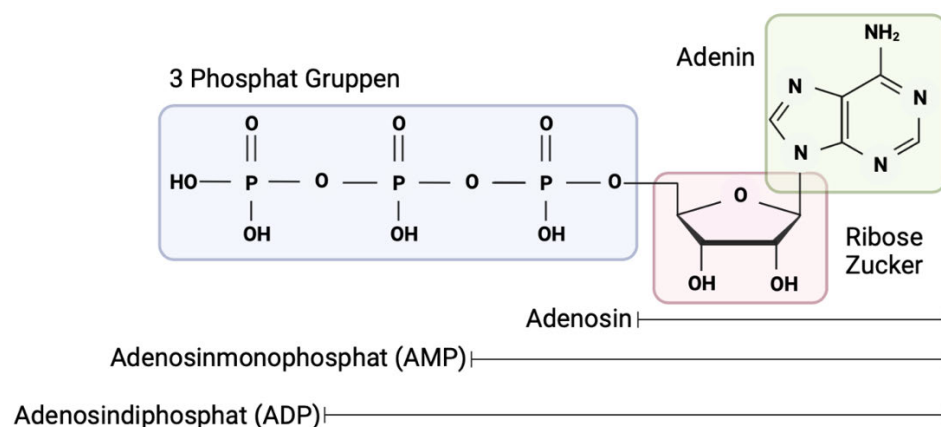


Abbildung 2: Struktur von Adenosintriphosphat und seinen Metaboliten. Adenosintriphosphat (ATP) setzt sich aus einem Adeninrest, dem Zucker Ribose und drei Phosphatresten zusammen. Die Bindungen zwischen den Phosphatresten sind von hoher Energie und somit chemisch instabil. Durch enzymatische Hydrolyse werden diese Bindungen gespalten, um Adenosindiphosphat (ADP) oder Adenosinmonophosphat (AMP) zu erzeugen. Dabei wird eine beträchtliche Menge an Energie freigesetzt, was ATP zu einer wichtigen Energiequelle für die Zellfunktionen macht. Erstellt mit *BioRender.com* (2023).^[10]

2.1 ATP als Signalmolekül

Die menschliche Gesundheit wird von zahlreichen Gefahren bedroht, sowohl von internen als auch externen Faktoren. Das Immunsystem hat die Aufgabe, den Körper vor diesen Gefahren zu schützen und somit die Gesundheit des Menschen zu bewahren. Hierfür verfügt das Immunsystem über eine breite Palette an zellulären und nicht-zellulären Effektoren, die in engem Austausch miteinander stehen.

2 Einleitung

Das natürlich vorkommende Nukleotid Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) bildet zusammen mit seinem Metaboliten Adenosin (Ado) einen essentiellen Bestandteil des komplexen immunologischen Netzwerks. Durch die Bindung an spezifische Rezeptoren, die weit verbreitet im Körper vorkommen, senden ATP und Ado purinerge Signale aus, wodurch ATP zu einem extrazellulären Botenstoff mit signalmäßigen Eigenschaften wird. Diese Eigenschaften machen ATP zu einem ubiquitären Molekül im Körper.^[11]

Im Gehirn werden Nervenzellen, auch bekannt als Neuronen, bei Aktivierung stimuliert, um ATP freizusetzen, welches dann zur Übertragung von Signalen an andere aktive Neuronen oder andere Zellen im Gehirn verwendet wird. Darüber hinaus kann ATP im Gehirn auch als Signalgeber für potenzielle Gefahren fungieren. Beispielsweise spielt es eine Rolle bei der Übertragung von Schmerzsignalen während Migräne und starker Kopfschmerzen. Bei Schlaganfällen kann das Gleichgewicht der ATP-Spiegel gestört werden, wenn bestimmte Gehirnregionen nicht mehr ausreichend durchblutet werden.^[1]

2.1.1 ATP-Freisetzung

Die Ausschüttung von ATP aus dem Zellinneren nach außen fördert die Signalübertragung durch purinerge Rezeptoren P1 und P2, welche dafür bekannt sind, den Gefäßtonus zu regulieren. Die ATP-Freisetzung aus Gefäßzellen kann durch verschiedene Mechanismen erfolgen, darunter die vesikuläre Exozytose, der Transport durch ABC-Transporter, eine F1/F0-ATP-Synthase in der Plasmamembran sowie die Freisetzung über Connexin-Hemichannels oder Pannexin-Kanäle (Panx1) (siehe Abb. 3). Die Quantifizierung von ATP in Zellüberständen kann jedoch durch externe Faktoren wie z.B. eine Zellyse beeinflusst werden, die zu einer verzerrten Interpretation der ATP-Freisetzung führen können.^[12]

Es ist möglich, dass Panx1-Kanäle die physiologischen ATP-Freisetzungskanäle im Gefäßsystem darstellen. Die Entdeckung von Panx1 im vaskulären Endothel legt nahe, dass die ATP-Freisetzung aus diesen Zellen bei erhöhter Scherbelastung und Hypoxie durch die Aktivierung dieser Kanäle erfolgt. Durch weitere Untersuchungen der Regulationsmechanismen von Panx-Kanälen in vaskulärem Endothel, glatten Muskelzellen und zirkulierenden Erythrozyten können möglicherweise neue Erkenntnisse über die Kontrolle des peripheren Gefäßwiderstands und des Blutdrucks gewonnen werden. Diese Erkenntnisse könnten auch neue Ansätze für die Behandlung von Gefäßkrankheiten bieten.^[12]

2 Einleitung

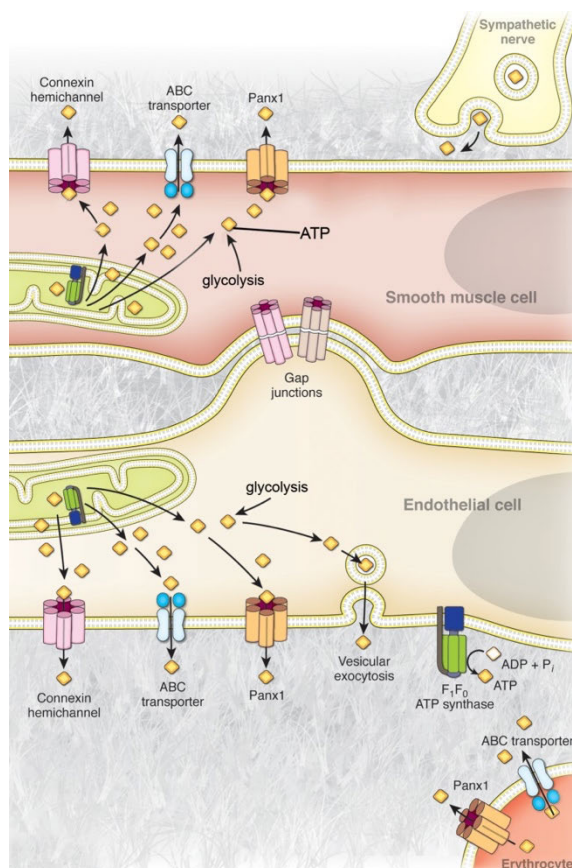


Abbildung 3: Mechanismen der ATP-Freisetzung aus Zellen der Blutgefäßwand. Eine umfassende Darstellung der aktuellen Mechanismen für die Freisetzung von ATP in verschiedenen Zelltypen im Gefäßsystem wird präsentiert. In den Mitochondrien erfolgt die Erzeugung der verfügbaren ATP-Menge in diesen Zellen durch die Glykolyse im Zytosol und die oxidative Phosphorylierung. Nervenzellen setzen ATP durch vesikuläre Exozytose frei, während glatte Gefäßmuskelzellen ATP über Membrantransporter und -kanäle, wie Connexin-Hemikanäle, Pannexin-Kanäle und möglicherweise ABC-Transporter freisetzen. Vaskuläre Endothelzellen setzen ATP durch vesikuläre Exozytose, ABC-Transporter, Connexin-Hemikanäle, Pannexin-Kanäle sowie über direkte Synthese an der extrazellulären Plasmamembran durch eine F₁/F₀-ATP-Synthase an der Zelloberfläche frei. Bei den zirkulierenden Erythrozyten wird ATP über ABC-Transporter und Pannexin-Kanäle freigesetzt.^[12]

2.2 ATP-Messung und ATP-Sensoren

Um die Mechanismen der ATP-Prozesse zu verstehen, ist es wichtig, die räumlich-zeitliche Dynamik von ATP zu erfassen. Allerdings gestaltet sich die Visualisierung von ATP im Körper schwierig und die Echtzeit-Überwachung im aktiven Gehirn stellt eine Herausforderung dar. In der Vergangenheit wurden verschiedene Techniken zur Messung von ATP entwickelt, darunter Biolumineszenz-Assays mit Glühwürmchen-Luciferase,^{[13][14]} elektrochemische Methoden wie Volumetrie,^[15] enzymgekoppelte Elektrodenverfahren,^{[16][17]} zellbasierte elektrophysiologische Verfahren,^[18] und ganzellbasierte Fluoreszenztests mit Ca²⁺-Indikatoren.^{[19][20]} Einige dieser Methoden wurden bereits zur Messung extrazellulärer ATP-Konzentrationen in vivo eingesetzt.^{[21][22]} Durch den Biolumineszenz-Assay ist es möglich, den Gehalt an extrazellulärem ATP in Mikrodialyseproben zu quantifizieren.^[23]

2 Einleitung

Eine kontinuierliche Überwachung des extrazellulären ATP-Gehalts im Gehirn kann mit Hilfe von enzymbeschichteten Elektroden realisiert werden, die in das Gewebe eingeführt werden.^[21] Allerdings ermöglichen diese Methoden keine räumliche Auflösung. Um ATP räumlich aufgelöst messen zu können, könnte die Abbildung der Biolumineszenz, die durch die Luciferin-Luciferase-Reaktion erzeugt wird, eine Lösung sein. Jedoch sind die räumliche und zeitliche Auflösung bei der Bildgebung durch Luciferase beeinträchtigt, da die Biolumineszenzemission einen geringen Photonenfluss aufweist.^[24]

Im Gegensatz dazu bieten bildgebende Verfahren, die fluoreszierende Sensoren verwenden, eine hervorragende räumliche und zeitliche Auflösung,^[25] wie durch zahlreiche entwickelte fluoreszierende ATP-Sensoren auf Basis von fluoreszierenden Proteinen belegt wurde.^{[26][27][28]} Die Verwendung dieser genetisch kodierten ATP-Sensoren ermöglicht die Visualisierung der intrazellulären ATP-Dynamik und verbessert damit unser Verständnis der ATP-Signaltransmission innerhalb von Zellen.^[29] Jedoch waren die Bemühungen, diese Sensoren für die extrazelluläre Verwendung anzupassen, nur teilweise erfolgreich, was die *In-vivo*-Bildgebung von extrazellulärem ATP erschwert.^{[30][31]} Ein Grund hierfür ist, dass die Affinitäten dieser extrazellulären ATP-Sensoren zu gering sind, um extrazelluläres ATP im Konzentrationsbereich von Hunderten von nanomolaren bis mikromolaren zu detektieren.^[32] Ein weiteres Problem bei der *In-vivo*-ATP-Bildgebung ist die ausgeprägte pH-Abhängigkeit dieser genetisch kodierten ATP-Sensoren, die auf die angeborene pH-Empfindlichkeit der verwendeten fluoreszierenden Proteine zurückzuführen ist.^{[33][34]} Diese pH-Abhängigkeit stellt bei der *In-vivo*-ATP-Bildgebung ein besonderes Problem dar, da Veränderungen der ATP-Konzentrationen in Geweben häufig mit pH-Schwankungen einhergehen.^{[9][35]}

2.2.1 ATPOS ATP-Sensor

Zur Detektion von extrazellulärem ATP wurde ein fluoreszierender Hybrid-ATP-Sensor von *Kitajima et al. (2020)* entwickelt, der aus einem ATP-bindenden Protein und einem niedermolekularen fluoreszierenden Farbstoff besteht. Für das ATP-bindende Protein wurde die ϵ -Untereinheit der F₀F₁-ATP-Synthase des thermophilen *Bacillus PS3* (Cohn 1872) aufgrund ihrer hohen Affinität für ATP verwendet.^[36] Eine einzelne Cystein-Substitution wurde in die Aminosäuresequenz eingeführt, um die Konjugation eines niedermolekularen Fluoreszenzfarbstoffs mit einer Cystein-reaktiven Maleimidgruppe zu ermöglichen (siehe Abbildung 4).^[1]

2 Einleitung

Die Leistung eines Hybridtyp-Sensors hängt von der Position des Fluorophors innerhalb des ligandenbindenden Proteins ab.^{[37][38]} Zur Entwicklung eines hochempfindlichen ATP-Sensors wurde das Hochdurchsatz-Screening-System HyFlnD eingesetzt.^[38] Dabei wurden durch Variation der Fluorophore sowie der Fluorophor-Konjugationsstellen zahlreiche fluoreszierende Konjugate erzeugt, die auf ihre Fluoreszenzantwort in Gegenwart eines Liganden hin untersucht wurden. In Anwesenheit von ATP kommt es aufgrund einer Konformationsänderung zu einer erhöhten Fluoreszenzintensität der ATP-Sensoren. Es wurden insgesamt 134 Cystein-Mutanten erzeugt, die jede Position in der Aminosäuresequenz mit Ausnahme der ersten Position (dem einleitenden Methionin) abdeckten. Vier niedermolekulare Fluoreszenzfarbstoffe, Oregon Green (OG), Alexa Fluor 488 (Alexa488), Cy3 und SiR650, wurden verwendet, wodurch insgesamt 536 fluoreszierende Konjugate erzeugt wurden.^[1]

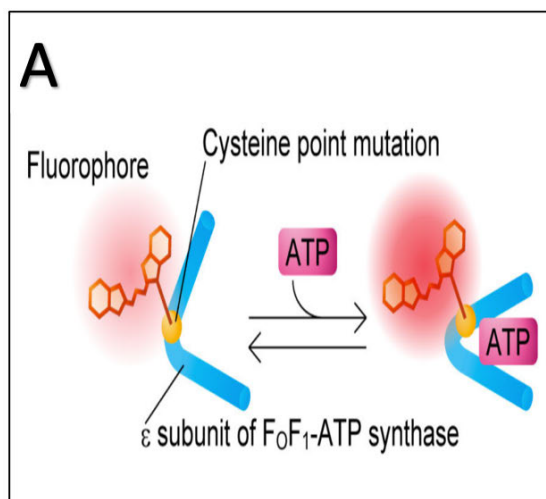


Abbildung 4: ATP Optical Sensor (ATPOS). Schematische Darstellung eines ATP-Sensors vom Hybridtyp, der aus der ϵ -Untereinheit der F₀F₁-ATP-Synthase mit einer Cystein-Punktmutation besteht, an die ein niedermolekularer Fluorophor konjugiert ist (Kitajima et al. *eLife* 2020).^[1]

Um Sensoren mit einem großen dynamischen Bereich der Fluoreszenzreaktion auszuwählen, wurde eine ATP-Zugabe mit unterschiedlichen ATP-Konzentrationen (200 nM bis 2 mM) durchgeführt. Der Sensor, der die größte Fluoreszenzantwort bei niedrigen ATP-Konzentrationen aufwies, war die Cy3-markierte Cystein-Substitutionsmutante an Glutamin 105 (Q105C-Cy3), der als ATPOS (ATP Optical Sensor) bezeichnet wurde.

2 Einleitung

In Abwesenheit von ATP zeigte ATPOS einen Fluoreszenz-Anregungspeak bei 556 nm und einen Emissionspeak bei 566 nm. Bei einer Konzentration von 1 mM ATP nahm die Fluoreszenzintensität von ATPOS zu, während sich die Wellenlängen der Peaks nur geringfügig veränderten. Das Absorptionsspektrum von ATPOS hingegen veränderte sich durch Zugabe von ATP kaum.^[1]

Zur Ermittlung der Empfindlichkeit von ATPOS für ATP und zur Untersuchung seiner Kinetik wurde die Abhängigkeit der ATPOS-Fluoreszenzänderung von der ATP-Konzentration sowie von den ATP-Derivaten analysiert. Darüber hinaus wurde die pH-Empfindlichkeit von ATPOS untersucht, da die pH-Abhängigkeit von ATP-Sensoren eine entscheidende Determinante für die Genauigkeit der ATP-Quantifizierung darstellt. pH-Schwankungen treten häufig gleichzeitig mit Änderungen der ATP-Konzentration auf.^{[1][9][35]}

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass ATPOS bei der In-vivo-Visualisierung von extrazellulärem ATP mindestens folgende Vorteile bietet:

- Im Vergleich zu fluoreszierenden ATP-Sensoren wie ATeam, QUEEN und iATPSnFR hat ATPOS eine sehr hohe Affinität für ATP.^{[26][27][30][31]}
- Durch einen Anstieg seiner Fluoreszenz-Quantenausbeute (QY) in Gegenwart von ATP weist ATPOS eine hohe Helligkeit auf. Die QY von ATPOS stieg von etwa 0,29 auf 0,62, während die QY von Cy3 allein, das in ATPOS verwendet wird, nur etwa 0,04 beträgt.
- ATPOS ist hoch selektiv für ATP im Vergleich zu ATP-Metaboliten und anderen Nukleotiden. Dies macht ATPOS besser geeignet als herkömmliche Fluoreszenzsensoren, um die spezifische Rolle von extrazellulärem ATP zu untersuchen, da ATP-Derivate auch als extrazelluläre Signalmoleküle fungieren können.^[39]
- Aufgrund des Hybriddesigns von ATPOS, bei dem ein pH-unempfindlicher niedermolekularer Fluoreszenzfarbstoff anstelle eines fluoreszierenden Proteins verwendet wird, ist ATPOS unempfindlich gegenüber pH-Veränderungen.

Dank dieser Eigenschaften kann ATPOS eine präzise quantitative Analyse der ATP-Dynamik ermöglichen, die unabhängig von pH-Schwankungen ist.

2.3 Modifizierte ATPOS ATP-Sensoren

Obwohl die Verwendung von ATPOS ATP-Sensoren im Vergleich zu genetisch kodierten Sensoren erhebliche Vorteile bietet, sind auch Nachteile bei ihrer Anwendung zu beachten. Ein solcher Nachteil besteht darin, dass es schwierig ist, ATPOS-Sensoren gezielt auf bestimmte Zelltypen auszurichten.^[1] Daher präsentiert die vorliegende Arbeit drei Modifikationen von ATP-Sensoren, die auf dem ATPOS ATP-Sensor von *Kitajima et al. (2020)* basieren. Diese Modifikationen nutzen die Kombination von Tag-Proteinen, die eine spezifische Bindung an andere Proteine eingehen können.

2.3.1 TP1170_alfa_ATPOS

Eine der in dieser Arbeit modifizierten ATP-Sensoren ist das TP1170_alfa_ATPOS. Um den Sensor gezielt auf der Zelloberfläche zu koppeln, wird er als Fusionsprotein von ATPOS mit dem von *Pleiner et al. (2018)* entwickelten Nanobody TP1170 konstruiert.^[40] Der Nanobody ist gegen die Maus Kappa (κ)-Kette gerichtet. Durch die Bindung des TP1170 an der Kappa-Kette eines Maus Antikörpers, der bereits an der Zelloberfläche gekoppelt ist, kann der Sensor in unmittelbare Nähe der Zelloberfläche positioniert werden (siehe Abb. 5-C). Das Fusionsprotein wird in *E.coli* und in *HEK*-Zellen hergestellt, wobei die beiden Konstrukte bis auf geringe Unterschiede fast identisch sind (siehe Abb. 5 A-B). Allerdings wird die *E.coli*-Variante zunächst als Pro-Protein mit einer N-terminalen His14/Nedd8-Domäne produziert, um eine spezifische Aufreinigung des Sensors mittels Nickel-Säulen zu ermöglichen. Die His14/Nedd8-Domäne wird nach der Reinigung von der Protease Nedp1 mit hoher Spezifität abgespalten, da sie die Aktivität des Proteins beeinträchtigen könnte.

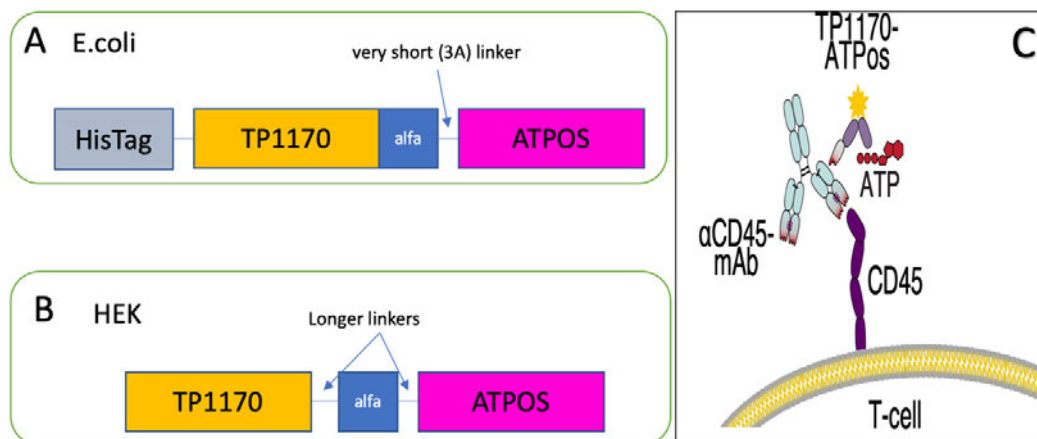


Abbildung 5: TP1170_alfa_ATPOS. (A) Struktur der in *E.coli* herzustellenden Variante. (B) Struktur der in *HEK*-Zellen herzustellenden Variante. (C) Schematische Darstellung für das Andocken des Sensors an der Plasmamembran einer T-Zelle.

2.3.1.1 Antikörper und Nanobodies

Antikörper stellen spezifische Proteinmoleküle dar, die als Antwort des Immunsystems auf Pathogene wie Viren, Bakterien, Pilze oder Parasiten gebildet werden. Sie sind auch als Immunglobuline (Ig) bekannt und werden in B-Lymphozyten synthetisiert, die bei Kontakt mit Antigenen aktiviert werden. Antigene sind dabei Bestandteile von Pathogenen auf zellulärer Ebene. Zu jedem Antigen kann das Immunsystem einen spezifischen, passenden Antikörper machen, wodurch eine hochpräzise Reaktion auf eine Vielzahl von Eindringlingen ermöglicht wird. Antikörper spielen eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung von Pathogenen in Körperflüssigkeiten wie Blut und Lymphe und sind somit für die humorale Immunreaktion von zentraler Bedeutung. Antikörper sind verschiedenen Klassen zugeordnet (IgM, IgG, IgE, IgA und IgD), welche spezifische Aufgaben in unterschiedlichen Körperbereichen erfüllen. Die im Serum häufigste Klasse stellt das Immunglobulin G (IgG) dar.^[41]

Alle Antikörper besitzen eine ähnliche Grundstruktur, welche aus zwei jeweils identischen leichten (L) und schweren (H) Polypeptidketten besteht, die durch kovalente Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (siehe Abb. 6). Die beiden Arme, die jeweils aus dem oberen Teil der H-Kette und einer L-Kette gebildet werden, bezeichnet man als Fab-Fragmente (antigen binding fragment), welche variabel sind. Die leichten Ketten kommen in zwei Isotypen (κ und λ) vor. Diese Fab-Fragmente enthalten die Bindungsstellen für spezifische Antigene und ermöglichen somit die spezifische Erkennung von Pathogenen durch das Immunsystem. Die leichten Ketten setzen sich aus einer variablen Domäne (VL) und einer konstanten Domäne (CL) zusammen, während die schweren Ketten eine variable Domäne (VH) und drei konstante Domänen (CH1, CH2 und CH3) besitzen. Der untere Teil der Antikörper, das sogenannte Fc-Fragment (fragment crystallizable), ist konstant und bindet an spezifische Rezeptoren auf Immunzellen, um Effektorfunktionen auszulösen.^[42]

2 Einleitung

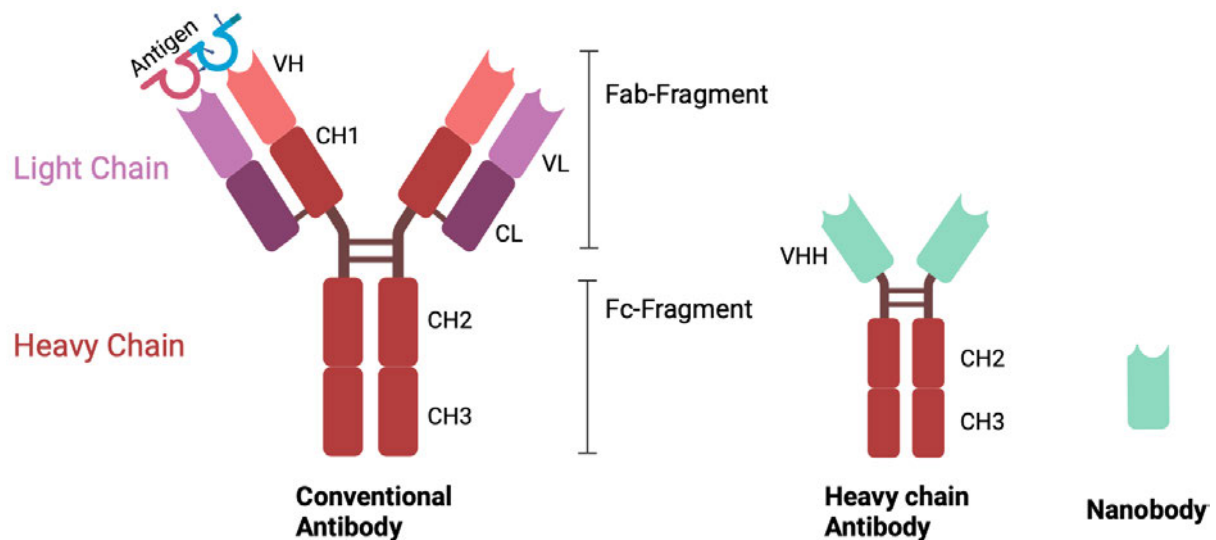


Abbildung 6: Aufbau eines Antikörpers und dessen rekombinante Fragmente. Bei Wirbeltieren treten konventionelle Antikörper, wie IgG, auf, welche aus zwei identischen leichten Ketten und zwei identischen schweren Ketten bestehen. Die leichte Kette und ihre schwere Kette sind durch kovalente Disulfidbindungen verbunden. Kamele und Lamas bilden zusätzlich sog. Schwere-Ketten-Antikörper, welche keine Leichtketten besitzen. Die variable Domäne (VHH) dieser Antikörper wird wegen ihrer geringen Größe als Nanobody bezeichnet. Erstellt mit *BioRender.com* (2023).^[10]

Unter den Säugetieren besitzen Kameliden wie Alpakas, Lamas und Kamele einzigartige IgG-Subklassen. Neben dem konventionellen IgG1 mit klassischem Aufbau, befinden sich im Serum dieser Tiere auch zwei weitere IgG-Subklassen, IgG2 und IgG3, die als Schwere-Ketten-Antikörper bezeichnet werden. Diese besitzen im Gegensatz zu anderen IgG-Subklassen keine leichten Ketten, und in den schweren Ketten fehlt die CH1 Domäne. Die variablen Domänen dieser Antikörper werden als VHH bezeichnet. Isolierte VHH Domänen lassen sich leicht in Bakterien, Hefe- oder Pflanzenzellen rekombinant herstellen und werden wegen ihrer geringen Größe als „Nanobodies“ bezeichnet (siehe Abb. 6). Diese Antikörperfragmente sind sehr klein, äußerst stabil und weisen eine hohe Spezifität und Affinität zum jeweiligen Antigen auf.^[43]

In dieser Arbeit wird der Nanobody TP1170 verwendet, der alle κ -Ketten von Maus-erkennt.^[40] Die Fusion des ATPOS Sensors an diesen Nanobody soll es ermöglichen, dass der Sensor an Zelloberflächenstrukturen auf humanen Zellen bindet, welche zuvor durch einen Maus-anti-human Antikörper markiert worden sind.

2 Einleitung

2.3.2 ATPOS_alfa_SBP

Im Vergleich zur ersten Variante des ATP-Sensors ersetzt die ATPOS_alfa_SBP-Variante den Nanobody durch ein Peptid (SBP), das hoch spezifisch an Streptavidin (SA) bindet. Streptavidin besitzt vier hochaffine Bindungsstellen für Biotin. Wenn ein Streptavidin-Molekül an einen biotinylierten Antikörper bindet, der bereits an einer Zelle gekoppelt ist, kann der ATP-Sensor durch das SBP an freie Bindungsstellen des SA binden (siehe Abbildung 7-C).

Dieses Fusionsprotein wird ebenfalls sowohl in *E.coli* als auch in HEK-Zellen hergestellt, wobei beide Konstrukte identisch sind (siehe Abbildung 7 A-B). Jedoch wird die *E.coli*-Variante zuerst mit der N-terminalen His14/Nedd8-Domäne produziert. Das Alfa-Tag in beiden Varianten des ATP-Sensors ermöglicht auch eine spezifische Aufreinigung der Sensoren.

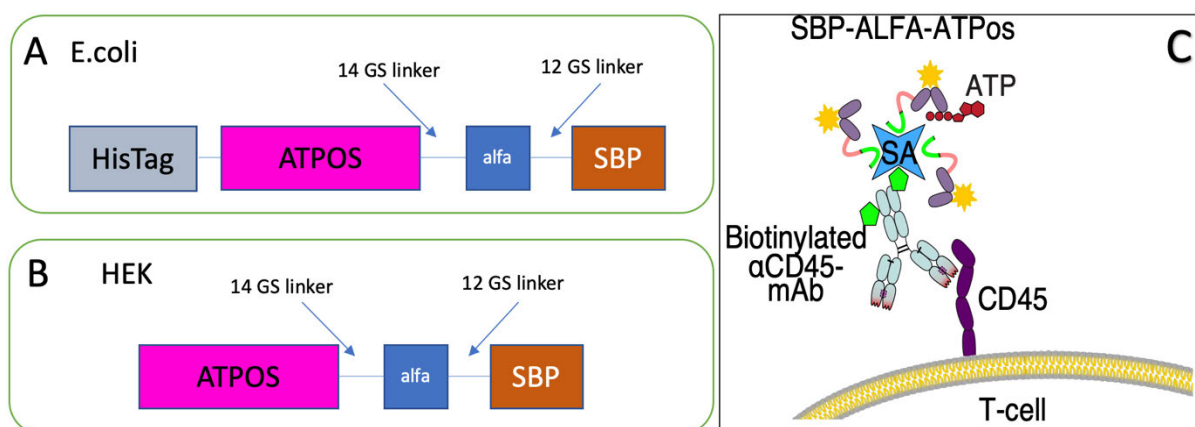


Abbildung 7: ATPOS_alfa_SBP. (A) Struktur der in *E.coli* herzustellenden Variante. (B) Struktur der in HEK-Zellen herzustellenden Variante. (C) Schematische Darstellung für das Andocken des Sensors an der Plasmamembran einer T-Zelle.

2.3.2.1 Streptavidin SA

Streptavidin ist ein Tetramerprotein mit einer Größe von 56 kDa, das ursprünglich aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* (Stapley et al. 1964) gewonnen wurde. Es weist eine außergewöhnlich hohe Affinität zu Biotin auf und kann dieses Molekül mit großer Stabilität binden. Das Protein besteht aus vier identischen Untereinheiten, von denen jede in der Lage ist, ein Biotin-Molekül zu binden. Aufgrund dieser Fähigkeit wird Streptavidin häufig als Reagenz in der molekularen Biologie verwendet, um Biotin-markierte Moleküle wie DNA, RNA oder Proteine zu erkennen oder zu isolieren. Es wird auch oft als Ankerprotein eingesetzt, um Biotin-markierte Antikörper oder Enzyme an Oberflächen zu binden.^[44]

2 Einleitung

2.3.3 ATPOS_Sortase

Die letzte modifizierte Variante der ATPOS ATP-Proteinsensoren in dieser Arbeit ist das ATPOS_Sortase. Dieser Sensor ist an einen Sortase-Tag und einen 6xHis-Tag fusioniert (siehe Abbildung 8 A), und wird ausschließlich in *HEK*-Zellen hergestellt. Der Sortase-Tag besteht aus einem Peptid mit einer kurzen Folge von Glycinresten (LPETGGGG), welche als Erkennungssequenz für das bakterielle Enzym Sortase dient. Dieses kann den Sortase-Tag abschneiden und durch einen Oligo-Glycinrest ersetzen, der mit einem niedermolekularen Marker wie z.B. Biotin versehen ist. Auf diese Weise kann eine gezielte lokalisierte Biotinylierung des Sensors erreicht werden. Der Bindungsmechanismus dieser Variante ähnelt daher dem der ATPOS_alfa_SBP-Variante (siehe Abbildung 8 B).

