

Eine kritische Evaluierung FRET-basierter Biosensoren als Werkzeuge für die quantitative Metabolitanalytik

Roland Moussa

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Bio- und Geowissenschaften (IBG)
Biotechnologie (IBG-1)

Eine kritische Evaluierung FRET-basierter Biosensoren als Werkzeuge für die quantitative Metabolitanalytik

Roland Moussa

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health

Band / Volume 54

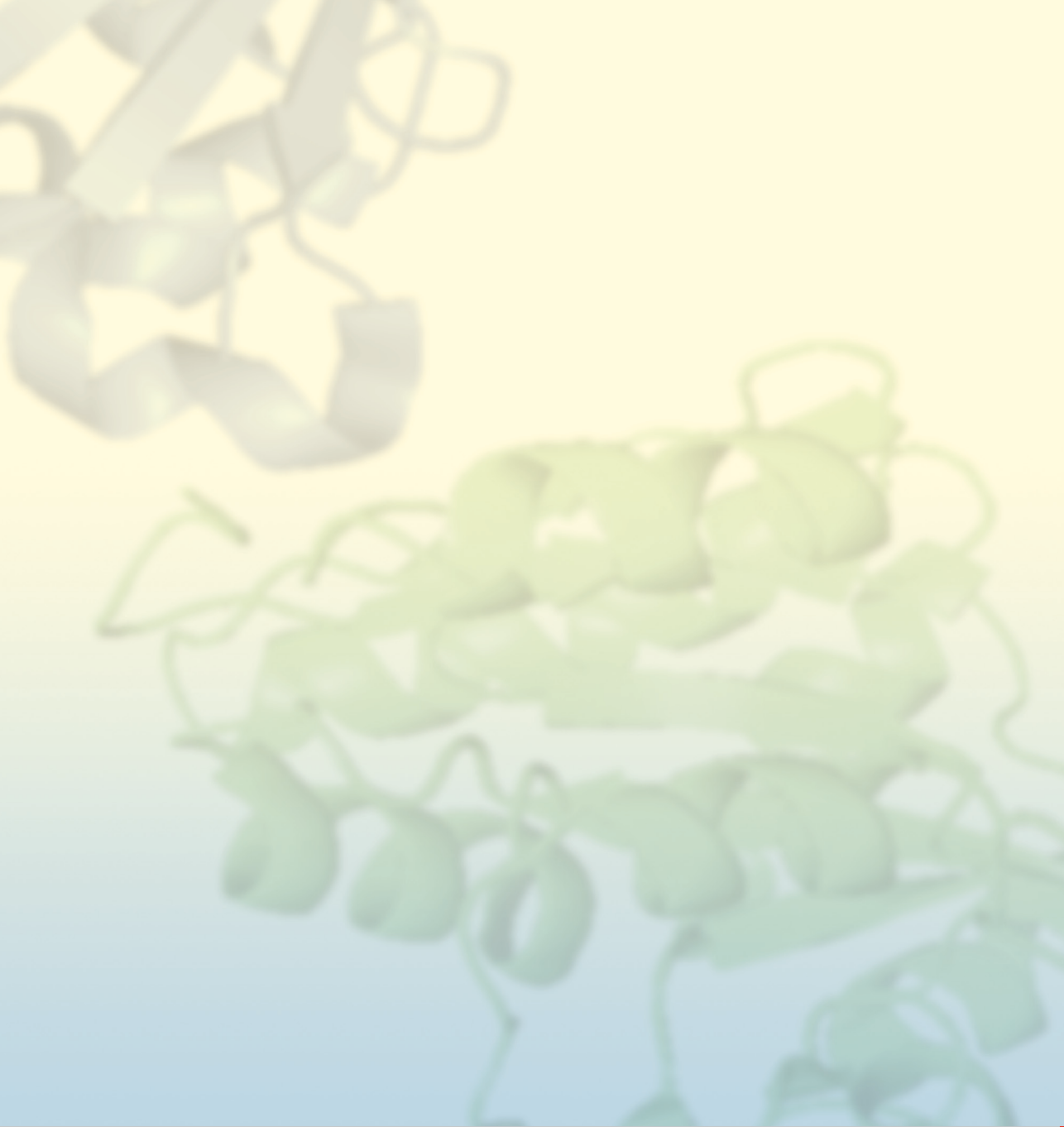
ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-792-4

Inhaltsverzeichnis

I.	Abstract	6
II.	Kurzfassung.....	7
III.	Abkürzungsverzeichnis.....	8
IV.	Abbildungsverzeichnis.....	9
V.	Tabellenverzeichnis.....	13
1	Einleitung.....	14
1.1	<i>Grundlagen der Fluoreszenz</i>	14
1.1.1	Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)	16
1.1.2	Fluoreszenzlebensdauer Messungen	17
1.2	<i>Fluoreszierende Proteine</i>	18
1.2.1	Das Grün fluoreszierende Protein (GFP) aus <i>Aequorea victoria</i>	18
1.2.2	<i>Flavin-mononucleotid-basiertes</i> Fluoreszenzprotein (FbFP)	20
1.3	<i>Periplasmatische Bindeproteine</i>	21
1.3.1	D-Galactose/ D-Glucose-Bindeprotein (GGBP)	22
1.3.2	Maltose-Bindeprotein (MBP)	23
1.4	<i>Genetisch kodierte FRET-Biosensoren</i>	24
1.5	<i>Makromolekular Crowding</i>	27
2	Zielsetzung.....	31
3	Ergebnisse und Diskussion.....	33
3.1	<i>Charakterisierung der gereinigten Sensorproteine.....</i>	33
3.1.1	Kultivierung Biosensoren.....	33
3.2	<i>Charakterisierung der Biosensoren und Fluoreszenzproteine</i>	35
3.2.1	Einfluss des pH-Werts auf das Sensorsignal.....	35
3.2.2	Einfluss der Ionenstärke auf das Sensorsignal	38
3.2.3	Einfluss verschiedener Puffersalze auf das Sensorsignal	39
3.2.4	Einfluss von Salzen und Spurenelementen auf das Sensorsignal.....	40
3.2.5	Einfluss verschiedener Zellmetabolite auf das Sensorsignal.....	44

3.2.6	Messungen in <i>E. coli</i> Rohzelleextrakt	52
3.2.7	Einfluss von <i>molecular crowding</i> auf die Affinität der Biosensoren.....	55
3.2.8	<i>EcFbFP</i> als alternativer FRET-Donor	63
3.2.9	Neue Sensorkonstrukte	67
3.2.10	Photophysikalische Beobachtungen.....	70
4	Zusammenfassende Diskussion und Ausblick	73
5	Material und Methoden	78
5.1	<i>Geräte</i>	78
5.2	<i>Chemikalien</i>	80
5.3	<i>Medien, Puffer und Lösungen</i>	81
5.4	<i>Biologisches Material</i>	85
5.5	<i>Kultivierung und Reinigung der Biosensor-Proteine</i>	90
5.6	<i>Analytik</i>	93
6	Anhang.....	100
7	Erklärung.....	105
8	Literaturverzeichnis.....	107



Gesundheit / Health
Band / Volume 54
ISBN 978-3-89336-792-4

