(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

BERICHTIGTE FASSUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
31. Dezember 2008 (31.12.2008)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/000920 A9

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12Q 1/02 (2006.01) *G01N 33/58* (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2008/058288

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. Juni 2008 (27.06.2008)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2007 031 533.5 27. Juni 2007 (27.06.2007) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **TECHNISCHE UNIVERSITÄT DRESDEN** [DE/DE]; Mommsenstrasse 11, 01069 Dresden (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **OSTERMANN, Kai** [DE/DE]; Zwickauer Str. 103, 01187 Dresden (DE). **POMPE, Wolfgang** [DE/DE]; Buchenweg 15, 01737 Hartha (DE). **WERSING, Dagmar** [DE/DE]; Fichtenstr. 5, 01097 Dresden (DE). **LAKATOS, Mathias** [DE/DE]; Röhrhofsgasse 6, 01067 Dresden (DE). **MERTIG, Michael** [DE/DE]; Altwölfnitz 6, 01169 Dresden (DE). **RÖDEL, Gerhard** [DE/DE]; Eulenweg 8, 85757 Karlsfeld (DE). **THIERFELDER, Simone** [DE/DE]; Gubener Str. 22, 01237 Dresden (DE).

(74) Anwalt: **PATENTANWÄLTE KAILUWEIT & UHLEMANN**; Bamberger Str. 49, 01187 Dresden (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:
— *mit internationalem Recherchenbericht*
— *mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich*

(48) Datum der Veröffentlichung dieser berichtigten Fassung: 26. März 2009

(15) Informationen zur Berichtigung:
siehe Mitteilung vom 26. März 2009

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR DETECTING A SUBSTANCE BY MEANS OF PARTICLE PLASMON RESONANCE (PPR) OR PARTICLE-MEDIATED FLUORESCENCE BASED ON CELL SURFACE POLARIZATIONS

(54) Bezeichnung: EINRICHTUNG UND VERFAHREN ZUM NACHWEIS EINER SUBSTANZ MITTELS PARTIKEL-PLASMONEN- RESONANZ (PPR) ODER PARTIKEL-VERMITTELTER FLUORESZENZ AUF DER BASIS VON ZELLOBERFLÄCHENPOLARISIERUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to devices and methods for detecting a substance by cell surface polarizations and the detection thereof by means of PPR or particle-mediated fluorescence. The device for detecting a substance by cell surface polarization according to the invention has cells, wherein a gene the expression of which leads to the polarized presentation of a protein on the surface of the cell is placed under the control of a promotor which can be regulated by the substance to be detected, nanoparticles which are functionalized with a molecule which can bind specifically to the surface-exposed protein, and at least one optical measurement device, such that an accumulation of the nanoparticles on the surface of the cells can be detected by particle plasmon resonance or particle-mediated fluorescence.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Einrichtungen und Verfahren zum Nachweis einer Substanz durch Zelloberflächenpolarisierung und deren Detektion mittels PPR oder Partikel-vermittelter Fluoreszenz. Die erfindungsgemäße Einrichtung zum Nachweis einer Substanz durch Zelloberflächenpolarisierung umfasst Zellen, bei denen ein Gen, dessen Expression zu der polarisierten Präsentation eines Proteins auf der Oberfläche von Zellen führt, unter die Kontrolle eines durch die nachzuweisende Substanz regulierbaren Promotors gestellt ist, Nanopartikel, die mit einem Molekül funktionalisiert sind, das spezifisch an das Oberflächenexponierte Protein binden kann, und wenigstens eine optische Messeinrichtung, so dass durch Partikel-Plasmonen-Resonanz oder Partikel-vermittelte Fluoreszenz eine Zusammenlagerung der Nanopartikel auf der Oberfläche der Zellen nachgewiesen werden kann.

WO 2009/000920 A9

Einrichtung und Verfahren zum Nachweis einer Substanz mittels Partikel-Plasmonen-Resonanz (PPR) oder Partikel-vermittelter Fluoreszenz auf der Basis von Zelloberflächenpolarisierungen

Die Erfindung betrifft Einrichtungen und Verfahren zum Nachweis einer Substanz durch Zelloberflächenpolarisierung und deren Detektion mittels PPR oder Partikel-vermittelter Fluoreszenz.

Bisherige Systeme erlauben es nicht, von lebenden Zellen detektierte Signale so zu wandeln, dass sie sich mittels PPR oder Partikel-vermittelter Fluoreszenz in unmittelbarer Nachbarschaft der lebenden Zellen auf einfache Weise detektieren lassen.

Aufgabe der Erfindung ist es, eine Einrichtung und ein Verfahren zum Nachweis einer Substanz mittels eines biologischen Systems unter Nutzung von Partikel-Plasmonen-Resonanz (PPR) oder Partikel-vermittelter Fluoreszenz bereitzustellen, mit der Zielmoleküle ggf. auch in geringen Konzentrationen detektiert werden können.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst durch eine Einrichtung zum Nachweis einer Substanz durch Zelloberflächenpolarisierung mit den Merkmalen des Anspruchs 1, nämlich mit

a) Zellen, bei denen ein Gen, dessen Expression zu der polarisierten Präsentation eines Proteins auf der Oberfläche von Zellen führt, unter die Kontrolle eines durch die nachzuweisende Substanz regulierbaren Promotors gestellt ist,

b) Nanopartikeln, die mit einem Molekül funktionalisiert sind, das spezifisch an das Oberflächen-exponierte Protein binden kann, und

c) wenigstens einer optischen Messeinrichtung,

so dass durch Partikel-Plasmonen-Resonanz oder Partikel-vermittelte Fluoreszenz eine Zusammenlagerung der Nanopartikel auf der Oberfläche der Zellen nachgewiesen werden kann.

Ein typisches Beispiel der Polarisierung von Oberflächen ist die Ausbildung der immunologischen Synapse. Werden z.B. humane T-Zellen durch die Präsentation eines Antigens aktiviert, kommt es zu einer Umlagerung der vorher auf der Zelloberfläche ubiquitär verteilten T-Zell Rezeptoren zum Punkt der Antigen-Erkennung. Durch die Umlagerung kommt es zu einer starken Akkumulation der T-Zell Rezeptoren in einem begrenzten Areal der Zelloberfläche, der so genannten immunologischen Synapse (van der Merwe, P. A. et al. (2000) *Cytoskeletal polarization and redistribution of cell-surface molecules during T-cell antigen recognition.* Seminars in Immunology 12:5-21).

Ebenfalls zu Polarisierungseffekten bei T-Zellen führen die Aktivierungen von beispielsweise den CD4- und CTLA-4-Rezeptoren (Nguyen, D.H. et al. (2005) *Dynamic reorganization of chemokine receptors, cholesterol, lipid rafts, and adhesion molecules to sites of CD4 engagement.* Experimental Cellular Research 304:559-569; Wei, B. et al. (2007) *CTL-associated antigen-4 ligation induces rapid T-cell polarization that depends on phosphatidylinositol 3-kinase, Vav-1, Cdc42, and myosin light chain kinase.* The Journal of Immunology 179:400-408).

Ein weiteres Beispiel für eine hochgradige Polarisierung eines Biomoleküls an Zelloberflächen nach spezifischer Induktion zeigt *Dictyostelium discoideum.* Es handelt sich um einen einzelligen Schleimpilz, der als Amöbe oder nach Induktion als Zellaggregat bis zu einem vielzelligen Fruchtkörper hin organisiert vorkommen kann. Die Aggregation der Einzelzellen wird chemotaktisch gesteuert und erfordert ein hochgradig reguliertes genetisches Programm, welches letztlich zum Aufbau eines Fruchtkörpers führt. Wird *D. discoideum* einem chemischen Gradienten (z.B. cAMP) ausgesetzt, erfolgt eine Polarisierung der Zelloberfläche. Ein typischer Marker dieser Polarisierung ist das Phospholipid PIP3, welches an der Zelloberfläche zum Punkt der höchsten Konzentration des Gradienten hin spezifisch akkumuliert. Die Akkumulation von PIP3 wird in vielen chemotaktischen Zellen beobachtet (Franca-Koh, J. et al. (2006) *Navigating signaling networks: chemotaxis in Dictyostelium discoideum.* Current Opinion in Genetics and Development 16:333-338).

Ein weiteres Beispiel für ein Protein, das nach Induktion geclustert auf der Zelloberfläche auftritt, ist der Chemokinrezeptor CCR2. CCR2 ist ein membranständiger, G-Protein gekoppelter Rezeptor, der aus der Zelle herausragt. Er wird durch Chemokine aktiviert und

überträgt das Signal über die Plasmamembran, was zur Aktivierung einer nachgeschalteten Signalkaskade führt. CCR2 wird als Antwort auf spezifische Reize z.B. in Lymphozyten oder auch in multipotenten adulten mesenchymalen Stammzellen polarisiert auf der Zelloberfläche präsentiert (Belema-Bedada, F. et al. (2008) *Efficient homing of multipotent adult mesenchymal stem cells depends on FROUNT-mediated clustering of CCR2.* Cell Stem Cell 2:566-575; Nieto, M. et al. (1997) *Polarization of chemokine receptors to the leading edge during lymphocyte chemotaxis.* Journal of Experimental Medicine 186:153-158).

In einer bevorzugten Ausgestaltung führt die durch die nachzuweisende Substanz induzierte Expression des Gens in einer ersten Zelle zu einer polarisierten Präsentation eines Proteins auf der Oberfläche von Zellen eines zweiten Zelltyps. Die entsprechende Ausgestaltung besitzt daher die Merkmale **des Anspruchs 2,** nämlich

- Zellen eines ersten Typs, bei denen ein für ein Pheromon kodierendes Gen unter die Kontrolle eines durch die nachzuweisende Substanz regulierbaren Promotors gestellt ist, so dass durch das Auftreten der nachzuweisenden Substanz die Zellen des ersten Typs das Pheromon sezernieren, und

- Zellen eines zweiten Typs, die für das Pheromon responsiv sind und deren Oberfläche durch das Auftreten des Pheromons polarisiert wird.