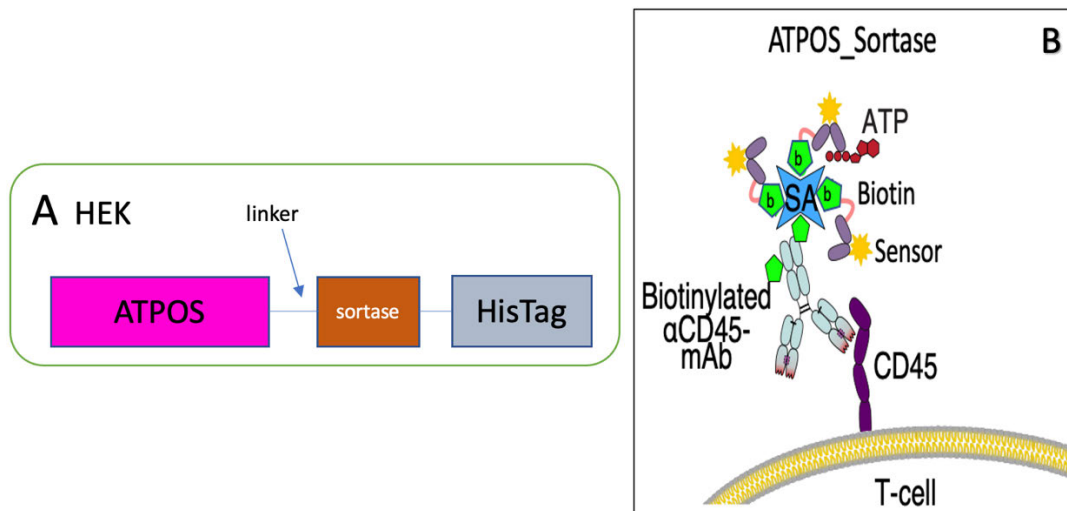


Abbildung 8: ATPOS_Sortase. (A) Struktur der in *HEK*-Zellen herzustellenden Variante. (B) Schematische Darstellung für das Andocken des Sensors an der Plasmamembran einer T-Zelle.

2.3.3.1 Sortase Enzym

Sortase ist ein Enzym, das in Bakterien vorkommt und eine wichtige Rolle bei der Verankerung von Proteinen auf der Zelloberfläche spielt. Es handelt sich um ein Transpeptidase-Enzym, das Peptidbindungen zwischen Proteinen bildet und dabei eine Oligoglycin- oder Oligoalanin-Motivsequenz als Substrat erkennt.

3 Materialien

3.1 Antibiotika

Tabelle 1: Antibiotika.

Bezeichnung	Nummer	Hersteller
Carbenicillin	-	Carl Roth
Kanamycin	T832.2	Carl Roth

3.2 Antikörper

Tabelle 2: Antikörper.

Bezeichnung	Fluoreszenz	Typ	Hersteller
Biotin CD45	unkonjugiert	Anti-Human	BioLegend
CD4	BV421	Mouse Anti-Human	BD Horizon
CD45RA	FITC	Anti-Human	BioLegend

3.3 Bakterienstämme

Tabelle 3: Bakterienstämme.

Bezeichnung	Hersteller
<i>E.coli</i> BL21-(DE3) pLysS	Novagen
<i>E.coli</i> XL1-Blue	Stratagene

3.4 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien.

Bezeichnung	Nummer	Hersteller
2x YT-Medium	Y2377-250G	Sigma-Aldrich
Adenosine triphosphate (ATP)	A2383-1G	Sigma-Aldrich
AEBSF	532586	Sigma-Aldrich
Antarctic Phosphatase Reaction Puffer, 10x	B0289S	New England Biolabs
Aqua ad	0082479E	Braun
Benzonase	E1014-5KU	Merck
Bugbuster	70921	Merck

3 Materialien

Centrifugal Filters, Amicon Ultra 30kDa	UFC8033024	Merck
CL-Xposure™ Film	34089	Thermo Scientific
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	D2650-100ML	Sigma-Aldrich
Ethanol	K928.4	Carl Roth
isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG)	10724815001	Roche
LB Agar	X969.2	Carl Roth
LE Agarose	652324	Biozym
L-Glutamin, 200mM	25030081	Gibco
Methanol	82.3	Carl Roth
Milch Pulver	T145.2	Carl Roth
Phosphate buffered saline (PBS-/-) -CaCl ₂ /-MgCl ₂	14190-094	Gibco by life technologies
Poly-L-Lysine 0,1 % W/V	P7280-5MG	Sigma-Aldrich
Roti-Safe Gel Stain	3865.1	Carl Roth
RPMI medium 1640	21875-034	Gibco
SDS-Gel (12% Bris-Tris)	23021470	Invitrogen
Streptavidin BV421	405226	BioLegend
Green 100 Fluorescent Streptavidin Beads, 9,2 μ m	10562009	PolyAn
Transparent Streptavidin Beads, 8,9 μ m	10521009	PolyAn
Tris-HCl	9090.3	Carl Roth
Turbo Nuclease	117.285	Jena Bioscience
Tween20	BP337-100	Fisher Scientific

3.5 Enzyme

Tabelle 5: Enzyme.

Bezeichnung	Nummer	Hersteller
Antarctic Phosphatase	0351611	New England Biolabs
Hind III - HF	M0289S	New England Biolabs
Kas I	R0544S	New England Biolabs
NEDD8-specific protease 1 (NEDP1)	-	AG Haag/ UKE
NcoI- HF	R3193M	New England Biolabs
Not-I-HF	R3189M	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	M0202L	New England Biolabs
XbaI	R0145M	New England Biolabs

3 Materialien

3.6 Farbstoffe

Tabelle 6: Farbstoffe.

Bezeichnung	Nummer	Hersteller
Cy3-Maleimide, 1mg	11080	Lumiprobe
InstantBlue - Coomassie	GR3394310-1	Abcam
Trypanblau	1680.1	Carl Roth

3.7 Geräte

Tabelle 7: Geräte.

Bezeichnung	Nummer / Modell	Hersteller
Analytische Waage	1412	Sartorius AG
Biolayer-Interferometrie System (BLItz)	ForteBio	PALL Life Sciences
Blotting Kammer	1158095-032	Invitrogen
Curix Entwickler	-	AGFA
CO2 Brutschrank	MCO-20AIC	Sanyo
Durchflusszytometer	Canto II	Becton Dickinson
Gefrierfach	-80°C	Liebherr
Gel Electrophorese Kammer	Novex Mini Cell	invitrogen
Inkubator	10908866	Sanyo
Inkubator	Unitron	HT Infors
Inkubator	Ecotron	HT Infors
Kühlschrank	-20°C	Liebherr
Kühlschrank	4°C	Liebherr
Lichtmikroskope	Axiovert 200M	Zeiss
Mikroskope	TCS SP8	Leica
Photometer	1005/OD600	Implen
Pipette	2.5 µL	Eppendorf
Pipette	10 µL	Eppendorf
Pipette	20 µL	Eppendorf
Pipette	100 µL	Eppendorf
Pipette	200 µL	Eppendorf
Pipette	1000 µL	Eppendorf

3 Materialien

Power Supply	250/2,5	Bio-Rad
Power Supply	PowerPac 200	Bio-Rad
Roller mixer	SRT6	Stuart
Schüttler	-	Medgenix Diagnostics
Sicherheitswerkbank Klasse 2	Herasafe KS12	Thermo Scientific
Spektrophotometer	NanoDrop 2000c	Peqlab biotechnology
Thermoblock	5350 01301	Eppendorf
Tischzentrifuge	Heraeus Pico 17	Thermo Scientific
Transilluminator	9707148	peQlab
UV-Tisch	TI 1	Biometra
Vortex Mixer	PluriPlix	Heidolph
Waage	Scout Pro	Ohaus
Wasserbad	Type1007	Gesellschaft für Labortechnik
Zentrifuge	Rotanta 460R	Hettich GmbH
Zentrifuge	Sorvall RC-26+	DuPont
Zählkammer	Neubauer	Brand GmbH

3.8 Kits

Tabelle 8: Kits.

Bezeichnung	Nummer	Hersteller
ALFA Selector PE / 10 mg Elutionspeptid	N1510	NanoTag Biotechnologies
LS-Columns	130-042-401	Miltenyi Biotec
Mix2Seq Kits	-	Eurofins Genomics
NucleoBond Xtra Maxi EF Kits	740424.50	Macherey-Nagel
Nucelospin gel and PCR clean-up	750.609.250	Macherey-Nagel
Protino Ni-TED 150 Packed Columns	745 100.10	Macherey-Nagel
QIAprep Spin Miniprep Kit	27104	Qiagen

3 Materialien

3.9 Lösungen und Nährmedien

Tabelle 9: Lösungen und Nährmedien.

Medium	Zusammensetzung
2x YT-Medium	31 g in 1 L deionisiertes Wasser (diH ₂ O) 5 g/L NaCl 16 g/L Trypton 10 g/L Hefeextrakt
F17- Transfektionsmedium	500 ml FreeStyle F17 Expression Medium 10 ml (v/v) L-glutamine (200 mM)
BLitz - Kinetik Puffer	50 mL PBS -/- 0,1% BSA (50 µL) bzw. 100 µL 5%ige BSA 0,02% Tween 20 (10 µL)
LB-Medium	25 g LB-Medium in 1 L diH ₂ O
Lysis Puffer	5 mL BugBuster 50 µL AEBSF (100 mM) 0.5 µL Benzonase (Turbonuclease)
MES Running Puffer	20x NuPage MES SDS running Puffer diH ₂ O
SDS-Puffer	Für einen Ansatz von 10 µL: 5 µL Loading Dye Solution (4x) 3 µL dH ₂ O 2 µL Reducing Argent (=DTT)
SOC-Medium	0,5 % Hefeextrakt 2 % Trypton 20 mM D (+)-Glucose 10 mM NaCl 10 mM Ca ₂ 10 mM MgSO ₄ 2,5 mM KCl diH ₂ O
TBS Puffer	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 25 mM TRIS diH ₂ O, pH 7.6

3 Materialien

3.10 Plasmide

Tabelle 10: Plasmide.

Insert	Vektor	Restriktions-Enzyme
TP1170_alfa	pH14N8_myc_alfa_ATPOS	Not I – Nco I
ATPOS_SBP_E.coli	pH14N8_TP1170_alfa_ATPOS	Hind III – Kas I
ATPOS_15GS_alfa_SBP_HEK	pCSE2.5_s+16dim_Anti ART2.2_rbFc #FS-439	Xba I – Nco I
TP1170_alfa_ATPOS		
ATPOS_sortasemAktih		

3.11 Primer

Tabelle 11: Primer.

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
BGH (Reverse)	5'-TAG AAG GCA GAG TCG AGG-3'	Eurofins Genomics
CMV (Forward)	5'-CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG-3'	Eurofins Genomics
Nedd8 (Forward)	5'-GCG AAT CAA GGA GCG TGT GGAA-3'	Eurofins Genomics
PQE80L (Reverse)	5'-TTC TGA GGT CAT TAC TGG ATC-3'	Eurofins Genomics

3.12 Puffer

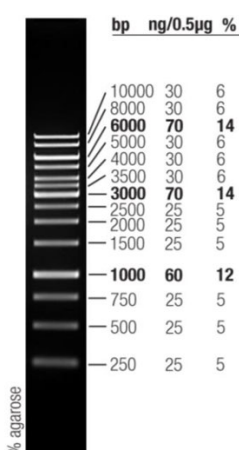

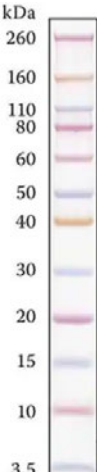
Tabelle 12: Puffer.

Bezeichnung	Nummer	Hersteller
CutSmart Puffer 10x	B6004	New England Biolabs
NuPAGE loading dye solution (LDS)	NP0007	Invitrogen
NuPAGE MES SDS Running Buffer, 20x	NP0002	Invitrogen
NuPAGE Sample Reducing Agent, 10x	NP0009	Invitrogen
T4 DNA Ligase Buffer, 10x	B0202A	New England Biolabs
TAE, 50x	24710030	Invitrogen
Tris Buffer (1M, pH 9,0)	786-476	G-Biosciences

3 Materialien

3.13 Protein Marker

Tabelle 13: Protein Marker.

Bezeichnung	Hersteller	Zusammensetzung																																													
GeneRuler, 1 kb	Thermo Scientific SM0314	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>bp</th> <th>ng/0.5µg</th> <th>%</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>10000</td><td>30</td><td>6</td></tr> <tr><td>8000</td><td>30</td><td>6</td></tr> <tr><td>6000</td><td>70</td><td>14</td></tr> <tr><td>5000</td><td>30</td><td>6</td></tr> <tr><td>4000</td><td>30</td><td>6</td></tr> <tr><td>3500</td><td>30</td><td>6</td></tr> <tr><td>3000</td><td>70</td><td>14</td></tr> <tr><td>2500</td><td>25</td><td>5</td></tr> <tr><td>2000</td><td>25</td><td>5</td></tr> <tr><td>1500</td><td>25</td><td>5</td></tr> <tr><td>1000</td><td>60</td><td>12</td></tr> <tr><td>750</td><td>25</td><td>5</td></tr> <tr><td>500</td><td>25</td><td>5</td></tr> <tr><td>250</td><td>25</td><td>5</td></tr> </tbody> </table>	bp	ng/0.5µg	%	10000	30	6	8000	30	6	6000	70	14	5000	30	6	4000	30	6	3500	30	6	3000	70	14	2500	25	5	2000	25	5	1500	25	5	1000	60	12	750	25	5	500	25	5	250	25	5
bp	ng/0.5µg	%																																													
10000	30	6																																													
8000	30	6																																													
6000	70	14																																													
5000	30	6																																													
4000	30	6																																													
3500	30	6																																													
3000	70	14																																													
2500	25	5																																													
2000	25	5																																													
1500	25	5																																													
1000	60	12																																													
750	25	5																																													
500	25	5																																													
250	25	5																																													
Protein Supermarker	AG Koch-Nolte/ UKE	 <ul style="list-style-type: none"> — BSA-Bovines Serumalbumin: 66 kDa (4 µL/10 µL) — Heavy Chain IgG: 50 kDa (2 µL/10 µL) — Light Chain IgG: 25 kDa (1 µL/10 µL) — Lysozym: 14 kDa (0,4 µL/10 µL) 																																													
Sharp Pre-Stained Protein Standardmarker	Novex LC5800																																														

3 Materialien

3.14 Software

Tabelle 14: Software.

Bezeichnung	Version	Hersteller
BLItz-System	BLItz Pro 1.3.1.3	Avantor-VWR
FACS	Diva 8.0	Becton Dickinson
FlowJo (Mac)	9.6	Becton Dickinson
Leica LAS X SP8	3.5.2	Leica
Nanodrop 2000/2000C	1.2	Peqlab
Snap Gene Viewer	5.0.7	GSL Biotech LLC

3.15 Verbrauchsmaterial

Tabelle 15: Verbrauchsmaterial.

Bezeichnung	Nummer	Hersteller
15 µ-Slide 8 well Ibidi Platte	10724815001	Roche
Amicon® Ultra Centrifugal	UFC8100	Merck
FACS- Röhren	352054	Falkon
Falcontube 15 - 50 mL	-	Sarstedt
Mikrozentrifugenröhrchen 0,2 - 2 mL	-	Eppendorf
NuPage 12% Bis-Tris-Gel	NPO341BOX	invitrogen
Streptavidin „Octet® SA-Biosensors_For Kinetics“	2201000311	Sartorius
Pierce Spin Columns – Screw Cap	89851	Thermo Fischer
Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette 3,5K	66333	Thermo Fischer

3.16 Zelllinien

Tabelle 16: Zelllinien.

Bezeichnung	Zelltyp	Hersteller
HEK-293 6E	Human Embryonic Kidney	AG Koch-Nolte/ UKE
Jurkat	Menschliches Zell-Lymphom	AG Koch-Nolte/ UKE
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells	AG Haag/ UKE

4 Methoden und Durchführung

4.1 Klonierung

4.1.1 Prinzip:

Im Rahmen der DNA-Klonierung werden DNA-Fragmente aus unterschiedlichen Quellen in einen Klonierungsvektor eingefügt. Anschließend wird das entstandene rekombinante DNA-Molekül oft in Bakterienzellen, insbesondere *Escherichia coli* „*E.coli*“ (Migula 1895), aber auch in Hefezellen oder anderen eukaryotischen Zellen mittels Transfektion oder Transformation eingeführt.^[45] In diesen Wirtszellen erfolgt eine Vermehrung dieser DNA-Moleküle. Durch Zellteilung entstehen Bakterienkolonien, die aus genetisch identischen Zellen, sogenannten Klonen, bestehen. Diese Kolonien enthalten jeweils eine Kopie des gewünschten DNA-Fragments.^[46]

Bei einer typischen Klonierungsreaktion wird das zu untersuchende DNA-Fragment (Insert) in einen Vektor oder ein Plasmid eingebracht. In der Regel enthält dieser Vektor alle erforderlichen Elemente für die Replikation der DNA in der Wirtszelle. Um das Insert zu gewinnen, kann es entweder durch Restriktionsenzyme ausgeschnitten, mittels PCR amplifiziert oder aus Oligonukleotiden durch Assemblierung zusammengesetzt werden. Durch Restriktionsverdau oder PCR wird der Zielvektor normalerweise geöffnet und in die lineare Form überführt. Nachfolgend werden das Insert und der Vektor mithilfe einer Ligase verbunden. Das resultierende rekombinante Plasmid liegt dann wieder in zirkulärer Form vor und kann beispielsweise in *E.coli* zur Vermehrung verwendet werden (siehe Abbildung 9).^[47] Rekombinante Plasmide werden nicht nur zur reinen Vervielfältigung der klonierten DNA verwendet, sondern auch für vielfältige Methoden wie Proteinexpression, Lokalisationsstudien oder Reporterassays. Darüber hinaus kann die Klonierung als Technik verwendet werden, um die Übertragung von einem oder mehreren Genen auf heterologe Organismen zu ermöglichen, um metabolische Prozesse zu optimieren oder Resistenzfähigkeiten zu verleihen, sowohl bei Tieren als auch bei Pflanzen, was zu genetischer Manipulation führt.^[48]

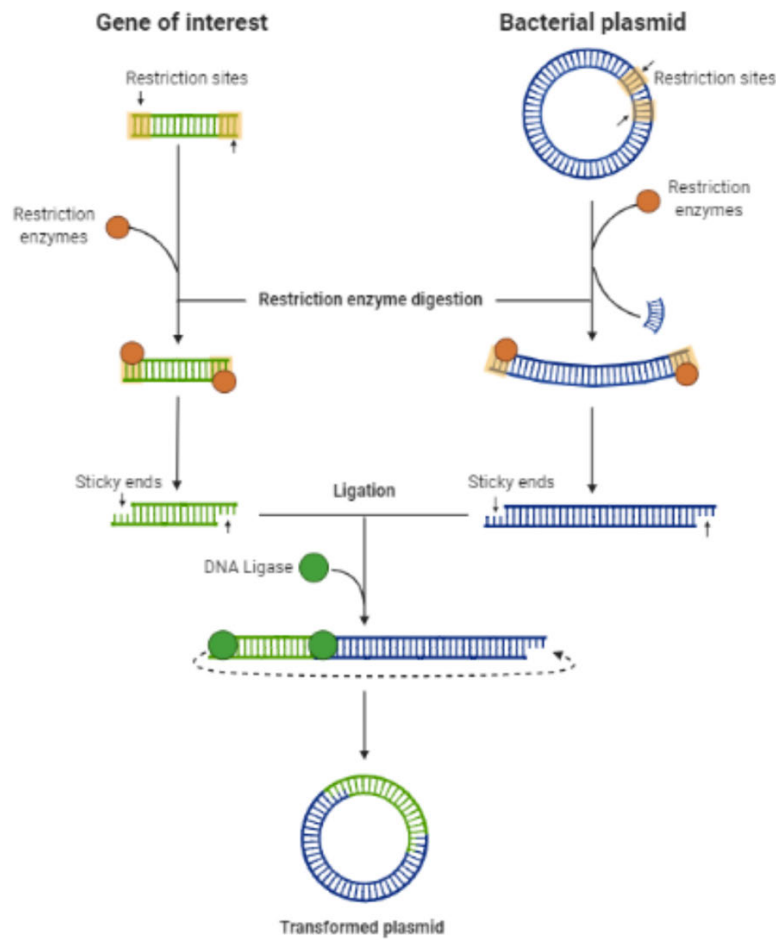


Abbildung 9: Schematischer Überblick über den Restriktionsverdau und die Ligation. Um eine gezielte Integration des gewünschten Gens (Insert) in das bakterielle Plasmid (Vektor) in der richtigen Orientierung zu erreichen, wird der Restriktionsverdau angewandt, bei der dieselben hochspezifischen Restriktionsenzyme verwendet werden, um sowohl das Plasmid als auch das Gen zu schneiden. Um die gewünschte Orientierung sicherzustellen, werden dabei zwei verschiedene Restriktionsenzyme eingesetzt. Die Ringstruktur des Plasmids wird dann durch einen Schnitt an einer bestimmten Stelle geöffnet und eine bestimmte Anzahl von Nukleotiden zwischen den Schnittstellen wird entfernt. Dieser Prozess führt zur Bildung von "sticky ends", die durch Hydrolyse der Phosphodiester-Bindungen an den Enden entstehen und es ermöglichen, die DNA-Fragmente gezielt miteinander zu verknüpfen. Mit Hilfe von DNA-Ligase werden die Fragmente schließlich verbunden und der Ring des Plasmids wird wiederhergestellt. Bearbeitet aus "Biolyer Interferometry", von *BioRender.com* (2021).^[49]

4.1.2 Durchführung:

4.1.2.1 Verdauen des Inserts sowie des Vektors durch Restriktionsenzyme

Das Insert (DNA-Fragment) wurde zunächst in 32 μL Wasser höchster Reinheit (ddH_2O) gelöst. Davon wurden lediglich 16 μL für den Verdauungsprozess verwendet. Anschließend wurde das gelöste Insert zusammen mit jeweils 1 μL der beiden Restriktionsenzyme sowie 2 μL des spezifischen Restriktionspuffers in ein 1,5 mL Mikrozentrifugenröhrchen (Eppendorf-Röhrchen) pipettiert.

4 Methoden

Dabei variierte die Auswahl der Restriktionsenzyme und Restriktionspuffer je nach den unterschiedlichen Konstrukten der Sensoren (siehe Tabelle 25-27 im Anhang). Im Anschluss wurde der entsprechende Vektor mit den Restriktionsenzymen verdaut, um ihn zu öffnen. Basierend auf der benötigten Menge von 3 µg für die Verdauung und der Konzentration des Vektors wurde das erforderliche Volumen des Vektors für die Verdauung berechnet (siehe Tabelle 17). Das berechnete Volumen des Vektors wurde dann mit 2 µL Restriktionspuffer und jeweils 1 µL der beiden Restriktionsenzyme in ein 1,5 mL Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Sowohl das gelöste Insert als auch der vorbereitete Vektor wurden vorgetext und für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurden sie für 20 Minuten bei 80 °C inkubiert, um die Restriktionsenzyme zu inaktivieren, da diese sonst die restliche DNA zerstören könnten.

4.1.2.2 Dephosphorylierung

Um sicherzustellen, dass die offenen Enden am Vektor nicht wieder korrelieren bzw. zusammenkleben und die Stelle für das Insert frei bleibt, wurde der Vektor dephosphoryliert. Hierzu wurden die 20 µL Vektor in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Röhrchen mit 3 µL 10x Puffer für Antarktische Phosphatase sowie 1 µL Antarktische Phosphatase (AP) pipettiert und mit Wasser aufgefüllt, bis ein Gesamtvolumen von 30 µL erreicht wurde. Die Mischung wurde dann bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Schließlich wurde der Vektor für 20 Minuten bei 65 °C erhitzt, um die Enzyme zu inaktivieren.

4.1.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Trennung und Aufreinigung des ausgeschnittenen Vektors bzw. Plasmids wurde eine Gel-Elektrophorese durchgeführt. Hierzu wurde zuerst 1 g Biozym LE Agarose mit einer Analysenwaage abgewogen und in einem Erlenmeyerkolben mit 100 mL 1x TAE-Puffer (bestehend aus 40 mL 50x TAE in 2000 mL Aqua) gelöst. Als Nächstes wurde die Mischung für 4 Minuten bei 60 Watt in der Mikrowelle erhitzt und danach kurz gerührt. Parallel dazu wurde eine Gelkammer auf einer speziellen Glasplatte fixiert und mit einer Wasserwaage überprüft, ob sie waagrecht ist. 5 µL Roti-Safe wurden in die Mitte der Gelkammer pipettiert (**Hinweis:** Roti-Safe sollte unter einem Abzug verwendet werden, da es sehr toxisch ist). Danach wurde die Agarose-Gellösung in die Gelkammer gegossen, so dass eine Gelhöhe von etwa 2-3 mm erreicht wurde. Das Gel wurde mittels des Gel-Kamms gerührt, um entstehende Luftblasen im Gel zu entfernen und eine homogene Verteilung der Roti-Safe-Lösung im Gel zu gewährleisten.

4 Methoden

Der Gel-Kamm wurde gemäß den spezifischen Kammpositionen in die Kammer eingeführt, und das Gel wurde für einen Zeitraum von 30 Minuten bei Raumtemperatur platziert, um die Agarose-Lösung zur Gelbildung zu bringen. Nachdem das Gel in der Gelkammer erstarrt war, konnte es für die Gel-Elektrophorese verwendet werden, um das gewünschte DNA-Fragment, wie den ausgeschnittenen Vektor oder das Plasmid, zu trennen und aufzureinigen. Dies erfolgte durch Anlegen einer elektrischen Spannung an die Gelkammer, die die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe und Ladung durch das Gel bewegen lässt. Zur Durchführung wurde die Gel-Kammer mit dem zuvor eingesetzten Gel in die Elektrophorese-Kammer platziert und mit 1x TAE-Puffer bis zum Rand aufgefüllt. Der Gel-Kamm wurde anschließend aus der Gel-Kammer entfernt. Weiterhin wurden 5 μL Purple Loading Dye (Farbstoff) zu dem ausgewählten Plasmid pipettiert und die gesamten 35 μL der gefärbten Plasmidprobe in eine der Geltaschen pipettiert. Als Größenmarker wurden 7 μL GeneRuler 1kb (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ebenfalls auf das Gel pipettiert. Die Kammer wurde dann bei einer elektrischen Spannung von 100 V für 45 Minuten betrieben.

Als letztes wurde das Gel unter Verwendung des VisionCapt-Programms und UV-Lichts untersucht, um das Vorhandensein des Plasmids nachzuweisen. Nach dem Starten des Exposme- und Transilluminator-Geräts wurden die Banden des Plasmids bzw. des zugeschnittenen Fragments sichtbar. Ein Bild des Gels wurde daraufhin gespeichert (siehe Abbildung 15-16). Um die Banden für weitere Analysen zu isolieren, wurde das Gel aus der Kammer entfernt und auf einem Leuchttisch mit UV-Licht platziert. Zuletzt wurde die Bande des Plasmids präzise mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 2 mL Eppendorf-Röhrchen überführt (siehe Abbildung 15-16).

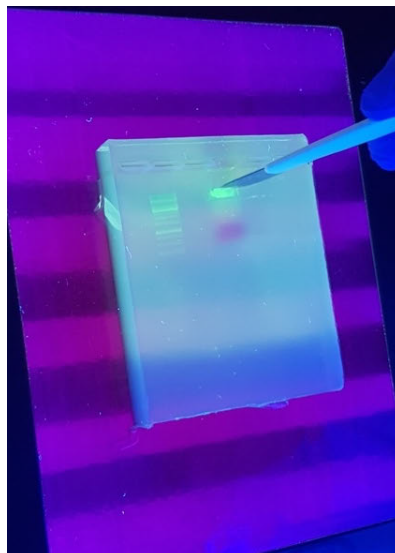


Abbildung 10: Ausschneiden der Vektor-Bande aus dem Agarose-Gel.

4.1.2.4 Aufreinigung der Fragmente mit dem MN-Kit (Macherey-Nagel) / Nucleospin Gel and PCR Clean-up

Die ausgeschnittene Bande des Vektors wurde in 200 μL NTI-Puffer gelöst. Für die Insert-DNA wurden 100 μL des NTI-Puffers und zusätzlich 30 μL entsalztes Wasser zugegeben. Die Proben wurden dann in Eppendorf-Röhrchen in einem Thermobad auf 50 °C für 10 Minuten erhitzt. Danach wurden das Insert und der Vektor in separate Säulen des Reinigungskits überführt und bei 11.000 $\times g$ für 30 Sekunden zentrifugiert, gefolgt von der Entfernung des Durchflusses. Im nächsten Schritt wurden die Säulen mit 700 μL NT3-Puffer zweimal gewaschen, wobei jeder Waschschrift bei 11.000 $\times g$ für 30 Sekunden zentrifugiert wurde. Nach Verwerfung des Durchflusses wurden die Säulen nochmal für 1 Minute bei 11.000 $\times g$ zentrifugiert, um sicherzustellen, dass kein Puffer mehr vorhanden ist. Zur Elution wurden 20 μL Wasser zu den Säulen gegeben, wobei die Säulen zuvor in neue 1,5 mL Eppendorf-Röhrchen platziert wurden. Die Säulen wurden dann bei Raumtemperatur für 1 Minute inkubiert und nachfolgend für 1 Minute bei 11.000 $\times g$ zentrifugiert.

Um eine sichere Aufreinigung zu gewährleisten, wurde das 20 μL Eluat (Durchfluss) erneut auf die Säulen pipettiert, bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 1 Minute bei 11.000 $\times g$ zentrifugiert. Zur weiteren Analyse wurde die Konzentration des Inserts und des Vektors mit einem Spektrophotometer "NanoDrop 2000c" bestimmt (siehe Tabelle 18).

4.1.2.5 Bestimmung der Konzentration der DNA-Plasmide mittels des Spektralphotometers Nanodrop 2000c

4.1.2.5.1 Prinzip:

Die Konzentration von Plasmidlösungen oder Proteinen wird mit Hilfe des Spektralphotometers Nanodrop 2000c bestimmt. Das Thermo Scientific NanoDrop™ 2000/2000c UV-Vis Spektralphotometer besitzt ein Probenhaltesystem, das Messungen mit sehr geringen Probenvolumina von 0,5 - 2 μl ermöglicht, ohne dass dabei Küvetten oder Kapillaren verwendet werden müssen. Das Nanodrop hat einen Messbereich von 2-15000 $\text{ng}/\mu\text{L}$, was die unterschiedlichsten Messungen von Enzymkinetiken und Zellsuspensionen ermöglicht. Das Probenhaltesystem nutzt die Oberflächenspannung der Probe, um eine Flüssigkeitssäule zwischen zwei optischen Fasern zu bilden, die den Messweg darstellt.^[50]

DNA absorbiert Licht am stärksten bei 260 nm, während Proteine bei 280 nm am stärksten absorbieren. Bei der Messung wird daher ein vollständiges Absorptionsspektrum über den gesamten Wellenlängenbereich von 190 nm bis 840 nm aufgenommen, um die Extinktionen bei 260 nm bzw. 280 nm für die jeweiligen Ansätze zu messen. Dies ermöglicht eine schnelle Quantifizierung von hochkonzentrierten Proben mit hoher Präzision.^{[50][51]}

4.1.2.5.2 Durchführung:

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des NanoDrop-Spektrophotometers bestimmt. Dazu wurde 1 μL der eluierten Plasmid-DNA verwendet. Um den Blindwert zu ermitteln, wurde 1 μL des Elutionspuffers, der für die Aufreinigung verwendet wurde, in das Gerät pipettiert und als Blank-Wert eingestellt. Daraufhin wurde jeweils 1 μL der Plasmid-DNA-Proben im Gerät gemessen und die Konzentration der DNA bestimmt.

4.1.2.6 Ligation des Inserts mit dem Vektor

Nach Bestimmung der Konzentrationen der beiden DNA-Fragmente (Insert und Vektor) wurden die erforderlichen Volumina gemäß eines Verhältnisses von 1:3 (Vektor:Insert) berechnet (siehe Tabelle 18). Darauffolgend wurden die berechneten Volumina des Inserts bzw. des Vektors zusammen mit jeweils 1 μL T4 Ligase und 1 μL des T4 Ligase-Puffers in ein 1,5 mL Eppendorf-Röhrchen pipettiert und mit Wasser auf 10 μL aufgefüllt. Für die Ligase-Reaktion wurden die Röhrchen nach dem Pipettieren aller Komponenten 30 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Überprüfung der Klonierung wurde als Kontrollansatz ein Religationsansatz ohne Insert vorbereitet. Dieser dient dazu, sicherzustellen, dass es sich bei den auf den Ligationsplatten gewachsenen Plasmiden tatsächlich um die korrekt klonierten Plasmide handelt.

4.2 DNA-Sequenzierung

Zur Verifikation der Integrität der klonierten DNA-Plasmide erfolgte eine *in-vivo* Herstellung in *Escherichia coli* (*E.coli*), gefolgt von einer Plasmid-Isolation unter Verwendung von Präparationskits. Danach wurden die Plasmide für die Sequenzierung vorbereitet und einer Sequenzierungsanalyse unterzogen, um ihre genetische Sequenz zu bestimmen. Diese Sequenzen wurden dann mit den erwarteten theoretischen Sequenzen verglichen, um die Übereinstimmung zu überprüfen.

