

Quantifizierung der Konzentration von  
Kupfer(II)-ionen in lebenden Zellen durch  
Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie des Grün  
Fluoreszierenden Proteins

Dissertation

zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III  
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften  
der Universität des Saarlandes

von

Diplom Physiker  
Benjamin Hötzer

Saarbrücken

2010

Tag des Kolloquiums:	08.02.2011
Dekan:	Prof. Dr. Stefan Diebels
Berichterstatter:	Prof. Dr. Gregor Jung Prof. Dr. Ingolf Bernhardt
Vorsitz:	Prof. Dr. Michael Springborg
Akad. Mitarbeiter:	Dr. Michael Schmitt



zum Gedenken an Leo Schrass (†)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Das Grün Fluoreszierende Protein (GFP)</b>	<b>12</b>
2.1	Die Entdeckung von GFP . . . . .	12
2.2	Struktur des Proteins . . . . .	13
2.3	Die Bildung des Chromophors . . . . .	14
2.4	Photochemie des Chromophors . . . . .	16
2.5	Photokonversion . . . . .	19
2.6	Photophysikalische Eigenschaften von GFP . . . . .	21
2.7	Anwendungen . . . . .	22
<b>3</b>	<b>Grundlagen der Fluoreszenz</b>	<b>24</b>
3.1	Quantenmechanische Grundlagen . . . . .	24
3.2	Jablonski Diagramm . . . . .	24
3.3	Einstein-Faktoren . . . . .	26
3.4	Lambert-Beersches Gesetz . . . . .	28
3.5	Resonanter Energietransfer . . . . .	28
<b>4</b>	<b>Zeitaufgelöste Spektroskopie</b>	<b>32</b>
4.1	Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen (TCSPC) . . . . .	32
4.1.1	Prinzip des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens . . . . .	33
4.1.2	Pile-up . . . . .	35
4.1.3	Reabsorption . . . . .	35
4.1.4	Instrumentelle Antwortfunktion . . . . .	36
4.1.5	Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer . . . . .	38
4.1.6	Aufbau . . . . .	38
4.1.7	Signalverarbeitung . . . . .	39
4.2	Fluoreszenzlebensdauerermikroskopie (FLIM) . . . . .	40
4.2.1	Konfokales Prinzip . . . . .	41

4.2.2	Aufbau . . . . .	41
4.2.3	Ergebnisse aus FLIM Messungen . . . . .	42
<b>5</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>46</b>
5.1	Mutationen in GFP . . . . .	46
5.2	Fluoreszenzproteine . . . . .	47
5.3	Präparation der Proben . . . . .	47
5.4	<i>E. coli</i> -Zellen . . . . .	48
5.5	Tabakzellen . . . . .	48
5.6	Chromophorbildungseffizienz . . . . .	49
5.7	Absorptionsspektrometer . . . . .	50
5.8	Fluoreszenzspektrometer . . . . .	50
<b>6</b>	<b>Mathematisches Modell zur Bestimmung von <math>[Cu^{2+}]</math> aus Messungen der Lebensdauer von GFP</b>	<b>52</b>
6.1	Ratiometrisches Prinzip: Quantifizierung durch Spektroskopie . . . . .	52
6.2	Herleitung über das Massenwirkungsgesetz . . . . .	55
6.3	Zusammenhang der Lebensdauer-messungen mit den Konzentrationen .	59
6.4	Geschlossen analytische Lösung . . . . .	61
6.5	Bestimmung der physikalisch sinnvollen Lösung . . . . .	62
6.6	Näherungslösung für geringe GFP-Konzentrationen . . . . .	63
6.7	Anwendung auf experimentelle Werte . . . . .	65
6.8	Simulation des theoretischen Verlaufs der Titrationskurve . . . . .	66
6.8.1	Simulation mit konstanter Dissoziationskonstante . . . . .	66
6.8.2	Ergebnis der Simulation mit konstanter $K_d$ . . . . .	67
6.8.3	Einfluss der Variation der Dissoziationskonstante auf den Titrationsverlauf . . . . .	68
6.8.4	Ergebnis der Variation von $K_d$ . . . . .	69
6.8.5	Simulation der Titrationsformel und der Näherungsformel . . . . .	71
6.9	Diskussion der Ergebnisse von Kapitel 6 . . . . .	72
<b>7</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>74</b>
7.1	Quantifizierung von Kupfer(II)-ionen . . . . .	74
7.1.1	Verfahren zur Bestimmung von $[Cu^{2+}]$ . . . . .	74
7.1.2	Einfluss von $Cu^{2+}$ auf die Fluoreszenzlebensdauer . . . . .	77
7.1.3	Bestimmung der Bindungsstelle . . . . .	79
7.1.4	Mögliche Quenchmechanismen . . . . .	83
7.1.5	FRET führt zur Reduzierung der Lebensdauer . . . . .	85