Die Einrichtung gemäß Anspruch 2 kann demnach folgendermaßen zusammengefasst werden als eine Einrichtung mit

- Zellen eines ersten Typs, bei denen ein für ein Pheromon kodierendes Gen unter die Kontrolle eines durch die nachzuweisende Substanz regulierbaren Promotors gestellt ist, so dass durch das Auftreten der nachzuweisenden Substanz die Zellen des ersten Typs das Pheromon sezernieren,

- Zellen eines zweiten Typs, die für das Pheromon responsiv sind und deren Oberfläche durch das Auftreten des Pheromons polarisiert wird,

- Nanopartikeln, die mit einem Antikörper funktionalisiert sind, der gegen ein Protein gerichtet ist, das durch das Auftreten des Pheromons auf der Oberfläche der Zellen des zweiten Typs polarisiert exponiert wird, und

- wenigstens einer optischen Messeinrichtung,

so dass durch Partikel-Plasmonen-Resonanz oder optische Fluoreszenz eine messbare Zusammenlagerung der Nanopartikel auf der Zelloberfläche der Hefezellen des zweiten Typs nachgewiesen werden kann.

In der erfindungsgemäßen Einrichtung befinden sich die Zellen in einem flüssigen, bevorzugt wässrigen Medium. Die Zellen der Einrichtung sind dabei entweder suspendiert in Lösung oder immobilisiert auf einem Träger.

Die Lösung befindet sich in einem geeigneten Behältnis, das die messtechnische Erfassung eines von den Zellen ausgesandten Signals gewährleistet.

Der Träger ist ebenfalls so gestaltet, dass von den Zellen ausgesandte Signale durch ein Detektionssystem erfasst werden können.

Die nachzuweisenden Substanzen befinden sich ebenfalls in wässriger Lösung. Für den Nachweis werden die zu testenden Lösungen mit den Zellen der erfindungsgemäßen Einrichtung kontaktiert.

Vorteilhafte Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Einrichtung sind in den Patentansprüchen 3 bis 29 angegeben.

Nach der Weiterbildung des **Patentanspruchs 3** sind die Zellen Hefezellen. Nach der Weiterbildung des **Patentanspruchs 4** sind die Zellen *Saccharomyces cerevisiae* oder *Schizosaccharomyces pombe* Hefezellen.

Bei Hefezellen unterscheidet man zwei so genannte Paarungstypen. Bei der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* sind dies die Paarungstypen α und a, bei der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* Plus und Minus.

Die Hefezellen des ersten Typs sind nach der Weiterbildung des **Patentanspruchs 5** *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen des α-Paarungstyps oder *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen das a-Paarungstyps.

Die Hefezellen des zweiten Typs sind nach der Weiterbildung des **Patentanspruchs 6** *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen das a-Paarungstyps oder *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen des α-Paarungstyps. Die Hefezellen des zweiten Typs verfügen über Rezeptoren sowie eine zugehörige intrazelluläre Signalkaskade zur Weiterleitung des Signals für das Pheromon, welches von den Zellen des ersten Typs gebildet wird.

Die jeweiligen Hefezellen bilden kurze Peptide, sog. Pheromone, um ihrer Umgebung den eigenen Paarungstyp mitzuteilen. So sezernieren z.B. *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen des Paarungstyps α das Pheromon α-Faktor und Zellen des Paarungstyps a das Pheromon a-Faktor. Die Hefezellen besitzen auf ihren Oberflächen Rezeptoren für die Pheromone des jeweils entgegengesetzten Paarungstyps. So sind beispielsweise *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen des Paarungstyps a in der Lage, *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen des Paarungstyps α in ihrer Umgebung wahrzunehmen und umgekehrt.

Nehmen Hefezellen eines Paarungstyps Pheromone des entgegengesetzten Paarungstyps in ihrer Umgebung wahr, wird ein umfangreiches genetisches Programm gestartet, dessen Ziel die Verschmelzung jeweils einer Hefezelle eines Paarungstyps mit einer Hefezelle des entgegengesetzten Paarungstyps unter Bildung einer diploiden Zygote ist.

Erfindungsgemäß werden Hefezellen eines ersten Typs genetisch so verändert, dass ein Gen, das für ein Pheromon kodiert, unter die Kontrolle eines Promotors gestellt ist, der durch ein Signal reguliert wird.

Als Promotor wird in der Genetik eine DNA-Sequenz bezeichnet, die die Expression eines Gens reguliert. Promotoren im Sinne der Erfindung sind bevorzugt diejenigen Bereiche der genomischen DNA, die spezifisch für die Regulation der Expression eines Gens verantwortlich sind, indem sie auf spezifische intra- oder extrazelluläre Signale reagieren und abhängig von diesen Signalen die Expression des unter ihrer Kontrolle liegenden Gens aktivieren oder reprimieren. In Hefen befinden sich diese regulierenden DNA-Bereiche in der Regel auf der 5'-

Seite des Startcodons des betreffenden Gens und haben eine durchschnittliche Länge von 309 bp (Mewes H. W. et al., *Overview of the yeast genome*. Nature (1997) 387, 7-65). Solche regulierenden Bereiche können aber auch weiter als 1000 bp entfernt von der kodierenden Sequenz oder auf der 3'-Seite der kodierenden Sequenz des betreffenden Gens oder sogar innerhalb der transkribierten Sequenz des betreffenden Gens liegen. Setzt man derartige Promotoren an die 5'-Seite des Startcodons eines beliebigen Gens, bevorzugt eines Pheromongens, regulieren sie die Aktivität dieses Gens in Abhängigkeit von den oben genannten spezifischen Signalen.

Das Gen, das für ein Pheromon kodiert, ist nach der Weiterbildung des **Patentanspruchs 7** das *MFα1*-Gen, das *MFα2*-Gen, das *MFA1*-Gen oder das *MFA2*-Gen.

Das unter die Kontrolle eines Promotors eines Gens, das durch ein spezifische Signal reguliert wird, gestellte Pheromongen wird in eine Hefezelle eingebracht. Dabei kann es in der Hefezelle auf einem extrachromosomalen DNA-Molekül vorliegen. Bevorzugt verwendet wird dazu ein Hefe-Expressionsvektor, der bei der Teilung der Hefezelle stabil repliziert wird. Besonders bevorzugt ist ein sogenannter „high copy number" Vektor, der in der Hefezelle in einer großen Anzahl an Kopien vorliegt. Alternativ werden als extrachromosomale DNA-Moleküle auch künstliche Hefechromosomen (yeast artificial chromosomes) verwendet.
In einer anderen Ausführungsform wird das Pheromongen zusammen mit dem Promotor in die chromosomale DNA der Hefezelle integriert. Dadurch wird vorteilhaft sichergestellt, dass alle Nachkommen der Hefezelle ebenfalls das Pheromongen unter Kontrolle des spezifischen Promotors enthalten.
Alternativ werden auch Vektoren genutzt, die in geringerer Kopienzahl oder als einzelner Vektor in Hefen vorliegen, z.B. *ARS-CEN*-Vektoren.

Erkennen die Hefezellen des ersten Typs mittels Rezeptoren eingehende Signale, wird direkt oder indirekt über zwischengeschaltete Signalkaskaden die Transkription des signal-spezifischen Promotors induziert, so dass die Hefezellen des ersten Typs als Antwort auf das eingehende Signal das Pheromon in die Umgebung sezernieren.

Die Hefezellen des zweiten Typs besitzen auf ihrer Oberfläche Rezeptoren für die Pheromone, die durch die Hefezellen des ersten Typs sezerniert werden. Erreicht das sezernierte Pheromon

die umliegenden Hefezellen des zweiten Typs, werden die Hefezellen des zweiten Typs unter dem Einfluss der Pheromone des ersten Typs in einer bestimmten Zellzyklusphase (G1) arretiert, Stoffwechselprozesse werden modifiziert und die Hefezellen des ersten und zweiten Typs wachsen gezielt aufeinander zu. Dieser Effekt wird bei *S. cerevisiae* auch als „shmoo-Phänotyp" bezeichnet. Mit diesem Zellwachstum in Richtung auf den Paarungspartner geht eine hochgradige Veränderung und Polarisierung der Zelloberfläche der Hefezellen einher. Insbesondere erfährt die Zellspitze der Hefezellen des zweiten Typs, die in Richtung der Hefezelle des ersten Typs bzw. der das Pheromon sezernierenden Zelle wächst, umfangreiche Modifikationen in ihrer Lipid- und Proteinzusammensetzung. So liegen hier hochspezifisch bestimmte Proteine in hoher Konzentration vor.

Nach der Weiterbildung des **Patentanspruchs 8** ist die Zelle eine haploide Hefezelle, die gentechnisch so verändert ist, dass das Gen für ein Pheromon des entgegengesetzten Paarungstyps unter die Kontrolle eines Promotors gestellt ist, der durch die nachzuweisende Substanz reguliert wird.
Die Zelle ist für diese sezernierten Pheromone responsiv. Dadurch führt die durch die nachzuweisende Substanz induzierte Expression des Gens in dieser Zelle zu einer polarisierten Präsentation eines Proteins auf der Oberfläche. Diese kann dann über die Anlagerung der funktionalisierten Nanopartikel mittels Partikel-Plasmonen-Resonanz oder optische Fluoreszenz nachgewiesen werden.

In den Hefezellen des ersten und/oder zweiten Typs ist nach der Weiterbildung des **Patentanspruchs 9** die authentische Regulation der Expression von Pheromonen ausgeschaltet.