4.2.1 Transformation der rekombinanten DNA-Plasmide in *E.coli* XL 1-Blue Zellen

4.2.1.1 Prinzip:

Die Transformation von Bakterien- und Hefezellen ist ein Verfahren zur Einführung von *in vitro* rekombinanter DNA (Fremd-DNA, Plasmide, Vektoren) in diese Zellen. Es handelt sich um eine nicht-virale Übertragung, die als parasexueller Prozess bezeichnet wird. Dabei erfolgt die Übertragung von Genen zwischen Zellen durch isolierte DNA. In der Gentechnik wird die Transformation verwendet, um rekombinante DNA in Bakterien zu vervielfältigen, nachdem DNA-Abschnitte in einen Vektor geklont wurden. Die eingebrachte DNA wird in die Bakterienzelle (*E.coli* XL 1-Blue) integriert und an alle Tochterzellen weitergegeben, wobei eine hohe Anzahl von Klonen mit rekombinanter DNA erzeugt werden. Diese rekombinanten Bakterien weisen eine auf dem Plasmid kodierte Antibiotikaresistenz auf, und können daher in Anwesenheit des Antibiotikums selektiert werden.^{[52][53]}

Die Konstrukte, die in *E.coli*-BL21 produziert wurden (siehe Abschnitt 4.3.1), waren mit einem Kanamycin-Resistenzgen ausgestattet, weshalb bei der Kultivierung der Bakterienzellen (*E.coli* XL 1-Blue) Agarplatten mit dem Antibiotikum Kanamycin eingesetzt wurden. Im Gegensatz dazu wurde bei den Konstrukten, die in *HEK*-Zellen produziert wurden (siehe Abschnitt 4.3.2), das Antibiotikum Carbenicillin verwendet, da deren Plasmide ein Carbenicillin-Resistenzgen enthalten. Die Bakterienzellen wurden mittels der Hitzeschockmethode mit den klonierten rekombinanten Vektoren bzw. Plasmiden (aus Abschnitt 4.1) transformiert. Während der Hitzeschock-Behandlung kann es zu einer vorübergehenden Zunahme der Permeabilität der Zellmembranen für Plasmid-DNA kommen, was die Effizienz der Plasmid-Aufnahme in die Zellen erhöhen kann.

4.2.1.2 Durchführung:

50 μL *E.coli* Zellen (Stamm: XL-1Blue) wurden aus dem -80°C Schrank auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde jeweils 1 μL des rekombinanten Plasmids zu den Zellen pipettiert. Die Zellen wurden für 20 Minuten auf Eis inkubiert, währenddessen ein Wasserbad auf 42°C vorgewärmt und das Soc-Medium darin erhitzt wurde. Nach der Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 30 Sekunden in das Wasserbad gestellt und danach für 2 Minuten auf Eis inkubiert, um einen Hitzeschock zu induzieren. Daraufhin wurden 450 μL Soc-Medium zu den Zellen gegeben und die Zellen wurden für 1 Stunde bei 37°C und 800 Umdrehungen pro Minute (rpm) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen für 3 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert, das Pellet wurde in 450 μL Medium resuspendiert und der Überstand entfernt. Etwa 50 μL der resuspendierten Zellen wurden mit einer Impföse auf eine LB+Kanamycin bzw. LB+Carbenicillin Agarplatte ausplattiert und diese wurde über Nacht bei 37°C inkubiert, um Kolonien wachsen zu lassen. Die Auswahl des Antibiotikums für die Agarplatte hing von dem verwendeten rekombinanten DNA-Plasmid ab, da die Plasmide verschiedene Resistenzgene aufwiesen.

4.2.1.2.1 Screening und Kultivierung der *E.coli* Zellen

Nach dem Wachstum der Kolonien wurden vier Einzelkolonien in jeweils ein Falconröhrchen überführt, welches 5 mL 2x YT-Medium mit 5 μL Kanamycin bzw. Carbenicillin enthält. Um eine erhöhte Ausbeute an Plasmiden zu erzielen, wurden einige Kolonien in einem Volumen von 300 mL 2x YT-Medium kultiviert. Die Falconröhrchen wurden nachfolgend über Nacht bei 37°C und bei 200 rpm in einem Schüttler inkubiert. Schließlich wurden die Zellen bei 4000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde entfernt und das Pellet bei 4°C für die weitere Analyse gelagert.

4.2.2 Plasmid Präparation

4.2.2.1 Prinzip:

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde mittels **QIAprep®Spin Miniprep Kits** und **NucleoBond Xtra Maxi EF Kits** durchgeführt, wobei das Maxi Kit verwendet wurde, um eine größere Menge an Plasmid-DNA zu gewinnen. Hierzu werden die Bakterien zunächst in Resuspendierungspuffer resuspendiert, anschließend in Lysepuffer lysiert und in einem Neutralisierungspuffer neutralisiert. Die Plasmidlösung wird dann auf die Säulen gegeben und gewaschen. Schließlich kann die DNA nach mehreren Waschschritten eluiert werden.

4.2.2.2 Präparation bei dem Mini Kit (QIAprep®Spin Miniprep)

Die Pellets wurden in 250 µL P1-Puffer (A1) resuspendiert und in 1,5 mL Eppendorf-Röhrchen überführt. Im Anschluss wurden 250 µL P2-Puffer (A2) zu jedem Ansatz hinzugegeben und die Röhrchen mehrmals geschüttelt. Sobald die Zellsuspension blau wurde, wurden 300 µL N3-Puffer (A3) zur Neutralisation hinzugefügt und die Röhrchen leicht geschüttelt, bis die blaue Farbe verschwand. Danach wurden die Röhrchen in einer Zentrifuge bei 11.000 g für 10 Minuten sedimentiert und der Überstand (etwa 750 µL) in eine QIAprep-Säule überführt. Die Säulen wurden dann für 1 Minute bei 11.000 g zentrifugiert und der Durchfluss wurde entnommen. Als Nächstes wurde der Waschschrift mit 600 µL PB-Puffer (A4) "Waschlösung" durchgeführt, die Säulen wurden wieder bei 11.000 g für 1 Minute zentrifugiert und der Durchfluss wurde entnommen.

Um sicherzustellen, dass die gesamte Waschlösung durch die Säule diffundiert war, wurden die Säulen für 2 Minuten bei 11.000 g erneut zentrifugiert. Danach wurden sie in 1,5 mL Eppendorf-Röhrchen platziert und jeweils 50 µL Elutionspuffer („EB-Puffer“, 5 mM Tris/HCl, pH 8.5) in die Mitte der Säulen pipettiert. Nachdem die Säulen für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert wurden, wurden sie für 1 Minute bei 11.000 g zentrifugiert. Abschließend wurden die 50 µL gereinigte DNA-Plasmide im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt. Die Konzentration der Plasmidlösungen wurde später mit Hilfe des Spektralphotometers Nanodrop 2000c bestimmt (siehe Tabelle 19).

4.2.2.3 Präparation bei dem Maxi Kit (NucleoBond Xtra Maxi EF):

Das Pellet wurde in 12 mL **RES-EF** + RNase Puffer resuspendiert und in ein 50 mL Falconröhrchen überführt. Zur Lyse der Zellen wurde das Pellet in 12 mL **LYS-EF** (enthaltend Natriumhydroxid/SDS) gelöst und durch leichtes Schütteln des Röhrchens (5-maliges Umdrehen) homogenisiert. Danach wurde das Falconröhrchen bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Währenddessen wurden die **NucleoBond® Xtra Säulen** des Kits mit 35 mL **Equilibration Buffer EQU-EF** equilibriert, indem der Puffer an den Rand des Filters pipettiert wurde, um den gesamten Filter zu benetzen. Die Säulen wurden dann ohne Zentrifugation mit der Erdbeschleunigung entleert.

4 Methoden

Das lysierte Pellet (Lysat) wurde anschließend neutralisiert, indem 12 mL Neutralisationspuffer **NEU-EF** hinzugefügt und das Röhrchen durch leichtes Umdrehen gemischt wurde, bis die blaue Farbe verschwand und das Lysat eine geringere Viskosität aufwies. Daraufhin wurde das Lysat für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Der Neutralisationspuffer **NEU-EF** enthält Kaliumacetat, das die Ausfällung von SDS als KDS (Kaliumdodecylsulfat) bewirkt und Proteine, chromosomale DNA und andere Zelltrümmer präzipitiert. Das Lysat wurde dann durch leichtes Umdrehen des Röhrchens homogenisiert und bei 4600 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Das Lysat bzw. die Suspension wurde auf den Watte-Filter der Säule gegeben und abtropfen gelassen. Das Plasmid wurde für die Maxi Kit-Präparation dreimal gewaschen. Zunächst wurde der Filter in der Säule mit 10 mL **Filter Wash Buffer FIL-EF** gewaschen. Nachdem der Puffer durchgelaufen war, wurde der Filter entfernt und die Säule wurde ohne den Filter mit 90 mL **Wash Buffer ENDO-EF** gewaschen. Als letzter Waschschrift wurde die Säule erneut mit 45 mL **Wash Buffer WASH-EF** gewaschen.

Infolgedessen wurde die Plasmid-DNA mit 15 mL **Elution Buffer ELU-EF** eluiert und das Eluat in ein 50 mL Falconröhrchen aufgefangen. Dem Eluat wurden 10,5 mL Isopropanol zugegeben und das Röhrchen intensiv gemischt. Danach wurde das Röhrchen bei 4500 xg und bei 4°C für 30 Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Das erzeugte Pellet wurde nachher mit 5 mL endotoxin-freiem 70 % Ethanol bei Raumtemperatur gewaschen und bei 4500 xg für 5 Minuten zentrifugiert. Um eine effektive und sichere Reinigung der Plasmid-DNA durchzuführen, wurde das Röhrchen abgeschüttelt und erneut bei 4500 xg für 5 Minuten zentrifugiert. Der ethanolhaltige Überstand wurde entfernt und das Pellet bei Raumtemperatur für maximal 15 Minuten getrocknet.

Zum Abschluss wurde das DNA-Pellet in 1000 µL **endotoxin-freiem Buffer TE-EF** gelöst und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Mischung durch Schütteln homogenisiert und in ein 2 mL Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Konzentration der Plasmidlösungen wurde mithilfe des Spektralphotometers Nanodrop 2000c bestimmt (siehe Tabelle 22).

4.2.3 Sequenzierung der aufgereinigten Plasmide mittels des *Mix2Seq* Kits

4.2.3.1 Prinzip:

Zur Plasmid-Sequenzierung wurde die DNA-Mischung zusammen mit dem Primer vorbereitet und an das Unternehmen *Eurofins-Genomics* geschickt. Für jede Sequenzierungsreaktion betrug das Gesamtvolumen 17 μL , wobei 2 μL für die Primer reserviert waren. Das Volumen des Plasmids wurde entsprechend der zuvor bestimmten Konzentration berechnet, und der verbleibende Teil des Gesamtvolumens wurde mit Wasser aufgefüllt. Als spezifische Primer für die Sequenzierung wurden Nedd8 bzw. CMV (als Forward Primer) und PQE80L bzw. BGH (als Reverse Primer) verwendet.

4.2.3.2 Durchführung:

Das für die DNA-Sequenzierung erforderliche Volumen wurde mittels der folgenden Formel berechnet:

$$V = \frac{1000}{DNA_{Konzentration}}$$

Die berechneten Volumina der DNA wurden in die entsprechend markierten Sequenzierungsröhrchen (Seq-Tubes) pipettiert. Anschließend wurden jeweils 2 μL der Primer hinzugefügt und das Volumen mit Wasser auf 17 μL aufgefüllt (siehe Tabelle 19). Zum Schluss wurden die Seq-Röhrchen an *Eurofins-Genomics* zur Durchführung der Sequenzierung eingesandt. Zur Auswertung der DNA-Codes wurden die Sequenzen der Plasmide mit Hilfe des Programms *SnapGene* auf ihre Genauigkeit überprüft.

4.3 Proteinproduktion

4.3.1 Produktion der rekombinanten Proteine in *E.coli* Zellen

In den *E.coli* Zellen (Stamm: BL21-DE3) erfolgte die Expression der von den rekombinanten Plasmiden (siehe Abschnitt 4.2.2) kodierten Proteine. Diese Plasmide enthalten ein Kanamycin-Resistenzgen. Daher können in einem Kanamycin-haltigen Medium nur die transformierten Bakterien überleben. Das Wachstum der Zellen wird durch die Messung der optischen Dichte (*OD*) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Sobald die OD_{600} einen Schwellenwert von 0,6 erreicht, sind ausreichend Zellen gewachsen, und es wird der künstliche Induktor Isopropyl- β -D-thiogalactosid „IPTG“ (Aktivator für Proteinsynthese) hinzugegeben, um die Proteinexpression einzuleiten.^{[51][54]}

4.3.1.1 Transformation der rekombinanten Plasmide in *E.coli* BL 21-DE3 Zellen (*Single Cells_Novagen*)

Die Transformation der Plasmide in *E.coli* Zellen (Stamm: BL21) geschah genauso wie für die Transformation in XL-1Blue *E.coli* Zellen beschrieben (siehe Abschnitt 4.2.1). Allerdings wurde hier bei der Ausplattierung auf den Agarplatten und der Kultivierung der Zellen ausschließlich das Antibiotikum Kanamycin eingesetzt, da die zu produzierenden Plasmide ein Kanamycin-Resistenzgen enthalten.

4.3.1.2 Kultivierung der Vorkultur und Hauptkultur

Vorkultur

Nachdem die Kolonien gewachsen waren, wurde von allen Plasmid-Platten je eine Kolonie in ein Falconröhrchen überführt. In diesen Falconröhrchen wurden 10 mL 2x YT-Medium mit 10 µL Kanamycin vermischt. Darauffolgend wurden die Falconröhrchen bei 37°C im Schüttler für 6 Stunden inkubiert. Nach der 6-stündigen Inkubation wurde die optische Dichte aller verdünnten Vorkulturen bei 600 nm (OD_{600}) gemessen. Hierfür wurde eine 1:5-Verdünnung (200 µL:800 µL) mit 2x YT-Medium durchgeführt und die OD_{600} -Werte mit einem Photometer gemessen (siehe Tabelle 20).

Hauptkultur

Um die Hauptkulturen vorzubereiten, wurden 200 mL 2x YT-Medium und 200 µL Kanamycin in Erlenmeyer-Flaschen gemischt. Die Vorkulturen wurden indessen in einer Zentrifuge bei 4600 rpm und 4°C für 15 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde abgossen und das Pellet in 10 mL 2x YT-Medium + Kanamycin resuspendiert. Die Volumina für die Hauptkultur wurden dann basierend auf der optischen Dichte wie folgt berechnet:

$$V = \frac{(V_{2x\ yt-Medium} \cdot OD\ Messung_{Gezielt})}{Hochgerechnete\ OD_{600}\ der\ Vorkultur} = \frac{(200\ mL \cdot 0,1)}{Verdünnte\ OD_{600} \cdot 5}$$

Die berechneten Volumina der Vorkulturen (siehe Tabelle 20) wurden daraufhin in die 200 mL Hauptkulturen pipettiert. Um die Vorkulturen zu konservieren, wurde jeweils eine Glycerinkultur (engl. *glycerol stock*) vorbereitet, bei der 900 µL der Zellsuspension mit 300 µL Glycerol verdünnt wurden.

Danach wurden die Hauptkulturen bei 37°C für 1 bis 2 Stunden inkubiert, und die OD_{600} der unverdünnten Kulturen wurde mittels eines Photometers gemessen. Zudem wurden 100 µL 1 M IPTG zu den Kulturen gegeben. Vor Zugabe von IPTG wurden 2 mL Proben entnommen. Die Hauptkulturen wurden dann bei 23°C und 220 rpm über Nacht inkubiert.

Die Hauptkulturen wurden danach aus den Erlenmeyerkolben in spezielle Zentrifugenröhrchen überführt, und jeweils 2 mL wurden in 2 mL Eppendorf-Röhrchen als Proben nach Zugabe von IPTG entnommen. Zum Schluss wurden die Kulturen in einer Zentrifuge bei 4600 rpm und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde entfernt und das Pellet wurde bei -80°C gelagert.

4.3.2 Produktion der rekombinanten Proteine in *HEK*-Zellen

Ergänzend zur Produktion in *E.coli* wurden einige in eukaryotischen Zellen rekombinanten Proteine auch in eukaryotischen Zellen hergestellt. Dazu wurde eine Zelllinie verwendet, die aus menschlichen embryonalen Nierenzellen abstammt. Diese Zellen, auch bekannt als *HEK*-Zellen „*Human Embryonic Kidney*-Zellen“, weisen Eigenschaften von Krebszellen auf, was ihre Kultivierung und genetische Manipulation erleichtert. Dies macht sie zu einer geeigneten Wahl für Forschungszwecke.^{[55][56]}

Das Einschleusen von DNA in Säugetierzellen zeigt gewisse Parallelen zur bakteriellen Transformation. Allerdings bezieht sich die Transformation von Säugerzellen auf den Prozess, bei dem normale Zellen in einen malignen Zustand, wie Tumore oder Krebs, umgewandelt werden. Aus diesem Grund wird die Übertragung von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen als Transfektion bezeichnet.^[57]

4.3.2.1 Transfektion der rekombinanten Plasmide in die *HEK*-Zelllinie *HEK-293 6E*

Für die *in-vitro* Transfektion der Plasmide wurde eine Variante der *HEK*-Zellen verwendet, die in Suspension wächst (*HEK-293 6E*). Die Zellen wurden in einer T225 Zellkulturflasche im Verhältnis von 1:5 mit dem Medium FreeStyle-253 aufgeteilt und bei 37°C für 24 Stunden inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das für die Produktion erforderliche Nährmedium FreeStyle F17 Expression angesetzt. Anschließend wurde die DNA-Mischung vorbereitet, wobei zunächst das Plasmidvolumen anhand der Plasmidkonzentration und einer benötigten DNA-Menge von 20 µL wie folgt berechnet wurde:

$$V = \frac{\text{Plasmid Menge für die T225 – Flasche (20 } \mu\text{g)}}{\text{Konzentration des Plasmids in ng}/\mu\text{L}}$$

4 Methoden

Die berechneten Volumina der Plasmide (siehe Tabelle 22) wurden in einem 15 mL Falconröhrchen mit 750 μ L 300 mM NaCl pipettiert und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1,5 mL aufgefüllt. In einem separaten 2 mL Eppendorf-Gefäß wurde eine Mischung aus PEI (Polyethylenimine), 300 mM NaCl und Wasser hergestellt. In der Folge wurde die 1,5 mL PEI-Mischung tropfenweise zur DNA-Mischung gegeben und für 10 Sekunden geschüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die 3 mL DNA/PEI-Mischung tropfenweise, langsam und gleichmäßig zu den Zellen pipettiert und daraufhin bei 5% CO_2 und 37 °C für 24 Stunden inkubiert.

Zusätzlich wurden 500 μ L des Nährmediums FreeStyle F17 zu den Zellen gegeben und die Inkubation bei 37 °C und 5% CO_2 für weitere 5 Tage fortgesetzt. Danach wurde der Überstand der Zellkultur in ein 50 mL Falconröhrchen übertragen und bei 4600 rpm und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der neue Überstand wurde anschließend in ein weiteres 50 mL Falconröhrchen übertragen und erneut bei 4600 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Letztendlich wurde der zuletzt gewonnene Überstand, der das rekombinante Protein enthält, in ein 50 mL Falconröhrchen übertragen und bei 4 °C aufbewahrt.

4.4 Aufreinigung der rekombinanten Proteine

Zur Entfernung von unerwünschten Verunreinigungen wurden die produzierten rekombinanten Proteine einer mehrstufigen Reinigung unterzogen. Die Proteine, die in *HEK*-Zellen produziert wurden, wurden aus dem Überstand gewonnen. Im Gegensatz dazu wurden die Proteine, die in *E.coli* produziert wurden, zuerst durch Lyse der Zellen mit einem speziellen Puffer freigesetzt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung aller Proteine mittels verschiedener spezifischer Säulen, gefolgt von einer Aufkonzentrierung, um die Proteinkonzentration zu erhöhen.

4.4.1 Lyse der Bakterienzellen

Zur Vorbereitung des Lyse-Puffers (Bugbuster) wurden die Pellets der Zellkulturen zunächst mit einer Analysewaage gewogen, um das erforderliche Volumen des Puffers gemäß einem Verhältnis von 5 mL Puffer pro 1 g Pellet zu berechnen (siehe Tabelle 21). Danach wurde der Lyse-Puffer in einem 50 mL Falconröhrchen vorbereitet, indem das berechnete Volumen an Bugbuster pipettiert wurde. Zusätzlich wurden Protease Inhibitor „AEBSF“ (1%) sowie Turbo Nuclease „Benzonase“ (0,01%) hinzugefügt. Als nächstes wurden die Pellets mit dem berechneten Volumen an Lyse-Puffer resuspendiert und in spezifische Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 30 min Schütteln auf einem Roller bei Raumtemperatur wurden die lysierten Zellkulturen mittels einer spezifischen Zentrifuge (**SORVALL RC 26 PLUS**) bei 20000 rpm und 4°C für 30 min zentrifugiert. Die Überstände wurden in 15 mL Falconröhrchen überführt und 1 mL davon als Lysat-Probe entnommen. Letztlich wurden die neuen Pellets mit einer 1%-igen Tween-Lösung wieder resuspendiert und auf einem Roller inkubiert.

4.4.2 Aufreinigung durch Ni-NTA Säulen (Protino Ni-TED 1000 Packed Columns)

4.4.2.1 Prinzip:

Die meisten der rekombinanten Proteine enthalten eine eingefügte Folge mehrerer Histidinreste (Polyhistidin-tag), der eine Aufreinigung über eine Nickelsäule (Ni-NTA Säule, Protino Ni-TED 1000 Packed Columns) ermöglicht. Die Aufreinigung beruht auf der hohen Affinität der Imidazol-Ringe der Histidin-Reste zu der Nickel-Nitrilotriacetic-Acid (Ni-NTA) Metall-Affinitätsmatrix. Diese Bindungen sind äußerst stabil, was das Waschen der Proteine und die Entfernung unspezifischer Kontaminationen erleichtert. Ein weiterer Vorteil ist, dass diese Bindungen unabhängig von der Proteinkonformation sind, was ermöglicht, dass die Proteine auch unter denaturierenden Bedingungen eluiert werden können. Die Elution der Proteine kann durch verschiedene Prinzipien erfolgen, zum Beispiel durch Elution bei saurem pH-Wert, bei dem die Histidin-Reste von den Nickel-Ionen abgelöst werden. Alternativ kann auch ein kompetitiver Inhibitor wie Imidazol zur Elution verwendet werden. Dadurch wird die Isolierung der Proteine mit hoher Reinheit erleichtert, die dann mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) weiter charakterisiert werden können.^[51]

4.4.2.2 Durchführung:

Die erforderlichen Lösungen wurden für die Aufreinigung vorbereitet. Hierbei wurden der Waschpuffer „8x-LEW“ und der 4x-Elutionspuffer im Verhältnis von 1:3 mit Millipore Wasser verdünnt. Anschließend erfolgte die Aktivierung der Nickel-Säulen durch Zugabe von 2 mL verdünnter 1x-LEW-Lösung pro Säule. Die Lysate wurden dann mittels Durchflussschromatographie durch die Säulen geleitet und in 15 mL Falconröhrchen gesammelt. Nachfolgend wurden die Säulen zweimal mit 2 mL 1x-LEW gewaschen und der Durchfluss in 2 mL Eppendorf-Röhrchen gesammelt. Letztlich erfolgte die Elution der Proteine dreimal mit 1,5 mL 1x-Elutionspuffer, der jeweils in separaten 2 mL Eppendorf-Röhrchen aufgefangen wurde. Zur Analyse der Proteine wurde eine SDS-PAGE sowie Western Blot durchgeführt (siehe Abbildungen 20 und 21).

4.4.3 Aufkonzentrieren der eluierten Proteine durch Ultrafiltrationstubes (Amicon-Säulen)

4.4.3.1 Prinzip:

Die Amicon-Säulen sind mit einer Zellulosemembran ausgestattet und fungieren somit als Filter für die Proteine. Da die zu konzentrierenden Proteine unterschiedliche Größen aufweisen, werden Säulen mit unterschiedlichen Porengrößen eingesetzt. Dabei werden die größeren Moleküle durch die Membran zurückgehalten, während die kleineren Moleküle durch die Poren hindurch diffundieren.

4.4.3.2 Durchführung:

Zur Aktivierung der Säulen wurde zuerst 5 mL 1x PBS-Puffer -/- (*phosphate-buffered saline*) zugegeben. Im Anschluss wurden die Säulen bei 4000 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und die Durchflüsse verworfen. Danach wurden die Säulen mit den drei Elutionsfraktionen aus der NiNTA-Aufreinigung (siehe Abschnitt 4.4.2) beladen, und mit PBS-Puffer aufgefüllt. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen der Durchflüsse wurde der Waschschriff mit PBS-Puffer zweimal wiederholt. Schließlich wurden die Überstände, die die aufkonzentrierten Proteine enthielten, in 2 mL Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Konzentrationen wurden mit einem Spektrophotometer "NanoDrop 2000c" gemessen.

4.4.4 Verdauen der rekombinanten Proteine

Die in *E.coli* produzierten Sensorproteine enthalten an ihren N-terminalen Enden alle einen 14xHis-tag, der mit einer Domäne aus dem Ubiquitin-ähnlichen Nedd8-Gen verbunden ist. Das C-terminale Ende der Nedd8-Domäne wird von der Protease Nedp1 mit hoher Spezifität erkannt, weswegen diese Protease verwendet werden kann, um den Polyhistidin-tag mit Nedd8-Domäne abzuspalten, da diese die Aktivität des Proteins beeinflussen könnten. Hierzu wurden die Proteine mit einer im Labor vorhandenen Präparation der NEDP1-Protease im Volumenverhältnis von 1:20 inkubiert (die Konzentration der Protease war unbekannt). Um sicherzustellen, dass die Proteine vollständig verdaut wurden, wurde anschließend eine SDS-PAGE sowie Western Blot durchgeführt (siehe Abbildung 20 und 21-B).

4.4.5 Aufreinigung durch die ALFA Selector PE Matrix

4.4.5.1 Prinzip:

Einige der Sensorproteine enthielten auch den sogenannten „Alfa-tag“, eine Peptidsequenz, die von einer rekombinanten Einzelketten-Antikörperdomäne, einem sogenannten „Nanobody“, erkannt wird. Diese Proteine konnten über das "ALFA Selector PE (Peptide Elutable) Kit" aufgereinigt werden. Die ALFA Selector PE Matrix basiert auf einem Single-Domain-Antikörper (sdAb) mit einem K_d-Wert von 11 nM, der kovalent an 4% vernetztes Agarose oder magnetische Agarose-Beads gebunden ist und das Alfa-Peptid SRLEEEELRRRLTE mit vergleichsweise geringer Affinität bindet. Durch die Verwendung eines kompetitiven Peptid-Elutionsverfahrens mit einem speziellen ALFA-Elutionspeptid werden die ALFA-markierten Proteine erfolgreich eluiert. Als Alternative könnte die Elution unter sauren Bedingungen erfolgen. Dadurch ermöglicht der ALFA Selector PE eine optimale und effiziente Elution der Zielproteine.^{[58][59]}

4.4.5.2 Durchführung:

Basierend auf der angegebenen Kapazität der ALFA Selector Matrix und anhand der Konzentrationen der Zielproteine wurden die erforderlichen Volumina für die Lösung des ALFA-Beads gemäß der nachstehenden Formel berechnet:

$$V = \frac{\text{Protein Menge in mg}}{\text{Kapazität des ALFA Selector (4,5 mg/2 mL)}}$$

Darauffolgend wurden die ALFA-Beads equilibriert, indem das zuvor berechnete Volumen der Beads-Lösung in Mini-Säulen (**Pierce Spin Columns – Screw Cap**) pipettiert und bei 1000 xg für 1 min zentrifugiert wurde. Nachdem der Durchfluss verworfen wurde, wurden die Säulen mit dem fünffachen Beads-Volumen in PBS -/- gewaschen und erneut bei 1000 xg für 1 min zentrifugiert.

4 Methoden

Im Anschluss wurden die Säulen mit den ALFA-Beads auf neue 2 mL Eppendorf-Röhrchen platziert und die zu reinigenden Proteine zu den Beads pipettiert. Nachdem die Säulen für 1 min bei 1000 xg zentrifugiert wurden, wurde der Durchfluss zurück auf der Säule pipettiert und erneut zentrifugiert. Weiterhin wurden die Säulen mit dem zehnfachen Beads-Volumen in PBS -/- gewaschen und für 1 min zentrifugiert. Für den Elutionsschritt wurde das ALFA-Elutionspeptid vorbereitet, indem es zuerst in 250 µL Wasser gelöst, geschüttelt und kurz zentrifugiert wurde. Die ALFA-Peptidlösung wurde dann im Verhältnis von 1:20 mit PBS -/- verdünnt.

Demnach wurde die ALFA-Peptidlösung in die Säulen pipettiert, um die Proteine zu eluieren. Nach einer Inkubationszeit von 1 Minute bei Raumtemperatur wurden die Säulen für 1 Minute bei 1000 xg zentrifugiert, und dieser Elutionsschritt wurde zweimal wiederholt. Zusätzlich wurde zur Kontrolle der Vollständigkeit der Elution eine weitere Elution der Proteine unter sauren Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurde eine Lösung von **100 mM Glycine Buffer Solution pH 2-2.5** zu den Beads pipettiert und die Säulen wurden für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Schlussendlich wurden sie bei 1000 xg für 1 Minute zentrifugiert und die basische Pufferlösung **Tris-HCl Buffer pH 9.0** wurde zu den Eluatzen hinzugegeben, um die Lösung zu neutralisieren. Der saure Eluationsschritt wurde ebenfalls zweimal durchgeführt.

4.4.6 Proteinreinigung durch Dialyse mittels Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette

4.4.6.1 Prinzip:

Die aufgereinigten Proteine, die mittels Elution unter sauren Bedingungen gewonnen wurden, könnten potenziell unerwünschte Stoffe wie Aminosäuren oder Salze enthalten. Um diese niedermolekularen Verbindungen aus der proteinhaltigen Eluat-Fraktion abzutrennen, kann die Dialyse als Verfahren angewendet werden, bei dem ein Pufferaustausch der Proteine stattfindet.

4 Methoden

Die Dialyse bezeichnet ein Trennverfahren, bei dem kleine, unerwünschte Verbindungen aus Makromolekülen in Lösung mittels selektiver Diffusion durch eine semipermeable Membran entfernt werden. Die Dialysemembran besteht aus einer regenerierten Zellulosefolie und weist Poren unterschiedlicher Größe auf, was zu unterschiedlichen Molekulargewichts-*Cutoff* (MWCO)-Werten führt. Moleküle, die größer sind als die Poren der Dialysemembran, werden auf der probenseitigen Seite der Membran zurückgehalten. Im Gegensatz dazu diffundieren kleinere Moleküle ungehindert durch die Membran und streben dabei schrittweise einer Gleichgewichtskonzentration mit dem gesamten Dialysatvolumen an. Durch diesen Prozess wird es ermöglicht, die Konzentration von kleinen Verunreinigungen in der Probe auf ein akzeptables oder vernachlässigbares Niveau zu reduzieren.^[60]

4.4.6.2 Durchführung:

Es wurde eine Kassette mit einer Membran verwendet, deren MWCO-Wert 3,5 kDa beträgt. Vor der Anwendung wurde die Membran der Kassette hydratisiert, indem die Kassette in 500 mL Dialysepuffer aus 1x PBS -/- eingetaucht und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Darauf folgend wurde eine Spritze mit dem zu reinigenden Protein befüllt, wobei eine kleine Menge Luft in der Spritze belassen wurde. Durch eine der Spritzenöffnungen in einer Ecke der Kassette wurde das Protein mittels der Spritzennadel langsam und vorsichtig injiziert, und die Luft in der Kassette wurde abgezogen. Die Kassette wurde dann in dem Dialysepuffer bei 4°C unter ständigem Umrühren mit einem Fisch-Magnetrührer für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde der Puffer gewechselt und die Kassette über Nacht weiter inkubiert.

Nach der Inkubation der Kassette wurde das gereinigte Protein entnommen. Hierfür wurde eine Spritze mit einem Volumen an Luft gefüllt, das dem Volumen des Proteins entsprach, und sorgfältig durch eine andere Spitzenöffnung in der Kassette injiziert, um die Membranen zu trennen. Abschließend wurde die Kassette umgedreht, so dass die Spritzennadel nach oben zeigte, und das Protein wurde in die Spritze zurückgezogen.