7.1.6	Bestimmung von $K_d$ . . . . .	87
7.1.7	Selektivität . . . . .	88
7.1.8	Reversibilität der Bindung . . . . .	91
7.1.9	Einfluss von $\text{Cu}^{2+}$ auf weitere Mutanten von GFP . . . . .	93
7.1.10	Diskussion der $\text{Cu}^{2+}$ Quantifizierung . . . . .	94
7.2	Bestimmung von $[\text{Cu}^{2+}]$ in Zellen . . . . .	96
7.2.1	Theoretischer Ansatz . . . . .	96
7.2.2	Bestimmung von $[\text{Cu}^{2+}]$ in <i>E. coli</i> -Zellen . . . . .	97
7.2.3	Untersuchung der $\text{Cu}^{2+}$ Aufnahme in Tabakzellen . . . . .	99
7.2.4	Diskussion der Messungen in Zellen . . . . .	101
7.3	Detektion von Eisen(II)-ionen . . . . .	102
7.3.1	$\text{Fe}^{2+}$ sensitive GFP-Mutante . . . . .	102
7.3.2	Diskussion der Ergebnisse der Detektion von $\text{Fe}^{2+}$ . . . . .	104
7.4	Bestimmung der Bildungseffizienz des Chromophors von GFP . . . . .	106
7.4.1	Prinzip zur Bestimmung der Bildungseffizienz mittels TCSPC . . . . .	106
7.4.2	Labeln von NTA-Atto488 an mCherry . . . . .	110
7.4.3	Bestimmung der Bildungseffizienz . . . . .	111
7.4.4	Diskussion der Bestimmung der Chromophorbildungseffizienz . . . . .	116
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>118</b>
<b>A</b>	<b>Lebensdauer titrationen an weiteren Mutanten von GFP</b>	<b>122</b>
<b>B</b>	<b>Einfluss von <math>\text{Ni}^{2+}</math> und <math>\text{Co}^{2+}</math> auf die Lebensdauer von GFP T203H</b>	<b>126</b>

## Zusammenfassung

Die Aufklärung intrazellulärer Vorgänge ist wichtig für das Verständnis der dort ablaufenden Prozesse. Lebensdauer-mikroskopie an Zellen, die Fluoreszenzproteine enthalten, ist eine geeignete Methode, um einen Einblick in lebende Zellen zu erhalten. Ein Ziel ist dabei die Verfolgung von für die Zelle wichtigen Substanzen und die zeitliche und räumliche Entwicklung ihrer Konzentration. In der vorliegenden Arbeit wird die Bestimmung der  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration in verschiedenen Zellen durch eine Änderung der Fluoreszenzlebensdauer ( $\tau$ ) von in die Zellen eingebrachtem Grün fluoreszierendem Protein (GFP) dargestellt. Ursache hierfür ist die Bildung eines Komplexes zwischen  $\text{Cu}^{2+}$  und GFP. Die verantwortliche Bindungsstelle ist das His<sub>6</sub>-Tag. Außerdem wird der Mechanismus, der für die Abnahme von  $\tau$  verantwortlich ist, als Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) identifiziert. Der Förster-Radius wird zu  $R_0 = 2,1 \pm 0,1$  nm bestimmt. Aufgrund der spektralen Voraussetzungen führt nur die Präsenz von  $\text{Cu}^{2+}$  zu einer Änderung von  $\tau$ , so dass ein selektiver Sensor entwickelt werden kann. Zur Quantifizierung von  $\text{Cu}^{2+}$  wird ein mathematisches Modell hergeleitet, das die Bestimmung der Konzentration aus der experimentell ermittelten Lebensdauer erlaubt. Die Quantifizierung von  $\text{Cu}^{2+}$  kann durch nicht intakte GFP-Moleküle verfälscht werden. Ein Modell zur exemplarischen Bestimmung der Bildungseffizienz von GFP wird vorgestellt. Die Bildungseffizienz wird dabei über die Lebensdaueränderung eines an das GFP gelabelten Farbstoffes bestimmt.

## Abstract

The investigation of intracellular procedures is an important aspect of understanding the processes that occur there. Fluorescence microscopy of cells which contain fluorescent proteins, is a suitable method for gaining insight into living cells. One objective is the tracking of substances that are important for cells and the temporal and spatial development of their concentration. In this work the determination of the  $\text{Cu}^{2+}$  concentration in different cells via the lifetime changes of green fluorescent protein (GFP) in cells is described. This is possible due to the formation of a complex consisting of copper ions and GFP. The binding site responsible for this is the His<sub>6</sub>-tag. The mechanism causing the lifetime change is identified as the Förster resonance energy transfer (FRET). The Förster radius is given as  $R_0 = 2,1 \pm 0,1$  nm. Due to the spectral conditions, only the presence of  $\text{Cu}^{2+}$  leads to a change in lifetime - this makes it possible to develop a selective sensor. A mathematical model for the quantification of  $\text{Cu}^{2+}$  is generated, which enables the  $\text{Cu}^{2+}$  concentration to be determined on the basis of the experimental lifetime measurements. The quantification of  $\text{Cu}^{2+}$  may be distorted by incompletely formed GFP molecules. A model for determining the formation efficiency of GFP is also presented in this work. The formation efficiency of GFP is determined by changes to the fluorescence lifetime of a fluorophor attached to the GFP as a label.