Beispielsweise sind die natürlichen Gene *MFα1* und *MFα2*, welche beide den α-Faktor kodieren, in α-Zellen von *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen nach der Weiterbildung des **Patentanspruchs 10** deletiert. Damit wird vorteilhaft sichergestellt, dass der α-Faktor ausschließlich dann gebildet und sezerniert wird, wenn das zu detektierende Signal vorhanden ist.

Beispielsweise sind die natürlichen Gene *MFA1* und *MFA2* in a-Zellen von *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen nach der Weiterbildung des **Patentanspruchs 11** deletiert. Damit werden vorteilhaft sekundäre Effekte auf die a-Zellen oder α-Zellen ausgeschlossen.

Erfindungsgemäß sind Nanopartikel mit einem Molekül funktionalisiert, das spezifisch an ein Protein bindet, das durch das Pheromon des ersten Paarungstyps auf der Zelloberfläche der Hefezellen des zweiten Paarungstyps polarisiert exponiert wird. Nanopartikel sind Teilchen mit einem Durchmesser von ca. 1 nm bis ca. 500 nm, deren optische Eigenschaften sowohl von der Partikelgröße als auch von der Partikelform stark abhängen. Bei Nanopartikel mit Größen typischerweise > 3 nm bestimmen Plasmonenresonanzen das optische Verhalten, während bei Nanopartikeln mit einer Teilchengröße < 3 nm eine Partikel-vermittelte Fluoreszenz beobachtet wird. Agglomerationen der Nanoteilchen führen infolge elektromagnetischer Wechselwirkung zu einer Änderung der Plasmonenresonanzen (Frequenzverschiebung) bzw. einer Änderung des Fluoreszenzspektrums.

In der Weiterbildung des **Patentanspruchs 12** bestehen die Nanopartikel aus Gold, Silber oder einer Legierung dieser Metalle.

Bevorzugt werden als Moleküle, die spezifisch an das polarisiert auf der Oberfläche von Zellen des zweiten Typs präsentierte Proteine binden. Dabei handelt es sich z.B. um Peptidliganden, Rezeptoren, Antikörper, Haptene oder um Nukleinsäuren. Bevorzugt binden diese Moleküle an den Bereich des Proteins, der an der Außenseite der Zelloberfläche zugänglich ist.

In Anwesenheit der Nanopartikel, z.B. Gold-Nanopartikel, die mit Molekülen funktionalisiert sind, die spezifisch an ein Protein binden, das durch das Pheromon auf der Zelloberfläche polarisiert präsentiert wird, kommt es zur Clusterbildung an den entsprechenden Oberflächenarealen der Hefezellen. Die daraus resultierende Frequenz – bzw. Farbänderung aufgrund der Partikel-Plasmonen-Resonanz bzw. der Partikel-vermittelten Fluoreszenz wird sensortechnisch erfasst. Durch Partikel-Plasmonen-Resonanz oder Partikel-vermittelte Fluoreszenz kann dadurch erfindungsgemäß eine messbare Zusammenlagerung der Nanopartikel auf der Zelloberfläche der Zellen des zweiten Paarungstyps nachgewiesen werden. Eine zunehmende Aggregation der Nanopartikel (Ausbildung von Clustern auf der Zelloberfläche) spiegelt sich in einer Frequenzänderung wider (Rotverschiebung).

Die erfindungsgemäße Einrichtung hat den Vorteil, dass ein von einer Zelle aufgenommenes Signal gewandelt und schließlich mittels Partikel-Plasmonen-Resonanz oder Partikel-vermittelter Fluoreszenz nachgewiesen werden kann. Das durch eine Zelle aufgenommene Signal kann dabei ggf. verstärkt werden.

Nach der Weiterbildung des **Patentanspruchs 13** besitzen die Nanopartikel einen Durchmesser von größer 3 nm, deren Anlagerung an Zellen des zweiten Typs mittels Partikel-Plasmonen-Resonanz nachgewiesen werden kann.

Die Nanopartikel besitzen nach der Weiterbildung des **Patentanspruchs 14** einen Durchmesser von kleiner 3 nm, deren Anlagerung an Zellen des zweiten Paarungstyps mittels Partikel-vermittelter Fluoreszenz nachgewiesen werden kann.

Die Anbindung der spezifisch bindenden Moleküle an die Nanopartikel, die wie in Patentanspruch 13 ausgeführt, einen Durchmesser von größer als 3 nm besitzen, erfolgt sowohl direkt mittels unspezifischer Adsorption der Moleküle auf der Oberfläche der Nanopartikel oder aber gerichtet spezifisch im Falle einer vorausgegangen Funktionalisierung der Nanopartikeloberfläche (bspw. durch chemisch funktionelle endständige Gruppen).

Nanopartikel, die wie in Patentanspruch 14 ausgeführt einen Durchmesser von kleiner 3 nm besitzen, werden an Antikörper als spezifisch bindende Moleküle gebunden, und können des Weiteren mittels Antikörper-gekoppelter amphiphiler Kern-Schalestrukturen auf der Basis saccharidfunktionalisierter dendritischer Polymere funktionalisiert werden.

Um die Zugänglichkeit der Zelloberfläche für die funktionalisierten Nanopartikel zu erleichtern, wird eine zellwandlose Hefemutante eingesetzt oder die Zellwand durch vorhergehenden enzymatischen Abbau entfernt. Hierzu müssen die Zellen vorher in eine osmostabilisierende Matrix (z.B. 1% Agarose) eingebettet oder in einem osmotisch stabilisierenden Medium (z.B. in 1 M Sorbitol) gehalten werden, um die Integrität der Zellen zu gewährleisten.

Das Protein, das durch das Pheromon auf der Zelloberfläche polarisiert präsentiert wird und an das das spezifische Molekül, mit dem die Nanopartikel funktionalisiert sind, bindet, ist nach der Weiterführung des **Patentanspruchs 15** Fus1p.

Fus1p aus *Saccharomyces cerevisiae* ist für die Fusion der Zellen notwendig und liegt deshalb in den aufeinander zuwachsenden Zellspitzen in hoher Konzentration vor. Es handelt sich um ein Protein, das die Cytoplasmamembran mit einer Transmembrandomäne durchspannt. Der N-Terminus von Fus1p ist nach außen und der größere C-terminale Bereich ins Zellinnere gerichtet. Damit ist der N-terminale Bereich von Fus1p als Antwort der Zelle auf das Einwirken des jeweiligen entgegen gesetzten Pheromons spezifisch an der Zelloberfläche der aufeinander zu wachsenden Zellen konzentriert.

Bevorzugte, spezifisch an Fus1p bindende Moleküle sind dabei anti-Fus1p-Antikörper. Als Antikörper im erfindungsgemäßen Sinn sind weiterhin verschiedene modifizierte Formen von Antikörpern zu verstehen, wie z.B. Fragmente wie das Fv-Fragment, das Fab-Fragment oder das (Fab)'2-Fragment.

Neben dem angegebenen Protein werden auch andere Proteine nur partiell bzw. polarisiert auf der Zelloberfläche präsentiert. Auch solche Proteine können genutzt werden. Außerdem wird auch die Zusammensetzung der Zellwand an den „Zellspitzen" modifiziert und kann somit für das beschriebene Verfahren genutzt werden.

Weiterhin werden bevorzugt Proteine eingesetzt, die durch die Aktivierung des Pheromonsignalwegs in Zellen des zweiten Typs polarisiert auf der Zelloberfläche exponiert werden, und die in dem Bereich, der von außerhalb der Zelle zugänglich ist, mit einem Epitop-Tag verbunden sind. Solche Epitop-Tags sind kurze Moleküle, meist Oligopeptide, die auch multimerisiert vorliegen können, und die von Antikörpern spezifisch gebunden werden. Bevorzugte Epitop-Tags sind solche, die die Präsentation des an den Epitop-Tag gebundenen Proteins nicht behindern oder negativ beeinflussen. Besonders bevorzugt sind HA-Tag, Myc-Tag, Flag-Tag, SUMO-Tag, His-Tag oder der T7-Tag. Bevorzugt können auch Proteine (z.B. eGFP) oder Proteindomänen in einem Fusionsprotein mit dem polarisiert auf der Oberfläche präsentierten Protein eingesetzt werden, die von Antikörpern oder Nukleinsäuren spezifisch gebunden werden. Als Moleküle, die spezifisch an die polarisiert auf der Oberfläche der Zellen

des zweiten Typs präsentierten Proteine binden, werden spezifisch gegen den verwendeten Epitop-Tag oder das fusionierte Protein bzw. die Proteindomäne gerichtete Antikörper oder an einen DNA-bindenden Proteinteil bindende Nukleinsäuren verwendet. Dadurch wird vorteilhaft eine zuverlässige und hochspezifische Bindung der Nanopartikel an die polarisiert präsentierten Proteine gewährleistet, auch wenn ein spezifisch gegen dieses Protein selbst gerichteter Antikörper nicht zur Verfügung steht.

Nach der Weiterbildung des **Patentanspruchs 16** ergibt sich durch eine geeignete Wahl des Verhältnisses von Zellen des ersten Typs zu Zellen des zweiten Typs eine Signalverstärkung. Dabei kann durch die gezielte Beeinflussung der Zahlenverhältnisse der verschiedenen Zelltypen der verstärkende Effekt weiter gesteigert werden. So liegen dabei die Zellen des ersten Typs gegenüber den Zellen des zweiten Typs in einem Verhältnis von 1 zu 20, bevorzugt von 1 zu 10, besonders bevorzugt von 1 zu 5 vor.

