
Dissertation

**Fluoreszenzindikatoren für intrazelluläre
Natriumkonzentrationsmessungen**

Zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Sascha Dietrich

geboren am 28.08.1979 in Dresden/Sachsen

Gutachter:

Prof. Dr. Klaus Benndorf
Institut für Physiologie II der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Kollegiengasse 9
07743 Jena

Prof. Dr. Frank Böhmer
Institut für Molekulare Zellbiologie
Medizinische Fakultät
Drackendorfer Straße 1
07747 Jena

PD Dr. Nikolaj Klöcker
Universität Freiburg
Physiologie II
Hermann-Herder-Str. 7
79104 Freiburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.06.2008

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Bedeutung der intrazellulären Natrium - Messungen	1
1.2 Methoden für intrazelluläre Natriummessungen.....	2
1.2.1 Techniken, die die totale intrazelluläre Natriumkonzentration messen, jedoch eine Zerstörung der Zellen zur Folge haben	2
1.2.2 NMR Techniken für intrazelluläre Natriumbestimmungen	2
1.2.3 Techniken für intrazelluläre Natriummessungen auf der Basis definierter physikochemischer Gleichgewichte	3
1.3 Fluoreszenz	4
1.3.1 Grundlagen der Fluoreszenzentstehung	4
1.3.2 Quantenausbeute und Fluoreszenzlebensdauer	6
1.4 Fluoreszenzionenindikatoren	9
1.4.1 Theoretische Grundlagen	9
1.5 Natriumsensitive Fluoreszenzionenindikatoren	14
1.5.1 Anforderungen an einen idealen Natriumindikator.....	14
1.5.2 Struktur und Selektivität kommerziell erhältlicher Natriumindikatoren.....	15
1.5.3 Natriumabhängige Änderungen des Fluoreszenzsignals kommerzieller Natriumindikatoren	17
1.5.4 Beladung der Zellen mit den Fluoreszenzindikatoren.....	19
1.5.5 Eichung der Indikatoren in den Zellen.....	20
1.5.6 Beeinträchtigung der Indikatoren durch den pH-Wert und intrazelluläre Proteine	21
1.6 Nanopartikel für die Messung intrazellulärer Ionenkonzentrationen	23
1.6.1 Acrylamid - Nanopartikel.....	23
1.6.2 Decylmethacrylat Nanopartikel.....	24
1.7 Zielstellung dieser Arbeit.....	26
2 Methoden	27
2.1 Lösungen	27
2.2 Zellen	27
2.2.1 Zellkultur	27
2.2.2 Beladung der Zellen mit dem membrangängigen Natriumindikator Sodium Green – Tetraacetat.....	27
2.2.3 Eichung der intrazellulären Natriumkonzentration	28
2.3 Fluoreszenzspektroskopische Methoden.....	29
2.3.1 Bestimmung der Fluoreszenz - und Absorptionsspektren.....	29
2.3.2 Fluoreszenzintensitätsmessungen für die Bestimmung intrazellulärer Natriumkonzentrationen	29
2.3.3 Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauern	33

2.4	Polymerpartikel	38
2.4.1	Herstellung der Polymerpartikel	38
2.4.2	Beladung der Zellen mit den Nanopartikeln	40
2.5	Auswertung der Daten	43
2.5.1	Auswertung der Fluoreszenzintensitätsmessungen	43
2.5.2	Auswertung der Fluoreszenzlebensdauerermessungen	43
3	Ergebnisse	46
3.1	Fluoreszenzanregungs - und Fluoreszenzemissionsspektrum des Natriumindikators Sodium Green	46
3.2	Fluoreszenzintensitätsmessungen des Indikators Sodium Green	47
3.2.1	Fluoreszenzintensitätsänderungen des Indikators Sodium Green in Abhängigkeit von variablen Natriumkonzentrationen.....	47
3.2.2	Fluoreszenzintensitätsänderung des Indikators Sodium Green in Abhängigkeit von Kalium	49
3.2.3	Fluoreszenzintensitätsänderung des Indikators Sodium Green in Gegenwart von Natrium und Kalium	49
3.2.4	pH-Wertabhängigkeit des Sodium Greens in Gegenwart von Natrium und Kalium	50
3.2.5	Fluoreszenzintensitätsänderung des Farbstoffes Sodium Green in Gegenwart von Natrium, Kalium und BSA	51
3.2.6	Intensitätsmessungen mit Sodium Green in der Zelle.....	53
3.3	Absorptionsänderung des Fluoreszenzindikators Sodium Green	56
3.3.1	Absorptionsänderung des Fluoreszenzindikators Sodium Green in Gegenwart steigender Natrium - und Kaliumkonzentrationen	56
3.3.2	Absorptionseigenschaften des Fluoreszenzindikators Sodium Green in Gegenwart steigender Natriumkonzentrationen und BSA	57
3.4	Natriumabhängige Intensitätsmessungen des Indikators Sodium Green in Acrylamid - Nanopartikeln	57
3.4.1	Der Einschluss des Indikators Sodium Green in Acrylamid - Nanopartikel verhindert die Interaktion mit Proteinen.....	57
3.4.2	Intensitätsmessungen des Farbstoffes Sodium Green in Acrylamid - Nanopartikeln	59
3.4.3	pH-Wertabhängigkeit des Indikators Sodium Green in Acrylamid - Nanopartikeln	61
3.4.4	Ratiometrische Intensitätsmessungen mit Sodium Green und Texas Red beladenen Acrylamid - Nanopartikeln.....	62
3.4.5	Intensitätsmessungen mit Sodium Green / Texas Red Nanosensoren in CHO-Zellen	66
3.4.6	Lokalisation der Nanopartikel in der Zelle	68
3.4.7	Reaktionszeit der Acrylamid - Nanopartikel.....	70
3.5	Fluoreszenzlebensdauerermessungen des Fluoreszenzindikators Sodium Green	72
3.5.1	Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators Sodium Green in Abhängigkeit variabler Natriumkonzentrationen	72
3.5.2	Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators Sodium Green in Abhängigkeit variabler Kaliumkonzentrationen.....	78

3.5.3	Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators Sodium Green in Gegenwart von Natrium und Kalium	79
3.5.4	Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators Sodium Green in Gegenwart von Rinderserum-Albumin (BSA).....	82
3.5.5	Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators Sodium Green in der Zelle .	84
3.5.6	Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von der Indikatorkonzentration (Sodium Green)	86
3.6	Fluoreszenzlebensdauermessungen des Fluoreszenzindikators CoroNa Green	87
3.6.1	Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators CoronNa Green in Abhängigkeit variabler Natriumkonzentrationen	88
3.6.2	Einfluss von Kalium auf die Fluoreszenzlebensdauer des Indikators CoroNa Green.....	92
3.6.3	Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators CoroNa Green in Gegenwart von Natrium und Kalium	94
3.6.4	Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators CoroNa Green in Gegenwart von BSA	96
4	Diskussion	99
4.1	Fluoreszenzintensitätsänderung des Indikators Sodium Green	99
4.1.1	Fluoreszenzintensitätsänderung des Indikators Sodium Green in Abhängigkeit der Natrium- und Kaliumkonzentration.....	99
4.1.2	Der Einfluss von Kalium auf die natriumabhängige Fluoreszenzintensitätsänderung des Indikators Sodium Green	100
4.2	Absorption des Indikators Sodium Green	101
4.3	Natriumabhängige Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators Sodium Green	102
4.3.1	Natriumabhängige Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators Sodium Green.....	102
4.3.2	Der Einfluss von Kalium auf die natriumabhängige Fluoreszenz-lebensdauer-änderung des Indikators Sodium Green.....	104
4.3.3	Abhängigkeit der Sodium Green Fluoreszenzlebensdauer von der Indikatorkonzentration selbst.....	104
4.4	Interaktion des Indikators Sodium Green mit Proteinen.....	105
4.4.1	Natriumabhängige Fluoreszenzintensitätsänderung des Indikators Sodium Green in Gegenwart von BSA	105
4.4.2	Einfluss von BSA auf die Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators Sodium Green.....	107
4.4.3	Vergleich der Fluoreszenzintensitäts- und der Fluoreszenzlebensdauer-messungen mit Sodium Geen	107
4.5	Natriumabhängige Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators CoroNa Green	108
4.6	Der Einfluss von BSA auf den Indikator CoroNa Green	109
4.6.1	Einfluss von BSA auf die Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators CoroNa Green	109
4.7	Sodium Green in Polyacrylamid Nanosensoren	110

4.7.1	Der Einschluss des Indikators Sodium Green in Polyacrylamid Nanopartikeln verhindert die Interaktion mit Proteinen.....	110
4.7.2	Natriummessungen mithilfe von Sodium Green Nanosensoren	110
4.7.3	Ratiometrische Polyacrylamid Nanosensoren mit Sodium Green und Texas Red.....	111
4.8	Ist der Indikator Sodium Green geeignet für Natriummessungen.....	112
	in der Zelle?	112
4.8.1	Natriummessungen mit Sodium Green in der Zelle.....	112
4.8.2	Natriummessungen mit Sodium Green-Nanosensoren in der Zelle.....	113
5	Zusammenfassung.....	114
6	Anhang	118
6.1	Mono- und Multiexponentielle Fluoreszenzabfälle.....	118
6.1.1	Fläche unter der Fluoreszenzabklingkurve.....	118
6.1.2	Durchschnittliche Lebensdauer im angeregten Zustand	118
6.1.3	Durchschnittliche Lebensdauer bei multiexponentiellen Fluoreszenzabfällen.....	118
6.2	Bestimmung des K_d – Wertes	119
7	Literaturverzeichnis	124
	Danksagung	135
	Lebenslauf.....	136

1 Einleitung

1.1 Bedeutung der intrazellulären Natrium - Messungen

Natrium spielt eine außerordentlich wichtige Rolle für die Physiologie der Zelle. Jede Zelle ist bestrebt, einen großen Natriumgradienten zwischen intrazellulärem (4 mM – 15 mM) und extrazellulärem (120mM - 150mM) Milieu aufrechtzuerhalten. Dieser Gradient bildet die Voraussetzung für viele funktionelle und essentielle Prozesse der Zelle (Skou 1988). Die Zelle investiert einen Grossteil ihrer Energie in die Aufrechterhaltung dieses Gradienten durch die Na^+/K^+ -ATPase. Die Na^+/K^+ -ATPase ist eine Membranpumpe, die drei Natriumionen unter Energieaufwand (ATP-Hydrolyse) im Austausch gegen zwei Kaliumionen aus der Zelle heraustransportiert (Skou 1990).

Der Natriumgradient wird für sekundär aktive Transportprozesse ausgenutzt, wobei der Natriumeinstrom entlang des Gradienten die Energie für den Transport anderer Ionen und Nährstoffe bereitstellt (Wright et al. 1996, Hediger et al. 2004). Ein wichtiges Beispiel für einen solchen Transportmechanismus ist der Natrium / Protonenaustauscher, welcher ein intrazelluläres Proton im Austausch gegen ein Natriumion nach außen transportiert und somit einer intrazellulären Azidose entgegen wirkt (Aronson et al. 1982, Frelin et al. 1983, Frelin et al. 1984, Lazdunski et al. 1985). Weiterhin kommt dem Natrium / Kalziumaustauscher am Herzmuskel eine besondere Bedeutung für die Kalziumhomöostase zu (Jeff 1992, Philipson und Nicoll 1992, Kang und Hilgemann 2004). Natriumgekoppelte Transportprozesse erlauben auch die Aufnahme von Aminosäuren und Glukose in die Zelle (Bruinvels 1975, Bader 1976, Wright und Loo 2000, Wright und Turk 2004). Darüber hinaus dient die durch Öffnung von Natriumkanälen erzeugte Depolarisation der Signalverarbeitung und -weiterleitung im Nervensystem, sowie der Auslösung von Muskelkontraktionen. Weiterhin können diese Transportproteine durch eine Vielzahl unterschiedlicher Medikamente beeinflusst werden (Hediger et al. 2004).

Diese und eine Vielzahl weiterer Beispiele veranschaulichen die Bedeutung der Natriumhomöostase für die Zelle und begründen deshalb das große Interesse, intrazelluläre Natriumkonzentrationen verlässlich messen zu können (Minta und Tsien 1989). In dieser Arbeit werden die Natriumindikatoren Sodium Green und CoroNa Green hinsichtlich ihrer Eignung für intrazelluläre Natriummessungen untersucht.

1.2 Methoden für intrazelluläre Natriummessungen

Die Natriumkonzentration im extrazellulären Milieu kann mithilfe von ionenselektiven Elektroden oder der Flammenphotometrie leicht bestimmt werden (Chuang et al. 1973, Dewitte et al. 1999, Burnett et al. 2000). Schwieriger ist es hingegen, intrazelluläre Natriumkonzentrationen zu messen. Die verschiedenen Ansätze, intrazelluläre Natriumkonzentrationen zu messen, lassen sich in drei große Gruppen einteilen (Minta und Tsien 1989).

1.2.1 Techniken, die die totale intrazelluläre Natriumkonzentration messen, jedoch eine Zerstörung der Zellen zur Folge haben

Eine einfache und häufig angewendete Methode Natriumkonzentrationen zu messen, ist die Flammenphotometrie. Ein großer Nachteil dieser Methode besteht darin, dass man die Zellen im Anschluss an das Experiment zerstören muss, um die intrazellulären Natriumkonzentrationen messen zu können. Weiterhin müssen die Zellen aus ihrer natriumreichen extrazellulären Umgebung entfernt werden, um sie für die Messung aufarbeiten zu können. Hierbei besteht die Gefahr, die zu bestimmende intrazelluläre Natriumkonzentration durch das extrazellulär vorhandene Natrium zu verfälschen (Horowitz und Paine 1979, Minta und Tsien 1989). Da die Zellen zur Natriumbestimmung zerstört werden müssen, ist auch eine Verlaufsbeobachtung der Natriumkonzentration nicht möglich.

1.2.2 NMR Techniken für intrazelluläre Natriumbestimmungen

Mithilfe der NMR-Spektroskopie kann die Konzentration des Natrium-Isotops $^{23}\text{Na}^+$ bestimmt werden. Die Gesamt-Natriumkonzentration lässt sich hierbei einfach errechnen, da man weiss, dass ein Drittel des in vivo vorhandenen Natriums das Isotop $^{23}\text{Na}^+$ ist. Zwischen intra- und extrazellulärem Natrium kann unterschieden werden, indem man Shiftreagenzien benutzt. Diese Stoffe verschieben die Resonanzfrequenz des Natriums, wenn sie in direkte Wechselwirkung mit Natrium treten. Aufgrund der Größe und elektrischen Ladung der Shiftreagenzien gelangen diese nicht in die Zellen. Durch Chemical Shift Imaging kann man so die beiden Kompartimente getrennt voneinander darstellen (Liebling und Gupta 1987, Springer 1987, Hirshfield et al. 1996). Nachteilig bei diesem Verfahren ist allerdings, dass

man hierfür eine relativ große Menge an Zellen mit hoher Dichte erfassen muss, um sie dann aus ihrer Manipulationsumgebung entfernt, in ein magnetisches Feld einbringen zu können.

1.2.3 Techniken für intrazelluläre Natriummessungen auf der Basis definierter physikochemischer Gleichgewichte

Natriummessungen mithilfe von Indikatoren basieren auf der Annahme, dass der Indikator mit dem nachzuweisenden Ion in einem Gleichgewicht steht. In Abhängigkeit von der Affinität beider beteiligter Bindungspartner bildet sich ein Natrium-Indikator Komplex (Gleichung 1-1).



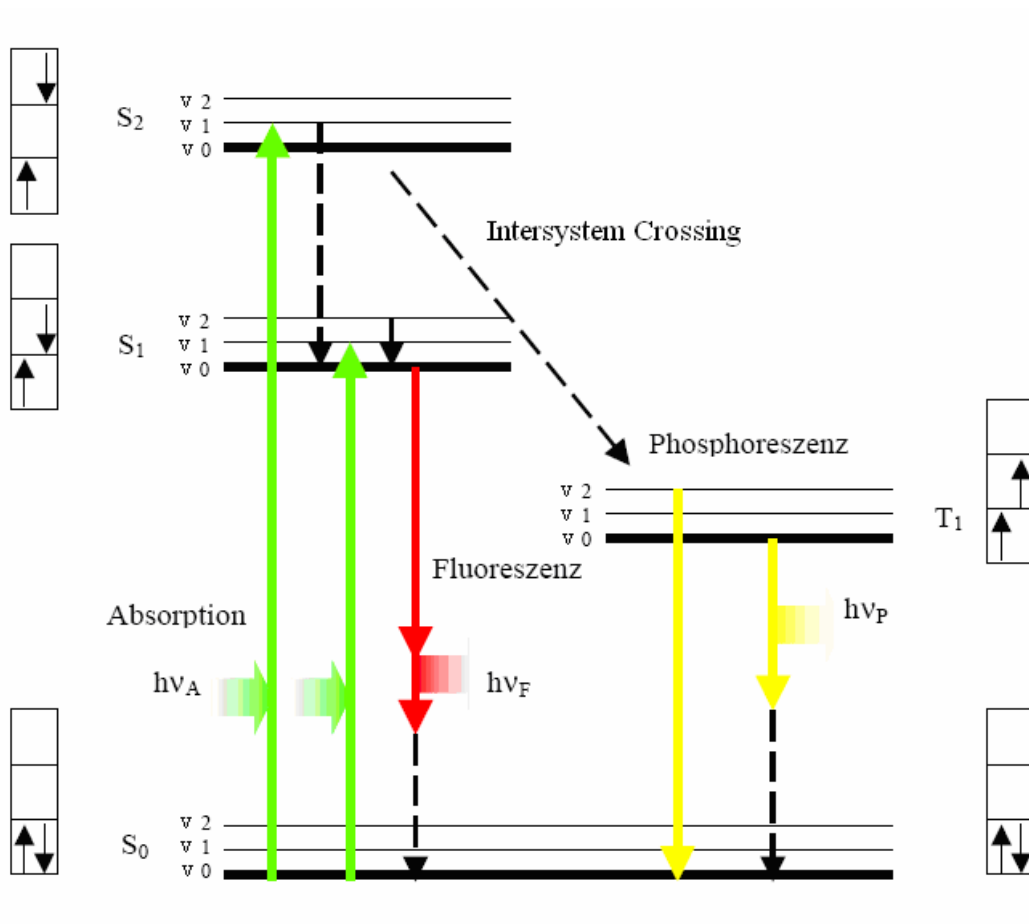
Eine Erhöhung der Ionenkonzentration führt zur Bildung des Komplexes und eine Erniedrigung der Ionenkonzentration zur Dissoziation des Komplexes. Die Natriumbindung an den Indikator verursacht eine Signaländerung, welche detektiert werden kann und somit als Maß für die Natriumkonzentration dient. Als Beispiel hierfür sind ^{19}F – gekoppelte Natriumchelatoren zu erwähnen, die jedoch keine Akzeptanz gefunden haben (Smith et al. 1986). Bei diesen Indikatoren ruft die Natriumbindung eine Verschiebung des NMR Spektrums hervor.

Natriumselektive Elektroden, die aus einer potentiometrischen Elektrode und einer natriumselektiven Membran bestehen, gehören ebenfalls in diese Gruppe (Slack et al. 1973). Die Natriumselektivität der Elektrodenmembranen beruht auf natriumspezifischen Ionophoren, die in der Membranmatrix enthalten sind. Der Einsatz dieser Elektroden für intrazelluläre Messungen ist jedoch relativ schwierig, da stets nur eine Zelle betrachtet werden kann und entsprechende Übung für diese Messungen erforderlich ist. Eine weitere Untergruppe bilden die sehr häufig verwendeten natriumsensitiven Fluoreszenzionenindikatoren. Ziel dieser Arbeit war es, zwei Fluoreszenznatriumindikatoren im Hinblick auf Natriummessungen in der Zelle zu untersuchen. Im folgenden Abschnitt wird deshalb zunächst das Prinzip der Fluoreszenzentstehung beschrieben. Vor- und Nachteile der Fluoreszenzionenindikatoren werden in Abschnitt 1.3 genauer besprochen.

1.3 Fluoreszenz

1.3.1 Grundlagen der Fluoreszenzentstehung

Durch die Bestrahlung von Molekülen mit Licht können Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben (Absorption) werden. Hier verweilen sie sehr kurz und fallen dann unter Aussendung von längerwelligem Emissionslicht λ_{em} auf das ursprüngliche Niveau zurück (Emission). Diesen Prozess bezeichnet man als Lumineszenz, wobei zwei Formen, die Fluoreszenz und die Phosphoreszenz, unterschieden werden können.



Legende



Spin Konfiguration

$h\nu_{(F,A;P)}$ zugeführte bzw. abgeführte Energie

S(0,1,2) Singlett-Zustände

↓ nichtstrahlender Übergang

T₁ Triplett-Zustand

Abbildung 1-1 Jablonski Diagramm

Die Elektronenübergänge, die bei Absorption und Emission von Photonen auftreten, lassen sich gut mit einem Jablonski Diagramm verdeutlichen (Abbildung 1-1). Der Grundzustand ist mit S0, der erste und zweite angeregte Zustand mit S1 beziehungsweise S2 bezeichnet. In den elektronischen Zuständen S0, S1 und S2 kann das Fluorophor in energetisch unterschiedlichen Vibrationszuständen (v_0 , v_1 , v_2) existieren.

Viele lumineszierende Moleküle haben aromatische Ringstrukturen. Solche Moleküle besitzen delokalisierte Elektronen in sogenannten bindenden π -Orbitalen. In bindenden Orbitalen liegen Elektronen normalerweise mit antiparallelem Spin vor - eine Anordnung, die die sogenannten Singulett - Zustände charakterisiert (S0, S1, S2, vgl. Abbildung 1-1).

Durch Absorption eines Photons geht ein Elektron aus dem höchsten besetzten Molekülorbital (Highest Occupied Molecular Orbital - HOMO) in das niedrigste unbesetzte Molekülorbital (Lowest Unoccupied Molecular Orbital - LUMO) über (vgl. Abbildung 1-1). Die Wellenlänge des hierfür notwendigen Lichtes wird dabei im Wesentlichen von der Energiedifferenz des LUMO - HOMO Abstandes und den der Vibrationsniveaus bestimmt.

Der Übergang des Elektrons vom Grundzustand S0 in die Zustände S1 und S2 vollzieht sich in 10^{-15} s. Das Elektron relaxiert innerhalb von 10^{-12} s auf das energetisch niedrigste Vibrationslevel von S1, ohne dass ein Photon emittiert wird. Diesen Vorgang bezeichnet man als interne Konversion (Internal Conversion). Beim Übergang vom niedrigsten Vibrationslevel des S1 Zustandes in den Grundzustand S0 kann die Energiedifferenz in Form eines Photons emittiert werden. Die Lebensdauer des S1 Zustandes beträgt durchschnittlich 10^{-9} bis 10^{-8} s. Da aufgrund der internen Konversion die freiwerdende Energie bei der Depopulation des S1 Zustandes geringer als die für die Absorption aufgebraachte Energie ist, ist die Wellenlänge des Fluoreszenzlichtes größer, als die des Anregungslichtes (Stokesche - Regel).

Bei manchen Verbindungen kann es zu einem Übergang aus einem angeregten Singulettzustand S1 in einen Triplett-Zustand (T1) kommen. Bei diesem Vorgang ("Intersystem Crossing") kommt es zu einer Spinumkehr des angeregten Elektrons. Hierbei muss auch für den Sprung in den Grundzustand eine Spinumkehr stattfinden. Solche Vorgänge sind jedoch vergleichsweise wenig wahrscheinlich, so daß die Emissionsraten entsprechend gering sind (1-1000 pro s). Diese geringe Übergangsrate ist der Grund für das langsame Abklingen der Phosphoreszenz.

1.3.2 Quantenausbeute und Fluoreszenzlebensdauer

Zwei wichtige Größen, die die Fluoreszenzeigenschaften eines Stoffes charakterisieren sind die Fluoreszenzlebensdauer und die Fluoreszenzquantenausbeute. Als Fluoreszenzquantenausbeute bezeichnet man das Verhältnis der Anzahl emittierter Photonen zur Zahl der angeregten Moleküle.

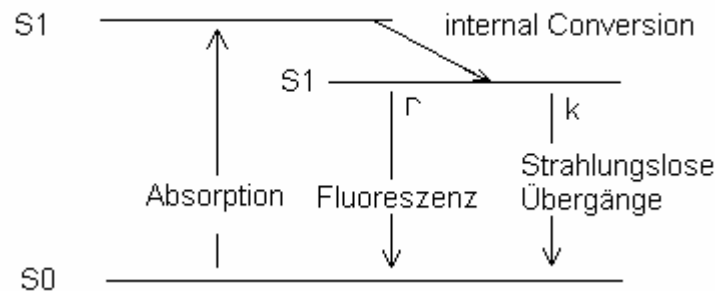


Abbildung 1-2 Vereinfachtes Jablonski Diagramm

Bezeichnet man mit Γ die Geschwindigkeitskonstante für die Fluoreszenzemission und fasst in der Geschwindigkeitskonstante k_{nr} alle strahlungslosen Übergänge in den Grundzustand zusammen (Abbildung 1-2), dann gilt für die Fluoreszenzquantenausbeute (Q):

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad \text{Gleichung 1-2}$$

Für die Anzahl $N(t)$ angeregter Moleküle zur Zeit t nach einem unendlich kurzen Anregungspuls gilt:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(\Gamma + k_{nr})N(t) \quad \text{Gleichung 1-3}$$

Durch Integration von Gleichung 1-3 erhält man:

$$N(t) = N_0 e^{-(\Gamma + k_{nr})t} \quad \text{Gleichung 1-4}$$

wobei N_0 der Zahl der Moleküle unmittelbar nach der Anregung ($t=0$) entspricht. Mit

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}}$$

Gleichung 1-5

erhält man aus Gleichung 1-4:

$$N(t) = N_0 e^{-t/\tau}$$

Gleichung 1-6

Die Konstante τ bezeichnet man auch als die Fluoreszenzlebensdauer. Sie entspricht der durchschnittlichen Zeit, die sich ein Molekül im angeregten Zustand befindetet (vgl. Anhang 6.1.2).

Die Fluoreszenzintensität $I(t)$ ist proportional zur Zahl der angeregten Moleküle $N(t)$. Der Proportionalitätsfaktor ist nach Gleichung 1-2 die Quantenausbeute:

$$I(t) = QN(t)$$

Gleichung 1-7

Aus Gleichung 1-6 erhält man somit:

$$QN(t) = QN_0 e^{-t/\tau}$$

Gleichung 1-8

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau}$$

Gleichung 1-9

Dementsprechend erhält man auch für den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzintensität einen exponentiellen Abfall. Experimentell lässt sich die Fluoreszenzlebensdauer somit aus der Fluoreszenzabklingkurve bestimmen (vgl. Abbildung 1-3).

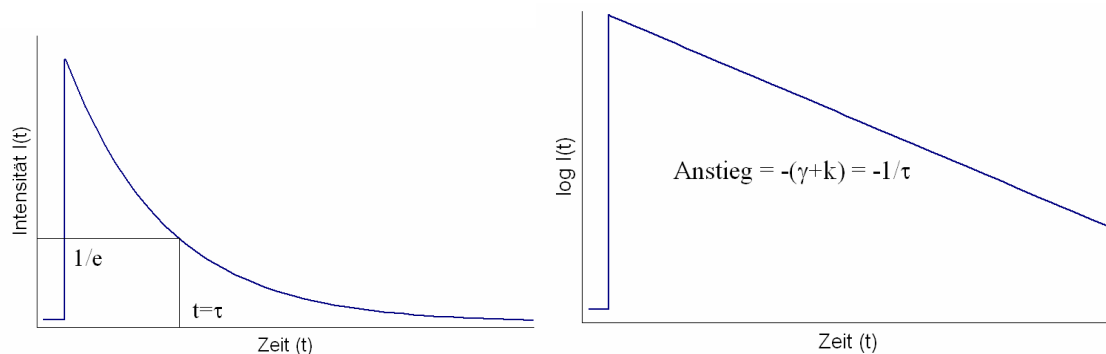


Abbildung 1-3 Schematische Darstellung des Fluoreszenzabfalls a) lineare Auftragung des Verlaufes der Fluoreszenzintensität nach Anregung mit einem ultrakurzem Puls b) logarithmische Auftragung der Fluoreszenzintensität

Bei einem monoexponentiellem Abfall entspricht die Fluoreszenzlebensdauer der Zeit, die vergeht bis die Fluoreszenzintensität auf 1/e ihres anfänglichen Wertes abgefallen ist, wie sich leicht mit Hilfe von Gleichung 1-9 zeigen lässt, indem man $t = \tau$ setzt:

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau} = I_0 \frac{1}{e} \quad \text{Gleichung 1-10}$$

Liegt ein Molekül in unterschiedlichen Formen vor, welche unterschiedliche Lebensdauern τ_i haben, so ergibt sich die gemessene Fluoreszenzabklingkurve aus der Summe der Fluoreszenzabklingkurven der jeweiligen Isomere:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n A_i * e^{-t/\tau_i} \quad \text{Gleichung 1-11}$$

Die Amplitude A_i beschreibt hierbei den Anteil, den die Molekülsorte i unmittelbar nach der Anregung ($t=0$) an der Gesamtfluoreszenz hat. Wenn die Fluoreszenzabklingkurve auf 1 normiert ist, dann gilt:

$$\sum_{i=1}^n A_i = 1 \quad \text{Gleichung 1-12}$$

Die Amplitude ist nicht zu verwechseln mit dem Beitrag f_i , den diese Molekülsorte insgesamt an der Gesamtfluoreszenz hat. Dieser Anteil errechnet sich dadurch, daß man das Integral des Fluoreszenzabfalls der Molekülsorte i in Relation zum Integral der Abklingkurve der Gesamtfluoreszenz setzt:

$$f_i = \frac{A_i \tau_i}{\sum_j A_j \tau_j} \quad \text{Gleichung 1-13}$$

Um multiexponentielle Fluoreszenzabklingkurven untereinander zu vergleichen, ist es üblich, eine „mittlere“ Lebensdauer anzugeben. In dieser Arbeit werden dabei ausschließlich Amplituden-gewichtete mittlere Lebensdauern ($\bar{\tau}$) aufgeführt, die sich wie folgt berechnen:

$$\bar{\tau} = \frac{\sum_{i=1}^n A_i \tau_i}{\sum_{i=1}^n A_i} \quad \text{Gleichung 1-14}$$

Bei normierten Fluoreszenzabklingkurven vereinfacht sich Gleichung 1-14 zu:

$$\bar{\tau} = \sum_{i=1}^n A_i \tau_i \quad \text{Gleichung 1-15}$$

Die mittlere Lebensdauer $\bar{\tau}$ einer normierten, multiexponentiellen Fluoreszenzabklingkurve ist damit gleich der Summe der Flächen unter den Fluoreszenzabklingkurven der einzelnen Komponenten. Der multiexponentielle Fluoreszenzabfall wird auf diese Weise durch einen monoexponentiellen Fluoreszenzabfall gleicher Fläche (und damit gleicher Fluoreszenzintensität) wiedergegeben.

Die Amplituden-gewichtete „mittlere“ Lebensdauer der Komponenten einer Fluoreszenzabklingkurve unterscheidet sich von der „durchschnittlichen“ Lebensdauer der Moleküle im angeregten Zustand, wie im Anhang (Abschnitt 6.1.3) dargelegt wird.

1.4 Fluoreszenzionenindikatoren

1.4.1 Theoretische Grundlagen

Ionenindikatoren, die in Abhängigkeit von der Ionenkonzentration ihre Fluoreszenzeigenschaften ändern werden sehr häufig für Ionenkonzentrationenmessungen in der Zelle eingesetzt. Sie bestehen aus einer ionenbindenden- (Ionophor) und einer fluoreszierenden Einheit (Fluorophor) und werden deshalb häufig auch als Fluoroionophore bezeichnet. Fluorophor und Ionophor können direkt oder über eine Kopplungseinheit miteinander verbunden sein (Abbildung 1-4). Das Ionophor bindet das nachzuweisende Ion und das Fluorophor setzt das Ereignis der Ionenbindung an das Ionophor in ein optisches Signal um.

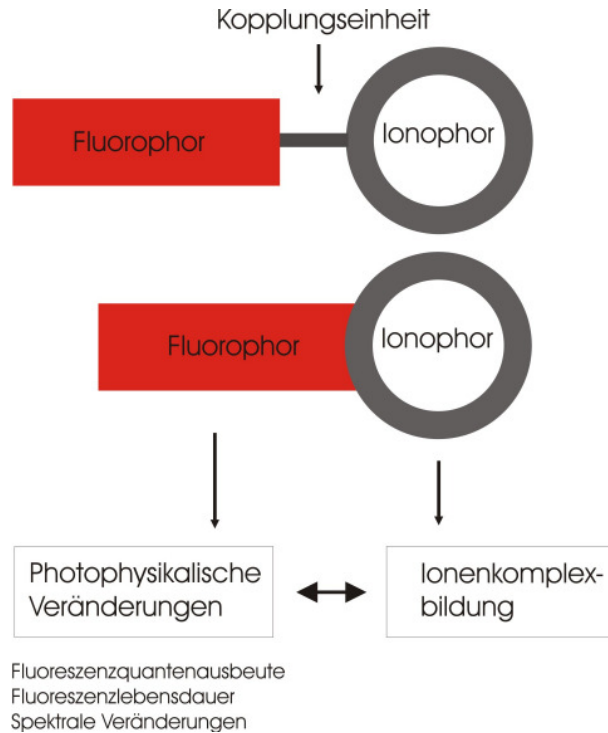


Abbildung 1-4 Prinzipskizze für das Design eines Fluoroionophors.

Die Selektivität eines Indikators für ein bestimmtes Ion wird durch das Ionophor bestimmt. Von besonderer Bedeutung sind hierbei die Eigenschaften des Ions (Ionenradius, Ladung, Koordinationnummer) und die Eigenschaften des Lösungsmittels (pH – Wert, Ionenstärke, Art des Lösungsmittels). Aber auch die an das Ionophor gebundenen Fluorophore können die Selektivität des Ionenindikators beeinflussen. So konnte für einige Indikatorfarbstoffe gezeigt werden, dass das Indikatormolekül bestehend aus Fluorophor und Ionophor selektiver für ein bestimmtes Ion ist, als das Ionophor allein (Minta und Tsien 1989).

Wie bereits erwähnt, ändern sich die Fluoreszenzeigenschaften des Fluorophors, wenn ein Ion an das Ionophor bindet. Die Fluoreszenzquantenausbeute, die Fluoreszenzlebensdauer oder spektrale Veränderungen des Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektrums sind Parameter, die sich in Abhängigkeit von der Ionenbindung ändern und somit zur Messung der Ionenkonzentration ausgenutzt werden können. Diese Veränderungen sind Folge der Störung photoinduzierter Prozesse wie zum Beispiel dem Elektronentransfer (PET) oder dem Energietransfer (PCT). Auch eine Dimerbildung der Fluorophore kann durch die Ionenbindung induziert oder unterbunden werden und so zu einer Signaländerung führen (de Silva et al. 2000, Valeur und Leray 2000). Diese Prozesse werden in den folgenden Abschnitten kurz beschrieben.



Abbildung 1-5 Die Bindung des Ions verändert die Fluoreszenzeigenschaften des Fluorophors.

a. Photoinduzierter Elektronentransfer (PET)

In Abbildung 1-6 wird das Prinzip des photoinduzierten Elektronentransfers dargestellt. Das Ionophor fungiert als Elektronendonator und das Fluorophor als Elektronenakzeptor.

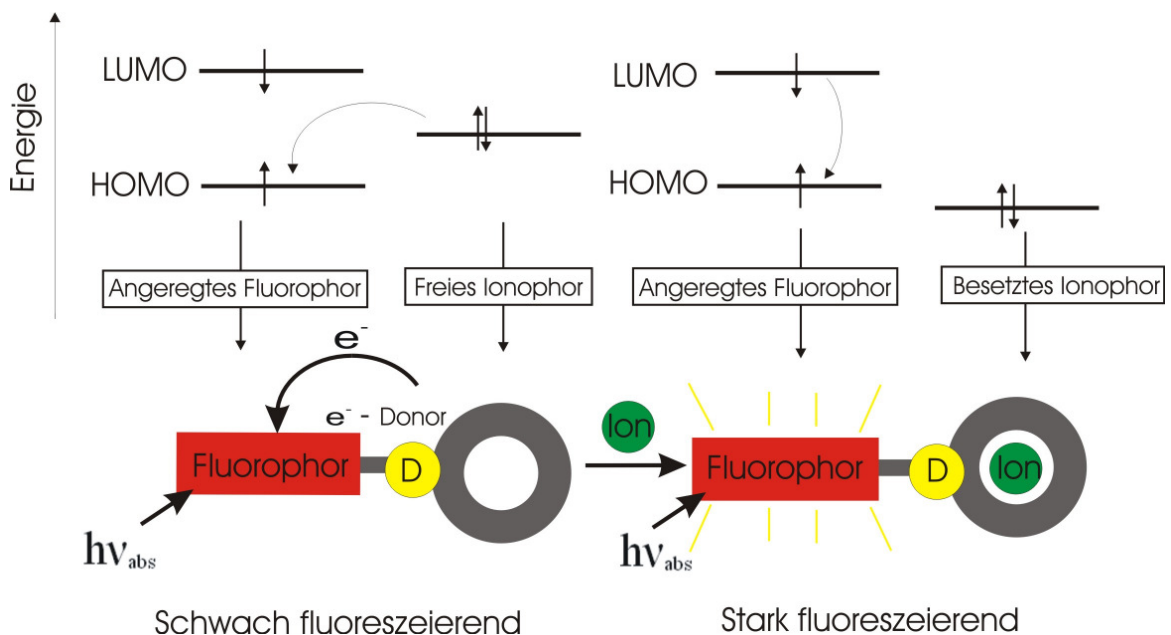


Abbildung 1-6 Prinzip des photoinduzierten Elektronentransfers. Das unbesetzte Ionophor fungiert als Elektronendonator, das Fluorophor als Elektronenakzeptor. Die Bindung des Kations verhindert den Elektronentransfermechanismus, was zu einer Fluoreszenzzunahme führt.

Die Anregung des Fluorophors verursacht den Übertritt eines Elektrons vom höchsten besetzten Molekülorbital des Fluorophors (highest occupied molecular orbital = HOMO) zum niedrigsten unbesetzten Molekülorbital des Fluorophors (lowest unoccupied molecular orbital = LUMO). In der Folge findet ein Elektronentransfer vom HOMO des Ionophors zum HOMO des Fluorophors statt. Dieser Übergang führt zur Löschung des Fluoreszenzsignals, da das Elektron somit nicht mehr vom angeregten Zustand (LUMO-Fluorophor) in den Grundzustand (HOMO-Fluorophor) relaxieren– und seine Energie in Form von

Fluoreszenzlicht abgeben kann. Die Bindung des Kations an das Ionophor erhöht dessen Redoxpotential, so dass das Energieniveau vom HOMO des Ionophors gesenkt wird. Folglich ist der Elektronentransfermechanismus nicht mehr möglich. Das angeregte Elektron kann unter Aussendung von Fluoreszenz vom LUMO des Fluorophors zum HOMO des Fluorophors relaxieren. Die Fluoreszenzquantenausbeute des Fluorophors wird dadurch erhöht und kann somit als Maß für die zu bestimmende Ionenkonzentration dienen (de Silva et al. 2000, Witulski et al. 2001).

b. Photoinduzierter Ladungstransfer (Photoinduced Charge Transfer, PCT)

Beim photoinduzierten Energietransfer findet mit der Anregung des Fluorophors eine intramolekulare Elektronenverschiebung von einer Elektronendonatorgruppe (oft eine Aminogruppe) auf einen Akzeptor statt. Die so verursachte Veränderung des Dipolmomentes bedingt eine Stokes Verschiebung, die von der Mikroumgebung des Fluorophors abhängig ist. Ionen, die in unmittelbarer Nähe des Donors oder des Akzeptors binden, beeinflussen die Effektivität des PCT und verändern so die photophysikalischen Eigenschaften des Fluorophores (Abbildung 1-7). Interagiert das bindende Ion mit dem Donor (Abbildung 1-7) wird der Grundzustand stabilisiert. Es resultiert eine Blauverschiebung des Absorptions- – und Emissionsspektrums mit Abnahme des Extinktionskoeffizienten. Umgekehrt stabilisiert eine Interaktion mit dem Akzeptor den angeregten Zustand und führt zur Rotverschiebung und zur Zunahme des Extinktionskoeffizienten (Bourson et al. 1993, Martin et al. 1993, Valeur und Leray 2000).

Die Verschiebung der Emissions- – und Absorptionsspektren kann man sich für ratiometrische Messungen zunutze machen. Man unterscheidet hierbei die duale Emissionsmethode von der dualen Absorptionsmethode. Für die duale Emissionsmethode wird der Indikator bei einer Wellenlänge angeregt. Der Ionen– Indikator-komplex fluoresziert in einem anderen Wellenlängenbereich als die ungebundene Form des Indikators. Die Fluoreszenzintensität wird deshalb separat im Wellenlängenbereich des Ionen– Indikator-komplexes und des ungebundenen Indikators detektiert. Setzt man nun die Fluoreszenzintensitäten im Emissionsbereich des ungebundenen Indikators ins Verhältnis zur Fluoreszenzintensität im Emissionsbereich des Ionen– Indikator-komplexes, so erhält man eine Größe, die den Vorteil hat, nur von der Ionenkonzentration und nicht von der Indikator-konzentration abhängig zu sein.

Im Unterschied zur dualen Emissionsmethode detektiert man bei der dualen Anregungsmethode nur in einem Wellenlängenbereich. Die Probe wird jedoch bei unterschiedlichen Wellenlängen angeregt. Man kann so die Fluoreszenzintensität bei Anregung im Absorptionsbereich der ungebundenen Form des Indikators ins Verhältnis zur Fluoreszenzintensität bei Anregung im Absorptionsbereich der gebundenen Form des Indikators setzen und erhält wiederum eine Größe, die nur von der Ionenkonzentration und nicht von der Indikatorkonzentration abhängig ist.

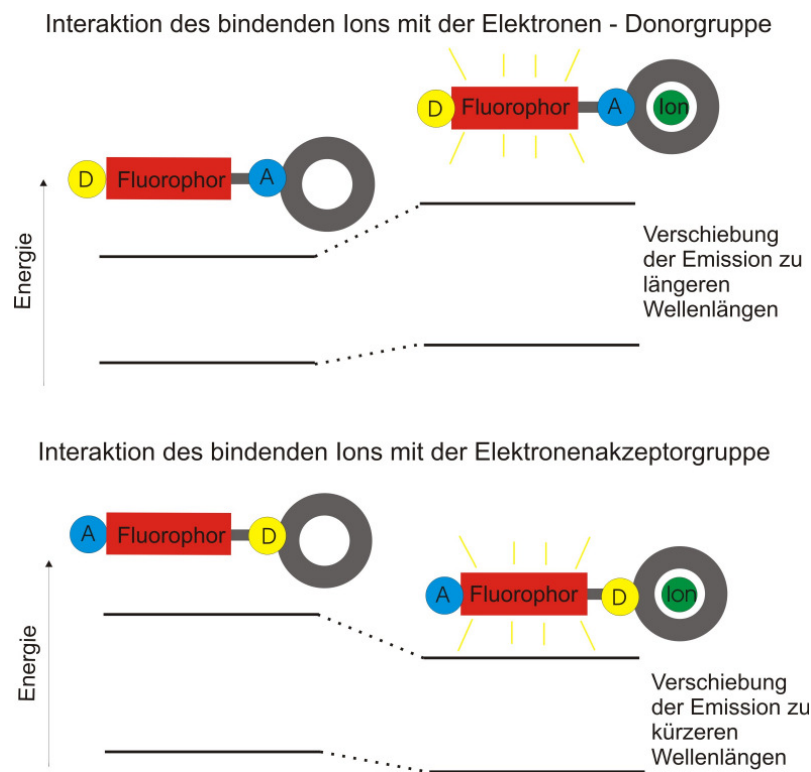


Abbildung 1-7 Prinzip für die Fluoreszenzänderungen, die auf dem Mechanismus des Photoinduzierten Energietransfers beruhen.

c. Ionenindikatorsysteme, die auf einer Dimerisierung der Fluorophore basieren

Sind an das Ionophor zwei Fluorophore gekoppelt, können sich diese gegenseitig beeinflussen. Die Ionenbindung an das Ionophor beeinflusst die Effektivität der Interaktion zwischen den Fluorophoren und induziert damit eine Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften, welche als Signalparameter genutzt werden können (Zhang et al. 1995, Crawford et al. 1998, Prodi et al. 1998, Valeur und Leray 2000).

1.5 Natriumsensitive Fluoreszenzindikatoren

1.5.1 Anforderungen an einen idealen Natriumindikator

Ein idealer Natriumindikator für intrazelluläre Natriummessungen sollte die im Folgenden beschriebenen Eigenschaften haben (Minta und Tsien 1989).

Selektivität: Die intrazelluläre Kaliumkonzentration übersteigt die Natriumkonzentration um das 10-fache. Ein Indikator für die Bestimmung intrazellulärer Natriumkonzentrationen sollte deshalb sehr selektiv für Natrium gegenüber Kalium sein.

Natriumabhängiger Signalparameter: Die Natriumbindung muss eine starke Änderung des Signalparameters bewirken. Das natriumabhängige Fluoreszenzsignal darf dabei nicht nennenswert durch andere intrazelluläre Bestandteile verfälscht werden.

Absorption: Eine gleichzeitige Anregung zellulärer Autofluoreszenz wie zum Beispiel NADH/NADPH (Absorptionsmaximum bei 360 nm) sollte vermieden werden.

Emission: Um Reabsorption und Fluoreszenztransferprozesse zu verhindern, sollten Absorptions- und Emissionsspektrum so wenig wie möglich überlappen. Ein Emissionsmaximum jenseits von 500 nm wäre wünschenswert, um eine Überlappung mit zellulärer Autofluoreszenz zu verhindern.

Fluoreszenzausbeute: Um die Messdauer kurz und die Belastung der Probe gering zu halten, sollte das Fluorophor im Zustand der natriumgebundenen Form eine hohe Fluoreszenzausbeute haben.

Natriumbindung: Die Dissoziationskonstante (K_d) für die Natriumbindung sollte im Bereich intrazellulärer Natriumkonzentrationen liegen. Für die Bindung von Natrium an das Indikatormolekül gilt folgende Gleichung:



Der K_d -Wert errechnet sich nach dem Massenwirkungsgesetz wie folgt:

$$K_d = \frac{[Na^+][Indikator]}{[Na - Indikatorkomplex]} \quad \text{Gleichung 1-17}$$

Für $K_d = [Na^+]$, gilt $[Indikator] = [Na - Indikatorkomplex]$. Somit ist die größtmögliche Sensitivität in beide Richtungen gewährleistet. Ein K_d -Wert zwischen 10 mM und 20 mM wäre also für intrazelluläre Messungen erstrebenswert.

pH-Wert: Unter bestimmten Bedingungen (z.B. Azidose) kann sich der intrazelluläre pH-Wert verändern. Deshalb sollte der pH-Wert in einem Bereich von pH = 6.0 bis pH = 8.0 auf die Natriumbindung oder das Fluoreszenzsignal des Indikators keinen Einfluss haben, da Schwankungen des intrazellulären pH-Wertes das Messergebnis sonst verfälschen würden.

Wasserlöslichkeit: Der Indikator sollte über genügend polare Gruppen verfügen, damit er gut wasserlöslich ist und sich gleichförmig im Zytosol verteilt.

Maskierbarkeit: Die polaren Gruppen sollten durch Schutzgruppen, die durch intrazelluläre Enzyme abgespalten werden können, maskierbar sein. Dieses Prinzip ermöglicht es, dass der maskierte und deshalb lipophile Indikator durch die Zellmembran diffundieren kann. Nach Abspaltung der Maskierungsgruppen durch intrazelluläre Enzyme kann der nun polare Indikator einerseits die Zelle nicht mehr verlassen und ist andererseits gut im Zytosol löslich. Diese Methode stellt eine einfache Möglichkeit dar, eine Vielzahl von Zellen gleichzeitig mit einem Indikator zu beladen.

1.5.2 Struktur und Selektivität kommerziell erhältlicher Natriumindikatoren

Die Zahl der kommerziell erhältlichen natriumsensitiven Fluoreszenzionenindikatoren ist nicht sehr groß. Die am häufigsten gebrauchten Indikatoren sind SBFI und Sodium Green (Haugland 2004). Weniger gut erprobt sind die relativ neuen Natriumindikatoren CoroNa Red und CoroNa Green.

Als natriumbindende Einheit für einen Natriumindikator haben sich Kronenether als geeignet erwiesen. Über die Ringgröße lässt sich die Selektivität gegenüber Natrium- und Kaliumionen beeinflussen.