# Kapitel 1

## Einleitung

Der Fluoreszenzspektroskopie kommt in den Lebenswissenschaften, der Chemie und der Physik eine wichtige Rolle zu. Sie bietet die Möglichkeit zum Einblick in grundlegende physikalische und biologische Prozesse. Mit geeigneten Fluorophoren können Analysen von Stoffen bis hin zu einzelnen Molekülen realisiert werden [1, 2, 3, 4]. Dabei stehen bisher vor allem qualitative Fragestellungen im Fokus des Interesses. Das beinhaltet u. a. die zeitliche und räumliche Verfolgung relevanter Abläufe. Für viele Anwendungen ist hingegen die quantitative Betrachtung wünschenswert.

Eine Fluorophorklasse, die sich zur Applikation für biologische und medizinische Zwecke anbietet, ist die der Quantenpunkte. Quantenpunkte eignen sich hauptsächlich für Biolabeling, insbesondere wegen ihrer einzigartigen optischen Eigenschaften. Dazu zählen neben der höheren Beständigkeit gegenüber Photobleichen im Gegensatz zu organischen Fluorophoren, auch die größenabhängige Farbe ihrer Emission [5, 6, 7]. Cluster aus Edelmetallen haben aufgrund ihrer photophysikalischen Eigenschaften Anwendung in der Nanomedizin gefunden [8, 9]. Nanopartikel finden ihren Einsatz beispielsweise in der Molekularbiologie [10] und in der Pharmazie z. B. bei der Untersuchung der Wirkstoffaufnahme [11, 12, 13].

Für biologische Anwendungen ist die Kenntnis intrazellulärer Komponenten sowie deren räumliche Verteilung in den Zellen erstrebenswert, um physiologische Prozesse verfolgen und verstehen zu können. Spektroskopische Methoden auf der Basis von Fluoreszenzproteinen (FP) bieten durch die Möglichkeit der genetischen Expression dieser FP in Zellen eine Option dazu. Die Eigenschaften eines solchen Biosensors bieten viele Vorteile gegenüber alternativen Ansätzen, wie z. B. der Verwendung organischer Fluorophore oder fluoreszierender Nanopartikel, da diese erst in die Zellen eingebracht werden müssen. Bei FP hingegen kann die sensitive Einheit, also der Fluorophor, ohne Schädigung der Zellmembran durch Methoden der Gentechnik in die

Zelle oder den Organismus eingebracht werden. Dadurch lassen sich Vorgänge *in vivo* unter natürlichen Bedingungen beobachten.

Ein relevantes FP ist das Grün Fluoreszierende Protein (GFP), das als ein wichtiges Werkzeug in der Biologie und in den Lebenswissenschaften gilt. In den zu untersuchenden Zellen exprimiert, lassen sich biologische Prozesse durch die Änderung der spektralen Eigenschaften, insbesondere der Fluoreszenzintensität und der Fluoreszenzlebensdauer *in vivo* beobachten. Dabei wird das GFP in den Zellen mit einer externen Laserquelle angeregt und die Emission detektiert. Eine Möglichkeit besteht in der Untersuchung der Fluoreszenzintensität, die durch entsprechende Stoffe gequencht wird, d. h. die durch Zugabe dieser Stoffe abnimmt, wie dies für das mit dem GFP verwandte FP DsRed beobachtet wurde [14].

Ein Problem bei Untersuchungen, die auf der Analyse der Fluoreszenzintensität basieren, ist das Fehlen eines Bezugswertes. Absolute Intensitäten haben eine geringe Aussagekraft, da die Messung der Konzentration eines Quenchers in der Zelle typischerweise ohne Vergleichswert von GFP in Abwesenheit des Quenchers erfolgt. Dies liegt daran, dass die Konzentration des eingebauten GFPs unbekannt ist und in der Regel an unterschiedlichen Stellen der Zelle unterschiedliche Werte besitzt. Um eine Aussage über den Einfluss des Quenchers auf die Fluoreszenzintensität treffen zu können, ist damit eine vorherige Kalibrierung der Fluoreszenzintensität der Zelle ohne Präsenz des Quenchers erforderlich. Dies ist in der Praxis nahezu ausgeschlossen. Eine Möglichkeit zum quantitativen Arbeiten mit FP über die Fluoreszenzintensität, ergibt sich aus einem ratiometrischen Ansatz [15, 16, 17, 18]. Auch hierbei ist eine Kalibrationsmessung zwingend erforderlich, was den Einsatz in Zellen erheblich erschwert.

Eine Methode, dieses Problem zu lösen, ergibt sich durch die Bestimmung der Konzentration des Quenchers über die Messung der Fluoreszenzlebensdauer von GFP. Diese besitzt einen für die entsprechende GFP-Mutante spezifischen Wert, der als Referenz für GFP in Abwesenheit des Quenchers angesehen werden kann. Diese spezifische Lebensdauer ist unabhängig von der GFP-Konzentration. Im Gegensatz zu Messungen der Fluoreszenzintensität sind störende Einflüsse, wie die Absorption des Fluoreszenzlichtes durch in den Zellen vorhandene Stoffe, bei Messungen der Fluoreszenzlebensdauer für quantitatives Arbeiten unerheblich. Zur Bestimmung der Konzentration des Quenchers wird die Änderung der Lebensdauer von GFP durch dessen Präsenz gemessen. Aufgrund des spezifischen Lebensdauerwertes von GFP ist keine Referenzmessung erforderlich. Eine Lebensdauermessung genügt, um den Quencher zu quantifizieren. Das System ist damit selbst referenzierend.