Die Zellen der erfindungsgemäßen Einrichtung können suspendiert in Lösung oder immobilisiert sein. Nach der Weiterbildung des **Patentanspruchs 17** befinden sich die Zellen in einem porösen organischen oder anorganischen Gel, nach der Weiterbildung des **Patentanspruchs 18** in einem porösen und optisch transparenten Siliziumdioxid-Xerogel.

Xerogele sind Gele, die ihre Flüssigkeit beispielsweise durch Verdampfen oder Absaugen verloren haben. Gele sind formbeständige, leicht deformierbare disperse Systeme aus mindestens zwei Komponenten, die zumeist aus einem festen Stoff mit langen oder stark verzweigten Teilchen (z.B. Kieselsäure, Gelatine, Kollagene, Polysaccharide, Pektine, spezielle Polymere, wie z.B. Polyacrylate, und andere, oft als Verdickungsmittel bezeichnete Geliermittel) und einer Flüssigkeit (meist Wasser) als Dispersionsmittel bestehen. Dabei bildet die feste Substanz im Dispersionsmittel ein räumliches Netzwerk. Bei der Entstehung von Xerogelen verändert sich die räumliche Anordnung des Netzes.

Die erfindungsgemäße Verwendung von anorganischen oder biologisch inerten organischen Xerogelen zur Einbettung der Zellen erlaubt vorteilhaft das Überleben der Zellen bei gleichzeitiger Stabilität der erzeugten Strukturen, denn sie sind toxikologisch und biologisch inert und werden im Allgemeinen nicht durch die Hefen abgebaut. Sie ermöglichen weiterhin

vorteilhaft die Einlagerung von Nährstoffen und Feuchthaltemitteln, die das Überleben der Zellen sichern.

Die Zellen sind erfindungsgemäß in einem porösen und optisch transparenten anorganischen oder biologisch inerten organischen Xerogel immobilisiert. Bevorzugt ist das Xerogel ein anorganisches Xerogel aus Siliziumdioxid, alkyliertem Siliziumdioxid, Titandioxid, Aluminiumoxid oder deren Gemischen, und wird vorzugsweise durch einen Sol-Gel-Prozess hergestellt.

Dazu werden zunächst Silica- oder andere anorganische Nanosole entweder durch säure- oder alkalikatalysierte Hydrolyse der entsprechenden Silizium- oder Metallalkoxide in Wasser oder einem wasserlöslichem organischem Lösungsmittel (wie Ethanol) hergestellt. Bevorzugt wird die Hydrolyse in Wasser durchgeführt, um toxische Effekte des Lösungsmittels auf die einzubettenden Zellen zu verhindern. Bei der Herstellung von Nanosolen durch Alkoxidhydrolyse entstehen im Zuge der Reaktion Alkohole, die anschließend aus dem erhaltenen Nanosol durch Durchleitung eines inerten Gasstroms verdampft und durch Wasser ersetzt werden.

Durch die Verwendung von Gemischen verschiedener Alkoxide können die Matrixeigenschaften gezielt beeinflusst werden. Die Sol-Gel-Matrix erlaubt vorteilhaft die chemische Modifizierung durch Co-Hydrolyse und Co-Kondensation unter Verwendung verschiedener Metalloxide von Metallen wie Al, Ti, Zr zur Herstellung von gemischten Oxiden oder von Alkoxysilanen mit organischen Resten am Si-Atom zur Herstellung von organisch modifizierten Siliziumoxid-Gelen.

Die einzubettenden Zellen werden mit dem entstandenen Nanosol gemischt. Der Prozess der Gelbildung wird bevorzugt eingeleitet durch Erhöhung der Temperatur, Neutralisierung des pH-Werts, Aufkonzentrierung oder die Zugabe von Katalysatoren wie beispielsweise Fluoriden. Dabei sollte die Temperatur jedoch nicht auf Temperaturen >42°C erhöht werden, um die einzubettenden Zellen nicht zu schädigen. Bei der Überführung in ein Gel verringern die Nanosole ihr Oberflächen/Volumenverhältnis durch Aggregation und dreidimensionale Quervernetzungen. Während dieser Umwandlung des Nanosols in ein sogenanntes Lyogel werden die Zellen in dem entstehenden anorganischen Netzwerk immobilisiert. Die

Immobilisierung überlebensfähiger Zellen wird vorteilhaft durch das Verhältnis Zellen:Oxid und durch die Zugabe von Poren-formenden Agentien gesteuert.

Der Anteil von Zellen an der Gesamtmenge des erzeugten Xerogels einschließlich der eingebetteten Zellen kann je nach Anwendung von 0,1 bis 50% Gewichtsprozent betragen. Bevorzugt verwendet wird ein Anteil von 2 bis 25% Gewichtsprozent.

Durch Trocknung wird dem Lyogel das noch enthaltene Lösungsmittel entzogen. Dadurch bildet sich aus dem Lyogel das Xerogel. Das entstehende Xerogel weist eine hohe Porosität auf, die einen raschen Stoffaustausch mit dem umgebenden Medium erlaubt. Der Trocknungsprozess hat eine starke Schrumpfung des Gels zur Folge, der zu Stress für die eingebetteten Zellen führt. Bevorzugt wird der Trocknungsschritt daher sehr schonend und langsam bei Temperaturen von weniger als 40°C durchgeführt.

Mit sinkendem Wassergehalt der Matrix verringern sich die physiologische Aktivität und die Überlebensrate der eingebetteten Zellen. Ein zu hoher Wassergehalt führt jedoch zu niedriger mechanischer Stabilität und verringert die Haltbarkeit der Struktur.

Die erfindungsgemäße Verwendung von Hefezellen ist daher besonders vorteilhaft, da Hefezellen eine hohe Resistenz gegen Trockenheit besitzen und auch bei sehr geringem Wassergehalt ihre Überlebensfähigkeit nicht einbüßen. Dadurch wird es möglich, sehr trockene Xerogele herzustellen.

Die Erfindung umfasst auch die Verwendung verschiedener Additive wie lösliche organische Salze, d. h. Metallsalze organischer Carbon- oder Sulfonsäuren bzw. offenkettige oder cyclische Ammoniumsalze und Quartärsalze von N-Heterocyclen sowie niedermolekulare Polyanionen oder Polykationen, oder wasserlösliche organische Verbindungen wie Polycarbonsäuren, Harnstoff-Derivate, Kohlenhydrate, Polyole, wie Glycerin, Polyethylenglycol und Polyvinylalkohol, oder Gelatine, die als Weichmacher, Feuchthaltemittel und Porenbildner wirken, die Zelllyse hemmen und die Überlebensfähigkeit der eingebetteten Zellen beträchtlich verlängern.

Das Siliziumdioxid-Xerogel mit den Zellen befindet sich nach der Weiterbildung des **Patentanspruchs 19** auf einem Substrat mit erhöhter mechanischer Stabilität.

Substrate sind nach der Weiterbildung des **Patentanspruchs 20** eine Lichtleitfaser, Glasbeads, ein planarer Glasträger oder andere Formkörper aus Glas wie Hohlkugeln, Stäbe, Röhren oder keramische Granulate.

Dabei werden die Zellen in einem porösen und optisch transparenten anorganischen Xerogel, z. B. einem Siliziumdioxid-Xerogel, fixiert. Das mit den Mikroorganismen versetzte Siliziumdioxid-Xerogel wird als Schicht auf Glasbeads, einer Lichtleitfaser, planaren Glasträgern oder anderen Formkörpern wie Hohlkugeln, Stäben, Röhren oder keramischen Granulaten mittels eines bekannten Sol-Gel-Prozesses abgeschieden, indem das Nanosol-Zell-Gemisch auf das zu beschichtende Substrat aufgebracht oder das Substrat in das Nanosol-Zell-Gemisch eingetaucht wird und das Nanosol anschließend durch Trocknung und die dadurch resultierende Aufkonzentrierung des Nanosols in ein Xerogel überführt wird. Die dadurch vorhandene mechanische Stabilität dieser Strukturen erlaubt das Einbringen der erfindungsgemäßen Einrichtung in ein Messsystem, das unmittelbar mit dem zu untersuchenden Reaktionsraum (Fermenter) im Sinn einer near-line-Diagnostik verbunden werden kann.

Nach der Weiterbildung des **Patentanspruchs 21** sind die Zellen ein Bestandteil einer einen Hohlraum wenigstens teilweise umschließenden Hüllenstruktur. Das heißt, dass einzelne oder mehrere Zellen in diesem Hohlraum, der eine poröse Hülle hat, eingekapselt werden. Die Mikroporosität erlaubt vorteilhaft einen Stoffaustausch mit der Umgebung.

Die Hüllenstruktur besteht nach der Weiterbildung des **Patentanspruchs 22** aus einem Grundkörper mit einer inneren Schicht aus einem biologischen Hydrogel und einer äußeren Schicht aus einem porösen anorganischen Gel, wobei die Schichten wenigstens bereichsweise aufgebracht sind.

Nach der Weiterbildung des **Patentanspruchs 23** sind die Zellen in ein Gefüge mit einer hierarchischen Porenstruktur eingebettet, so dass neben der für anorganische Gele typischen Nanoporosität das Gefüge zusätzlich von miteinander verbundenen Mesoporen durchzogen wird, deren Durchmesser typischerweise zwischen 10 bis 100 µm variiert und die einen

Stoffaustausch zwischen der Umgebung und den eingebetteten Zellen sowie deren Reaktionsprodukten wie den Enzymen ermöglichen. Diese Mesoporen dienen zugleich als Transportwege für die als physikalische Sensoren dienenden Nanoteilchen.

Die Zellen befinden sich nach der Weiterbildung des **Patentanspruchs 24** wenigstens auf einer Oberfläche in einer transparenten Messzelle, wobei die Messzelle Einrichtungen zum Zuführen und Abführen eines Mediums besitzt und mit einer Heizeinrichtung gekoppelt ist.