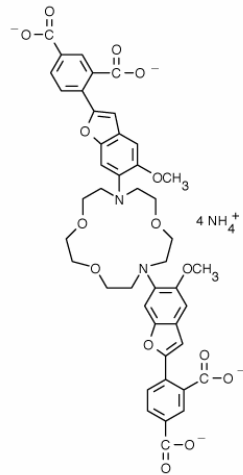


Abbildung 1-8 Strukturformel des natrium-sensitiven Ionenindikators SBF1

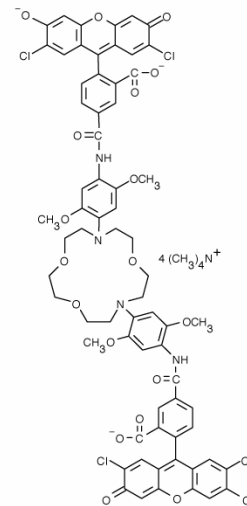


Abbildung 1-9 Strukturformel des natrium-sensitiven Indikators Sodium Green

Sowohl SBF1 als auch Sodium Green besitzen als natriumbindende Einheit ein 1,7-Diaza-4,10,13-trioxacyclopentadecan Gerüst, an dessen Stickstoffatome die jeweiligen Fluorophore gekoppelt sind. Im Sodium Green Molekül fungieren zwei Fluoreszeinderivate, die über einen Aminochinolether mit dem Stickstoffatom des Kronenethers verknüpft sind, als Fluorophor (Haugland 2004). Im Falle von SBF1 sind zwei Benzofuranisophthalate als Fluorophore an den Kronenether gebunden.

Der K_d -Wert für die Natriumbindung von Sodium Green und SBF1 beträgt 6mM beziehungsweise 3,8mM und liegt somit in beiden Fällen im Bereich der intrazellulären Natriumkonzentration. Da die intrazelluläre Kaliumkonzentration die intrazelluläre Natriumkonzentration um mehr als das zehnfache übersteigt, ist es sehr wichtig, dass Natriumindikatoren für intrazelluläre Messungen sehr selektiv für Natrium gegenüber Kalium sind. SBF1 zeigt eine Natriumselektivität gegenüber Kalium von 1:18 und Sodium Green von 1:41 (Minta und Tsien 1989, Diarra et al. 2001, Haugland 2004). In Gegenwart von Kalium konnte für SBF1 ein K_d -Wert von 11,3mM und für Sodium Green ein K_d -Wert von 21mM bestimmt werden (Haugland 2004). SBF1 und Sodium Green haben beide die gleiche Natrium bindende Domäne. Trotzdem zeigen die Indikatoren unterschiedliche Selektivitäten für Natrium gegenüber Kalium. Diese Tatsache verdeutlicht, dass die Natriumaffinität der

Indikatoren auch durch die an den Kronenether gebundenen Fluorophore beeinflusst wird (Minta und Tsien 1989).

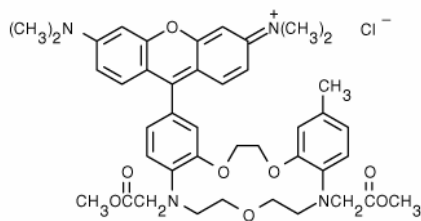


Abbildung 1-10 CoroNa Red

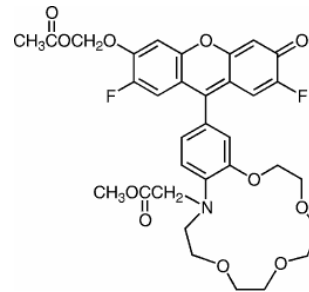


Abbildung 1-11 CoroNa Green

Der Natriumindikator CoroNa Red setzt sich aus einem Dibenzodiaza – Analogon des 15-Kronen-5-ether als Ionophor und einem Tetramethylrhodaminderivat als fluoreszierende Komponente zusammen (Abbildung 1-10). Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die ^{19}F – NMR Reagenzien, die Smith et al. synthetisiert haben (Smith et al. 1986). Der K_d –Wert des Indikators liegt jedoch bei ungefähr 200 nmol (Haugland 2004), was ihn für intrazelluläre Messungen nur bedingt einsetzbar macht.

Als natriumbindende Struktur des Indikators CoroNa Green kommt ein Monobenzomonoaza-15-Kronen-5-Ether und als fluoreszierende Komponente, in Anlehnung an das Sodium Green Molekül ein Fluoreszeinderivat, zum Einsatz. Zum Farbstoff CoroNa Green liegen bisher nur wenige Untersuchungen vor. Der Hersteller Invitrogen (Carlsbad, California, USA) gibt einen K_d –Wert von 80mM an.

Im Unterschied zu Sodium Green und SBF1 sind die Fluorophore bei CoroNa Red und CoroNa Green nicht über die Stickstoffatome, sondern über den Benzolring an das Chromophor gebunden.

1.5.3 Natriumabhängige Änderungen des Fluoreszenzsignals kommerzieller Natriumindikatoren

a. Nicht - Ratiometrische Natriumindikatoren

Die Fluoreszenzintensität der Natriumindikatoren Sodium Green, CoroNa Red und CoroNa Green steigt mit der Natriumbindung und kann deshalb als Signalparameter für

Natriummessungen genutzt werden. Bei den vollständig durch Natrium gesättigten Indikatoren steigt die Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Natrium freien Form der Indikatoren für Sodium Green um den Faktor 6, für CoroNa Red um den Faktor 15 und für CoroNa Green um den Faktor 7. Eine häufige Fehlerquelle bei Natriummessungen mit nicht-ratiometrischen Fluoreszenzindikatoren in der Zelle ist, dass Änderungen der intrazellulären Indikatorkonzentration oder der Anregungsintensität einen Anstieg oder Abfall der Fluoreszenzintensität zur Folge haben. Diese Änderungen der Fluoreszenzintensität könnten dann fälschlicherweise als Änderung der Natriumkonzentration interpretiert werden.

Das Emissionsmaximum dieser Indikatoren liegt für Sodium Green bei 532 nm, für CoroNa Green bei 516 nm und für CoroNa Red bei 578 nm (Haugland 2004). Alle Farbstoffe gehören in die Gruppe der PET-Indikatoren. Eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums beziehungsweise des Absorptionsmaximums in Abhängigkeit von der Natriumbindung ist nicht zu beobachten. Ratiometrische Messungen sind somit nicht möglich.

b. Ratiometrische Natriumindikatoren

Der natriumsensitive Farbstoff SBFI lässt sich in die Gruppe der PCT-Sensoren einordnen (Valeur und Leray 2000). Bindet Natrium an das SBFI-Molekül, so interagiert es mit den Stickstoffatomen des Diaza-Kronenethers (Elektronendonator). Diese Interaktion ruft eine Verschiebung des Absorptionsspektrums zu kürzeren Wellenlängen hervor. Der Natriumindikator SBFI kann sowohl mit der dualen Absorptionmethode als auch der dualen Emissionsmethode zur Bestimmung intrazellulärer Natriumkonzentrationen eingesetzt werden. Für die Natriumkonzentrationsmessung mit der dualen Emissionsmethode wird SBFI bei 340 nm angeregt und die Fluoreszenzintensitäten bei 410 nm und 590 nm bestimmt (Baartscheer et al. 1997). Häufiger jedoch wird die duale Absorptionmethode genutzt. Hierfür wird die Fluoreszenzintensität bei Anregung mit 340 nm zur Fluoreszenzintensität bei Anregung mit 380 nm ins Verhältnis gesetzt (Meier et al. 2006).

Ratiometrische Messungen mit dem Indikator SBFI haben den grossen Vorteil, dass Messfehler, die durch Schwankungen der intrazellulären Indikatorkonzentration oder Fluktuationen der Anregungsintensität hervorgerufen werden, korrigiert werden können. Ein wesentlicher Nachteil von SBFI ist jedoch, dass sein Fluoreszenzspektrum von der zellulären, im wesentlichen auf NADH zurückzuführenden, Autofluoreszenz überlagert wird. Somit lässt sich SBFI in Systemen, die mit einer Änderung des metabolischen Status einhergehen, nicht

einsetzen. Da die Hypoxie, mit Bevorzugung der anaeroben Glykolyse, gleichfalls eine Veränderung des NADH-Spiegels bedingt, ist SBFI für derartige Untersuchungen ungeeignet. Fragestellungen die eine Natriumkonzentrationsmessung unter hypoxischen Bedingungen nötig machen, können daher mit SBFI nicht beantwortet werden (Gasbarrini et al. 1992, Friedman und Haddad 1994, Shigematsu und Arita 1999).

Auch überlappt das Emissionspektrum von SBFI mit dem einiger Pharmaka (z.B. Amilorid), die Einfluß auf die intrazelluläre Natriumkonzentration haben. SBFI kann also auch in Messungen, die den Einfluß dieser Pharmaka untersuchen, nicht zur Anwendung kommen.

c. Fluoreszenzlebensdauermessungen zur Bestimmung der Natriumkonzentration

Eine weitere Möglichkeit ergibt sich durch die Messung der Fluoreszenzlebensdauer von natriumbindenden Farbstoffen, wenn sich diese in Abhängigkeit von der Natriumkonzentration ändert. Im Idealfall lässt sich der natriumfreien Form des Indikators eine Lebensdauer und der natriumgebundenen Form eine andere, hiervon stark abweichende, Lebensdauer zuordnen. Durch eine Approximation des gemessenen Fluoreszenzabfalls mit einer biexponentiellen Funktion lassen sich dann über die Amplituden die Beiträge der jeweiligen Formen zum Gesamtfluoreszenzabfall ermitteln. Hieraus könnte dann, bei bekannter Dissoziationskonstante, die Natriumkonzentration errechnet werden. SBFI erfüllt diese Bedingungen *in vitro* und lässt sich durch ein zweiexponentielles Modell beschreiben (Kowalczyk et al. 1997, Despa et al. 2000a, Despa et al. 2000b). In dieser Arbeit wird untersucht, inwiefern man über die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer von Sodium Green und CoroNa Green, die beide im sichtbaren Wellenlängenbereich angeregt werden können, verlässlich Natriumkonzentrationen bestimmen kann.

1.5.4 Beladung der Zellen mit den Fluoreszenzindikatoren

Um Zellen mit einem wasserlöslichen Indikator zu beladen, werden verschiedene Techniken verwandt. Eine einfache Möglichkeit besteht darin, alle polaren Gruppen mit einem Ester zu maskieren, um so dem Indikator den Durchtritt durch die unipolare Doppellipidmembran der Zelle zu ermöglichen. Diese Estergruppen werden von zahlreichen in der Zelle vorhandenen Esterasen abgespalten. Nach Abspaltung der Estergruppen können die nun polaren Indikatormoleküle die Zelle nicht wieder verlassen.

Die polaren Gruppen des Indikators SBFI und CoroNa Green sind durch eine Acetoxymethylgruppe maskiert (Minta und Tsien 1989). Die polaren Gruppen des Farbstoffs Sodium Green hingegen sind durch eine Acetatgruppe maskiert. CoroNa Red nimmt hierbei eine Sonderstellung ein. Dieser Indikator ist selbst so apolar, dass er die Zellmembran passieren kann. Dies hat jedoch den Nachteil, dass CoroNa Red besonders stark in den Mitochondrien akkumuliert.

Weiterhin ist es möglich, die Indikatormoleküle in nichtmaskierter Form über eine Mikropipette in die Zelle zu befördern. Mit dieser Methode kann jeweils nur eine Zelle beladen werden.

Für den Indikator CoroNa Green berichten Meier et. al., dass ein signifikanter Anteil des Farbstoffes aus der Zelle diffundiert und somit die Natriumbestimmung verfälscht. Auch wenn die nichtmaskierte Form des Indikators CoroNa Green über eine Mikropipette in die Zelle eingebracht wird, ist dieser Effekt zu beobachten (Meier et al. 2006).

Generell ist es bei all diesen Methoden schwer steuerbar, wie viele Indikatormoleküle in die Zelle gelangen. Deshalb ist es sinnvoll, einen Signalparameter für Natriummessungen zu wählen, der von der Indikatorkonzentration unabhängig ist.

1.5.5 Eichung der Indikatoren in den Zellen

Für die Eichung der Indikatorfarbstoffe in der Zelle, werden diese mit den natrium- und kaliumselektiven Porenbildnern Monensin, Nigericin und Gramacidin umspült. Es wurden verschiedene Kombinationen von Membranporenbildnern eingesetzt. Amorino et al. nutzten in ihren Experimenten nur Gramacidin, Despa et al. eine Kombination aus allen drei benannten Porenbildner (Amorino und Fox 1995, Despa et al. 2000b). Gramacidin und Monensin sind Porenbildner, die für Natrium selektiv sind. Nigericin hingegen ist deutlich selektiver für Kalium (Alonso und Carrasco 1981, Decker und Levitt 1983, Nakamura et al. 1989).

Eine definierte extrazelluläre Natriumkonzentration kann sich so über die Membranporenbildner mit der intrazellulären Natriumkonzentration equilibrieren. Für die vollständige Equilibrierung der Natriumkonzentration ist es wichtig, dass auch Kaliumionen über einen Kaliumporenbildner frei durch die Zellmembran diffundieren können, um zu verhindern, dass sich mit der einwärts gerichteten Diffusion von Natriumionen ein elektrisches Gleichgewicht ausbildet, das der Natriumequilibrierung entgegen wirkt. Mithilfe

der Porenbildner ist es deshalb möglich, die Fluoreszenzsignale der Indikatoren bei vorgegebener Natriumkonzentration zu messen.

1.5.6 Beeinträchtigung der Indikatoren durch den pH-Wert und intrazelluläre Proteine

a. Einfluss des pH-Wertes

Für zahlreiche Fragestellungen ist es interessant, Natriumkonzentrationen unter Bedingungen in der Zelle zu messen, bei denen sich der pH-Wert des intrazellulären Milieus verändert. So sind die Natrium- und Protonenhomöostase über den Natriumprotonenaustauscher eng aneinandergelockt. Der Natrium/Protonenaustauscher transportiert ein intrazelluläres Proton im Austausch gegen ein Natriumion nach außen und wirkt somit einer intrazellulären Azidose entgegen (Aronson et al. 1982, Frelin et al. 1983, Frelin et al. 1984, Lazdunski et al. 1985). Auch beeinflusst der pH-Wert in der Zelle das Öffnungsverhalten verschiedener Natrium- und Kaliumkanäle (Wanke et al. 1980, Wanke et al. 1983, Berger et al. 1998). Die für die Kalibrierung verwendeten Ionophore Gramicidin, Nigericin und Monensin können ebenfalls den pH-Wert der Zelle beeinflussen (Diarra et al. 2001). Aus diesen Gründen ist es sehr wichtig, den Einfluss des pH-Wertes auf die Indikatorfluoreszenz zu kennen.

Für SBFI wurde ein pK_a -Wert von 6,09 bestimmt (Minta und Tsien 1989). Weiterhin konnte für SBFI gezeigt werden, dass ein Anstieg der H^+ - Konzentration einen Anstieg, eine Alkalisierung einen Abfall der Fluoreszenz zur Folge hat (Negulescu und Machen 1990, David et al. 1997, Meier et al. 2006). Bei Messungen in der Zelle könnte dies fälschlicherweise als Abfall oder Anstieg der Natriumkonzentration interpretiert werden.

Sodium Green zeigt ebenfalls eine geringfügige Abhängigkeit vom pH-Wert, wobei es bei einem Anstieg der Protonenkonzentration zu einem Abfall der Fluoreszenzintensität kommt. Dies kommt insbesondere bei höheren Natriumkonzentrationen zum Tragen. Eine Alkalisierung bis $pH=9$ hingegen beeinflusst die Fluoreszenzintensität des Indikators Sodium Green nur geringfügig (Amorino und Fox 1995).

b. Einfluss von Proteinen auf die Fluoreszenzeigenschaften des Indikators

Aufgrund einer hohen intrazellulären Proteinkonzentration von 200-300 mg/ml (Luby-Phelps 1994, Alberts 2002) ist es wichtig, den Einfluss von Proteinen auf die Fluoreszenz- und Natriumbindungseigenschaften der Indikatoren zu untersuchen. Viele Fluoreszenzionenindikatoren zeigen hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften eine Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. In einer proteinreichen Umgebung verschiebt sich so zum Beispiel das Fluoreszenzemissionsmaximum von SBFI in den blauen Wellenlängenbereich. Baartscheer et al. beobachteten eine Verschiebung um 10 nm, wenn man Proteine aus lysierten Myozyten zur Farbstofflösung gibt (Baartscheer et al. 1997). Despa et al. beschreiben sogar eine Verschiebung um 25 nm in Gegenwart einer 0,1 % BSA-Lösung (Despa et al. 2000b). In Gegenwart von Proteinen steigt die Intensität von SBFI, wobei die BSA-abhängige Fluoreszenzintensitätszunahme in Gegenwart hoher Natriumkonzentrationen geringer ausgeprägt ist als bei niedrigeren Natriumkonzentrationen (Baartscheer et al. 1997, Despa et al. 2000a). Für eine Reihe anderer Fluoreszenzfarbstoffe, so zum Beispiel Quin-2, Fura-2 und Calcium Green sind ähnliche Phänomene publiziert worden (Konishi et al. 1988, Keating und Wensel 1991, Hirshfield et al. 1996).

Die natriumabhängige Änderung der Fluoreszenzlebensdauer des Indikators SBFI wird ebenfalls stark durch Proteine beeinflusst. Die natriumabhängige Fluoreszenzlebensdaueränderung, die in Abwesenheit von BSA bestimmt wurde, ist nach Zugabe von BSA nicht mehr messbar (Despa et al. 2000c, Despa et al. 2000b). Für die Approximation des Fluoreszenzabfalls von SBFI in Abwesenheit von BSA ist eine zweixponentielle Funktion nötig. Nach Zugabe von BSA zur Farbstofflösung wird der Fluoreszenzabfall des Indikators jedoch nur ausreichend durch eine dreixponentielle Funktion beschrieben. Die neu hinzugekommene dritte Komponente wird von Despa et al. einem BSA-SBFI Komplex zugeschrieben (Despa et al. 2000a). Für steigende Natriumkonzentrationen konnte nachgewiesen werden, dass die Amplitude der dritten, BSA-abhängigen, Komponente abnimmt (Despa et al. 2000a). Hieraus schlussfolgerten Despa et al. und Baartscheer et al., dass der Einfluss von BSA auf den Indikator SBFI mit steigender Natriumkonzentration sinkt (Baartscheer et al. 1997, Despa et al. 2000a). In dieser Arbeit wird der Einfluss von Proteinen auf den Indikator Sodium Green untersucht.

1.6 Nanopartikel für die Messung intrazellulärer Ionenkonzentrationen

Aufgrund der veränderten Fluoreszenz- und Indikatoreigenschaften der Farbstoffe in Gegenwart von Proteinen ist es sinnvoll, den Indikator vor dem Einfluss der Proteine zu schützen. Eine Möglichkeit besteht darin, den Fluoreszenzindikator in Nanopartikel einzubetten. Der Indikatorfarbstoff befindet sich dann in einer chemisch inerten Matrix, in die die zu detektierenden Ionen frei diffundieren können. Proteinmoleküle können aufgrund ihrer Größe nicht in die Polymermatrix eindringen (Abbildung 1-12). Kopelman und Mitarbeiter beschreiben die Herstellung von Nanopartikeln aus unterschiedlichen Polymermatrizes: Acrylamid-Nanopartikel, Decylmethacrylat - Nanopartikel und Silicat - Nanopartikel (Kopelman et al. 1997, Uhlmann et al. 1997a, Uhlmann et al. 1997b, Buhlmann et al. 1998, Clark et al. 1999c, Kurihara et al. 1999).

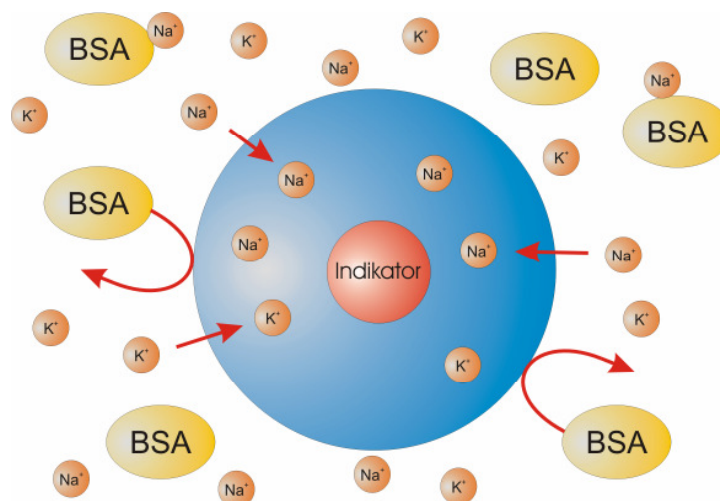


Abbildung 1-12 Funktionsprinzip eines Nanosensors.

1.6.1 Acrylamid - Nanopartikel

Acrylamid-Nanopartikel eignen sich besonders für den Einschluß von polaren Farbstoffmolekülen. Weiterhin ist aufgrund der hohen Polarität eine gute Wasserlöslichkeit zu beobachten. Die milden Synthesebedingungen für diese Partikel gewährleisten, dass der Indikator die Synthese der Partikel unbeschadet übersteht (Daubresse et al. 1994, Clark et al. 1998, Clark et al. 1999b).

Ein großer Vorteil von Acrylamid-Nanopartikeln besteht auch darin, dass durch Kombination eines nicht ratiometrischen Indikators mit einem Referenzfarbstoff im Nanopartikel ein

ratiometrisches Indikatorsystem hergestellt werden kann. Voraussetzung ist, dass sich die Eigenschaften des Referenzfarbstoffes nicht mit der Konzentration des zu detektierenden Ions ändern. Liegen beide Fluoreszenzfarbstoffe in einem konstanten Verhältnis im Nanopartikel vor, kann man die Fluoreszenzänderung des nichtratiometrischen Ionenindikators auf ein konstantes Referenzsignal beziehen. Das Signal des zweiten ionenkonzentrations-unabhängigen Fluoreszenzfarbstoffes im Nanopartikel kann als Maß für die Nanosensorkonzentration genutzt werden. Dies ist insbesondere für Messungen in der Zelle interessant, da die Konzentration der Indikatoren oder Nanosensoren in der Zelle nur schwer gesteuert werden kann. Sumner et al. kombinierten so zum Beispiel den Zinkindikator Newport Green mit dem Referenzfarbstoff Texas Red. Ein ähnlicher Sensor aus Calcium Green und Texas Red wurde von Clark et al. für intrazelluläre Kalzium Messungen verwandt (Sumner et al. 2002). In dieser Arbeit werden natriumsensitive Acrylamid-Nanopartikel aus Sodium Green und Texas Red synthetisiert und hinsichtlich ihrer Eigenschaften für Natriummessungen in der Zelle untersucht.

1.6.2 Decylmethacrylat Nanopartikel

Im Unterschied zu den Acrylamid-Nanopartikeln ist die Matrix der Decylmethacrylat-Nanopartikel apolar, so dass nur hydrophobe Farbstoffe im Inneren festgehalten werden können. In Decylmethacrylat-Nanopartikel können Fluoreszenz-pH-Indikatoren mit einer separaten ionenbindenden Einheit, im Sinne eines „Tandem Optical Sensors“ kombiniert werden (Morf et al. 1989, Kopelman et al. 1997, Buhlmann et al. 1998, Kurihara et al. 1999). In Abbildung 1-13 wird das Funktionsprinzip der Decylmethacrylat-Nanosensoren dargestellt. Ein Ion, das an die ionenbindende Einheit bindet, bringt eine positive Ladung in die Matrix. Aus Gründen der Elektroneutralität verlässt im Ausgleich dafür ein Proton die Polymermatrix. Diese Änderung des pH-Wertes im Partikel bedingt die Fluoreszenzänderung des pH-Indikators. Die Herstellung der Decylmethacrylat Nanopartikel erfolgt bei 80° C. Da diese Temperatur den Farbstoff schädigen würde, werden die Partikel erst nach erfolgreicher Synthese mit den Indikatorsubstanzen beladen. Die von Kopelman und seinen Mitarbeitern beschriebenen Decylmethacrylat Nanopartikel haben eine Grösse von 0,2µm – 2µm (Buhlmann et al. 1998). Ein großer Nachteil der Decylmethacrylat Nanopartikel ist, dass Änderungen des pH-Wertes in der Messlösung das Messergebnis verfälschen können.

Deshalb sollte für eine genaue Messung stets gleichzeitig der pH-Wert der Messumgebung detektiert werden.

Nanopartikel aus Decylmetacrylat

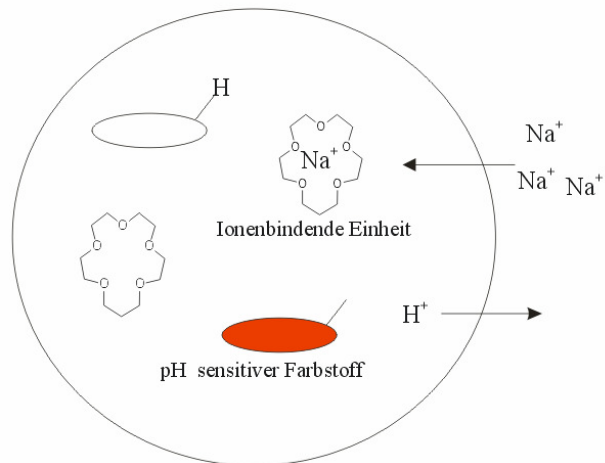


Abbildung 1-13 Funktionsprinzip eines Tandem Optical-Sensors in Decylmethacrylat Partikeln

1.7 Zielstellung dieser Arbeit

In dieser Arbeit werden verschiedene Strategien, intrazelluläre Natriumkonzentrationen zu messen, verfolgt und auf ihre Anwendbarkeit hin getestet:

- Der natriumsensitive Fluoreszenzindikator Sodium Green wird charakterisiert. Hierfür werden die natriumabhängigen Fluoreszenzintensitätsmessungen den Fluoreszenzlebensdauermessungen gegenübergestellt. Es wird geprüft, ob es möglich ist, mit Sodium Green verlässlich intrazelluläre Natriumkonzentrationen zu messen. Zusammenfassend wird ein molekularer Mechanismus vorgeschlagen, der die natriumabhängige Signaländerung des Indikators Sodium Green erklärt.
- Durch Einschluss des Indikators Sodium Green in Nanopartikel wird eine Möglichkeit beschrieben, den Einfluss von Proteinen auf die Fluoreszenzeigenschaften des Sodium Greens auszuschalten. Da Fluoreszenzintensitätsmessungen zur Natriumkonzentrationsbestimmung mit dem nicht ratiometrischen Indikatorfarbstoff Sodium Green sehr fehlerbehaftet sind, werden in dieser Arbeit ratiometrische Nanosensoren hergestellt, die den natriumsensitiven Indikator Sodium Green und den Referenzfarbstoff Texas Red enthalten.
- Für den neuen Indikator CoroNa Green wird ebenfalls untersucht, ob sich die Fluoreszenzlebensdauer für Natriumkonzentrationsmessungen eignet.

2 Methoden

2.1 Lösungen

Alle Lösungen für die spektroskopischen Messungen wurden mit 5mM Hepespuffer angesetzt und mit Tetramethylammoniumhydroxid auf einen pH-Wert von 7,4 titriert. Um eine konstante Ionenstärke zu gewährleisten, wurde den Messlösungen mit unterschiedlichen Natriumkonzentrationen Tetramethylammoniumchlorid oder Kaliumchlorid zugesetzt, so dass die Gesamt-Kationenkonzentration 145 mM betrug ($[\text{Na}^+] + [\text{TMA}^+] = 145\text{mM}$ oder $[\text{Na}^+] + [\text{K}^+] = 145\text{mM}$).

Die Stammlösung (10mM) des Natrium Green Tetramethylammoniumsalzes (Invitrogen-S6900, Carlsbad, California, USA) wurde in destilliertem Wasser angesetzt. Für Messungen in der Zelle wurde eine Natrium Green Tetraacetat-Stammlösung (5mM) (Invitrogen-S6900, Carlsbad, California, USA) in DMSO angefertigt. Eine CoroNa Green Stammlösung (10mM) (Invitrogen-C36675, Carlsbad, California, USA) wurde in DMSO angesetzt.

2.2 Zellen

2.2.1 Zellkultur

Für Natriummessungen in der Zelle wurden CHO-Zellen (chinese hamster ovary cells), COS7 Zellen (monkey kidney cells) und HEK-293 (human embryonic kidney cells) Zellen verwandt. Diese Zellen wurden in Minimal Essentielles Medium (MEM), das 10% FCS (Fetal Calf Serum) und die Antibiotika Penicillin und Streptomycin enthielt, bei 37°C und 5% CO₂ angezüchtet.

2.2.2 *Beladung der Zellen mit dem membrangängigen Natriumindikator Natrium Green – Tetraacetat*

Für die Beladung der Zellen mit dem Indikator Natrium Green wurde eine 5mM Natrium Green Tetraacetat-Stammlösung (Invitrogen, Carlsbad, USA, S6901) in DMSO angesetzt.

Vor der Zugabe des Indikators zu den Zellen wurde das Kulturmedium von den Zellen entfernt und mit einer 5mM Hepespuffer-Lösung, die 140 mmol NaCl und 5.8 mmol KCl enthielt, zwei bis drei mal gespült.

Für die Herstellung der Inkubationslösung wurde zu 1 ml Hepespuffer 1 µl der Natrium Green Tetraacetat Stammlösung gegeben. Um eine bessere Löslichkeit des Natrium Green Tetraacetats in Wasser zu gewährleisten, wurde der Lösung zusätzlich 1 µl (5% w/v) des nichtionischen Tensids Pluronic F-127 (Invitrogen, Carlsbad, USA, P3000MP) zugesetzt. Dieses Gemisch wurde über die gewaschenen Zellen gegeben, so dass die Endkonzentration des Natrium Greens 5 µM und des Pluronic F-127 0,05 % (w/v) betrug. Dem apolaren Ester ist es möglich, die Lipidmembran der Zelle zu durchdringen. Die zahlreichen intrazellulär vorhandenen Esterasen hydrolysieren das Ester und verhindern somit das Wiederaustrreten des Farbstoffes aus der Zelle (Minta und Tsien 1989). Nach Inkubation der Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur wurden diese 7–8 mal in dreiminütigen Abständen sorgfältig mit einer 5mM Hepespufferlösung gewaschen, um den extrazellulär verbliebenen Farbstoff vollständig auszuwaschen. Dies ist sehr wichtig, da ein weiterer Anstieg der intrazellulären Farbstoffkonzentration die Fluoreszenzintensitätsmessungen verfälschen würde.

2.2.3 Eichung der intrazellulären Natriumkonzentration

Für die Eichung der Indikatorfarbstoffe in der Zelle, wurden Lösungen unterschiedlicher Natriumkonzentrationen hergestellt, die die Porenbildner Gramacidin (15µM), Nigericin (5µM) und Monensin (10µM) enthielten. Die Zellen wurden mit diesen Lösungen umspült, so dass sich die bekannte extrazelluläre Natriumkonzentration über die Porenbildner mit der intrazellulären Natriumkonzentration equilibrieren konnte (Amorino und Fox 1995, Despa et al. 2000b). Alle Lösungen enthielten Hepespuffer (5mM), der für die Natriumkonzentrationen 10mM, 20mM und 50mM mit KOH und für die Natriumkonzentration 100mM mit NaOH auf einen pH-Wert=7,4 titriert wurde. Die Kaliumkonzentration wurde so gewählt, dass die Summe aus Natrium - und Kaliumkonzentration stets 145mM betrug.

Allen Lösungen wurde weiterhin Oobain (10µM) zugesetzt, um zu verhindern, dass Natrium im Austausch gegen Kalium durch die Natrium-Kalium ATPase aus der Zelle transportiert wird und so die Eichung verfälscht.

2.3 Fluoreszenzspektroskopische Methoden

2.3.1 Bestimmung der Fluoreszenz - und Absorptionsspektren

Absorptionsspektren wurden mit einem Lambda 16 UV/VIS Spektrophotometer (Perkin Elmer, Wellesley, USA) in Quarzküvetten mit einer Kantenlänge von 1 cm und für Lösungen mit höheren Farbstoffkonzentrationen in Quarzküvetten mit einer Kantenlänge von 1 mm aufgenommen.

Die Anregungs- und Fluoreszenzemissionsspektren wurden mithilfe des Jobin Yvon Spex Fluorolog3 (HORIBA Jobin Yvon Inc, München, Deutschland) in Quarzküvetten mit einer Kantenlänge von 1 cm und 0,5 cm vermessen, wobei das Fluoreszenzsignal rechtwinklig zur Anregungsquelle (Hg – Lampe) detektiert wurde. Die Spaltbreite für Anregung und Emission betrug 5 nm. Alle Spektren wurden in 1 nm Schritten aufgezeichnet. Die Fluoreszenzanregungsspektren von Sodium Green und Texas Red wurden bei einer Emissionswellenlänge von 530 nm beziehungsweise 603 nm aufgenommen. Für die Aufnahme der Fluoreszenzemissionsspektren wurde Sodium Green mit 488 nm, und Texas Red mit 543 nm angeregt. Diese Anregungswellenlängen entsprechen nicht den Absorptionsmaxima der Farbstoffe Sodium Green und Texas Red. Im Hinblick auf Natriumkonzentrationsmessungen in der Zelle wurden diese Wellenlängen gewählt, da in Laserscanning Mikroskopen üblicherweise ein Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm und ein Helium/Neon Laser mit einer Wellenlänge von 543 nm zur Verfügung stehen. Die Resultate aus den Küvettenmessungen lassen sich somit besser auf Messungen mit dem Laserscanningmikroskop übertragen.

2.3.2 Fluoreszenzintensitätsmessungen für die Bestimmung intrazellulärer Natriumkonzentrationen

Fluoreszenzmessungen in mikroskopischen Präparaten können mithilfe eines konventionellen Epifluoreszenzmikroskops oder eines konfokalen Mikroskops durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurde ein konfokales Laserscanning Mikroskop der Firma Carl Zeiss (LSM 510) für die Messung der Fluoreszenz verwendet. Das Messprinzip wird im folgenden Abschnitt näher erläutert.

a. Prinzip des konfokalen Laserscanning Mikroskops

Beim konfokalen Messverfahren wird Licht, das nicht aus der Brennebene des Objektivs stammt, ausgeblendet (Abbildung 2-1). Eine Lochblende (A) beschränkt die Ausleuchtung des Objekts. Das vom Objekt reflektierte oder emittierte Licht wird mithilfe eines Strahlenteilers auf einen Detektor fokussiert. Eine zweite Lochblende (B) beschränkt das Sichtfeld auf einen Punkt des Objektes. Der Durchmesser der Blenden wird so klein gewählt, dass nur Licht aus Bereichen des Objekts, die in der Brennebene liegen, in die Apertur der Lochblende B fällt (Abbildung 2-1). Fluoreszenzlicht aus den Ebenen, die ober- oder unterhalb der Brennebene liegen, wird bei dieser Methode nicht detektiert. Im Unterschied zum Epifluoreszenzmikroskop erhält man deshalb mithilfe des konfokalen Prinzips ein schärferes Fluoreszenzbild (Wilson und Sheppard 1984).

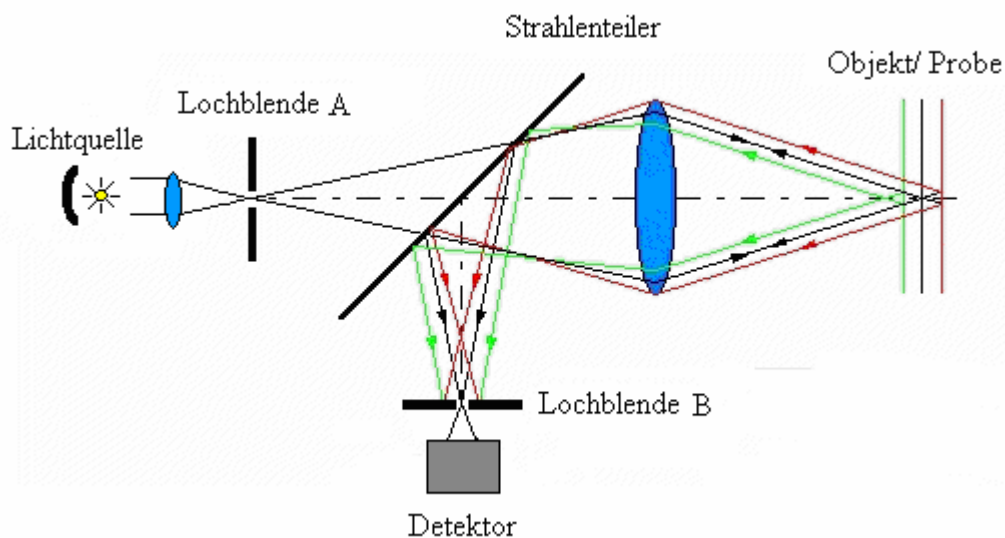


Abbildung 2-1 Das konfokale Prinzip.

Im Unterschied zum konventionellen Mikroskop erzeugt ein konfokales Laserscanning Mikroskop (Abbildung 2-2) zunächst nur einen Bildpunkt, der genau einen Punkt aus der Brennebene des Objektivs darstellt. Um ein vollständiges Bild des Objekts zu erhalten, muss das Objekt Punkt für Punkt gerastert (gescannt) werden. Die dabei gesammelten Bildpunkte werden dann im Computer zu einem vollständigen Bild zusammengesetzt.

Ein weiterer Vorteil dieser Methode besteht darin, dass man die Fokusebene schrittweise verschieben- und somit Fluoreszenzbilder verschiedener Ebenen aufzeichnen kann. Die

einzelnen Bilder (optische Schnitte) lassen sich im Anschluss zu einem dreidimensionalen Bildstapel zusammensetzen und digital verarbeiten.

Für diese Arbeit wurde das konfokale Laserscanning Mikroskop LSM 510 (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) in Kombination mit den Wasser – Immersions – Objektiven C-Apochromat 10x, 40x und 63x verwandt.

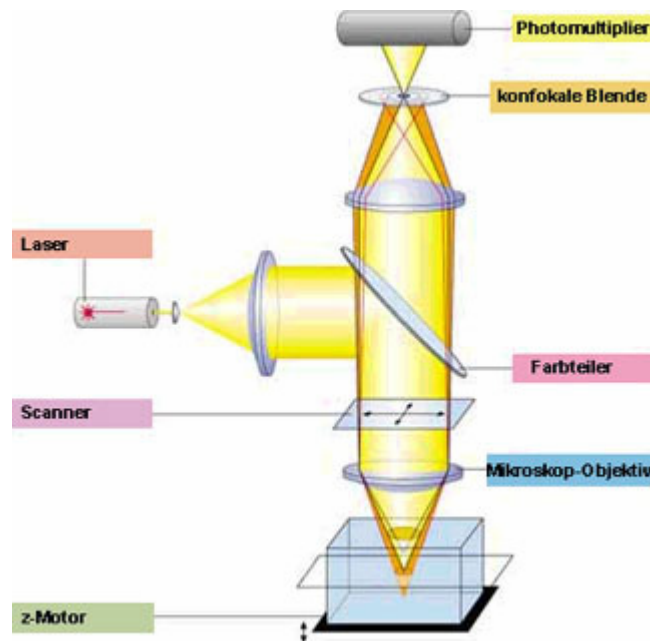


Abbildung 2-2 Schematischer Aufbau eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops. (Abbildung aus der Broschüre „Das konfokale Laserscanning Mikroskop im Überblick“, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland)

b. Konfiguration des LSM 510 für die Bestimmung intrazellulärer Natriumkonzentrationen.

Für die Anregung der Probe besitzt das Laserscanning Mikroskop LSM 510 einen Argon Laser mit den Laserlinien 458nm, 488nm und 514nm, sowie einen Helium - Neon Laser mit den Laserlinien 543 nm und 633 nm. Das Laserlicht gelangt durch getrennte Lichtleiter zum Scanmodul, wo es vom Hauptfarbteiler (HFT) in die Probe reflektiert wird. Das von der Probe zurückkommende längerwellige Fluoreszenzlicht kann den Hauptfarbteiler passieren. Es stehen unterschiedliche Hauptfarbteiler für die unterschiedlichen Anwendungen und Laserlinien zur Verfügung. Mit Hilfe von Nebenfarteilern (NFT) kann das Licht weiterhin Spektral aufgespalten und durch Spiegel in unterschiedliche Kanäle reflektiert werden. Jeder

der vier konfokalen Kanäle ist mit einer in Größe und Position frei einstellbaren Blende (Pinhole) versehen. Mit Emissionsfiltern für alle relevanten Spektralbereiche wird sichergestellt, dass nur Photonen der gewünschten Wellenlängen von den hochempfindlichen Photomultipliern detektiert werden.

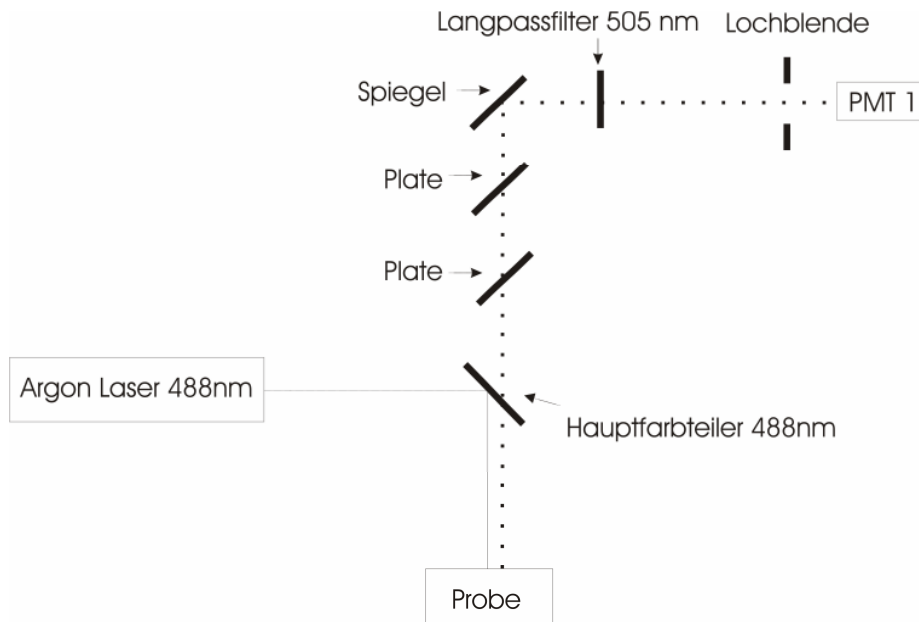


Abbildung 2-3 Konfiguration des LSM 510 für die Bestimmung intrazellulären Natriumkonzentrationen mit dem Indikator Sodium Green.

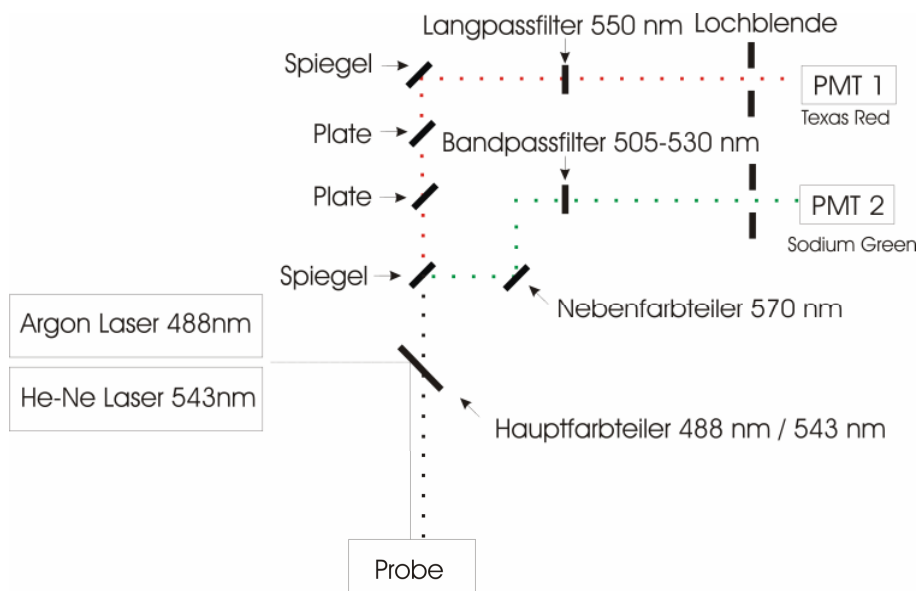


Abbildung 2-4 Konfiguration des LSM 510 für die Bestimmung intrazellulärer Natriumkonzentrationen mit Sodium Green - Texas Red Nanosensoren.

Für Fluoreszenzintensitätsmessungen in Zellen wurde die Strahlenkonfiguration für das LSM 510 aus Abbildung 2-3 (Sodium Green Messungen) und Abbildung 2-4 (ratiometrische Messungen mit Sodium Green – Texas Red Nanopartikeln) gewählt.

2.3.3 Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauern

Die meisten Fluorophore bleiben nach der Anregung nur wenige Nanosekunden im angeregten Zustand S_1 (vgl. Abschnitt 1.3.1). Um die Lebensdauer dieses Zustandes zu bestimmen, benötigt man kurze Pulse für die Anregung der Probe und schnelle Detektoren für die Registrierung der von der Probe emittierten Fluoreszenz. Für die in dieser Arbeit vorgestellten Messungen wurden ultrakurze Anregungspulse mithilfe eines Titan-Saphir Lasers generiert. Der Fluoreszenzabfall wurde mit einer Streak Camera oder einem Messaufbau nach dem Prinzip der zeitaufgelösten Einzelphotonenzählung (Time correlated single photon counting, TCSPC) detektiert. Beide Verfahren werden im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

a. Fluoreszenzlebensdauermessungen mit einer Streakcamera

Fluoreszenzanregung: Ultrakurze Lichtpulse mit einer Halbwertsbreite von 70-150 fs wurden durch ein Ti:Sapphire Laser System (Mira 900D, Coherent GmbH, Dieburg, Deutschland) erzeugt, der durch einen frequenzverdoppelten Nd:YVO₄ Laser (5W Verdi, Coherent) gepumpt wurde. Das Ti:Sapphire Laser System ist in einem Wellenlängenbereich von 700nm bis 1000nm durchstimmbar.

Für Fluoreszenzlebensdauermessungen mit einer Streakcamera wurde die Frequenz des Ti:Sapphire Lasers durch einen Pulse – Picker (Model 9200, Coherent GmbH, Dieburg, Deutschland) auf 2 MHz reduziert. Für die Anregung des Sodium Green Moleküls wurde ein gepulster Laserstrahl der Wellenlänge 980 nm erzeugt und mittels eines BBO – Kristalls frequenzverdoppelt. Um eine Leistungsverminderung der Laserintensität aufgrund der Wasserabsorption bei 950 – 1000 nm zu vermeiden, wurde das Ti:Sapphire Laser System vor Justagebeginn 45 Minuten mit Stickstoff gespült. Der fokussierte Laserstrahl wurde in den Scankopf eines Laserscanning Mikroskops (LSM 510, Carl Zeiss GmbH, Göttingen, Deutschland) eingekoppelt. Kleine Glaskapillaren, die 10 μ l der unterschiedlichen Natriumindikatorlösungen enthielten, wurden mit einem gepulsten Laserstrahl der

Wellenlänge 470 nm angeregt. Um Verfälschungen durch Reabsorptionsprozesse zu verhindern, wurde der Laserstrahl mithilfe des LSM 510 50 μm vor den Boden der Kapillare fokussiert.

Fluoreszenzemission: Vom Präparat emittierte Photonen werden über einen der konfokalen Kanäle in eine optische Glasfaser eingekoppelt und zu einem Spektrographen (Model 250is, Chromex Inc., Albuquerque, USA) geführt, wo sie entsprechend ihrer Wellenlänge entlang der horizontalen Achse aufgefächert werden. Das spektral aufgelöste Signal wird nun in eine Streakcamera eingekoppelt, welche die eintreffenden Photonen hinsichtlich ihrer zeitlichen Beziehung zum Anregungspuls auftrennt. Das Funktionsprinzip einer Streakcamera ist in Abbildung 2-6 dargestellt (Model C5680 mit S20 Photokathode und M5677 Sweep Unit, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching, Deutschland).

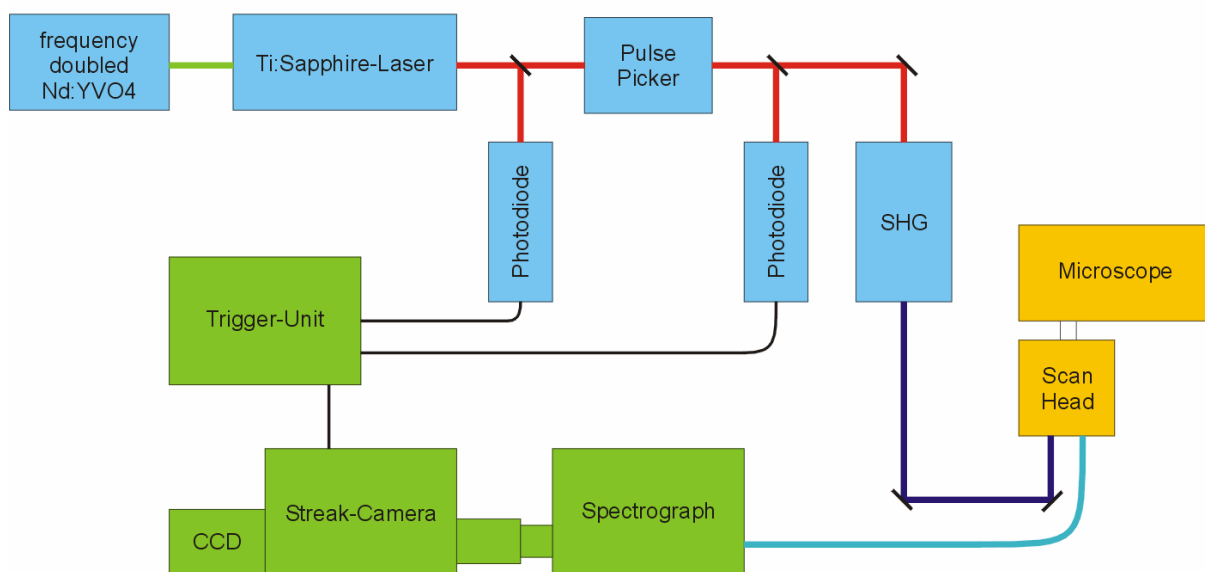


Abbildung 2-5 Messaufbau aus einer Streakcamera und einem Laserscanning Mikroskop zur Fluoreszenzlebensdauerdetektion (Biskup et al. 2004a).