Eine besondere Relevanz in der Biologie und in der Medizin kommen Übergangsmetallen wie Kupfer, Kobalt, Zink und Eisen zu. Zink ist involviert in komplexen neu-

robiologischen Systemen. So werden zweiwertige Zinkionen u. a. für die Funktion von Synapsen benötigt. Störungen in der Zinkhomöostase können zu neurologischen Fehlfunktionen, wie z. B. Epilepsie, führen [19]. Eisenionen sind maßgeblich an der Struktur essentieller Bestandteile von Enzymen und Proteinen beteiligt [20]. Sie sind unentbehrlich für verschiedene Stoffwechselprozesse, im Überschuss hingegen schädlich, weil sie dann zur Bildung freier Radikale führen [21]. Bivalentes Kupfer,  $\text{Cu}^{2+}$ , ist in mikromolaren Konzentrationen ein essentieller Mikronährstoff für alle Lebewesen, der aufgrund seiner Redoxeigenschaften in seiner Funktion als katalytischer Kofaktor an einer Vielzahl metabolischer Prozesse beteiligt ist [22, 23].  $\text{Cu}^{2+}$  trägt im trans-Golgi-Netzwerk von Zellen zur Bereitstellung von kupferhaltigen Proteinen bei und wird im Zytosol zur Superoxiddismutase und in Mitochondrien für die Funktion der Zytochromoxidase benötigt [24]. Plastocyanine in Cyanobakterien, Algen und den Chloroplasten von Pflanzen, die bei der Photosynthese eine Rolle spielen, benötigen ebenfalls  $\text{Cu}^{2+}$  [25, 26]. Weiterhin ist  $\text{Cu}^{2+}$  an der Bildung struktureller Komponenten von Bio- und Signalmolekülen involviert [27, 28].

Für ein optimales Zellwachstum des methanotrophen Bakteriums *M. capsulatus* benötigt dieses eine  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration von etwa 30  $\mu\text{M}$ , im Blut beträgt die  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration ungefähr 8  $\mu\text{M}$  [29]. Die Unzureichende Verfügbarkeit von  $\text{Cu}^{2+}$  kann schädlich sein und zu Abnormalitäten der Mitochondrien und zu Neurodegeneration in menschlichen Zellen führen [30]. Kupfermangel in Pflanzen kann Chlorose zur Folge haben, die u. a. den Ernteertrag schmälern kann [31]. Im Gegensatz dazu verursachen erhöhte  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentrationen die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale in Prokaryoten und Eukaryoten, die zu Schäden an intrazellulären Membranen, Proteinen und Nucleinsäuren führen können [32, 33]. Hohe Konzentrationen an  $\text{Cu}^{2+}$  haben weiterhin einen antibiotischen Effekt [34, 35] und sind an verschiedenen Krankheiten maßgeblich beteiligt. So erfordert die Beteiligung von  $\text{Cu}^{2+}$  bei Morbus Wilson und bei der Alzheimer Krankheit weitere Untersuchungen, um ein besseres Verständnis dieser Erkrankungen zu erlangen und mögliche Methoden für deren Heilung zu entwickeln [36, 37]. Nicht nur die qualitative Bestimmung von Kupfer(II)-ionen, sondern auch die Bestimmung deren Konzentration, ist für die Untersuchung der Kupferhomöostase damit ein wichtiges Ziel [38].

Eine wesentliche Voraussetzung zur Messung der Konzentration solcher Ionen ist die Selektivität des Sensors. Erfolgt der beobachtete Effekt, also die Abnahme der Fluoreszenzlebensdauer nicht nur für ein Metallion, sondern auch für weitere Ionen, ist der Effekt nicht zweifelsfrei genau einem Ion zuzusprechen. Dies kann in der Praxis durch die selektive Bindung der Analyten an den Sensor oder über einen Quenchmechanismus erfolgen, der für das entsprechende Ion, nicht aber für weitere Ionen auftritt. Um

ein vollständiges Verständnis der Funktion von Metallionen zu erhalten, ist deren intrazelluläre Betrachtung notwendig. Die Selektivität muss dabei gewährleistet werden. Methoden auf der Basis von Fluoreszenzproteinen bieten eine Möglichkeit dazu. Hierbei stellt besonders die Messung der Fluoreszenzlebensdauer von in Zellen inkorporierten FP eine geeignete Methode dar, die quantitative Aussagen über in den Zellen enthaltenen Substanzen ermöglicht.