Die Zellen sind nach der Weiterbildung des **Patentanspruchs 25** ein Bestandteil einer Lösung oder eines Gels, die oder das sich in einem Behältnis als Messzelle befindet.

Die Messzelle ist Bestandteil einer optischen Messeinrichtung, die weiterhin aus wenigstens einer Quelle für elektromagnetische Strahlen und entweder einem Bildaufnahmesystem oder einem Fotodetektor besteht. Das Behältnis und die Lösung oder das Gel bestehen aus Materialien, die für die elektromagnetischen Strahlen der Quelle transparent sind.

Ein Bildaufnahmesystem ist nach der Weiterbildung des **Patentanspruchs 26** als optische Messeinrichtung als eine die Zellen abbildende Optik so angeordnet, dass eine durch die Zusammenlagerung der Nanopartikel hervorgerufene Farb-oder Resonanzfrequenz änderung von Zellen als Abbildungssignal quantitativ oder qualitativ bestimmbar ist.

Nach der Weiterbildung des **Patentanspruchs 27** sind eine Quelle für elektromagnetische Strahlen, Zellen und mindestens ein Fotodetektor als optische Messeinrichtung so angeordnet, dass elektromagnetische Strahlen der Quelle auf Zellen fallen und das dadurch hervorgerufene Fluoreszenzlicht als Abbildungssignal des Fotodetektors quantitativ oder qualitativ bestimmbar ist.

Nach der Weiterbildung **des Patentanspruchs 28 sind** eine Quelle für elektromagnetische Strahlen, Zellen sowie Nanopartikel und wenigstens ein Fotodetektor als optische Messeinrichtung so angeordnet, dass durch die elektromagnetischen Strahlen der Quelle in den Nanopartikeln angeregte elektromagnetische Strahlen auf den Fotodetektor gelangen, abgebildet werden und als Abbildungssignale quantitativ oder qualitativ bestimmbar sind.

Nach der Weiterbildung **des Patentanspruchs 29** ist im Strahlengang nach der Quelle für elektromagnetische Strahlen und/oder im Strahlengang vor dem Fotodetektor wenigstens eine Strahlen beeinflussende Vorrichtung, wenigstens eine Strahlen formende Vorrichtung oder wenigstens eine Kombination daraus angeordnet.

Nach der Weiterbildung **des Patentanspruchs 30** ist der Fotodetektor ein Festkörperbildsensor mit Fotowiderständen, Fotodioden oder Fototransistoren, und der Festkörperbildsensor ist mit einem Datenverarbeitungssystem zusammengeschaltet.

Bestandteil der Erfindung ist nach **Patentanspruch 31** ein Verfahren zum Nachweis einer Substanz mittels Partikel-Plasmonen-Resonanz (PPR) oder Partikel-vermittelter Fluoreszenz durch Zelloberflächenpolarisierung unter Nutzung von Zellen, Nanopartikeln und wenigstens einer Messeinrichtung. Das Verfahren umfasst die folgenden Verfahrensschritte:

a) die Oberfläche von Zellen, in denen ein Gen, dessen Expression zu der polarisierten Präsentation eines Proteins auf der Oberfläche von Zellen führt, unter die Kontrolle eines durch die nachzuweisende Substanz regulierbaren Promotors gestellt ist, wird durch das Auftreten der Substanz polarisiert,

b) Nanopartikel, die mit einem Molekül funktionalisiert sind, das spezifisch an das Protein binden kann, das durch das Auftreten der Substanz auf der Oberfläche der Zellen polarisiert exponiert wird, binden an das Protein und

c) durch Partikel-Plasmonen-Resonanz oder Partikel-vermittelte Fluoreszenz wird mittels wenigstens einer optischen Messeinrichtung eine messbare Zusammenlagerung der Nanopartikel auf der Zelloberfläche der Zellen nachgewiesen.

Bestandteil der Erfindung ist nach **Patentanspruch 32** auch ein Verfahren zum Nachweis einer Substanz mittels Partikel-Plasmonen-Resonanz (PPR) oder Partikel-vermittelte Fluoreszenz durch Zelloberflächenpolarisierung, wobei als Zellen Zellen eines ersten Typs und Zellen eines zweiten Typs genutzt werden, wobei

a) Zellen des ersten Typs, in denen ein für ein Pheromon kodierendes Gen unter die Kontrolle eines durch die nachzuweisende Substanz regulierbaren Promotors gestellt ist, durch das Auftreten der Substanz das Pheromon sezernieren, und

b) die Oberfläche von Zellen des zweiten Typs durch das Auftreten des Pheromons polarisiert wird.

Das Verfahren gemäß Anspruch 32 kann also durch folgende Verfahrensschritte zusammengefasst werden:

a) die Zellen des ersten Typs, in denen ein für ein Pheromon kodierendes Gen unter die Kontrolle eines durch die nachzuweisende Substanz regulierbaren Promotors gestellt ist, sezernieren auf die Anwesenheit der Substanz hin das Pheromon,

b) die Oberfläche von Zellen eines zweiten Typs, die für das Pheromon responsiv sind, wird durch das Auftreten des Pheromons polarisiert,

c) Nanopartikel, die mit einem Molekül funktionalisiert sind, das spezifisch an ein Protein binden kann, das durch das Auftreten des Pheromons auf der Oberfläche der Zellen des zweiten Typs polarisiert exponiert wird, binden an das Protein, und

d) durch Partikel-Plasmonen-Resonanz oder optische Fluoreszenz wird mittels wenigstens einer optischen Messeinrichtung eine messbare Zusammenlagerung der Nanopartikel auf der Oberfläche der Zellen des zweiten Typs nachgewiesen.

Für vorteilhafte Ausgestaltungen des erfindungsgemäßen Verfahrens, betreffend die Zellen, die Nanopartikel und die Messeinrichtung, gelten die in der Beschreibung der erfindungsgemäßen Einrichtung aufgeführten vorteilhaften Ausgestaltungen der Merkmale der Einrichtung gleichermaßen. Nach der Weiterbildung des **Anspruchs 33**, wird das Verfahren mit wenigstens einer Einrichtung mit mindestens einem Merkmal aus einem der Ansprüche 3 bis 30 durchgeführt.

Anhand folgender Figuren und Ausführungsbeispiele wird die Erfindung näher erläutert.

Dabei zeigen

Fig. 1A: Schematische Darstellung von gentechnisch veränderten *Saccharomyces cerevisiae*-Hefezellen des Paarungstyps α und von *Saccharomyces cerevisiae*-Hefezellen des Paarungstyps a gemäß Ausführungsbeispiel 1.

Fig. 1B: Schematische Darstellung der Polarisierung der Zelloberfläche und der Clusterung des Fus1p-Proteins an den Zellspitzen der Hefezellen des Paarungstyps a gemäß Ausführungsbeispiel 1.

Fig. 1C: Schematische Darstellung der Goldclusterbildung an den entsprechenden Oberflächenarealen der Hefezellen des Paarungstyps a in Anwesenheit von Goldnanopartikeln, welche mit gegen den N-terminalen Bereich von Fus1 p oder eines gleichsinnig orientierten Fus1 p-Fusionsproteins gerichteten Antikörpern funktionalisiert sind gemäß Ausführungsbeispiel 1.

Ausführungsbeispiel 1

Saccharomyces cerevisiae-Hefezellen des Paarungstyps α erkennen als Zellen des ersten Typs mittels eines Rezeptors ein eingehendes Signal. Rezeptoren induzieren direkt oder über zwischengeschaltete Signalkaskaden die Transkription des Promotors. Unter die Kontrolle des Promotors ist der für den α-Faktor kodierende *MFα1* Leserahmen kloniert, so dass die Hefezelle des Paarungstyps α als Antwort auf ein eingehendes Signal das Pheromon α-Faktor in die Umgebung sezerniert.

Die Herstellung einer solchen Hefezelle des ersten Typs ist im Folgenden beispielhaft für die Anwendung zum Monitoring von bioverfügbarem Phosphor beschrieben. Die Hefezellen des ersten Typs (Sensorzellen) reagiert hierbei sensitiv auf eine Limitierung von Phosphor. Das Gen *YAR071W* wird bei einer Phosphorlimitierung spezifisch sehr viel stärker transkribiert (Boer et al., (2003). *The genome-wide transcriptional responses of Saccharomyces cerevisiae*

grown on glucose in aerobic chemostat cultures limited for carbon, nitrogen, phosphorus, or sulfur. J. Biol. Chem. 278: 3265-3274.). Die 1000 Basenpaare umfassende, stromaufwärtsliegende Region des heraufregulierten Gens *YAR071W* wird mittels der spezifischen Primer Seq.-Nr. 1 und Seq.-Nr. 2 aus Tab. 1 in einer PCR aus genomischer DNA von *Saccharomyces cerevisiae* amplifiziert. Durch die Primer wird die Sequenz um eine 5'-seitige Erkennungssequenz für *Sac*I und 3'-seitig um eine Erkennungssequenz für *Spe*I erweitert. Mittels dieser Erkennungssequenzen erfolgt ein gerichteter Einbau in den „high copy-number"-Vektor p426, folgend p426YAR071W genannt. Im zweiten Schritt wird der Leserahmen des *MFα1*-Gens in das Plasmid p426YAR071W kloniert. Dazu wird die Sequenz des *MFα1*-Leserahmens mit den Primern Seq.-Nr. 3 und Seq.-Nr. 4 (siehe Tab. 1) aus genomischer DNA von *Saccharomyces cerevisiae* amplifiziert, welche das Fragment 5'-seitig um eine *Spe*I- und 3'-seitig um eine *Sal*I-Schnittstelle erweitern. Danach erfolgt die Klonierung des Fragments mit den genannten Restriktionsschnittstellen in den Vektor p426YAR071W, folgend p426YAR071W-MFalpha1 genannt. Die korrekte Sequenz der klonierten Fragmente wird mittels DNA-Sequenzanalyse überprüft und bestätigt. Der Vektor p426 enthält einen *URA3*-Marker aus *Saccharomyces cerevisiae* zur Selektion in Uracil-auxotrophen Stämmen. Das entstandene Konstrukt p426YAR071W-MFalpha1 wird z.B. in den Hefestamm BY4742 (*MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0*) transformiert und positive Transformanden selektiert. Bei Phosphorlimitierung wird in Sensorzellen, die mit dem Plasmid p426YAR071W-MFalpha1 ausgestattet sind, spezifisch die Expression von α-Faktor induziert.