Funktionsprinzip der Streakcamera: Das spektral aufgelöste Fluoreszenzsignal aus dem Spektrographen trifft auf die Photokathode der Streakcamera; hier werden die ankommenden Photonen in Photoelektronen umgewandelt. Die Photoelektronen werden durch eine Anode beschleunigt, passieren die Ablenkelektroden und treffen auf ein Multi Channel Plate (MCP). Hier werden die Elektronen vervielfacht und treffen schließlich auf einen Phosphorbildschirm, den sie am Ort ihres Auftreffens zum Leuchten bringen. Dieses Signal

wird von einer CCD Kamera ausgelesen. Die Spannung an den Ablenkelektroden nimmt nach einem Trigger Puls kontinuierlich zu, so dass Photoelektronen, die kurz nach dem Anregungspuls eintreffen, weniger stark vertikal abgelenkt werden, als diejenigen, die später eintreffen (Abbildung 2-6). Der Ort des Auftreffens der Photoelektronen auf das Multi Channel Plate (MCP) wird durch die an den Ablenkelektroden anliegende Spannung bestimmt.

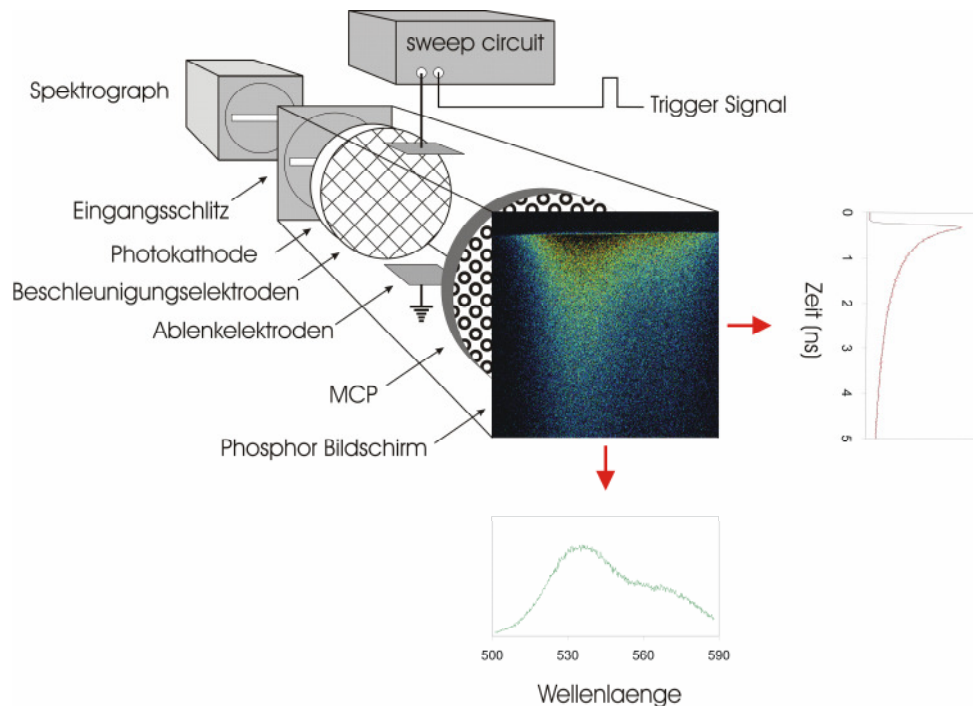


Abbildung 2-6 **Funktionsprinzip einer Streakcamera am Beispiel einer 100 μM Natrium Green Lösung.** (Biskup et al. 2004b) Einfallendes Licht setzt aus der Photokathode der Streak-Camera Photoelektronen frei, die von einer Anode beschleunigt und in einer MCP vervielfältigt werden, bevor sie auf einen Phosphorschirm treffen, wo das erzeugte Phosphoreszenzlicht von einer CCD-Camera ausgelesen wird. Auf ihrem Weg treten sie durch zwei Ablenkelektroden durch, deren Spannung innerhalb einer kurzen Zeitspanne (5 ns – 500 μs) hochgefahren werden kann. Photoelektronen, die früh durch die Ablenkelektroden hindurchtreten, erfahren nur eine geringe Ablenkspannung und treffen damit auf den oberen Teil des Phosphorbildschirms. Photoelektronen, die hingegen erst später die Ablenkelektroden durchstreifen, werden entsprechend stärker abgelenkt und treffen auf einen entsprechend tiefer liegenden Teil des Phosphorbildschirms. Die vertikale Achse des Bildes auf dem Phosphorschirm (Streak-Image) erhält damit eine zeitliche Dimension. In horizontaler Richtung werden die Photonen durch den Spektrographen nach der Wellenlänge aufgefächert.

Dieser Aufbau ermöglicht es, jedem Photon des Streakcamerabildes einen Emissionszeitpunkt nach dem Laserpuls auf der y-Achse und eine Wellenlänge auf der x-Achse zuzuordnen. Die Summation der Photonen entlang der y – Achse ergibt somit das dargestellte

Fluoreszenzmissionsspektrum und eine Summation der Photonen entlang der x – Achse die dargestellte Fluoreszenzabklingkurve (Biskup et al. 2004a).

- b. Zeitaufgelöste Einzelphotonenzählung (Time correlated single photon counting, TCSPC)

Fluoreszenzanregung: Der Aufbau für Anregung der Probe entspricht der zuvor beschriebenen Anordnung (Abbildung 2-5). Einziger Unterschied hierbei ist, dass die Pulsrepetitionsrate nicht durch einen Pulspicker verringert werden muss.

Fluoreszenzemission: Für die Fluoreszenzlebensdauermessung wurde das aus dem Laserscanning Mikroskop ausgekoppelte Fluoreszenzsignal durch einen externen Photomultiplier (PMT) detektiert, welcher in Kombination mit dem Time correlated single photon counting Modul (SPC-730, Becker & Hickl GmbH, Deutschland) für die Messung der Fluoreszenzabklingzeiten diente (Becker et al. 2004, Biskup et al. 2004a). Ein großer Vorteil dieses Aufbaus besteht in der Möglichkeit, einer bestimmten x-y Koordinate der Probe eine Fluoreszenzabklingkurve zuzuordnen zu können. Spektral aufgelöste Messungen sind hiermit jedoch nicht möglich.

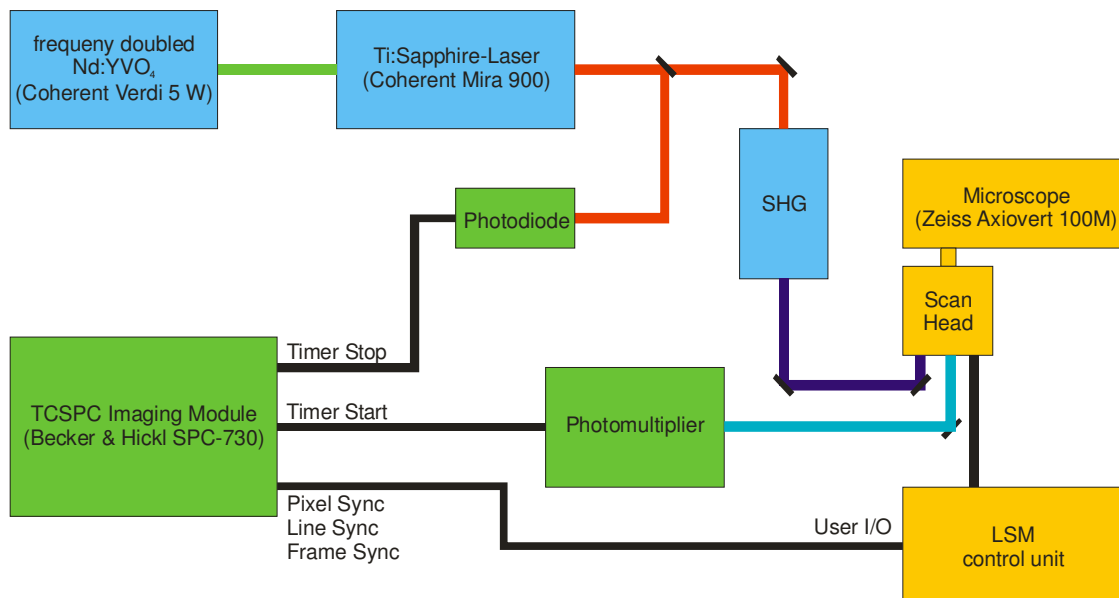


Abbildung 2-7 Messaufbau eines Laserscanning Mikroskops und einer Apparatur für Fluoreszenzlebensdauermessungen nach dem Prinzip des Time correlated single photon counting (TCSPC) (Biskup et al. auf 2000).

Prinzip des Time correlated single photon counting (TCSPC): Eine Probe wird durch einen Laserpuls mit hoher Wiederholungsrate (bis zu 80 MHz) angeregt, wobei ein Photomultiplier die von der Probe emittierten Photonen detektiert. Es wird nun die Zeitdifferenz zwischen dem ersten eintreffenden Photon (Start Signal) und dem nachfolgenden Laserpuls (Stopsignal) gemessen. Die inverse Auftragung der so ermittelten Zeitintervalle in einem Histogramm ergibt die Fluoreszenzabklingkurve (Abbildung 2-8). Bei dieser Methode ist es wichtig, dass pro Anregungspuls nur ein Photon auf den Photomultiplier trifft, da der Photomultiplier durch das erste eintreffende Photon nach dem Anregungspuls gesättigt ist. Jedes weitere Photon nach einem Anregungspuls würde nicht detektiert werden und deshalb das Messergebnis verfälschen. Deshalb setzt man voraus, dass die Wahrscheinlichkeit, ein Photon pro Anregungspuls zu detektieren, kleiner als 0,1 ist (Koester und Dowben 1978, Massa et al. 2002).

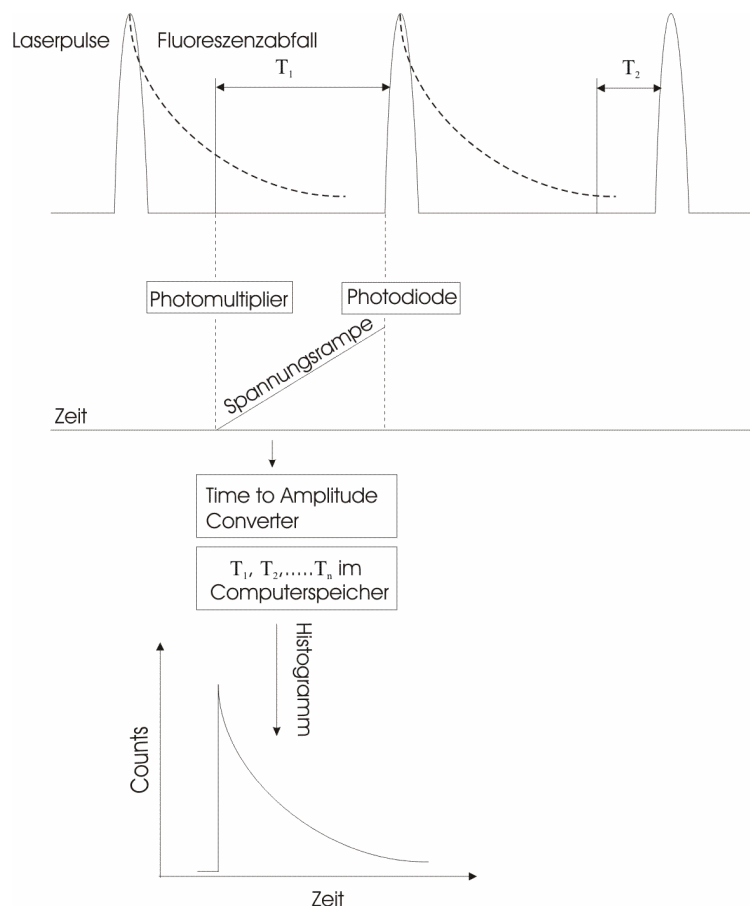


Abbildung 2-8 Prinzipskizze für das Time correlated single photon counting (TCSPC).

Für alle Fluoreszenzlebensdauer-messungen wurde das Laser Scanning Mikroskop (LSM 510) genutzt, um das Anregungslicht in die Probe zu fokussieren. Hierfür wurde der

Fluoreszenzanregungspuls in das LSM 510 eingekoppelt und das Fluoreszenzemissionssignal ausgekoppelt. Die Konfiguration des LSM 510 ist in Abbildung 2-9 dargestellt.

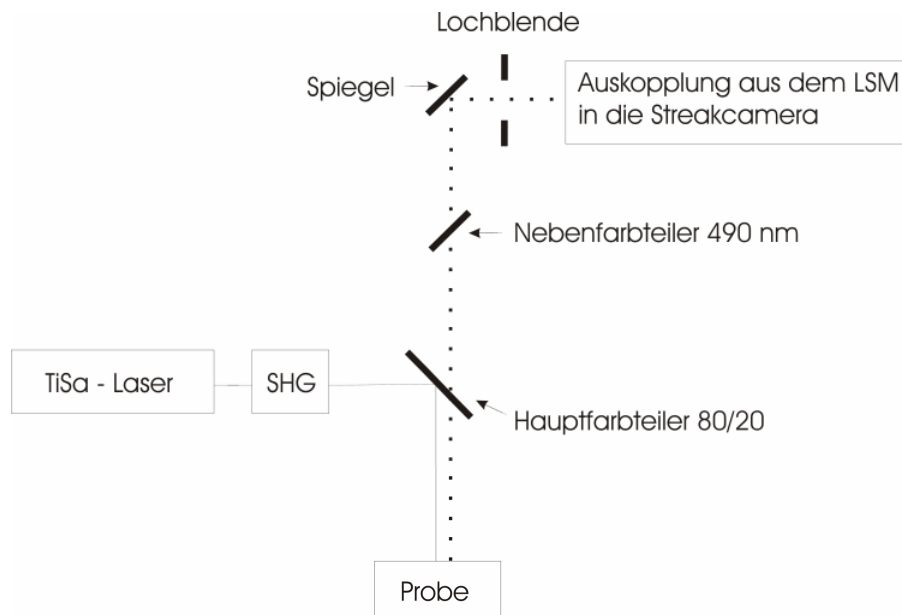


Abbildung 2-9 Filteranordnung im LSM 510 für die Detektion der Fluoreszenzlebensdauern.

2.4 Polymerpartikel

2.4.1 Herstellung der Polymerpartikel

Zum Schutz des Indikators vor dem Einfluss intrazellulärer Proteine wurde dieser in Polyacrylamidpartikel eingebracht. Eine Polyacrylamidmatrix eignet sich gut den polaren Farbstoff Sodium Green einzuschließen. Im Folgenden wird die Synthese der Sodium Green beladenen Polyacrylamidpartikel beschrieben. Zunächst wurden zwei Lösungen hergestellt, deren Zusammensetzung in Tabelle 2-1 und Tabelle 2-2 beschrieben wird.

Lösung 1

0,4 g	N,N'-methylen-bisacrylamide (Fluka, Art.:46115)
1,85 g	Acrylamid (Fluka, Art.: 01698)
4,5 ml	Phosphatpuffer pH=7,2

Tabelle 2-1 Zusammensetzung von Lösung 1 (Monomere) für die Synthese von Polyacrylamid-Nanopartikeln

Lösung 2

3,08 g	Brij 30 (Polyoxyethylene-4-laurylether) (Fluka Art.:16001)
1,59 g	AOT (Sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate) (Fluka Art.:86139)
43 ml	Hexan

Tabelle 2-2 Zusammensetzung von Lösung 2 (Lösungsmittel, Micellenbildner) für die Synthese von Polyacrylamid-Nanopartikeln

Da die Anwesenheit von Sauerstoff den Polymerisierungsprozess beeinträchtigt, wurde Lösung 2 eine Stunde durch eine Injektionsnadel, die in die Lösung eingetaucht wurde, mit Stickstoff gespült. Die Zugabe weiterer Substanzen erfolgte mithilfe einer Injektionsnadel durch eine Membran (Abbildung 2-10).

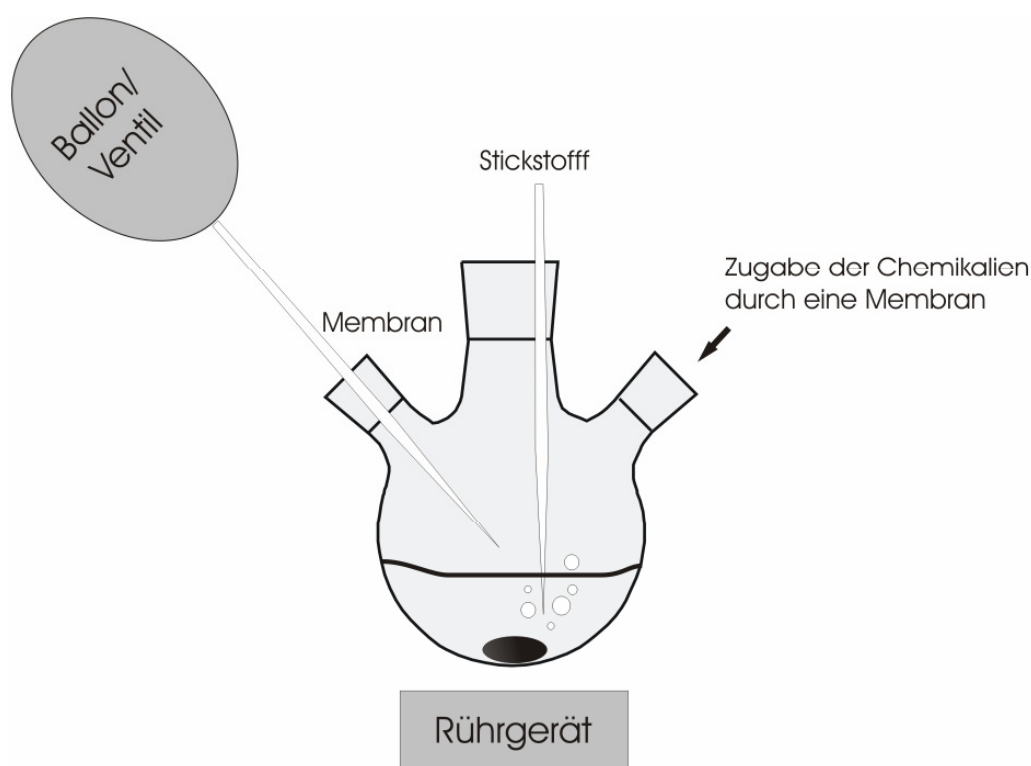


Abbildung 2-10 Schemaskizze für die Synthese der Acrylamid Nanopartikel.

Zur deoxygenierten Lösung 2 wurden 2ml der Lösung 1 tropfenweise langsam zugegeben. Weiterhin wurden 140 μ l des Farbstoffes Texas Red ($c=1\text{mg/ml}$) (Sulforhodamine 101, Fluka,

86184) und des Indikators Sodium Green ($c=1\text{mg/ml}$) hinzugegeben. Für die Dauer der Zugabe wurde der Ansatz bei mittlerer Geschwindigkeit gerührt und kontinuierlich mit Stickstoff gespült. Der Polymerisationsvorgang wurde durch Zugabe von $24\ \mu\text{l}$ einer 10% Ammoniumpersulfatlösung (Fluka, 09914) und $12\ \mu\text{l}$ TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, Fluka 87689) oder $12\ \mu\text{l}$ einer 10% Natriumbisulfit-Lösung (Sigma, 243973) gestartet (Cutaia et al. 1996, Clark et al. 1998, Clark et al. 1999c, Sumner et al. 2002). Beide Varianten sind für die Initiierung des Polymerisationsprozesses gut geeignet. In der Literatur wird beschrieben, dass einige Fluoreszenzfarbstoffe durch den Initiator TEMED geschädigt werden können (Clark et al. 1999b). Sodium Green und Texas Red haben den Polymerisationsprozess gut überstanden.

Anschließend wurde der Ansatz für zwei Stunden bei Raumtemperatur und mittlerer Geschwindigkeit gerührt, um die Polymerisation abzuschließen. Das Hexan wurde aus dem Polymerisationsgemisch mittels Rotoevaporation entfernt. Die weitgehend hexanfreie Lösung wurde dann mithilfe eines Filtrationssystems der Firma Millipore (Glass Filter Holder with frit glass screen 47 mm, Katalognummer XX10 047 00) und Filtern der Porengröße $0,02\ \mu\text{m}$ (Anodisc 47, Whatman 6809-5002) abfiltriert (Abbildung 2-11). Danach wurden die Polyacrylamidpartikel auf dem Filtersystem mit 500 ml Ethanol gewaschen und luftgetrocknet.

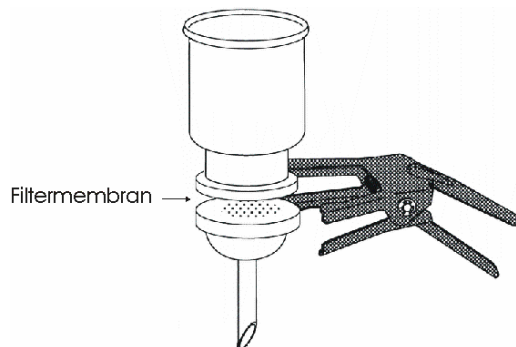


Abbildung 2-11 Prinzip des Filtersystems für die Reinigung der Acrylamid-Partikel

2.4.2 Beladung der Zellen mit den Nanopartikeln

Beladung der Zelle mit Nanopartikeln durch eine Gene Gun (Abbildung 2-12): Eine Partikelsuspension wird auf eine Membran gegeben und getrocknet. Eine weitere Membran, die bei einem definierten Druck rupturiert, befindet sich oberhalb der Membran, auf der die

getrockneten Nanopartikel lagern. Ein kurzzeitiger hoher Druck läßt die Membranen zerreißen und bewirkt somit ein Hineinschießen der Partikel in die Zellen. Es handelt sich bei diesem Verfahren um eine sehr effektive Methode, da viele Zellen gleichzeitig mit mehreren tausend Partikel beladen werden können (Daubresse et al. 1994, Clark et al. 1998, Clark et al. 1999a, Clark et al. 1999b). Die Effektivität variiert mit dem Gewicht und der Dichte der Partikel. Es konnte gezeigt werden, dass über 98% der Zellen dieses Beladungsverfahrens überleben (Clark et al. 1999a).

Für dieses Verfahren wurde das Biolistic PDS – 1000 / He System der Firma Biorad (Hercules, CA, USA) eingesetzt. Auf die Rupturmembran wurden mehrere Tropfen einer 50% - 50% Wasser – Ethanolsuspension der Partikelkonzentration 10mg/ml gegeben. Gute Ergebnisse wurden bei einem Heliumdruck von 600 psig und einem Vakuum von 25 Torr erzielt (Abbildung 2-12).

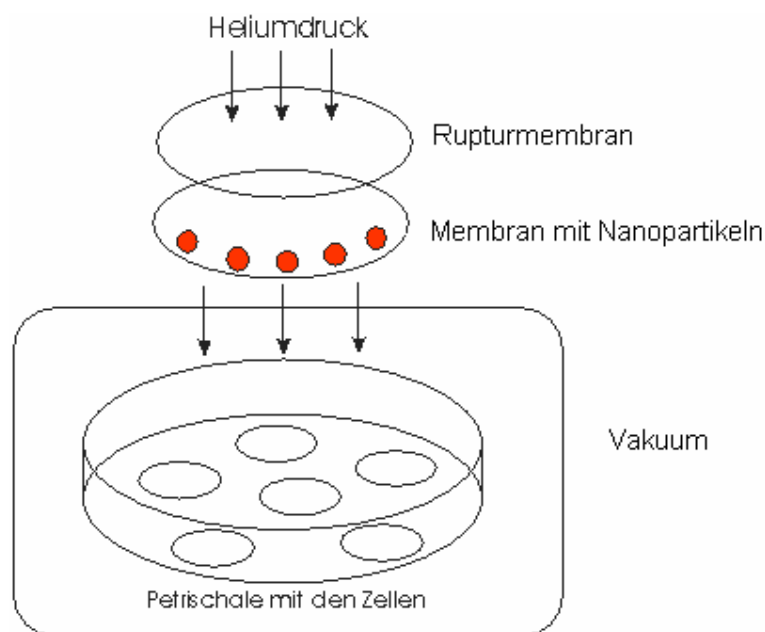


Abbildung 2-12 Funktionsprinzip der Gene-Gun zum Beladen der Zellen mit Nanopartikeln

Beladung der Zelle mit Nanopartikeln mithilfe kommerziell erhältlicher Liposomen: Bei dieser Methode bilden kationische Lipide in einem wässrigen Milieu zirka 30 µm große Liposomen. Ein Liposom schließt mehrere Nanopartikel in eine Lipiddoppelmembran ein. Die Liposom–Nanopartikel–Komplexe werden endozytotisch von der Zelle aufgenommen. Beim Verschmelzen des Liposoms mit der Zellmembran werden die Nanopartikel in das Zytoplasma abgegeben (Clark et al. 1999a).

Für dieses Verfahren wurde ein Effecten Transfektionskit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland, Katalognummer: 301425) verwandt. 9 mg der Sodium Green / Texas Red Nanopartikel wurden mit 75 µl Pufferlösung, 4 µl Enhancer und 12 µl des Tensides Effecten vermischt. Anschließend wurde die Lösung intensiv für zwei Minuten geschüttelt und 10 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt.

CHO-Zellen wurden auf 10 mm Glassplättchen ausgesät und bei einer Konfluenz von 50 - 80% mit den Nanopartikeln beladen. Hierfür wurde das FCS enthaltende Medium gegen Opti-MEM Medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, Cat No. 31985) gewechselt. Das Liposomen-Nanobead-Gemisch wurde nun zu den Zellen gegeben und sechs Stunden bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert. Danach wurde durch gründliches Waschen mit einer Hepespufferlösung das Nanopartikel-Liposomengemisch entfernt.

Kotransfektion ER-Marker und SodiumGreen Nanopartikel: Um zu überprüfen, ob die Nanopartikel in das Endoplasmatische Retikulum gelangen, wurden HEK293 – Zellen mit dem Plasmid pECFP-ER (Clontech, Mountain View, USA, Art.: 6907-1), einem Marker für das Endoplasmatische Retikulum, und den Sodium Green Nanopartikeln kotransfiziert. Das Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein aus Kalretikulin, ECFP und der ER-Retentionssequenz KDEL. HEK293-Zellen wurden mit der konventionellen Kalziumphosphat Präzipitationmethode und 1µg ER-Marker Plasmid auf 60 mm Zellkulturschalen transfiziert. Hierfür wurde 1µg Plasmid DNA auf das Volumen 240 µl verdünnt, mit 120 µl Puffer A (Kalzium Chlorid – Lösung) vermischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 240 µl Natrium Puffer B (Phosphat – Lösung) hinzupipetiert und für weitere 10 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde dann tropfenweise über die Zellen gegeben. Diese Zellen wurden im Brutschrank (CO₂ 5%, 37°C) inkubiert und nach 24 Stunden auf 10 mm Glasplättchen umgesetzt. Nach weiteren 2 Tagen wurden die ER-markierten Zellen entsprechend des oben beschriebenen Protokolls mit Sodium Green-Texas Red Nanopartikeln beladen.

2.5 Auswertung der Daten

2.5.1 Auswertung der Fluoreszenzintensitätsmessungen

Für die Auswertung der natriumabhängigen Fluoreszenzintensitätsänderungen wurden mit der Software Origin (Northampton, MA, USA) die Flächen unter den Fluoreszenzemissionspektren bei den jeweiligen Natriumkonzentrationen bestimmt und in Abhängigkeit von der Natriumkonzentration aufgetragen. Um den K_d -Wert für die Natriumbindung des Indikators zu ermitteln, wurde Gleichung 2-1 an die Datenpunkte angepasst (Gryniewicz et al. 1985, Winslow et al. 2002). Der K_d -Wert erlaubt es, eine Aussage über das Natriumbindungsverhalten des Ionenindikators zu treffen, wobei dieser der Natriumkonzentration entspricht, bei der die Hälfte aller Indikatormoleküle ein Natriumion gebunden haben. Gleichung 2-1 wird im Anhang hergeleitet (Abschnitt 6). Die Anpassung von Gleichung 2-1 an die Daten erfolgte mit der Software GraphPad (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA).

$$\frac{F}{F_{\min}} = \frac{p * [Na^+]}{K_d + [Na^+]} + 1 \quad \text{Gleichung 2-1}$$

Der Parameter p gibt das Verhältnis ($p = F_{\max}/F_{\min} - 1$) der Fluoreszenzintensität des vollständig natriumgesättigten Indikators zur Fluoreszenzintensität des Indikators in Abwesenheit von Natrium an.

2.5.2 Auswertung der Fluoreszenzlebensdauermessungen

Für die Auswertung der Fluoreszenzlebensdauermessungen werden die Fluoreszenzlebensdauerkurven der Natriumindikatoren an Gleichung 2-2 angepasst (Grinvald und Steinberg 1974). $I(t)$ entspricht der Intensität des Indikators zur Zeit (t) nach einem Anregungspuls. Die Amplitude (A) beschreibt den Beitrag der Einzelkomponente (i) mit der Lebensdauer τ_i zum Gesamtfluoreszenzabfall.

$$I(t) = \sum_{i=1}^n A_i * e^{\frac{-t}{\tau_i}}$$

Gleichung 2-2

Gleichung 2-2 beschreibt einen Fluoreszenzabfall, der nach einem unendlich kurzen Laserpuls ausgelöst worden wäre. Ein Laserpuls regt in Abhängigkeit seiner Halbwertsbreite nicht alle Indikatormoleküle zur gleichen Zeit an. Der Startpunkt des Fluoreszenzabfalls ist somit nicht eindeutig bestimmt. Durch Dekonvolution des gemessenen Fluoreszenzabfalls mit dem Laserpuls, welcher in einer separaten Messung bestimmt wurde, war es möglich diesen Fehler zu korrigieren (Oconnor et al. 1979).

Die Auswertung der Fluoreszenzlebensdauerkurven, die mit der Streakcamera aufgenommen wurden, erfolgte mithilfe der Software Globals Unlimited (Laboratory for Fluorescence Dynamics, University of Illinois at Urbana-Champaign, USA). Alle Fluoreszenzlebensdauerkurven, die mit dem in Abschnitt (2.3.3b) beschriebenen Messaufbau zur zeitaufgelösten Einzelphotonenzählung (TCSPC) bestimmt wurden, erfolgte mit der Becker & Hickl Auswertungssoftware (Becker & Hickl, Berlin, Deutschland).

Globale Auswertung einer Messreihe: Bei der globalen Auswertung fasst man alle Messungen einer Messreihe in einer Matrix zusammen und wertet diese gemeinsam aus. Dies hat den Vorteil, dass frei variierbare Parameter während der Anpassung von Gleichung 2-2 an die Fluoreszenzlebensdauerkurven miteinander verknüpft werden können. Die Fluoreszenzlebensdauer ist eine Stoffkonstante des Indikators und deshalb unabhängig von der Natriumkonzentration. Diese Tatsache kann man sich für die globale Auswertung einer Messreihe zunutze machen, indem man voraussetzt, dass die Lebensdauern τ_i für alle Messungen einer Messreihe gleich sind (Abbildung 2-13). Demzufolge ändern sich die Fluoreszenzlebensdauern τ_i für alle Abfallskurven gleichermaßen während des mathematischen Anpassungsprozesses. Die Amplituden A_i bleiben ihrerseits völlig frei variierbar. Auf diese Weise lässt sich die Zahl der frei variierbaren Parameter reduzieren.

Messung ₁	Messung ₂	Messung ₃	...	Messung _i	
τ_{1_1}	τ_{1_2}	τ_{1_2}	...	τ_{1_i}	$\rightarrow \square \tau_{1_1} = \tau_{1_2} = \tau_{1_3} = \tau_{1_i}$
A1 ₁	A1 ₂	A1 ₂	...	A1 _i	
τ_{2_1}	τ_{2_2}	τ_{2_2}	...	τ_{2_i}	$\rightarrow \square \tau_{2_1} = \tau_{2_2} = \tau_{2_3} = \tau_{2_i}$
A2 ₁	A2 ₂	A2 ₂	...	A2 _i	
τ_{3_1}	τ_{3_1}	τ_{3_2}	τ_{3_i}	$\rightarrow \square \tau_{3_1} = \tau_{3_2} = \tau_{3_3} = \tau_{3_i}$
A3 ₁	A3 ₂	A3 ₂	...	A3 _i	

Abbildung 2-13 Prinzip der globalen Auswertung von Fluoreszenzlebensdauern. Die Lebensdauern τ_1 , τ_2 , τ_3 ändern sich während des mathematischen Anpassungsprozesses gleichermaßen. Die Amplituden A1, A2, A3 sind frei variierbar und unabhängig voneinander.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden verschiedene Ansätze verfolgt, wie man mithilfe des Fluoreszenzindikators Sodium Green Natriumkonzentrationen messen kann. Hiefür wurde der Fluoreszenzindikator Sodium Green zunächst *in vivo* und im Anschluss daran *in vitro* charakterisiert. Da Sodium Green, wie im Folgenden dargestellt wird, mit Proteinen interagiert wurden Nanosensoren hergestellt, die den Indikator vor dem Einfluss der Proteine schützen.

3.1 Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzemissionsspektrum des Natriumindikators Sodium Green

An die Natriumbindungsdomäne des Indikators Sodium Green sind über einen Aminochinolether zwei Fluoreszeinderivate gebunden, die die Fluoreszeigenschaften des Indikators bestimmen. Das Fluoreszenzanregungsmaximum von Sodium Green liegt bei 505 nm und das Fluoreszenzemissionsmaximum von Sodium Green liegt bei 533 nm (Abbildung 3-1). In konfokalen Laserscanning-Mikroskopen steht üblicherweise ein Argonlaser mit einer Laserlinie bei 488 nm zur Verfügung, die für die Anregung von Sodium Green genutzt werden kann. Im Hinblick auf Natriummessungen mit Sodium Green in der Zelle, die mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop durchgeführt werden können, wurde Sodium Green für alle Messungen in dieser Arbeit bei 488 nm angeregt. Weiterhin ist es sehr gut möglich, Sodium Green aufgrund seines Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzemissionsspektrums von der zellulären Autofluoreszenz (Absorptionsmaximum bei 360 nm), die hauptsächlich auf NADH/NADPH zurückzuführen ist, spektral zu trennen.

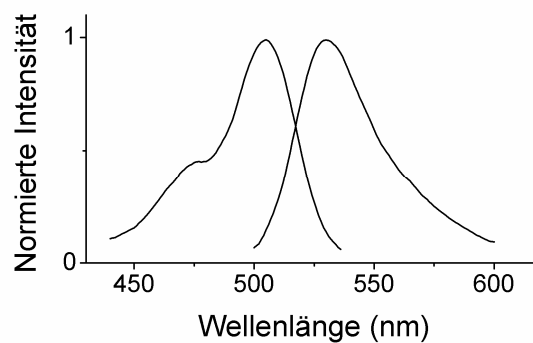


Abbildung 3-1 **Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzemissionsspektrum des Indikators Sodium Green.**

Die Spektren wurden in einer 10 mM Hepeslösung bei pH=7,4 aufgenommen. Das Fluoreszenzanregungsspektrum (linke Kurve) wurde im Maximum der Emission aufgezeichnet (530 nm). Für die Aufnahme der Fluoreszenzemissionsspektren (rechte Kurve) wurde Sodium Green mit 488nm angeregt. Die Wellenlänge entspricht der des Argon-Lasers, der üblicherweise in konfokalen Mikroskopen zur Anregung von Sodium Green benutzt wird. Bei allen Messungen wurde eine Spaltbreite von 5nm für die Anregung und Emission gewählt.

3.2 Fluoreszenzintensitätsmessungen des Indikators Sodium Green

3.2.1 *Fluoreszenzintensitätsänderungen des Indikators Sodium Green in Abhängigkeit variabler Natriumkonzentrationen*

Im folgenden Experiment wurde die natriumabhängige Fluoreszenzintensitätsänderung des Indikators Sodium Green in Kalium-freier Lösung untersucht. Steigende Natriumkonzentrationen haben einen Fluoreszenzintensitätsanstieg des natriumsensitiven Farbstoffes Sodium Green zur Folge (Abbildung 3-2). Es ist jedoch keine Änderung des Fluoreszenzemissionsspektrums zu beobachten. Ratiometrische Messungen sind deshalb nicht möglich.

$K^+ = 0\text{mM}$; $\text{BSA} = 0\%$; $\text{pH} = 7,4$, $[\text{Na}^+] + [\text{TMA}^+] = 145\text{mM}$

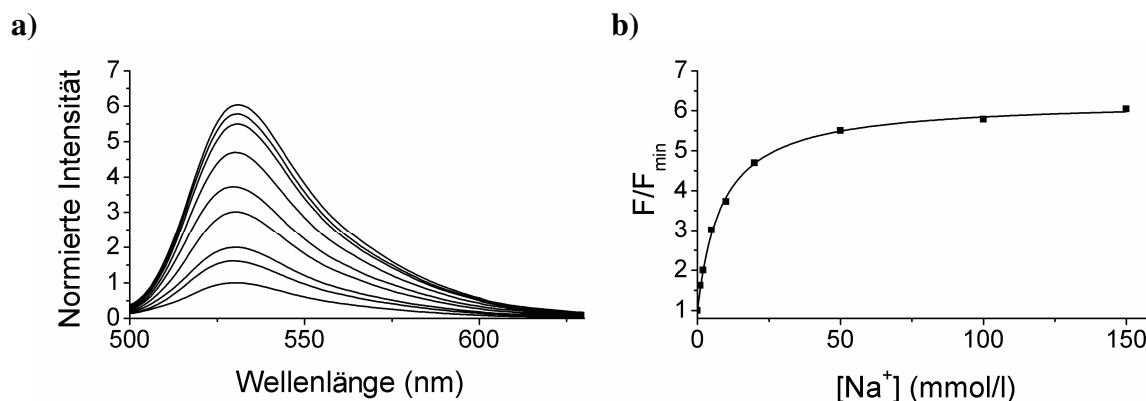


Abbildung 3-2 **Abhängigkeit der Sodium Green Fluoreszenz von der Natriumkonzentration in Kalium-freier Lösung**

a) Fluoreszenzspektren des Fluoreszenzindikators Sodium Green in Gegenwart von 0 (untere Kurve), 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 150mM (obere Kurve) Natrium. Um eine konstante Ionenstärke zu gewährleisten, wurde bei Lösungen mit Natriumkonzentrationen unter 150 mM soviel Tetramethylammoniumchlorid zugesetzt, dass die Kationengeamtkonzentration bei 145 mM lag ($[\text{Na}^+] + [\text{TMA}^+] = 145\text{mM}$, $K^+ = 0\text{mM}$; $\text{BSA} = 0\%$; $\text{pH} = 7,4$; $\text{Hepes} = 10\text{mM}$). Alle Fluoreszenzspektren wurden so skaliert, dass das Maximum des Fluoreszenzemissionspektrums in Abwesenheit von Natrium auf 1 liegt. **b)** Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität (F/F_{\min}) für steigende Natriumkonzentrationen. Die Anpassung von Gleichung 3-1 an die Datenpunkte lieferte $K_d = 8,7\text{mM}$ und $p = 5,2$.

Um den K_d -Wert für die Natriumbindung von Sodium Green in kaliumfreier Lösung zu ermitteln, wurden die relativen Fluoreszenzintensitäten F/F_{\min} in Abhängigkeit von der Natriumkonzentration aufgetragen. Die Anpassung von Gleichung 3-1 an die Daten liefert einen K_d -Wert von $K_d = 8,7\text{mM}$ und $p = 5,2$. Der Parameter p ist eine Maß für das Verhältnis aus maximaler- und minimaler Fluoreszenzintensität des Indikators Sodium Green innerhalb einer Messreihe.

$$\frac{F}{F_{\min}} = \frac{p[\text{Na}^+]}{k_d + [\text{Na}^+]} + 1, \quad \text{wobei} \quad \frac{F_{\max}}{F_{\min}} = 1 + p \quad \text{Gleichung 3-1}$$

Der ermittelte K_d -Wert von 8,7mM entspricht den Ergebnissen von Szmackinski und Lakowicz sowie denen von Haugland, die einen K_d -Wert von 8,4 mM beziehungsweise 6 mM angeben (Szmackinski und Lakowicz 1997, Haugland 2004). Ein Anstieg der Natriumkonzentration von 0mM auf 100mM bewirkt in den gezeigten Messungen einen Anstieg der Fluoreszenzintensität um das 5,8-fache. Szmackinski und Lakowicz haben in ihren Messungen eine 6,7-fache Intensitätszunahme der natriumgebundenen Form des Sodium Greens in Bezug

zur natriumfreien Form des Indikators beobachtet (Szmacinski und Lakowicz 1997). Haugland beschreibt sogar einen 7,3-fachen Anstieg (Haugland 2004).

3.2.2 *Fluoreszenzintensitätsänderung des Indikators Sodium Green in Abhängigkeit von Kalium*

Die intrazelluläre Kaliumkonzentration übersteigt die Natriumkonzentration um das 10- bis 15-fache. Deshalb ist es sinnvoll, die Eigenschaften des Sodium Green Moleküls in Gegenwart von Kalium zu untersuchen, um mögliche Beeinflussungen der Natriumbindung durch Kaliumionen besser abschätzen zu können.

$\text{Na}^+ = 0\text{mM}$; $\text{BSA} = 0\%$; $\text{pH} = 7,4$; $[\text{K}^+] + [\text{TMA}^+] = 145\text{mM}$

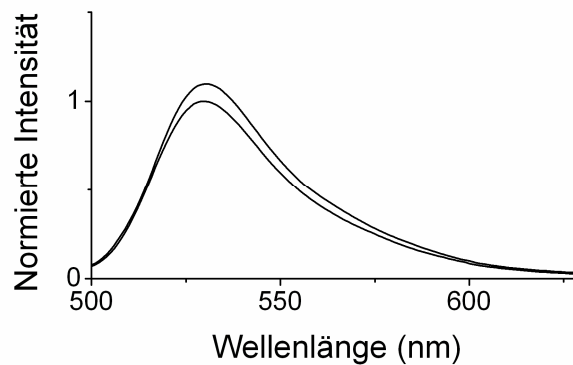


Abbildung 3-3 **Fluoreszenzemissionsspektren des Fluoreszenzindikators Sodium Green** in Gegenwart von 0mM (untere Kurve) und 100mM (obere Kurve) KCl. Die Fluoreszenzspektren wurden so skaliert, dass die Fluoreszenzintensität in Abwesenheit von Kalium auf 1 liegt. (Na=0mM, pH= 7,4; Hepes=10mM).

Kalium verursacht im Vergleich zu Natrium eine nur geringe Zunahme der Fluoreszenzintensität von Sodium Green (Abbildung 3-2).

3.2.3 *Fluoreszenzintensitätsänderung des Indikators Sodium Green in Gegenwart von Natrium und Kalium*

Auch wenn Kalium selbst nur einen geringen direkten Einfluß auf die Fluoreszenz von Sodium Green hat, so ist es denkbar, daß es mit Natrium um die Bindungsstelle konkurrieren und auf diese Weise eine Natriumbestimmung verfälschen kann. Um den Einfluss von Kalium auf die Natriumbindungseigenschaften zu untersuchen, wurde die Fluoreszenzintensitäts-

änderung in Gegenwart von Natrium und Kalium gemessen (Abbildung 3-4a). In Anlehnung an physiologische Bedingungen wurde die Kaliumkonzentration so gewählt, dass die Kationen-Gesamtkonzentration 145 mM betrug. Die Anpassung von Gleichung 3-1 an die Daten liefert einen K_d -Wert von 22,4mM und $p=4,4$. Haugland und Amorino haben unter diesen Bedingungen einen K_d -Wert von 20mM beziehungsweise 21mM bestimmt (Haugland 2004) (Amorino und Fox 1995). Ein Natriumkonzentrationsanstieg von 0 mM auf 100 mM hat in Gegenwart von Kalium einen Fluoreszenzanstieg um das 4,6-fache zur Folge.

$$\text{Na}^+ + \text{K}^+ = 145\text{mM}; \text{BSA} = 0\%; \text{pH} = 7,4$$

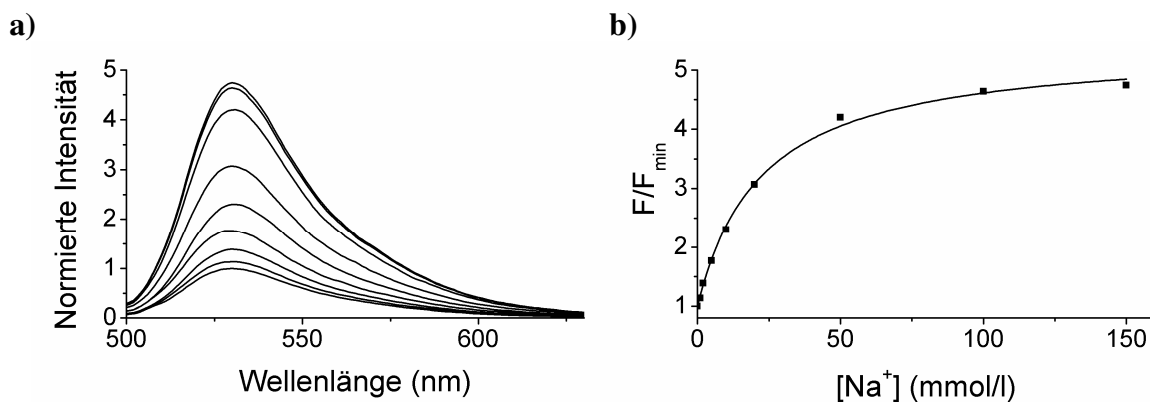


Abbildung 3-4 **Abhängigkeit der Sodium Green Fluoreszenz von der Natriumkonzentration in Gegenwart von Kalium.**

a) Fluoreszenzspektren des Fluoreszenzindikators Sodium Green in Gegenwart von 0 (untere Kurve), 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 150mM (obere Kurve) Natrium. Für alle Messlösungen, die eine geringere Natriumkonzentration als 150mM enthielten, wurde die Kaliumkonzentration so gewählt daß die Kationengesamtkonzentration 145mM betrug ($[\text{Na}^+] + [\text{K}^+] = 145\text{mM}$; $\text{BSA} = 0\%$; $\text{pH} = 7,4$). Alle Fluoreszenzspektren wurden so skaliert, dass die Fluoreszenzintensität des Indikators in Abwesenheit von Natrium und in Gegenwart von 145 mM Kalium auf 1 liegt. **b)** Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität (F/F_{\min}) für steigende Natriumkonzentrationen. Anpassung von Gleichung 3-1 an die Datenpunkte lieferte $K_d = 22,4\text{mM}$ und $p = 4,4$.

Der größere K_d -Wert des Sodium Greens in Gegenwart von Kalium ($K_d = 22,4\text{mM}$) zeigt, daß Natrium und Kalium um die Bindungsstelle konkurrieren, wobei die Kaliumbindung, wie die Versuche in Abschnitt 3.2.2 zeigen, nur mit einem geringen Fluoreszenzanstieg einhergeht.

3.2.4 pH-Wertabhängigkeit des Sodium Greens in Gegenwart von Natrium und Kalium

Unter bestimmten Bedingungen (z.B. Azidose) kann sich der intrazelluläre pH-Wert verändern. Deshalb wurde in den folgenden Experimenten der Einfluss des pH-Wertes auf den Indikator untersucht. Hierfür wurde die Fluoreszenzintensität von Sodium Green bei $\text{pH} =$

6,8; 7,4 und 7,6 in Gegenwart von 10mM und 100mM Natrium bestimmt (Abbildung 3-5). In Gegenwart von 10mM Natrium konnte innerhalb physiologischer Grenzen (pH=6,8 bis 7,6) kein Einfluss auf die Fluoreszenzintensität von Sodim Green nachgewiesen werden. Im Unterschied dazu konnte jedoch für hohe Natriumkonzentrationem gezeigt werden (100mM Natrium), dass die Fluoreszenz bei einem pH-Wert=6,8 geringer als bei pH=7,4 beziehungsweise 7,6 ist. Ansteigende Protonenkonzentrationen führen also im unteren pH-Bereich nur zu einer geringen Fluoreszenzintensitätsabnahme, wobei dieser Effekt bei höheren Natriumkonzentrationen deutlicher zu beobachten ist.