Ein bisher ungelöstes Problem für das quantitative Arbeiten mit GFP stellt der unbekannt Anteil von nicht vollständig ausgebildetem und damit fluoreszenzuntüchtigem Chromophor dar. GFP-Moleküle, die eine intakte Struktur aufweisen, deren Chromophore jedoch den letzten Faltungsschritt nicht durchlaufen haben, können spektroskopisch nicht erfasst werden, da ihnen die Fähigkeit zur Fluoreszenz fehlt. Trotzdem können diese Moleküle Substanzen binden. Für analytische Zwecke, z. B. für die Bestimmung der Konzentration von Metallionen durch Lebensdaueränderung von GFP, verfälschen diese defekten GFP-Moleküle die Quantifizierung hin zu vermeintlich geringeren Konzentrationen. Eine Methode, mit der der Grad der Chromophorbildungseffizienz ermittelt werden kann, besteht in Einzelmolekülexperimenten mit immobilisierten GFP-Molekülen, die mit einem Farbstoff gelabelt sind. Aus dem Verhältnis der GFP-Farbstoffpaare, die Fluoreszenz von GFP und Farbstoff zeigen und denen, die ausschließlich durch Fluoreszenz des Farbstoffes visualisiert werden können, kann die Effizienz ermittelt werden. Diese Methode ist jedoch zeitaufwändig und unpraktikabel.

In dieser Arbeit wird eine Methode zur Bestimmung der Chromophorbildungseffizienz präsentiert, die einfach zu realisieren ist und mit der Verwendung einer einzigen Anregungsquelle auskommt. Hierbei wird ein Farbstoff an das GFP gelabelt, der die Voraussetzungen für Energietransfer auf GFP erfüllt. Die Abnahme der Lebensdauer dieses Farbstoffes hängt vom Grad des Energietransfers ab. Da dieser nur auf GFP-Moleküle mit intakt gebildetem Chromophor möglich ist, kann aus dem Anteil der Spezies mit gequenchter Lebensdauer auf den Anteil an GFP-Molekülen mit intaktem Chromophor geschlossen werden. Beim quantitativen Arbeiten mit GFP kann damit der störende Effekt nicht vollständig ausgebildeter Chromophore korrigiert werden.

Ziel dieser Arbeit ist Bestimmung von  $[Cu^{2+}]$  in Zellen über Lebensdauerermessungen an GFP, die Entwicklung des dazu notwendigen mathematischen Modells sowie die Realisierung eines Verfahrens zur Ermittlung der Chromophorbildungseffizienz von GFP.

# Kapitel 2

## Das Grün Fluoreszierende Protein (GFP)

### 2.1 Die Entdeckung von GFP

Im Jahre 1962 entdeckt O. Shimomura das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) [39], das in der Natur in der Qualle *Aequorea victoria* vorkommt (Abbildung 2.1). GFP wandelt vom Photoprotein Aequorin in der Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  emittiertes blaues Licht (460 nm) in grünes Licht um (509 nm) [40]. Dieser strahlungsfreie Energietransfer resultiert aus dem spektralen Überlappen des Emissionsspektrums von Aequorin und des Absorptionsspektrums von GFP. Der biologische Nutzen dieser Transformation ist nicht geklärt, insbesondere da eine Vielzahl an GFP ähnlichen Bioproteinen bekannt und charakterisiert sind, die nicht fluoreszieren [41].

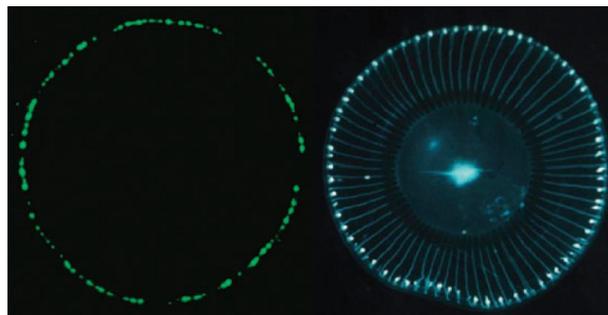


Abbildung 2.1: Die Qualle *Aequorea victoria* im Dunkeln unter Emission grünen Lichts (links) und unter Bestrahlung durch Licht im sichtbaren Spektralbereich (rechts) [42].

Die Kristallisation von GFP sowie die Beschreibung des intramolekularen Energietransfers zwischen Aequorin und GFP gelingt 1974 [43]. Fünf Jahre später erfolgt die Aufklärung der Struktur des Chromophors [44], der eine zentrale Position in der

fassartigen Struktur des Proteins einnimmt. Am Aufbau des Chromophors sind die drei Aminosäuren Serin, Tyrosin und Glycin an den Positionen 65, 66 und 67 der Proteinstruktur beteiligt. Die Struktur des Chromophors in seiner neutralen und in seiner anionischen Form sind dargestellt in Abbildung 2.2.