4.5 Auftrennung und Nachweis der Proteine

4.5.1 SDS-PAGE

4.5.1.1 Prinzip:

Zur Separation und Detektion von Proteinen wird die SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) eingesetzt. Dabei erfolgt die Trennung der Proteine anhand ihrer Größe, Form und Ladung. Dies wird durch die Verlangsamung ihrer Wanderung durch ein Gel aus Polyacrylamid ermöglicht, das als molekulares Sieb fungiert. Vorher werden die Proteine durch Aufkochen denaturiert und dadurch in eine ähnliche Form gebracht. Die Zugabe von SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat), einem anionischen Detergens, zu den denaturierten Proteinen führt zu einer Angleichung ihres Massen-Ladungs-Verhältnisses, da das SDS an die Proteine proportional zu ihrem Molekulargewicht bindet (ein SDS-Molekül pro zwei Aminosäurereste). Dadurch trennen sich die negativ geladenen Proteine ausschließlich aufgrund ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld. Während der Elektrophorese werden die Proteine gemäß ihrer Größe sortiert, wobei größere Moleküle langsamer wandern als kleinere. Die Disulfidbrücken der Proteine können durch Zugabe von Dithiothreitol (DTT) im Puffer aufgebrochen werden. Darüber hinaus können die Molekulargewichte unbekannter Proteine durch Auftragung von Standardproteinen abgeschätzt werden. Letztendlich können die Protein-Banden im Gel durch Färbung mit einem proteinbindenden Farbstoff wie "Coomassie Blue" sichtbar gemacht werden.^{[51][61]}

4.5.1.2 Durchführung:

Für jede Probe wurden 10 µL eines vorbereiteten SDS-Puffers verwendet. Der SDS-Puffer wurde zuvor durch das Mischen von LDS-Puffer (50% des gesamten Volumens), SRA-Puffer (20%) und destilliertem Wasser (30%) hergestellt. Im Anschluss wurden 10 µL dieser vorbereiteten Pufferlösung zu je 10 µL Probe in 1,5 mL Mikrozentrifugenröhrchen pipettiert und die Röhrchen folgend gevortext. Die Röhrchen wurden dann für 10 Minuten bei 70°C erhitzt. Währenddessen wurde die Elektrophoresekammer vorbereitet, indem eine 12%ige Bis-Tris Geltasche in die Kammer eingesetzt und die Kammer mit MES-Puffer (Running Buffer 1x) aufgefüllt wurde. Nachdem die Probe-Röhrchen bei 70°C erhitzt wurden, wurden je 20 µL der Probe-Puffer-Mischung auf das Gel aufgetragen. Darauffolgend wurde eine Spannung von 200 V angelegt und das Gel für einen Zeitraum von 40 Minuten elektrophoretisch laufen gelassen. Um die Protein-Banden sichtbar zu machen, wurde das Gel am Ende in eine Coomassie-Blau-Farblösung über Nacht inkubiert.

4.5.2 Western Blot

4.5.2.1 Prinzip:

Das Western Blotting ist ein Analyseverfahren zur sensitiven Detektion und Identifikation von Proteinen. Es ermöglicht den Nachweis spezifischer Proteinmoleküle in Zelllysaten. Dabei werden die Proteine zunächst mittels SDS-PAGE getrennt und auf eine Trägermembran aus Polyvinylidendifluorid (PVDF) oder Nitrozellulose transferiert. Durch Bindung eines spezifischen Antikörpers an das auf die Trägermembran immobilisierte Protein können die gesuchten Proteine identifiziert werden, da nur sie mit dem Antikörper in Wechselwirkung treten. In der Regel wird beim Western Blotting ein primärer Antikörper eingesetzt, der spezifisch an das zu detektierende Protein bindet. Daraufhin wird ein mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) beladener sekundärer Antikörper verwendet, der spezifisch an den primären Antikörper bindet. Unter Einsatz eines bestimmten Substrats dient dieser sekundäre Antikörper zum chemilumineszenten Nachweis der Proteine. Allerdings gibt es auch eine Variante dieser Methode, bei der nur ein primärer Antikörper verwendet wird, der bereits mit HRP konjugiert ist.^{[54][62]}

4.5.2.2 Durchführung:

Zur Proteinseparation wurde zuerst eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt. Während der Proteintrennung mittels SDS-PAGE wurden die erforderlichen Materialien für den Western Blot vorbereitet. Hierbei wurde eine PVDF-Membran markiert und kurz in Methanol inkubiert. Anschließend wurden vier Schwämme und zwei Filterpapiere zusammen mit der Membran in einem Gefäß gefüllt mit Blotting-Puffer für 10 Minuten getränkt. Das SDS-Gel wurde im Anschluss nicht gefärbt, sondern direkt für die weitere Verarbeitung im Rahmen des Western Blot verwendet. Infolgedessen wurde das Gel mit der Membran sowie den Schwämmen und Filterpapieren in der Western-Blot-Kammer zusammengebaut. Daraufhin wurde die Western-Blot-Kammer wieder in die Elektrophorese-Kammer übertragen und mit Blotting-Puffer und Millipore-Wasser aufgefüllt. Es wurde folglich ein elektrisches Feld von 30 V und 300 mA für 90 Minuten angelegt. Zeitgleich wurde der Blocking-Puffer aus Milchpulver und 1x TBS hergestellt. Der Färbepuffer (Staining Buffer) enthielt den Blocking-Puffer mit der Tween 20-Lösung sowie den primären Antikörper, der bereits mit dem Enzym HRP konjugiert war.

4 Methoden

Die Membran wurde nach Abschluss der Elektrophorese in den Blocking-Puffer gegeben, um unspezifische Bindungen zu blockieren, und für 20 Minuten auf einem Rollermixer inkubiert. Danach wurde die Membran in ein Falconröhrchen mit Färbepuffer überführt und für 1 Stunde inkubiert, um spezifische Antikörperbindungen zu erzielen. Die Trägermembran wurde dann mehrmals mit einer Mischung aus 1x-TBS (Tris-gepufferter Salzlösung) und Tween-20 (Detergenz) gewaschen, damit die ungebundenen Antikörper entfernt werden.

Nach Durchführung der Waschschrirte wurde die Membran mit Western-Blot-Detektionsreagenzien behandelt und mit Frischhaltefolie abgedeckt. Zur Visualisierung wurde die Membran in eine Entwicklungskassette mit Verstärkerfolie (Hyperkassette) gelegt und die Kassette für 1 Minute unter einer Lampe belichtet, damit die chemilumineszente Reaktion zwischen den Detektionsreagenzien und den Antikörpern aktiviert werden. Zum Abschluss wurde ein CL-Xposure-Röntgenfilm auf die Membran gelegt. Nach erfolgter Belichtung wurde der Film in einem Entwicklungsautomaten für Röntgenfilme entwickelt.

4.6 Markierung der ATPOS ATP-Sensoren mit einem fluoreszierenden Farbstoff

4.6.1 Prinzip:

Damit die ATPOS ATP-Sensorproteine auf ATP reagieren können, müssen sie an einem freien Cysteinrest in der ATP-Bindedomäne mit dem Farbstoff Cyanin-3 (Cy3) gekoppelt werden. Dieser ist ein roter Farbstoff und weist ein Absorptionsmaximum bei 555 nm sowie ein Emissionsmaximum bei 570 nm auf. Eine spezifische Kopplung von Cy3 an das freie Cystein wird durch Verwendung eines Maleimid-Konjugats des Farbstoffes erreicht, da sich die elektrophilen Maleimiden hochselektiv mit Thiolen wie freie Cysteinreste verbinden.^[63]



4.6.2 Durchführung:

Zu Beginn wurden die nicht mit Maleimid reaktionsfähigen Disulfidbrücken durch Zugabe des reduzierenden Mittels TCEP (Tris (2-carboxyethyl) phosphin-hydrochlorid) reduziert. Hierbei wurde jedem Protein ein 100-facher molarer Überschuss an TCEP in 1,5 mL Eppendorf-Röhrchen zugesetzt (siehe Tab. 24). Nach dem Verdrängen der Luft durch das Inertgas Stickstoff wurden die Röhrchen 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde 1 mg Cy3-Maleimid in 100 µL des Hilfelösungsmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Anschließend wurde die Reaktion der Fluorophor-Lösung mit der Thiol-Lösung durchgeführt, indem jeweils ein 20-facher molaren Überschuss des gelösten Cy3-Maleimids zu den reduzierten Proteinen pipettiert wurde (siehe Tab. 24). Nach einer Zugabe von Stickstoff gefolgt von einer sorgfältigen Mischung wurden die Röhrchen über Nacht bei 4 °C auf einem Rollermixer inkubiert. Die markierten Proteine wurden durch Amicon-Säulen (siehe Abschnitt 4.4.3) aufkonzentriert, wobei unkonjugierte Farbstoffmoleküle entfernt wurden. Zur Überprüfung der Farbstoffkopplung wurde eine Detektion der Proteine mittels eines Fluoreszenz-Mikroskops (IVIS - *In Vivo* Imaging System) durchgeführt (siehe Abb. 24-B).

4.7 Detektion der hergestellten ATPOS ATP-Sensoren

4.7.1 Austestung der Bindungsfähigkeit der ATPOS durch Biolayer-Interferometrie (BLItz)

4.7.1.1 Prinzip:

Die Bindung der ATPOS-Sensoren an Zielproteine wurde durch Bio-Layer-Interferometrie (BLItz-System) überprüft. Dabei führt die Wechselwirkung zwischen zwei Molekülen zu einer Änderung des Brechungsindex an der Oberfläche eines Biosensors (**Streptavidin „Octet® SA-Biosensors_For Kinetics“**), wodurch eine Interaktion zweier Proteine ohne Markierung der Bindungspartner nachgewiesen werden kann. Dies ermöglicht eine Echtzeit-Analyse der Bindungskinetik der ATP-Sensoren, erfordert jedoch hohe Proteinkonzentrationen.^{[64][65]}

Durch Verwendung eines biotinylierten Antikörpers (Anti Human CD19 Mouse IgG1/Kappa) als Substrat konnte die Bindung der ATP-Sensoren, welche den gegen die Maus Kappa-Kette gerichteten Nanobody TP1170 als Fusionsprotein enthielten, an ihre Bindungspartner getestet werden. Ebenfalls konnten die ATP-Sensoren, die das Streptavidin-bindende Peptid (SBP) enthielten, auf ihre Bindung mit den SA-Biosensoren getestet werden.

4.7.1.2 Durchführung:

Die Bindungsaffinität des Nanobodys TP1170 mit der Kappa-Kette eines Maus-Antikörpers wurde durch die Verwendung des IgG1-Antikörpers überprüft. Vor Beginn des Experiments wurden die ATP-Sensoren entsprechend ihrer Konzentration mit Kinetik-Puffer (PBS mit 0,01 % BSA, 0,002 % Tween20) verdünnt. Die spezifischen Streptavidin-Biosensoren des BLItz-Geräts wurden in einer Mikrotiterplatte mit 200 µL Kinetik-Puffer platziert, um die Schutzschicht aus Zucker zu entfernen und den Biosensor für die Verwendung bereitzustellen. Danach wurden spezifische Probenplatten, die für die Messungen verwendet wurden, mit 20 µL HCl und 20 µL Kinetik Puffer gewaschen.

4 Methoden

Nachdem der Streptavidin-Biosensor im Gerät platziert wurde, wurde die Messung durch Zugabe von 250 μL des Kinetik-Puffers initiiert, gefolgt von einer 30-sekündigen Konditionierung des Geräts, um eine erste Grundlinie zu etablieren („Initial Baseline“). Daraufhin wurden 4 μL des IgG1-Antikörpers in eine Probenplatte pipettiert und für 60 Sekunden gemessen (Loading). Nach einer erneuten Konditionierung des Geräts mit dem Kinetik-Puffer für 30 Sekunden (Baseline), wurden 4 μL des zu untersuchenden ATPOS-TP1170 Fusionsproteins in eine Probenplatte pipettiert und für 60 Sekunden gemessen (Association). Zum Abschluss wurde das Gerät für 120 Sekunden erneut mit dem Puffer konditioniert (Dissociation).

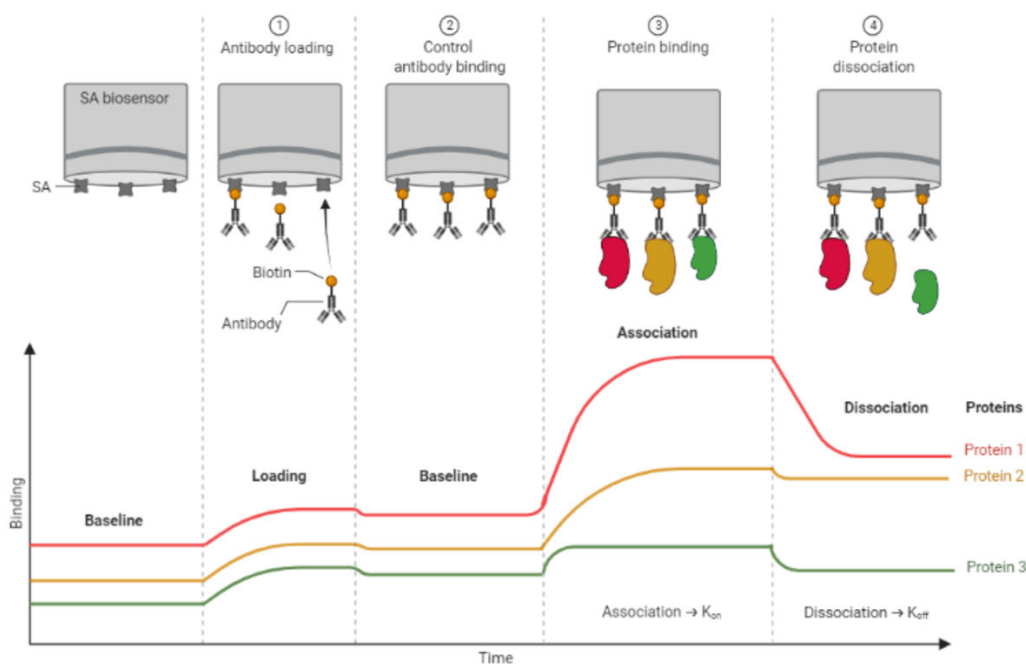


Abbildung 11: Prinzip der Bio-Layer-Interferometrie. Die initiale Baseline wird mit dem Biosensor im Kinetik-Puffer nachgewiesen. (1) Auf den SA-beschichteten Biosensor wird der biotinylierte IgG1 Antikörper geladen und (2) zur Bindungskontrolle mit Kinetik-Puffer gewaschen. (3) Die Proteinprobe (ATPOS) wird geladen, und die Assoziation findet statt (K_{on}). Dabei bindet der Nanobody an den Antikörper IgG1. (4) Der Biosensor wird erneut mit Kinetik Puffer gewaschen, um die Dissoziation des Nanobody zu überwachen (K_{off}). Die drei Proteine sind Beispiele für verschiedene Bindungskinetiken. Bearbeitet aus "Biolayer Interferometry", von *BioRender.com* (2021).^[49]

Die Untersuchung der Streptavidin-Bindungsfähigkeit des Streptavidin-bindenden Peptids der ATPOS_SBP-Variante erfolgte durch dieselben Schritte wie zuvor beschrieben. Allerdings wurde kein Antikörper (IgG1) während des Loading-Schritts zugegeben, stattdessen wurde der ATP-Sensor direkt geladen, gefolgt von einer erneuten Konditionierung während des Assoziation-Schritts, um die Dissoziation zu kontrollieren.

4.7.2 Durchflusszytometrie

4.7.2.1 Prinzip:

Das Durchflusszytometer (*fluorescence activated cell sorter*, FACS) ermöglicht die präzise Messung und Charakterisierung von Einzelpartikeln oder Partikelpopulationen in einer heterogenen Suspension. Die Methode basiert auf der Unterscheidung von Partikeln (z.B. Zellen oder Mikrobeads) anhand ihrer Größe und Struktur durch Lichtstreuung sowie ihres Fluoreszenzsignals, das durch spezifische Oberflächen- oder intrazelluläre Marker mit Hilfe von monochromatischer Laserstrahlung hervorgerufen wird. Das Durchflusszytometer besteht aus einem optischen System und einem Flüssigkeitssystem. Dabei werden die Partikel durch einen hydrodynamischen Hüllstrom fokussiert und über Kapillaren in die Messküvette geleitet, wo sie einzeln einen Laserstrahl passieren und gemessen werden.^[66]

Durch die Messung des Vorwärtsstreulichts (*Forward scatter* FSC) im Flachwinkel zum Laser wird die relative Größe der Partikel bestimmt (siehe Abb. 12-A). Außerdem ermöglicht die Detektion des Seitwärtsstreulichts (*Side scatter* SSC) im 90°-Winkel die Erfassung der Granularität der Partikel (siehe Abb. 12-A). Dies ermöglicht die Aufteilung spezifischer Partikelgemische in separate Populationen aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften wie Größe und Granularität.^[66]

Die Bindung von Fluoreszenz-markierten monoklonalen Antikörpern an Partikel (z.B. Intrazelluläre- und Oberflächenmarker) ermöglicht eine zusätzliche Charakterisierung dieser Partikel. Hierbei werden diese durch den Laserstrahl angeregt (Anregungswellenlänge), wodurch die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffs in ein höheres Energieniveau gehoben werden (Absorption). Wenn die Elektronen in den Grundzustand zurückkehren, wird Licht einer spezifischen Wellenlänge ausgesendet (Emission). Dieses Licht wird nach dem Durchgang durch Filter und Spiegeln gemeinsam mit der Partikelgröße und -granularität von den Photomultiplerröhren (PMTs) erfasst und vom Computer (CPU) analysiert (siehe Abb. 12-A).^[66]

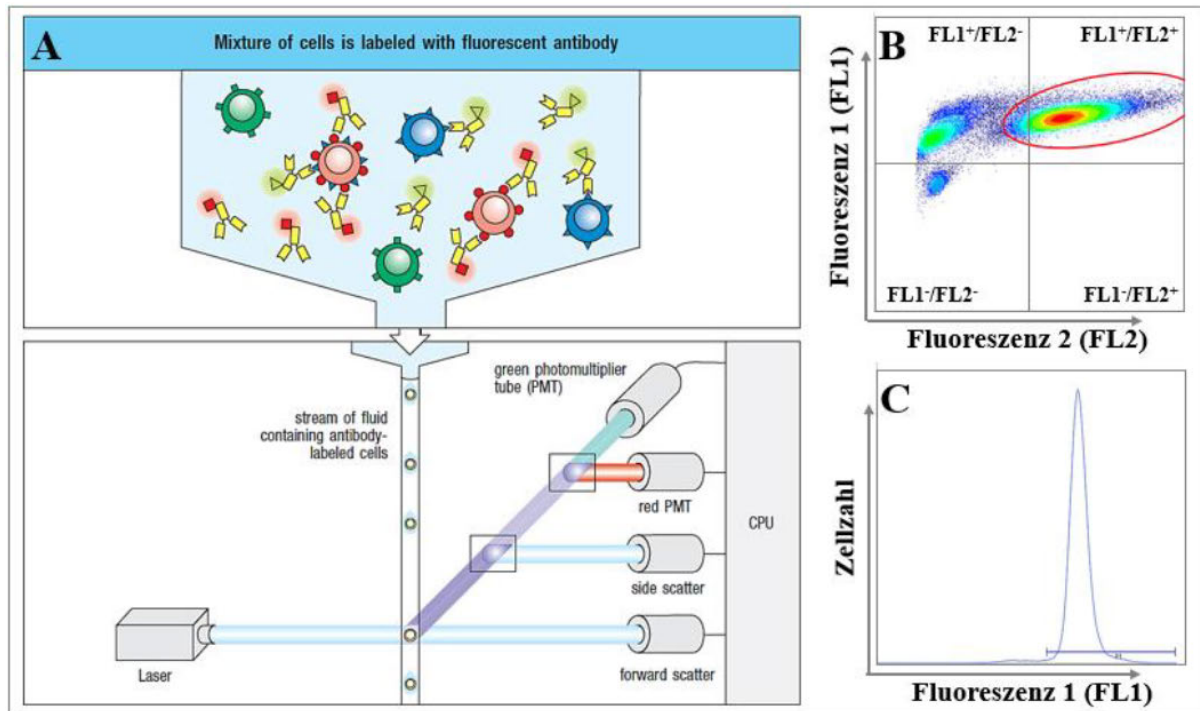


Abbildung 12: Schematische Darstellung des FACS-Messprinzips und Datenanalyse. In (A) wird das Messprinzip eines Durchflusszytometers in schematischer Form dargestellt. Hierbei werden Partikel, welche mit fluoreszierenden Antikörpern gekoppelt sind, durch einen Hüllstrom in Kapillaren geleitet und einzeln am Laser mit einer bestimmten Wellenlänge vorbeigeführt. Die Lichtstreuung, Granularität (SSC), Partikelgröße (FSC) sowie Emissionen der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe werden durch die *photomultiplier tubes* (PMTs) erfasst. Diese Daten werden durch Filter geleitet und anschließend in einer CPU verarbeitet. Nach der Analyse einer spezifischen Anzahl von Partikeln können die Eigenschaften und die Fluoreszenzintensität (Expressionsgrad) verschiedener Moleküle mithilfe von Gates (B) in Populationen klassifiziert werden. Diese Daten können in Form von *Plots*, *Dot-Plots* (B) oder Histogrammen (C) visualisiert werden. Ein *Dot-Plot* bietet die Möglichkeit, zwei Signale gleichzeitig darzustellen, während ein Histogramm die Verteilung der Partikelzahl in Abhängigkeit von der Fluoreszenzintensität für ein einzelnes Signal anzeigt (modifiziert nach Murphy et al, 2017).^[66]

Fluoreszenzfarbstoffe haben individuelle Absorptions- und Emissionsspektren, die im Durchflusszytometer zur Unterscheidung der Partikel genutzt werden. Zu den gebräuchlichen Fluoreszenzfarbstoffen gehören Phycoerythrin (PE) und Fluorescein Isothiocyanat (FITC) mit einem Emissionsmaximum bei 660 nm bzw. 530 nm. Die von den angeregten Fluoreszenzfarbstoffen ausgestrahlte Emission wird vom Detektor erfasst, wodurch die Partikel erkannt werden können. Die detektierten Partikel können entweder in einem *Dot-Plot*-Diagramm mit zwei Signalen als Punkte dargestellt werden (siehe Abb. 12-B) oder als Histogramm, das die Anzahl der Partikel gegen die Fluoreszenzintensität aufzeigt (siehe Abb. 12-C).^[66]

4.7.2.2 Kopplung der ATPOS-Sensoren an Streptavidin beschichtete Beads (Perlen) und Analyse ihrer Bindung mit dem Durchflusszytometer (FACS)

Durch Verwendung von Streptavidin-beschichteten Beads wurde die Bindung zwischen ATP-Sensoren, die das Streptavidin-bindende Peptid (SBP) enthielten, und ihrem Bindungspartner (Streptavidin) untersucht. Verwendet wurden Beads der Firma PolyAn, die entweder grün fluoreszierend oder transparent waren (**PolyAn Green 100** sowie **Transparente Beads**). Dazu wurden jeweils 5 μL der Beads in 195 μL 1x PBS -/- aufgenommen und für 3 Minuten bei 13,300 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfung des Überstands wurden die Beads durch Vortexen resuspendiert und erneut mit 200 μL PBS gewaschen, zentrifugiert und der Überstand wurde entfernt. Danach wurden die Beads (Grüne und Transparente) in 100 μL PBS resuspendiert und auf zwei 1,5 mL Eppendorf-Röhrchen aufgeteilt. Im Anschluss wurden jeweils 10 μL ATPOS zu den Beads hinzugegeben und die Röhrchen bei 4 °C inkubiert. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit wurden die Beads mit 200 μL PBS gewaschen, gefolgt von einem langsamen Schütteln und einer 3-minütigen Zentrifugation. Der Überstand wurde verworfen und die Beads wurden in 100 μL PBS resuspendiert. Schließlich wurden die Beads mit Hilfe des FACS untersucht, dabei wurden die mit den Beads gekoppelten ATP-Sensoren nachgewiesen (siehe Abb. 28 und 29). Zusätzlich wurden die Beads mittels eines Fluoreszenz-Mikroskops (EVOS - Zellbildungssystem) untersucht (siehe Abb. 30).

4.7.3 Untersuchung der Bindung der ATPOS ATP-Sensoren mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Leica TCS SP8X „DMi8“)

Zum Schluss wurden alle hergestellten ATP-Sensoren auf ihre Aktivität mittels Fluoreszenzmikroskopie getestet und ihre Affinität für ATP untersucht. Hierbei wurden die verschiedenen ATPOS ATP-Sensoren an ihre jeweiligen spezifischen Bindungspartner gekoppelt. Die ATP-Sensoren, welche den gegen die Maus Kappa-Kette gerichteten Nanobody TP1170 als Fusionsprotein enthielten, wurden mit fluoreszierenden Antikörpern (**BV421 Maus-anti-human CD4** bzw. **FITC Maus-anti-human CD45RA**) gekoppelt. Hingegen wurden die ATPOS Sensoren, die das Streptavidin-bindende Peptid (SBP) enthielten, mit Streptavidin (**Briliant Violet 421** bzw. **FITC - 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$**) gekoppelt, welches wiederum an das Biotin eines biotinylierten Antikörpers (**Biotin Anti-Human CD45 - 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$**) binden konnte.

CD4+ Zellen aus PBMC-Zellen (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) sowie die humane T-Zelllinie **Jurkat** wurden in diesem Experiment als Zielzellen verwendet, an deren Oberfläche die biotinylierten Antikörper binden sollten. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen nach Bindung der ATPOS ATP-Sensoren vor und nach ATP-Zugabe untersucht. Die verwendeten Fluorochrome weisen unterschiedliche Absorptionsmaxima auf, und wurden mithilfe von Lasern unterschiedlicher Wellenlängen (488 nm für FITC, 555 nm für PE „Cy3“ und 421 nm für BV421) angeregt. Daher wurde die Farbe Grün für FITC, die Farbe Rot für PE und die Farbe Blau für BV421 zugewiesen, wenn sie unter dem Mikroskop betrachtet wurden.

4.7.3.1 Zellen Aufteilen und Aufreinigung

- **Jurkat Zellen:**

Die Jurkat Zellen wurden zu Beginn mit 1x PBS -/- im Verhältnis von 1:10 aufgeteilt und bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert. Danach wurden sie bei 1300 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert und in 1 mL PBS resuspendiert.

- **CD4+ Zellen:**

Zur Gewinnung der CD4+ Zellen wurden sie aus PBMC-Zellen ohne Monozyten mithilfe des **CD4+ T Cell Isolation Kits** (Miltenyi Biotec) isoliert. Hierzu wurde 2 mL PBMC-Zellen in FACS-Röhrchen mit 18 mL MACS-Puffer gelöst und bei 1300 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Röhrchen wurden durch Ziehen über ein Gitter resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in 160 µL MACS-Puffer resuspendiert und mit 40 µL eines **CD4+ T Cell Biotin-Antibody Cocktail** gründlich vermischt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei 4 °C wurden die Zellen erneut mit 120 µL Puffer gelöst.

Daraufhin wurden 80 µL eines **CD4+ T Cell MicroBead Cocktails** zu den Zellen hinzugegeben, geschüttelt und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Zur Äquilibration einer LS-Säule aus dem Kit wurden 3 mL MACS-Puffer eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen auf die Säule geladen und die CD4+ Zellen im Durchfluss gesammelt. Nach einer Zentrifugation bei 4 °C und 1300 rpm für 5 min wurde der Überstand entfernt und die Zellen in 1 mL 1x PBS -/- aufgenommen.

4.7.3.2 Zellzahlbestimmung

Zur Zellquantifizierung wurde die Neubauer Zählkammer verwendet. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:10 in 0,5 mL Eppendorf-Röhrchen mit der Trypan Blau Farbe verdünnt und gevortext. Diese Farbe dient der Erkennung toter Zellen, da sie durch die aufgeschlossene Zellmembran diffundieren und die Zellen färben kann. Ein Deckglas wurde dann auf der Neubauer Zählkammer befestigt, und 10 μL der verdünnten Zellen wurden zwischen das Deckglas und die Zählkammer pipettiert. Abschließend wurden die Zellen unter einem Lichtmikroskop mit 40x-Vergrößerung gezählt, indem die Zellen in einem der vier großen Felder gezählt wurden (siehe Abb. 13).

Berechnung der Zellkonzentration:

Zellen in einem Milliliter = Zellzahl $\cdot 10^4$ (Kammer Faktor) $\cdot 10$ (Verdünnungsfaktor)

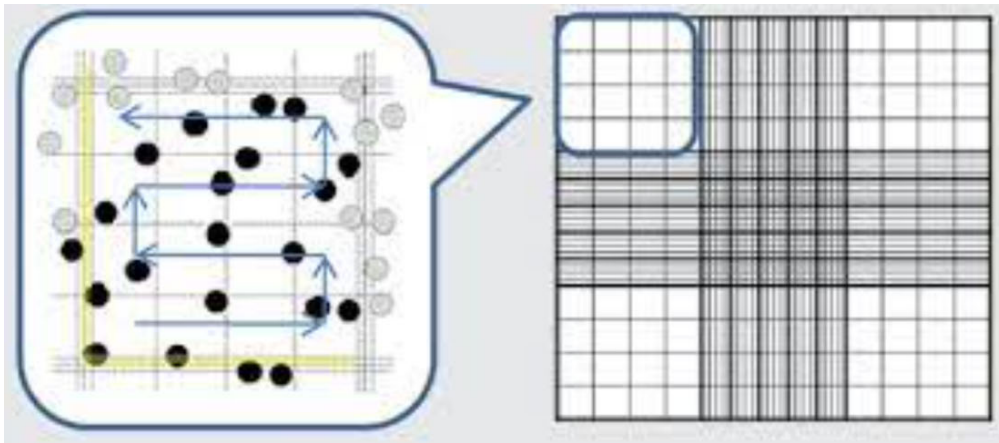


Abbildung 13: Schema der Zellzahlbestimmung. Die Zellen werden in einem der vier großen Felder betrachtet (blau markiert), wobei nur diejenigen Zellen gezählt werden, die ungefärbt sind (lebende) und sich genau innerhalb der 16 kleinen Quadrate befinden.^[67]

- **CD4+ Zellen:**

Zellen in einem Milliliter = $17 \cdot 10^5 = 1700000$ Zellen/mL

$$\text{Volumen für } 1 \text{ M Zellen in } 100 \mu\text{L} = \frac{100 \mu\text{L} \cdot 1700000 \text{ Zellen}}{1000000 \text{ Zellen}} \approx 170 \mu\text{L}$$

- **Jurkat Zellen:**

Zellen in einem Milliliter = $37 \cdot 10^5 = 3700000$ Zellen/mL

$$\text{Volumen für } 1 \text{ M Zellen in } 100 \mu\text{L} = \frac{100 \mu\text{L} \cdot 3700000 \text{ Zellen}}{1000000 \text{ Zellen}} \approx 370 \mu\text{L}$$

4.7.3.3 Kopplung der ATPOS ATP-Sensoren mit den Antikörpern an die Zellen

Zur Untersuchung der Zellen unter dem Mikroskop wurde eine **15 μ -Slide 8 Wellplatte** mit 200 μ L Poly-L-Lysin 0,1 W/V Lösung beschichtet, um sicherzustellen, dass die Zellen während der Untersuchung auf dem Boden der Platte haften bleiben und sich nicht bewegen. Die Platte wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, danach wurde die Lysin-Lösung entfernt und die Platte wurde zum Trocknen belassen. In der Zwischenzeit wurden die CD4⁺ Zellen in 170 μ L und die Jurkat Zellen in 370 μ L resuspendiert, um eine Zellkonzentration von etwa 1 Million Zellen pro 100 μ L zu erzielen.

- **CD4⁺ Zellen:**

Die Zellen wurden anschließend in zwei FACS-Röhrchen aufgeteilt. In einem Röhrchen wurden 3 μ L **Biotin anti-human CD45** und in dem anderen wurden 3 μ L **BV421 Maus-anti-human CD4 Antikörper** zugegeben. Zu den Zellen, die Biotin CD45 enthielten, wurden 2 μ L **Briliant Violet 421 Streptavidin** hinzugefügt. Darauffolgend erfolgte die Kopplung der ATPOS ATP-Sensoren an die Zellen, indem 10 μ L der ATP-Sensoren, die den Nanobody TP1170 enthielten, zu den Zellen mit dem CD4 Antikörper pipettiert wurden und ebenfalls 10 μ L der ATP-Sensor, die das Streptavidin-bindende Peptid (SBP) enthielten, zu den Zellen mit dem BV421 Streptavidin pipettiert wurden.

Nach jeder Zugabe fand eine Inkubation der Zellen in einem dunkeln Raum für 20 min statt, gefolgt von einem Waschschrift mit 2 mL PBS und einer Zentrifugation für 5 min bei 1300 rpm. Letztendlich wurden 20 μ L der mit den Sensoren gekoppelten Zellen in die Wellplatte pipettiert. Vor der Untersuchung wurden 170 μ L PBS in die *Wells* pipettiert sowie 20 μ L 250 μ M ATP zum Detektieren unter dem Mikroskop zugegeben.