Na⁺ = 10, 100 mM; pH= 6,8; 7,4; 7,6

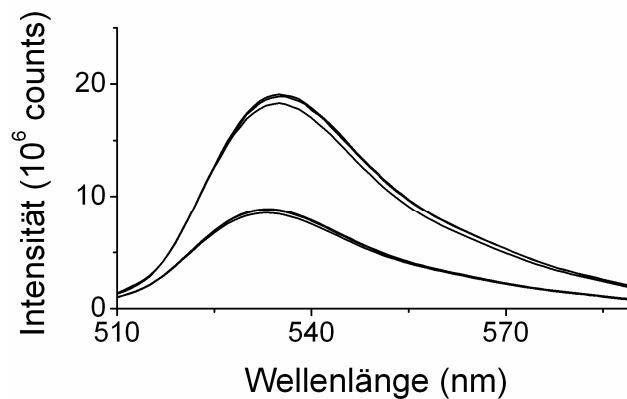


Abbildung 3-5 Fluoreszenzintensitätsänderung des Farbstoffes Sodium Green in Abhängigkeit vom pH-Wert Hepespufferlösungen (10mM) wurden mit Tetramethylammoniumhydroxid auf die pH – Werte 7,6 7,4 und 6,8 titriert. Anschließend wurde soviel Natriumchlorid hinzugefügt, dass die Natriumkonzentration bei 10mM (untere Kurven) bzw. 100mM (obere Kurven) lag. Die Spektren bei unterschiedlichen pH-Werten (pH=7,6 7,4 und 6,8), die bei 10 mM Natrium aufgenommen wurden, liegen alle übereinander. Für die Spektren, die bei 100 mM Natrium aufgenommen wurden zeigt sich, dass das Spektrum bei pH=6,8 unterhalb der Spektren bei pH=7,4 und 7,6 liegt. Die Indikatorkonzentration war in allen Ansätzen gleich groß (5µM).

3.2.5 Fluoreszenzintensitätsänderung des Farbstoffes Sodium Green in Gegenwart von Natrium, Kalium und BSA

Das Zytoplasma enthält eine hohe Konzentration an Proteinen (200-300 mg/ml). Es ist deshalb wichtig den Einfluss der Proteine auf den Indikator Sodium Green im Hinblick auf intrazelluläre Natriummessungen zu untersuchen. In den folgenden Experimenten wurde stellvertretend für die intrazellulär vorhandenen Proteine Bovines Serum-Albumin (BSA) eingesetzt. Die BSA-Konzentration wurde auf einen Wert von 5% w/v (5g/100ml Lösung)

eingestellt, da dies in etwa der intrazellulären Proteinkonzentration entspricht (Luby-Phelps 1994, Alberts 2002).

Um auszuschließen, dass Natriumkontaminationen der verwendeten BSA-Chargen die Messungen verfälschen, wurde ihr Natriumgehalt flammenphotometrisch bestimmt. Hierbei ergab sich für eine 5% BSA-Lösung eine Natriumkonzentration von 3,02mM. Da die Fluoreszenzintensität für 0mM Natrium in Anwesenheit von BSA deshalb nicht bestimmt werden konnte, wurde dieser Wert im Rahmen der Anpassung von Gleichung 3-2 an die Daten ermittelt. Die Herleitung von Gleichung 3-2 kann dem Anhang entnommen werden.

$$\frac{F}{F_{3mM}} = \frac{p[Na^+]}{k_d + [Na^+]} + F_{\min}, \quad \frac{F_{\max}}{F_{3mM}} = 1 + p \quad \text{Gleichung 3-2}$$

BSA verursacht einen Anstieg der Sodium Green Fluoreszenzintensität um den Faktor 2,7, sowie eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums um 14 nm in den roten Wellenlängenbereich (Abbildung 3-6).

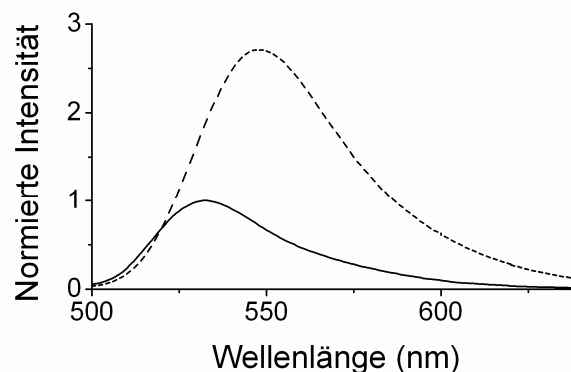


Abbildung 3-6 **Fluoreszenzemissionsspektren des Indikators Sodiums Green** ($\lambda_{\text{ex}}=503\text{nm}$) in Abwesenheit (durchgezogene Linie) und Gegenwart (gestrichelte Linie) von BSA (5% w/v) Beide Lösungen enthielten 3mM Natriumchlorid. Die Emissionsspektren wurden so skaliert, dass die Fluoreszenzintensität in BSA-freier Lösung auf 1 liegt.

Für hohe Natriumkonzentrationen beträgt die Verlagerung des Fluoreszenzmaximums lediglich 8nm, so dass die auf BSA zurückzuführende Rotverschiebung durch Natrium teilweise rückgängig gemacht wird (Abbildung 3-7a). Diese Beobachtung könnte damit erklärt werden, dass eine zunehmende Sättigung des Indikators einer Interaktion von Protein und Sodium Green entgegen wirkt.

Die Anpassung von Gleichung 3-2 an die natriumabhängigen Fluoreszenzintensitäten in Gegenwart von BSA ergibt einen K_d -Wert von 26,8mM (Abbildung 3-7b). Der K_d -Wert für die BSA freie Lösung lag hingegen bei 22,4mM. Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Affinität, von Natrium Green Natrium zu binden, in Gegenwart von Proteinen kaum beeinträchtigt wird.

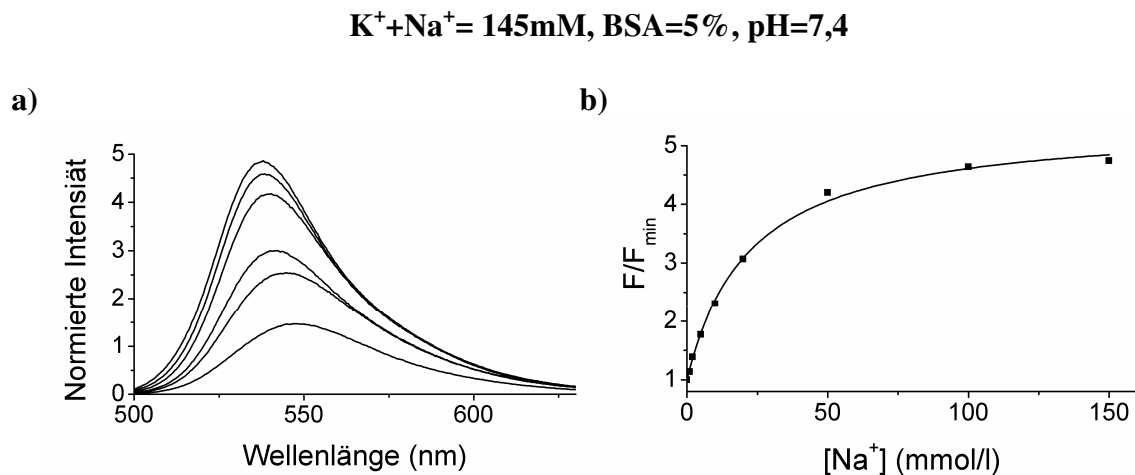


Abbildung 3-7 **Abhängigkeit der Sodium Green Fluoreszenz von der Natriumkonzentration in Gegenwart von Kalium und 5% BSA**

a) Fluoreszenzspektren des Fluoreszenzindikators Sodium Green in Gegenwart von 5% BSA und 3 (untere Kurve), 5, 10, 20, 50, 100, 150 mM (obere Kurve) Natrium. Um eine konstante Ionenstärke zu gewährleisten, wurde bei Lösungen mit Natriumkonzentrationen unter 150 mM soviel Tetramethylammoniumchlorid zugesetzt, dass die Kationengeamtkonzentration 145mM betrug ($[Na^+] + [TMA^+] = 145mM$, $K^+ = 0mM$; BSA=0%; pH=7,4; Hepes=10mM). Alle Fluoreszenzspektren wurden so skaliert, dass das Maximum des Fluoreszenzemissionspektrums in Gegenwart von 3mM Natrium bei 1 liegt.

b) Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität (F/F_{min}) für steigende Natriumkonzentrationen. Die Anpassung von Gleichung 3-2 an die Datenpunkte lieferte $K_d = 26,8mM$, $p = 3,1$ und $F_{min} = 0,68$.

3.2.6 Intensitätsmessungen mit Sodium Green in der Zelle

In den zuvor beschriebenen Experimenten wurde die natriumabhängige Fluoreszenzintensitätsänderung des Indikators Sodium Green in vitro (in der Küvette) charakterisiert. Im folgenden Experiment wurde nun untersucht, ob es möglich ist, mit dem Fluoreszenzindikator Sodium Green Natriumkonzentrationsänderungen in der Zelle zu messen. Hierfür wurden mit Sodium Green beladene CHO-Zellen mit Lösungen definierter Natriumkonzentrationen (10, 20, 30, 50, 100mM Natrium) umspült. Diese Lösungen enthielten die natrium- und kaliumselektiven Membranporenbildner Gramacidin, Nigericin

und Monensin, über die sich die intrazelluläre Natriumkonzentration der vorgegebenen extrazellulären Natriumkonzentration angleichen konnte. Weiterhin enthielten alle Lösungen Oabain, um zu verhindern, dass Natrium im Austausch gegen Kalium durch die Natrium-Kalium ATPase aus den Zellen transportiert wird und so das Eichexperiment verfälscht. Nach dem Einwaschen einer Lösung mit einer bestimmten Natriumkonzentration wurde 15 Minuten bis zum Einwaschen der nächsten Konzentrationsstufe gewartet, um zu gewährleisten, dass sich intrazelluläre und extrazelluläre Natriumkonzentration vollständig equilibriert haben. Nach zirka zwei bis drei Minuten nach dem Einwaschen einer Konzentrationsstufe haben sich intrazelluläre und extrazelluläre Natriumkonzentration nahezu vollständig angeglichen (Abbildung 3-9a).

Auf diese Weise konnte die Fluoreszenzintensität von Sodium Green bei bekannter intrazellulärer Natriumkonzentration mit dem konfokalen Laserscanning Mikroskop (LSM 510) bestimmt werden (Abbildung 3-8). Die Fluoreszenzintensitäten wurden in einminütigen Abständen gemessen, über das gesamte Fluoreszenzbild gemittelt und im zeitlichen Verlauf aufgetragen (Abbildung 3-9a). Für einen Konzentrationssprung von 10mM auf 100mM Natrium konnte eine Verdopplung der Intensität beobachtet werden (Abbildung 3-9a).

Da es nicht möglich ist, eine intrazelluläre Natriumkonzentration von 0mM einzustellen, wurden alle Werte auf die Fluoreszenzintensität bei 10 mM Natrium (kleinste eingestellte Natriumkonzentration) skaliert. Die minimale Fluoreszenz, die der Fluoreszenzintensität bei 0mM Natrium entspricht, wurde durch die Anpassung von Gleichung 3-3 an die Messwerte bestimmt.

$$\frac{F}{F_{10mM}} = \frac{p[Na^+]}{k_d + [Na^+]} + F_{\min}, \quad \frac{F_{\max}}{F_{10mM}} = 1 + p \quad \text{Gleichung 3-3}$$

Für die *in vivo* Messungen wurden auf diese Weise die Parameter $K_d = 30,75\text{mM}$; $p = 1,608$ und $F_{\min} = 0,64$ errechnet. Amorino hat in seinen Experimenten einen vergleichbaren K_d -Wert von $27,8\text{mM}$ beobachtet (Amorino und Fox 1995).

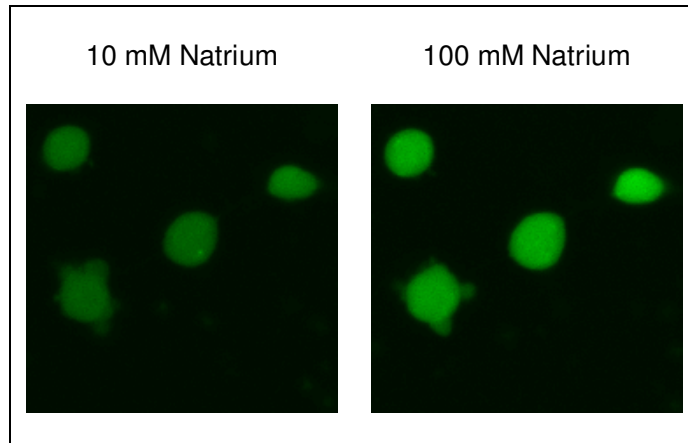


Abbildung 3-8 **Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von CHO - Zellen, die mit Sodium Green – Tetraacetat beladen wurden.**

Zum Zeitpunkt der Aufnahme sind die Zellen mit einer Hepespufferlösung (10mM), die **a)** 10 mM und **b)** 100 mM NaCl enthielten, umspült wurden. Die KCl Konzentration aller Lösungen wurde so eingestellt, daß die Kationengesamtkonzentration 145 mM betrug ($[K^+] = 145\text{mM} - [Na^+]$). Allen Lösungen wurde weiterhin eine Kombination der drei Zellmembranporenbildner Gramicidin (15 μM), Nigericin (5 μM) und Monensin (15 μM) zugesetzt, um einen Angleich der intrazellulären Natriumkonzentration an eine definierte extrazelluläre Natriumkonzentration herbeizuführen. Weiterhin enthielten die Lösungen Oabain (10 μM), um die Na^+/K^+ -ATPase zu blocken.

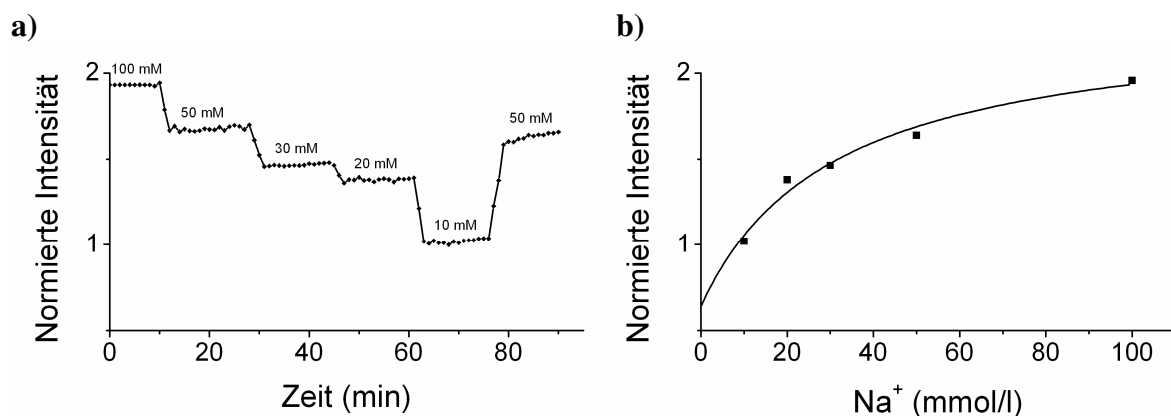


Abbildung 3-9 **Abhängigkeit der Sodium Green Fluoreszenz von der Natriumkonzentration in CHO-Zellen**

a) Fluoreszenzintensitätsänderung des Farbstoffes Sodium Green der in Abbildung 3-8 dargestellten CHO-Zellen. Die extrazelluläre Natriumkonzentration wurde in der Reihenfolge 100mM \rightarrow 50mM \rightarrow 30mM \rightarrow 20mM \rightarrow 10mM \rightarrow 50mM geändert. In einminütigen Abständen wurde die mittlere Intensität des Farbstoffes in den CHO-Zellen bestimmt. Die Fluoreszenzintensitäten wurden so skaliert, dass der erste Wert bei 10mM Natrium nach vollständiger Equilibrierung bei 1 liegt. **b)** Nach Mittelung der Werte für eine Konzentrationsstufe wurden die Fluoreszenzintensitäten des Sodium Greens in Abhängigkeit von der Natriumkonzentration aufgetragen. Durch Anpassung von Gleichung 3-3 an die Daten konnte ein $K_d = 30,75\text{mM}$; $p = 1,608$ und $F_{\min} = 0,64$ ermittelt werden.

3.3 Absorptionsänderung des Fluoreszenzindikators Sodium Green

Im Folgenden Abschnitt werden kurz die Absorptionseigenschaften des Indikators Sodium Green dargestellt.

3.3.1 Absorptionsänderung des Fluoreszenzindikators Sodium Green in Gegenwart steigender Natrium- und Kaliumkonzentrationen

Natrium bewirkt eine geringe Änderung des Absorptionsspektrums des Indikators Sodium Green (Abbildung 3-10a). Mit steigender Natriumkonzentration nimmt die Extinktion bei 507 nm zu, bei 487 nm jedoch ab. Den gleichen Effekt von Natrium auf das Absorptionsspektrum von Sodium Green konnten Szmackinski und Lakowicz ebenfalls zeigen (Szmackinski und Lakowicz 1997). Kalium hingegen hat keinen Einfluss auf das Absorptionsspektrum (Abbildung 3-10b).

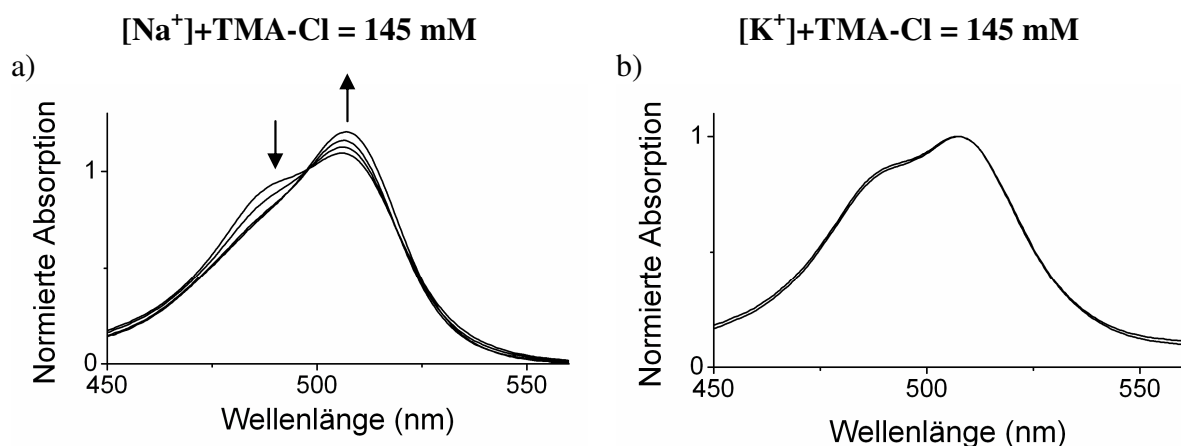


Abbildung 3-10 **Absorptionsspektren des Fluoreszenzindikators Sodium Green**

a) Absorptionsspektren des Fluoreszenzindikators Sodium Green in Gegenwart der Natriumkonzentrationen 0, 10, 50 und 100 mM. Mit steigender Natriumkonzentration nimmt die Extinktion bei 507 nm zu, bei 487 nm jedoch ab. Alle Spektren wurden im Bezug auf den isosbestischen Punkt skaliert. **b)** Absorptionsspektren des Fluoreszenzindikators Sodium Green in Gegenwart der Kaliumkonzentrationen 0, 10 und 100 mM. Kalium hat keinen Einfluss auf das Absorptionsspektrum von Sodium Green.

3.3.2 Absorptionseigenschaften des Fluoreszenzindikators Sodium Green in Gegenwart steigender Natriumkonzentrationen und BSA

Wie das Fluoreszenzmaximum (vergleiche Abbildung 3-6) verlagert sich auch das Absorptionsmaximum von Sodium Green in Anwesenheit von BSA in den roten Wellenlängenbereich (Abbildung 3-11a). Steigende Natriumkonzentrationen in Gegenwart von BSA haben jedoch keinen zusätzlichen Einfluss auf das Absorptionsspektrum (Abbildung 3-11b).

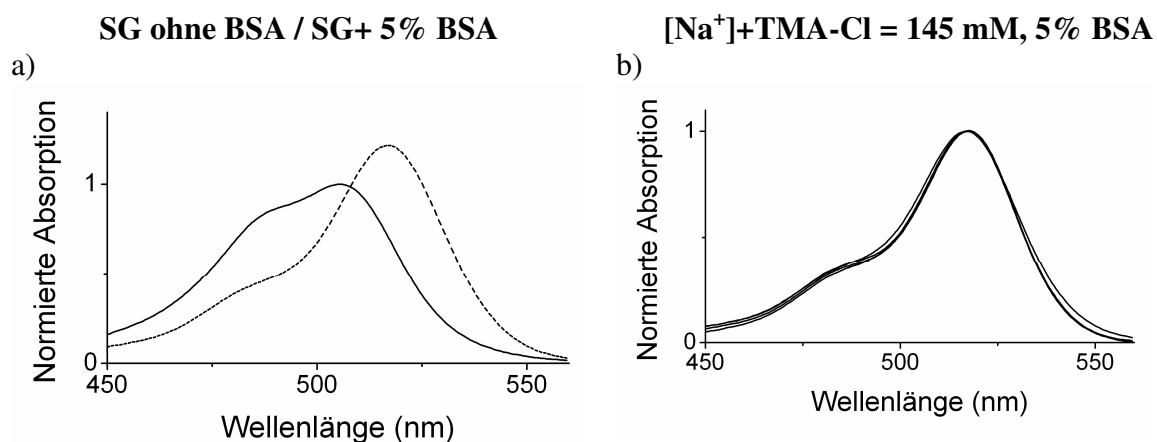


Abbildung 3-11 **Absorptionsspektren des Fluoreszenzindikators Sodium Green in Gegenwart von 5% w/v (5mg BSA / 100µl)**

a) Absorptionsspektrum des Fluoreszenzindikators Sodium Green in Gegenwart von 5% BSA (gestrichelte Linie) und BSA freier Lösung (durchgezogene Linie). Beide Lösungen enthielten 3mM Natrium. Beide Spektren wurden so skaliert, dass das Maximum der Extinktion in Abwesenheit von Natrium auf 1 liegt. b) Absorptionsspektren des Fluoreszenzindikators Sodium Green in Gegenwart der Natriumkonzentration = 0, 10, 50, 100mM in 5% BSA-Lösung. Alle Spektren wurden so skaliert, dass das Maximum der Extinktion in Abwesenheit von Natrium und 145mM Kalium bei 1 liegt.

3.4 Natriumabhängige Intensitätsmessungen des Indikators Sodium Green in Acrylamid - Nanopartikeln

3.4.1 Der Einschluss des Indikators Sodium Green in Acrylamid - Nanopartikel verhindert die Interaktion mit Proteinen

Wie bereits in Abschnitt 3.2.5 gezeigt wurde, können Proteine das Fluoreszenzverhalten des Indikators Sodium Green stark beeinflussen. Die Fluoreszenzintensität des Indikators Sodium Green nimmt in Gegenwart von BSA um das 2,7-fache zu. Weiterhin ist eine Verschiebung

des Fluoreszenzemissionsmaximums um 14 nm zu längeren Wellenlängen hin zu beobachten (Abbildung 3-13a). Aufgrund des hohen Proteinanteils im Zytosol einer Zelle und des beschriebenen Einflusses der Proteine auf das Fluoreszenzverhalten des Indikators sind verlässliche Natriumkonzentrationsbestimmungen in Zellen nur schwierig möglich, wenn sich die Proteinkonzentration ändert oder gänzlich unbekannt ist. Um den Einfluss von Proteinen auszuschalten, wurden für die folgenden Experimente Polyacrylamidpartikel synthetisiert, die den Natriumindikator Sodium Green einschließen und vor der Interaktion mit Proteinen schützen. Kleine Ionen können in die Polymermatrix diffundieren und an den Indikator binden; größere Proteinmoleküle hingegen können nicht in die Polymermatrix eindringen und werden auf diese Weise daran gehindert, mit den Indikatormolekülen zu interagieren. Die in dieser Versuchsserie hergestellten Partikel haben eine Größe von 20 nm (Abbildung 3-12) und können auf verschiedenen Wegen (vgl. Abschnitt 2.4.2) in die Zelle eingebracht werden, ohne diese zu beschädigen.

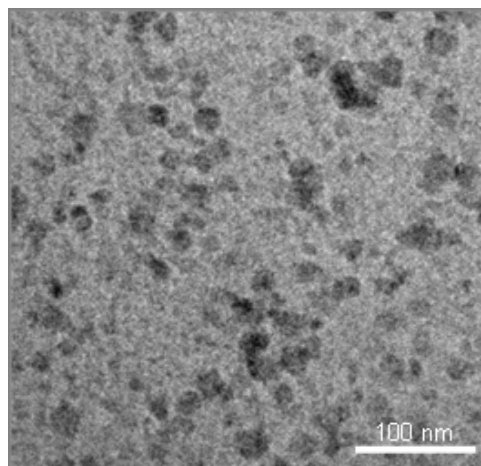


Abbildung 3-12 **Elektronenmikroskopische Aufnahme von Acrylamid-Nanopartikeln.** 3mg Acrylamid-Nanopartikel, die keine Fluoreszenzfarbstoffe enthielten, wurden in 3ml einer 10mM Hepespuffer-Lösung (pH=7,4; TMA-Cl=145mM) gelöst und auf einem Formvar-überzogenen Objektträgernetz getrocknet. Die Nanopartikel wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop (LEO-1450VP, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) fotografiert. Die Acrylamid-Nanopartikel haben eine durchschnittliche Größe von zirka 20 nm.

Die Fluoreszenzspektren der Sodium Green Nanosensoren in An- und Abwesenheit von BSA werden in Abbildung 3-13b vergleichend gegenübergestellt. Weder die Fluoreszenzintensität noch die Lage des Fluoreszenzmaximums werden im Unterschied zum freiem Sodium Green (nicht in Acrylamid-Nanonopartikel eingebettet, vgl. Abbildung 3-13a) durch die Anwesenheit von BSA beeinflusst. Diese Beobachtung bestätigt die Annahme, dass grössere

Proteinmoleküle nicht in die Polymermatrix diffundieren können. Der Einfluss von BSA auf den Indikator Sodium Green ist somit ausgeschaltet.

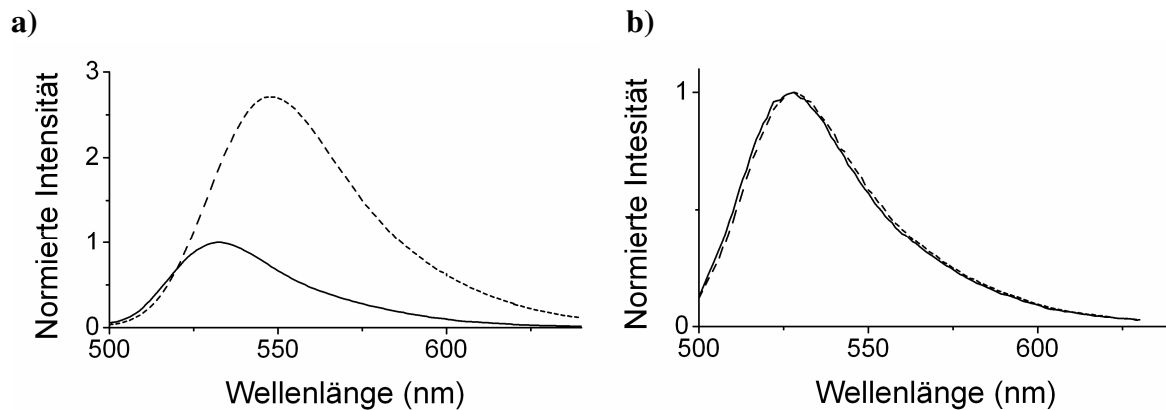


Abbildung 3-13 **Der Einfluss von BSA auf das Fluoreszenzspektrum des nicht in Acrylamid-Nanosensoren eingebetteten Indikators Sodium Green und auf das Fluoreszenzspektrum von Sodium Green-Acrylamidnanosensoren**

a) Fluoreszenzemissionsspektren des Sodiums Greens ($\lambda_{\text{ex}}=503\text{nm}$) in Abwesenheit (durchgezogene Linie) und Gegenwart (gestrichelte Linie) von BSA (5% w/v). Die Emissionsspektren wurden so skaliert, dass die maximale Intensität in Abwesenheit von BSA auf 1 liegt. Alle Spektren wurden in einer Hepespufferlösung (10mM, pH=7,4) in Gegenwart von 3 mM Natrium aufgenommen.

b) Fluoreszenzemissionsspektrum von Sodium Green Nanosensoren in Abwesenheit von 5% BSA (durchgezogene Linie) und Gegenwart von 5% BSA (gestrichelte Linie). Die Emissionsspektren wurden so skaliert, dass die maximale Intensität in Abwesenheit von BSA auf 1 liegt. Die Spektren sind deckungsgleich; der Einfluss von BSA auf den Indikator ist ausgeschaltet.

3.4.2 Intensitätsmessungen des Farbstoffes Sodium Green in Acrylamid - Nanopartikeln

In den folgenden Experimenten wird untersucht, ob und wie gut es möglich ist, mit Sodium Green Acrylamid-Nanopartikeln Natriumkonzentrationen zu messen. Der in Acrylamid-Nanopartikel eingebettete Indikator Sodium Green ist weiterhin sensitiv für Natrium (Abbildung 3-14a und Abbildung 3-15a). Diese Beobachtung bestätigt, dass kleine Ionen frei in die Polymermatrix diffundieren können. Mit steigender Natriumkonzentration (0mM-100mM Natrium) nimmt die Fluoreszenzintensität des Indikators in Abwesenheit von Kalium um das 2,1-fache und in Gegenwart von Kalium um das 1,9-fache zu. Im Vergleich hierzu nimmt die Fluoreszenzintensität des frei gelösten Indikators (nicht in Acrylamidmatrix eingebettet) in Abwesenheit von Kalium um das 5,8-fache und in Anwesenheit von Kalium auf das 4,6-fache zu.

$K^+ = 0\text{mM}$; $BSA = 0\%$; $\text{pH} = 7,4$, $[\text{Na}^+] + [\text{TMA}^+] = 145\text{mM}$

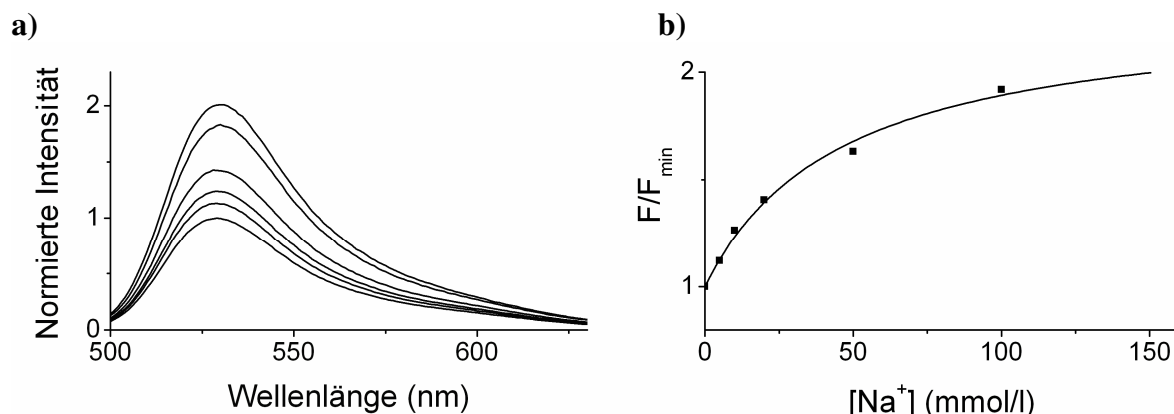


Abbildung 3-14 **Abhängigkeit der Fluoreszenz des in Acrylamid-Nanosensoren eingebetteten Indikators Sodium Green von der Natriumkonzentration in Kalium-freier Lösung**

a) Fluoreszenzspektren des in Acrylamid-Nanosensoren eingebetteten Indikators Sodium Green in Gegenwart der Natriumkonzentrationen 0 (unten), 5, 10, 20, 50, 100mM (oben). ($K^+ = 0\text{mM}$; $BSA = 0\%$; $\text{pH} = 7,4$; $\text{Hepes} = 10\text{mM}$). Um eine konstante Ionenstärke zu gewährleisten, wurde den Lösungen soviel Tetramethylammoniumchlorid zugesetzt, daß die Gesamtkonzentration bei 145 mM lag ($[\text{Na}^+] + [\text{TMA}^+] = 145\text{mM}$, $K^+ = 0\text{mM}$; $BSA = 0\%$; $\text{pH} = 7,4$; $\text{Hepes} = 10\text{mM}$). Die bei den angegebenen Natriumkonzentrationen bestimmten Fluoreszenzintensitäten wurden so skaliert, dass das Maximum der Fluoreszenzintensität in Abwesenheit von Natrium auf 1 liegt. **b)** Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität (F/F_{\min}) für steigende Natriumkonzentrationen. Die Anpassung von Gleichung 3-1 an die Datenpunkte lieferte $p = 1,389$, $K_d = 40,6\text{mM}$.

$K^+ + \text{Na}^+ = 145\text{mM}$, $BSA = 0\%$, $\text{pH} = 7,4$

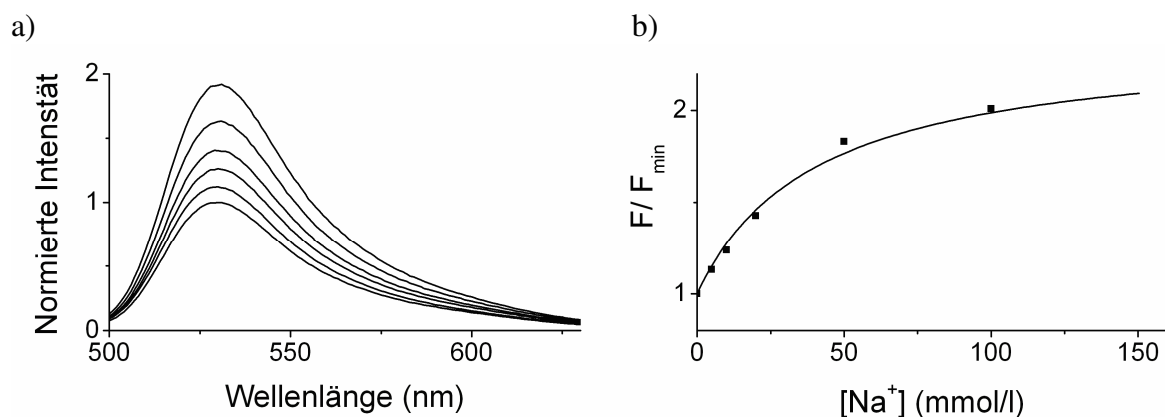


Abbildung 3-15 **Abhängigkeit der Fluoreszenz des in Acrylamid-Nanosensoren eingebetteten Indikators Sodium Green von der Natriumkonzentration in Gegenwart von Kalium.**

a) Fluoreszenzspektren des Indikators Sodium Green in Acrylamid Nanosensoren in Gegenwart der Natriumkonzentrationen 0 (unten), 5, 10, 20, 50, 100mM (oben). Die Kaliumkonzentration wurde so angepasst, dass die Kationengesamtkonzentration 145 mM betrug ($[\text{Na}^+] + [\text{K}^+] = 145\text{mM}$; $BSA = 0\%$; $\text{pH} = 7,4$; $\text{Hepes} = 10\text{mM}$). Die bei den angegebenen Natriumkonzentrationen bestimmten Fluoreszenzintensitäten wurden so skaliert, dass das Maximum der Fluoreszenzintensität in Abwesenheit von Natrium auf 1 liegt. **b)** Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität (F/F_{\min}) von der Natriumkonzentration. Die Anpassung von Gleichung 3-1 an die Datenpunkte lieferte $p = 1,303$, $K_d = 46,12\text{mM}$.

Für die Sodium Green Nanopartikel konnte ein K_d -Wert von 40,6mM in Abwesenheit von Kalium und 46,1mM in Anwesenheit von Kalium errechnet werden (Abbildung 3-14b und Abbildung 3-15b). Diese Werte sind deutlich größer als die des frei gelösten Farbstoffes, für den in Abwesenheit von Kalium ein K_d -Wert von 8,7mM beziehungsweise in Anwesenheit von Kalium ein K_d -Wert von 22,4mM bestimmt wurde.

3.4.3 pH-Wertabhängigkeit des Indikators Sodium Green in Acrylamid - Nanopartikeln

Auch für die Sodium Green Acrylamid-Nanosensoren ist es im Hinblick auf Natriummessungen in der Zelle wichtig zu wissen, welchen Einfluss der pH-Wert auf die Fluoreszenzintensität der Nanosensoren hat. Deshalb wurde die Fluoreszenzintensität der Sodium Green Nanosensoren bei 10mM und 100mM Natrium und unterschiedlichen pH-Werten (pH=6,8; 7,4; 7,6) bestimmt. Wie für den frei gelösten Indikator Sodium Green (Abschnitt 3.2.4) konnte für die Sodium Green Nanopartikel gezeigt werden, dass eine Änderung des pH-Wertes im Bereich pH=6,8 bis pH=7,6 keinen wesentlichen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität des Indikatorfarbstoffes hat (Abbildung 3-16).

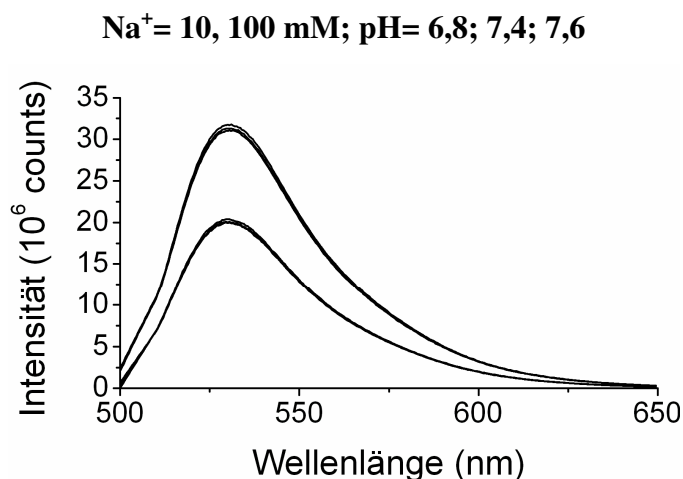


Abbildung 3-16 **pH-Wert Abhängigkeit der Sodium Green Nanosensoren** in Gegenwart der Natriumkonzentrationen 10mM (untere Kurven) und 100mM (obere Kurven). Hepespuflerlösungen (10mM) wurden mit Tetramethylammoniumhydroxid auf die pH-Werte 7,6; 7,4 und 6,8 titriert. Den Lösungen wurde soviel Natrium zugesetzt, dass diese 10mM bzw. 100mM Natrium enthielten. Der pH-Wert (pH=6,8 - pH=7,6) hat keinen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität der Sodium Green Nanosensoren.

3.4.4 *Ratiometrische Intensitätsmessungen mit Sodium Green und Texas Red beladenen Acrylamid - Nanopartikeln*

Ionenkonzentrationsmessungen, die mit nicht-ratiometrischen Fluoreszenzindikatoren wie Sodium Green durchgeführt werden, können sehr fehlerbehaftet sein, wenn die intrazelluläre Natriumkonzentration oder die Position der Fokusebene nicht konstant sind. Fällt die Fluoreszenzintensität des Indikators zum Beispiel, so ließe sich der Fluoreszenzabfall in diesem Fall nicht eindeutig auf eine geringere Natriumkonzentration zurückzuführen. Der Abfall der Fluoreszenzintensität könnte ebenfalls durch eine Verschiebung der Fokusebene oder eine geringere intrazelluläre Indikatorkonzentration verursacht worden sein.

Um diesen Fehler korrigieren zu können, wurde für die folgenden Experimente ein zweiter Fluoreszenzfarbstoff (Texas Red) in die Acrylamidpartikel eingebracht, dessen Fluoreszenzintensität von der Natriumkonzentration unabhängig ist. Setzt man beide Farbstoffe in einem konstanten Verhältnis ein, so ist es möglich, die natriumabhängige Intensitätsänderung des Ionenindikators mithilfe der natriumunabhängigen Intensität des Referenzfarbstoffes zu eichen. Man erhält somit eine Größe, die nur von der Natriumkonzentration, nicht aber von der Indikatorkonzentration oder Anregungsintensität abhängig ist.

Aufgrund der Größe der Partikel von nur 20 nm erscheint es zwar unwahrscheinlich, dass beide Farbstoffe in einem konstanten Verhältnis in die Nanopartikel inkorporiert werden. Für eine ratiometrische Messung ist dies jedoch unerheblich, da die Nanopartikel wesentlich kleiner sind als das optische Auflösungsvermögen des Mikroskops. Bei den Einstellungen, die für die hier vorgestellten Messungen gewählt wurden, besitzt ein Voxel in der x und y Achse üblicherweise eine Kantenlänge von 250-300nm, so dass in dem kleinsten auflösbaren Volumen über 1000 Nanopartikel enthalten sein können. In Messungen mit einem konfokalen Mikroskop wird also nur das statistische Mittel erfaßt. Wichtig für ratiometrische Messungen ist nur, dass sich Nanopartikel, die den Natriumindikator Sodium Green enthalten, intrazellulär genauso verteilen, wie Nanopartikel, die den Referenzfarbstoff Texas Red oder beide Fluorophore enthalten. Dies wird durch eine identische Beschaffenheit der Nanopartikel, die in demselben Ansatz hergestellt wurden, sichergestellt.

Der Fluoreszenzfarbstoff Sodium Green lässt sich mit der 488nm Linie des üblicherweise in konfokalen Mikroskopen eingebauten Argon-Lasers anregen. Der Referenzfarbstoff Texas Red kann mit der 543nm Linie des Helium/Neon-Lasers angeregt werden. Wie die Fluoreszenzanregungsspektren in Abbildung 3-17a zeigen, lassen sich beide Farbstoffe bei

den jeweiligen Wellenlängen nahezu selektiv anregen. Im Hinblick auf die Messungen mit dem Laserscanning Mikroskop LSM 510 in der Zelle wurden Sodium Green und Texas Red auch für die Messungen in der Küvette mit dem Fluoreszenzspektrometer (Jobin Yvon Spex Fluorolog3) mit 488nm beziehungsweise 543nm angeregt. Auch die Fluoreszenzemissionssignale beider Fluoreszenzfarbstoffe können sehr gut spektral voneinander getrennt werden (Abbildung 3-17b). Somit kann sichergestellt werden, dass bei der Detektion der Fluoreszenzsignale keine gegenseitige Verfälschung (cross talk) stattfindet.

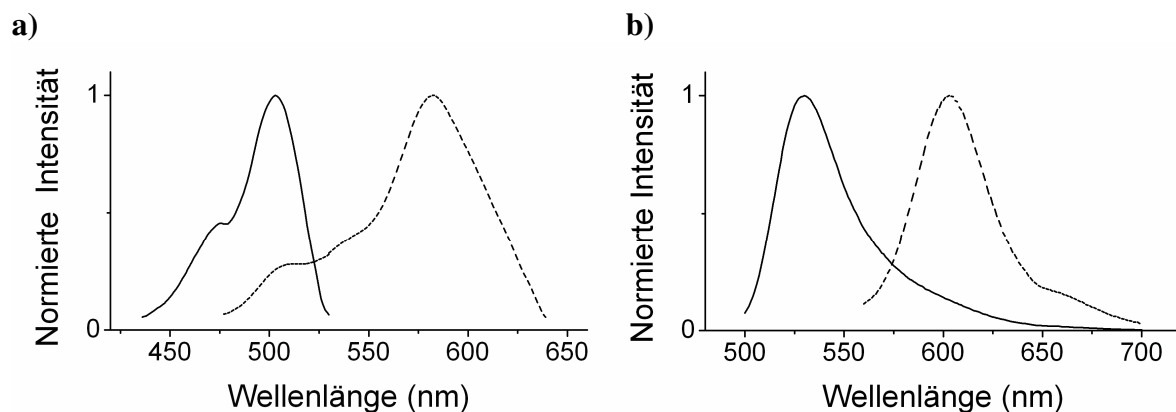


Abbildung 3-17 **Fluoreszenzanregungsspektren und Fluoreszenzemissionsspektren von Sodium Green und Texas Red eingebettet in Acrylamid-Nanosensoren**

a) Fluoreszenzanregungsspektren der Farbstoffe Sodium Green und Texas Red in Polyacrylamid-Nanosensoren (Na=0mM, K=0mM, BSA=0%, Hepes=10mM). Die Spektren wurden auf 1 normiert. Mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop LSM510 lässt sich Sodium Green mit dem Argon-Laser bei 488nm und Texas Red mit dem HeNe-Laser bei 543nm nahezu selektiv anregen. **b)** Fluoreszenzemissionsspektren der Farbstoffe Sodium Green und Texas Red in Polyacrylamid-Nanosensoren (Na=0mM, K=0mM, BSA=0%, Hepes=10mM). Die Spektren wurden auf 1 normiert. Auch in Bezug auf die Emission lassen sich die Farbstoffe spektral trennen.

In den in Abbildung 3-18a und Abbildung 3-19a vorgestellten Experimenten wird die Antwort der ratiometrischen Nanosensoren auf Natrium in Kalium-freien und Kalium-haltigen Lösungen untersucht. Zunächst wurde das Sodium Green Fluoreszenzemissionsspektrum einer Lösung mit einer bestimmten Natriumkonzentration bei Anregung mit 488 nm aufgezeichnet. Im Anschluss daran wurde in dieser Lösung das Fluoreszenzemissionsspektrum von Texas Red bei einer Anregung mit 543nm aufgenommen. Sowohl die Sodium Green- als auch die Texas Red Spektren wurden auf die Fluoreszenzintensität von Sodium Green in Abwesenheit von Natrium skaliert. Das heißt, die dargestellten Texas Red Emissionsspektren sind mit demselben Faktor wie die Sodium Green Spektren skaliert worden.

Die Fluoreszenzintensität des Indikators Sodium Green zeigt die bereits oben charakterisierte Abhängigkeit von der Natriumkonzentration (Abbildung 3-18a). Die „Antwort“ von Sodium Green auf Natriumkonzentrationsänderungen wird also durch die Zugabe von Texas Red zum Polymerisationsgemisch nicht beeinträchtigt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Texas Red Spektren deckungsgleich sind. Das bedeutet, dass die Texas Red Fluoreszenz unabhängig von der Natriumkonzentration ist (Abbildung 3-18a). Die Fluoreszenzintensität von Texas Red kann somit als Maß für die Nanosensorkonzentration benutzt werden. Es ist deshalb möglich die Intensitätsmessungen von Sodium Green mithilfe der natriumunabhängigen Fluoreszenz von Texas Red zu korrigieren. Auf diese Weise erhält man eine Messgröße, die nur von der Natriumkonzentration, nicht jedoch von der Indikatorkonzentration oder der Anregungsintensität abhängig ist.

$K^+ = 0\text{mM}$; $\text{BSA} = 0\%$; $\text{pH} = 7,4$; $[\text{Na}^+] + [\text{TMA}^+] = 145\text{mM}$

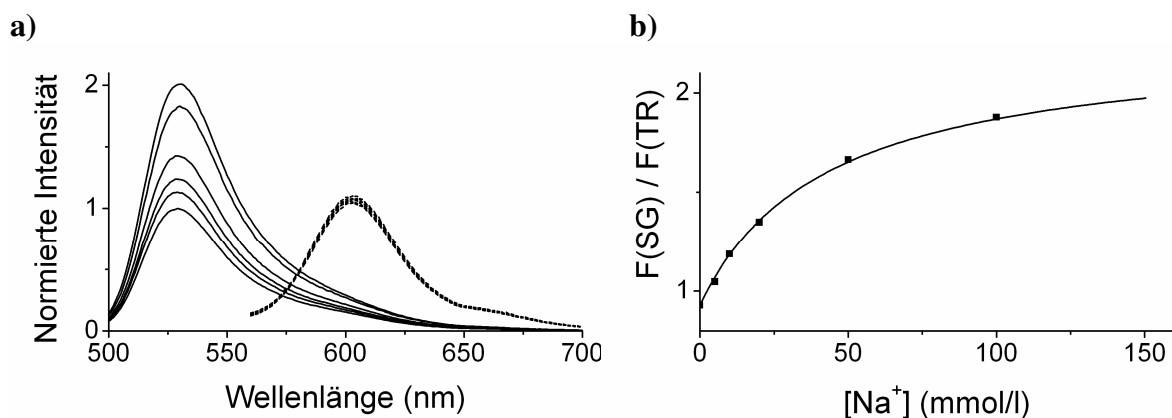


Abbildung 3-18 **Abhängigkeit der Sodium Green - Texas Red Nanosensor Fluoreszenz von der Natriumkonzentration in Kalium-freier Lösung.**

a) Fluoreszenzemissionsspektren der Farbstoffe Sodium Green (durchgezogene Linie) und Texas Red (gestrichelte Linie) in Acrylamid Nanosensoren in Gegenwart der Natriumkonzentrationen 0 (unten), 5, 10, 20, 50, 100 mM (oben). ($K^+ = 0\text{mM}$, $\text{BSA} = 0\%$; $\text{pH} = 7,4$; $\text{Hepes} = 10\text{mM}$, $\text{TMA-Cl} = 100\text{mM}$) Um eine konstante Ionenstärke zu gewährleisten, wurde den Lösungen soviel Tetramethylammoniumchlorid zugesetzt, dass die Kationengeamtkonzentration bei 145mM lag ($[\text{Na}^+] + [\text{TMA}^+] = 145\text{mM}$, $K^+ = 0\text{mM}$; $\text{BSA} = 0\%$; $\text{pH} = 7,4$; $\text{Hepes} = 10\text{mM}$). Sowohl die Sodium Green Spektren als auch die Texas Red Spektren wurden mit dem gleichen Faktor skaliert, so dass die Fluoreszenzintensität in Abwesenheit von Natrium bei 1 liegt. **b)** Abhängigkeit des Quotienten aus Sodium Green Fluoreszenz und Texas Red Fluoreszenz aus Abbildung 3-18a von der Natriumkonzentration. Die Anpassung von Gleichung 3-4 an die Datenpunkte lieferte $p = 1,344$, $K_d = 42,8\text{mM}$.