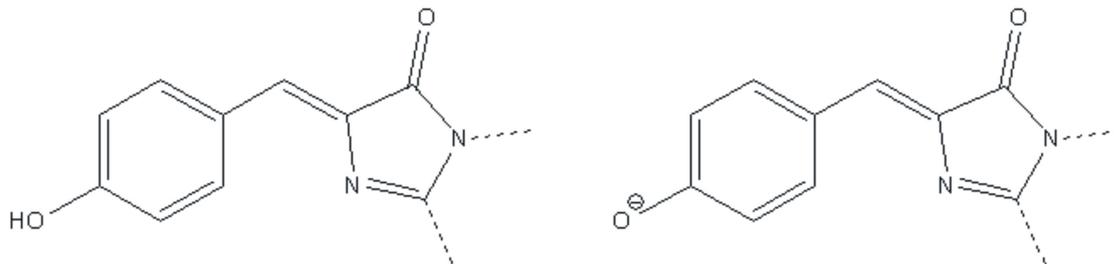


Abbildung 2.2: Die Struktur der neutralen Form des Chromophors, bei der der phenolische Sauerstoff als OH vorliegt (links) und die Struktur der anionischen Form des Chromophors von GFP, bei der dieser Sauerstoff als  $O^-$  vorliegt. Der Chromophor setzt sich aus den drei Aminosäuren Serin, Tyrosin und Glycin an den Positionen 65, 66 und 67 der Proteinstruktur zusammen [44].

Der Chromophor von GFP bildet sich autokatalytisch, d. h. es sind keine Kofaktoren oder Enzyme nötig, um ein fluoreszierendes Molekül zu erzeugen. Damit ist die Expression von funktionstüchtigen GFP-Molekülen in lebenden Organismen prinzipiell möglich. Allerdings folgt der finale Schritt in der Dehydrationsreaktion nur bei etwa 70 % der Moleküle, bei den restlichen 30 % findet die Chromophorbildung nicht vollständig statt [45]. Es folgt die Isolierung des Gens und die damit verbundene Aufklärung der Aminosäuresequenz, die für die Bildung des Chromophors verantwortlich ist [46]. 1994 gelingt M. Chalfie die Expression von GFP in *E. coli* und in *C. elegans* [47]. Im selben Jahr erfolgt die Expression des Gens von GFP in *E. coli* [48]. Die Möglichkeit der Expression von GFP in Zellen zusammen mit der großen Anzahl an Mutationen, die sich in einer Vielfalt an spektralen Eigenschaften widerspiegelt, kommt GFP eine wichtige Rolle in den Lebens- und Biowissenschaften zu. Für die Entdeckung, die Expression und die weitere Entwicklung von GFP wird 2008 der Nobelpreis in Chemie an O. Shimomura, M. Chalfie und R. Y. Tsien verliehen [49].

## 2.2 Struktur des Proteins

Die vollständige Aufklärung der Struktur von GFP gelingt 1996 unabhängig voneinander zwei Arbeitsgruppen [45, 50]. Das monomere GFP-Molekül besteht aus 238 Aminosäuren [51]. Seine molare Masse beträgt 26,9 kDa [46]. Das Molekül ist zylinderförmig aus elf  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut, die eine  $\alpha$ -Helix umschließen. Der Chromo-

phor befindet sich in der Mitte dieser  $\alpha$ -Helix an den Positionen 65-67. An den Fassen befinden sich kurze spiralförmige Segmente, sogenannte *Loops*. Die Ausmaße eines GFP-Moleküls betragen ungefähr 4,2 nm x 2,4 nm [50]. Abbildung 2.3 zeigt eine schematische Darstellung der Röntgenstruktur des Proteins.

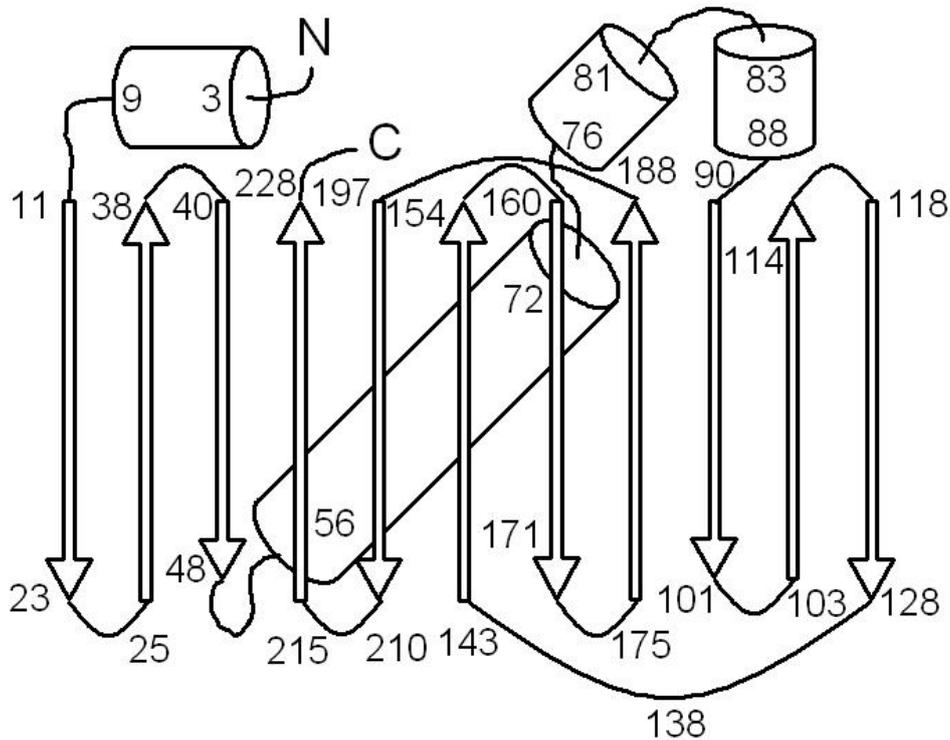


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Struktur von GFP [45]. Die Pfeile stellen die  $\beta$ -Faltblätter dar, das zentrale Fass entspricht der  $\alpha$ -Helix. Eingezeichnet sind die Positionen der Aminosäuren, sowie der C- und der N-Terminus des Moleküls. Der Chromophor befindet sich in der  $\alpha$ -Helix an den Positionen 65, 66 und 67.