- **Jurkat Zellen:**

Die Kopplung an Jurkat Zellen wurde analog zur Kopplung an CD4⁺ Zellen durchgeführt. Allerdings kamen in diesem Fall **FITC-anti-human CD45RA** und **FITC-Straptavidin** zum Einsatz anstelle der zuvor verwendeten Antikörper.

5 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf Varianten des ATPOS ATP-Sensors hergestellt, die auf ihre Fähigkeit, an Zelloberflächen zu binden und ihre Reaktivität auf ATP untersucht wurden. Dabei wurden die ATP-Sensoren kloniert, synthetisiert und aufgereinigt. Die Expression aller ATPOS ATP-Sensoren wurde teilweise in *Escherichia coli* (*E.coli*) Bakterienzellen oder in menschlichen *HEK*-Zellen durchgeführt. Zwei Varianten der ATP-Sensoren, nämlich **pH14N8_TP1170_alfa_ATPOS** und **pH14N8_ATPOS_alfa_SBP**, wurden in *E.coli* produziert, während die anderen ATPOS-Varianten, **pCSE2.5_TP1170_alfa_ATPOS**, **pCSE2.5_ATPOS-alfa_SBP** sowie **pCSE2.5_ATPOS_Sortase** in *HEK*-Zellen produziert wurden. Demnach durchliefen sie einen mehrstufigen Reinigungsprozess und wurden bei den einzelnen Schritten mittels SDS-PAGE sowie Western Blot nachgewiesen. Schlussendlich wurden die Sensoren mit dem Farbstoff Cy3-Maleimid markiert und ihre Aktivität mittels verschiedener Detektorsysteme untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse und Beobachtungen der einzelnen Arbeitsschritte dargestellt.

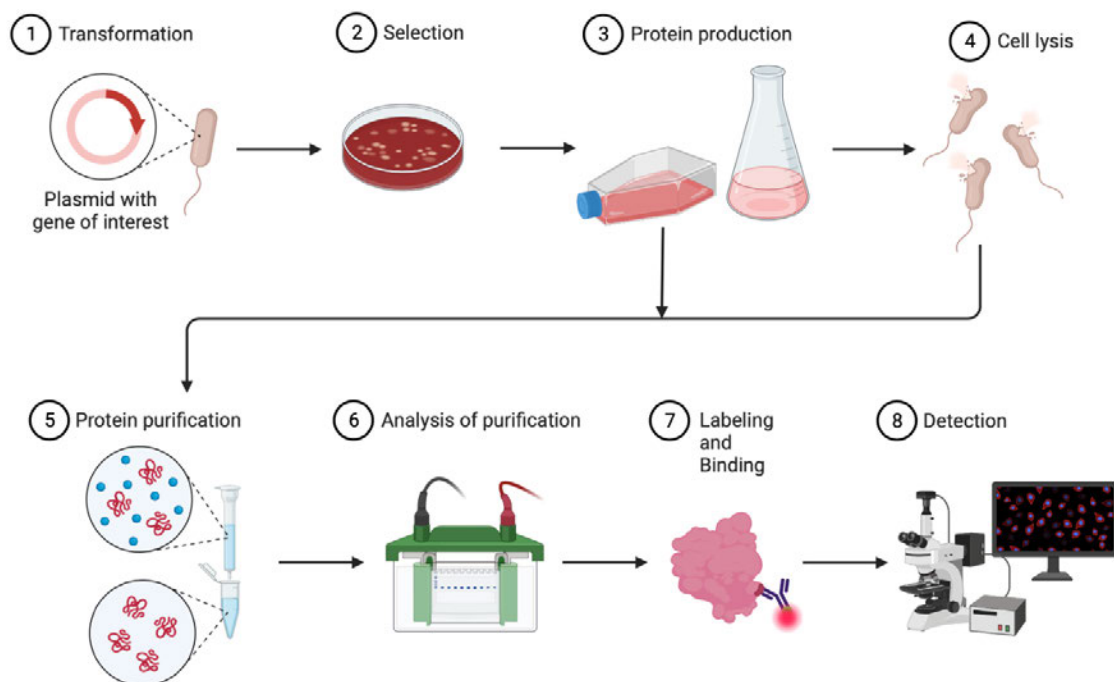


Abbildung 14: Arbeitsablauf für die Klonierung, Expression, Aufreinigung und ATP-Bindungsexperimente der ATPOS ATP-Sensoren. (1) Die DNA-Plasmide der ATP-Sensoren wurden in ein bakterielles Vektorplasmid eingefügt und in *E.coli* XL 1-Blue Zellen eingeführt. (2) Die transformierten Bakterien wurden auf Agarplatten mit verschiedenen Antibiotika ausplattiert, und einzelne Kolonien wurden für die Expression ausgewählt. (3) Für die in *E.coli* BL21-Zellen hergestellten Proteine wurde eine Hauptkultur angeimpft und mehrere Stunden bebrütet, bevor die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG gestartet wurde. Die in *HEK*-Zellen produzierten Proteine wurden nach der Isolierung der Plasmide in *HEK*-Zelllinie transfiziert und unmittelbar aufgereinigt. Die *E.coli* Zellen wurden geerntet und (4) mit Lysispuffer lysiert. (5) Die Zielproteine wurde durch Affinitätschromatographie (NiNTA) sowie durch ALFA Selector Matrix aufgereinigt. Der 14xHis/Nedd8-Tag wurde durch die NEDP1-Protease abgespalten. (6) Der Erfolg der Aufreinigung wurde

5 Ergebnisse

mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. (7) Die Proteine wurden mit Cy3 markiert und mit Antikörpern an Zellen bzw. Streptavidin-Beads konjugiert. (8) Die gekoppelten Sensoren wurden schließlich durch FACS und Mikroskopen getestet. Bearbeitet aus "Protein Overexpression and Purification from Bacteria", von BioRender.com (2023).^[10]

5.1 Klonierung der rekombinanten DNA-Plasmide

5.1.1 Verdau durch Restriktionsenzyme

Unter Berücksichtigung der erforderlichen Menge von 3 µg für die Verdauung sowie der Konzentration des Vektors wurde das notwendige Volumen des Vektors für die Verdauung berechnet (siehe Tab. 17).

Tabelle 17: Die Konzentrationen und Volumina der verdauten Vektoren während des Klonierungsprozesses.

Verwendete Vektor-Plasmid	Konzentration in ng/µL	Menge _{DNA} in µg	V _{Vektor} in µL
pH14N8_myc_alfa_ATPOS	441	3	6,80 *
pH14N8_TP1170_alfa_ATPOS	166	3	18,08
pCSE2.5_s+16dim (dimer)_Anti ART2.2_rbFc“	1000	3	3,00

***Rechenbeispiel:**

$$V_{\text{Vektor}} = \frac{\text{DNA Menge in } \mu\text{g}}{\text{Konzentration des Vektors in } \mu\text{g}/\mu\text{L}}$$

$$V_{\text{Vektor}} = \frac{3 \mu\text{g}}{0,44 \mu\text{g}/\mu\text{L}} = 6,80 \mu\text{L}$$

5 Ergebnisse

5.1.2 Agarose Gel-Elektrophorese

Zur Erkennung der Plasmide wurden die geschnittenen Plasmide in einem Agarose-Gel aufgetrennt und mittels eines Vision-Capt-Programms und UV-Licht untersucht. Dabei wurde das Gel sowohl vor als auch nach dem Schneiden der Vektor-Banden dargestellt.

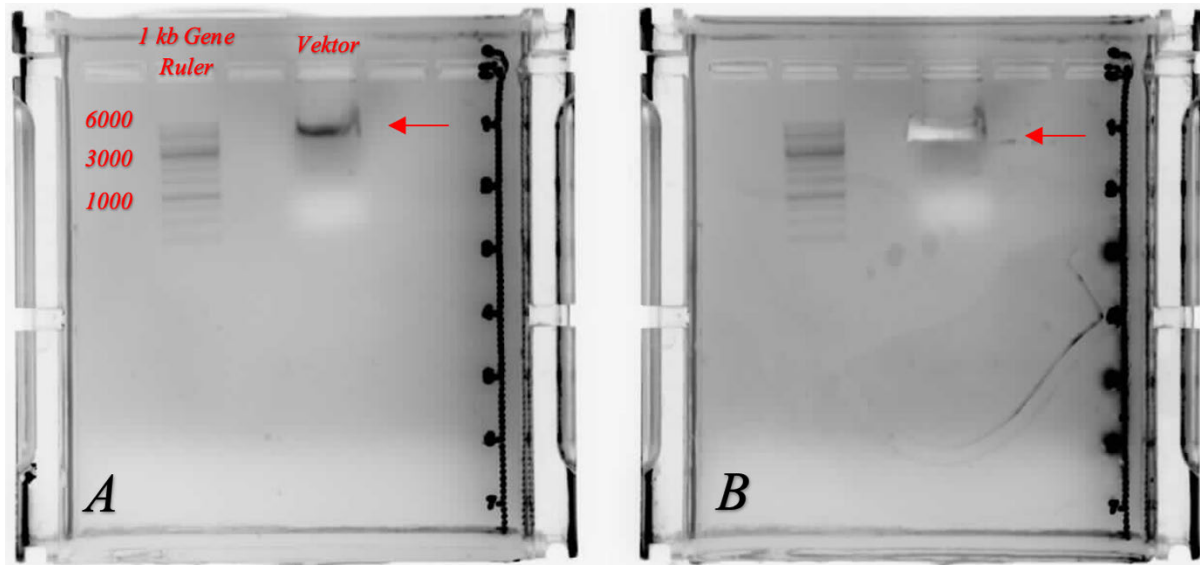


Abbildung 15: Agarose Gel des Vektors pH14N8_myc_alfa_ATPOS. In (A) wird das Agarose-Gel vor dem Schneiden der Bande dargestellt. Der Vektor hat eine erwartete Größe von 4682 bp. Während der Elektrophorese wurde das myc_Alfa-Tag-Fragment aus dem Vektor ausgeschnitten und das TP1170_Alfa- DNA-Fragment zur Ligation eingeführt. (B) zeigt das Gel nach dem Schneiden der Bande.

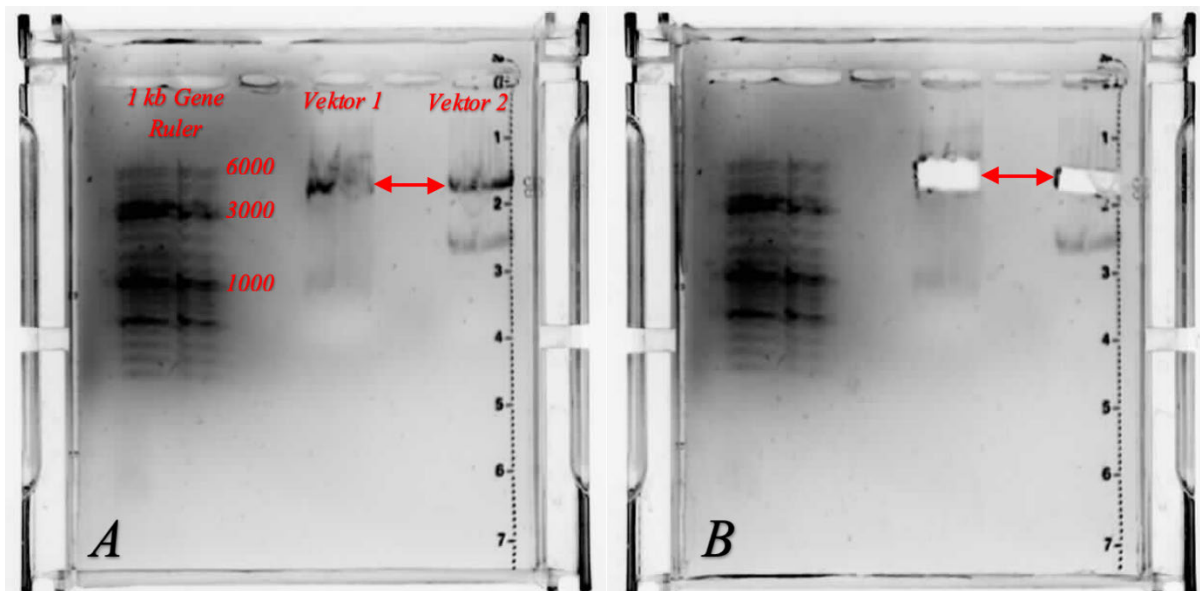


Abbildung 16: Agarose Gel für zwei Vektor-Plasmide. In (A) wird das Agarose-Gel vor dem Schneiden der Bande gezeigt. Vektor 1 (pH14N8_TP1170_alfa_ATPOS) und Vektor 2 (pCSE2.5_s+16dim) wurden bei einer Größe von ungefähr 4500 bp nachgewiesen. Während der Elektrophorese wurde das TP1170_alfa_myc_Alfa-Tag-Fragment aus Vektor 1 und das s+16 dimer_rbFc-Fragment aus Vektor 2 ausgeschnitten. (B) Stellt das Gel nach dem Schneiden der Bande dar.

5 Ergebnisse

5.1.3 Ligation

Die Konzentrationen der Plasmide wurden mittels Spektralphotometrie gemessen. Zur Durchführung der Ligation wurden die benötigten Volumina für die Ligase-Reaktion anhand der gemessenen Konzentrationen berechnet (siehe Tab. 18).

Tabelle 18: Die Konzentrationen und Volumina der bei der Klonierung ligierten DNA-Fragmente und Plasmide.

Insert-DNA-Fragment	Konzentration in ng/μL	Ligation-Vektor	Konzentration in ng/μL	Restriktions-Enzyme	V_{Insert} in μL*	V_{Vektor} in μL
TP1170_alfa	58,60	PH14N8_myc_alfa_ATPOS	19,80	Not I – Nco I	0,47 ≈ 1	5,10
ATPOS_SBP_E.coli	20,05	pH14N8_TP1170_alfa_ATPOS	16,30	Hind III – Kas I	2,26	6,13
ATPOS_15GS_alfa_SBP_HEK	15,55	pCSE2.5_s+16dim_Anti ART2.2_rbFc #FS-439	303,70	Xba I – Nco I	4,40	0,70
TP1170_alfa_ATPOS	31,95		22,60		3,64	4,42
ATPOS_sortase mAktih	21,45		22,60		2,90	4,42

*Rechenbeispiel:

$$V_{Vektor} = \frac{m_{Vektor}}{\beta_{Vektor}} = \frac{100 \text{ ng}}{19,8 \text{ ng}/\mu\text{L}} = 5,10 \mu\text{L}$$

$$\frac{size_{Insert}}{size_{Vektor}} = \frac{NotI-NcoI}{(Vektor-(NotI-NcoI))} = \frac{437 \text{ bp} \quad 5 \text{ bp}}{(4766 \text{ bp} \quad (568 \text{ bp} \quad 484 \text{ bp}))} = \frac{432 \text{ bp}}{(4766 \text{ bp} \quad 84 \text{ bp})} = \frac{432 \text{ bp}}{4682 \text{ bp}}$$

$$m_{Insert} = \left(\frac{size_{Insert}}{size_{Vektor}} \right) \cdot m_{Vektor} \cdot \text{Ligationsverhältnis (1:3)}$$

$$m_{Insert} = \frac{432 \text{ bp}}{4682 \text{ bp}} \cdot 100 \text{ ng} \cdot 3 = 27,68 \text{ ng}$$

$$V_{Insert} = \frac{m_{Insert}}{\beta_{Insert}} = \frac{27,68 \text{ ng}}{58,6 \text{ ng}/\mu\text{L}} = 0,47 \mu\text{L} \approx 1 \mu\text{L}$$

5 Ergebnisse

5.1.4 Sequenzierung der rekombinanten DNA-Plasmide

Um die Sequenzierung durchführen zu können, wurden die benötigten Volumina basierend auf den Plasmidkonzentrationen berechnet (siehe Tab. 19).

Tabelle 19: Die gemessenen Konzentrationen der mittels Miniprep Kit isolierten Plasmide und die darauf basierend berechneten Volumina für die Sequenzierung.

Sample ID	Konzentration in ng/ μ L	V_{DNA} in μ L *	V_{Wasser} in μ L
pH14N8_TP1170_alfa_ATPOS_ <i>E.coli</i>	145,80	6,86	8,00
pCSE2.5_TP1170_alfa_ATPOS_ <i>HEK</i>	187,45	5,33	9,67
pH14N8_ATPOS_alfa_SBP_ <i>E.coli</i>	123,55	8,09	6,91
pCSE2.5_ATPOS_alfa_SBP_ <i>HEK</i>	912,60	1,10	13,90
pCSE2.5_ATPOS_Sortase_ <i>HEK</i>	220,95	4,53	10,47

*Berechnung siehe Formel unter Abschnitt 4.2.3.2

5.2 Herstellung der rekombinanten Proteine

5.2.1 Transformation der rekombinanten Proteine in *E.coli* BL21-Zellen und die Kultivierung der Zellen

Nach der Sequenzierung wurden die passenden Plasmide in *E.coli* produziert. Zur Vorbereitung der Zellkulturen wurden die optischen Dichten mittels eines Photometers während der Produktion gemessen und dementsprechend wurden die erforderlichen Volumina für die Hauptkultur berechnet (siehe Tab. 20).

Tabelle 20: Die gemessenen optischen Dichten und die berechneten Volumina für die Zellkulturen.

Kultur	Verdünnte OD_{600} (1:5)	Hochgerechnete OD_{600} *	Volumen für Hauptkultur **
pH14N8_TP1170_alfa_ATPOS_ <i>E.coli</i>	0,70	3,5	5,71 mL \approx 6 mL
pH14N8_ATPOS_alfa_SBP_ <i>E.coli</i>	0,66	3,3	6,06 mL \approx 6 mL

* Hochrechnen= $OD_{600} \cdot 5$

** Berechnung siehe Formel unter Abschnitt 4.3.1.2

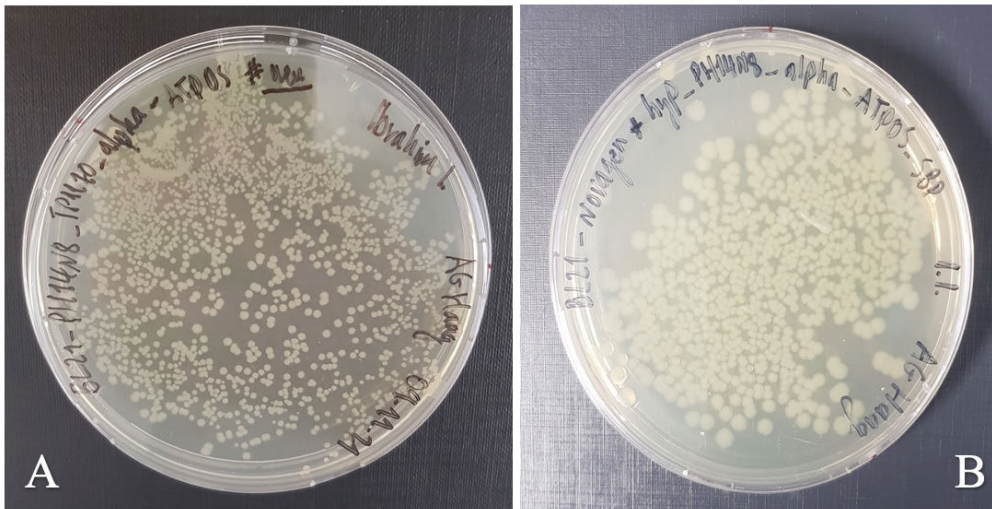


Abbildung 17: Eine Kanamycin-haltige Agarplatte. Ausplattiert einer BL21 *E.coli*-Kultur mit dem klonierten Plasmid nach der Sequenzierung. (A) Für pH14N8_TP1170_alfa_ATPOS_*E.coli* und (B) Für pH14N8_ATPOS_alfa_SBP_*E.coli*.

5.2.2 Lyse der Bakterienzellen

Nach der Herstellung der rekombinanten Proteine wurde das Pellet der *E.coli*-Zellkultur gewogen und das benötigte Volumen des Lyse-Puffers wurde berechnet, wobei ein Verhältnis von 5 mL pro 1 g Pellet zugrunde gelegt wurde (siehe Tab. 21).

Tabelle 21: Das Gewicht des Pellets der Zellkultur und das berechnete Puffer-Volumen.

Pellet der <i>E.coli</i> -Zellkultur	Einwaage in g	Puffer Volumen in mL
pH14N8_TP1170_alfa_ATPOS	2,03	10,15
pH14N8_ATPOS_alfa_SBP	1,96	9,80

5 Ergebnisse

5.2.3 Transfektion der rekombinanten Plasmide in die *HEK-Zelllinie HEK-293 6E*

Für die Herstellung der Proteine in *HEK-Zellen* wurden die Volumina der DNA-Mischung zur Transfektion in den Zellen anhand der Konzentration der DNA-Plasmide berechnet (siehe Tabelle 22).

Tabelle 22: Die gemessenen Konzentrationen der mittels Maxi Kit isolierten Plasmide und die berechneten Volumina für die Transfektion.

DNA-Plasmid	Konzentration in ng/ μ L	DNA in μ L	Wasservolumen in μ L	300 mM NaCl in μ L
pCSE2.5_ATPOS_alfa_TP1170	5482,85	3,7	746,3	750
pCSE2.5_ATPOS_alfa_SBP	5219,50	4,0	746,0	750
pCSE2.5_ATPOS_Sortase	4330,05	4,7	745,3	750

** Berechnung siehe Formel unter Abschnitt 4.3.2.1

Die drei Proteine besitzen unterschiedliche Größen, die auf einem SDS-Gel sichtbar sind. Das ATPOS_alfa_TP1170_HEK Protein zeigt schwach konzentrierte Banden bei einer Größe von ungefähr 30 kDa, da das Protein selbst eine Größe von 33,2 kDa aufweist (siehe Abb. 18). Im Gegensatz dazu scheint die Herstellung der Varianten ATPOS_alfa_SBP_HEK und ATPOS_Sortase_HEK erfolgreicher zu sein. Das ATPOS_Sortase Protein hat eine Größe von 18,4 kDa und ist somit bei etwa 19 kDa gut sichtbar. Das ATPOS_alfa_SBP hingegen zeigt eine noch bessere Herstellung mit stärker konzentrierten Banden bei einer Größe von etwa 25 kDa, da das Protein selbst eine Größe von 24,5 kDa besitzt.

5 Ergebnisse

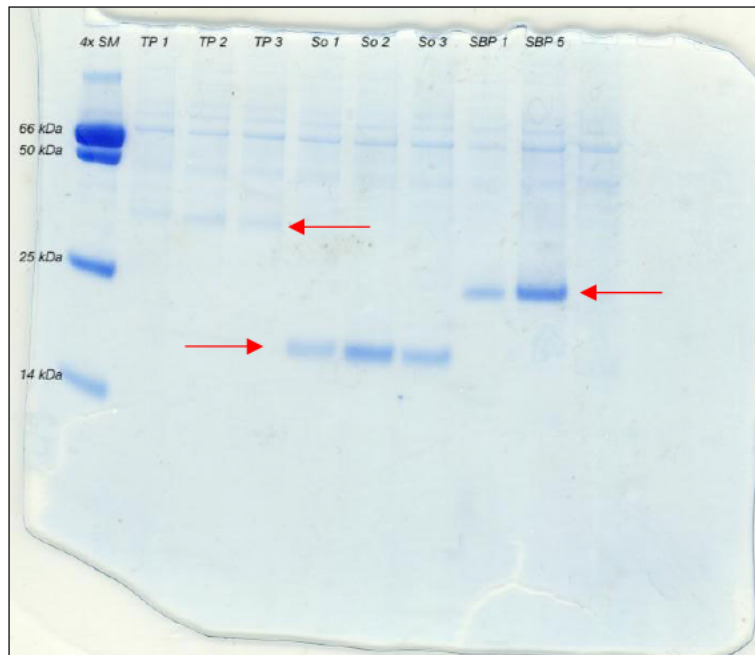


Abbildung 18: SDS-PAGE für die Proteinexpression der klonierten DNA-Konstrukte in *HEK*-Zellen. Auftragung auf ein 12%igen Agarosegel bei 200 V für 40 min. 1. Probe: 4x Supermarker/ 2. Probe: ATPOS_alfa_TP1170_1/ 3. Probe: ATPOS_alfa_TP1170_2/ 4. Probe: ATPOS_alfa_TP1170_3/ 5. Probe: ATPOS_Sortase_1/ 6. Probe: ATPOS_Sortase_2/ 7. Probe: ATPOS_Sortase_3/ 8. Probe: ATPOS_alfa_SBP_1/ 9. Probe: ATPOS_alfa_SBP_2.

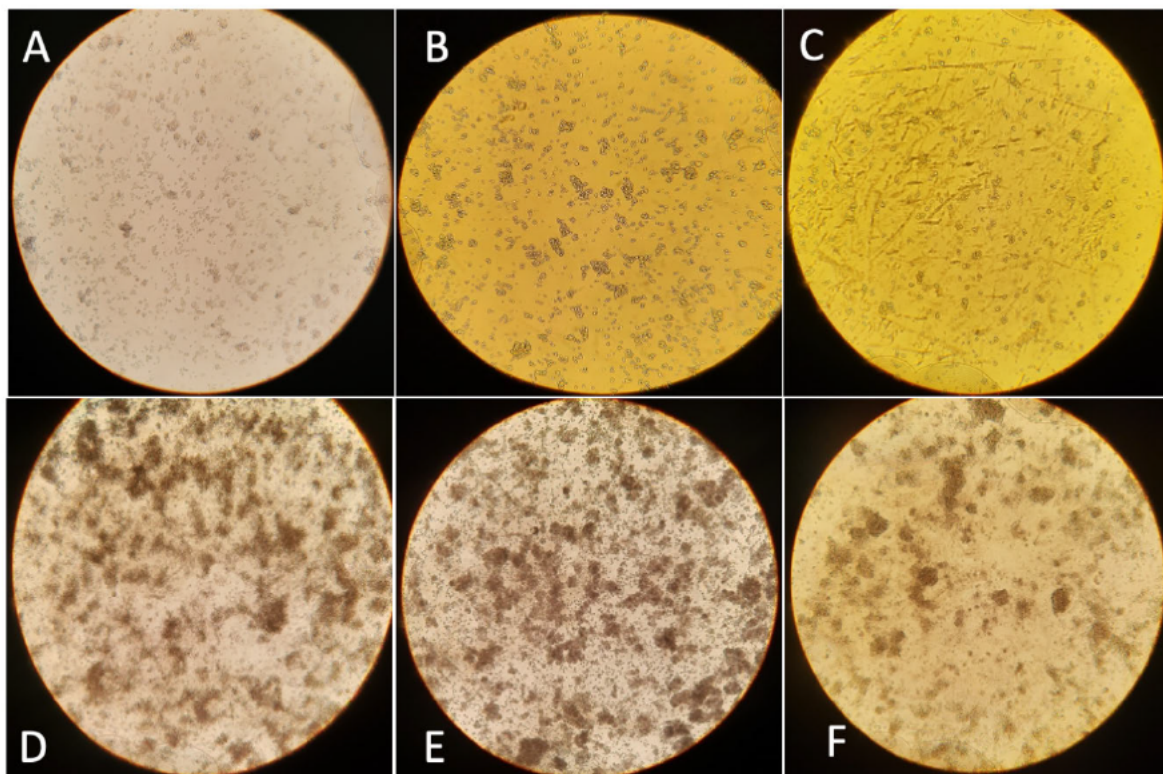


Abbildung 19: Transfektion in *HEK*-293 6E Zellen. Die Bilder zeigen die transfizierten *HEK*-Zellen mit (A, D) ATPOS_alfa_TP1170, mit (B, E) ATPOS_alfa_SBP, und mit (C, F) ATPOS_Sortase. Die Bilder A, B und C stellen die *HEK*-Zellen an Tag 0 der Transfektion dar. Bilder D, E und F stellen die Transfektion der Zellen an Tag 5 dar. Die Kultivierung erfolgte in T255-Zellkulturflaschen.

5.3 Aufreinigung und Quantifizierung der Proteine

Die Proteine, die in *E.coli* produziert wurden, wurden zuerst durch Zelllyse freigesetzt, während die in *HEK*-Zellen produzierten Proteine aus dem Überstand gewonnen wurden. Alle Proteine wurde anschließend mittels verschiedener Aufreinigungsmethoden gereinigt. Der Erfolg der einzelnen Aufreinigungsschritte aller hergestellten Proteine wurde durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

5.3.1 Aufreinigung durch NiNTA-Säulen und Verdauen der Proteine

Das ATPOS_Sortase_HEK sowie die in *E.coli* produzierten Proteine TP1170_alfa_ATPOS_*E.coli* und ATPOS_alfa_SBP_*E.coli* wurden aufgrund ihrer Histidinreste (Polyhistidin-Tag) mithilfe einer Ni-NTA-Säule aufgereinigt. Anhand der deutlicheren Banden auf die SDS-Gele zeigen die in *E.coli* hergestellten Proteine eine effektive Produktion im Vergleich zu den *HEK*-Proteinen (siehe Abbildung 20). Die Banden der *E.coli*-Proteine vor der Aufreinigung (Pellet) sind bei einer Größe von etwa 44 kDa (ATPOS_alfa_TP1170_*E.coli*) und 38 kDa (ATPOS_alfa_SBP_*E.coli*) sehr konzentriert und deutlich zu erkennen (siehe Abb. 20 und 21-B). Die aufkonzentrierte Eluate (Fraktion E1-E3), die nach der Aufreinigung gewonnen wurden, bestätigen ebenfalls mit stark konzentrierten Banden bei einer Größe von etwa 44 bzw. 38 kDa, dass die Aufreinigung durch die NiNTA-Säule erfolgreich war. Des Weiteren wurde der enthaltene Polyhistidin-tag (14xHis/Nedd8-tag) durch die Protease Nedp1 abgespalten, um die Aktivität des Proteins nicht zu beeinträchtigen. Der 14xHis-Tag hat eine Größe von 13,7 kDa.

Das erfolgreiche Verdauen der Proteine wird somit durch die Banden des ATPOS_alfa_TP1170_*E.coli* bei einer Größe von etwa 30 kDa sowie des ATPOS_alfa_SBP_*E.coli* bei einer Größe von etwa 25 kDa bestätigt (siehe Abb. 20 und 21-B). Auch die Bande der Fraktion (E1-E3) des ATPOS_Sortase bei einer Größe von etwa 19 kDa bestätigt ebenfalls die erfolgreiche Aufreinigung (siehe Abb. 21-A).

5 Ergebnisse

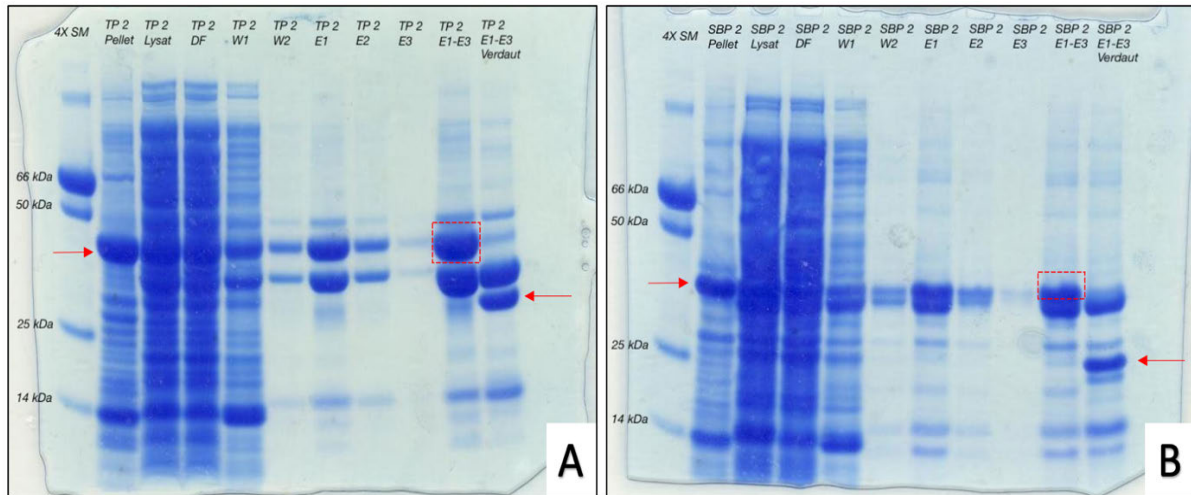


Abbildung 20: SDS-PAGE für die NiNTA-Aufreinigung und für das Verdauen der Proteine. Auftragung auf ein 12%iges Agarosegel bei 200 V für 40 min. In (A) werden die jeweiligen Fraktionen des aufgereinigten ATPOS_alfa_TP1170_E.coli, in (B) die des ATPOS_alfa_SBP_E.coli dargestellt. 1. Probe: 4x Supermarker/ 2. Probe: Das Pellet der Zellkultur/ 3. Probe: Lysat des Proteins/ 4. Probe: Durchfluss durch die Säule/ 5. Probe: 1. Waschdurchfluss/ 6. Probe: 2. Waschdurchfluss/ 7. Probe: 1. Eluat/ 8. Probe: 2. Eluat/ 9. Probe: 3. Eluat/ 10. Probe: Zusammengelegte Eluate E1-E3/ 11. Probe: Verdautes Protein.