Bildet man in den vorliegenden Messungen das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten aus Sodium Green und Texas Red und trägt dieses Verhältnis in Abhängigkeit der

Natriumkonzentration auf, so erhält man Abbildung 3-18b (Abwesenheit von Kalium) und Abbildung 3-19b (Anwesenheit von Kalium).

$$\frac{F(SG)}{F(TR)} = \frac{p[Na^+]}{k_d + [Na^+]} + F(SG)_{\min}, \quad \frac{F(SG)_{\max}}{F(TR)_{\min}} = 1 + p \quad \text{Gleichung 3-4}$$

Passt man Gleichung 3-4 den Daten an, so erhält man einen K_d -Wert von 42,8 mM in Abwesenheit von Kalium beziehungsweise von 48,72 mM in Anwesenheit von Kalium. Diese Werte entsprechen den Werten, die für die nichtratiometrischen Acrylamidpartikel bestimmt wurden. Diese Messgrößen haben nun aber den Vorteil ratiometrisch ermittelt worden zu sein. Sie sind damit von der Indikatorkonzentration und der Anregungsintensität unabhängig. In den dargestellten Küvettenmessungen, in denen stets die gleiche Nanopartikelkonzentration verwendet wurde, macht sich dieser Vorteil nicht bemerkbar. Allerdings kommt er bei Messungen in lebenden Zellen deutlich zum tragen. Der folgende Abschnitt veranschaulicht dies am Beispiel von Messungen, die mit ratiometrischen Nanosensoren in CHO Zellen durchgeführt wurden.

$Na^+ + K^+ = 145\text{mM}$, HEPES= 10mM BSA= 0%; pH= 7,4

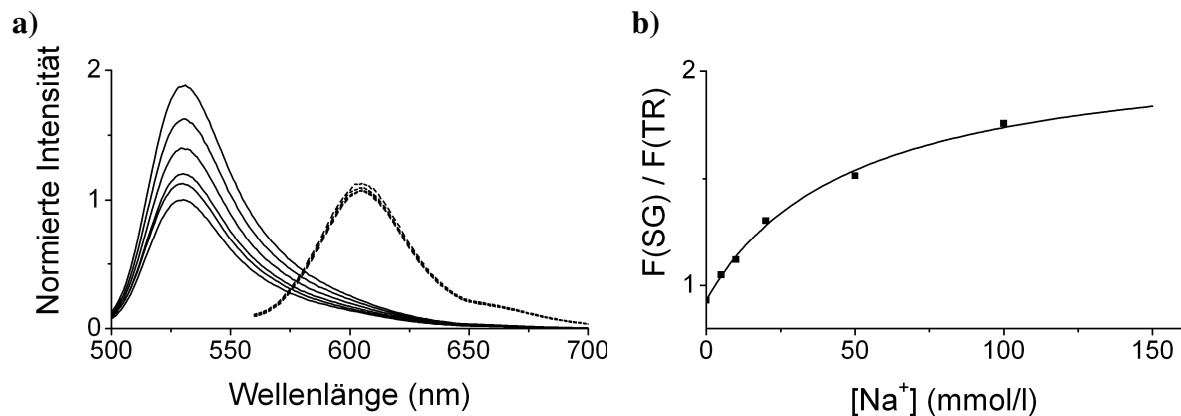


Abbildung 3-19 **Abhängigkeit der Sodium Green - Texas Red Nanosensor Fluoreszenz von der Natriumkonzentration in Gegenwart von Kalium.**

a) Fluoreszenzemissionsspektren der Farbstoffe Sodium Green (durchgezogene Linie) und Texas Red (gestrichelte Linie) in Acrylamid Nanosensoren in Gegenwart der Natriumkonzentrationen 0 (unten), 5, 10, 20, 50, 100mM (oben) ($[Na^+] + [K^+] = 145\text{mM}$; BSA=0%; pH=7,4; HEPES=10mM). Für alle Messlösungen betrug die Kaliumkonzentration $[K^+] = 145\text{mM} - [Na^+]$. Die Sodium Green Spektren und die Texas Red Spektren wurden mit dem gleichen Faktor so skaliert, dass die Fluoreszenzintensität in Abwesenheit von Natrium bei 1 liegt. b) Abhängigkeit des Quotienten aus Sodium Green Fluoreszenz und Texas Red Fluoreszenz aus Abbildung 3-19a von der Natriumkonzentration. Die Anpassung von Gleichung 3-4 an die Datenpunkte lieferte $p=1,198$, $K_d= 48,7\text{mM}$.

3.4.5 Intensitätsmessungen mit Sodium Green / Texas Red Nanosensoren in CHO – Zellen

In den vorangegangenen Abschnitten wurden die Eigenschaften der Sodium Green / Texas Red Nanosensoren in vitro charakterisiert. Im folgenden Abschnitt wird nun experimentell überprüft, ob es möglich ist, mit den ratiometrischen Nanosensoren Natriumkonzentrationen in Zellen zu messen.

Um die Nanosensoren in das Zytosol von CHO-Zellen einzubringen, wurden verschiedene Strategien verfolgt (vgl. Abschnitt 2.4.2). Sowohl der Beschuss der Zellen mit den Nanopartikeln über ein Gene Gun System als auch die Beladung über Liposomen erwies sich dabei als geeignet. Im Laboralltag war es jedoch einfacher, die Zellen über Liposomen zu beladen. Alle im Folgenden beschriebenen Versuche wurden in Zellen durchgeführt, die auf diese Art und Weise beladen wurden.

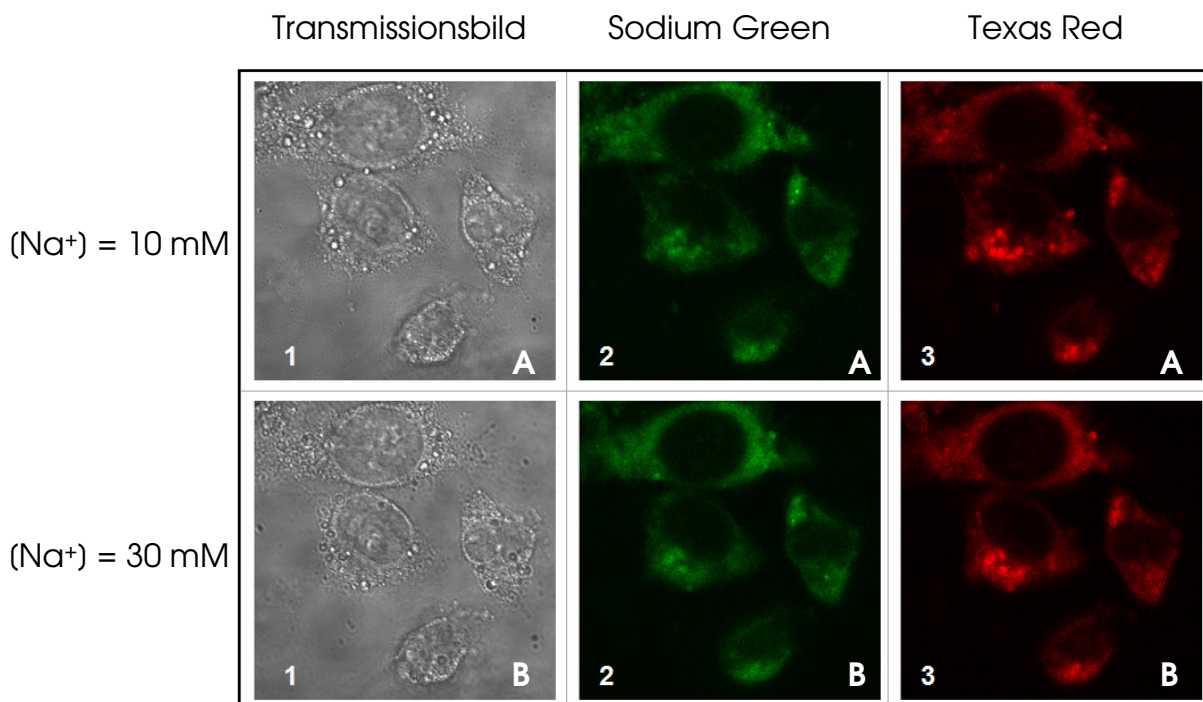


Abbildung 3-20 **Natriummessungen mit ratiometrischen Nanosensoren in CHO-Zellen.**

(1) Transmissionsbild (2) konfokale Fluoreszenzaufnahme im Sodium Green Kanal (3) konfokale Fluoreszenzaufnahme im Texas Red Kanal. Die Zellen wurden im Verlauf des Versuches mit Natriumlösungen unterschiedlicher Konzentrationen umspült (10mM - 30mM - 150mM - 30mM). Allen Lösungen wurde weiterhin eine Kombination der drei Zellmembranporenbildner Gramicidin (15 µM) Nigericin (5µM) und Monensin (15µM) zugesetzt, um einen Angleich der intrazellulären Natriumkonzentration an eine definierte extrazelluläre Natriumkonzentration herbeizuführen. **A)** Zu Beginn des Experimentes (t=0min, [Na⁺]=10mM) - obere Zeile. **B)** Aufnahme nach Einwaschen der nächsten Konzentrationstufe (t= 11 min, [Na⁺]=30mM) – untere Zeile.

CHO Zellen wurden mithilfe der Liposomenmethode mit den ratiometrischen Nanosensoren beladen (Abbildung 3-20). Die Struktur der Zellen entspricht denen unbeladener Kulturzellen. Morphologische Veränderungen, die auf eine Schädigung der Zellen durch die Beladung hindeuten könnten, sind nicht erkennbar. Durch das Auswaschen nach der Beladung sind extrazellulär verbliebene Nanosensoren entfernt worden. Alle in den konfokalen Aufnahmen sichtbaren Nanosensoren sind intrazellulär lokalisiert. Der Zellkern ist mit relativ scharfer Kontur ausgespart.

Die mit ratiometrischen Nanosensoren beladenen CHO-Zellen (Abbildung 3-20) wurden im Verlauf des Experiments mit Lösungen, die unterschiedliche Natriumkonzentrationen enthielten (10, 30, 150 und 30 mM Natrium), umspült. Diese Lösungen enthielten ebenfalls Oobain und Membranporenbildner (vgl. Abschnitt 2.2.3 und Abschnitt 3.2.6) über die sich die intrazelluläre Natriumkonzentration der vorgegebenen extrazellulären Natriumkonzentration angleichen konnte. Auf diese Weise konnte die Fluoreszenzintensität von Sodium Green/Texas Red Nanosensoren bei bekannter intrazellulärer Natriumkonzentration mithilfe des Laser Scanning Mikroskop LSM 510 bestimmt werden. Die Konfiguration des LSM 510 für diese Messungen ist in Abbildung 2-4 (Abschnitt 2.3.2) dargestellt.

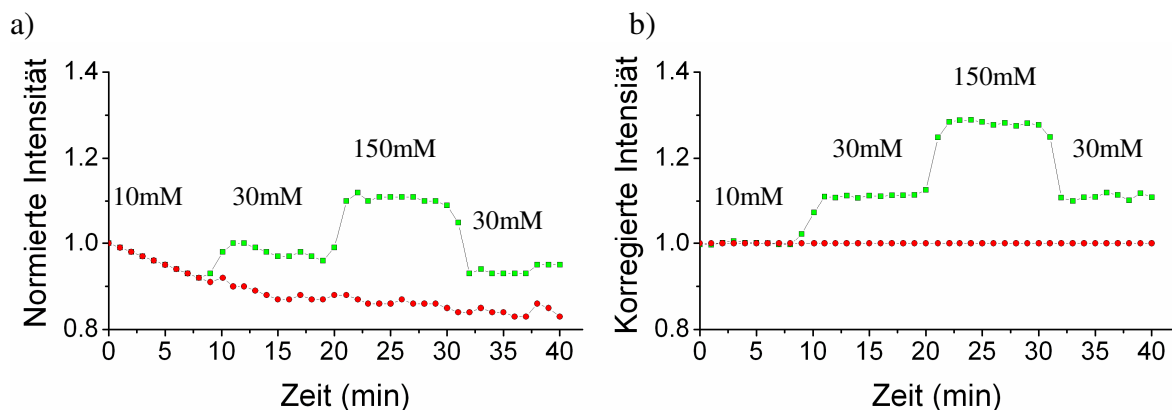


Abbildung 3-21 **Sodium Green und Texas Red Fluoreszenz der ratiometrischen Acrylamid-Nanosensoren in CHO-Zellen in Abhängigkeit von der Natriumkonzentration**

a) In einminütigen Abständen wurden konfokale Aufnahmen im Sodium Green- und Texas Red-Kanal in Gegenwart der intrazellulären Natriumkonzentrationen 10mM → 30mM → 150mM → 30mM erstellt. Die gemessene Fluoreszenzintensität der konfokalen Bilder wurde für jeden Kanal gemittelt, so skaliert, dass die Fluoreszenzintensität zu Beginn des Experiments ($t=0\text{min}$, $[\text{Na}^+]=10\text{mM}$) bei 1 liegt und im zeitlichen Verlauf dargestellt. **b)** Die Texas Red Fluoreszenz wurde durch die Sodium Green Fluoreszenz geteilt und so skaliert, dass die Fluoreszenzintensität zu Beginn des Experiments ($t=0\text{min}$, $[\text{Na}^+]=10\text{mM}$) bei 1 liegt und im zeitlichen Verlauf aufgetragen.

In einminütigen Abständen wurden konfokale Aufnahmen im Sodium Green- und Texas Red-Kanal erstellt. Die gemessene Fluoreszenzintensität dieser konfokalen Bilder wurde für jeden Kanal gemittelt, auf die zu Beginn des Experimentes gemessene Intensität normiert und im zeitlichen Verlauf dargestellt (Abbildung 3-21a). Während der 40-minütigen Messung verursachte eine geringe Verschiebung der konfokalen Ebene eine stetig sinkende Sodium Green- und Texas Red Fluoreszenz (Abbildung 3-21a). Vergleicht man nun die absolute Fluoreszenzintensität von Sodium Green zu Beginn des Experimentes in Gegenwart von 10mM Natrium ($t=0\text{min}$) mit der Fluoreszenzintensität von Sodium Green in Gegenwart von 30mM Natrium ($t=11\text{min}$), so sind diese gleich groß. Mithilfe der Fluoreszenzintensität von Sodium Green könnten in diesem Fall 10mM und 30mM Natrium nicht unterschieden werden. Korrigiert man deshalb die natriumabhängige Fluoreszenz von Sodium Green mit der natriumunabhängigen Fluoreszenz von Texas Red, indem man die Sodium Green Fluoreszenz durch die Texas Red Fluoreszenz teilt, so erhält man eine Größe, die es ermöglicht 10mM und 30mM Natrium gut zu unterscheiden (Abbildung 3-21b). Dieses Beispiel zeigt sehr gut, welchen großen Vorteil eine ratiometrische Kalibrierung des natriumabhängigen Sodium Green Signals hat. Artefakte die auf einer Verschiebung der konfokalen Ebene oder einer nicht konstanten intrazellulären Indikatorkonzentration beruhen, können so ausgeglichen werden.

3.4.6 Lokalisation der Nanopartikel in der Zelle

Eine einfache und effektive Methode Zellen mit einem wasserlöslichen Ionenindikator zu beladen, besteht darin die polaren Gruppen des Indikators mit Estergruppen zu maskieren (Abschnitt 1.5.4). Die apolaren Farbstoff-Ester können durch die Zellmembran diffundieren und werden durch im Zytosol vorhandene Esterasen hydrolysiert. Diese Methode hat den Nachteil, dass ein Teil der Indikatormoleküle auch in andere Zellkompartimente (z.B.: Endoplasmatische- oder das Sarkoplasmatische Retikulum) diffundiert, bevor sie im Zytosol hydrolysiert werden (Hofer und Machen 1993, ZhuGe et al. 1999). Der schnelle Natriumeinstrom während eines Aktionspotentials findet vom Extrazellulärraum in das Zytosol statt. Deshalb ist es für viele Fragestellungen besonders interessant, die unmittelbare Natriumkonzentrationsänderung im Zytosol messen zu können. Indikatormoleküle in anderen Zellkompartimenten könnten in diesem Fall das Messergebnis verfälschen. Deshalb wurde in dieser Arbeit überprüft, ob Acrylamid-Nanosensoren in das Endoplasmatische Retikulum

gelangen, wenn man Zellen mithilfe der Transfektionsmethode mit Acrylamid-Nanosensoren belädt (vgl. Abschnitt 2.4.2). Hierfür wurden HEK-293 Zellen mit dem Plasmid pECFP-ER, einem Marker der das Endoplasmatische Retikulum mit dem Cyan Fluoreszierenden Protein (CFP) markiert, transfiziert. Nach zwei Tagen wurden diese HEK-293 Zellen mit den ratiometrischen Texas Red/ Sodium Green Nanosensoren beladen (vgl. Abschnitt 2.4.2) und mit dem Laserscanning Mikroskop LSM 510 fotografiert (Abbildung 3-22). CFP wurde mit 458nm und der in Acrylamid eingebettete Farbstoff Texas Red mit 543nm angeregt. Die CFP-Fluoreszenz wurde mit einem Bandpassfilter (BP 470-500nm) und die Texas Red mit einem Langpassfilter (LP 550nm) gemessen. In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass sich die Nanopartikel (rot) im Zytosol, aber nicht im Endoplasmatischen Retikulum (blau) verteilen (Abbildung 3-22). Dieses Experiment verdeutlicht, dass man mit Acrylamid Nanosensoren Ionenkonzentrationen im Zytosol messen kann, ohne dabei fälschlicherweise Ionenkonzentration in anderen Zellkompartimenten, wie dem Endoplasmatischen- oder Sarkoplasmatischen Retikulum mitzubestimmen.

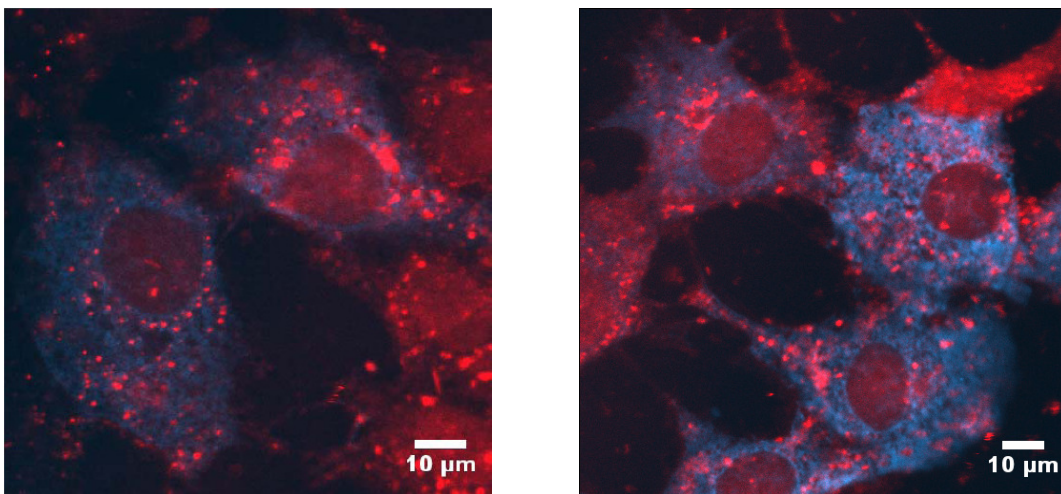


Abbildung 3-22 **Acrylamid-Nanosensoren sind nach Beladung der Zellen mithilfe von Liposomen nicht im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert**

HEK-293 Zellen wurden mit pECFP-ER, einem Marker für das Endoplasmatische Retikulum, transfiziert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen mit den ratiometrischen Texas Red/ Sodium Green Nanosensoren (rot) beladen (vgl. Abschnitt 2.4.2). CFP wurde mit 458nm und der Farbstoff Texas Red in den Acrylamid-Nanosensoren mit 543nm angeregt. Die Nanopartikel (rot) sind nicht im Endoplasmatischen Retikulum (blau) lokalisiert.

Diese Ergebnisse lassen sich auch auf Acrylamid-Nanosensoren für andere Ionen wie Kalzium übertragen (Clark et al. 1999c). In Muskelzellen dient das sarkoplasmatische Retikulum als Kalziumspeicher. Während einer Kontraktion wird Kalzium aus dem

Sarkoplasmatischen Retikulum in das Zytosol freigesetzt und im Anschluss unter Aufwendung von Energie zurücktransportiert. Exakte Kalziummessungen im Zytosol mit kalziumsensitiven Farbstoff-Estern, die ins Sarkoplasmatische Retikulum diffundieren, sind deshalb sehr fehlerbehaftet (ZhuGe et al. 1999). Alternativ wären jedoch Kalziummessungen mit kalziumsensitiven Acrylamid Nanosensoren möglich.

3.4.7 Reaktionszeit der Acrylamid - Nanopartikel

Im folgenden Experiment wurde die Reaktionszeit der ratiometrischen Nanosensoren nach Natriumkonzentrationsänderung bis zum Anstieg der Fluoreszenzintensität von Sodium Green Nanosensoren untersucht. Hierfür wurden ratiometrische Nanosensoren, die in Natrium-freier Lösung gelöst waren, zu einer Lösung gegeben, die 100mM NaCl enthielt ($\text{pH}=7,4$, $[\text{K}^+]=0$, $\text{BSA}=0$). Mit dem Laserscanning Mikroskop LSM 510 wurde im Point Scan Modus während der Zugabe der Nanosensoren zur Natriumlösung (100mM) die Intensität im Sodium Green- und Texas Red Kanal registriert (Abbildung 3-23a). Im Point Scan wird der Anregungs-Laserstrahl auf einen festgesetzten Punkt innerhalb der Lösung fokussiert. Die Nanosensoren können innerhalb der Lösung in den Fokus hinein und wieder heraus diffundieren, so dass ein Ausbleichen der Nanosensoren nicht ins Gewicht fällt.

Die in der Registrierung des Texas-Red Kanals sichtbaren Intensitätsschwankungen werden dadurch hervorgerufen, dass die hinzugefügten Nanopartikel durch den Fokus diffundieren und sich erst langsam ein Konzentrationsgleichgewicht einstellt. Das Sodium Green Signal wird durch die gleiche Diffusionskinetik und zusätzlich durch die Geschwindigkeit der Natriumbindung bestimmt. Das Verhältnis beider Signale (vgl. Abbildung 3-23b) ist zu jedem Zeitpunkt konstant. Das heißt, dass die Natriumbindung schneller sein muss als die Zeitauflösung der Registrierung. Wenn die Natriumbindung langsamer wäre, dann müsste eine zusätzliche Zunahme des Sodium Green Signals zu sehen sein, die einen Anstieg des Quotienten aus Sodium Green und Texas Red Fluoreszenz zur Folge hätte. Das Verhältnis bleibt jedoch konstant. Deshalb kann man schlussfolgern, dass die Kinetik der Natriumbindung durch die Polymermatrix nicht wesentlich eingeschränkt wird. Die Zeitauflösung ist vielmehr durch das Mikroskop selbst limitiert.

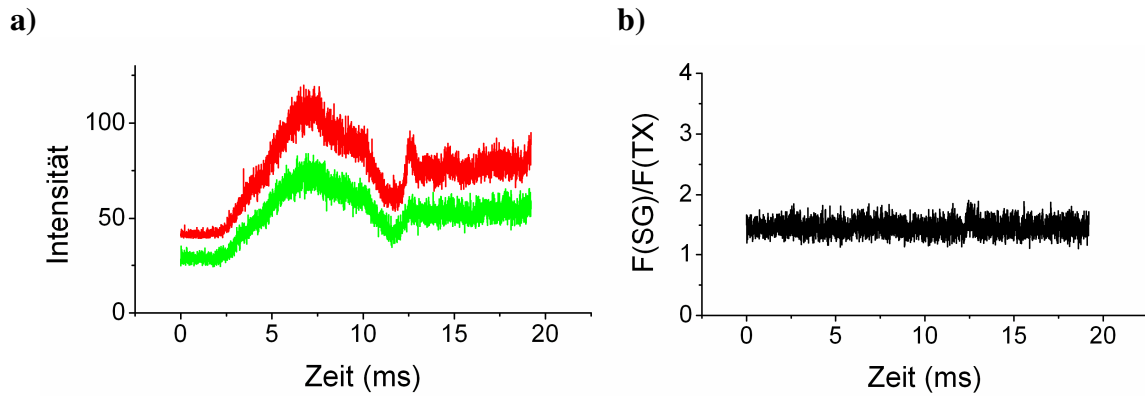


Abbildung 3-23 **Reaktionszeit der Acrylamid Sodium Green / Texas Red Nanosensoren**
a) Es wurden ratiometrische Nanosensoren (Sodium Green/Texas Red), die in Natriumfreier Lösung gelöst waren, zu einer Lösung gegeben, die 100mM NaCl enthielt (pH=7,4, $[K^+]=0$, BSA=0). Mit dem Laserscanning Mikroskop LSM 510 wurde im Point Scan Modus kontinuierlich die Intensität im Sodium Green- und Texas Red Kanal registriert **b)** Verhältnis der unter a) dargestellten Sodium Green und Texas Red Fluoreszenz.

3.5 Fluoreszenzlebensdauermessungen des Fluoreszenzindikators Sodium Green

Sodium Green ist ein nicht-ratiometrischer Fluoreszenzindikator. Natriummessungen mit Sodium Green in der Zelle, die auf Fluoreszenzintensitätsänderungen des Indikators beruhen, sind fehlerbehaftet, da die Fluoreszenzintensität nicht nur von der Natriumkonzentration sondern auch von der schwer steuerbaren intrazellulären Indikatorkonzentration und der Anregungsintensität abhängig ist.

In Abschnitt 3.4.4 wird durch Kombination von Sodium Green und einem Referenzfarbstoff in Acrylamid Nanopartikeln die Möglichkeit beschrieben, ratiometrische Messungen durchzuführen. Diese Methode ermöglicht es, Verfälschungen, die durch eine unbekannte intrazelluläre Indikatorkonzentration zustande kommen, zu korrigieren. Eine weitere Möglichkeit eröffnet sich über die Messung der Fluoreszenzlebensdauer von Sodium Green. Die Fluoreszenzlebensdauer ist eine Stoffkonstante und deshalb unabhängig von den beschriebenen Fehlerquellen.

Im Folgenden soll untersucht werden, ob sich die Fluoreszenzlebensdauer des Indikators Sodium Green als natriumsensitiver Signalparameter für intrazelluläre Natriummessungen eignet. Die Fluoreszenzlebensdauermessungen von Sodium Green wurden mit einer Streak Camera (vgl. Abschnitt 2.3.3) durchgeführt.

3.5.1 Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators Sodium Green in Abhängigkeit von variablen Natriumkonzentrationen

In den folgenden Experimenten wurde die Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer des Indikators Sodium Green von der Natriumkonzentration in Kalium-freier Lösung untersucht. Hierfür wurden Lösungen, die Sodium Green ($5\mu\text{M}$) und unterschiedliche Natriumkonzentrationen enthielten, in Glaskapillaren gefüllt und mit einer Streakcamera vermessen (vgl. Abschnitt 2.3.3).

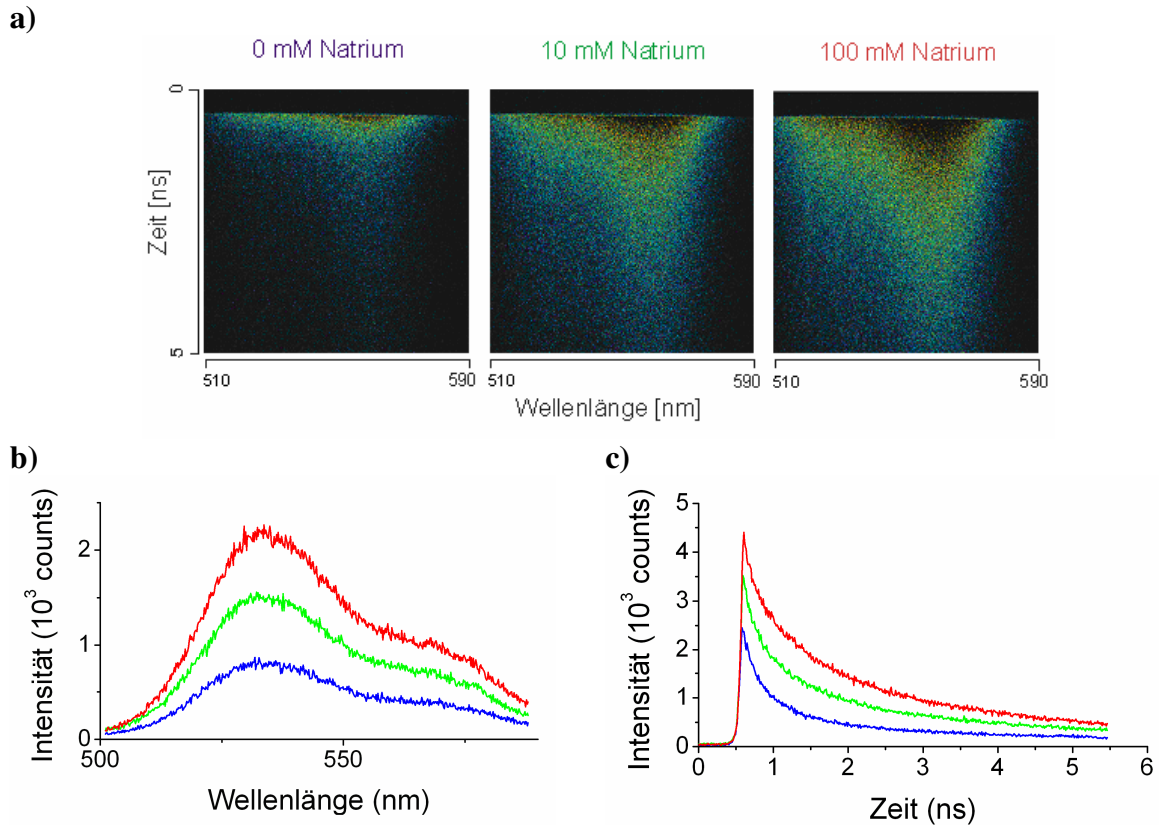


Abbildung 3-24 **Fluoreszenzlebensdauermessungen des Indikators Sodium Green mit einer Streakcamera in Gegenwart von 0mM (blau), 10mM (grün) und 100mM (rot) Natriumchlorid.**

Um eine konstante Ionenstärke zu gewährleisten, wurde allen Lösungen so viel Tetramethylammoniumchlorid zugesetzt, dass die Kationengesamtkonzentration bei 145mM lag ($[\text{Na}^+] + [\text{TMA}^+] = 145\text{mM}$, $\text{K}^+ = 0\text{mM}$; BSA=0%; pH=7,4; Hepes=10mM).

a) Zeit- und wellenlängenaufgelöste Streakcamera Bilder des Farbstoffes Sodium Green. Durch Summation der Photonen der unter a) gezeigten Streakcamera-Bilder entlang der y-Achse (Zeitachse) erhält man die in Abbildung b) dargestellten Fluoreszenzintensitätsspektren. Durch Summation der Photonen entlang der x-Achse (Wellenlänge) erhält man die in Abbildung c) dargestellten zeitaufgelösten Fluoreszenzabfälle.

In Abbildung 3-24 a) werden exemplarisch für die Natriumkonzentrationen 0, 10, 100mM die zeit- und wellenlängen-aufgelösten Streak Camera Bilder des Farbstoffes Sodium Green gezeigt. Jeder einzelne im Streak Camera Bild sichtbare Punkt stellt ein detektiertes Photon dar. Seine Position auf der Wellenlängenachse (x-Achse) wird durch die Wellenlänge, seine Position auf der Zeitachse (y-Achse) durch die Zeit in Bezug auf das Triggersignal bestimmt. Durch Summation der so registrierten Einzelereignisse entlang der Zeitachse ergeben sich die in Abbildung 3-24b dargestellten Fluoreszenzemissionsspektren und durch Summation entlang der Wellenlängenachse die in Abbildung 3-24c dargestellten Fluoreszenzabklingkurven.

In Abbildung 3-25a wurden alle Fluoreszenzabklingkurven auf 1 normiert. In dieser Auftragung ist deutlich zu erkennen, dass ein Anstieg der Natriumkonzentration eine deutliche Verlängerung der Fluoreszenzlebensdauer hervorruft.

Ausgehend von der Idee, dass sich im Idealfall der Natrium-gebundenen Form des Indikators eine Fluoreszenzlebensdauer τ_1 und der Natrium-freien Form eine andere, hiervon stark abweichende, Lebensdauer τ_2 zuordnen lässt, wurde zunächst eine zweiexponentielle Funktion (Gleichung 3-5) an die Lebensdauerkurven angepasst.

$$I(t) = A_1 * e^{\frac{-t}{\tau_1}} + A_2 * e^{\frac{-t}{\tau_2}} \quad \text{Gleichung 3-5}$$

Bei der Anpassung wurden die Lebensdauern als Stoffkonstante angesehen, die global für alle Datensätze gelten muß, wohingegen die Amplituden den Beitrag der jeweiligen Form zur gemessenen Fluoreszenzabklingkurve angeben. Alle Daten wurden mithilfe der Software Globals Unlimited (Laboratory for Fluorescence Dynamics, University of Illinois at Urbana-Champaign, USA) global ausgewertet (vergleiche Abschnitt 2.5.2).

Die Ergebnisse der zweiexponentiellen Auwertung sind in Abbildung 3-25a und Tabelle 3-1 dargestellt. Die Amplitude der kurzen Lebensdauer ($\tau_1=0.30\text{ns}$) nimmt für steigende Natriumkonzentrationen ab, die Amplitude der längeren Lebensdauer ($\tau_2=2.44\text{ns}$) hingegen zu (Tabelle 3-1). Man könnte deshalb der Natrium-freien Form die Lebensdauer $\tau_1=0.30\text{ns}$ und der Natrium-gebundenen Form die Lebensdauer $\tau_2=2.44\text{ns}$ zuordnen. Ein biexponentielles Modell beschreibt den Fluoreszenzabfall des Indikators Sodium Green leider nicht korrekt: Insbesondere bei kleinen Natriumkonzentrationen, d.h. einem schnellen Fluoreszenzabfall ist die Abweichung des errechneten Fluoreszenzabfalls von dem tatsächlich gemessenen sehr groß, wie es der erhöhte χ^2 -Wert zeigt.

Biexponentielle Anpassung

$$\tau_1=0,30 \text{ ns}, \tau_2=2,44\text{ns}$$

c (mmol/l)	A1	A2	$\bar{\tau}$ (ns)	χ^2
0	75,38%	24,62%	0,83	1,81
1	72,51%	27,49%	0,89	1,84
2	69,88%	30,12%	0,94	2,06
5	64,18%	35,82%	1,07	1,92
10	59,37%	40,63%	1,17	1,42
20	54,42%	45,58%	1,28	1,32
50	48,29%	51,71%	1,41	1,31
100	47,83%	52,17%	1,42	1,37

Tabelle 3-1 Globale biexponentielle Auswertung der Fluoreszenzlebensdauerkurven (Abbildung 3-25) des Indikators Sodium Green in Abhängigkeit von variablen Natriumkonzentrationen ($K^+=0\text{mM}$; $BSA=0\%$; $\text{pH}=7,4$; $\text{Hepes}=10\text{mM}$, $[\text{Na}^+]+[\text{TMA}^+]=145\text{mM}$).

Im Weiteren wurde deshalb eine dreixponentielle Funktion (Gleichung 3-6) an die Fluoreszenzabklingkurven angepasst (Abbildung 3-25b und Tabelle 3-2).

$$I(t) = A_1 * e^{\frac{-t}{\tau_1}} + A_2 * e^{\frac{-t}{\tau_2}} + A_3 * e^{\frac{-t}{\tau_3}} \quad \text{Gleichung 3-6}$$

In der globalen dreixponentiellen Anpassung wurden die Lebensdauern $\tau_1=0,13 \text{ ns}$, $\tau_2=0,54 \text{ ns}$ und $\tau_3=2,80 \text{ ns}$ ermittelt. Vergleicht man die χ^2 -Werte der zwei- und dreixponentiellen Auswertung miteinander, so wird deutlich, dass ein dreixponentielles Modell den Fluoreszenzabfall des Indikators insbesondere bei kleinen Natriumkonzentrationen besser beschreibt (Tabelle 3-1 und Tabelle 3-2). Deshalb wurde für alle folgenden Auswertungen der Sodium Green Lebensdauerkurven ein dreixponentielles Modell benutzt.

Dreixponentielle Anpassung
 $\tau_1=0,13 \text{ ns}$, $\tau_2=0,54 \text{ ns}$, $\tau_3=2,80 \text{ ns}$

c (mmol/l)	A1	A2	A3	$\bar{\tau}$ (ns)	χ^2
0	46,84%	36,46%	16,70%	0,73	1.42
1	47,08%	33,57%	19,35%	0,78	1.54
2	43,23%	35,04%	21,73%	0,85	1.79
5	37,96%	35,15%	26,89%	0,99	1.63
10	31,23%	37,22%	31,54%	1,12	1.08
20	26,59%	37,01%	36,39%	1,25	1.03
50	18,91%	38,44%	42,65%	1,43	1.06
100	16,10%	40,15%	43,75%	1,46	1.07

Tabelle 3-2 Globale dreixponentielle Auswertung der Fluoreszenzlebensdauerkurven (Abbildung 3-25) des Indikators Sodium Green in Abhängigkeit von variablen Natriumkonzentrationen ($K^+=0\text{mM}$; $BSA=0\%$; $\text{pH}=7,4$; $\text{Hepes}=10\text{mM}$, $[\text{Na}^+]+[\text{TMA}^+]=145\text{mM}$). Bei 10mM Natrium sind die Amplituden A1 und A3 gleich gross (rote Markierung).

Im Rahmen der dreixponentiellen Auswertung nimmt die Amplitude A1 der kurzen Lebensdauer ($\tau_1=0,13\text{ns}$) ab; die Amplitude A3 der langen Lebensdauer ($\tau_3=2,8\text{ns}$) nimmt für steigende Natriumkonzentrationen zu. A2, die Amplitude der mittleren Lebensdauer ($\tau_2=0,54\text{ns}$) ändert sich hingegen kaum (Tabelle 3-2). Aufgrund dieser Befunde lässt sich die Amplitude A1 der Natrium-freien Form und die Amplitude A3 der Natrium-gebundenen Form des Indikators zuordnen. Die Natriumbindung hat jedoch keinen Einfluss auf die Amplitude A2. In einem ähnlichen Experiment konnten Despa et al. ($\tau_1=0,25\text{ns}$, $\tau_2=0,74\text{ns}$, $\tau_3=2,90\text{ns}$) und Szmackinski et. al. ($\tau_1=0,09\text{ns}$, $\tau_2=0,40\text{ns}$, $\tau_3=2,53\text{ns}$) vergleichbare Fluoreszenzlebensdauern von Sodium Green ermitteln (Szmackinski und Lakowicz 1997, Despa et al. 2000c). Diese Autoren konnten ebenfalls zeigen, dass die Amplitude der kurzen Lebensdauer bei steigenden Natriumkonzentrationen abnimmt, die Amplitude der langen Lebensdauer zunimmt und die Amplitude der mittleren Lebensdauer durch Natrium nicht beeinflusst wird.

$K^+ = 0\text{mM}$; $\text{BSA} = 0\%$; $\text{pH} = 7,4$; $[\text{Na}^+] + [\text{TMA}^+] = 145\text{mM}$

a) Biexponentielle Anpassung

b) Triexponentielle Anpassung

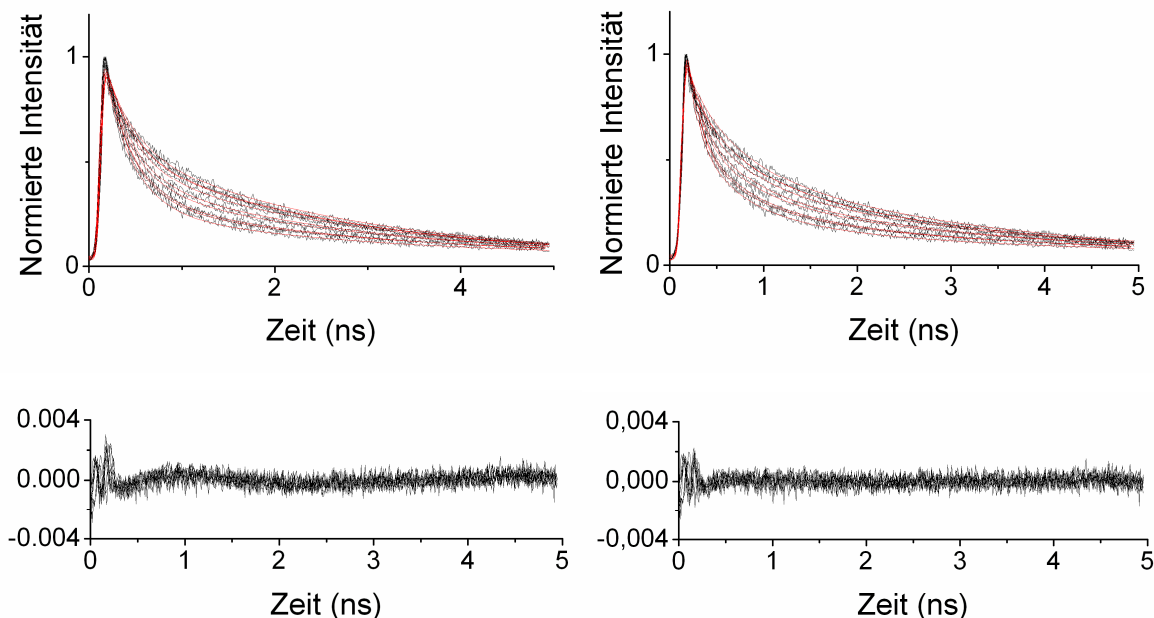


Abbildung 3-25 **Vergleich von zweiexponentieller und dreiexponentieller Auswertung der natriumabhängigen Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators Sodium Green in Kalium-freier Lösung.** Fluoreszenzlebensdauerkurven des Indikators Sodium Green in Gegenwart von 0 (untere Kurve), 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100mM (obere Kurve) NaCl. Um eine konstante Ionenstärke zu gewährleisten, wurde bei Lösungen mit Natriumkonzentrationen unter 150mM soviel Tetramethylammoniumchlorid zugesetzt, dass die Kationengesamtkonzentration bei 145mM lag ($[\text{Na}^+] + [\text{TMA}^+] = 145\text{mM}$, $K^+ = 0\text{mM}$; $\text{BSA} = 0\%$; $\text{pH} = 7,4$; $\text{Hepes} = 10\text{mM}$). Alle Fluoreszenzabklingkurven wurden auf 1 normiert. **a)** Ein zweiexponentielles Modell (Gleichung 3-5) wurde global an den Datensatz angepasst. Die Reste der Anpassung von Gleichung 3-5 an die Daten werden unter den zugehörigen Fluoreszenzabklingkurven dargestellt. **b)** Ein dreiexponentielles Modell (Gleichung 3-6) wurde global an den Datensatz angepasst. Die Reste der Anpassung von Gleichung 3-6 an die Daten werden unter den zugehörigen Fluoreszenzabklingkurven dargestellt.

Betrachtet man τ_1 als Lebensdauer der Natrium-freien Form und τ_3 als Lebensdauer der Natrium-gesättigten Form von Sodium Green, so lässt sich mithilfe von Gleichung 3-7 (vgl. Gleichung 6-17) für die Amplitude A_1 ein $K_d = 14,8\text{mM}$ und für die Amplitude A_3 ein $K_d = 10,1\text{mM}$ errechnen (Abbildung 3-26). Beide K_d -Werte entsprechen dem K_d -Wert ($K_d = 8,7\text{mM}$), der für die Intensitätsmessungen mit Sodium Green ermittelt werden konnte.

$$K_d = \frac{X_{\max} - X}{X - X_{\min}} [Na^+]$$

Gleichung 3-7

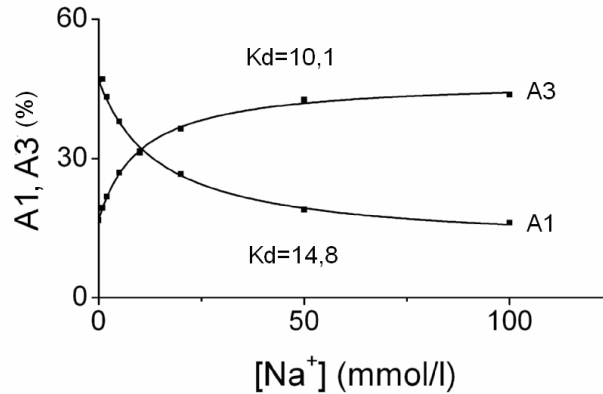


Abbildung 3-26 **Abhängigkeit der Amplitude A1 beziehungsweise A3 von der Natriumkonzentration.**

Gleichung 3-7 (vgl. Anhang 6.2) wurde an die Daten angepasst. Für die Änderung der Amplitude A1 konnte ein $K_d=14,8\text{mM}$ und für A3 $K_d=10,1\text{mM}$ errechnet werden.

3.5.2 Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators Sodium Green in Abhängigkeit von variablen Kaliumkonzentrationen

Die in Abschnitt 3.2.2 wiedergegebenen Experimente zeigten, daß Kalium im Vergleich zu Natrium eine nur geringe Zunahme der Fluoreszenzintensität von Sodium Green verursacht. In den Experiment aus Abbildung 3-27 und Tabelle 3-3 wurde der Einfluß von Kalium auf die Fluoreszenzlebensdauer von Sodium Green untersucht. Er ist, wie es Szmacinski et al. in einem analogen Experiment zeigen konnten, sehr gering (Szmacinski und Lakowicz 1997).

$$\tau_1=0,20\text{ns}, \tau_2=0,41\text{ ns}, \tau_3= 2,08\text{ ns}$$

c (mmol/l)	A1	A2	A3	$\bar{\tau}$ (ns)	χ^2
0	44%	22%	34%	0,89	0,84
20	42%	22%	35%	0,91	1,03
100	32%	29%	39%	0,99	0,95

Tabelle 3-3 Globale dreixponentielle Fluoreszenzlebensdauerbewertung des Indikators Sodium Green in Gegenwart von 0 und 100mM Kaliumchlorid. ($K^+=0\text{mM}$; BSA=0%; pH=7,4; Hepes=10mM, $[Na^+]+[TMA^+]=145\text{mM}$)

$\text{Na}^+ = 0\text{mM}$; $\text{BSA} = 0\%$; $\text{pH} = 7,4$; $[\text{K}^+] + [\text{TMA}^+] = 145\text{mM}$

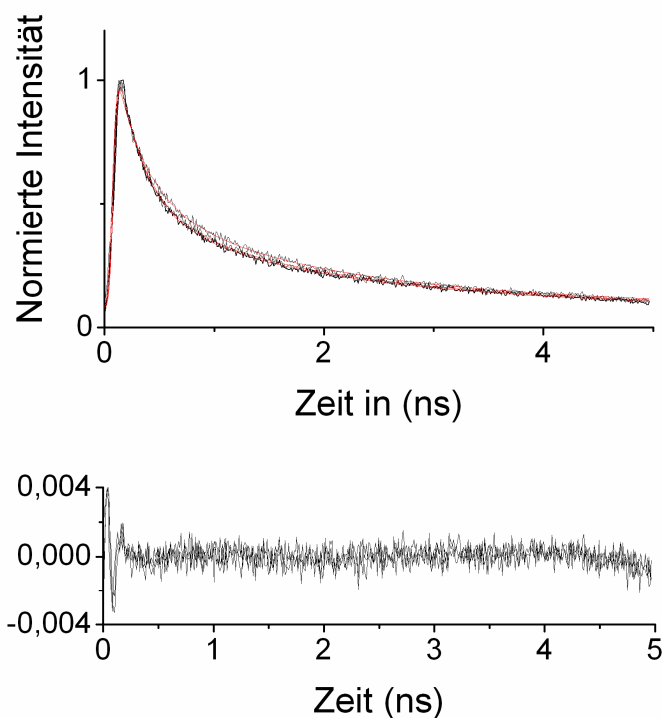


Abbildung 3-27 **Fluoreszenzabklingkurven des Indikators Sodium Green in Gegenwart variabler Kaliumkonzentrationen.**

Fluoreszenzabklingkurven von Sodium Green in Gegenwart von 0 (untere Kurve) und 100mM (obere Kurve) Kalium. Allen Messlösungen wurde Tetramethylammoniumchlorid zugegeben, so dass die Kationengesamtkonzentration 145mM betrug ($[\text{TMA}^+] + [\text{K}^+] = 145\text{mM}$; $\text{BSA} = 0\%$; $\text{pH} = 7,4$). Alle Fluoreszenzabklingkurven wurden auf 1 normiert. Gleichung 3-5 wurde an die Daten angepasst. Die Reste der Anpassung von Gleichung 3-6 an die Daten werden unter den zugehörigen Fluoreszenzabklingkurven dargestellt.