Tab. 1: Primer für die Herstellung des Sensor-Plasmids p426YAR071W-MFalpha1. Zur genomischen Zielsequenz homologe Bereiche sind dick markiert, Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen.

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
1	YAR071W-for-SacI	TATTATGAGCTC**GGTGCTGTGACCGTTTCCAATACG**
2	YAR071W-rev-SpeI	TATTATACTAGT**TGGTATTTCTGATGATGTTCTTGCTCTCTTTG**
3	MFalpha1-for-SpeI	TATTATACTAGT**ATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGCAG**
4	MFalpha1-rev-SalI	TATTATGTCGAC**TTAGTACATTGGTTGGCCGGG**

Die authentisch für den α-Faktor kodierenden Gene *MFα1* und *MFα2* sind im gleichen Stamm deletiert. Damit ist sichergestellt, dass der α-Faktor ausschließlich dann gebildet und sezerniert wird, wenn das zu detektierende Signal vorhanden ist.

Für die Deletion der Leserahmen von *MFα1* und *MFα2*, z.B. im α-Hefestamm BY4742 (*MATα*, *his3Δ1*, *leu2Δ0*, *lys2Δ0, ura3Δ0*), werden die Markerkassetten *natMX6* bzw. *hphMX6* verwendet, welche Resistenzen gegen die Antibiotika Nourseothricin bzw. Hygromycin B vermitteln. Die *natMX6*-Kassette wird in einer SFH-PCR mittels der Primer Seq.-Nr. 5 und Seq.-Nr. 6 aus Tab. 2 amplifiziert. Die 5'-Bereiche der Primer (je 50 Basen) sind homolog zu den flankierenden Sequenzen des *MFα1*-Leserahmens im Genom von *Saccharomyces cerevisiae*. Die 3'-Bereiche der Primer (20 bp) sind homolog zu den Enden der *natMX6*-Kassette. Als DNA-Template für die SFH-PCR dient das Plasmid pFA6a-natMX6. Anschließend werden Hefezellen mit dem SFH-Fragment transformiert. Transformanden, bei denen das Fragment über doppelt homologe Rekombination stabil in das Genom integriert ist, werden auf Nourseothricin-haltigem Medium selektiert und die korrekte Integration der Deletionskassette mittels diagnostischer PCR bestätigt. Danach erfolgt die Deletion des Leserahmens von *MFα2* im erzeugten Δ*mfα1*-Hefestamm. Hierzu wird analog zur ersten Deletion ein SFH-Fragment mit den Primern Seq.-Nr. 7 und Seq.-Nr. 8 (siehe Tab. 2) und der hphMX6-Kassette (DNA-Template pFA6a-hphMX6) amplifiziert und in Δ*mfα1*-Hefezellen transformiert. Die 5'-seitigen Bereiche der Primer sind homolog zu den flankierenden Sequenzen des *MFα2*-Leserahmens im Genom von *Saccharomyces cerevisiae*. Die Selektion positiver Transformanden erfolgt auf Hygromycin B-haltigem Medium und die korrekte Integration der Hygromycin-Resistenzkassette im *Δmfα1-Δmfα2*-Hefestamm wird mittels diagnostischer PCR überprüft.

Tab. 2: Primer für die Deletion der Leserahmen von MFα1 und MFα2 von *Saccharomyces cerevisiae*. Die unmarkierte Primersequenz kennzeichnet Bereiche, die homolog zur genomischen DNA von *Saccharomyces cerevisiae* sind, Zur Deletionskassette homologe Bereiche sind dick markiert.

Seq.-Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
5	MFalp1_F2	AAGAAGATTACAAACTATCAATTTCATACACAATATAAACG ATTAAAAGA**CGGATCCCCGGGTTAATTAA**
6	MFalp1_R1	TGGGAACAAAGTCGACTTTGTTACATCTACACTGTTGTTAT CAGTCGGGC**GAATTCGAGCTCGTTTAAAC**
7	MFalp2_F2	TTACTACCATCACCTGCATCAAATTCCAGTAAATTCACATA TTGGAGAAA**CGGATCCCCGGGTTAATTAA**
8	MFalp2_R1	ATGAACGTGAAAGAAATCGAGAGGGTTTAGAAGTAGTTTA GGGTCATTTT**GAATTCGAGCTCGTTTAAAC**

Erreicht der sezernierte α-Faktor die umliegenden a-Zellen, erfolgt eine hochgradige Polarisierung der Zelloberfläche und die Clusterung des Fus1p Proteins an den Zellspitzen der a-Zellen (Fig. 1B). Diese Clusterung ist Voraussetzung für die Wandlung in ein PPR -Signal. Das durch die Expression und Sekretion des α-Faktors und die nachfolgende Polarisierung der Zellen hervorgerufene Signal kann durch das Verhältnis von α-Zellen zu a-Zellen moduliert werden.

In Anwesenheit von Goldnanopartikeln, welche mit gegen den N-terminalen Bereich von Fus1p oder eines gleichsinnig orientierten Fus1p-Fusionsproteins gerichteten Antikörpern funktionalisiert sind, kommt es zur Goldclusterbildung an den entsprechenden Oberflächenarealen der a-Zellen (Fig. 1C). Die daraus resultierende Farbänderung aufgrund der Partikel-Plasmonen-Resonanz oder Partikel-vermittelte Fluoreszenz wird sensortechnisch erfasst.

Die Quelle, die Messzelle und entweder das Bildaufnahmesystem oder der Fotodetektor sind so angeordnet, dass eine durch die elektromagnetischen Strahlen der Quelle hervorgerufene optische Änderung in der Messzelle auf dem Bildaufnahmesystem oder dem Fotodetektor abgebildet werden. Die Änderung ist beispielsweise

- eine durch die Zusammenlagerung der Nanopartikel hervorgerufene Farbänderung von Hefezellen oder

- ein durch die elektromagnetischen Strahlen der Quelle hervorgerufenes Fluoreszenzlicht der Hefezellen.

Die dadurch hervorgerufenen Abbildungssignale des Bildaufnahmesystems oder des Fotodetektors sind quantitativ oder qualitativ bestimmbar. Dazu ist das Bildaufnahmesystem oder der Fotodetektor mit einem Datenverarbeitungssystem zusammengeschaltet.
In Ausführungsformen können im Strahlengang nach der Quelle für elektromagnetische Strahlen und/oder im Strahlengang vor dem Fotodetektor wenigstens eine Strahlen beeinflussende Vorrichtung, wenigstens eine Strahlen formende Vorrichtung oder wenigstens eine Kombination daraus angeordnet sein. Strahlen formende Vorrichtungen sind bekannte Linsen. Diese können die Strahlen aufweiten und fokussieren, so dass eine große Fläche mit Strahlen beaufschlagt werden kann. Eine Strahlen beeinflussende Vorrichtung ist vorzugsweise ein Scannerspiegel. Dieser ist dazu vorteilhafterweise so angeordnet und gesteuert, dass die elektromagnetischen Strahlen der Quelle als Spur auf die Messzelle und daraus folgernd auf das Bildaufnahmesystem oder den Fotodetektor gelangen. Für mehrere parallel angeordnete Spuren kann im Strahlengang vor dem Scanner ein Schwenkspiegel angeordnet sein. Zur Steuerung der Antriebe des Scanners und des eventuellen Schwenkspiegels sind diese mit dem Datenverarbeitungssystem zusammengeschaltet. Zwischen der Quelle und der strahlbeeinflussenden oder strahlformenden Vorrichtung sowie zwischen der strahlbeeinflussenden oder strahlformenden Vorrichtung und dem Fotodetektor können auch Lichtleiter angeordnet sein, so dass eine örtliche Trennung vorgenommen werden kann.
Das Bildaufnahmesystem ist eine bekannte Digitalkamera. Das abgebildete digitale Bild der Hefezellen kann über eine digitale Bildverarbeitung im Datenverarbeitungssystem bearbeitet und im Ergebnis ausgewertet werden.
Der Fotodetektor ist ein Festkörperbildsensor mit Fotowiderständen, Fotodioden oder Fototransistoren. Die daraus resultierenden Signale können direkt mittels des Datenverarbeitungssystems verarbeitet und ausgewertet werden.

Ausführungsbeispiel 2:

Das Plasmid p426YAR071W-MFalpha1 (siehe Ausführungsbeispiel 1) zur Detektion einer Phosphorlimitierung wird direkt in einen Stamm des Paarungstyps a, z.B. den *S. cerevisiae-Stamm* BY4741 (*MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0*) transformiert.

Wird die Bildung des α-Faktors in diesem Stamm, der den entgegengesetzten Paarungstyp besitzt, induziert, wird der α-Faktor gebildet und sezerniert und die endogenen α-Faktor-Rezeptoren des Stammes aktiviert. Die a-Zellen aktivieren sich also durch den gebildeten α-Faktor selbst. Dies führt unter anderem zur beschriebenen Oberflächenpolarisierung und auch den „Shmoo"-Effekt.

In den dergestalt veränderten a-Zellen sind zudem vorteilhafterweise die authentischen chromosomalen *MFα1* und *MFα2*-Loci transkriptionsinaktiviert.