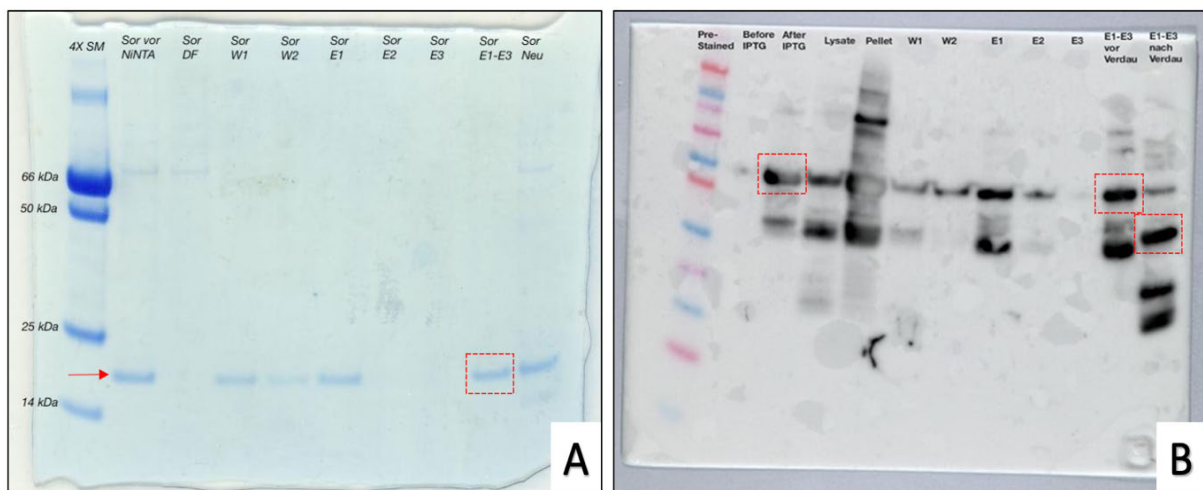


Abbildung 21: SDS-PAGE und Western Blot für die NiNTA-Aufreinigung. Auftragung auf ein 12%iges Agarosegel bei 200 V für 40 min. In (A) werden die Fraktionen des aufgereinigten ATPOS_Sortase_HEK auf SDS-Gel dargestellt: 1. Probe: 4x Supermarker/ 2. Probe: ATPOS_Sortase_HEK vor Aufreinigung/ 3. Probe: Durchfluss durch die Säule/ 4. Probe: 1. Waschdurchfluss/ 5. Probe: 2. Waschdurchfluss/ 6. Probe: 1. Eluat/ 7. Probe: 2. Eluat/ 8. Probe: 3. Eluat/ 9. Probe: Zusammengelegte Eluate E1-E3/ 10. Probe: Neue produzierte Charge für das ATPOS_Sortase_HEK. (B) zeigt einen Western Blot Nachweis für die Fraktionen des aufgereinigten ATPOS_alfa_TP1170_E.coli: 1. Probe: Novex Sharp Pre-Stained Protein Standardmarker/ 2. Probe: Zellkultur vor IPTG-Zugabe/ 3. Probe: Zellkultur nach IPTG-Zugabe / 4. Probe: Lysat des Proteins/ 5. Probe: Das Pellet der Zellkultur/ 6. Probe: 1. Waschdurchfluss/ 7. Probe: 2. Waschdurchfluss/ 8. Probe: 1. Eluat/ 9. Probe: 2. Eluat/ 10. Probe: 3. Eluat/ 11. Probe: Zusammengelegte Eluate E1-E3/ 12. Probe: Verdautes Protein.

5.3.2 Aufreinigung durch ALFA-Matrix

Die Sensorproteine **ATPOS_alfa_SBP** und **ATPOS_alfa_TP1170**, die sowohl in *E.coli* als auch in *HEK*-Zellen produziert wurde, enthielten auch den sogenannten „Alfa-tag“, eine Peptidsequenz, die von dem kommerziell erhältlichen alfa-Nanobody erkannt wird. Daher wurden sie mittels des "ALFA Selector PE (Peptide Elutable) Kit“ aufgereinigt. Die Banden in den Eluat-Fractionen (E1-E5) aller vier Sensorproteine deuten darauf an, dass die Aufreinigung durch ALFA-Matrix erfolgreich ausgeführt wurde (siehe Abb. 22 und 23). Die Eluat-Fractionen der **ATPOS_alfa_TP1170**-Varianten zeigen konzentrierte Banden bei einer Größe von etwa 30 kDa (siehe Abb. 22 A-C). Allerdings zeigen die Eluat-Fractionen (E4-E5) des **ATPOS_alfa_TP1170_E.coli**, die unter sauren Bedingungen eluiert wurden, konzentriertere Banden im Vergleich zur Variante **ATPOS_alfa_TP1170_HEK** (siehe Abb. 22-C). Auch die Eluat-Fractionen der **ATPOS_alfa_SBP**-Varianten bestätigen mit leicht konzentrierten Banden bei einer Größe von etwa 25 kDa die Aufreinigung mittels ALFA-Matrix (siehe Abb. 23).

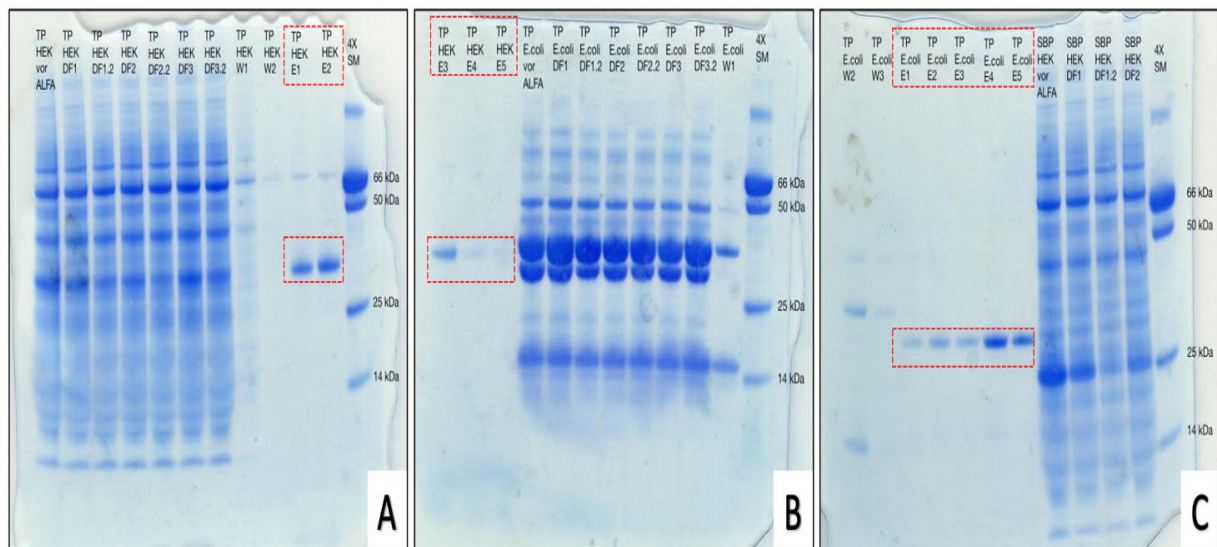


Abbildung 22: SDS-PAGE für die Aufreinigung durch ALFA-Matrix 1. Auftragung auf ein 12%iges Agarosegel bei 200 V für 40 min. In (A und B) sind die Eluat-Fraktion (E1-E5) für das **ATPOS_alfa_TP1170_HEK** dargestellt. In (C) sind die Eluat-Fraktion (E1-E5) für das **ATPOS_alfa_TP1170_E.coli** dargestellt. Dabei bezeichnen die Fraktionen E1-E3 die Protein-Eluate, die mit ALFA-Elutionspeptid eluiert wurden, während die Fraktionen E4-E5 die Protein-Eluate bezeichnen, die unter sauren Bedingungen eluiert wurden.

5 Ergebnisse

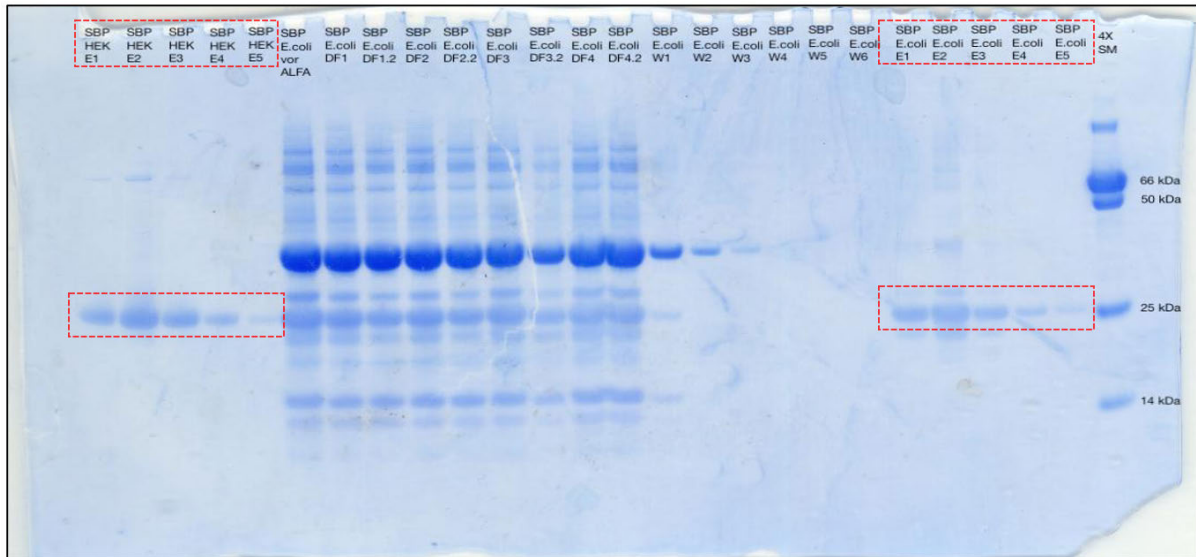


Abbildung 23: SDS-PAGE für die Aufreinigung durch ALFA-Matrix 2. Auftragung auf ein 12%iges Agarosegel bei 200 V für 40 min. Links markiert, sind die Eluat-Fraktion (E1-E5) für das ATPOS_alfa_SBP_HEK dargestellt. Rechts markiert, sind die Eluat-Fraktion (E1-E5) für das ATPOS_alfa_SBP_E.coli dargestellt. Dabei bezeichnen die Fraktionen E1-E3 die Protein-Eluate, die mit ALFA-Elutionspeptid eluiert wurden, während die Fraktionen E4-E5 die Protein-Eluate bezeichnen, die unter sauren Bedingungen eluiert wurden.

5.3.3 Verlust-Berechnung und Bestimmung der Konzentrationen aus den Gelen

Analog zu der Bestimmung der Proteingröße wurden die Konzentrationen der Proteine grob anhand des aufgetragenen Markers geschätzt. Der Marker besteht aus mehreren Proteinen, die auf dem Gel verschiedene Banden mit unterschiedlichen Größen zeigen. Mithilfe dieser Banden wurde die Größe der Proteine ermittelt. Jedoch weist jede Bande eine spezifische Konzentration auf, so dass durch einen Banden-Vergleich die Konzentrationen der einzelnen Proteine abgeschätzt werden können (siehe Tabelle 23).

Tabelle 23: Die abgeschätzte Konzentrationen aus dem SDS-Gel und die Berechnung des Protein-Verlusts.

Proteinsensor	Konzentration vor Aufreinigung	Konzentration nach NiNTA-Säule	Verlust	Konzentration nach ALFA-Matrix	Verlust
TP1170_ATPOS_HEK	0,5 mg/ 30 mL	-	-	0,5 mg/mL	0 %
TP1170_ATPOS_E.coli	4 mg/ 10 mL	0,28 mg/ 0,7 mL	93 %	0,5 mg/mL	87,5 %
ATPOS_SBP_HEK	1,2 mg/ 30 mL	-	-	0,5 mg/mL	58,3 %
ATPOS_SBP_E.coli	4 mg/ 10 mL	0,4 mg/mL	90 %	0,5 mg/mL	87,5 %
ATPOS_Sortase_HEK	0,3 mg/ 7,5 mL	0,04 mg/mL	80 %	-	-

5.4 Markierung der Proteine

5.4.1 Berechnung der Volumina für die Cy3-Kopplung

Für die Kopplung der Sensorproteine mit dem Cy3-Farbstoff wurde für jedes Protein ein 100-facher molarer Überschuss des Reduktionsmittels TCEP sowie ein 20-facher molarer Überschuss an gelöstem Cy3-Maleimids berechnet (siehe Tab. 24).

Tabelle 24: Berechnung der Volumina für die Farbstoffkopplung.

ATPOS	Protein Volumen in μL	Stoffmengenkonzentration der Proteinsensoren in $\mu\text{mol/L}$	250 mM-TCEP Volumen in μL (100-facher Überschuss)	Cy3 Volumen in μL (20-facher Überschuss)
TP1170_ATPOS_HEK	200	15,06	1,20	4,5
TP1170_ATPOS_E.coli	240	16,18	1,56	5,7
ATPOS_SBP_HEK	1000	20,41	8,20	30,2
ATPOS_SBP_E.coli	1000	22,22	8,88	32,9

5.4.2 Fluoreszenz-Mikroskopie (IVIS - *In Vivo* Imaging System)

Zur Überprüfung der Farbstoffkopplung wurde nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE eine Detektion mittels eines Fluoreszenz-Imaging Systems (IVIS, *In Vivo* Imaging System) durchgeführt. Die erfolgreich gekoppelten Proteine zeigten unter dem Mikroskop deutlich erkennbare Banden bei der jeweils erwarteten Größe des entsprechenden Proteinsensors (siehe Abb. 24).

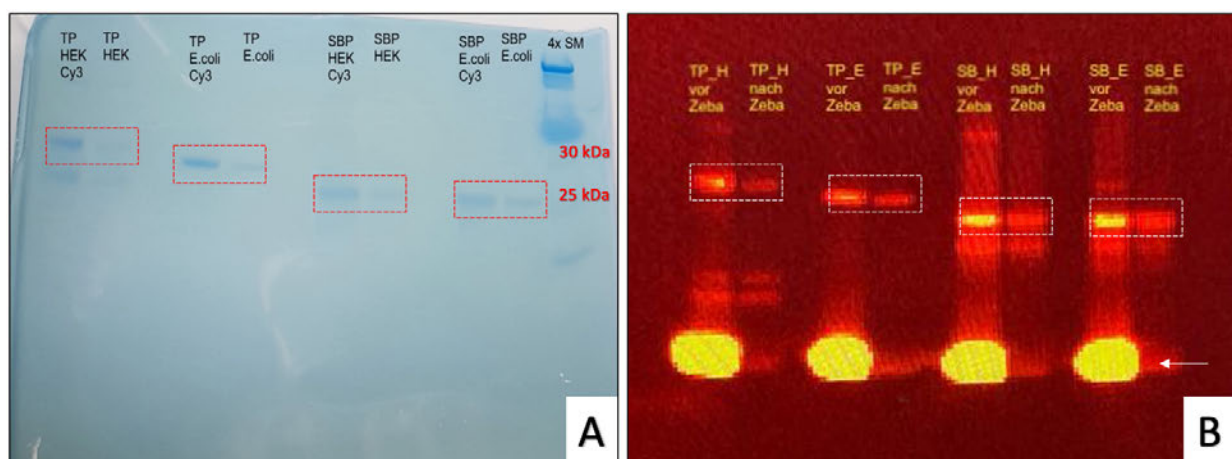


Abbildung 24: Überprüfung der Farbstoffkopplung. Auftragung auf ein 12%iges Agarosegel bei 200 V für 20 min und getestet durch das IVIS. Die Proteinsensoren wurden vor und nach dem Waschen der ungebundenen Farbstoffmoleküle aufgetragen. In (A) ist ein gefärbtes SDS-Gel dargestellt. In (B) ist das Gel mittels IVIS dargestellt. 1-2. Probe: ATPOS_alfa_TP1170_HEK/ 3-4. Probe: ATPOS_alfa_TP1170_E.coli/ 5-6. Probe: ATPOS_alfa_SBP_HEK/ 7-8. Probe: ATPOS_alfa_SBP_E.coli/ 9. Probe: 4x SM-Marker.

5.5 Charakterisierung der ATPOS ATP-Proteinsensoren

Die Bindungsfähigkeit der ATP-Sensoren an ihre jeweiligen Bindungspartner, sowie ihre Aktivität bei der Erkennung von ATP wurden mit Hilfe verschiedener Detektorsysteme untersucht und dargestellt.

5.5.1 Biolayer-Interferometrie (BLItz)

- **TP1170_alfa_ATPOS:**

Die Bindung der ATPOS-Varianten TP1170_alfa_ATPOS, die in *HEK*-Zellen sowie in *E.coli* hergestellt wurden, wurde unter Verwendung eines biotinylierten Anti-human CD19 Maus IgG1/Kappa-Antikörpers getestet. Nach der 30-sekündigen Equilibration des Geräts erfolgte die Bindung des Antikörpers an den SA-Biosensor, was sich durch einen ansteigenden Kurvenverlauf bei der 30. Sekunde auszeichnete (siehe Abb. 25 und 26). Anschließend wurde das Gerät erneut für 30 Sekunden equilibriert und der ATP-Sensor danach hinzugegeben. Anhand der zweiten ansteigenden Kurve bei der 120. Sekunde zeigte der Nanobody des ATP-Sensors eine plausible Bindung mit der Kappa-Kette des Maus-Antikörpers (Assoziation „ K_{On} “). Durch die letzte Equilibrationsphase ab der 180. Sekunde deutet der geringe Abfall der Kurve darauf hin, dass die Bindung des Nanobody an den Antikörper stark war und der ATP-Sensor nicht einfach abdissoziierte (Dissoziation „ K_{Off} “ (siehe Abb. 25 und 26).

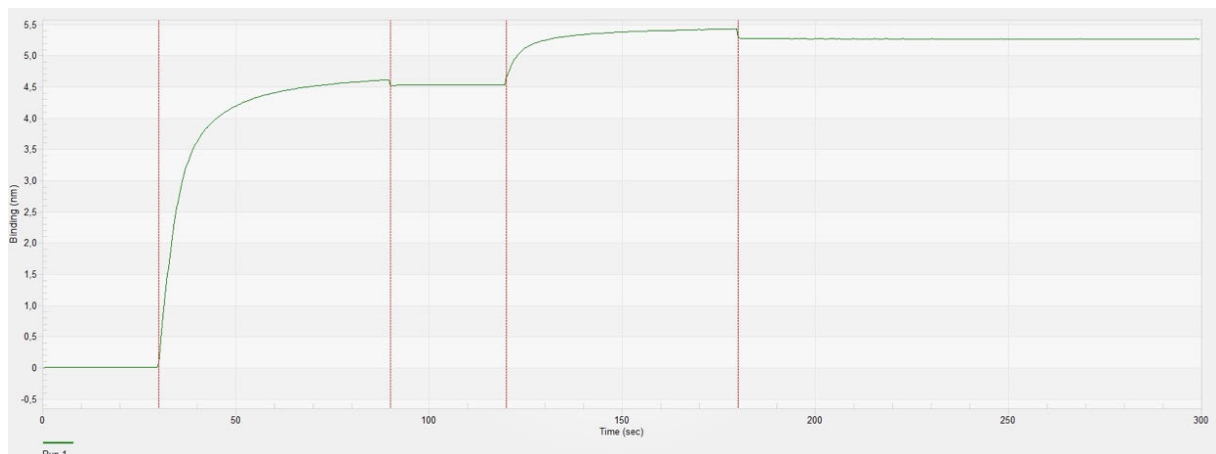


Abbildung 25: Bindungsverlauf des TP1170_alfa_ATPOS_E.coli. (0-30 sek): Initiale Baseline durch den Kinetik Puffer/ (30-90 sek): Laden des Antikörpers/ (90-120 sek): neue Baseline mit Kinetik Puffer/ (120-180 sek): Assoziation des ATP-Sensors mit dem Antikörper/ (180-300 sek): Überwachung der Dissoziation des ATP-Sensors.

5 Ergebnisse

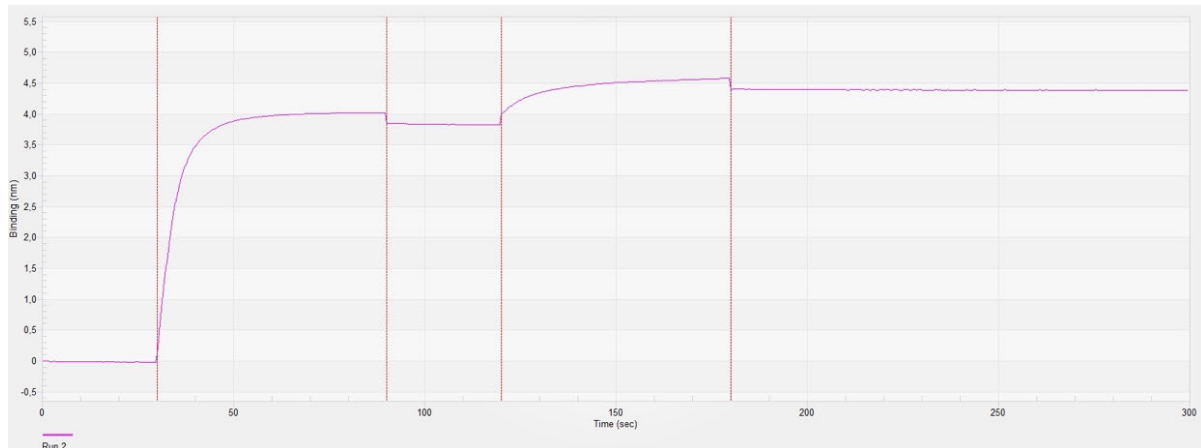


Abbildung 26: Bindungsverlauf des TP1170_alfa_ATPOS_HEK. (0-30 sek): Initiale Baseline durch den Kinetik Puffer/ (30-90 sek): Laden des Antikörpers/ (90-120 sek): neue Baseline mit Kinetik Puffer/ (120-180 sek): Assoziation des ATP-Sensors mit dem Antikörper/ (180-300 sek): Überwachung der Dissoziation des ATP-Sensors.

- **ATPOS_alfa_SBP:**

Im Vergleich zur TP1170-Variante erfolgte hierbei die Austestung der ATPOS-Varianten ATPOS_alfa_SBP, die in *HEK*-Zellen sowie in *E.coli* hergestellt wurden, ohne Verwendung eines Antikörpers. Nach der 30-sekündigen Gerät-Equilibration fand die Bindung des ATP-Sensors direkt an den SA-Biosensor statt. Das ATPOS_alfa_SBP verfügt über ein Streptavidin (SA)-bindendes Peptid (SBP), das an die SA-Biosensoren unmittelbar gebunden hat (Assoziation „ K_{on} “). Dies zeigt sich durch die ansteigende Kurve bei der 30. Sekunde (siehe Abb. 27). Durch die weitere Equilibration ab der 90. Sekunde weist der Kurvenverlauf darauf hin, dass die Bindung des SBP an die SA-Biosensoren stark war, und der ATP-Sensor sich nicht einfach ablöste (Dissoziation „ K_{off} “ (siehe Abb. 27).

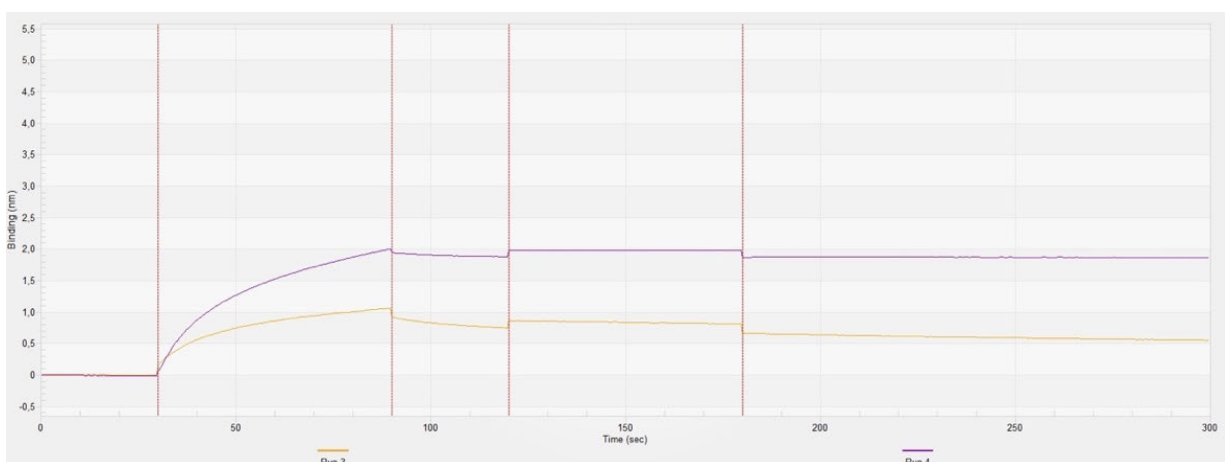


Abbildung 27: Bindungsverlauf des ATPOS_alfa_SBP_HEK (Run3) sowie des ATPOS_alfa_SBP_E.coli (Run4). (0-30 sek): Initiale Baseline durch den Kinetik Puffer/ (30-90 sek): Laden des ATP-Sensors/ (90-120 sek): neue Baseline mit Kinetik Puffer/ (120-300 sek): Überwachung der Dissoziation des ATP-Sensors.

5.5.2 Nachweis der Bindung von ATPOS_SBP an SA-Beads in der Durchflusszytometrie (FACS)

Die Bindung zwischen ATP-Sensoren, die das Streptavidin-bindende Peptid (SBP) enthalten, und deren Bindungspartner (Streptavidin) wurde auch mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung von Streptavidin-beschichteten Beads (**PolyAn Green 100** und **Transparente Beads**) nachgewiesen. Die zu untersuchenden Beads wurden zunächst in einem zweidimensionalen *Dot-Plot*-Diagramm identifiziert, in dem die morphologischen Eigenschaften der Partikel durch die Parameter *FSC* (Vorwärtsstreulicht) und *SSC* (Seitwärtsstreulicht) dargestellt werden (siehe Abb. 28). Die Stärke der Anfärbung (Fluoreszenzintensität) der gekoppelten Beads wurde dann in einem eindimensionalen Histogramm dargestellt (siehe Abb. 29). Die Histogramme zeigen, dass die Streptavidin-beschichteten Beads einheitlich mit den ATP-Sensoren beschichtet wurden.

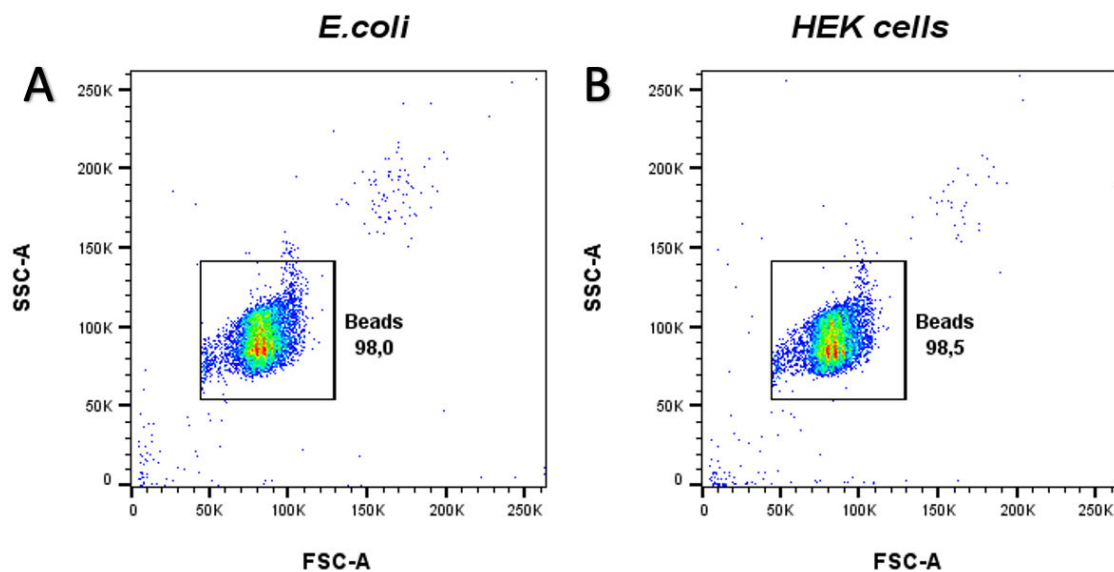


Abbildung 28: Darstellung der mit ATPOS_alfa_SBP inkubierten, SA-beschichteten Beads im Durchflusszytometer. (A) stellt den FSC/SSC-*Dot-Plot* für die mit dem ATPOS_alfa_SBP_*E.coli* gekoppelten SA-Beads, (B) zeigt den entsprechenden *Dot-Plot* für die mit dem ATPOS_alfa_SBP_*HEK* gekoppelten Beads.

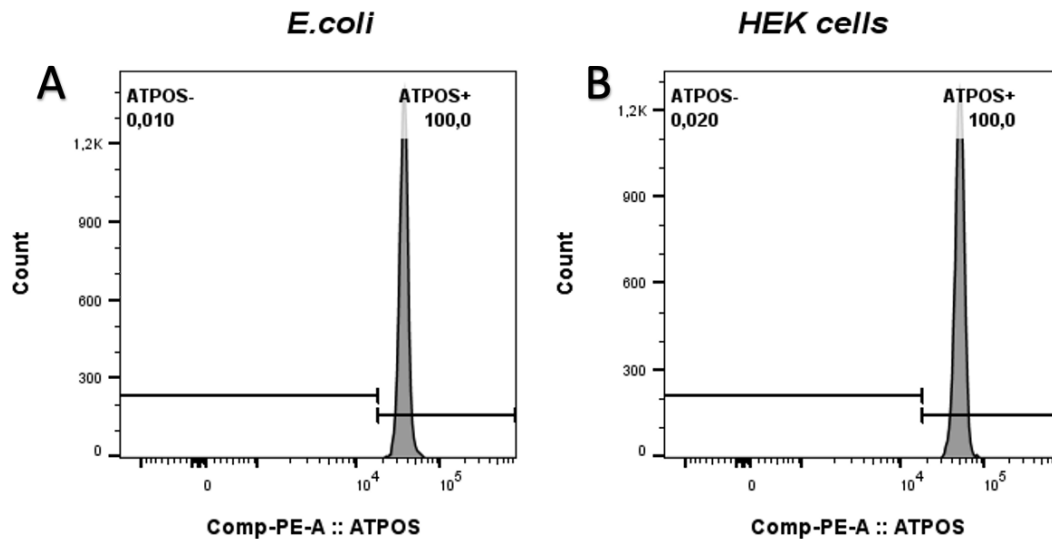


Abbildung 29: Nachweis der Bindung des ATPOS_alfa_SBP an die mit SA-beschichteten Beads. (A) stellt das Histogramm für den gebundenen ATP-Sensor ATPOS_alfa_SBP_ *E.coli* dar, (B) zeigt das Histogramm für den ATP_Sensor ATPOS_alfa_SBP_ *HEK*.

5.5.3 Nachweis der Bindung von ATPOS_SBP an SA-Beads in der EVOS - Zellbildgebungssystem

Nach dem FACS-Versuch wurden die gekoppelten SA-beschichteten Beads zusätzlich mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (EVOS-Bildgebungssystem) untersucht. Durch die Verwendung von verschiedenen Farben (rot und grün) konnten die grün leuchtenden Beads und die rot markierten Sensorproteine unter dem Mikroskop detektiert werden. Als positive Kontrolle leuchteten die grünen Beads unter grünem Licht, während die transparenten Beads nur bei normalem Durchlicht sichtbar waren. Unter dem roten Licht waren alle Beads sichtbar, was bestätigt, dass alle Beads erfolgreich mit den Cy3-markierten ATP-Sensoren gekoppelt wurden (siehe Abb. 30).