3.5.3 *Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators Sodium Green in Gegenwart von Natrium und Kalium*

Für die Intensitätsmessungen mit Sodium Green konnte gezeigt werden, dass Kalium mit Natrium um die Bindungsstelle am Kronenether konkurriert (Abschnitt 3.2.3). Im Folgenden soll untersucht werden, ob Kalium die natriumabhängige Änderung der Fluoreszenzlebensdauer von Sodium Green beeinflusst. Die Kaliumkonzentration wurde so gewählt, daß die Summe der Natrium- und Kaliumionenkonzentration stets 145mM betrug (Abbildung 3-28 und Tabelle 3-4).

$\text{Na}^+ + \text{K}^+ = 145\text{mM}$; BSA= 0%; pH= 7,4

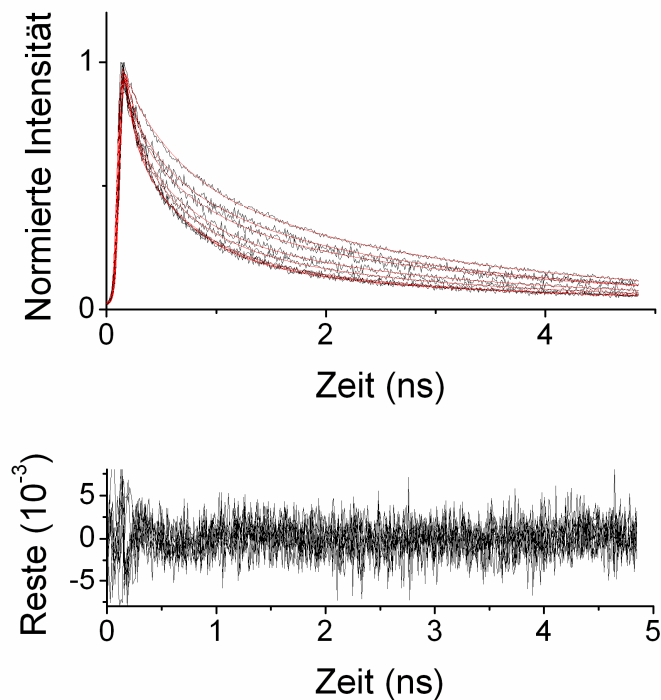


Abbildung 3-28 **Fluoreszenzlebensdaueränderung von Sodium Green in Gegenwart von Natrium und Kalium**

Fluoreszenzlebensdaueränderung von Sodium Green in Gegenwart von $[\text{Na}^+] = 0\text{mM}$ (untere Kurve), 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100mM (obere Kurve). Für alle Messlösungen wurde die Kaliumkonzentration so gewählt, dass die Kationengesamtkonzentration 145mM betrug ($[\text{Na}^+] + [\text{K}^+] = 145\text{mM}$; BSA=0%; pH=7,4). Die Fluoreszenzabklingkurven wurden auf 1 normiert. Gleichung 3-6 wurde global an diese Kurven angepasst. Die Reste der Anpassung von Gleichung 3-6 an die Daten werden unter den zugehörigen Fluoreszenzabklingkurven dargestellt.

In der globalen dreixponentiellen Auswertung der Abklingkurven in Gegenwart von Natrium und Kalium konnten die Lebensdauern $\tau_1 = 0,07\text{ ns}$, $\tau_2 = 0,51\text{ ns}$ und $\tau_3 = 2,63\text{ ns}$ ermittelt werden. Die Werte gleichen den Werten, die in Abwesenheit von Kalium ermittelt wurden ($\tau_1 = 0,13\text{ ns}$, $\tau_2 = 0,54\text{ ns}$, $\tau_3 = 2,80\text{ ns}$, vgl. Abschnitt 3.5.1). Mit steigenden Natriumkonzentrationen (und abnehmenden Kaliumkonzentrationen) nimmt im Unterschied zu den Messungen in Abwesenheit von Kalium nicht nur A_1 ($\tau_3 = 0,07\text{ ns}$) sondern auch A_2 ($\tau_3 = 0,51\text{ ns}$) ab. Nur A_3 ($\tau_3 = 2,63\text{ ns}$) steigt bei höheren Natriumkonzentrationen an. Die Ergebnisse befinden sich in guter Übereinstimmung mit denen anderer Autoren (Szmackinski und Lakowicz 1997, Despa et al. 2000c).

$$\tau_1=0,07\text{ns}, \tau_2=0,51\text{ ns}, \tau_3=2,63\text{ns}$$

c [mmol/l]	A1	A2	A3	$\bar{\tau}$ (ns)	X^2
0	40,00%	45,70%	14,30%	0,64	1,13
1	40,60%	44,10%	15,40%	0,66	1,28
2	39,80%	43,00%	17,20%	0,70	1,22
5	36,70%	42,50%	20,80%	0,79	1,53
10	35,60%	39,40%	25,10%	0,89	1,62
20	32,30%	35,20%	32,50%	1,06	1,16
50	28,50%	33,00%	38,50%	1,20	1,27
100	25,40%	33,10%	41,50%	1,28	1,64

Tabelle 3-4 Globale dreixponentielle Fluoreszenzlebensdauerbewertung des Indikators Sodium Green in Gegenwart von Natrium und Kalium (Abbildung 3-28). (BSA=0%; pH=7,4; Hepes=10mM, $[\text{Na}^+]+[\text{K}^+]=145\text{mM}$). Bei 20mM Natrium sind die Amplituden A1 und A3 gleich groß (rote Markierung).

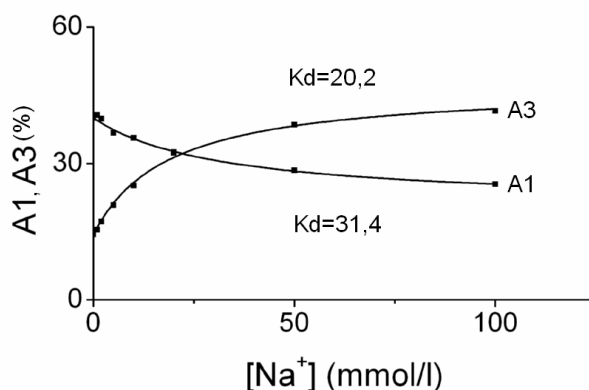


Abbildung 3-29 **Abhängigkeit der Amplitude A1 und A3 von der Natriumkonzentration in Gegenwart von Natrium und Kalium.**

Für alle Messlösungen wurde die Kaliumkonzentration so gewählt, dass die Kationengesamtkonzentration 145mM betrug ($[\text{Na}^+]+[\text{K}^+]=145\text{mM}$; BSA=0%; pH=7,4). Gleichung 3-7 wurden an die Daten angepasst. Für die Änderung der Amplitude A1 konnte ein $K_d=20,2\text{mM}$ und für A3 $K_d=31,4\text{mM}$ errechnet werden.

Betrachtet man τ_1 als Lebensdauer der Natrium-freien Form und τ_3 als Lebensdauer der Natrium-gebundenen Form, so lässt sich durch Anpassung von Gleichung 3-7 an den Verlauf der Amplituden A1 und A3 ein K_d -Wert von 31,4mM bzw. 20,2mM berechnen (Abbildung 3-29). Diese beiden Werte entsprechen ungefähr dem K_d -Wert, der für die Intensitätsmessungen ermittelt wurde ($K_d=22,4\text{mM}$). Auch sind bei einer Natriumkonzentration von 20mM die Amplituden A1 und A3 in etwa gleich groß (Tabelle 3-4).

3.5.4 Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators Sodium Green in Gegenwart von Rinderserum-Albumin (BSA)

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Proteine einen starken Einfluss auf die Fluoreszenzintensitätsmessungen mit Sodium Green haben (Abschnitt 3.4.1). In den folgenden Experimenten wurde überprüft, ob Proteine einen Einfluß auf die Fluoreszenzlebensdauer von Sodium Green bei verschiedenen Natrium- und Kaliumkonzentrationen haben (Abbildung 3-30).

a) $[\text{Na}^+]=3\text{mM}, [\text{K}^+]=142\text{ mM}$

b) $[\text{Na}^+]=3\text{mM}, [\text{K}^+]=142\text{ mM}, 5\% \text{ BSA}$

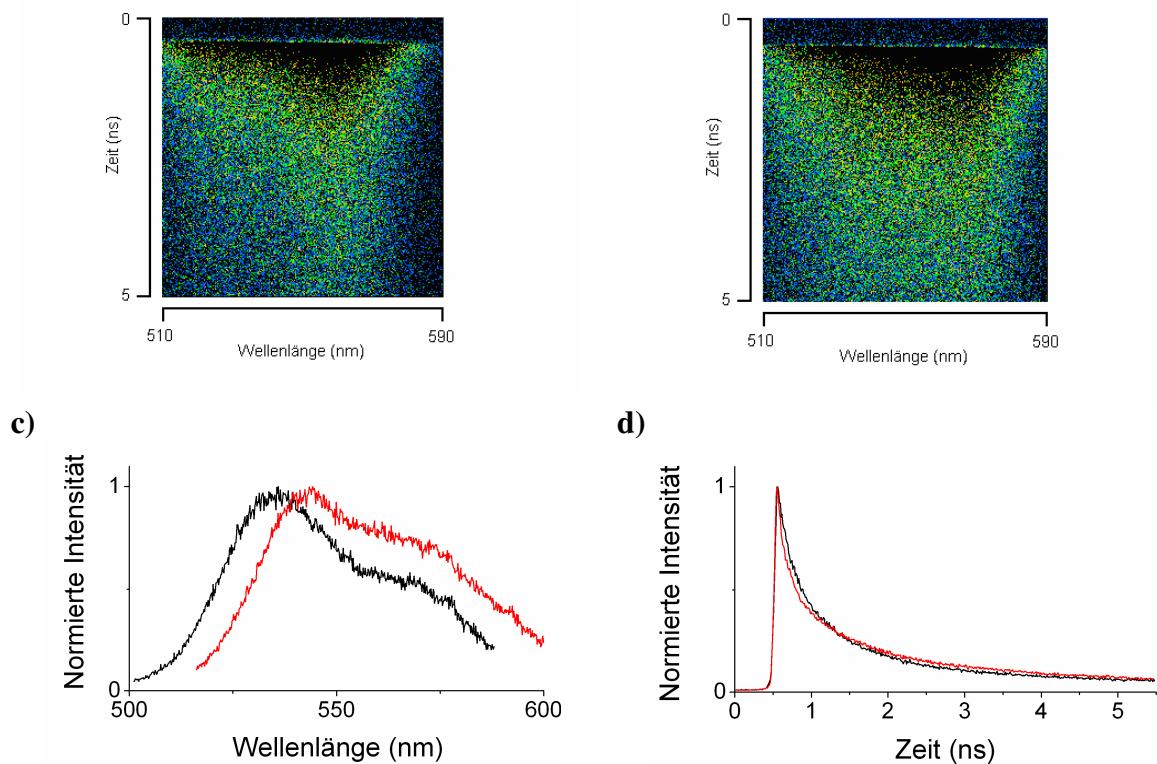


Abbildung 3-30 **Streakcamera-Bilder von Sodium Green in Gegenwart und Abwesenheit von BSA** a) Streakcamera-Bild von Sodium Green in einer Lösung mit $[\text{Na}^+]=3\text{mM}$, $[\text{K}^+]=142\text{mM}$, $[\text{Hepes}]=10\text{mM}$ b) Streakcamera-Bild von Sodium Green in einer Lösung mit $\text{BSA}=5\%$ (w/v) und ansonsten gleicher Zusammensetzung wie in a). c) Fluoreszenzemissionsspektrum von Sodium Green in Abwesenheit (schwarz) und in Gegenwart (rot) von BSA. Die Spektren wurden aus den Streakcamera-Bildern in a) und b) durch Summation der Photonen entlang der Zeitachse errechnet. d) Fluoreszenzabklingkurven von Sodium Green in Abwesenheit (schwarz) und in Gegenwart (rot) von BSA. Die Kurven wurden aus den Streakcamera-Bildern in a) und b) durch Summation der Photonen entlang der Wellenlängenachse errechnet.

$\text{Na}^+ + \text{K}^+ = 145\text{mM}$; BSA= 5%; pH= 7,4

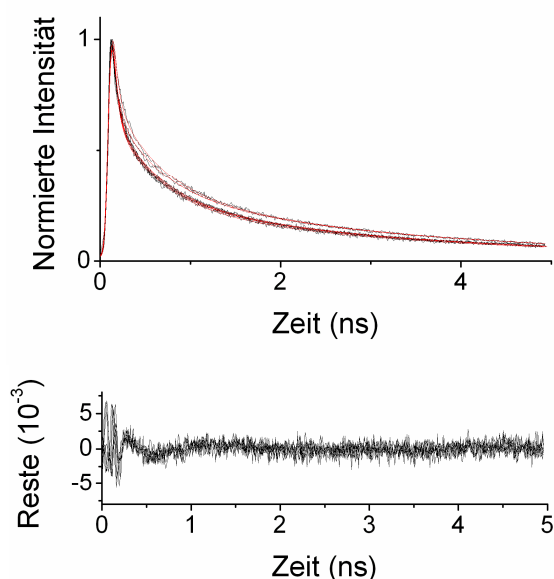


Abbildung 3-31 **Natriumabhängige Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators Sodium Green in Gegenwart von Natrium, Kalium und BSA.** Fluoreszenzabfallkurven des Indikators Sodium Green in Gegenwart von 0 (untere Kurve), 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 150mM (obere Kurve) Natrium. Für alle Messlösungen wurde die Kaliumkonzentration so gewählt, daß die Kationengesamtkonzentration 145mM betrug. Allen Lösungen wurde soviel BSA zugefügt, dass die BSA-Konzentration 5% w/v betrug. ($[\text{Na}^+] + [\text{K}^+] = 145\text{mM}$; BSA=5%; pH=7,4). Die Fluoreszenzabklingkurven wurden auf 1 normiert. Gleichung 3-6 wurde global an diese Kurven angepasst. Die Reste der Anpassung von Gleichung 3-6 an die Daten werden unter den zugehörigen Fluoreszenzabklingkurven dargestellt.

Der Vergleich der Streak-Camera Bilder in An- und Abwesenheit von BSA (Abbildung 3-30 a, b) und der daraus extrahierten Spektren (Abbildung 3-30c) zeigt, daß das Fluoreszenzspektrum von Sodium Green in Gegenwart von BSA zu roten Wellenlängen hin verschoben wird. Gleiches wurde bereits in den Intensitätsmessungen beobachtet (vgl. Abbildung 3-6). Die Fluoreszenzlebensdauereigenschaften des Indikators in in Gegenwart geringer Natriumkonzentrationen werden durch BSA nur geringfügig verändert (Abbildung 3-30d). Eine Erhöhung der Natriumkonzentration hat jedoch keine deutliche Verlängerung der Fluoreszenzlebensdauer von Sodium Green zur Folge (Abbildung 3-31, vgl. Abbildung 3-28).

Die Auswertung der Fluoreszenzlebensdauerkurven in Gegenwart von BSA zeigt, dass die natriumabhängige Änderung der Amplituden A1, A2 und A3 nur noch sehr gering ist (Tabelle 3-5). Aufgrund der eingeschränkten Dynamik der Fluoreszenzlebensdauer von Sodium in Gegenwart von BSA, ist es nicht möglich, mit diesem Signalparameter

Natriumkonzentrationen in proteinreichen Lösungen zu messen. Despa et al. haben in ihren Experimenten ebenfalls zeigen können, dass die natriumabhängige Fluoreszenzlebensdaueränderung von Sodium Green in Gegenwart von BSA deutlich vermindert ist (Despa et al. 2000b).

$$\tau_1=0,14 \text{ ns}, \tau_2=0,67 \text{ ns}, \tau_3=3,11 \text{ ns}$$

c (mmol/l)	A1	A2	A3	$\bar{\tau}$ (ns)	χ^2
3	57,30%	26,90%	15,80%	0,75	1,13
4	57,40%	26,40%	16,20%	0,76	1,28
5	57,00%	26,50%	16,50%	0,77	1,22
8	56,00%	26,70%	17,30%	0,80	1,07
13	54,90%	26,70%	18,50%	0,83	1,06
23	53,60%	26,40%	20,00%	0,87	1,16
53	52,80%	26,20%	21,00%	0,90	1,27
103	51,20%	26,00%	22,70%	0,95	1,15

Tabelle 3-5 Globale dreixponentielle Auswertung der Fluoreszenzlebensdauerkurven (Abbildung 3-31) des Indikators Sodium Green in Gegenwart von Natrium, Kalium und BSA. (BSA=5%; pH=7,4; HEPES=10mM, $[\text{Na}^+]+[\text{K}^+]=145\text{mM}$).

3.5.5 Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators Sodium Green in der Zelle

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die natriumabhängige Änderung der Fluoreszenzlebensdauer von Sodium Green in vitro beschrieben. Im folgenden Experiment soll der Indikator in lebenden Zellen charakterisiert werden. Hierfür wurden CHO-Zellen mit Sodium Green Tetraacetat beladen (vgl. Abschnitt 2.2.2) und in Gegenwart der natrium- und kaliumselektiven Membranporenbildner Gramicidin, Monensin und Nigericin mit Lösungen umspült, die 10mM (Abbildung 3-32b) beziehungsweise 100mM (Abbildung 3-32c) Natriumchlorid enthielten. Über die Porenbildner konnte sich die intrazelluläre Natriumkonzentration der vorgegebenen extrazellulären Natriumkonzentration angleichen (vgl. Abschnitt 2.2.3). Auf diese Weise konnte die Fluoreszenzlebensdauer von Sodium Green in CHO Zellen bei definierten intrazellulären Natriumkonzentration gemessen werden. Die Fluoreszenzlebensdauern wurden im mikroskopischen Präparat über die Einzelphotonenmeßtechnik (TCSPC) bestimmt (Abschnitt 2.3.3b). Im Gegensatz zu dem

Streakcamera Aufbau ermöglicht es diese Methode für jeden Pixel eines Bildes eine Fluoreszenzabklingkurve zu messen.

a) Transmissionsbild b) $[\text{Na}^+] = 10 \text{ mM}$ c) $[\text{Na}^+] = 100 \text{ mM}$

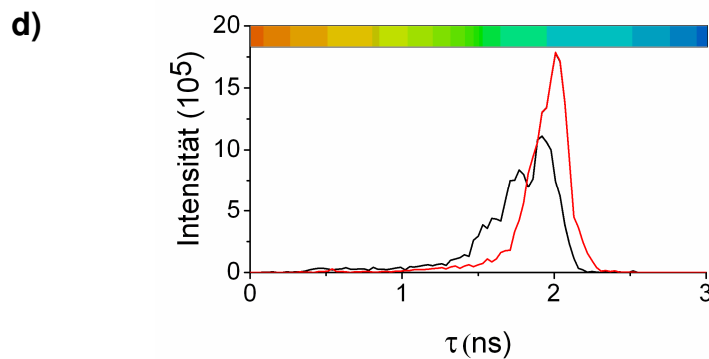
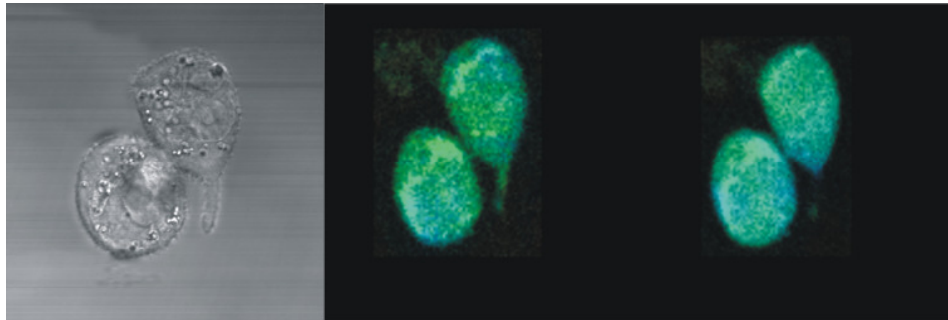


Abbildung 3-32 **Verteilung der mittleren Fluoreszenzlebensdauer des Indikators Sodium Green in CHO-Zellen bei 10mM und 100mM Natrium**

(a) Transmissionsbild (b) Farbcodierte Fluoreszenzlebensdauer-Verteilung des Indikators Sodium Green in CHO-Zellen bei 10mM Natrium. (c) Farbcodierte Fluoreszenzlebensdauer-Verteilung des Indikators Sodium Green in CHO-Zellen bei 100mM Natrium (d) Fluoreszenzlebensdauer-Verteilung von Sodium Green in CHO-Zellen in Gegenwart von 10 mM Natrium (schwarz) und 100 mM Natrium (rot). Die Zellen wurden im Verlauf des Versuches mit Lösungen, die 10mM bzw. 100mM Natriumchlorid enthielten, umspült. Allen Lösungen wurde weiterhin eine Kombination der drei Zellmembranporenbildner Gramicidin (15 μM) Nigericin (5 μM) und Monensin (15 μM) zugesetzt, um einen Angleich der intrazellulären Natriumkonzentration an eine definierte extrazelluläre Natriumkonzentration herbeizuführen.

Abbildung 3-32 zeigt das Transmissionsbild (a) und die Fluoreszenzlebensdauerbilder (b, c) einer CHO-Zelle, die mit Einzelphotonenmeßtechnik wurde. Zur Berechnung des Fluoreszenzlebensdauerbildes wurde eine dreixponentielle Gleichung (Gleichung 1-11) an die Fluoreszenzabklingkurve angepasst und die mittlere Fluoreszenzlebensdauer $\bar{\tau}$ nach Gleichung 1-14 berechnet (vgl. Abschnitt 2.5.2). Jeder Pixel der Fluoreszenzlebensdauerbilder (Abbildung 3-32 b, c) wurde entsprechend seiner mittleren Fluoreszenzlebensdauer

farbcodiert. In Abbildung 3-32d wird die Verteilung der mittleren Fluoreszenzlebensdauern in Bild b (10mM Natrium, linke Kurve) und in Bild c (100 mM Natrium, rechte Kurve) dargestellt.

Dieser Versuch zeigt, daß sich bei einem Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration die Fluoreszenzlebensdauer des Indikators Sodium Green im intrazellulären Milieu nur geringfügig ändert. Intrazelluläre Natriumbestimmungen, die auf einer Änderung der Fluoreszenzlebensdauer beruhen, sind deshalb nur schwierig möglich. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich in der hohen Konzentration an zelleigenen Proteinen. Die in Abschnitt 3.5.4 beschriebenen Versuche hatten bereits gezeigt, dass BSA den Einfluß von Natrium auf die Fluoreszenzlebensdauer von Sodium Green sehr vermindert.

3.5.6 Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von der Indikatorkonzentration (Sodium Green)

Bei Fluoreszenzlebensdauerermessungen geht man davon aus, daß die Fluoreszenzlebensdauer unabhängig von der Indikatorkonzentration ist. Ob diese Bedingung für Sodium Green erfüllt ist, wurde in den folgenden Experimenten überprüft. Hierfür wurde die Fluoreszenzlebensdauer von Sodium Green bei verschiedenen Indikatorkonzentrationen gemessen (Abbildung 3-33).

In Abwesenheit von Natrium und Kalium sind die Fluoreszenzabklingkurven von Sodium Green bis zu einer Indikatorkonzentration von 1mM deckungsgleich. Bei höheren Konzentrationen (3mM und 6mM) ist jedoch eine deutliche Zunahme der kurzen Lebensdauerkomponente zu erkennen (Abbildung 3-33). Die globale Auswertung dieser Messreihe ergibt, dass für steigende Sodium Green Konzentrationen die Amplitude der kurzen Lebensdauer (A1) zunimmt und die Amplitude der langen Lebensdauer (A3) abnimmt (Tabelle 3-6). Die Amplitude A2 der mittleren Lebensdauer bleibt jedoch konstant. Ursache hierfür könnte sein, daß die Indikatormoleküle bei höheren Konzentrationen aggregieren und ihre Fluoreszenz gegenseitig löschen.

Variable Sodium Green Konzentration

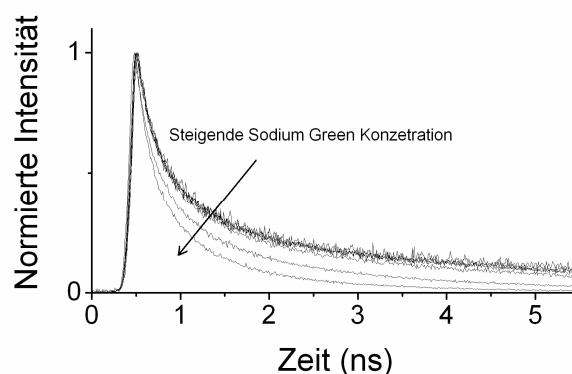


Abbildung 3-33 **Fluoreszenzabklingkurven des Indikators Sodium Green für unterschiedliche Indikatorkonzentrationen.** Sodium Green Konzentration=0,0625 (oben); 0,5; 1; 3; 6mM (unten). ($[Na^+]=0mM$, $[K^+]=0mM$, $pH=7,4$, Hepes=10mM, TMA-Cl=145mM)

$\tau_1=0,13\text{ ns}$, $\tau_2=0,53\text{ ns}$, $\tau_3=2,8\text{ ns}$

c [mmol/l]	A1	A2	A3	$\bar{\tau}$ (ns)	X^2
0,0625	31,68%	46,25%	22,07%	0,91	1,94
0,5	33,79%	42,77%	23,44%	0,93	1,21
1	34,52%	43,77%	21,71%	0,89	1,23
3	35,26%	47,06%	17,68%	0,80	1,34
6	43,84%	47,33%	8,83%	0,56	1,73

Tabelle 3-6 Globale Auswertung der Fluoreszenzabklingkurven für steigende Sodium Green Konzentrationen. Gleichung 3-6 wurde global an die Daten angepasst.

3.6 Fluoreszenzlebensdauer-messungen des Fluoreszenzindikators CoroNa Green

CoroNa Green ist ein relativ neuer Natriumindikator, der im Unterschied zu Sodium Green nur ein Fluoreszeinderivat, das über einen Benzolring an das Ionophor gebunden ist, besitzt (vgl. Abschnitt 1.5.2). Im Falle von CoroNa Green ist eine intramolekulare Interaktion der Fluorophore deshalb nicht möglich. Im Folgenden sollen deshalb die Fluoreszenzeigenschaften von CoroNa Green näher charakterisiert und mit denen von Sodium Green verglichen werden.

3.6.1 Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators CoroNa Green in Abhängigkeit variabler Natriumkonzentrationen

In dem im Folgenden beschriebenen Experiment wurde zunächst untersucht, ob sich die Fluoreszenzlebensdauer des Natriumindikators CoroNa Green in Abhängigkeit von den Natriumkonzentrationen ändert. Wie für die Fluoreszenzlebensdauermessungen mit Sodium Green wurden Lösungen, die den Indikator CoroNa Green ($5\mu\text{M}$) sowie unterschiedliche Natriumkonzentrationen enthielten, mit der Streakcamera vermessen (vgl. Abschnitt 2.3.3). Von Invitrogen wird für die Intensitätsmessungen von CoroNa Green ein Kd-Wert von 80 mM angegeben. Um die Lebensdauer des vollständig Natrium-gesättigten Indikators CoroNa Green bestimmen zu können, wurden die Lebensdauermessungen mit Corona Green im nachfolgend dargestellten Experiment in einem Konzentrationsbereich von 0 mM bis 1000 mM Natrium durchgeführt. Die normierten Fluoreszenzlebensdauerkurven (Abbildung 3-35) sind deutlich kürzer als die von Sodium Green, zeigen aber auch eine starke Abhängigkeit von der Natriumkonzentration.

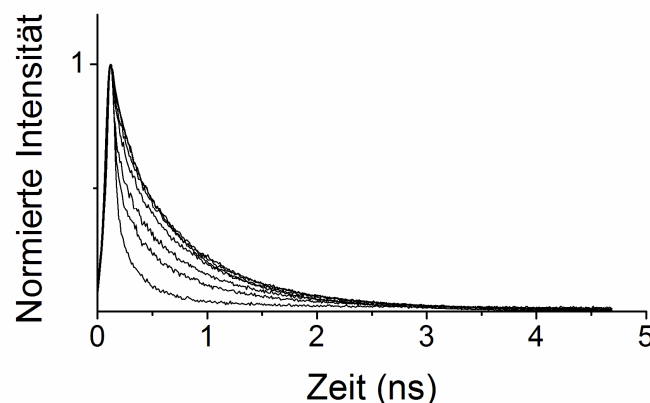


Abbildung 3-34 **Normierte Fluoreszenzabklingkurven des Indikators CoroNa Green in Gegenwart variabler Natriumkonzentrationen**

Normierte Fluoreszenzabklingkurven des Indikators CoroNa Green in Gegenwart von 0mM (untere Kurve), 10, 20, 50, 100, 150, 500, 1000mM (obere Kurve) NaCl. Allen Lösungen mit Natriumkonzentrationen unter 150 mM wurde soviel Tetramethylammoniumchlorid zugesetzt, dass die Kationengesamtkonzentration bei 145mM lag ($[\text{Na}^+] + [\text{TMA}^+] = 145\text{mM}$, $\text{K}^+ = 0\text{mM}$; BSA=0%; pH=7,4; HEPES=10mM).

Alle Lebensdauerkurven einer Messreihe wurden wie für Sodium Green (vgl. Abschnitt 3.5.1) in einer Matrix zusammengefasst und global zwei- und dreixponentiell ausgewertet (Abbildung 3-36, Tabelle 3-7, Tabelle 3-8).

Biexponentielle Anpassung

$$\tau_1 = 0,09 \text{ ns}, \tau_2 = 0,72 \text{ ns}$$

c [mmol/l]	A1	A2	$\bar{\tau}$ (ns)	X^2
0	91.67%	8.33%	0,28	3.33
10	70.53%	29.47%	0,36	2.16
20	56.90%	43.10%	0,43	1.86
50	43.65%	56.35%	0,51	1.72
100	37.67%	62.33%	0,54	1.80
150	34.71%	65.29%	0,57	1.78
500	34.84%	65.16%	0,57	1.65
1000	42.10%	57.90%	0,54	1,98

Tabelle 3-7 Globale biexponentielle Fluoreszenzlebensdauerwertung des Indikators Sodium Green in Abhängigkeit variabler Natriumkonzentrationen ($K^+=0\text{mM}$; BSA=0%; pH=7,4; Hepes=10mM, $[Na^+]+[TMA^+]=145\text{mM}$).

Triexponentielle Anpassung

$$\tau_1=0,06 \text{ ns}; \tau_2=0,29 \text{ ns}; \tau_3=0,85 \text{ ns};$$

c [mmol/l]	A1	A2	A3	$\bar{\tau}$ (ns)	X^2
0	82,58%	14,55%	2,86%	0,28	2,47
10	64,46%	18,77%	16,77%	0,36	1,87
20	47,33%	24,78%	27,89%	0,43	1,72
50	26,96%	32,42%	40,62%	0,51	1,53
100	20,34%	33,59%	46,07%	0,54	1,52
150	11,35%	38,30%	50,35%	0,57	1,53
500	9,93%	39,51%	50,55%	0,57	1,40
1000	0,00%	54,77%	45,23%	0,54	1,55

Tabelle 3-8 Globale dreixponentielle Fluoreszenzlebensdauerwertung des Indikators CoroNa Green in Abhängigkeit variabler Natriumkonzentrationen ($K^+=0\text{mM}$; BSA= 0%; pH=7,4; Hepes=10mM, $[Na^+]+[TMA^+]=145\text{mM}$).

$K^+ = 0\text{mM}$; $\text{BSA} = 0\%$; $\text{pH} = 7,4$; $[\text{Na}^+] + [\text{TMA}^+] = 145\text{mM}$

a) Biexponentielle Anpassung

b) Triexponentielle Anpassung

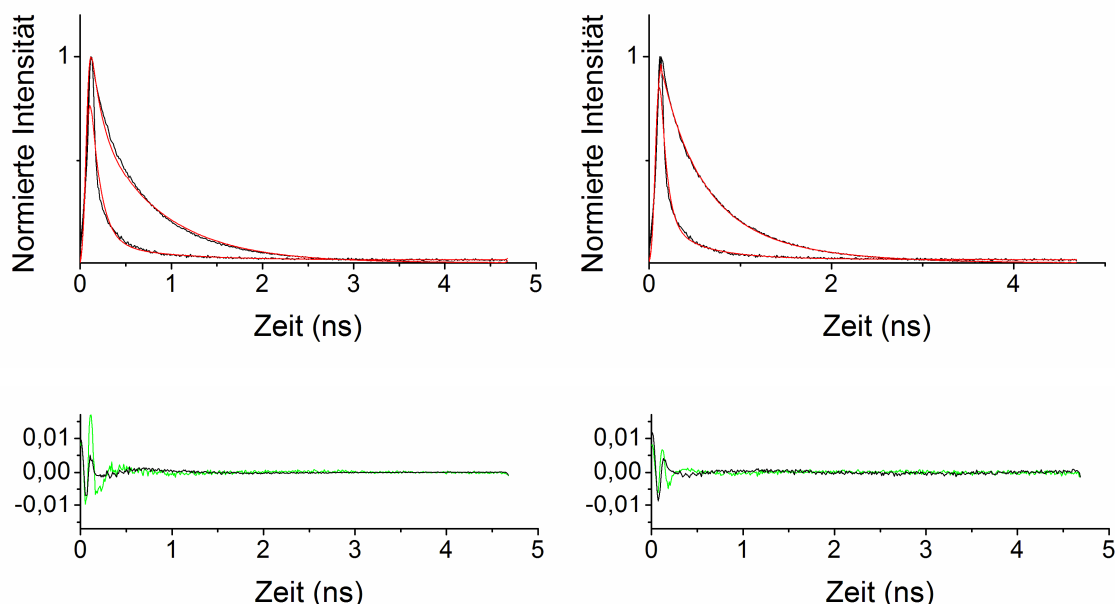


Abbildung 3-35 **Vergleich von zweiexponentieller und dreiexponentieller Auswertung der natriumabhängigen Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators CoroNa Green in Kalium-freier Lösung**

a) An die normierten Fluoreszenzabklingkurven des Indikators CoroNa Green in Gegenwart von 0, 10, 20, 50, 100, 150, 500, 1000mM Natrium wurde ein zweiexponentielles Modell global angepasst. Exemplarisch sind die ermittelten Funktionen für 0mM- und 1000mM Natrium dargestellt.

b) An die normierten Fluoreszenzabklingkurven des Indikators CoroNa Green in Gegenwart von 0, 10, 20, 50, 100, 150, 500, 1000mM Natrium wurde ein dreiexponentielles Modell global angepasst. Exemplarisch sind die ermittelten Funktionen für 0mM- und 1000mM Natrium dargestellt.

Die Reste für die Anpassung sind unter den dazugehörigen Kurven dargestellt. Die grünen Reste entsprechen der Anpassung des Fluoreszenzabfalls bei 0mM Natrium und die schwarzen Reste der Anpassung bei 1000mM an das jeweilige Modell.

Vergleicht man die zwei- und dreiexponentielle Auswertung der Fluoreszenzabfallkurven von CoroNa Green miteinander, so wird deutlich, dass der Fluoreszenzabfall in Abwesenheit von Natrium nur schlecht durch ein zweiexponentielles Modell beschrieben werden kann (Abbildung 3-35). Die ermittelte biexponentielle Funktion vernachlässigt hierbei die Spitze des Fluoreszenzabfalls. In der dreiexponentiellen Anpassung wird die Spitze des Fluoreszenzabfalls besser, jedoch auch nur unvollständig berücksichtigt. Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass es eine weitere sehr schnelle Abfallkomponente gibt, die technisch nicht bestimmt werden konnte. Für die schnellste Komponente konnte in der dreiexponentiellen Auswertung eine Lebensdauer von 60ps ermittelt werden. Diese

Lebensdauer liegt in der Grössenordnung des Anregungspulses; dies macht die Interpretation dieser Komponente leider sehr schwierig. Der Fluoreszenzabfall des vollständig durch Natrium gesättigten Indikators lässt sich hingegen gut durch ein zweixponentielles Modell beschreiben. Die dreixponentielle Anpassung an den Fluoreszenzabfall von CoroNa Green bei 1000mM Natrium ergab für die Amplitude der kurzen Lebensdauer $A_1=0$ (Tabelle 3-8). Man kann also davon ausgehen, dass der sehr kurze Fluoreszenzabfallsprozess bei dem vollständig durch Natrium gesättigten Indikator nicht mehr stattfindet.

Für die im Folgenden durchgeführten Messungen wurde aufgrund der beschriebenen Limitationen eines zweixponentiellen Modells stets ein dreixponentielles Modell für die Auswertung des Fluoreszenzabfalls von CoroNa Green verwandt.

Wie bereits für Sodium Green beschrieben wurde, sollte man im Idealfall der natriumgebundenen Form des Indikators eine Fluoreszenzlebensdauer und der natriumungebundenen Form eine andere, hiervon stark abweichende, Lebensdauer zuordnen können. Über die Änderung der Amplituden liess sich in diesem Fall dann der Beitrag der einzelnen Formen zum Gesamtabfall und somit die Natriumkonzentration errechnen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Amplitude der sehr kurzen Lebensdauer A_1 in Abhängigkeit steigender Natriumkonzentrationen fällt; A_2 und A_3 die Amplituden der mittleren und langen Lebensdauer hingegen steigen. Unter der Annahme, dass die Amplitude A_1 die natriumfreie- und die Summe der Amplituden A_2 und A_3 die natriumgebundene Form des Indikators CoroNa Green repräsentieren, wurde im Folgenden mit der natriumabhängigen Änderung dieser Parameter ein K_d -Wert errechnet. Die Annahme, dass die Amplitude A_1 der natriumfreien- und die Summe der Amplituden A_2 und A_3 der natriumgebundenen Form des Indikators entsprechen, ist nicht ganz korrekt, da der Fluoreszenzabfall von CoroNa Green in Abwesenheit von Natrium nicht monoexponentiell durch die kurze Lebensdauer beschrieben werden kann. Dennoch überwiegt die kurze Lebensdauer in Abwesenheit von Natrium mit einer Amplitude von 84%, so dass der so errechnete K_d -Wert eine gute Aussage über den Konzentrationsbereich, in dem mithilfe der Änderung der Fluoreszenzlebensdauer Natriumkonzentrationen gemessen werden können, gibt. Sowohl für den Anstieg von A_2 und A_3 als auch für den Abfall von A_1 konnte ein K_d -Wert von 27,6mM errechnet werden (Abbildung 3-36).

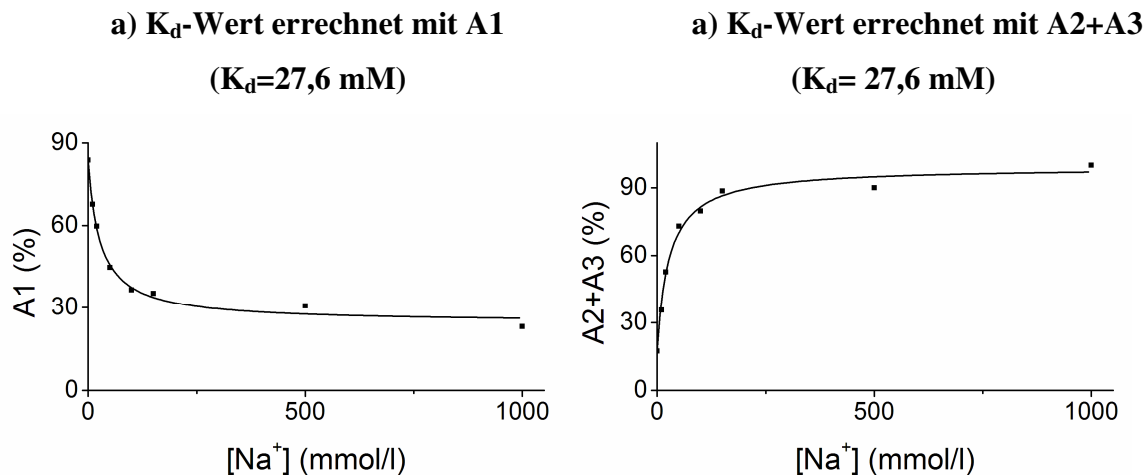


Abbildung 3-36 **Abhängigkeit der für die Fluoreszenzlebensdaueränderung von CoroNa Green ermittelten Amplituden A1 und A3 von der Natriumkonzentration** Gleichung 3-7 wurde an die Amplituden A1 und A3 aus Tabelle 3-8 1 angepasst. Für die Änderung der Amplitude A1 konnte ein $K_d=27,5$ mM und für A3 $K_d=20,8$ mM errechnet werden.

Der Hersteller (Molecular Probes/ Invitogen, Carlsbad, California, USA) des Indikators CoroNa Green gibt für die natriumabhängige Änderung der Fluoreszenzintensität einen K_d -Wert von 80mM an. Der für Änderung der Lebensdauer errechnete K_d -Wert von 27,6 mM ist im Vergleich zu dem K_d -Wert, der mithilfe der Intensitätsänderung ermittelt wurde, deutlich kleiner. Für Natriummessungen im physiologischen Konzentrationsbereich ist ein geringerer K_d -Wert jedoch von großem Vorteil. Meier et al. haben für den Natriumindikator CoroNa Green in der Zelle zeigen können, dass ein Natrium-Konzentrationsprung von 27,7mM für einen Anstieg der Fluoreszenzintensität von 50% nötig ist (Meier et al. 2006). Der Vergleich des in dieser Arbeit errechneten K_d -Wertes mit diesem Literaturwert ist nur schwierig möglich, da Meier et al. Intensitätsmessungen in der Zelle durchgeführt haben und in diesem Experiment Lebensdauerermessung in vitro durchgeführt wurden. Dennoch liegt die Sensitivität des Indikators in beiden Messungen ungefähr im gleichen Natriumkonzentrationsbereich.

3.6.2 Einfluss von Kalium auf die Fluoreszenzlebensdauer des Indikators CoroNa Green

Wie bereits erwähnt, ist die intrazelluläre Kaliumkonzentration um den Faktor zehn größer als die intrazelluläre Natriumkonzentration. Deshalb wurde im Folgenden analog zu den mit Natrium Green durchgeführten Experimenten der Einfluss von Kalium auf die Fluoreszenzlebensdauer von CoroNa Green untersucht. Die in Abbildung 3-37 und Tabelle

3-9 wiedergegebenen Ergebnisse zeigen, daß Kalium im Vergleich zu Natrium eine deutlich geringere Änderung der Fluoreszenzlebensdauer hervorruft.

[Na⁺]=0mM, BSA= 0% ; pH=7,4; Hepes=10mM

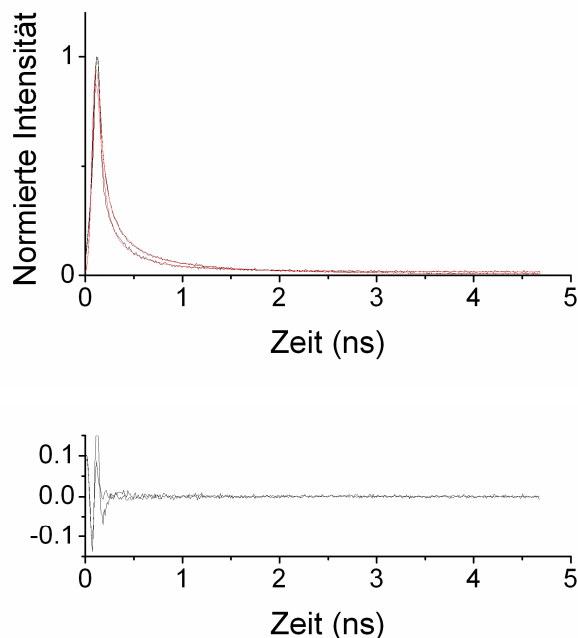


Abbildung 3-37 **Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators CoroNa Green in Gegenwart variabler Kaliumkonzentrationen.**

Normierte Fluoreszenzabklingkurven von CoroNa Green in Gegenwart von 0 (untere Kurve) und 100 mM (obere Kurve) Kalium. Allen Messlösungen wurde Tetramethylammoniumchlorid zugegeben, so dass die Kationengesamtkonzentration 145mM betrug ([TMA⁺]+[K⁺]=145mM; BSA=0%; pH=7,4). Gleichung 3-6 wurde an die Daten angepasst.

$\tau_1=0,05$ ns; $\tau_2=0,22$ ns; $\tau_3=0,95$ ns

c [mmol/l]	A1	A2	A3	$\bar{\tau}$ (ns)	χ^2
0	76.04%	20.56%	3.41%	0,12	2.40
100	68.96%	24.52%	6.52%	0,16	1.73

Tabelle 3-9 Globale dreixonponentielle Auswertung der Lebensdauerkurven des Indikators CoroNa Green für 0 mM und 100 mM Kalium ([TMA⁺]+[K⁺]=145mM; BSA=0%; pH=7,4).

3.6.3 Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators CoroNa Green in Gegenwart von Natrium und Kalium

Für Sodium Green konnte sowohl in den Intensitätsmessungen als auch in Fluoreszenzlebensdauermessungen gezeigt werden, dass Kalium zwar nur eine geringe Signaländerung hervorruft, aber mit Natrium um die Bindungsstelle konkurriert. Analoge Experimente zeigen auch für CoroNa Green einen ähnlichen Effekt (Abbildung 3-38 und Tabelle 3-10).

$$[\text{Na}^+] + [\text{K}^+] = 145\text{mM}, \text{BSA} = 0\%; \text{pH} = 7,4$$

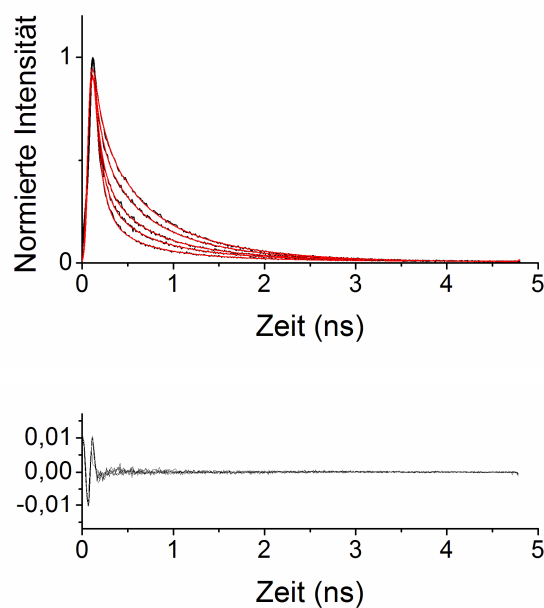


Abbildung 3-38 **Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators CoroNa Green in Gegenwart von Natrium und Kalium.** Normierte Fluoreszenzabklingkurven des Indikators CoroNa Green in Gegenwart von 0mM (untere Kurve), 10, 20, 50, 100, 150, 500, 1000mM (obere Kurve) NaCl. Die Kaliumkonzentration wurde so angepasst, dass die Kationengesamtkonzentration 145mM betrug ($[\text{Na}^+] + [\text{K}^+] = 145\text{mM}$; BSA=0%; pH=7,4; Hepes=10mM). Gleichung 3-6 wurde global an alle Kurven angepasst. Unter den Fluoreszenzabfallskurven sind die Reste der Anpassung dargestellt.

$$\tau_1=0,08 \text{ ns}, \tau_2=0,30 \text{ ns}, \tau_3=0,89 \text{ ns}$$

c [mmol/l]	A1	A2	A3	$\bar{\tau}$ (ns)	X^2
0	79,15%	13,11%	7,74%	0,33	1,70
10	70,49%	16,06%	13,45%	0,48	1,56
20	61,04%	20,47%	18,50%	0,63	1,72
50	41,52%	29,26%	29,22%	0,95	1,49
100	28,72%	34,17%	37,12%	1,17	1,55

Tabelle 3-10 Globale dreixponentielle Fluoreszenzlebensdauerbewertung des Indikators CoroNa Green in in Gegenwart von Natrium und Kalium ($[\text{Na}^+]+[\text{K}^+]=145\text{mM}$; BSA= 0%; pH= 7,4; Hepes= 10mM).