GFP zeichnet sich durch ein hohes Maß an Resistenz gegenüber Denaturierungsmitteln, wie beispielsweise Guanidiniumchlorid und Harnstoff selbst in hohen Konzentrationen, aus. Denaturierte Chromophore renaturieren in geeigneten Pufferlösungen [52]. Das Protein ist bei Temperaturen bis etwa 60 °C stabil, selbst bei Temperaturen von 78 °C bleibt die Fluoreszenz zu 50 % erhalten [53, 54].

## 2.3 Die Bildung des Chromophors

Der Chromophor von GFP, p-Hydroxybenzyliden-imidazolidin-5-on, wird autokatalytisch in vier Schritten aus den Aminosäuren Serin, Tyrosin und Glycin gebildet [55]. Dieser Vorgang findet posttranslational statt, d.h. nach der Biosynthese von GFP in

den entsprechenden Zellen [52, 56]. Die drei Aminosäuren befinden sich nach der Faltung der Faserstruktur in einer Anordnung, die eine Zyklisierung ermöglicht. Nach der Zyklisierung in Verbindung mit einer Dehydratation ist der Chromophor noch nicht fluoreszierend [57]. Erst ein Oxidationsschritt, der die Anwesenheit von molekularem Sauerstoff bedingt, führt zur Bildung eines intakten Chromophors [58]. Dieser befindet sich im Zentrum der  $\beta$ -Faserstruktur und ist dadurch vor Einflüssen der Umgebung geschützt. Wichtig für die Chromophorbildung ist die Aminosäure Arginin an Position 96 [59, 60].

Die Proteinfaltung ist ein langsamer Prozess, der zeitabhängige Untersuchungen erschwert. Durch Mutagenese kann die Faltungsgeschwindigkeit und die Stabilität erhöht werden [58]. Erfolgt einer dieser Reaktionsschritte nicht, so entstehen GFP-Moleküle mit defektem Chromophor, die nicht fluoreszieren.

Abbildung 2.4 zeigt schematisch die an der Bildung des Chromophors von GFP beteiligten Einzelschritte [57].