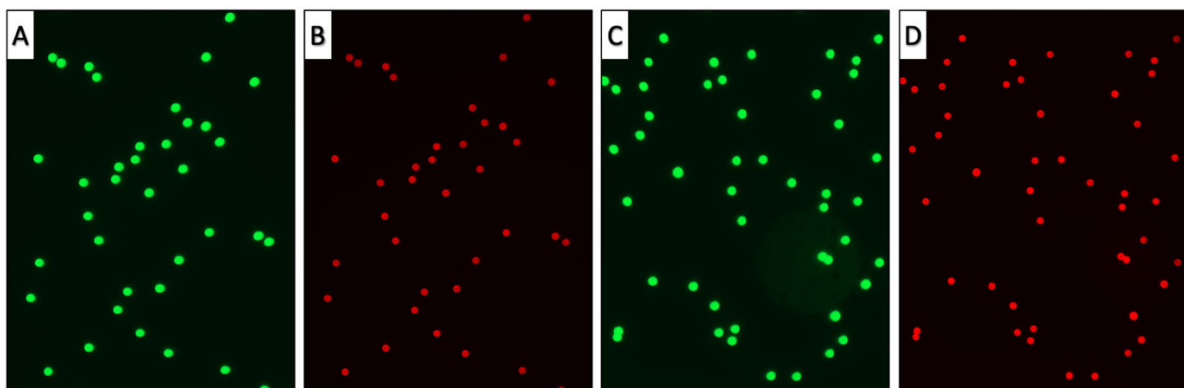


Abbildung 30: Gekoppelte SA-beschichtete Beads mit ATPOS_alfa_SBP. In (A, C) wurden die grünen Beads detektiert (GFP-Filter). (B, D) zeigen die Beads, die mit den ATP-Sensoren gekoppelt wurden (RFP-Filter). (A, B) zeigen mit dem ATPOS_alfa_SBP_ *E.coli* gekoppelte Beads. (C,D) zeigen mit dem ATPOS_alfa_SBP_ *HEK* gekoppelte Beads.

5.5.4 Untersuchung der ATP-Reaktivität der ATPOS ATP-Sensoren mittels eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica TCS SP8X „DMi8“)

Die Reaktivität aller hergestellten ATP-Sensoren für ATP wurde mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie getestet. Dazu wurden die verschiedenen ATPOS ATP-Sensoren über ihre jeweiligen spezifischen Bindungspartner an T-Lymphozyten (sowohl primäre **CD4+** T-Zellen sowie die T-Zelllinie **Jurkat**) gebunden, und ihre Reaktivität auf von außen zugebenes ATP wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie getestet.

- **Bindung von ATPOS_SBP an Jurkat Zellen**

Um die in *E.coli* oder *HEK*-Zellen produzierten ATPOS_alfa_SBP Sensoren an die T-Lymphozyten Zelllinie Jurkat zu binden, wurden die Sensorproteine zunächst mit **Streptavidin-FITC** in einem Mengenverhältnis inkubiert, welches freie Biotin-Bindungsstellen im Streptavidin übrig ließ. Dieser ATPOS/Streptavidin-Komplex wurde dann auf Jurkat Zellen gegeben, die mit einem biotinylierten **Maus-anti-human CD45** Antikörper vorinkubiert waren.

Die Bindung des FITC-Streptavidin an die Jurkat Zellen ließ sich leicht unter dem grünen Licht detektieren, und auch die Kopplung der ATP-Sensoren an die Jurkat Zellen konnte durch die rote Markierung nachgewiesen werden (siehe Abb. 31 und 32). Auffallend und unerwartet war jedoch, dass im Unterschied zu den SA-Beads die Beschichtung der Jurkat-Zellen mit dem Sensor nicht homogen war, und dass die rote und die grüne Fluoreszenz sich nicht überlagerte, was auf eine unterschiedliche Lokalisation des grünen Streptavidins und des roten Sensors schließen lässt (siehe Abb. 31-B).

Ein Vergleich der roten Fluoreszenzintensität vor und nach Zugabe von ATP zeigte keinen unmittelbar sichtbaren Anstieg der roten Fluoreszenz (Abb. 32). Weitere Versuche sind demnach notwendig, um das Protokoll für die Beladung von lebenden Zellen mit dem ATPOS_alfa_SBP Sensor zu optimieren, ehe der Sensor zur Messung extrazellulärer ATP-Konzentrationen eingesetzt werden kann.

5 Ergebnisse

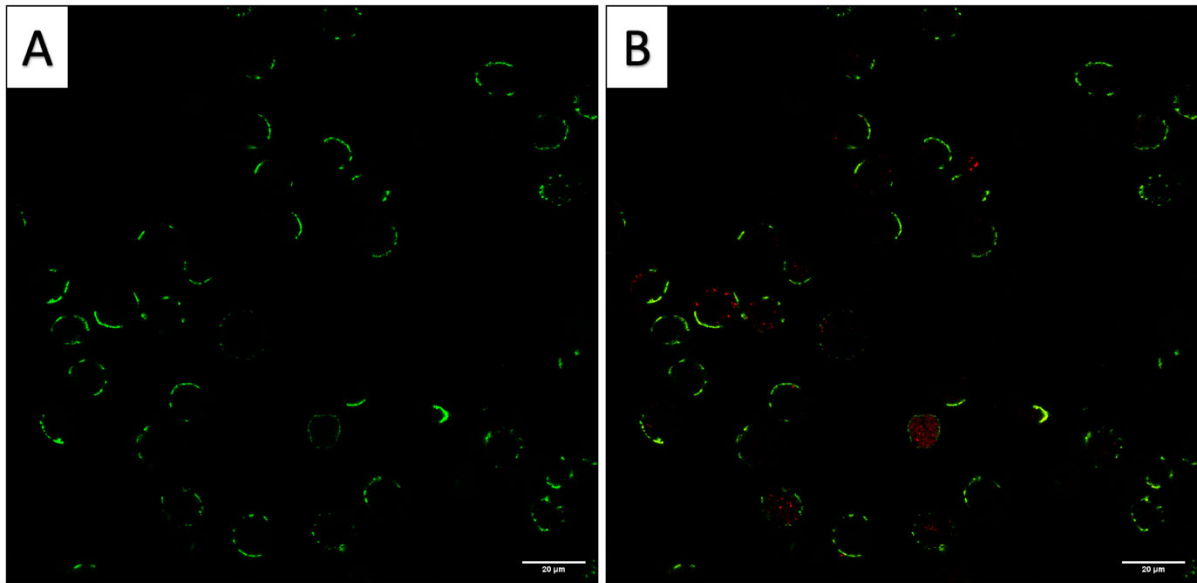


Abbildung 31: Mit ATPOS_alfa_SBP_ *E.coli* gekoppelte Jurkat Zellen. (A) zeigt die Bindung des grünen FITC-Streptavidin an die Jurkat Zellen. In (B) ist die Überlagerung der Fluoreszenz der zwei Kanäle dargestellt. Die Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop wurden in Zusammenarbeit mit S. Eiberg gemacht.

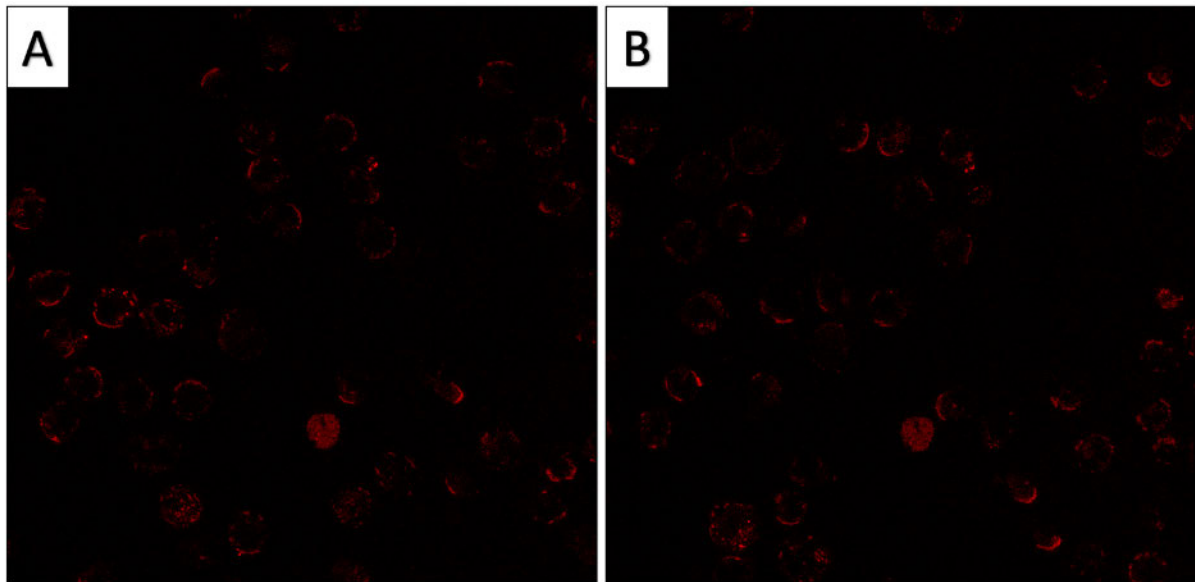


Abbildung 32: Mit ATPOS_alfa_SBP_ *E.coli* gekoppelte Jurkat Zellen vor und nach ATP-Zugabe. (A) zeigt die Jurkat Zellen vor ATP-Zugabe. (B) stellt die Zellen nach ATP-Zugabe dar. Die Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop wurden in Zusammenarbeit mit S. Eiberg gemacht.

- **Bindung von TP1170_alfa_ATPOS an primäre CD4+ Zellen**

Die ATP-Sensoren, welche den gegen die Maus Kappa-Kette gerichteten Nanobody TP1170 als Fusionsprotein enthielten, wurden mithilfe eines Antikörpers an primäre CD4+ T-Lymphozyten gebunden. Dazu wurden periphere Blutmonozyten (PBMCs) eines gesunden Spenders zunächst mit dem Antikörper **BV421 Maus-anti-human CD4** vorinkubiert. Der Antikörper bindet an humane T-Helferzellen, die den Oberflächenmarker CD4 tragen. Der an den ATP-Sensor fusionierte Nanobody TP1170 sollte an die Kappa-Kette des Antikörpers binden, um den Sensor an die Zelloberfläche anzudocken.

Wiederum zeigte sich eine Konzentration des Sensorproteins in fleckförmige Strukturen anstelle einer homogenen Anfärbung der Zelloberfläche (siehe Abb. 33). Auch für diesen Sensor muss daher das Protokoll für die Bindung an lebende Zellen durch weitere Versuche noch optimiert werden, ehe er für Messungen im Rahmen des Live-Cell-Imaging eingesetzt werden kann.

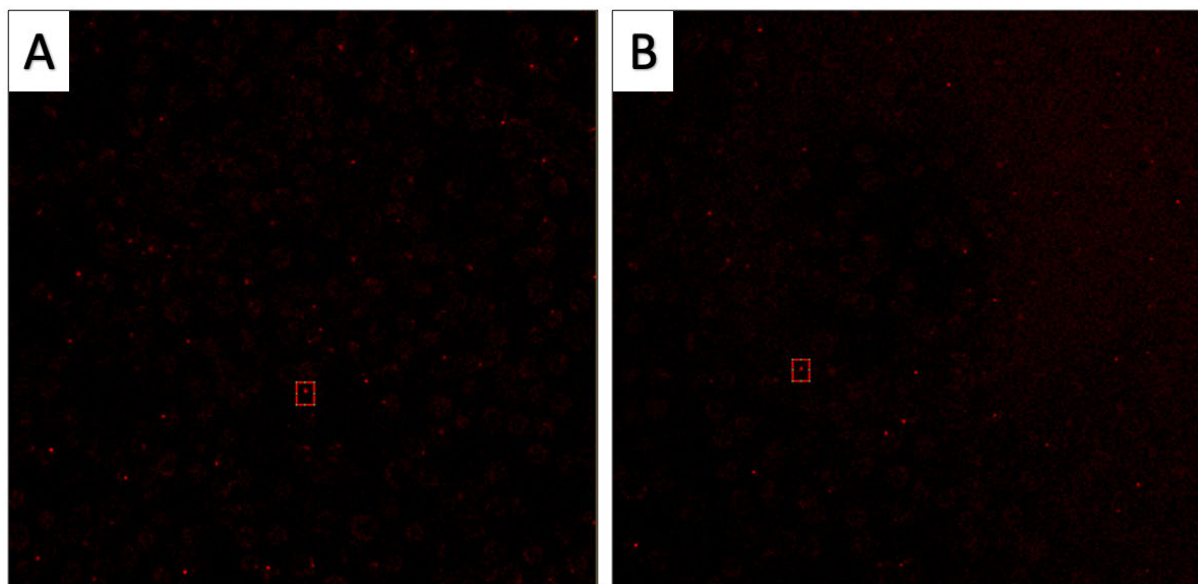


Abbildung 33: Mit TP1170_alfa_ATPOS_ *E.coli* gekoppelte CD4+ Zellen. In A und B sind die zwei berücksichtigten Zellen. Die beiden Zellen weisen keinen Unterschied nach ATP-Zugabe auf. Die Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop wurden in Zusammenarbeit mit S. Eiberg gemacht.

6 Diskussion

Alle ATP-Proteinsensoren-Varianten durchliefen einen mehrstufigen Verarbeitungsprozess. Zunächst wurden die DNA-Plasmide der Proteinsensoren erfolgreich in ein bakterielles Expressionsplasmid kloniert. Darauffolgend wurden die von den rekombinanten Plasmiden kodierten Proteine mehrfach exprimiert. Während die ATPOS_Sortase-Variante ausschließlich in *HEK*-Zellen produziert wurde, wurden die Varianten TP1170_alfa_ATPOS und ATPOS_alfa_SBP sowohl in *E.coli* Zellen als auch in *HEK*-Zellen hergestellt. Die hergestellten Proteine wurden dann mit verschiedenen Reinigungsmethoden aufgereinigt und konzentriert. Anschließend wurden die Proteinsensoren mit dem Farbstoff Cy3-Maleimid markiert. Zum Abschluss wurden die Sensoren über ihren jeweiligen Bindungspartner spezifisch an Zelloberflächen gebunden und ihre ATP-Reaktivität untersucht.

6.1 Herstellung und Aufreinigung der ATP-Proteinsensoren

Die Herstellung aller ATP-Proteinsensoren sowohl in *E.coli* als auch in *HEK*-Zellen wurde erfolgreich durchgeführt, was durch SDS-PAGE und Western Blot-Analysen bestätigt wurde. Jedoch zeigte sich, dass die Produktion der Varianten TP1170_alfa_ATPOS und ATPOS_alfa_SBP in *E.coli*-Zellen deutlich besser verlief als die Produktion in *HEK*-Zellen, wie aus den Abbildungen 18, 20 und 21 ersichtlich ist. Die Banden der gewünschten Proteine waren bei der bakteriellen Produktion sehr konzentriert im Vergleich zur Produktion in den humanen Zellen. Jedoch enthielten die in *E.coli* hergestellten Proteinsensoren viele unerwünschte Verunreinigungen, weshalb die *E.coli*-Varianten zweimal gereinigt wurden, einmal mittels der Ni-NTA-Säulen und anschließend mit der ALFA-Matrix.

Die Aufreinigung der fünf Proteinsensoren war ebenfalls erfolgreich. Die SDS-Gele zeigten, dass die ATP-Proteinsensoren nun reinere Fraktionen aufwiesen, mit weniger unerwünschten Banden, was die effektive Durchführung der Aufreinigung bestätigte (siehe Abbildungen 20, 21, 22 und 23). Allerdings wurde eine Reduktion der Konzentration der Proteinsensoren festgestellt, die mit einem Verlust an Protein einherging (siehe Tabelle 23). Darüber hinaus konnte mittels SDS-PAGE und Western Blot gezeigt werden, dass die Proteine, die den 14xHis-Tag enthielten, erfolgreich verdaut wurden (siehe Abbildungen 20 und 21).

6.2 Markierung der ATP-Proteinsensoren und Nachweis ihrer Bindung an ihre Interaktionspartner

Für die Funktion der ATP-Proteinsensoren war es notwendig, sie mit dem Farbstoff Cy3-Maleimid zu markieren. Anhand der SDS-PAGE und der Analyse mittels des IVIS-Systems wurde die erfolgreiche Kopplung der Sensoren nachgewiesen (siehe Abb. 24). Da die Konzentration der ATPOS_Sortase-Variante zu niedrig war, konnte dieser Proteinsensor im Rahmen dieser Arbeit nicht markiert und später auch nicht zur ATP-Detektion verwendet werden. Die Bindungsfähigkeit der anderen ATP-Proteinsensoren an ihre jeweiligen Bindungspartner wurde durch Durchflusszytometrie, BLitz-Test sowie Mikroskop-Untersuchungen nachgewiesen.

6.2.1 TP1170_alfa_ATPOS

Mithilfe des Biolayer-Interferometrie-Systems (BLitz) wurde die Fähigkeit der TP1170_alfa_ATPOS-Varianten zur Bindung an Maus Immunglobuline untersucht. Hierbei zeigte der Nanobody TP1170 in beiden Varianten TP1170_alfa_ATPOS_*E.coli* und TP1170_alfa_ATPOS_*HEK* eine angemessene Bindung mit der Kappa-Kette eines biotinylierten Maus IgG1/Kappa Antikörpers gegen humanes CD19, wobei die Bindungseffizienz der *E.coli*-Variante höher war (siehe Abbildungen 25 und 26). Dies könnte möglicherweise an Unterschieden in den TP1170-Domänen liegen, die in den beiden Expressionssystemen produziert wurden. Bakterielle und eukaryotische Produktionssysteme unterscheiden sich grundsätzlich in der Fähigkeit, Disulfidbrücken innerhalb des produzierten Proteins auszubilden, sowie in der Glykosylierung des produzierten Proteins. Nanobodies enthalten eine Immunglobulin V-Domäne (variable Domäne), welche zwei konservierte Disulfidbrücken enthält. Es ist daher nicht selbst verständlich, dass Nanobody-Domänen gut in *E.coli* produziert werden können. Die Arbeitsgruppe von *Pleiner et al.*, welche den TP1170 Nanobody entwickelte, hat jedoch gezeigt, dass Stabilität und Affinität des Nanobodies nicht durch die Produktion in *E.coli* beeinträchtigt werden.

Auf der anderen Seite könnte eine Glykosylierung im Bereich der Antigen-Bindungsstelle des Nanobodies seine Interaktion mit dem Zielprotein beeinträchtigen. Tatsächlich findet sich in der CDR3 (*complementarity determining region*) Region von TP1170, dem Bereich, der hauptsächlich für die Spezifität des Nanobodies verantwortlich ist, eine potenzielle N-Glykosylierungsstelle.

Es ist daher möglich, dass die in *HEK*-Zellen stattfindende Glykosylierung die Affinität des Nanobodys herabsetzt. Dies sollte in weiteren Versuchen untersucht werden, da dieses Problem möglicherweise durch eine Mutation der Glykosylierungsstelle im Expressionsvektor für die Produktion in *HEK*-Zellen in der Zukunft umgangen werden könnte.

6.2.2 ATPOS_alfa_SBP

Die ATPOS_alfa_SBP-Varianten wurden ebenfalls mittels des BLItz-Systems untersucht. In diesem Fall wurde im BLItz-Gerät direkt ein Streptavidin-Biosensor zur Messung der Bindung verwendet. Der Bindungsverlauf der beiden Sensoren zeigte, dass sie stark und spezifisch an Streptavidin binden können (siehe Abb. 27), und die Beobachtung der Dissoziation der Sensoren zeigte, dass sie von ihrem Zielprotein nicht leicht wieder abfallen.

6.3 Andocken der ATP-Proteinsensoren an Partikel oder Zellen

Abschließend wurde untersucht, ob die Sensoren an die Oberflächen von künstlichen Partikeln (microbeads) oder Zellen anbinden können. Zur Untersuchung der Bindungsfähigkeit der SBP-haltigen Sensorproteine wurden zunächst Streptavidin-beschichtete Beads verwendet. Danach wurde die Fähigkeit, mit Hilfe eines biotinylierten Antikörpers an humane T-Zellen zu binden, mit Hilfe der T-Zelllinie Jurkat getestet. Schließlich wurde versucht, den TP1170-enthaltenden Sensor an primäre T-Lymphozyten zu binden. Für die Bindungsversuche mit Zellen wurden jedoch ausschließlich die ATP-Proteinsensoren untersucht, die in *E.coli* hergestellt wurden.

6.3.1 TP1170_alfa_ATPOS_*E.coli*

Die ATP-Sensoren, die den gegen die Maus Kappa-Kette gerichteten Nanobody TP1170 enthielten, wurden gezielt an CD4⁺ Zellen angedockt. Hierbei wurden die Sensoren mithilfe eines biotinylierten Antikörpers (BV421 Mouse Anti-Human CD4) gekoppelt und an die Zelloberfläche gebracht. Die Bindung an die Zellen verlief erfolgreich, was durch die Mikroskop-Bildgebung bestätigt wurde (siehe Abbildung 33). Die mit den Sensoren gekoppelten Zellen konnten bei dem roten Licht unter dem Mikroskop aufgrund der roten Farbe des Farbstoffs Cy3 erkannt werden, jedoch konnte keine homogene Anfärbung der Zelloberfläche erzielt werden. Nach Zugabe von ATP sollte die Fluoreszenzintensität der gekoppelten Zellen deutlich ansteigen, was jedoch nach ersten Eindrücken per Augenschein

nicht beobachtet werden konnte. Eine quantitative Auswertung der Mikroskopiebilder steht jedoch noch aus, und konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr geleistet werden. Insgesamt ist zu vermuten, dass eine aussagefähige Visualisierung von ATP an der Zelloberfläche erst dann möglich sein wird, wenn ein geeignetes Protokoll für die homogene Anfärbung von Zelloberflächen entwickelt worden ist.

6.3.2 ATPOS_alfa_SBP_E.coli

Die Fähigkeit der SBP-haltigen Sensoren zur Bindung an Partikel wurde zunächst an Streptavidin-beschichteten Beads untersucht. Diese wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie (siehe Abb. 28 und 29) sowie im EVOS Mikroskopie-System bestätigt (siehe Abb. 30).

Danach wurde das gezielte Andocken dieser ATP-Sensoren an die Oberflächen von Jurkat-Zellen untersucht. Dazu wurden sie mit Streptavidin (FITC - 500 µg/mL) verknüpft und dann mit Jurkat-Zellen in Kontakt gebracht, die mit einem biotinylierten Antikörper (Biotin Anti-Human CD45 - 500 µg/mL) vorbeschichtet waren. Hierbei sollten freie Bindungsstellen des Streptavidin an den Biotinylrest des biotinylierten Antikörpers binden. Unter dem Mikroskop konnte das erfolgreiche Andocken der Sensoren an den Zellen bestätigt werden. Allerdings konnte auch hier keine homogene Anfärbung der Zelloberflächen erzielt werden (siehe Abb. 31 und 32). Dies könnte daran liegen, dass die Mengenverhältnisse zwischen Sensorprotein, Streptavidin, biotinyliertem Antikörper, und Zellzahl nicht optimal waren. Ebenfalls ist es möglich, dass gebundene Sensor/Streptavidin-Komplexe von den Zellen internalisiert und teilweise verdaut wurden. Eine weitere Optimierung des Färbeprotokolls ist hier in zukünftigen Versuchen noch erforderlich. Ebenso wie bei den CD4⁺ T-Zellen konnte die Reaktivität des Sensors auf ATP auch hier nicht bestimmt werden, da keine erkennbare Steigerung an der Fluoreszenzintensität beobachtet wurde (siehe Abb. 32).

7 Zusammenfassung und Ausblick

ATP ist ein unverzichtbares Molekül für die Lebensfähigkeit von Zellen und Organismen, welches eine zentrale Rolle bei der Energieversorgung und Zellregulierung erfüllt. Darüber hinaus fungiert ATP als Signalmolekül, indem es an spezifische Rezeptoren bindet und dadurch Signaltransduktionskaskaden auslöst. ATP ist auch an der Regulierung von Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose beteiligt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf Varianten des Fluoreszenz-basierten ATP-Sensors ATPOS erfolgreich hergestellt und aufgereinigt. Diese Varianten unterscheiden sich in der Art ihrer Herstellung und dem Mechanismus, mit dem sie an Zelloberflächen andocken können. Zwei Varianten stellten Fusionsproteine mit den Nanobody TP1170 dar, welcher die Kappa-Kette von Maus Immunglobulin erkennt, zwei andere waren Fusionsproteine mit den Streptavidin-bindenden Peptid (SBP). Diese beiden wurden sowohl in den *E.coli* Zellen (BL 21-DE3) als auch in der humanen HEK-293 6E-Zelllinie produziert. Hingegen wurde die Variante ATPOS_Sortase ausschließlich in den HEK-Zellen hergestellt. Die Konstrukte für die bakterielle Expression wurden in den Vektor pQE80, die für die HEK-Zell-Expression in den Vektor pCSE2.5 kloniert. Die Proteinsensoren wurden durch affinitätschromatographische Verfahren aufgereinigt und konzentriert, wobei jedoch teilweise erhebliche Verluste an Protein in Kauf genommen werden mussten, weswegen die ATPOS_Sortase nicht weiter aufgearbeitet werden konnte. Nach der Markierung der Sensoren mit dem Farbstoff Cy3, wurde ihre Fähigkeit, ihren jeweiligen Bindungspartner (Maus Kappa-Kette bzw. Streptavidin) zu erkennen, durch Biolayer Interferometrie nachgewiesen. Schließlich wurde die Fähigkeit der Sensoren, an die Oberfläche von Partikeln (Beads oder Zellen) zu binden, untersucht. Die Sensoren färbten die Oberfläche von Streptavidin-beschichteten Microbeads homogen an und konnten in der Fluoreszenzmikroskopie sowie der Durchflusszytometrie dargestellt werden. Dagegen konnte die Oberfläche von lebenden T-Lymphozyten nicht homogen angefärbt werden. Weitere Versuche zur Optimierung des Protokolls für die Bindung der Sensoren an lebende Zellen sind notwendig.

Literaturverzeichnis

1. Kitajima, N., Takikawa, K., Sekiya, H., Satoh, K., Asanuma, D., Sakamoto, H., Takahashi, S., Hanaoka, K., Urano, Y., Namiki, S., Iino, M., & Hirose, K. (2020). Real-time in vivo imaging of extracellular ATP in the brain with a hybrid-type fluorescent sensor. *ELife*, *9*, e57544. <https://doi.org/10.7554/eLife.57544>
2. Burnstock, G. (2007). Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological Reviews*, *87* (2), 659–797. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2006>
3. Fields, R. D., & Burnstock, G. (2006). Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nature Reviews. Neuroscience*, *7*(6), 423–436. <https://doi.org/10.1038/nrn1928>
4. Khakh, B. S., & North, R. A. (2012). Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. *Neuron*, *76*(1), 51–69. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.024>
5. Cheng, J., Korte, N., Nortley, R., Sethi, H., Tang, Y., & Attwell, D. (2018). Targeting pericytes for therapeutic approaches to neurological disorders. *Acta Neuropathologica*, *136*(4), 507–523. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1893-0>
6. González-Alonso, J., Olsen, D. B., & Saltin, B. (2002). Erythrocyte and the regulation of human skeletal muscle blood flow and oxygen delivery: role of circulating ATP: Role of circulating ATP. *Circulation Research*, *91*(11), 1046–1055. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000044939.73286.e2>
7. Idzko, M., Ferrari, D., & Eltzschig, H. K. (2014). Nucleotide signalling during inflammation. *Nature*, *509*(7500), 310–317. <https://doi.org/10.1038/nature13085>
8. Junger, W. G. (2011). Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nature Reviews. Immunology*, *11*(3), 201–212. <https://doi.org/10.1038/nri2938>
9. Di Virgilio, F., Sarti, A. C., Falzoni, S., De Marchi, E., & Adinolfi, E. (2018). Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. *Nature Reviews. Cancer*, *18*(10), 601–618. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0037-0>
10. Shiz Aoki. *BioRender* 2023. <https://app.biorender.com/biorender-templates>

11. Bours, M. J. L., Swennen, E. L. R., Di Virgilio, F., Cronstein, B. N., & Dagnelie, P. C. (2006). Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology & Therapeutics*, *112*(2), 358–404.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.04.013>
12. Lohman, A. W., Billaud, M., & Isakson, B. E. (2012). Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall. *Cardiovascular Research*, *95*(3), 269–280.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvs187>
13. Holton, P. (1959). The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *The Journal of Physiology*, *145*(3), 494–504.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1959.sp006157>
14. Wang, Z., Haydon, P. G., & Yeung, E. S. (2000). Direct observation of calcium-independent intercellular ATP signaling in astrocytes. *Analytical Chemistry*, *72*(9), 2001–2007.
<https://doi.org/10.1021/ac9912146>
15. Singhal, P., & Kuhr, W. G. (1997). Direct electrochemical detection of purine- and pyrimidine-based nucleotides with sinusoidal voltammetry. *Analytical Chemistry*, *69*(17), 3552–3557.
<https://doi.org/10.1021/ac970333n>
16. Kueng, A., Kranz, C., & Mizaikoff, B. (2004). Amperometric ATP biosensor based on polymer entrapped enzymes. *Biosensors & Bioelectronics*, *19*(10), 1301–1307.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2003.11.023>
17. Llaudet, E., Hatz, S., Droniou, M., & Dale, N. (2005). Microelectrode biosensor for real-time measurement of ATP in biological tissue. *Analytical Chemistry*, *77*(10), 3267–3273.
<https://doi.org/10.1021/ac048106g>
18. Brown, P., & Dale, N. (2002). Spike-independent release of ATP from *Xenopus* spinal neurons evoked by activation of glutamate receptors. *The Journal of Physiology*, *540*(3), 851–860.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.013193>
19. Anselmi, F., Hernandez, V. H., Crispino, G., Seydel, A., Ortolano, S., Roper, S. D., Kessar, N., Richardson, W., Rickheit, G., Filippov, M. A., Monyer, H., & Mammano, F. (2008). ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second messengers propagate Ca²⁺ signals across the inner ear. *Proceedings of the National Academy of Sciences*

- of the United States of America*, 105(48), 18770–18775.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0800793105>
20. Huang, Y.-J., Maruyama, Y., Dvoryanchikov, G., Pereira, E., Chaudhari, N., & Roper, S. D. (2007). The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(15), 6436–6441. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611280104>
21. Gourine, A. V., Llaudet, E., Dale, N., & Spyer, K. M. (2005). ATP is a mediator of chemosensory transduction in the central nervous system. *Nature*, 436(7047), 108–111. <https://doi.org/10.1038/nature03690>
22. Pellegatti, P., Raffaghello, L., Bianchi, G., Piccardi, F., Pistoia, V., & Di Virgilio, F. (2008). Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PloS One*, 3(7), e2599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002599>
23. Melani, A., Turchi, D., Vannucchi, M. G., Cipriani, S., Gianfriddo, M., & Pedata, F. (2005). ATP extracellular concentrations are increased in the rat striatum during in vivo ischemia. *Neurochemistry International*, 47(6), 442–448. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2005.05.014>
24. Rajendran, M., Dane, E., Conley, J., & Tantama, M. (2016). Imaging adenosine triphosphate (ATP). *The Biological Bulletin*, 231(1), 73–84. <https://doi.org/10.1086/689592>
25. Giepmans, B. N. G., Adams, S. R., Ellisman, M. H., & Tsien, R. Y. (2006). The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5771), 217–224. <https://doi.org/10.1126/science.1124618>
26. Arai, S., Kriszt, R., Harada, K., Looi, L.-S., Matsuda, S., Wongso, D., Suo, S., Ishiura, S., Tseng, Y.-H., Raghunath, M., Ito, T., Tsuboi, T., & Kitaguchi, T. (2018). RGB-color intensimetric indicators to visualize spatiotemporal dynamics of ATP in single cells. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*. <https://doi.org/10.1002/anie.201804304>
27. Imamura, H., Nhat, K. P. H., Togawa, H., Saito, K., Iino, R., Kato-Yamada, Y., Nagai, T., & Noji, H. (2009). Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(37), 15651–15656. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904764106>

28. Tantama, M., Martínez-François, J. R., Mongeon, R., & Yellen, G. (2013). Imaging energy status in live cells with a fluorescent biosensor of the intracellular ATP-to-ADP ratio. *Nature Communications*, 4(1), 2550. <https://doi.org/10.1038/ncomms3550>
29. Zala, D., Hinckelmann, M.-V., Yu, H., Lyra da Cunha, M. M., Liot, G., Cordelières, F. P., Marco, S., & Saudou, F. (2013). Vesicular glycolysis provides on-board energy for fast axonal transport. *Cell*, 152(3), 479–491. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.029>
30. Conley, J. M., Radhakrishnan, S., Valentino, S. A., & Tantama, M. (2017). Imaging extracellular ATP with a genetically-encoded, ratiometric fluorescent sensor. *PloS One*, 12(11), e0187481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187481>
31. Lobas, M. A., Tao, R., Nagai, J., Kronschräger, M. T., Borden, P. M., Marvin, J. S., Looger, L. L., & Khakh, B. S. (2019). A genetically encoded single-wavelength sensor for imaging cytosolic and cell surface ATP. *Nature Communications*, 10(1), 711. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08441-5>
32. Yegutkin, G. G. (2008). Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783(5), 673–694. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.024>
33. Chudakov, D. M., Matz, M. V., Lukyanov, S., & Lukyanov, K. A. (2010). Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiological Reviews*, 90(3), 1103–1163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2009>
34. Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry*, 67(1), 509–544. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>
35. Berg, J., Hung, Y. P., & Yellen, G. (2009). A genetically encoded fluorescent reporter of ATP:ADP ratio. *Nature Methods*, 6(2), 161–166. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1288>
36. Kato-Yamada, Y., & Yoshida, M. (2003). Isolated epsilon subunit of thermophilic F1-ATPase binds ATP. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(38), 36013–36016. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306140200>
37. Namiki, S., Sakamoto, H., Inuma, S., Iino, M., & Hirose, K. (2007). Optical glutamate sensor for spatiotemporal analysis of synaptic transmission: Visualization of glutamate dynamics. *The European Journal of Neuroscience*, 25(8), 2249–2259. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05511.x>