Für die Lebensdaueränderung des Indikators CoroNa Green in Gegenwart von Natrium und Kalium ($[\text{Na}^+]+[\text{K}^+]=145\text{mM}$) wurde mithilfe des Abfalls der Amplitude A1 sowie des Anstiegs der Amplituden A2 und A3 ein K_d -Wert von 77,3mM errechnet (Abbildung 3-39). Vergleicht man die Werte mit denen für Natrium allein ($K_d\text{-A1}=27,6\text{mM}$), so fällt auf, dass die Anwesenheit von Kalium den K_d -Wert zu höheren Konzentrationen hin verschiebt. Dieser Effekt lässt sich wie für Sodium Green damit erklären, dass Kalium und Natrium um die Bindung am Indikatormolekül CoroNa Green konkurrieren. Es sind deshalb höhere Natriumkonzentrationen notwendig um die Kaliumionen, die selber eine nur sehr geringe Lebensdaueränderung hervorrufen, aus ihrer Bindung am CoroNa Green Molekül zu verdrängen.

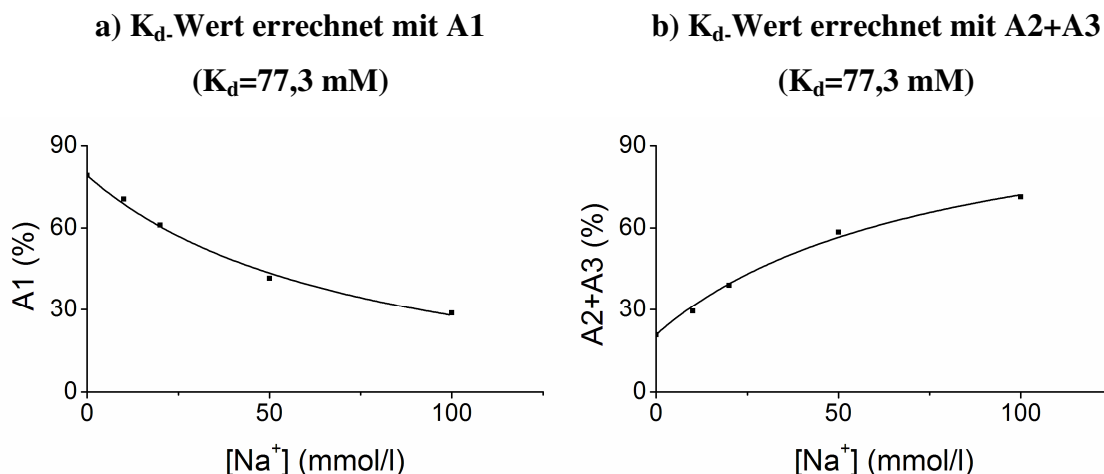


Abbildung 3-39 **Abhängigkeit der Amplituden A1 und A2+A3 von der Natriumkonzentration** Die Kaliumkonzentration wurde so angepasst, dass die Kationengesamtkonzentration 145mM betrug ($[\text{Na}^+]+[\text{K}^+]=145\text{mM}$; BSA=0%; pH=7,4; Hepes=10mM).

3.6.4 Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators CoroNa Green in Gegenwart von BSA

Die mit Sodium Green durchgeführten Experimente haben gezeigt, daß Proteine die Aussagekraft der Intensitätsmessungen (vgl. Abschnitt 3.2.5) sowie der Lebensdauermessungen (vgl. Abschnitt 3.5.4) stark einschränken. Im Folgenden wurde deshalb untersucht, welchen Einfluss Proteine auf die Fluoreszenzeigenschaften von CoroNa Green haben. Dazu wurden mit der Straekcamera (vgl. Abschnitt 2.3.3) das Fluoreszenzemissionsspektrum und die Fluoreszenzlebensdauer von CoroNa Green in Gegenwart von 5% BSA w/v für unterschiedliche Natriumkonzentrationen bestimmt.

Wie Abbildung 3-40 zeigt, verschiebt BSA auch im Fall von CoroNa Green das Fluoreszenzemissionsspektrum in den roten Wellenlängenbereich. CoroNa Green besitzt wie Sodium Green ebenfalls ein Fluoreszeinderivat als Fluorophor. Es ist daher zu vermuten, daß die Verschiebung des Emissionsmaximums durch eine direkte Wechselwirkung mit dem Fluorophor zustande kommt.

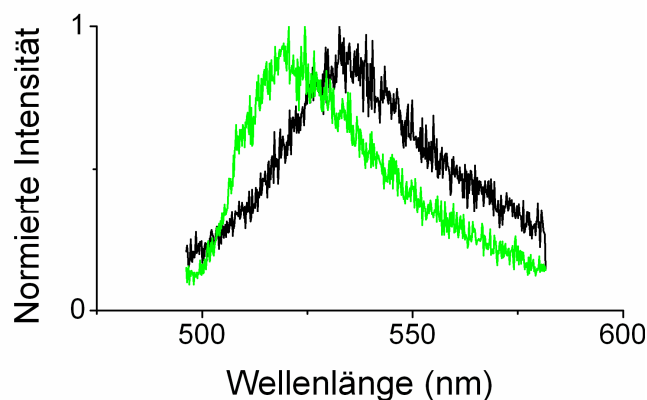


Abbildung 3-40 **Das Maximum des Fluoreszenzemissionsspektrums von CoroNa Green verschiebt sich in Gegenwart von BSA zu längeren Wellenlängen.**

Normiertes Fluoreszenzemissionsspektrum des Indikators CoroNa Green in Abwesenheit von BSA (linkes Spektrum, grün) und in Gegenwart von 5% BSA (rechtes Spektrum, schwarz). Die Anregung erfolgte mit dem TiSa-Laser bei 480 nm. Die Spektren wurden aus den jeweiligen Streak Camera Bildern errechnet. ($\text{Na}=3\text{mM}$, $\text{K}=0\text{mM}$, $\text{pH}=7,4$).

$[\text{Na}^+] + [\text{K}^+] = 145 \text{ mM}$, BSA = 5%; pH = 7,4

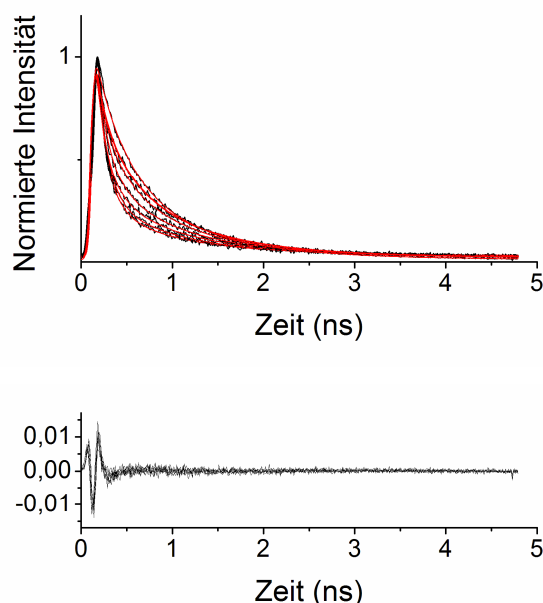


Abbildung 3-41 **Die natriumabhängige Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators CoroNa Green in Gegenwart von Proteinen**

Normierte Fluoreszenzabklingkurven des Fluoreszenzindikators CoroNa Green in Gegenwart von 0 (untere Kurve), 10, 20, 50, 100, 150, 500, 1000 mM (obere Kurve) NaCl. Die Kaliumkonzentration wurde so angepasst, dass die Kationengesamtkonzentration 145 mM betrug (BSA = 5%; pH = 7,4; Hepes = 10 mM, $[\text{Na}^+] + [\text{K}^+] = 145 \text{ mM}$). Gleichung 3-6 wurde global an alle Kurven angepasst. Unter den Fluoreszenzabfallskurven sind die Reste der Anpassung dargestellt.

Die in Abbildung 3-41 dargestellten Messungen verdeutlichen dass sich die Fluoreszenzlebensdauer von CoroNa Green auch in Gegenwart von Proteinen in Abhängigkeit von der Natriumkonzentration deutlich ändert. Wie für den Indikator in Abwesenheit von Proteinen nimmt die Amplitude der kurzen Lebensdauer ($\tau_1 = 0,11$) für steigende Natriumkonzentrationen zu. Die Amplitude der mittleren und langen Lebensdauer ($\tau_2 = 0,35$ ns, $\tau_3 = 0,97$ ns) nimmt hingegen ab. Es kann somit geschlossen werden, dass man mit CoroNa Green im Unterschied zu Sodium Green auch in Gegenwart von Proteinen, über die Änderung der Fluoreszenzlebensdauer, Natriumkonzentrationen messen kann.

$$\tau_1=0,11 \text{ ns}, \tau_2=0,35 \text{ ns}, \tau_3=0,97 \text{ ns}$$

c [mmol/l]	A1	A2	A3	$\bar{\tau}$ (ns)	X^2
0	75.27%	8.75%	15.99%	0,27	2.34
10	72.05%	8.98%	18.97%	0,29	2.12
20	62.19%	15.21%	22.60%	0,34	2.13
50	53.84%	19.15%	27.01%	0,39	1.86
100	35.31%	30.82%	33.86%	0,48	1.64
150	24.00%	35.10%	40.90%	0,55	1.63
1000	0.00%	58.81%	41.19%	0,61	1.18

Tabelle 3-11 Globale triexponentielle Fluoreszenzlebensdauerbewertung des Indikators CoroNa Green in Abhängigkeit variabler Natriumkonzentrationen (BSA= 5%; pH= 7,4; HEPES= 10mM, $[Na^+] + [K^+] = 145mM$).

Für die Lebensdaueränderung des Indikators CoroNa Green in Gegenwart von Natrium, Kalium und BSA ($[Na^+] + [K^+] = 145mM$, BSA=5%) konnte mithilfe des Abfalls der Amplitude A1 sowie des Anstiegs der Amplituden A2 und A3 ein K_d -Wert von 153,3mM errechnet werden (Abbildung 3-42). Der K_d -Wert, der in Gegenwart von Proteinen für die Fluoreszenzlebensdaueränderung bestimmt wurde, ist somit deutlich grösser als der in Abwesenheit von Proteinen ermittelte K_d -Wert. Trotz allem ist eine deutliche Signaländerung im physiologischen Natrium-Konzentrationsbereich zu erkennen, so dass Natriummessungen in Gegenwart von Proteinen über die Fluoreszenzlebensdaueränderung von CoroNa Green prinzipiell möglich sind.

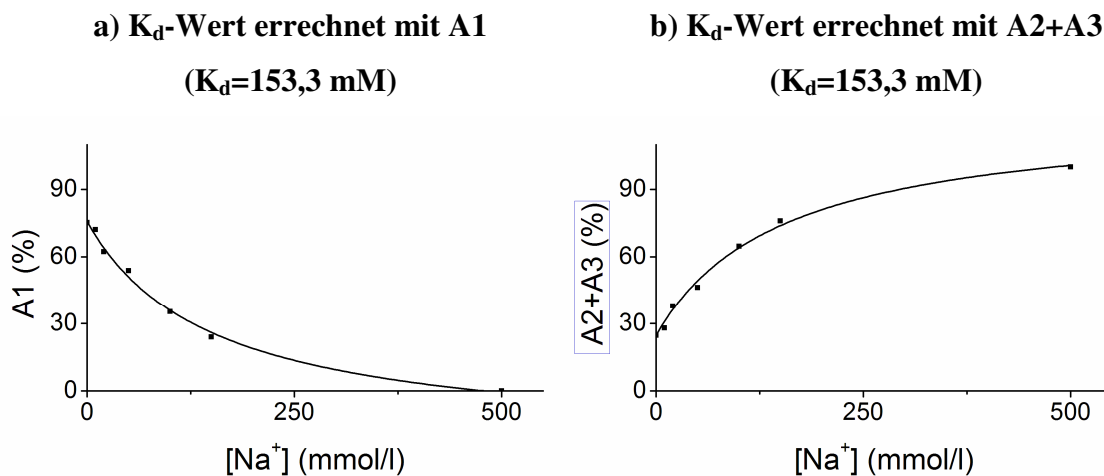


Abbildung 3-42 **Abhängigkeit der Amplituden A1 und A2+A3 von der Natriumkonzentration.** Die Kaliumkonzentration wurde so angepasst, dass die Kationengesamtkonzentration 145mM betrug ($[Na^+] + [K^+] = 145mM$; BSA=5%; pH=7,4; HEPES=10mM).

4 Diskussion

4.1 Fluoreszenzintensitätsänderung des Indikators Sodium Green

4.1.1 *Fluoreszenzintensitätsänderung des Indikators Sodium Green in Abhängigkeit von der Natrium- und Kaliumkonzentration*

Die Fluoreszenzintensität des Indikators Sodium Green nimmt für steigende Natriumkonzentrationen zu. Wie die in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Messungen zeigen, bewirkt ein Konzentrationsprung von 0 mM auf 100 mM Natrium einen Anstieg der Fluoreszenzintensität um das 5,8-fache. Das Maximum des Fluoreszenzemissionsspektrums verlagert sich dabei nicht. Ratiometrische Messungen mit Sodium Green sind deshalb nicht möglich. Diese Eigenschaften sind konsistent mit der Annahme, dass Sodium Green ein PET Sensor ist (vgl. Abschnitt 1.4.1).

Wird Sodium Green im Wellenlängenbereich zwischen 450 nm und 520 nm angeregt, so findet ein Elektronenübertritt vom höchsten besetzten Molekülorbital (HOMO) in das niedrigste unbesetzte Molekülorbital (LUMO) des Fluoreszeinfluorophors statt. Ein Elektronentransfer (PET) vom HOMO des Ionophors zum HOMO des Fluorophors führt in der Folge zur Löschung des Fluoreszenzsignals, da das Elektron nicht mehr vom angeregten Zustand (LUMO-Fluorophor) in den Grundzustand (HOMO-Fluorophor) relaxieren– und seine Energie in Form von Fluoreszenzlicht abgeben kann. Bindet nun Natrium an die Diaza-15-Kronen-5-Ether-Ringstruktur des Indikators Sodium Green, so wird das freie Elektronenpaar des Stickstoffs zum Natrium koordiniert. Dies verringert die Elektronendichte am Stickstoff. Dadurch sinkt das Energieniveau des höchsten besetzten Orbitals (HOMO) des Ionophors unter das Energieniveau des im Grundzustand höchsten besetzten Orbitals (HOMO) des Fluorophors, so dass ein Elektronentransfer (PET) in diesem Fall nicht mehr möglich ist. Das angeregte Elektron des Fluorophors kann somit unter Aussendung von Fluoreszenzlicht auf das Grundniveau zurückkehren. Dies führt zur Zunahme der Fluoreszenzintensität.

Möglicherweise spielt für die Fluoreszenzintensitätsänderung von Sodium Green die Fluoreszenzlöschung zwischen den Fluorophoren ebenfalls eine wichtige Rolle. Ein solcher Befund wurde von Bourson et al. bereits für eine analoge Struktur beschrieben (Bourson et al. 1993). Bei der von Bourson et al. synthetisierten Verbindung handelt es sich um einen Diaza-

16-Kronen-6-ether, an den über die Stickstoffatome zwei Coumarinderivate gekoppelt sind. Die Fluoreszenzintensität dieses Indikators nimmt in Gegenwart steigender Kalzium- und Bariumkonzentrationen zu. Die Autoren beschreiben, dass die Fluoreszenzzunahme dieses Indikators durch eine Konformationsänderung, welche die Fluoreszenzlöschung beider Coumarine verhindert, hervorgerufen wird (Bourson et al. 1993). In Analogie zu dieser Verbindung wäre es also denkbar, dass das Natrium-freie Sodium Green Molekül in einer Konformation vorliegt, die eine gegenseitige Fluoreszenzlöschung („static quenching“) der Fluorophore begünstigt. Bindet Natrium an die Diaza-15-Kronen-5-Ether-Ringstruktur, so ändert sich die Konformation des Sodium Green Moleküls, die eine gegenseitige Fluoreszenzlöschung der Fluorophore verhindert und so zur Zunahme der Fluoreszenzintensität führt. Röntgenstrukturanalysen des Sodium Green Moleküls, die diese Hypothese beweisen könnten, liegen leider bisher noch nicht vor. Es konnte aber in unterschiedlichen Arbeiten gezeigt werden, dass die Natriumbindung an einen Diazakronenether eine Konformationsänderung hervorruft. So konnten Tsukube et al. mittels ¹³C-NMR Spektroskopie sowohl für einen Diaza-16-Kronen-6-Ether als auch für einen Diaza-15-Kronen-5-Ether zeigen, dass die Ionenbindung eine Konformationsänderung des Kronenethers induziert (Tsukube et al. 1991). Auch de Silva et al. konnten durch Röntgenstrukturanalyse zeigen, dass die Natriumbindung eine Konformationsänderung des 15-Kronen-5-Ethers zur Folge hat (deSilva et al. 1996).

4.1.2 Der Einfluss von Kalium auf die natriumabhängige Fluoreszenzintensitätsänderung des Indikators Sodium Green

Die intrazelluläre Kaliumkonzentration übersteigt die Natriumkonzentration um das 10- bis 15-fache. In Abschnitt 3.2.2 und 3.2.3 wurde deshalb untersucht, welchen Einfluss Kalium auf die natriumabhängige Fluoreszenzintensitätsänderung des Indikators Sodium Green hat. Ein Konzentrationssprung von 0 mM auf 100 mM Kalium verursacht einen Anstieg der Fluoreszenzintensität um nur 10% (Abschnitt 3.2.2). Der kaliumabhängige Fluoreszenzanstieg von Sodium Green ist somit deutlich geringer als der durch Natrium hervorgerufene Anstieg der Fluoreszenzintensität, der bei einem Natriumkonzentrationssprung von 0 mM auf 100 mM beim 5,8 fachen liegt (Abschnitt 3.2.1). Misst man die natriumabhängige Änderung der Fluoreszenzintensität von Sodium Green in Gegenwart von Kalium, so steigt der für die Natriumbindung ermittelte K_d -Wert von $K_d=8,7$ mM ($[Na^+]+[TMA^+]=145$ mM) auf

$K_d=22,4 \text{ mM}$ ($[\text{Na}^+]+[\text{K}^+]=145 \text{ mM}$) an. Man kann deshalb schlussfolgern, dass Kalium, das alleine nur eine vernachlässigbar kleine Änderung der Fluoreszenzintensität bewirkt, mit Natrium um die Bindungsstelle am Sodium Green Molekül konkurriert.

4.2 Absorptionseigenschaften des Indikators Sodium Green

In den in Abschnitt 3.3 vorgestellten Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Schulter auf der kurzwelligen Seite des Absorptionsspektrums von Sodium Green in Gegenwart hoher Natriumkonzentrationen verschwindet. Dieses Phänomen kann ebenfalls mit der natriumabhängigen Konformationsänderung erklärt werden. In Abwesenheit von Natrium befinden sich beide Fluorophore in räumlicher Nähe zueinander, so dass die Interaktion der Fluoreszeinmoleküle zur Blauverschiebung des Absorptionsspektrums führt. Einen vergleichbaren Effekt kann man beobachten, wenn Fluoreszein in hochkonzentrierten Lösungen aggregiert (Arbeloa 1981a, Arbeloa 1981b).

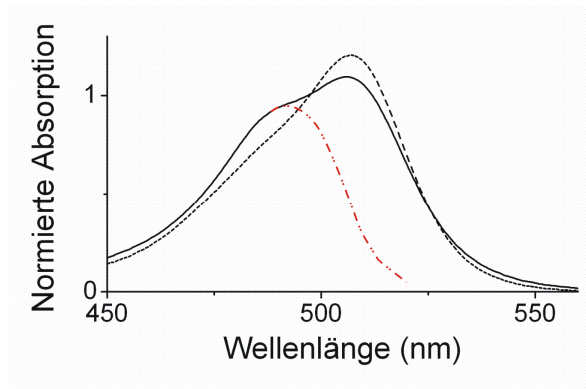


Abbildung 4-1 Absorptionsspektrum des Indikators Sodium Green in Abwesenheit (durchgezogene Linie) und Anwesenheit von 100 mM Natrium (gestrichelte Linie). Die rote Strich-Punkt Linie zeigt schematisch angedeutet das Spektrum des Fluoreszein Dimers (Arbeloa 1981a, Arbeloa 1981b).

So beobachteten Arbeloa et al., daß sich bereits ab einer Konzentration von 0,02 mol/l das Fluoreszenzabsorptionsspektrum von Fluoreszein zu kürzeren Wellenlängen hin verschiebt (Arbeloa 1981a, Arbeloa 1981b). Mit steigenden Konzentrationen nimmt dabei die Absorption bei 460 nm in Relation zur Absorption bei 491 nm zu. Dieses Phänomen erklären die Autoren mit der Aggregation des Fluoreszein Di-Anions. Speiser et al. zeigten ebenfalls, dass Fluoreszein aggregiert und dabei die Absorption bei 460 nm zunimmt (Speiser und

Chisena 1988). Die Ergebnisse von Arbeola et al. und Speiser et al. unterstützen die sehr wahrscheinliche Annahme, dass die Interaktion der Fluoreszein-Fluorophore für die natriumabhängige Fluoreszenzänderung von Sodium Green eine wichtige Rolle spielen.

4.3 Natriumabhängige Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators Sodium Green

Wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, steigt die Fluoreszenzintensität des Indikators Sodium Green in Abhängigkeit von der Natriumkonzentration. Ratiometrische Natriummessungen mit Sodium Green sind deshalb leider nicht möglich. Für Messungen in der Zelle lässt sich die intrazelluläre Konzentration des Farbstoffes nur schlecht steuern oder bestimmen. Schwankungen der Indikatorkonzentration oder der Anregungsintensität können Natriummessungen, die auf der Intensitätsänderung des Indikators beruhen, somit stark verfälschen. Eine alternative Möglichkeit, Natrium unabhängig von diesen Fehlerquellen zu messen, ergibt sich über die natriumabhängige Änderung der Fluoreszenzlebensdauer von Sodium Green. Die Fluoreszenzlebensdauer ist eine Stoffkonstante und deshalb unabhängig von der Indikatorkonzentration. In den in Abschnitt 3.5 beschriebenen Experimenten wurde deshalb untersucht, ob sich die natriumabhängige Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators Sodium Green für Natriummessungen eignet.

4.3.1 Natriumabhängige Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators Sodium Green

Ausgangspunkt für die Fluoreszenzlebensdauermessungen von Sodium Green war die Erwartung, daß sich in Gegenwart von Natrium ein biexponentieller Abfall der Fluoreszenz von Sodium Green beobachten lassen sollte, wobei sich der Natrium-gebundenen Form des Indikators eine langsame Fluoreszenzlebensdauer τ_1 und der Natrium-freien Form eine kürzere, im Idealfall hiervon stark abweichende, Lebensdauer τ_2 zuordnen ließe. Über die relativen Amplituden könnte man so den Beitrag der Einzelkomponenten zum Gesamtfluoreszenzabfall bestimmen und daraus bei bekanntem K_d -Wert die Natriumkonzentration errechnen.

In den Messungen aus Abschnitt 3.5 konnte jedoch gezeigt werden, dass der Fluoreszenzabfall von Sodium Green nur durch ein dreisexponentielles Modell hinreichend gut beschrieben wird. Hierfür konnten mithilfe der globalen Auswertung drei voneinander

unabhängige Relaxationszeiten ($\tau_1=0,13$ ns, $\tau_2=0,54$ ns und $\tau_3=2,80$ ns) ermittelt werden. In Kalium-freier Lösung nimmt die Amplitude der kurzen Lebensdauer τ_1 für steigende Natriumkonzentrationen zu, die Amplitude der langen Lebensdauer τ_3 nimmt hingegen ab. Die Amplitude der mittleren Lebensdauer τ_2 wird von der Natriumbindung nicht beeinflusst und bleibt annähernd konstant. Diese Ergebnisse befinden sich in Übereinstimmung mit den Daten anderer Autoren (Szmacinski und Lakowicz 1997, Despa et al. 2000c).

Da für steigende Natriumkonzentrationen die lange Komponente grösser und die kurze Komponente kleiner wird, kann die kurze Lebensdauer der natriumfreien Form und die lange Lebensdauer der natriumgebundenen Form des Indikators Sodium Green zugeordnet werden. Wie bereits beschrieben, so führt im Natrium-freien Sodium Green Molekül ein photoinduzierter Elektronentransfermechanismus (PET) vom HOMO des Ionophors zum HOMO des Fluorophors zur Löschung der Fluoreszenz. Dieser Zustand ist wahrscheinlich für die kurze Fluoreszenzlebensdauerkomponente ($\tau_1=0,13$ ns) des Sodium Green Moleküls verantwortlich. Bindet Natrium an den Kronenether des Sodium Green Moleküls, so wird der Elektronentransfer unterbunden. In der Folge steigt die Fluoreszenzintensität und gleichfalls die Fluoreszenzlebensdauer. Die Natrium-gebundene Form des Indikators wird somit durch die lange Lebensdauerkomponente ($\tau_3=2,80$ ns) repräsentiert. Wird der PET-Mechanismus durch die Natriumbindung an den Kronenether unterbunden, so ist die Fluoreszenzlebensdauer von Sodium Green vergleichbar mit der Fluoreszenzlebensdauer von Fluoreszein- oder der Lebensdauer anderer Indikatoren, die das gleiche Fluorophor wie Sodium Green besitzen (Hirshfield et al. 1993).

Wie bereits erwähnt, so ist die Amplitude der mittleren Lebensdauerkomponente von Sodium Green ($\tau_2=0,54$ ns) unabhängig von der Natriumkonzentration. Diese Lebensdauer ist wahrscheinlich auf einen Energieübertrag der Fluorophore untereinander zurückzuführen, wobei ein Fluorophor als Donor und das andere Fluorophor als Akzeptor fungiert. Die Lebensdauer des Donor-Fluorophors wird nur durch das Ausmaß des Energieübertrages zum Akzeptor bestimmt und ist somit unabhängig von der Natriumkonzentration. Die mittlere Lebensdauer kann deshalb auf einen Energieübertrag der Fluorophore untereinander zurückgeführt werden. Die Komponenten A1 und A3 hingegen werden nur durch das Akzeptorfluorophor bestimmt, das direkt oder indirekt über das Donorfluorophor angeregt werden kann.

4.3.2 *Der Einfluss von Kalium auf die natriumabhängige Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators Sodium Green*

Wie bei den Intensitätsmessungen ruft Kalium im Vergleich zu Natrium eine vernachlässigbar kleine Änderung der Fluoreszenzlebensdauer hervor (Abschnitt 3.5.2), so dass man schlussfolgern kann, dass die in Gegenwart von Natrium und Kalium ($[\text{Na}^+] + [\text{K}^+] = 145 \text{ mM}$) detektierte Fluoreszenzlebensdaueränderung hauptsächlich auf den Einfluss von Natrium zurückzuführen ist. (Abschnitt 3.5.3).

Sowohl in Gegenwart von Kalium ($\tau_1 = 0,20 \text{ ns}$, $\tau_2 = 0,41 \text{ ns}$, $\tau_3 = 2,08 \text{ ns}$) als auch in Gegenwart von Natrium und Kalium ($\tau_1 = 0,07 \text{ ns}$, $\tau_2 = 0,51 \text{ ns}$ und $\tau_3 = 2,63 \text{ ns}$) wurden für den Fluoreszenzabfall von Sodium Green drei voneinander unabhängige Lebensdauern ermittelt. Diese Relaxationszeiten sind geringfügig kürzer, als die Lebensdauern, die in Kalium-freier Lösung gemessen wurden. Im Unterschied zu den Messungen in Abwesenheit von Kalium bleibt die Amplitude (A2) der mittleren Lebensdauer nicht konstant. Sie nimmt für größer werdende Natriumkonzentrationen ab. Es ist möglich, dem Modell diesen Zwang (A2 = konstant) während der Anpassung vorzugeben, ohne dass sich dabei die Qualität der Anpassung deutlich verringert. Die Beobachtung, dass A2 nicht konstant ist, könnte somit auch auf die Anpassung von Gleichung 3-6 an die Daten zurückzuführen sein und sollte nicht überinterpretiert werden.

Errechnet man einen K_d -Wert für die Natriumbindung mithilfe der Amplitude der kurzen beziehungsweise der langen Lebensdauer, so steigt dieser von $K_d(A1) = 10,1 \text{ mM}$ und $K_d(A3) = 14,8 \text{ mM}$ in Abwesenheit von Kalium auf $K_d(A1) = 31,4 \text{ mM}$ und $K_d(A3) = 20,2 \text{ mM}$ in Gegenwart von Kalium. Wie für die Intensitätsmessungen lässt sich hieraus schlussfolgern, dass Natrium mit Kalium um die Bindungsstelle am Kronenether des Sodium Green Moleküls konkurriert, jedoch eine nur sehr geringe Änderung der Fluoreszenzlebensdauer hervorruft.

4.3.3 *Abhängigkeit der Sodium Green- Fluoreszenzlebensdauer von der Indikatorkonzentration selbst*

Die Ergebnisse aus Abschnitt 0 zeigen, dass sich die Fluoreszenzlebensdauer des Indikators Sodium Green auch in Abhängigkeit von der Indikatorkonzentration ändert. Die globale Auswertung dieser Messreihe ergab, dass die Amplitude der kurzen Lebensdauer für steigende Indikatorkonzentrationen zunimmt und die Amplitude der langen Form fällt. Diese Beobachtung kann damit erklärt werden, dass die Sodium Green Moleküle in hoch

konzentrierten Indikatorlösungen aggregieren und die Fluoreszein-Fluorophore deshalb miteinander interagieren können. Dies hat zur Folge, dass sich die Fluoreszenzlebensdauer verkürzt. Die intermolekulare Interaktion der Fluoreszein-Fluorophore übt somit den entgegengesetzten Effekt auf die Fluoreszenzlebensdauer aus, den eine Natriumbindung an das Sodium Green-Molekül hervorrufen würde. Der Mechanismus, der im Natrium-freien Sodium Green Molekül zur Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer führt, ist wahrscheinlich ebenfalls für die Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer von Sodium Green in hochkonzentrierten Indikator-Lösungen ($SG > 1\text{mM}$) verantwortlich. Ein vergleichbares Phänomen konnte für Fluoreszein bereits gezeigt werden; so wird der monoexponentielle Fluoreszenzabfall von Fluoreszein biexponentiell, wenn sich Fluoreszeinmoleküle in enger Nachbarschaft zueinander befinden (Imhof et al. 1999). Die in diesem Fall zusätzlich zu beobachtende Fluoreszenzlebensdauerkomponente ist in den Experimenten von Imhof et al. mit 1,1 ns ebenfalls deutlich kürzer als die Fluoreszenzlebensdauer von Fluoreszein mit 3,9 ns.

Bis zu einer Indikatorkonzentration von 1mM ist jedoch die Fluoreszenzlebensdauer des Sodium Greens unabhängig von der Indikatorkonzentration (Abschnitt 0). Erst ab einer Konzentration über 1mM weicht die Fluoreszenzlebensdauerkurve von denen bei geringeren Indikatorkonzentrationen ab. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Fluoreszenzlebensdauer basierte Natriummessungen mit Sodium Green unabhängig von der Indikatorkonzentration prinzipiell möglich sind, da in der Praxis solch hohe Sodium Green Konzentrationen nicht verwendet werden. Abgesehen davon sollte bei jeder Messung die Konzentration des Indikators deutlich unter der Konzentration des Analyts liegen, da der Indikator durch die Bindung des Analyts wie ein Puffer wirkt und allein dadurch das Messergebnis verfälscht.

4.4 Interaktion des Indikators Sodium Green mit Proteinen

4.4.1 Natriumabhängige Fluoreszenzintensitätsänderung des Indikators Sodium Green in Gegenwart von BSA

Proteine können mit dem Indikator Sodium Green interagieren und seine Fluoreszenz beeinflussen. Deshalb wurde in den Experimenten aus Abschnitt 3.2.5 (Intensitätsmessungen)- und Abschnitt 3.5.4 (Fluoreszenzlebensdauer-messungen) der Einfluss von Proteinen auf die Fluoreszenzeigenschaften des Indikators Sodium Green untersucht. Die Intensität des Indikators Sodium Green steigt in Gegenwart von 5% BSA w/v um den Faktor

2,7 (Abschnitt 3.2.5). Für den Fluoreszenzindikator Newport Green, der wie Sodium Green ein Fluoreszeinderivat als Fluorophor besitzt, wurde ebenfalls beschrieben, dass die Fluoreszenzintensität in Gegenwart von Proteinen um den Faktor 3 ansteigt (Sumner et al. 2002). Dieser Befund ist wahrscheinlich auf die Interaktion der Fluorophore mit den Proteinen zurückzuführen.

Schoutteten et al. konnten für den Kalziumindikator Calcium Green1 (gleiches Fluorophor wie Sodium Green) mithilfe von Anisotropieexperimenten nachweisen, dass sich die Rotationsgeschwindigkeit der Calcium Green Moleküle in Gegenwart von Proteinen stark verringert (Schoutteten et al. 1999). Diese Befunde lassen sich dadurch erklären, daß die Fluorophore dieser Indikatoren an Proteine binden und daß die Rotationsgeschwindigkeit des deutlich größeren Farbstoff-Protein Komplex langsamer ist als die eines freien, ungebundenen Farbstoffmoleküls. In einem ähnlichen Experiment wiesen Laurence et al. nach, dass Fluoreszein an BSA bindet (Laurence 1952, Meisingset und Steen 1981, Benes 1983). Diese Ergebnisse zeigen, dass Farbstoffe, die ein Fluoreszein Grundgerüst haben, an Proteine binden und dadurch in ihren Fluoreszenzeigenschaften verändert werden können.

Auch für Fluoreszenzindikatoren mit anderen Fluorophoren konnte gezeigt werden, dass Farbstoffmoleküle und Proteine miteinander interagieren und so zur Verfälschung des Meßergebnisses führen können. So steigt die Fluoreszenzintensität von Fura2 (Benzofuranring) in Gegenwart von Proteinen maximal um den Faktor 1,8 an (Konishi et al. 1988). Dass die Fura2 Moleküle an Proteine binden, konnte ebenfalls mithilfe von Anisotropieexperimenten bestätigt werden.

Weiterhin läßt sich bei Sodium Green in Anwesenheit von BSA eine Rotverschiebung des Fluoreszenzemissionsmaximums um 14 nm beobachten. Eine gleichgerichtete Verschiebung um bis zu 10nm tritt auch bei der Interaktion von Fluoreszein mit intrazellulären Proteinen auf (Laurence 1952, Meisingset und Steen 1981, Benes 1983) und läßt sich ebenfalls im Emissionsspektrum des strukturähnlichen pH-Indikators BCECF nachweisen (Plasek 1996).

Ferner konnten Konishi et al. für den Kalziumindikator Fura2 zeigen, dass die Ionenstärke ein wesentlicher Faktor für die Protein-Farbstoffbindung ist (Konishi et al. 1988). Für hohe Ionenstärken konnte sowohl durch Anisotropieexperimente als auch durch Fluoreszenzintensitätsmessungen nachgewiesen werden, dass der Anteil der an Protein gebundenen Fura2 Moleküle abnimmt. Für die Experimente dieser Arbeit wurde die Ionenstärke durch Zugabe von Kalium ($[Na^+]+[K^+]=145mM$) oder Tetramethylammoniumchlorid ($[Na^+]+[TMA^+]=145mM$) konstant gehalten. Eine Änderung der

Ionenstärke kann deswegen keinen Einfluss auf die Intensitätsmessungen in Gegenwart von BSA gehabt haben.

Der K_d -Wert von Sodium Green für die Natriumbindung steigt nur geringfügig von $K_d=22,4\text{mM}$ in Abwesenheit von BSA ($[\text{Na}^+]+[\text{K}^+]=145\text{mM}$) auf $26,8\text{ mM}$ in Anwesenheit von 5% BSA. BSA beeinflusst also nicht die Natriumbindung. Die Wechselwirkung mit dem Fluorophor scheint direkter Natur zu sein.

4.4.2 Einfluss von BSA auf die Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators Sodium Green

Auch in Gegenwart von 5% BSA w/v konnten die Fluoreszenzabklingkurven von Sodium Green nur mit Hilfe eines dreixponentiellen Modells angepasst werden ($\tau_1=0,14\text{ns}$, $\tau_2=0,67\text{ns}$, $\tau_3=3,11\text{ns}$). Die Fluoreszenzlebensdauern von Sodium Green sind in Gegenwart von BSA geringfügig länger als in Abwesenheit von BSA. Ein Anstieg der durchschnittlichen Fluoreszenzlebensdauern in Gegenwart von BSA konnte ebenfalls für die Indikatoren Fura2, Quin2 und SBFI nachgewiesen werden (Konishi et al. 1988, Keating und Wensel 1991, Hirshfield et al. 1996, Arner et al. 1998, Despa et al. 2000b). Lebensdauermessungen des Natriumindikators SBFI zeigten, daß der Fluoreszenzabfall in Abwesenheit von BSA durch ein biexponentielles Modell angepaßt werden kann. Das Modell mußte aber um eine Komponente erweitert werden, um den Fluoreszenzabfall in Gegenwart von Proteinen zu beschreiben (Despa et al. 2000a). Die neu hinzukommende Komponente ordnen die Autoren einem BSA-Protein Komplex zu. Es ist zu vermuten, daß auch durch die Interaktion von Sodium Green mit Proteinen eine weitere Lebensdauerkomponente entsteht, die sich mit dem dreixponentiellen Fluoreszenzabfall in Abwesenheit von BSA überlagert. Die Daten lassen jedoch keine Unterscheidung zwischen einem drei- und einem vierexponentiellen Modell zu.

4.4.3 Vergleich der Fluoreszenzintensitäts- und der Fluoreszenzlebensdauermessungen mit Sodium Green

Die natriumabhängige Fluoreszenzlebensdaueränderung ist in Gegenwart von BSA deutlich geringer als in Abwesenheit von BSA (Abschnitt 3.5.4). Fluoreszenzlebensdauer-basierte Natriummessungen mit dem Indikator Sodium Green in proteinreichen Lösungen sind deshalb nur schwierig möglich. Im Unterschied dazu sind Natriummessungen, die auf der Änderung

der Fluoreszenzintensität beruhen, auch in Gegenwart von Proteinen sehr gut durchführbar (Abschnitt 3.2.5). Die Fluoreszenzintensität steigt für einen Konzentrationssprung von 0 mM auf 100 mM Natrium in Gegenwart von BSA um den Faktor 4,5, wobei die Fluoreszenzintensität in Abwesenheit von BSA um den Faktor 5,8 zunimmt. Die Tatsache, dass sich die Fluoreszenzintensität, nicht jedoch die Fluoreszenzlebensdauer in Gegenwart von Proteinen natriumabhängig ändert, spricht dafür, dass zwei unterschiedliche Mechanismen an der Änderung der Fluoreszenzeigenschaften beteiligt sein müssen. Einen Teil der Fluoreszenzintensitätsänderung sowie die Änderung der Fluoreszenzlebensdauer wird durch den bereits beschriebenen PET-Mechanismus hervorgerufen. Der andere Teil Fluoreszenzintensitätsänderung lässt sich mit der gegenseitigen Fluoreszenzlöschung („static quenching“) der Fluoreszein-Fluorophore untereinander erklären. So wird im Natrium-freien Indikator möglicherweise eine Konformation begünstigt, die eine gegenseitige Fluoreszenzlöschung der Fluorophore ermöglicht. Alle Sodium Green Moleküle, bei denen es zur gegenseitigen Fluoreszenzlöschung der Fluorophore kommt, fluoreszieren nicht, so dass man keine Fluoreszenzlebensdauer dieses Zustandes messen kann. Der Anteil der Fluoreszenzintensitätsänderung, der auf diese gegenseitige Fluoreszenzlöschung der Fluorophore zurückzuführen ist, findet auch in Gegenwart von Proteinen statt. Der Anteil der Fluoreszenzintensitätsänderung, der hingegen durch den PET-Mechanismus vermittelt wird, wird durch Interaktion des Indikators mit Proteinen unterbunden, was erklärt warum zwar natriumabhängige Unterschiede in der Fluoreszenzintensität, nicht aber in der Fluoreszenzlebensdauer in Gegenwart von Proteinen detektierbar sind.

4.5 Natriumabhängige Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators CoroNa Green

CoroNa Green ist ein weiterer Natriumindikator, der im sichtbaren Wellenlängenbereich (492nm) angeregt werden kann. Die Fluoreszenzlebensdauer dieses Natriumindikators ändert sich deutlich in Abhängigkeit von der Natriumkonzentration, so dass sich die Fluoreszenzlebensdauer sehr gut als Signalparameter für Natriummessungen eignet (Abschnitt 3.6). Wie bei Sodium Green nimmt die Fluoreszenzintensität des Indikators CoroNa Green zu, wenn die Natriumkonzentration steigt, ohne dass sich das Maximum der Fluoreszenzintensität verlagert (Meier et al. 2006). Diese Befunde lassen sich ebenfalls durch einen PET-Mechanismus erklären. Aber auch eine direkte Interaktion des Natriumions mit dem Fluorophor ist aufgrund der Nähe des Fluorophors zum Ionophor möglich.

CoroNa Green ist ein Indikator, der nur ein Fluorophor besitzt. Ein intramolekularer Energieübertrag von einem auf das andere Fluorophor ist somit nicht möglich. Der Ausgangspunkt für die Fluoreszenzlebensdauer-messungen von CoroNa Green war deshalb die Erwartung, daß sich im Unterschied zu Natrium Green in Gegenwart von Natrium ein biexponentieller Abfall der Fluoreszenz von CoroNa Green beobachten lassen sollte. Die globale Auswertung der Fluoreszenzlebensdauer-messungen ergab jedoch, dass für die Beschreibung des Fluoreszenzabfalls von CoroNa Green ebenfalls eine dreielementige Funktion nötig ist. Die hierbei ermittelten Lebensdauern sind mit $\tau_1=0,06$ ns; $\tau_2=0,29$ ns und $\tau_3=0,85$ ns sehr kurz. Dies macht Fluoreszenzlebensdauer-basierte Natriummessungen mit CoroNa Green technisch schwierig.

Die Amplitude der sehr kurzen Lebensdauer A1 fällt in Abhängigkeit steigender Natriumkonzentrationen; A2 und A3 die Amplituden der mittleren- und langen Lebensdauer steigen hingegen. Somit lässt sich A1 der Natrium-freien Form- und A2 beziehungsweise A3 der Natrium-gebundenen Form des Indikators zuordnen. Im Unterschied zu Natrium Green ist sowohl A2 als auch A3 von der Natriumkonzentration abhängig; zudem sind beide Amplituden proportional zueinander. Dieser Befund lässt sich so interpretieren, dass die Natrium-gebundene Form von CoroNa Green in zwei Zuständen vorliegt, die durch A2 beziehungsweise A3 repräsentiert werden.

4.6 Der Einfluss von BSA auf den Indikator CoroNa Green

4.6.1 Einfluss von BSA auf die Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators CoroNa Green

In Gegenwart von BSA verschiebt sich das Fluoreszenzemissionsspektrum von CoroNa Green um 13 nm in den roten Wellenlängenbereich. Da auch CoroNa Green wie Natrium Green ein Fluoreszeinderivat als Fluorophor besitzt, liegt es nahe, dass die Verschiebung des Emissionsmaximums ebenfalls auf die Interaktion des Fluorophors mit BSA zurückzuführen ist.

Im Unterschied zu Natrium Green ändert sich die Fluoreszenzlebensdauer in Abhängigkeit von Natrium auch in Gegenwart von BSA deutlich. Ein grosser Vorteil der Fluoreszenzlebensdauer-basierten Natriummessungen mit CoroNa Green ist, dass diese auch in proteinreicher Umgebung möglich sind.

4.7 Natrium Green in Polyacrylamid Nanosensoren

4.7.1 *Der Einschluss des Indikators Sodium Green in Polyacrylamid Nanopartikeln verhindert die Interaktion mit Proteinen*

In den vorangegangenen Abschnitten wurde dargestellt, dass Proteine das Ergebnis einer Natriumkonzentrationsbestimmung mit Sodium Green verfälschen und im Falle der Fluoreszenzlebensdauer-messungen gar unmöglich machen können. In Abschnitt 3.4 wurde eine Möglichkeit vorgestellt, den Indikator Sodium Green vor dem Einfluss der Proteine zu schützen. Hierfür wurden Polyacrylamid-Nanosensoren synthetisiert, die Sodium Green enthielten. Durch Einschluss von Sodium Green in Polyacrylamidpartikel ist es möglich, den Einfluss der Proteine auf den Indikator erfolgreich auszuschalten. Die Funktionsweise der Polyacrylamid Nanosensoren basiert darauf, dass große Proteine aufgrund ihrer Größe nicht in die Polymermatrix eindringen können, während die wesentlich kleineren Natriumionen ungehindert durch die Acrylamidmatrix zum Indikator diffundieren und dort eine Signaländerung induzieren können. Dies allein ist ein wesentlicher Vorteil der Sodium Green-Nanosensoren gegenüber dem ungeschützten Indikator Sodium Green, da nur so unverfälschte Natriummessungen in einer proteinreichen Umgebung wie dem Zytosol einer Zelle möglich sind. Andere Autoren konnten in ähnlichen Experimenten ebenfalls zeigen, dass durch Einschluss des Zinkindikators Newport Green oder des Kalzium Indikators Calcium Green2 in Polyacrylamid-Partikel Ionenmessungen unabhängig von der umgebenden Proteinkonzentration möglich sind (Clark et al. 1999c, Sumner et al. 2002, Sumner und Kopelman 2005).

4.7.2 *Natriummessungen mithilfe von Sodium Green Nanosensoren*

Für einen Konzentrationssprung von 0 mM auf 100 mM Natrium steigt die Fluoreszenzintensität der Sodium Green Acrylamid Nanosensoren um den Faktor 2,1 ($[\text{Na}^+] + [\text{TMA}^+] = 145 \text{ mM}$) beziehungsweise um den Faktor 1,9 ($[\text{Na}^+] + [\text{K}^+] = 145 \text{ mM}$). Ist Sodium Green nicht in eine Acrylamidmatrix eingebettet, so vervielfacht sich die Fluoreszenzintensität für den Konzentrationssprung von 0 mM auf 100 mM um den Faktor Faktor 5,8. Dies verdeutlicht, dass die natriuminduzierte Signaländerung von Sodium Green in Polyacrylamid Nanosensoren im Vergleich zum freien Indikator stark abnimmt. Eine

wahrscheinliche Erklärung hierfür ist, dass die natriumabhängige Konformationsänderung des Sodium Green Moleküls innerhalb der Polymermatrix behindert ist. Die Dynamik der Kalziumindikatoren Orange Green, Calcium Green und Calcium Green 5N, sowie der pH-Indikatoren CNF, CDMF, BCPCF und SNAFL werden ebenfalls durch die Einbettung der Indikatoren in eine Polyacrylamidmatrix reduziert (Clark et al. 1999c). Auch die Fluoreszenzintensitätsänderung des Zinkindikators Newport Green, der ebenfalls ein Fluoreszein-Fluorophore enthält, sinkt deutlich, wenn der Indikator in Acrylamidpartikeln eingebettet wird (Sumner et al. 2002).

Der K_d -Wert des in Polyacrylamid Nanosensoren eingeschlossenen Indikators Sodium Green steigt von $K_d=5,8\text{mM}$ (ungeschützter Indikator) auf $K_d=40,6\text{mM}$ (Sodium Green Nanosensoren) (Tabelle 4-1). In Gegenwart von Natrium und Kalium ($[\text{Na}^+]+[\text{K}^+]=145\text{mM}$) steigt der K_d -Wert von $K_d=22,4\text{mM}$ (ungeschützter Indikator) auf $K_d=46,1\text{mM}$ (Sodium Green Nanosensoren). Ein vergleichbares Phänomen beschreiben Clark et al. für die pH Indikatoren CNF, CDMF, BCPCF und SNAFL und die Kalziumindikatoren Orange Green, Calcium Green und Calcium Green 5N. Der Anstieg der ionenabhängigen Fluoreszenzintensitätsänderung dieser Indikatoren nimmt in einer Polyacrylamidmatrix ab (Clark et al. 1999c).