Die sensortechnische Erfassung der Zusammenlagerung der Nanopartikel, die mit gegen das Fus1p-Protein gerichtetem Antikörper funktionalisiert sind, erfolgt wie unter Ausführungsbeispiel 1 beschrieben.

Patentansprüche

1. Einrichtung zum Nachweis einer Substanz mittels Partikel-Plasmonen-Resonanz (PPR) oder Partikel-vermittelter Fluoreszenz durch Zelloberflächenpolarisierung mit

   a. Zellen, bei denen ein Gen, dessen Expression zu der polarisierten Präsentation eines Proteins auf der Oberfläche von Zellen führt, unter die Kontrolle eines durch die nachzuweisende Substanz regulierbaren Promotors gestellt ist,

   b. Nanopartikeln, die mit einem Molekül funktionalisiert sind, das spezifisch an das Oberflächen-exponierte Protein binden kann,

   c. wenigstens einer optischen Messeinrichtung

   so dass durch Partikel-Plasmonen-Resonanz oder Partikel-vermittelte Fluoreszenz eine messbare Zusammenlagerung der Nanopartikel auf der Oberfläche der Zellen nachgewiesen werden kann.

2. Einrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen Zellen eines ersten Typs und Zellen eines zweiten Typs umfassen, wobei

   a. bei den Zellen des ersten Typs ein für ein Pheromon kodierendes Gen unter die Kontrolle eines durch die nachzuweisende Substanz regulierbaren Promotors gestellt ist, so dass durch das Auftreten der nachzuweisenden Substanz die Zellen des ersten Typs das Pheromon sezernieren, und

   b. die Oberfläche der Zellen des zweiten Typs, die für das Pheromon responsiv sind, durch das Auftreten des Pheromons polarisiert wird.

3. Einrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen Hefezellen sind.

4. Einrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Hefezellen *Saccharomyces cerevisiae* oder *Schizosacccharomyces pombe* Zellen sind.

5. Einrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen des ersten Typs *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen des α-Paarungstyps oder *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen das a-Paarungstyps sind.

6. Einrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen des zweiten Typs *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen des α-Paarungstyps oder *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen des a-Paarungstyps sind.

7. Einrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Gen, das für ein Pheromon kodiert, das *MFα1*-Gen, das *MFα2*-Gen, das *MFA1*-Gen oder das *MFA2*-Gen ist.

8. Einrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Zelle eine haploide Hefezelle ist, in der das Gen für ein Pheromon des entgegengesetzten Paarungstyps unter die Kontrolle eines Promotors gestellt ist, der durch die nachzuweisende Substanz reguliert wird.

9. Einrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass in den Zellen des ersten und/oder zweiten Typs die authentische Regulation der Expression von Pheromonen ausgeschaltet ist.

10. Einrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die natürlichen Gene *MFα1* und *MFα2* in α-Zellen von *Saccharomyces cerevisiae*-Hefezellen deletiert sind.

11. Einrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die natürlichen Gene *MFA1* oder *MFA2* in a-Zellen von *Saccharomyces cerevisiae*-Hefezellen deletiert sind.

12. Einrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Nanopartikel aus Gold, Silber oder einer Legierung dieser Metalle bestehen.

13. Einrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Nanopartikel einen Durchmesser von größer 3 nm besitzen, deren Anlagerung an Zellen des zweiten Typs mittels Partikel-Plasmonen-Resonanz nachgewiesen werden kann.

14. Einrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Nanopartikel einen Durchmesser von kleiner 3 nm besitzen, deren Anlagerung an Zellen des zweiten Typs mittels Partikel-vermittelter Fluoreszenz nachgewiesen werden kann.

15. Einrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Protein, an das das spezifisch bindende Molekül bindet, Fus1p ist.

16. Einrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass sich durch eine geeignete Wahl des Verhältnisses von Zellen des ersten Typs zu Zellen des zweiten Typs eine Signalverstärkung ergibt.

17. Einrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass sich die Zellen in einem porösen organischen oder anorganischen Gel befinden.

18. Einrichtung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass sich die Zellen in einem porösen und optisch transparenten Siliziumdioxid-Xerogel befinden.

19. Einrichtung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass sich das Siliziumdioxid-Xerogel mit den Zellen auf einem Substrat mit erhöhter mechanischer Stabilität befindet.

20. Einrichtung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat eine Lichtleitfaser, Glasbeads, ein planarer Glasträger oder andere Formkörper aus Glas wie Hohlkugeln, Stäbe, Röhren oder keramische Granulate ist oder sind.

21. Einrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen ein Bestandteil einer einen Hohlraum wenigstens teilweise umschließenden Hüllenstruktur sind.

22. Einrichtung nach Anspruch 21 dadurch gekennzeichnet, dass die Hüllenstruktur aus einem Grundkörper mit einer inneren Schicht aus einem biologischen Hydrogel und einer äußeren Schicht aus einem porösen anorganischen Gel besteht, wobei die Schichten wenigstens bereichsweise aufgebracht sind.

23. Einrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen in ein Gefüge mit einer hierarchischen Porenstruktur eingebettet sind, so dass neben der für anorganische Gele typischen Nanoporosität das Gefüge zusätzlich von miteinander verbundenen Mesoporen durchzogen wird, deren Durchmesser typischerweise zwischen 10 bis 100 µm variiert und die einen Stoffaustausch zwischen der Umgebung und den eingebetteten Zellen sowie deren Reaktionsprodukten wie den Enzymen ermöglichen.

24. Einrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass sich die Zellen wenigstens auf einer Oberfläche in einer transparenten Messzelle befinden, dass die Messzelle Einrichtungen zum Zuführen und Abführen von Medien und/oder Lösungen besitzt und dass die Messzelle mit einer Heizeinrichtung gekoppelt ist.

25. Einrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen ein Bestandteil einer Lösung oder eines Gels sind, die oder das sich in einem Behältnis als Messzelle befindet.

26. Einrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass ein Bildaufnahmesystem als optische Messeinrichtung als eine Zellen abbildende Optik so angeordnet ist, dass eine durch die Zusammenlagerung der Nanopartikel hervorgerufene Farbänderung von Zellen als Abbildungssignale quantitativ oder qualitativ bestimmbar ist.

27. Einrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass eine Quelle für elektromagnetische Strahlen, Zellen und mindestens eine Fotodetektor als optische Messeinrichtung so angeordnet sind, dass elektromagnetische Strahlen der Quelle auf Zellen fallen und das dadurch hervorgerufene Fluoreszenzlicht als Abbildungssignale des Fotodetektors quantitativ oder qualitativ bestimmbar ist.

28. Einrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass eine Quelle für elektromagnetische Strahlen, Zellen sowie Nanopartikel und wenigstens ein Fotodetektor als optische Messeinrichtung so angeordnet sind, dass durch die elektromagnetischen Strahlen der Quelle in den Nanopartikeln angeregte elektromagnetische Strahlen auf den Fotodetektor gelangen, abgebildet werden und als Abbildungssignale quantitativ oder qualitativ bestimmbar sind.

29. Einrichtung nach Anspruch 27 oder 28, dadurch gekennzeichnet, dass im Strahlengang nach der Quelle für elektromagnetische Strahlen und/oder im Strahlengang vor dem Fotodetektor wenigstens eine Strahlen beeinflussende Vorrichtung, wenigstens eine Strahlen formende Vorrichtung oder wenigstens eine Kombination daraus angeordnet ist.

30. Einrichtung nach einem der Ansprüche 27 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass der Fotodetektor ein Festkörperbildsensor mit Fotowiderständen, Fotodioden oder Fototransistoren ist und dass der Festkörperbildsensor mit einem Datenverarbeitungssystem zusammengeschaltet ist.

31. Verfahren zum Nachweis einer Substanz mittels Partikel-Plasmonen-Resonanz (PPR) oder Partikel-vermittelter Fluoreszenz durch Zelloberflächenpolarisierung unter Nutzung von Zellen, Nanopartikeln und wenigstens einer Messeinrichtung, mit den Verfahrensschritten:

    a) die Oberfläche von Zellen, in denen ein Gen, dessen Expression zu der polarisierten Präsentation eines Proteins auf der Oberfläche von Zellen führt, unter die Kontrolle eines durch die nachzuweisende Substanz regulierbaren Promotors gestellt ist, wird durch das Auftreten der Substanz polarisiert,

    b) Nanopartikel, die mit einem Molekül funktionalisiert sind, das spezifisch an das Protein binden kann, das durch das Auftreten der Substanz auf der Oberfläche der Zellen polarisiert exponiert wird, binden an das Protein und

c) durch Partikel-Plasmonen-Resonanz oder Partikel-vermittelte Fluoreszenz wird mittels wenigstens einer optischen Messeinrichtung eine messbare Zusammenlagerung der Nanopartikel auf der Oberfläche der Zellen nachgewiesen.

32. Verfahren gemäß Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass als Zellen Zellen eines ersten Typs und Zellen eines zweiten Typs genutzt werden, wobei

a. Zellen des ersten Typs, in denen ein für ein Pheromon kodierendes Gen unter die Kontrolle eines durch die nachzuweisende Substanz regulierbaren Promotors gestellt ist, durch das Auftreten der Substanz das Pheromon sezernieren, und

b. die Oberfläche von Zellen des zweiten Typs, die für das Pheromon responsiv sind, durch das Auftreten des Pheromons polarisiert wird.

33. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren unter Nutzung wenigstens einer Einrichtung mit mindestens einem Merkmal aus einem der Ansprüche 3 bis 30 durchgeführt wird.