38. Takikawa, K., Asanuma, D., Namiki, S., Sakamoto, H., Ariyoshi, T., Kimpara, N., & Hirose, K. (2014). High-throughput development of a hybrid-type fluorescent glutamate sensor for analysis of synaptic transmission. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 53(49), 13439–13443. <https://doi.org/10.1002/anie.201407181>
39. Dunwiddie, T. V., & Masino, S. A. (2001). The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, 24(1), 31–55. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.31>
40. Pleiner, T., Bates, M., & Görlich, D. (2018). A toolbox of anti-mouse and anti-rabbit IgG secondary nanobodies. *The Journal of Cell Biology*, 217(3), 1143–1154. <https://doi.org/10.1083/jcb.201709115>
41. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S. & Baker, D. L. (2014). *Cellular and Molecular Immunology Study smart with student consult ; studentconsult.com* 8. ed., inter- nat. ed. eng. 535 pp. isbn: 978-0-323-22275-4 (Elsevier Saunders, Philadelphia, Pa., 2015).
42. Antibody Structure. (2015). In *Antibodies for Infectious Diseases* (S. 49–62). American Society of Microbiology.
43. Wesolowski, J., Alzogaray, V., Reyelt, J., Unger, M., Juarez, K., Urrutia, M., Cauerhff, A., Danquah, W., Rissiek, B., Scheuplein, F., Schwarz, N., Adriouch, S., Boyer, O., Seman, M., Licea, A., Serreze, D. V., Goldbaum, F. A., Haag, F., & Koch-Nolte, F. (2009). Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Medical Microbiology and Immunology*, 198(3), 157–174. <https://doi.org/10.1007/s00430-009-0116-7>
44. Dundas, C. M., Demonte, D., & Park, S. (2013). Streptavidin-biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(21), 9343–9353. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5232-z>
45. Robinson, T. R. (2001). *Klonierung*. Spektrum.de. Abgerufen 07. April 2023, von <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/klonierung/6449>
46. Quail, Michael A. (2005): DNA Cloning, in *Encyclopedia of Life Sciences*, Abgerufen 09. April 2023, von <https://doi.org/10.1038/npg.els.0005344>

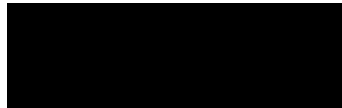
47. *Klonierung und Synthetische Biologie in der Molekularbiologie*. (2015, April 6). New England Biolabs GmbH, Abgerufen 07. April 2023, von <https://www.neb-online.de/klonierung-synthetische-biologie/>
48. Trun, N., & Trempy, J. (2003). *Fundamental Bacterial Genetics*. Blackwell Science.
49. Katharina Klose, S. (2021). *Construction of Fluorescent Sensor Molecules for the Detection of Local Concentrations of Extracellular ATP*.
50. *Mikrovolumen-Spektralphotometer, NanoDrop™ 2000/2000c*. (2023). VWR. Abgerufen 09. April 2023, von <https://de.vwr.com/store/product/15960651/mikrovolumen-spektralphotometer-nanodroptm-2000-2000c>
51. Kalbas, M., & Schäfer, E. (2020). *Skript Praktikum „Molekularbiologie“ SS20 HAW*.
52. Avery, O. T., MacLeod, C. M., & McCarty, M. (1917). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. In *Die Entdeckung der Doppelhelix* (S. 97–120). Springer Berlin Heidelberg.
53. Scherr, M., & Scherr, D. (2003). Meilenstein der Molekularbiologie: Das „Avery-Experiment“. *Biologie in unserer Zeit*, 33(1), 58–61. <https://doi.org/10.1002/biuz.200390010>
54. Ullrich, O. (2020) *Skript „Molekularbiologie“ SS20 HAW Hamburg*.
55. Zur Hausen, H. (1967). Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells. *Journal of Virology*, 1(6), 1174–1185. <https://doi.org/10.1128/JVI.1.6.1174-1185.1967>
56. Shein, H. M., & Enders, J. F. (1962). Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 48(7), 1164–1172. <https://doi.org/10.1073/pnas.48.7.1164>
57. Lottspeich, F. und Engels, J.W.: *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, 2. Auflage 2006, ISBN 3-8274-1520-9
58. Kilisch, M., Götzke, H., Gere-Becker, M., Crauel, A., Opazo, F., & Frey, S. (2021). Discovery and characterization of an ALFA-tag-specific affinity resin optimized for protein purification at low

- temperatures in physiological buffer. *Biomolecules*, 11(2), 269. <https://doi.org/10.3390/biom11020269>
59. Götzke, H., Kilisch, M., Martínez-Carranza, M., Sograte-Idrissi, S., Rajavel, A., Schlichthaerle, T., Engels, N., Jungmann, R., Stenmark, P., Opazo, F., & Frey, S. (2019). The ALFA-tag is a highly versatile tool for nanobody-based bioscience applications. *Nature Communications*, 10(1), 4403. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12301-7>
60. *Protein clean-up technical handbook*. (2016). Thermofisher.com. Abgerufen 14. April 2023, von <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/protein-clean-up-technical-handbook.pdf>
61. Anspach, B. (2020) „ARV-P Skript“ WS20/21 HAW Hamburg.
62. *The life science business of Merck KGaA, Darmstadt, Germany operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada*. (2020). Sigmaaldrich.com. Abgerufen 17. April 2023, von <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/302/950/protein-blotting-handbook-pg4967en-mk.pdf>
63. *Maleimid-Markierung von Proteinen und anderen thiolhaltigen Biomolekülen*. (o. J.). Lumiprobe.com. Abgerufen 19. April 2023, von <https://de.lumiprobe.com/protocols/protein-maleimide-labeling>
64. Rich, R. L., & Myszka, D. G. (2007). Higher-throughput, label-free, real-time molecular interaction analysis. *Analytical biochemistry*. Band 361, Nummer 1, S. 1–6, ISSN 0003-2697. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.10.040> PMID 17145039.
65. J. Fransson, A. Teplyakov, G. Raghunathan, E. Chi, W. Cordier, T. Dinh, Y. Feng, J. Giles-Komar, G. Gilliland, B. Lollo, T. J. Malia, W. Nishioka, G. Obmolova, S. Zhao, Y. Zhao, R. V. Swanson, J. C. Almagro (2010). *Human framework adaptation of a mouse anti-human IL-13 antibody*. In: *Journal of molecular biology*. Band 398, Nummer 2, S. 214–231, ISSN 1089-8638. doi:[10.1016/j.jmb.2010.03.004](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.03.004). PMID 20226193.
66. Janeway, C., Travers, P., Walport, M., & Hunt, S. (1997). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* (3. Auflage). Garland Publishing, Inc. ISBN: 0-443-05964-0
67. Schrödel, A. (2010). Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer. *Biologie in unserer Zeit*, 40(5), 298–298. <https://doi.org/10.1002/biuz.201090074>

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die von mir vorgelegte Arbeit ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst wurde. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Arbeiten anderer entnommen sind, habe ich unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Die Arbeit hat mit gleichem Inhalt bzw. in wesentlichen Teilen noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen und wurde auch noch nicht veröffentlicht.

Unterschrift:



Ort und Datum:

Anhang

1 Klonierte DNA-Sequenzen:

1. pH14N8_TP1170_alfa_myc_alfa_ATPOS

ATGAGCAAGCATCACCATCATTTCAGGCCATCACCATACCGGACACCACCATCATTTCAGGC
AGTCATCACCATACCGGCGGATCATCCGGAGGTATGAGCTCAGGATCTAACGGATCTAC
GGTTCCTGGTACTGGTAATAGCGGGACCGGAACCATGATTAAAGTAAAGACTCTGACCG
GCAAGGAAATTGAGATCGACATCGAACCGACCGACACCATCGATCGTATCAAAGAACGT
GTGGAGGAAAAAGAAGGCATTCCTCCGGTTCAGCAGCGTCTCATTACGCGGGTAAACA
GCTTGCAGATGACAAAACCGCCAAAGATTACAATATCGAGGGCGGTAGCGTACTGCACC
TTGTTCTGGCCCTGCGTGGTGGCGCCATGGCCCAAGTACAATTGGTTGAATCAGGAGGA
GGATGGGTTCAACCCGGTGGCAGCCTTCGCTTGAGCTGCGCCGCATCGGGCTTTACATTT
AGCGATACAGCGATGATGTGGGTGCGTCAAGCACCGGAAAAGGCCGTGAATGGGTGGC
GGCCATCGACACCGGCGGCGGCTATACCTATTACGCCGATTCTGTAAAAGGACGCTTTAC
TATTAGCCGTGATAATGCGAAGAATACCCTTTACTTACAGATGAATTCCTTGAAGCCCGA
AGATACTGCGCGTTATTATTGCGCAAAGACTTATTCGGGCAACTATTACTCAAATTATAC
TGTCGCAAATTACGGAACACTACCGGTCGTGGTACATTAGTAACCGTGAGTAGCCCGAGTCG
TTTAGAAGAGGAGCTCCGTCGTCGTCTCACGGAGCCCACCGCCGCAATGAAAACCATTC
ATGTGTCCGTTACGACCCCGGATGGTCCCGTATACGAAGACGATGTCGAGATGGTGTGAG
TTAAGGCCAAAAGTGGCGAGTTGGGCATCCTTCCAGGTCATATCCCCCTGAAAAGCCCCGT
TGGAGATTTTCGGCTGCACGTCTCAAGAAGGGCGGGAAGACGCAGTACATCGCAGTTAGC
GGCGGCAACTTAGAGGTACGTCTGACAAAGTGACGATTACGGCCCAAGCCGCCGAGCG
CGCGGAAGATATTGACGTAAGTGCAGTGCAGAAAGCTGCCAAAGAACGTGCCGAACGTCGTC
TGTGTAGCCAACAGGATGACATCGATTTTAAGCGTGCCGAACACTGGCCCTGAAGCGTGCC
ATGAACCGCTTAAGTGTGCGCCGAGATGAAAGTTGATTAA

2. pCSE2.5_TP1170_alfa_ATPOS

ATGGGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGCGCGCACTCCATGGCACAA
GTTTCAGCTGGTTGAATCTGGGGGGGGATGGGTCCAACCTGGCGGCAGCCTTCGGCTGTCT
TGCGCTGCCAGCGGATTCACATTTCCGACACGGCTATGATGTGGGTCCGCCAAGCACCA
GGTAAGGGCCGGGAGTGGGTGCGCAGCAATAGATACGGGCGGCGGGTACACATATTATGC
CGACTCTGTAAAGGTCGTTTTACCATTTCGCGGATAACGCCAAGAACACCCTGTATTT
ACAAATGAACAGTCTGAAACCAGAAGATACTGCAAGATACTATTGTGCTAAAACCTATT
CCGGCAATTATTACAGCAACTATACTGTGGCAAACACTACGGCACAACAGGTCGAGGAACT
CTTGTAAACAGTCTCATCAGCGGCCGCAAGCGGCGGAGCGGACCATCCCGGTTGGAAGA
GGAACCTGAGAAGACGCTTACTGAACTGGAGGAGGGAGTGGCGGTGGTGGAAAGTGGC
ATGAAAACAATCCACGTAAGTGTAAAGTCCAGATGGGCGGTATATGAGGACGACGT
TGAGATGGTATCCGTCAAAGCAAATCCGGGAGAACTCGGCATTCTCCCTGGCCATATACC
CTTAAAAGCTCCCCTGGAGATTAGTGCCGCCCAGTGAAGAAAAGGCGGTAAAACCTCAGT
ACATCGCGGTATCTGGCGGCAATCTGGAAGTAAGACCGGATAAGGTCACAATTACGGCT
CAAGCCGCAGAGCGCGCCGAGGACATTGACGTTTTAAGGGCCAAAGCGCCAAAGAAA
GGGCTGAACGGCGTCTCTGCAGTCAACAAGATGACATAGATTTCAAACGCGCAGAATC
GCACTCAAGAGGGCTATGAACAGATTATCTGTGCTGAGATGAAATGA

3. pH14N8_ATPOS_alfa_SBP

ATGAGCAAGCATCACCATCATTTCAGGCCATCACCATACCGGACACCACCATCATTTCAGGC
AGTCATCACCATACCGGCGGATCATCCGGAGGTATGAGCTCAGGATCTAACGGATCTAC
GGTTCTGGTACTGGTAATAGCGGGACCGGAACCATGATTAAGTAAAGACTCTGACCG
GCAAGGAAATTGAGATCGACATCGAACCGACCGACACCATCGATCGTATCAAAGAACGT
GTGGAGGAAAAAGAAGGCATTCCTCCGGTTCAGCAGCGTCTCATTACGCGGGTAAACA
GCTTGCAGATGACAAAACCGCCAAAGATTACAATATCGAGGGCGGTAGCGTACTGCACC
TTGTTCTGGCCCTGCGTGGTGGCGCCGGCAAACGATCCATGTATCCGTAACGACTCCA
GATGGACCGGTCTATGAAGATGATGTGAGATGGTCTCGGTCAAAGCTAAATCTGGAGA
ACTTGGTATCTTACCGGGTCATATCCCTCTGAAAGCCCCACTGGAGATATCTGCCGCGCG
CCTGAAGAAGGGCGGCAAGACTCAGTATATAGCTGTATCCGGTGGCAACCTGGAAGTTA
GACCAGACAAGGTCACGATTACCGCCCAGGCCGCGAAGCGGCAGAGGATATTGACGTA
CTTCGCGCAAAGCGGCCAAAGAGCGGGCGGAACGGAGATTATGTAGTCAACAGGATG
ATATAGATTTTAAACGTGCGGAGTTGGCCCTTAAGCGTGCCATGAACCGTTTATCAGTTG
CGGAAATGAAAGGGGGGGGTAGCGGTGGAGGAGGAAGTGGTGGAGCGGCCGCTCCTTC
GCGCCTTGAAGAGGAGCTTCGCCGCGGCTTACAGAGCCGGGTGGTGGTTCAGGTGGTG
GATCCGGTGGTGGTAGCATGGATGAAAAGACAACCTGGCTGGCGAGGCGGTCATGTGGTC
GAGGGTCTCGCTGGAGAGCTCGAGCAATTACGCGCACGCCTGGAGCACCATCCCCAAGG
ACAGCGCGAGCCTTAA

4. pCSE2.5_ATPOS_alfa_SBP

ATGGGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGCGCGCACTCCATGGCAAAA
ACCATACACGTGAGCGTCACAACCCAGATGGCCCTGTTTATGAGGACGATGTGCGAAAT
GGTCTCCGTGAAAGCTAAATCCGGTGAAGTTCGGGATTCTTCCAGGTACATTCCACTGAA
GGCCCCACTTGAATATCTGCAGCCCGCCTGAAGAAGGGCGGTAAAACCCAATATATCG
CCGTGAGCGGCGGTAACCTCGAGGTCCGGCCGGACAAAGTGACGATCACCGCTCAGGCG
GCTGAGCGGGCTGAGGACATCGATGTCTTGCAGCGAAAGCTGCCAAGGAGCGAGCAGA
GCGTGCAGCTTTGTTCCCAACAAGATGATATCGATTTTAAAGCGCGCGGAGCTGGCACTGAA
GCGTGCAGTGAACCGCTTATCCGTGCGAGAAATGAAAGGCGGTGGATCAGGTGGGGGGG
GTTCCGGCGGCGCGGCCGCACCGAGTAGGCTCGAAGAAGAGCTCCGGCGGCGTCTGACA
GAGCCCGGCGGTGGAAGCGGCGGTGGATCCGGTGGCGGCTCAATGGACGAAAAGACTA
CCGGATGGCGCGGCGGCCACGTAGTTGAAGGGTTAGCAGGCGAACTCGAACAGCTCCGC
GCTCGGTTGGAGCATCACCTCAAGGTCAGAGAGAAACCTTAA

5. pCSE2.5_ATPOS_Sortase

ATGGGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGCGCGCACTCCATGGCTAAA
ACAATCCACGTCTCCGTGACGACTCCTGATGGTCCCGTATATGAGGACGACGTAGAGATG
GTCAGTGTTAAAGCTAAAAGTGGGGAACCTGGCATTTTACCGGGCCATATTCCGCTGAAA
GCTCCTCTCGAGATTAGTGCTGCCAGGCTTAAGAAAGGCGGGAAAACCTCAGTACATCGC
TGCTCCGGCGGCAATCTGGAAGTCAGACCAGATAAGGTTACCATTACTGCACAAGCCG
CAGAGAGGGCAGAGGACATTGACGTGTTGCGAGCAAAGCAGCTAAAGAACGTGCTGA
AAGAAGGCTCTGCAGCCAACAAGATGACATCGATTTCAAACGAGCTGAACTGGCACTGA
AGAGGGCTATGAACCGACTCTCAGTTGCCGAGATGAAAGCGGCCGCTGGCGGCGGTAGC
GGCCTGCCTGAGACGGGTGGTGGTGGGCATCATCACCATCATCATTGA

Anhang

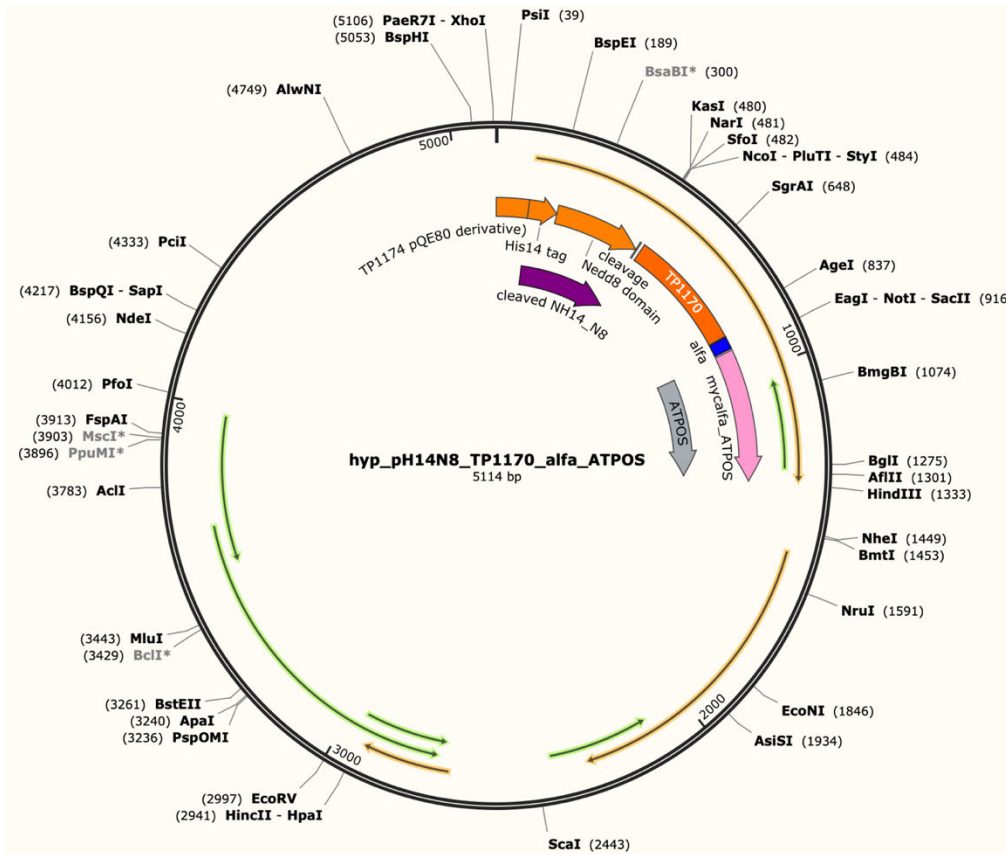


Abbildung 34: Gen-Karte pH14N8_TP1170_alfa_ATPOS. Erstellt mit Snap Gene.

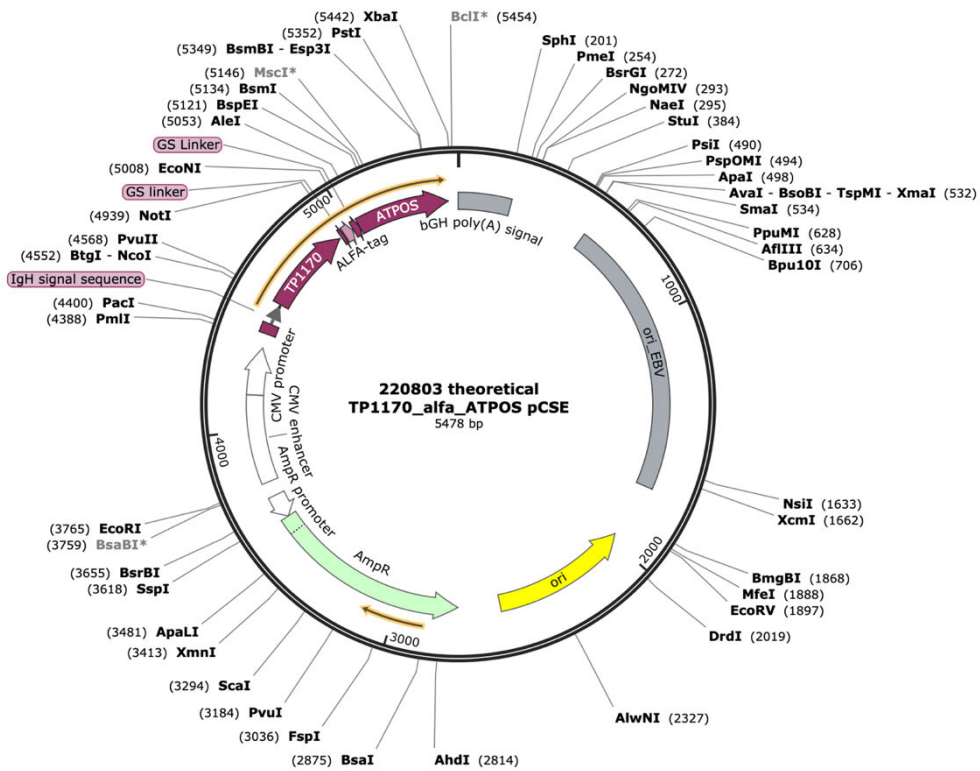


Abbildung 35: Gen-Karte pCSE2.5_TP1170_alfa_ATPOS. Erstellt mit Snap Gene.

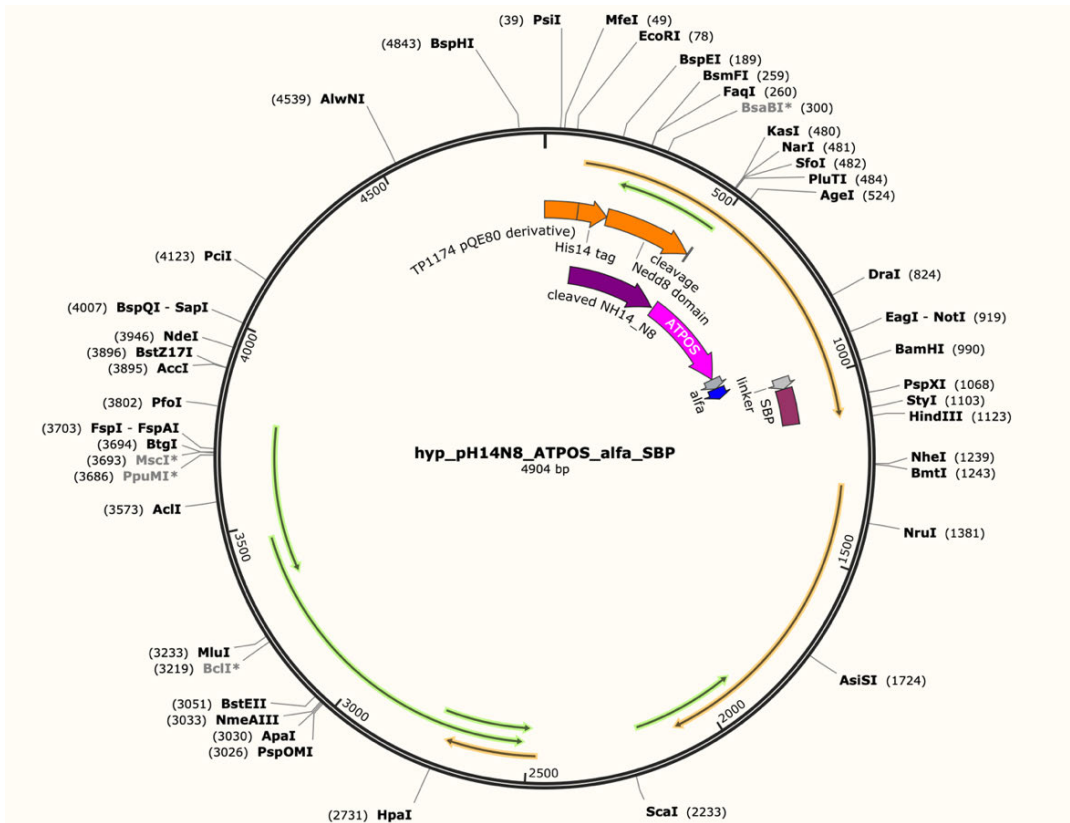


Abbildung 36: Gen-Karte pH14N8_ATPOS_alfa_SBP. Erstellt mit Snap Gene.

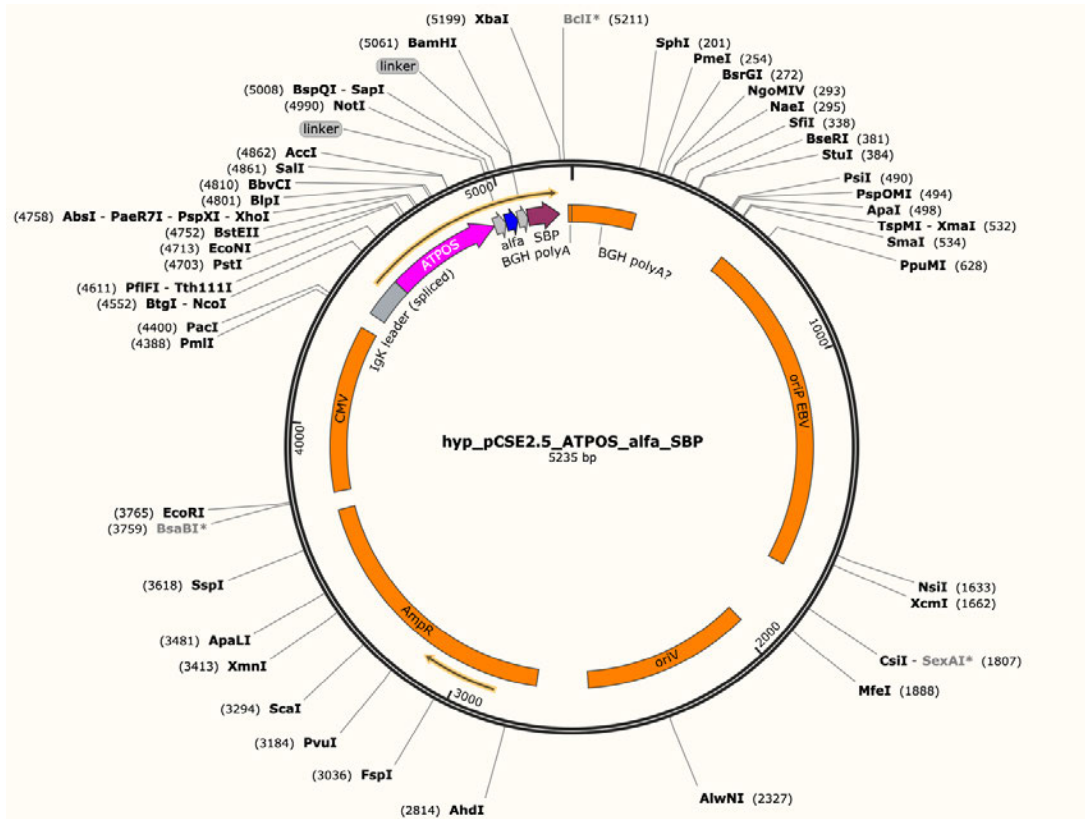


Abbildung 37: Gen-Karte pCSE2.5_ATPOS_alfa_SBP. Erstellt mit Snap Gene.

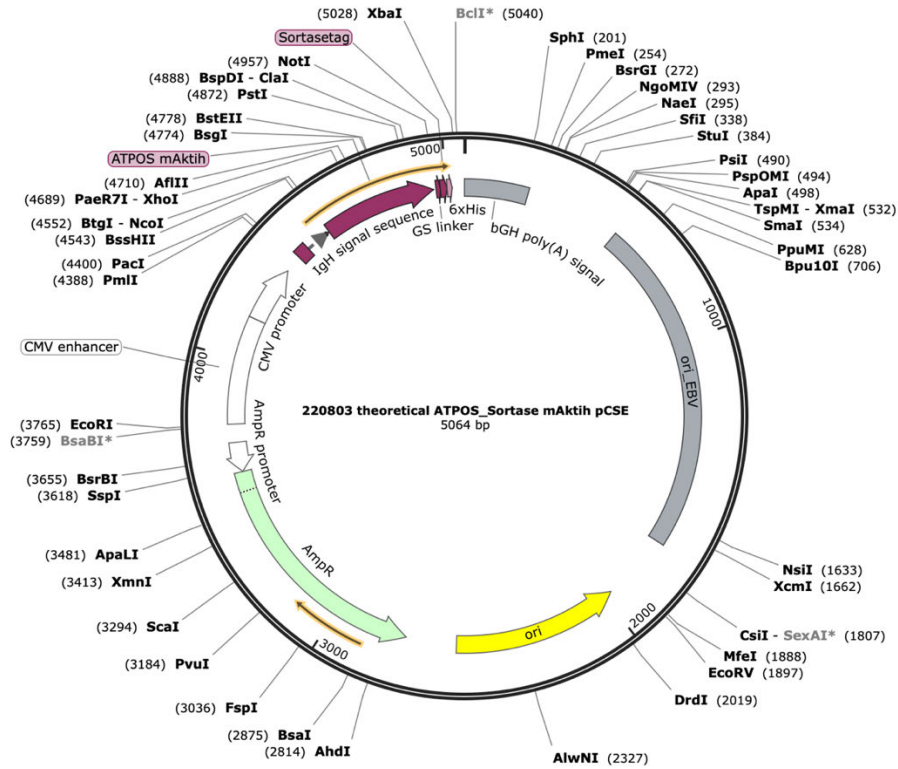


Abbildung 38: Gen-Karte pCSE2.5_ATPOS_Sortase. Erstellt mit Snap Gene.

2 Verdauter DNA-Fragmente:

Tabelle 25: Übersicht verdauter Insert-DNA-Fragmente 1.

1) TP1170_alfa_ATPOS_E.coli		2) TP1170_alfa_ATPOS_HEK	
TP1170_alfa	16 µL	220803TP1170_alfa_ATPOS	16 µL
10x CutSmart Puffer	2 µL	10x CutSmart Puffer	2 µL
NcoI - HF (High fidelity)	1 µL	NcoI - HF	1 µL
NotI - HF	1 µL	Xba I	1 µL
Gesamt	20 µL	Gesamt	20 µL
3) ATPOS_alfa_SBP_E.coli		4) ATPOS_alfa_SBP_HEK	
ATPOS_SBP_E.coli	16 µL	ATPOS_15GS_alfa_SBP_HEK	16 µL
10x CutSmart Puffer	2 µL	10x CutSmart Puffer	2 µL
Kas I	1 µL	NcoI - HF	1 µL
Hind III - HF	1 µL	Xba I	1 µL
Gesamt	20 µL	Gesamt	20 µL

Tabelle 26: Übersicht verdauter Insert-DNA-Fragmente 2.

5) ATPOS_Sortase

220803ATPOS_sortasemAktih	16 µL
10x CutSmart Puffer	2 µL
NcoI - HF	1 µL
Xba I	1 µL
<hr/>	
Gesamt	20 µL

Tabelle 27: Übersicht verdauter Vektoren.

1) pH14N8_myc_alfa_ATPOS

pH14N8_myc_alfa_ATPOS	6,8 µL
10x CutSmart Puffer	2 µL
NcoI- HF	1 µL
NotI – HF	1 µL
<i>ddH₂O</i>	+ 9,2 µL
<hr/>	
Gesamt	20 µL

2) pH14N8_TP1170_alfa_ATPOS

pH14N8_TP1170_alfa_ATPOS	16 µL
10x CutSmart Puffer	2 µL
Kas I	1 µL
Hind III - HF	1 µL
<hr/>	
Gesamt	20 µL

3) pCSE2.5_s+16 dim (dimer)_Anti ART2.2_rbFc # FS-439

pCSE2.5_s+16 dim (dimer)_Anti ART2.2_rbFc	3 µL
10x CutSmart Puffer	2 µL
Nco I - HF	1 µL
Xba I	1 µL
<i>ddH₂O</i>	+ 13 µL
<hr/>	
Gesamt	20 µL