	Freies SG		SG-Nanosensoren		SG/TR - Nanosensoren	
	K_d (mM)	$\frac{F_{100mM}}{F_{min}}$	K_d (mM)	$\frac{F_{100mM}}{F_{min}}$	K_d (mM)	$\frac{F_{100mM}}{F_{min}}$
$[\text{Na}^+]+[\text{TMA}]=145\text{mM}$	8,7	5,8	40,6	2,1	42,8	2,0
$[\text{Na}^+]+[\text{K}^+]=145\text{mM}$	22,4	4,6	46,1	1,9	48,7	1,9
$[\text{Na}^+]+[\text{K}^+]=145\text{mM}$ $[\text{BSA}] = 5\% \text{ (w/v)}$	26,1	3,4				

Tabelle 4-1 Zusammenfassende Tabelle der K_d -Werte und maximalen natriumabhängigen Fluoreszenzsteigerungen

4.7.3 Ratiometrische Polyacrylamid Nanosensoren mit Sodium Green und Texas Red

Natriummessungen mit dem nicht ratiometrischen Indikator Sodium Green, bei denen die Indikatorkonzentration nicht konstant ist, können wie bereits beschrieben sehr fehlerbehaftet

sein (Abschnitt 1.5.3 a). Um ratiometrische Messungen zu ermöglichen, lässt sich in die Nanosensoren neben dem Indikatorfarbstoff ein Referenzfarbstoff einbringen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Nanosensoren synthetisiert und untersucht, die neben dem natriumsensitiven Indikator Sodium Green den Referenzfarbstoff Texas Red enthielten. Beide Fluoreszenzfarbstoffe können sehr einfach mit der 488 nm Linie eines Argon-Lasers und der 543 nm Linie eines Helium-Neon Lasers, die in den meisten Fluoreszenz Laserscanning Mikroskopen enthalten sind, angeregt werden. Wie in den oben diskutierten Sodium-Green Nanosensoren, zeigte Sodium Green in den ratiometrischen Nanosensoren eine ähnliche Fluoreszenzänderung in Abhängigkeit von der Natriumkonzentration (Abschnitt 3.4.4). Der Kd-Wert für die Natriumbindung in Gegenwart von Kalium lag hier bei 48,7 mM (Tabelle 4-1). Die Fluoreszenzintensität von Texas Red war unabhängig von der Natriumkonzentration und kann deswegen als ein Maß für die Nanosensorkonzentration verwendet werden. Indem man das natriumabhängige Sodium Green Signal mithilfe des natriumunabhängigen Texas Red Signals korrigiert, ergibt sich eine Größe, die von der Indikatorkonzentration, Inhomogenitäten des Beleuchtungsfeldes oder eines Drifts der Fokusebene unabhängig ist. Letzteres wird durch den in Abbildung 3-20 wiedergegebenen Versuch demonstriert (vgl. hierzu auch Abschnitt 4.8.2 weiter unten)

4.8 Ist der Indikator Sodium Green geeignet für Natriummessungen in der Zelle?

4.8.1 Natriummessungen mit Sodium Green in der Zelle

Es wurden unterschiedliche Ansätze untersucht, mithilfe von Sodium Green Natriumkonzentrationen in der Zelle zu messen. Hierfür wurden CHO-Zellen mit Sodium Green-Tetraacetat beladen und anschliessend in Gegenwart der Porenbildner Gramacidin, Nigericin und Monensin mit Lösungen unterschiedlicher Natriumkonzentrationen umspült. Die Fluoreszenzintensität des Indikators Sodium Green zeigt auch in der Zelle eine signifikante Abhängigkeit von der Natriumkonzentration. Deshalb kann dieser natriumsensitive Signalparameter für intrazelluläre Natriumkonzentrationsmessungen herangezogen werden. Dennoch sind diese Messungen sehr fehlerbehaftet, da die intrazelluläre Indikatorkonzentration unbekannt und darüber hinaus schwer zu steuern ist. In CHO-Zellen verdoppelt sich die Fluoreszenzintensität von Sodium Green, wenn die Natriumkonzentration

von 0 mM auf 100 mM Natrium steigt. Messfehler fallen aufgrund der geringen natriumabhängigen Änderung der Fluoreszenzintensität sehr ins Gewicht.

In Abschnitt 3.5.5 wurde die Fluoreszenzlebensdauer von Sodium Green in CHO-Zellen bei unterschiedlichen Natriumkonzentrationen gemessen. Für einen Konzentrationssprung von 10 mM Natrium auf 100 mM Natrium konnte keine signifikante Änderung der Fluoreszenzlebensdauer beobachtet werden. Die Fluoreszenzlebensdauer des Indikators Sodium Green eignet sich somit nicht als Signalparameter für intrazelluläre Natriumkonzentrationsmessungen. Auch Despa et al. haben nur eine sehr kleine natriumabhängige Lebensdaueränderung in HeLa Zellen messen können (Despa et al. 2000c).

4.8.2 Natriummessungen mit Sodium Green-Nanosensoren in der Zelle

In Abschnitt 3.4.5 wurden ratiometrische Texas Red - Sodium Green Nanosensoren für Natriumkonzentrationsmessungen in CHO Zellen eingesetzt. Während der Messung verschob sich die Fokusebene des Mikroskops geringfügig, was eine Abnahme der Sodium Green – als auch der Texas Red Fluoreszenz zur Folge hatte. Aufgrund der Fluoreszenzabnahme war die Fluoreszenzintensität bei 10 mM Natrium zu Beginn des Experimentes gleich der Fluoreszenzintensität bei 30 mM Natrium, so dass diese Konzentrationen nicht mithilfe der Fluoreszenzintensität unterschieden werden konnten. Erst nach Korrektur der Sodium Green Fluoreszenz mithilfe der Texas Red Fluoreszenz war es möglich, diese Konzentrationsstufen sicher zu unterscheiden (Abbildung 3-20, Abbildung 3-21). Dieses Beispiel verdeutlicht sehr gut, dass Natriumkonzentrationsmessungen mithilfe der ratiometrischen Sodium Green - Texas Red Nanosensoren, trotz geringer Signaländerung des Indikators, verlässliche Ergebnisse liefern können.

Von den in dieser Arbeit getesteten Methoden zur Bestimmung intrazellulärer Natriumkonzentrationen sind Messungen mithilfe der ratiometrischen Nanosensoren trotz der geringen natriumabhängigen Intensitätsänderung am zuverlässigsten, da mögliche Verfälschungen durch eine Verschiebung der Fokusebene oder Ungleichverteilungen des Indikators hierbei berücksichtigt werden können.

5 Zusammenfassung

Natrium spielt eine außerordentlich wichtige Rolle für die Physiologie der Zelle. Jede Zelle ist bestrebt, den Natriumgradienten zwischen intrazellulärem (4 mM – 15 mM) und extrazellulärem (120 mM – 150 mM) Milieu aufrechtzuerhalten. Dieser Gradient bildet die Voraussetzung für eine Vielzahl essentieller Prozesse der Zelle. Es ist deshalb von grossem Interesse, intrazelluläre Natriumkonzentrationen exakt messen zu können.

Im Prinzip können mithilfe von Fluoreszenzindikatoren intrazelluläre Ionenkonzentrationen verlässlich und für die Zelle schonend bestimmt werden. Für Natrium gibt es allerdings nur wenige kommerziell erhältliche Ionenindikatoren, mit denen man Natrium selektiv messen kann. Sodium Green und CoroNa Green sind zwei der wenigen Fluoreszenzindikatoren für Natriummessungen in der Zelle, die mithilfe eines in konventionellen Laserscanningmikroskopen enthaltenen Argon-Lasers, bei 488 nm angeregt werden können. In dieser Arbeit wurden verschiedene Ansätze verfolgt, mithilfe dieser Indikatoren Natriumkonzentrationen verlässlich zu messen.

a. Die natriumabhängige Fluoreszenzintensitätsänderung des Indikators Sodium Green

Die Fluoreszenzintensität von Sodium Green ändert sich in Abhängigkeit von der Natriumkonzentration. Eine Verlagerung des Fluoreszenzemissionsspektrums ist jedoch nicht zu beobachten. Ratiometrische Messungen sind deshalb nicht möglich. Für die Natriumbindung in Kalium-freier Lösung konnte ein K_d -Wert von 8,4 mM und in Gegenwart von Kalium ($[Na^+] + [K^+] = 145 \text{ mM}$) von 22,4 mM ermittelt werden. Die höchste Sensitivität des Indikators Sodium Green gegenüber Natrium liegt somit im Bereich intrazellulärer Natriumkonzentrationen.

Ein Natriumkonzentrationsanstieg von 0 mM auf 100 mM Natrium verursacht einen Fluoreszenzanstieg von Sodium Green um den Faktor 5,8. Im Unterschied hierzu führt ein vergleichbarer Kaliumkonzentrationsprung von 0 mM auf 100 mM Kalium nur zu einem 1,1-fachen Anstieg der Sodium Green Fluoreszenz. Somit sind prinzipiell auch in Gegenwart hoher Kaliumkonzentrationen verlässliche Natriumkonzentrationsbestimmungen möglich.

b. Die natriumabhängige Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators Sodium Green

Natriummessungen mit dem nichtratiometrischen Natriumindikator Sodium Green, bei denen die Indikatorkonzentration oder die Anregungsintensität nicht konstant sind, sind sehr fehlerbehaftet. Sinkt beispielsweise die Anregungsintensität oder die Indikatorkonzentration, nimmt auch die Fluoreszenzintensität ab. Dies könnte dann fälschlicherweise als Abfall der Natriumkonzentration interpretiert werden.

Bei Fluoreszenzlebensdauermessungen werden diese Fehlerquellen ausgeschaltet. Die Fluoreszenzlebensdauer ist eine Stoffkonstante und deshalb unabhängig von der Indikatorkonzentration und der Anregungsintensität. Auch die Fluoreszenzlebensdauer von Sodium Green zeigt in einer Pufferlösung definierter Zusammensetzung eine deutliche Abhängigkeit von der Natriumkonzentration und eignet sich deshalb als Signalparameter für Natriumkonzentrationsmessungen.

c. Der Einfluss von Proteinen auf die Fluoreszenzeigenschaften von Sodium Green

In Gegenwart von 5% BSA (w/v) nimmt die Fluoreszenzintensität des Indikators Sodium Green um den Faktor 2,7 zu und das Fluoreszenzmaximum von Sodium Green verlagert sich um 14 nm in den roten Wellenlängenbereich. Dies ist auf die Interaktion des Indikators mit Proteinen zurückzuführen. Trotz der verringerten Dynamik ist eine Bestimmung der Natriumkonzentration über Fluoreszenzintensitätsmessungen auch in Gegenwart von Proteinen möglich, sofern die Proteinkonzentration konstant bleibt. Im Unterschied dazu konnte in Gegenwart von Proteinen keine signifikante natriumabhängige Fluoreszenzlebensdaueränderung von Sodium Green beobachtet werden, so dass fluoreszenzlebensdauerbasierte Natriummessungen in proteinreichen Lösungen nicht durchgeführt werden können.

d. Die natriumabhängige Fluoreszenzlebensdaueränderung des Indikators CoroNa Green

CoroNa Green ist ein weiterer natriumsensitiver Fluoreszenzindikator, der im Unterschied zu Sodium Green nur ein Fluoreszenzfluorophor besitzt. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass sich auch die Fluoreszenzlebensdauer des Indikators CoroNa Green in einer Pufferlösung definierter Zusammensetzung in Abhängigkeit von der Natriumkonzentration deutlich ändert. Die für den Fluoreszenzabfall von CoroNa Green ermittelten Lebensdauern sind kleiner als eine Nanosekunde. Fluoreszenzlebensdauerbasierte Natriummessungen mit CoroNa Green sind deshalb technisch schwierig zu realisieren. Ein grosser Vorteil des Indikators CoroNa

Green beteht jedoch darin, dass sich die Fluoreszenzlebensdauer auch in Gegenwart von Proteinen ändert und deshalb als natriumabhängiger Signalparameter in proteinreichen Lösungen genutzt werden kann.

- e. Der Einschluss des Indikators Sodium Green in Acrylamid Nanosensoren verhindert die Interaktion mit Proteinen

Um den Indikator vor der Interaktion mit Proteinen zu schützen, wurden Polyacrylamid-Nanopartikel (20nm) synthetisiert, die den Indikator Sodium Green einschließen. Es konnte gezeigt werden, dass Proteine nicht in die Polymermatrix der Nanopartikel eindringen können, wobei der in Polyacrylamid-Nanopartikel eingebettete Indikator Sodium Green weiterhin empfindlich gegenüber Natrium bleibt. Mit Sodium Green Nanosensoren können somit Natriumkonzentrationen unabhängig von der Verfälschung des Messergebnisses durch Proteine bestimmt werden.

- f. Ratiometrische Acrylamid Nanosensoren mit Sodium Green und Texas Red

Mit dem Indikator Sodium Green sind keine ratiometrischen Messungen möglich. Ein weiterer Ansatz, diesen Nachteil zu umgehen, besteht darin, den natriumsensitiven Indikator Sodium Green und den nicht natriumsensitiven Referenzfarbstoffes Texas Red in Polyacrylamid Nanopartikeln zu kombinieren. In dieser Arbeit werden die Eigenschaften des so gewonnenen ratiometrischen Sensorsystems untersucht.

- g. Natriummessungen in der Zelle

Es wurden verschiedene Möglichkeiten getestet, mithilfe des Indikators Sodium Green Natriumkonzentrationen in der Zelle zu messen. Aufgrund der Interaktion von Soduim Green mit intrazellulären Proteinen können fluorezenzlebensdauerbasierte Natriummessungen in der Zelle nicht durchgeführt werden. Natriummessungen mithilfe der Fluoreszenzintensitätsänderung von Sodium Green sind möglich, können aber bei zeitlichen Schwankungen und räumlichen Inhomogenitäten der intrazellulären Indikator- und Proteinkonzentration fehlerbehaftet sein. Eine Alternative stellen intrazelluläre Natriummessungen mit den ratiometrischen Nanosensoren dar. In dieser Arbeit wird exemplarisch gezeigt, dass eine Verfälschung des Sodium Green Signals durch eine

Verschiebung der Fokusebene mithilfe des Texas Red Signals korrigiert werden kann und dadurch eine verlässliche Bestimmung der Natriumkonzentration möglich ist.

6 Anhang

6.1 Mono- und Multiexponentielle Fluoreszenzabfälle

6.1.1 Fläche unter der Fluoreszenzabklingkurve

Der Fluoreszenzabfall wird durch Gleichung 6-3 beschrieben.

$$I(t) = \sum_{i=1}^n A_i * e^{\frac{-t}{\tau_i}} \quad \text{Gleichung 6-1}$$

Integriert man Gleichung 6-3 so erhält man:

$$\int I(t)dt = \int \sum_{i=1}^n A_i * e^{\frac{-t}{\tau_i}} = \sum_{i=1}^n A_i \tau_i \quad \text{Gleichung 6-2}$$

Die Fläche unter Fluoreszenzabfallskurve ist somit proportional zu $A_i \tau_i$.

6.1.2 Durchschnittliche Lebensdauer im angeregten Zustand

Betrachtet man die Lebensdauer als die durchschnittliche Zeit, die ein Fluorophor im angeregten Zustand verbringt, so ist sie für eine große Anzahl an Fluorophoren und geringe Zeitunterschiede ihrer Lebensdauern gegeben durch:

$$\langle t \rangle = \frac{\int_0^{\infty} tN(t)dt}{\int_0^{\infty} N(t)dt} = \frac{\int_0^{\infty} te^{-t/\tau} dt}{\int_0^{\infty} e^{-t/\tau} dt} = \frac{\tau\tau}{\tau} = \tau \quad \text{Gleichung 6-3}$$

Deshalb gilt für den monoexponentiellen Abfall, dass die durchschnittliche Zeit $\langle t \rangle$, die ein Fluorophor im angeregten Zustand bleibt, gleich der Lebensdauer τ ist.

6.1.3 Durchschnittliche Lebensdauer bei multiexponentiellen Fluoreszenzabfällen

Die Lebensdauer ist die durchschnittliche Zeit, die ein Fluorophor im angeregten Zustand verbleibt. Die durchschnittliche Lebensdauer $\langle \tau \rangle$ ergibt sich somit aus der durchschnittlichen Zeit t des Intensitätsabfalls $I(t)$ eines Fluorophors:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\int t * I(t) dt}{\int I(t) dt} = \frac{\int t * \sum_{i=1}^n A_i e^{-t/\tau_i} dt}{\int \sum_{i=1}^n A_i e^{-t/\tau_i} dt}$$

Gleichung 6-4

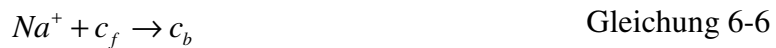
Die Lösung von Gleichung 6-7 ergibt:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_{i=1}^n A_i \tau_i^2}{\sum_{i=1}^n A_i \tau_i}$$

Gleichung 6-5

6.2 Bestimmung des K_d – Wertes

Für die Reaktion des Indikators mit Natrium nach Gleichung 6-6 errechnet sich der K_d – Wert nach Gleichung 6-7. c_f stellt hierbei die Konzentration des freien und c_b die Konzentration des an Natrium gebundenen Indikators dar.



$$K_d = \frac{Na^+ * c_f}{c_b}$$

Gleichung 6-7

Die Fluoreszenzintensität des Indikators setzt sich aus der Fluoreszenzintensität des freien und der Fluoreszenzintensität des an Natrium gebundenen Indikators zusammen. Gleichung 6-8 zeigt diesen Zusammenhang, wobei A_f und A_b entsprechende Proportionalitätsfaktoren darstellen. Ersetzt man c_b in Gleichung 6-8 durch Gleichung 6-6 so ergibt sich Gleichung 6-9

$$F = A_f c_f + A_b c_b$$

Gleichung 6-8

$$F = \left(A_f + A_b * \frac{Na^+}{K_d} \right) * c_f \quad \text{Gleichung 6-9}$$

Für die Gesamtkonzentration des Indikators $c_{tot} = c_f + c_b$ und Gleichung 6-10, ergibt sich folgender Zusammenhang.

$$c_{tot} = c_f * \left[1 + \frac{Na^+}{K_d} \right] \quad \text{Gleichung 6-10}$$

Ersetzt man nun c_f in Gleichung 6-9 mit Gleichung 6-10 erhält man für die Gesamtfluoreszenz des Indikatos.

$$F = \frac{c_{tot} * A_f * K_d + c_{tot} * A_b * Na^+}{K_d + Na^+} \quad \text{Gleichung 6-11}$$

Unter der Annahme, dass die Fluoreszenzintensität des Indikators mit steigender Natriumkonzentration ebenfalls steigt, kann man schlussfolgern, dass $(c_{tot} * A_f)$ der minimalen und $(c_{tot} * A_b)$ der maximalen Fluoreszenz F_{min} beziehungsweise F_{max} entspricht. Diese Annahmen sind möglich, da im Fall von $(c_{tot} * A_f)$ kein Natrium an den Indikator gebunden hat und im Fall von $(c_{tot} * A_b)$ der Indikator vollständig natriumgesättigt ist. Hieraus ergibt sich für Gleichung 6-11 die Gleichung 6-12.

$$F = \frac{F_{min} * K_d + F_{max} * Na^+}{K_d + Na^+} \quad \text{oder} \quad Na^+ = K_d * \frac{F - F_{min}}{F_{max} - F} \quad \text{Gleichung 6-12}$$

In Analogie lässt sich die dieser Zusammenhang auch für beliebige natriumabhängige Signalparameter X formulieren

$$Na^+ = K_d * \frac{X - X_{min}}{X_{max} - X} \quad \text{Gleichung 6-13}$$

Somit erhält man einen Zusammenhang zwischen der Natriumkonzentration und dem K_d -Wert für verschiedene natriumabhängige Signalparameter (Grynkiewicz et al. 1985, Winslow et al. 2002).

Nutzt man für den nichtratiometrischen Farbstoff Sodium Green die Fluoreszenzintensitäten als natriumabhängigen Signalparameter, so gilt für die relative Fluoreszenzzunahme $\Delta F/F_{\min}$ Gleichung 6-14. F steht hierbei für die in Gegenwart unterschiedlicher Natriumkonzentrationen gemessenen Intensitäten des Farbstoffes Sodium Green und F_{\min} für die Fluoreszenz des Indikators bei 0 mM Natrium.

$$\frac{\Delta F}{F_{\min}} = \frac{F - F_{\min}}{F_{\min}} = \frac{F}{F_{\min}} - 1 \quad \text{Gleichung 6-14}$$

Ersetzt man nun die natriumabhängige Fluoreszenz F aus Gleichung 6-14 mit Gleichung 6-12 so erhält man folgenden Zusammenhang.

$$\frac{\Delta F}{F_{\min}} = \frac{(F_{\max} - F_{\min}) * Na^+}{(K_d + Na) * F_{\min}} = \frac{F}{F_{\min}} - 1 \quad \text{Gleichung 6-15}$$

Gleichung 6-15 lässt in Gleichung 6-16 umformulieren. Man kann Gleichung 6-16 an eine Punktschar (x,y) anpassen. x entspricht der Natriumkonzentration und y der realtiven Fluoreszenz F/F_{\min} . a und K_d sind die zu bestimmenden Parameter, wobei $a = (F_{\max}/F_{\min}) - 1$ ist.

$$y = \frac{a * x}{K_d + x} + 1 \quad \text{Gleichung 6-16}$$

Die Fluoreszenzintensität eines Ionenindikators ist, wie bereits beschrieben, sowohl von der Ionenkonzentration als auch von der Farbstoffkonzentration abhängig. Da die Indikatorfluoreszenz somit eine Funktion der Natriumkonzentration und der Indikatorkonzentration selbst ist, kann bei variabler und unbekannter Farbstoffkonzentration keine absolute Natriumbestimmung erfolgen. In dieser Arbeit wird eine Möglichkeit vorgestellt, die natriumabhängige Indikatorfluoreszenz auf die natriumunabhängige

Fluoreszenzintensität eines Referenzfarbstoffes zu beziehen. Für diese Messungen lagen beide Farbstoffe in Polymerpartikeln eingebettet in konstantem Verhältnis vor. Somit erhält man mit dem Verhältnis R der Fluoreszenzintensitäten des Indikators F und der des Referenzfarbstoffes F_R eine Größe, die von der Farbstoffkonzentration selbst unabhängig ist. Da im Falle eines Anstieges der Indikatorpartikelkonzentration sowohl die Fluoreszenz des Indikators als auch die des Referenzfarbstoffes in gleichem Verhältnis steigt, ist das Verhältnis beider Fluoreszenzen nur noch von der Natriumkonzentration abhängig. Somit lässt sich in Analogie zu Gleichung 6-14 ein Zusammenhang für das Verhältnis $R = F / F_R$ formulieren.

$$\frac{F - F_{\min}}{F_R} = R - R_{\min} \quad \text{Gleichung 6-17}$$

Ersetzt man nun F in Gleichung 6-17 mit Gleichung 6-12 so erhält man Gleichung 6-18 R_{\min} entspricht dem Verhältnis F / F_R in Gegenwart von 0 mM Natrium

$$R - R_{\min} = \frac{Na^+ (F_{\max} - F_{\min})}{(K_d + Na^+) * F_R} \quad \text{Gleichung 6-18}$$

Für die Bestimmung des K_d - Wertes lässt sich aus Gleichung 6-18 die Gleichung 6-19 ableiten, welche an eine Punktschar (x,y) angepasst werden kann. x entspricht hierbei der Natriumkonzentration, y dem Verhältnis $R=F/F_R$. a und K_d sind die zu bestimmenden Parameter, wobei $a=R_{\max}-1$ und R_{\max} für das Verhältnis F/F_R des natriumgesättigten Indikators steht.

$$y = \frac{R_{\min} * a * x}{K_d + x} + R_{\min} \quad \text{Gleichung 6-19}$$

Nun ist es nur noch nötig, das Eichexperiment für eine Zelle durchzuführen, wobei R_{\min} in Gegenwart von 0 mM Natrium zu ermitteln ist. Die Bestimmung von R_{\max} erfolgt hierbei durch die Approximation der Gleichung 6-19 an die Messpunkte. Es ist nicht erforderlich die Natriumkonzentration im Rahmen der Eichung solange zu erhöhen bis sich der Indikator in Sättigung befindet. Hat man alle Parameter in einer Zelle ermittelt, so lassen sich diese für die

Natriumkonzentrationsbestimmung auf eine andere Zelle bei gleichen Messbedingungen übertragen. Ein Eichexperiment für jede einzelne Zelle ist nicht mehr notwendig.

7 Literaturverzeichnis

- Alberts B. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4te Aufl. Garland Science Publishing.
- Alonso MA, Carrasco L. 1981. Relationship between membrane permeability and the translation capacity of human HeLa cells studied by means of the ionophore nigericin. *Eur J Biochem*, 118 (2):289-294.
- Amorino GP, Fox MH. 1995. Intracellular Na⁺ measurements using sodium green tetraacetate with flow cytometry. *Cytometry*, 21 (3):248-256.
- Arbeloa IL. 1981a. Dimeric and Trimeric States of the Fluorescein Dianion .1. Molecular-Structures. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions II*, 77:1725-1733.
- Arbeloa IL. 1981b. Dimeric and Trimeric States of the Fluorescein Dianion .2. Effects on Fluorescence Characteristics. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions II*, 77:1735-1742.
- Arner A, Malmqvist U, Rigler R. 1998. Calcium transients and the effect of a photolytically released calcium chelator during electrically induced contractions in rabbit rectococcygeus smooth muscle. *Biophys J*, 75 (4):1895-1903.
- Aronson PS, Nee J, Suhm MA. 1982. Modifier role of internal H⁺ in activating the Na⁺-H⁺ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Nature*, 299 (5879):161-163.
- Baartscheer A, Schumacher CA, Fiolet JW. 1997. Small changes of cytosolic sodium in rat ventricular myocytes measured with SBF1 in emission ratio mode. *J Mol Cell Cardiol*, 29 (12):3375-3383.
- Bader JP. 1976. Sodium: a regulator of glucose uptake in virus-transformed and nontransformed cells. *J Cell Physiol*, 89 (4):677-681.
- Becker W, Bergmann A, Hink MA, König K, Benndorf K, Biskup C. 2004. Fluorescence lifetime imaging by time-correlated single-photon counting. *Microsc Res Tech*, 63 (1):58-66.
- Benes J. 1983. [The binding of fluorescein derivatives to proteins and the study of intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate in lymphocytes]. *Sb Lek*, 85 (1):14-17.
- Berger MG, Vandier C, Bonnet P, Jackson WF, Rusch NJ. 1998. Intracellular acidosis differentially regulates KV channels in coronary and pulmonary vascular muscle. *Am J Physiol*, 275 (4 Pt 2):H1351-1359.

-
- Biskup C, Kelbaskas L, Zimmer T, Benndorf K, Bergmann A, Becker W, Ruppertsberg JP, Stockklausner C, Klocker N. 2004a. Interaction of PSD-95 with potassium channels visualized by fluorescence lifetime-based resonance energy transfer imaging. *J Biomed Opt*, 9 (4):753-759.
- Biskup C, Zimmer T, Benndorf K. 2004b. FRET between cardiac Na⁺ channel subunits measured with a confocal microscope and a streak camera. *Nat Biotechnol*, 22 (2):220-224.
- Bourson J, Pouget J, Valeur B. 1993. Ion-Responsive Fluorescent Compounds .4. Effect of Cation Binding on the Photophysical Properties of a Coumarin Linked to Monoaza-Crown and Diaza-Crown Ethers. *Journal of Physical Chemistry*, 97 (17):4552-4557.
- Bruinvels J. 1975. Role of sodium in neuronal uptake of monoamines and amino acid precursors. *Nature*, 257 (5527):606-607.
- Buhlmann P, Pretsch E, Bakker E. 1998. Carrier-based ion-selective electrodes and bulk optodes. 2. Ionophores for potentiometric and optical sensors. *Chemical Reviews*, 98 (4):1593-1687.
- Burnett RW, Covington AK, Fogh-Andersen N, Kulpmann WR, Lewenstam A, Maas AH, Muller-Plathe O, Sachs C, Siggaard-Andersen O, VanKessel AL, Zijlstra WG. 2000. Recommendations for measurement of and conventions for reporting sodium and potassium by ion-selective electrodes in undiluted serum, plasma or whole blood. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC). IFCC Scientific Division Working Group on Selective Electrodes. *Clin Chem Lab Med*, 38 (10):1065-1071.
- Chuang FS, Sarbeck JR, St John PA, Winefordner JD. 1973. Flame spectrometric determination of sodium, potassium and calcium in blood serum by measurement of microsamples. *Mikrochim Acta*, (4):523-531.
- Clark HA, Barker SLR, Brasuel M, Miller MT, Monson E, Parus S, Shi ZY, Song A, Thorsrud B, Kopelman R, Ade A, Meixner W, Athey B, Hoyer M, Hill D, Lightle R, Philbert MA. 1998. Subcellular optochemical nanobiosensors: probes encapsulated by biologically localised embedding (PEBBLEs). *Sensors and Actuators B-Chemical*, 51 (1-3):12-16.
- Clark HA, Hoyer M, Parus S, Philbert MA, Kopelman M. 1999a. Optochemical nanosensors and subcellular applications in living cells. *Mikrochimica Acta*, 131 (1-2):121-128.

-
- Clark HA, Hoyer M, Philbert MA, Kopelman R. 1999b. Optical nanosensors for chemical analysis inside single living cells. 1. Fabrication, characterization, and methods for intracellular delivery of PEBBLE sensors. *Analytical Chemistry*, 71 (21):4831-4836.
- Clark HA, Kopelman R, Tjalkens R, Philbert MA. 1999c. Optical nanosensors for chemical analysis inside single living cells. 2. Sensors for pH and calcium and the intracellular application of PEBBLE sensors. *Anal Chem*, 71 (21):4837-4843.
- Crawford KB, Goldfinger MB, Swager TM. 1998. Na⁺ specific emission changes in an ionaphoric conjugated polymer. *Journal of the American Chemical Society*, 120 (21):5187-5192.
- Cutaia M, Davis R, Parks N, Rounds S. 1996. Effect of ATP-induced permeabilization on loading of the Na⁺ probe SBFI into endothelial cells. *J Appl Physiol*, 81 (1):509-515.
- Daubresse C, Grandfils C, Jerome R, Teyssie P. 1994. Enzyme Immobilization in Nanoparticles Produced by Inverse Microemulsion Polymerization. *Journal of Colloid and Interface Science*, 168 (1):222-229.
- David G, Barrett JN, Barrett EF. 1997. Spatiotemporal gradients of intra-axonal [Na⁺] after transection and resealing in lizard peripheral myelinated axons. *J Physiol*, 498 (Pt 2):295-307.
- de Silva AP, Fox DB, Huxley AJM, Moody TS. 2000. Combining luminescence, coordination and electron transfer for signalling purposes. *Coordination Chemistry Reviews*, 205:41-57.
- Decker ER, Levitt DG. 1983. Comparison of the gramicidin A potassium/sodium permeability and single channel conductance ratio. *Biochim Biophys Acta*, 730 (1):178-180.
- deSilva AP, Gunaratne HQN, Gunnlaugsson T, Nieuwenhuizen M. 1996. Fluorescent switches with high selectivity towards sodium ions: Correlation of ion-induced conformation switching with fluorescence function. *Chemical Communications*, (16):1967-1968.
- Despa S, Steels P, Ameloot M. 2000a. Fluorescence lifetime microscopy of the sodium indicator sodium-binding benzofuran isophthalate in HeLa cells. *Anal Biochem*, 280 (2):227-241.
- Despa S, Vecer J, Steels P, Ameloot M. 2000b. Fluorescence lifetime microscopy of the sodium indicators SBFI and sodium green in HeLa cells. *Biophysical Journal*, 78 (1):443a-443a.

-
- Despa S, Vecer J, Steels P, Ameloot M. 2000c. Fluorescence lifetime microscopy of the Na⁺ indicator Sodium Green in HeLa cells. *Anal Biochem*, 281 (2):159-175.
- Dewitte K, Stockl D, Thienpont LM. 1999. Measurement of serum sodium and potassium with direct ion-selective electrode systems. *Clin Chim Acta*, 282 (1-2):227-228.
- Diarra A, Sheldon C, Church J. 2001. In situ calibration and [H⁺] sensitivity of the fluorescent Na⁺ indicator SBFI. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280 (6):C1623-1633.
- Frelin C, Vigne P, Lazdunski M. 1984. The role of the Na⁺/H⁺ exchange system in cardiac cells in relation to the control of the internal Na⁺ concentration. A molecular basis for the antagonistic effect of ouabain and amiloride on the heart. *J Biol Chem*, 259 (14):8880-8885.
- Frelin C, Vigne P, Lazdunski M. 1983. The amiloride-sensitive Na⁺/H⁺ antiport in 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*, 258 (10):6272-6276.
- Friedman JE, Haddad GG. 1994. Anoxia induces an increase in intracellular sodium in rat central neurons in vitro. *Brain Res*, 663 (2):329-334.
- Gasbarrini A, Borle AB, Farghali H, Bender C, Francavilla A, Van Thiel D. 1992. Effect of anoxia on intracellular ATP, Na⁺_i, Ca²⁺_i, Mg²⁺_i, and cytotoxicity in rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 267 (10):6654-6663.
- Grinvald A, Steinberg IZ. 1974. On the analysis of fluorescence decay kinetics by the method of least-squares. *Anal Biochem*, 59 (2):583-598.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 260 (6):3440-3450.
- Haugland L *Molecular Probes Handbook*
- Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA. 2004. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins Introduction. *Pflugers Arch*, 447 (5):465-468.
- Hirshfield KM, Tóptygin D, Grandhige G, Kim H, Packard BZ, Brand L. 1996. Steady-state and time-resolved fluorescence measurements for studying molecular interactions: interaction of a calcium-binding probe with proteins. *Biophys Chem*, 62 (1-3):25-38.
- Hirshfield KM, Tóptygin D, Packard BS, Brand L. 1993. Dynamic fluorescence measurements of two-state systems: applications to calcium-chelating probes. *Anal Biochem*, 209 (2):209-218.

-
- Hofer AM, Machen TE. 1993. Technique for in situ measurement of calcium in intracellular inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores using the fluorescent indicator mag-fura-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (7):2598-2602.
- Horowitz SB, Paine PL. 1979. Reference phase analysis of free and bound intracellular solutes. II. Isothermal and isotopic studies of cytoplasmic sodium, potassium, and water. *Biophys J*, 25 (1):45-62.
- Imhof A, Megens M, Engelberts JJ, de Lang DTN, Sprik R, Vos WL. 1999. Spectroscopy of fluorescein (FITC) dyed colloidal silica spheres. *Journal of Physical Chemistry B*, 103 (9):1408-1415.
- Jeff A. 1992. Sodium - Calcium Exchange. In: Jeff A, Hrsg. Sodium - Calcium Exchange. 1te Aufl. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press,
- Kang TM, Hilgemann DW. 2004. Multiple transport modes of the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Nature*, 427 (6974):544-548.
- Keating SM, Wensel TG. 1991. Nanosecond fluorescence microscopy. Emission kinetics of fura-2 in single cells. *Biophys J*, 59 (1):186-202.
- Koester VJ, Dowben RM. 1978. Subnanosecond fluorescence lifetimes by time-correlated single photon counting using synchronously pumped dye laser excitation. *Biophys J*, 24 (1):245-247.
- Konishi M, Olson A, Hollingworth S, Baylor SM. 1988. Myoplasmic binding of fura-2 investigated by steady-state fluorescence and absorbance measurements. *Biophys J*, 54 (6):1089-1104.
- Kopelman R, Bakker E, Barker S, Clark H, Dourado S, Parus S, Rosenzweig Z, Shi ZY, Song T, Tan W, Thorsrud B. 1997. Is smaller better? Intracellular opto-chemical nanosensors. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 213:233-Anyl.
- Kowalczyk A, Boens N, Meuwis K, Ameloot M. 1997. Potential misevaluation of the ground-state dissociation constant from fluorimetric titrations: application to the ion indicators SBFI, PBFI, and fura-2. *Anal Biochem*, 245 (1):28-37.
- Kurihara K, Ohtsu M, Yoshida T, Abe T, Hisamoto H, Suzuki K. 1999. Micrometer-sized sodium ion-selective optodes based on a "tailed" neutral ionophore. *Analytical Chemistry*, 71 (16):3558-3566.
- Laurence DJ. 1952. A study of the adsorption of dyes on bovine serum albumin by the method of polarization of fluorescence. *Biochem J*, 51 (2):168-180.

-
- Lazdunski M, Frelin C, Vigne P. 1985. The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. *J Mol Cell Cardiol*, 17 (11):1029-1042.
- Liebling MS, Gupta RK. 1987. A comparison of intracellular sodium ion concentrations in neoplastic and nonneoplastic human tissue using ²³Na NMR spectroscopy. *Ann N Y Acad Sci*, 508:149-163.
- Luby-Phelps K. 1994. Physical properties of cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol*, 6 (1):Seite 3-9.
- Martin MM, Plaza P, Hung ND, Meyer YH, Bourson J, Valeur B. 1993. Photoejection of Cations from Complexes with a Crown-Ether-Linked Merocyanine Evidenced by Ultrafast Spectroscopy. *Chemical Physics Letters*, 202 (5):425-430.
- Massa J, Buller G, Walker A, Smith G, Cova S, Umasuthan M, Wallace A. 2002. Optical design and evaluation of a three-dimensional imaging and ranging system based on time-correlated single-photon counting. *Appl Opt*, 41 (6):1063-1070.
- Meier SD, Kovalchuk Y, Rose CR. 2006. Properties of the new fluorescent Na⁺ indicator CoroNa Green: comparison with SBFI and confocal Na⁺ imaging. *J Neurosci Methods*, 155 (2):251-259.
- Meisingset KK, Steen HB. 1981. Intracellular binding of fluorescein in lymphocytes. *Cytometry*, 1 (4):272-278.
- Minta A, Tsien RY. 1989. Fluorescent indicators for cytosolic sodium. *J Biol Chem*, 264 (32):19449-19457.
- Morf WE, Seiler K, Lehmann B, Behringer C, Hartman K, Simon W. 1989. Carriers for Chemical Sensors - Design-Features of Optical Sensors (Optodes) Based on Selective Chromoionophores. *Pure and Applied Chemistry*, 61 (9):1613-1618.
- Nakamura A, Nagai S, Ueda T, Sakakibara J, Hotta Y, Takeya K. 1989. Studies on the chemical modification of monensin. II. Measurement of sodium ion permeability of monensylamino acids using sodium-23 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 37 (9):2330-2333.
- Negulescu PA, Machen TE. 1990. Intracellular ion activities and membrane transport in parietal cells measured with fluorescent dyes. *Methods Enzymol*, 192:38-81.
- Oconnor DV, Ware WR, Andre JC. 1979. Deconvolution of Fluorescence Decay Curves - Critical Comparison of Techniques. *Journal of Physical Chemistry*, 83 (10):1333-1343.
- Philipson KD, Nicoll DA. 1992. Sodium-calcium exchange. *Curr Opin Cell Biol*, 4 (4):678-683.

-
- Plasek J, Horst, J.J., Ameloot, M., Steels, P. . 1996. Fluorescence Microscopy and Fluorescence Probes. 113-118.
- Prodi L, Bolletta F, Montalti M, Zaccheroni N, Savage PB, Bradshaw JS, Izatt RM. 1998. A fluorescent sensor for magnesium ions. *Tetrahedron Letters*, 39 (31):5451-5454.
- Schoutteten L, Denjean P, Faure J, Pansu RB. 1999. Photophysics of Calcium Green 1 in vitro and in live cells. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 1 (10):2463-2469.
- Shigematsu S, Arita M. 1999. Anoxia depresses sodium-calcium exchange currents in guinea-pig ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 31 (4):895-906.
- Skou JC. 1988. The Na,K-pump. *Methods Enzymol*, 156:1-25.
- Skou JC. 1990. The fourth Datta lecture. The energy coupled exchange of Na⁺ for K⁺ across the cell membrane. The Na⁺, K⁽⁺⁾-pump. *FEBS Lett*, 268 (2):314-324.
- Slack C, Warner AE, Warren RL. 1973. The distribution of sodium and potassium in amphibian embryos during early development. *J Physiol*, 232 (2):297-312.
- Smith GA, Morris PG, Hesketh TR, Metcalfe JC. 1986. Design of an indicator of intracellular free Na⁺ concentration using ¹⁹F-NMR. *Biochim Biophys Acta*, 889 (1):72-83.
- Speiser S, Chisena FL. 1988. Optical Bistability in Fluorescein Dyes. *Applied Physics B-Photophysics and Laser Chemistry*, 45 (3):137-144.
- Springer CS, Jr. 1987. Transmembrane ion pumping: high resolution cation NMR spectroscopy. *Ann N Y Acad Sci*, 508:130-148.
- Sumner JP, Aylott JW, Monson E, Kopelman R. 2002. A fluorescent PEBBLE nanosensor for intracellular free zinc. *Analyst*, 127 (1):11-16.
- Sumner JP, Kopelman R. 2005. Alexa Fluor 488 as an iron sensing molecule and its application in PEBBLE nanosensors. *Analyst*, 130 (4):528-533.
- Szmacinski H, Lakowicz JR. 1997. Sodium Green as a potential probe for intracellular sodium imaging based on fluorescence lifetime. *Anal Biochem*, 250 (2):131-138.
- Tsukube H, Yamashita K, Iwachido T, Zenki M. 1991. Pyridine-Armed Diaza-Crown Ethers - Molecular Design of Effective Synthetic Ionophores. *Journal of Organic Chemistry*, 56 (1):268-272.
- Uhlmann DR, Suratwala T, Davidson K, Boulton JM, Teowee G. 1997a. Sol-gel derived coatings on glass. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 218:113-122.
- Uhlmann DR, Teowee G, Boulton J. 1997b. The future of sol-gel science and technology. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 8 (1-3):1083-1091.

-
- Valeur B, Leray I. 2000. Design principles of fluorescent molecular sensors for cation recognition. *Coordination Chemistry Reviews*, 205:3-40.
- Wanke E, Carbone E, Testa PL. 1980. The sodium channel and intracellular H⁺ blockage in squid axons. *Nature*, 287 (5777):62-63.
- Wanke E, Testa PL, Prestipino G, Carbone E. 1983. High intracellular pH reversibly prevents gating-charge immobilization in squid axons. *Biophys J*, 44 (2):281-284.
- Winslow JL, Cooper RL, Atwood HL. 2002. Intracellular ionic concentration by calibration from fluorescence indicator emission spectra, its relationship to the K(d), F(min), F(max) formula, and use with Na-Green for presynaptic sodium. *J Neurosci Methods*, 118 (2):163-175.
- Witulski B, Weber M, Bergstrasser U, Desvergne JP, Bassani DM, Bouas-Laurent H. 2001. Novel alkali cation chemosensors based on N-9-anthrylaza-crown ethers. *Organic Letters*, 3 (10):1467-1470.
- Wright EM, Loo DD. 2000. Coupling between Na⁺, sugar, and water transport across the intestine. *Ann N Y Acad Sci*, 915:54-66.
- Wright EM, Loo DD, Turk E, Hirayama BA. 1996. Sodium cotransporters. *Curr Opin Cell Biol*, 8 (4):468-473.
- Wright EM, Turk E. 2004. The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch*, 447 (5):510-518.
- Zhang XX, Bordunov AV, Bradshaw JS, Dalley NK, Kou XL, Izatt RM. 1995. A New Highly Selective Macrocyclic for K⁺ and Ba²⁺ - Effect of Formation of a Pseudo 2nd Macroring through Complexation. *Journal of the American Chemical Society*, 117 (46):11507-11511.
- ZhuGe R, Tuft RA, Fogarty KE, Bellve K, Fay FS, Walsh JV, Jr. 1999. The influence of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ concentration on Ca²⁺ sparks and spontaneous transient outward currents in single smooth muscle cells. *J Gen Physiol*, 113 (2):215-228.

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Amplitude
BSA	Bovines Serum Albumin
CHO	Chinese Hamster Ovary Cells
CO ₂	Kohlendioxid
COS7	Monkey Kidney Cells
FCS	Fetal Calf Serum
HOMO	highest occupied molecular orbital
K ⁺	Kalium
K _d	Dissoziationskonstante
LSM	Laserscanning Mikroskop
LUMO	lowest unoccupied molecular orbital
max	maximal
min	minimal
mM	Millimol/ Liter
N ₂	Stickstoff
Na ⁺	Natrium
NAD/ NADH	Nicotinamid Adenin-Dinucleotid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
O ₂	Sauerstoff
PCT	Photoinduced Charge Transfer
PET	Photoinduced ElectronTransfer
SBFI	Sodium Binding Benzofuran Isophtalate
SG	Sodium Green
TCSPC	Time Correlated Single Photon Counting
TMA-Cl	Tetramethylammoniumchlorid
TR	Texa Red
TiSa	Titan Sapphire

9 Verzeichnis der Symbole

A	Amplitude
c	Konzentration
c_b	Konzentration des gebundenen Indikators
c_f	Konzentration des freien Indikators
e^-	Elektron
F, Γ	Fluoreszenz
F_{\max}	maximale Fluoreszenz
F_{\min}	minimale Fluoreszenz
F_0	Fluoreszenz bei 0mM Natrium oder Kalium
F_R	Fluoreszenz des Refernzfarbstoffes
I	Intensität
I_{\max}	maximale Fluoreszenzintensität
I_{\min}	minimale Fluoreszenzintensität
I_0	Intensität bei 0mM Natrium oder Kalium
K_d	Dissoziationskonstante
λ	Wellenlänge
Q	Quatenausbeute
R	F/F_R (relative Fluoreszenzintensität)
S_0	Grundzustand
S_1	erster angeregter Zustand
S_2	zweiter angeregter Zustand
τ	Lebensdauer
t	Zeit
$\bar{\tau}$	durchschnittliche Zeit, die ein Fluorophor im angeregten Zustandverweilt
v	Vibrationszustand
γ	Emissionsrate
k_{nr}	Strahlungslose Übergänge
N	Anzahl angeregter der Moleküle
N_0	Anzahl der angeregten Moleküle nach dem Exzitationspuls

10 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Erstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Herr Dr. med. Christoph Biskup

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde, und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwertige Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den

Sascha Dietrich

11 Danksagung

Bei **Herrn Prof. Dr. med. Klaus Benndorf** möchte ich mich für die Möglichkeit zur Durchführung meiner Arbeit in seiner Abteilung sowie die begleitenden Ratschläge bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn **Dr. med. Christoph Biskup** für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, als Doktorand und Mitarbeiter in seiner Arbeitsgruppe tätig zu sein. Für seine herausragende wissenschaftliche Kompetenz und die geduldige Beratung in jeder Phase meiner Arbeit möchte ihm ganz herzlich danken. Seine überragende und freundliche Unterstützung war nicht nur grundlegend für den Erfolg dieser Arbeit, sondern wird auch weiterhin wegweisend für meine wissenschaftliche und ärztliche Tätigkeit sein.

Weiterhin möchte ich mich bei den Medizin Technischen Assistentinnen, **Andrea Kolchmeier** und **Karin Schoknecht** für die Hilfe in der Zellkultur bedanken.

Bei **Herrn PD Dr. Gerhard Mohr** möchte ich mich für die Hilfe bei der Synthese der Fluoreszenz-Nanosensoren und die stets sehr anregende wissenschaftliche Diskussion bedanken.

Mein Dank gilt auch **Frau Müller**, die mich bei der Messung der Fluoreszenzspektren sehr kompetent beraten und unterstützt hat.

Mein tiefer persönlicher Dank gilt meiner Lebensgefährtin **Frau Dr. Mareike Sausemuth**; ohne ihre Unterstützung und Motivation wäre eine Fertigstellung dieser Arbeit undenkbar gewesen. Ich danke ihr weiterhin für die sorgfältige Durchsicht meiner Arbeit.

Insbesondere danke ich auch meinen **Eltern Hans-Peter** und **Kerstin Dietrich**, sowie meiner Großmutter **Maria Pinkert** für ihre Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Geduld ganz herzlich.

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sascha Dietrich
Geburtsdatum	28. August 1979
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	evangelisch

Ausbildungsdaten

Schulbildung

1986 – 1990	Grundschule in Gera, Thüringen, Deutschland
1990 -1998	Gymnasium, in Gera und Jena, Deutschland
1998	Abitur
1998 – 1999	Zivildienst in einer Einrichtung für geistig behinderte Menschen in Hermsdorf / Thüringen

Medizinische Ausbildung

seit Oktober 1999	Studium an der Friedrich Schiller Universität Jena
August 2001	"Ärztliche Vorprüfung" (Physikum)
März 2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August 2005	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 2006	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit Dezember 2006	Assistenzarzt in der Abteilung für Hämatologie der Medizinischen Universitätsklinik zu Heidelberg

Praktika und Kurse

Juli –September 2001	Medizinisches Grundpraktikum im Hospital 26 in Havana, Cuba
August 2003	Unterassistententätigkeit in Altdorf (Kanton Uri) in der Abteilung Medizin

September 2003	Famulatur in einer Praxis für Allgemeinmedizin
März 2004	Famulaturaufenthalt an der University of Chicago im Fachbereich für medizinische Hämatologie/ Onkologie
Oktober 2005 – Februar 2006	Praktisches Jahr im Department für Onkologie bei Prof. Fey am Inselspital Bern
Februar – Mai 2006	Praktisches Jahr in der Herz – Thorax und Gefässchirurgie am Universitätsklinikum Jena
Juni 2006 –Juli	Praktisches Jahr in der Abteilung für Neurologie am Universitätsklinikum Jena
August 2006 – September 2006	Subinternship am Memorial Sloan Kettering Cancer Center in New York im Department für Neurologie

Wissenschaftliche Ausbildung

Januar 2002 – April 2006	Promotionsarbeit am Institut für Herz- und Kreislauf Physiologie zum Thema: „Fluoreszenzindikatoren für intrazelluläre Natriumkonzentrationsmessungen“
September 2004 – Juni 2005	Forschungsaufenthalt an der University of Chicago zum Thema ‘Der c-Met Rezeptor als potenzielles Target für die Therapie des Bronchialkarzinoms’

Stipendien

September 2004 – Juni 2005	Boehringer Ingelheim Stipendium für einen Forschungsaufenthalt an der University of Chicago zum Thema ‘Der c-Met Rezeptor als potenzielles Target für die Therapie des Bronchialkarzinoms’
Februar 2005	Reisestipendium der Glaxo Smith Kline – Stiftung für die Teilnahme am 49. Meeting der Biophysical Society in Long Beach, Kalifornien, USA
Juni 2004 – Juni 2005	Aufnahme in das Biomedical Science Exchange Programm der Charite’ Berlin zwischen Europa and Nord Amerika

Sascha Dietrich