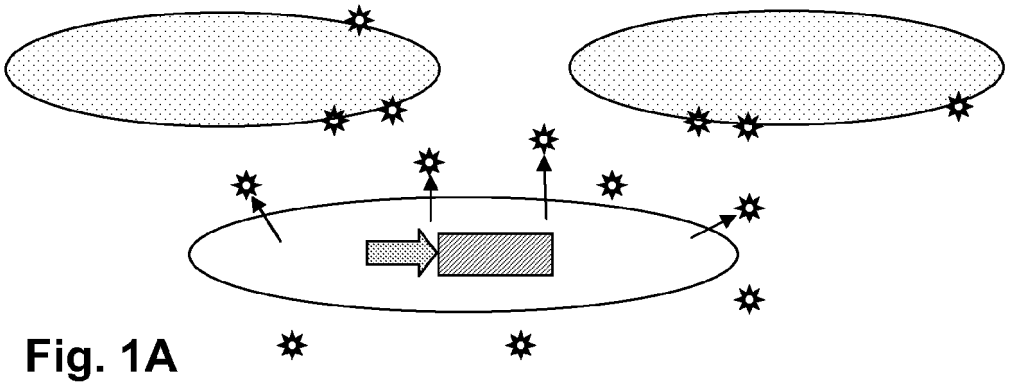


Fig. 1A

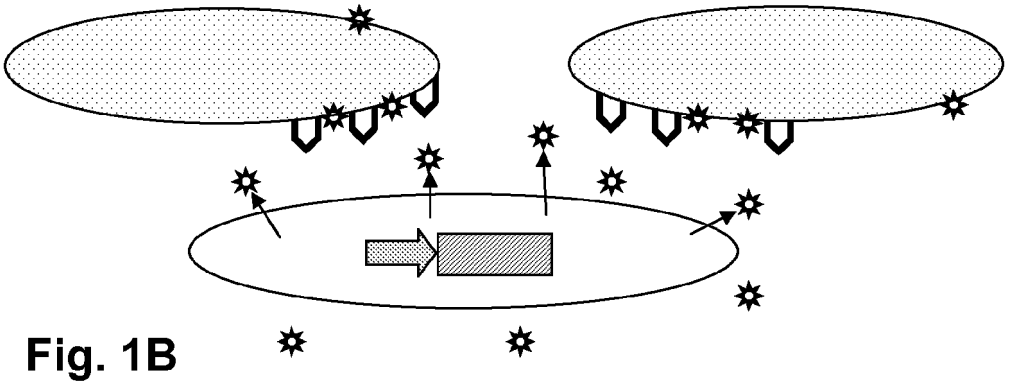


Fig. 1B

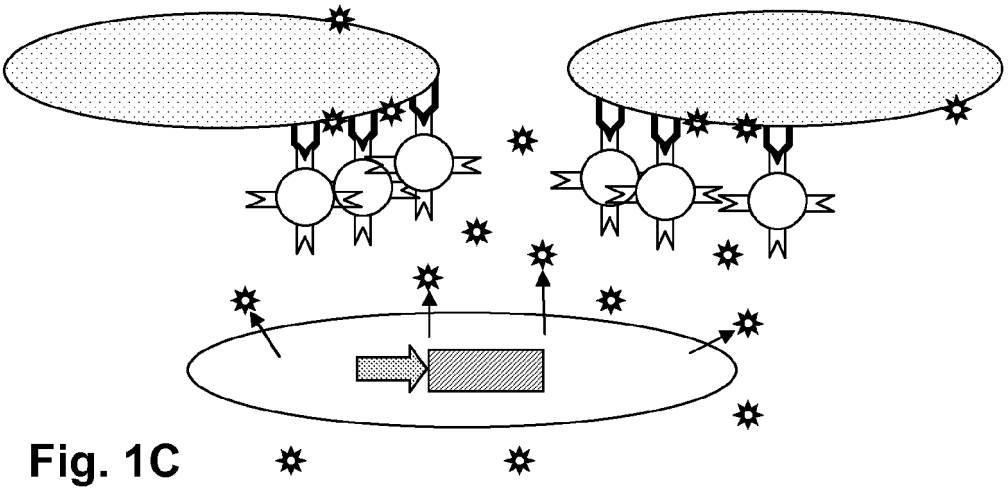
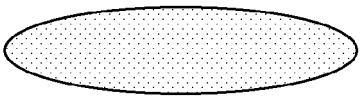
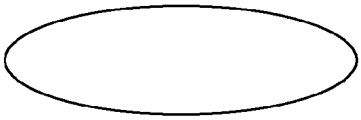


Fig. 1C

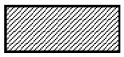


Hefezellen des Paarungstyps a



Hefezellen des Paarungstyps α

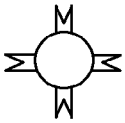
α-Faktor



α-Faktor-Leserahmen

Spezifisch regulierbarer Promotor

Fus1-Protein



Fus1-Antikörper gekoppelt an Gold-Nanopartikel

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/058288

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/02 G01N33/543 G01N33/58

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, FSTA, COMPENDEX

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RON ET AL: "Biosensing environmental pollution" CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, LONDON, GB, vol. 18, no. 3, 8 June 2007 (2007-06-08), pages 252-256, XP022110189 ISSN: 0958-1669 the whole document	

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24 September 2008	08/10/2008

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Adida, Anne

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/058288

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BENTON ET AL: "The utilization of a Saccharomyces cerevisiae HUG1P-GFP promoter-reporter construct for the selective detection of DNA damage" MUTATION RESEARCH. GENETIC TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTALMUTAGENESIS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 633, no. 1, 13 May 2007 (2007-05-13), pages 21-34, XP022170046 ISSN: 1383-5718 the whole document	
A	BELKIN S: "MICROBIAL WHOLE-CELL SENSING SYSTEMS OF ENVIRONMENTAL POLLUTANTS" CURRENT OPINION IN MICROBIOLOGY, CURRENT BIOLOGY LTD, GB, vol. 6, no. 3, 1 June 2003 (2003-06-01), pages 206-212, XP001202139 ISSN: 1369-5274 the whole document	
A	US 2003/211615 A1 (OEHLEN LAMBERTUS J [US]) 13 November 2003 (2003-11-13) the whole document	
A	PROSZYNSKI TOMASZ J ET AL: "Plasma membrane polarization during mating in yeast cells." THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY 19 JUN 2006, vol. 173, no. 6, 19 June 2006 (2006-06-19), pages 861-866, XP002497144 ISSN: 0021-9525 the whole document	
A	AARON JESSE ET AL: "Plasmon resonance coupling of metal nanoparticles for molecular imaging of carcinogenesis in vivo" JOURNAL OF BIOMEDICAL OPTICS, vol. 12, no. 3, May 2007 (2007-05), page Article No.: 034007, XP002497145 ISSN: 1083-3668 the whole document	
A	GEORGE NATHALIE ET AL: "SPECIFIC LABELING OF CELL SURFACE PROTEINS WITH CHEMICALLY DIVERSE COMPOUNDS" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, DC.; US, US, vol. 126, no. 29, 28 July 2004 (2004-07-28), pages 8896-8897, XP009079519 ISSN: 0002-7863 the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2008/058288

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003211615 A1	13-11-2003	US 6555325 B1	29-04-2003

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2008/058288

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C12Q1/02 G01N33/543 G01N33/58

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C12Q G01N

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, FSTA, COMPENDEX

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	RON ET AL: "Biosensing environmental pollution" CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, LONDON, GB, Bd. 18, Nr. 3, 8. Juni 2007 (2007-06-08), Seiten 252-256, XP022110189 ISSN: 0958-1669 das ganze Dokument	

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen [X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung *kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet* werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
24. September 2008	08/10/2008

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Adida, Anne

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2008/058288

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	BENTON ET AL: "The utilization of a Saccharomyces cerevisiae HUG1P-GFP promoter-reporter construct for the selective detection of DNA damage" MUTATION RESEARCH. GENETIC TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTALMUTAGENESIS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Bd. 633, Nr. 1, 13. Mai 2007 (2007-05-13), Seiten 21-34, XP022170046 ISSN: 1383-5718 das ganze Dokument	
A	BELKIN S: "MICROBIAL WHOLE-CELL SENSING SYSTEMS OF ENVIRONMENTAL POLLUTANTS" CURRENT OPINION IN MICROBIOLOGY, CURRENT BIOLOGY LTD, GB, Bd. 6, Nr. 3, 1. Juni 2003 (2003-06-01), Seiten 206-212, XP001202139 ISSN: 1369-5274 das ganze Dokument	
A	US 2003/211615 A1 (OEHLEN LAMBERTUS J [US]) 13. November 2003 (2003-11-13) das ganze Dokument	
A	PROSZYNSKI TOMASZ J ET AL: "Plasma membrane polarization during mating in yeast cells." THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY 19 JUN 2006, Bd. 173, Nr. 6, 19. Juni 2006 (2006-06-19), Seiten 861-866, XP002497144 ISSN: 0021-9525 das ganze Dokument	
A	AARON JESSE ET AL: "Plasmon resonance coupling of metal nanoparticles for molecular imaging of carcinogenesis in vivo" JOURNAL OF BIOMEDICAL OPTICS, Bd. 12, Nr. 3, Mai 2007 (2007-05), Seite Article No.: 034007, XP002497145 ISSN: 1083-3668 das ganze Dokument	
A	GEORGE NATHALIE ET AL: "SPECIFIC LABELING OF CELL SURFACE PROTEINS WITH CHEMICALLY DIVERSE COMPOUNDS" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, DC.; US, US, Bd. 126, Nr. 29, 28. Juli 2004 (2004-07-28), Seiten 8896-8897, XP009079519 ISSN: 0002-7863 das ganze Dokument	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2008/058288

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2003211615 A1	13-11-2003	US 6555325 B1	29-04-2003