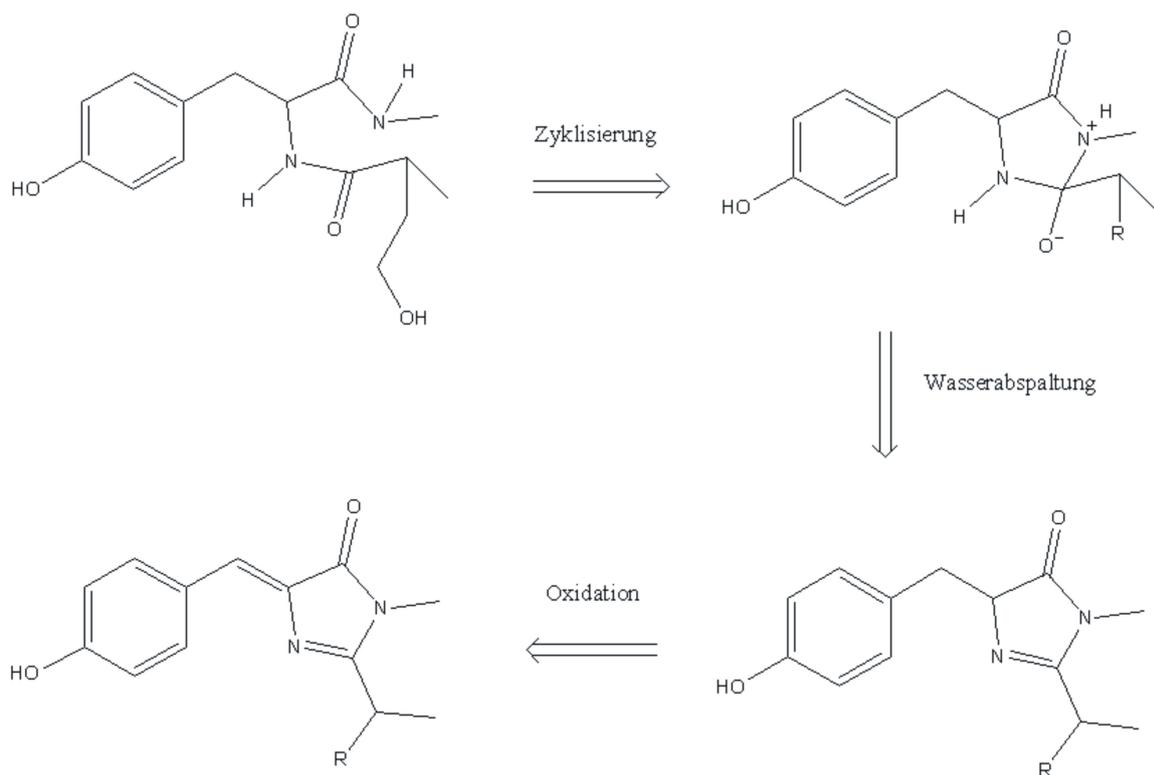


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der autokatalytischen Bildung des Chromophors von GFP [57]. Auf die Zyklisierung folgt die Dehydratation. Ein finaler Oxidationsschritt in Gegenwart von molekularem Sauerstoff führt zur Entstehung des intakten Chromophors.

## 2.4 Photochemie des Chromophors

Der isolierte Chromophor von GFP ist in wässrigen Lösungen bei Raumtemperatur nicht fluoreszierend [61, 62]. Ursache hierfür ist die effiziente strahlungslose Rückkehr vom elektronisch angeregten Zustand in den elektronischen Grundzustand durch interne Konversion [63, 64]. Eine Ursache hierfür ist die Rotation des Chromophors um die exozyklische Bindung. Diese Rotationsbewegung ist nur möglich, wenn der Chromophor nicht in der Proteinstruktur verankert ist. Außerdem kann eine Kippbewegung des Phenolrings stattfinden, die ebenfalls mit einer Energieabgabe verbunden ist. Beide Prozesse tragen zur internen Konversion bei und verringern durch die Verstärkung des strahlungslosen Zerfalls die Fluoreszenz und beim in das Protein eingebauten Chromophor die Fluoreszenzlebensdauer. Abbildung 2.5 zeigt schematisch die Kippbewegung und die Rotationsbewegung des Chromophors.

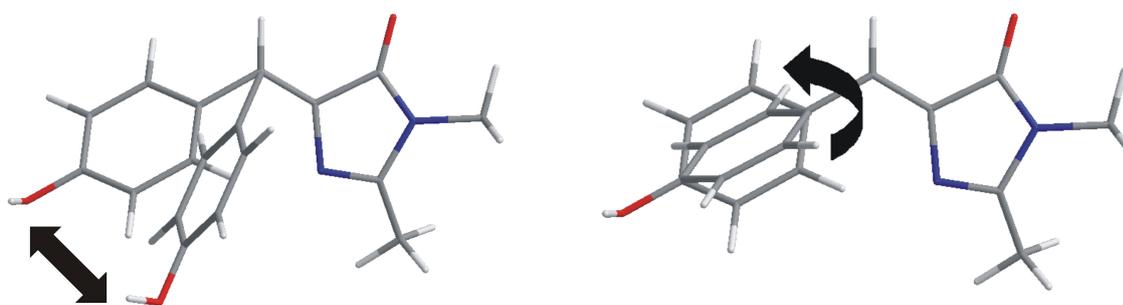


Abbildung 2.5: Der Chromophor von GFP kann ohne Fixierung an die Proteinmatrix Bewegungen ausführen. Die Abbildung zeigt die Kippbewegung (links) und die Rotationsbewegung (rechts) des Chromophors. Diese führen zu einer Verstärkung der internen Konversion. Dadurch nimmt die Fluoreszenz des Chromophors ab. Ist der Chromophor in GFP integriert, so kann die Flexibilität zur Abnahme der Fluoreszenzlebensdauer führen.

Bei tiefen Temperaturen von 77 K zeigt der Chromophor jedoch wieder eine starke Fluoreszenz, weil die strahlungslosen Zerfallskanäle unterdrückt sind [61, 65]. Auch wenn der Chromophor in das GFP-Molekül eingebaut ist, weist dieser ein hohes Maß an Fluoreszenz auf. Diese grüne Fluoreszenz kann durch das Auswechseln von Aminosäuren des Chromophors beeinflusst werden. Ein Austausch der zentralen Aminosäure Tyrosin 66 durch Histidin führt zur blauen Fluoreszenz des Chromophors, Einführen von Tryptophan an dieser Position zum cyan fluoreszierenden Protein [66].

Für die spektralen Eigenschaften ist nicht nur der Chromophor selbst, sondern auch seine Einbettung in die Matrix der umgebenden Proteinstruktur wichtig. Durch Änderungen im Wasserstoffbrückennetzwerk können strukturelle Eigenschaften beeinflusst werden. Insbesondere die polaren Aminosäuren Gln69, Arg96, His148, Thr203, Ser205

und Gln222 sowie angelagerte Wassermoleküle spielen dabei eine Rolle. So kann beispielsweise durch Austausch der Aminosäure an Position 222 Protonentransfer im elektronisch angeregten Zustand (ESPT) unterdrückt werden [67]. Der Chromophor in seiner Umgebung im Protein ist abgebildet in Abbildung 2.6. Dargestellt sind hier die Positionen, die zu Änderungen in den spektralen Eigenschaften führen.

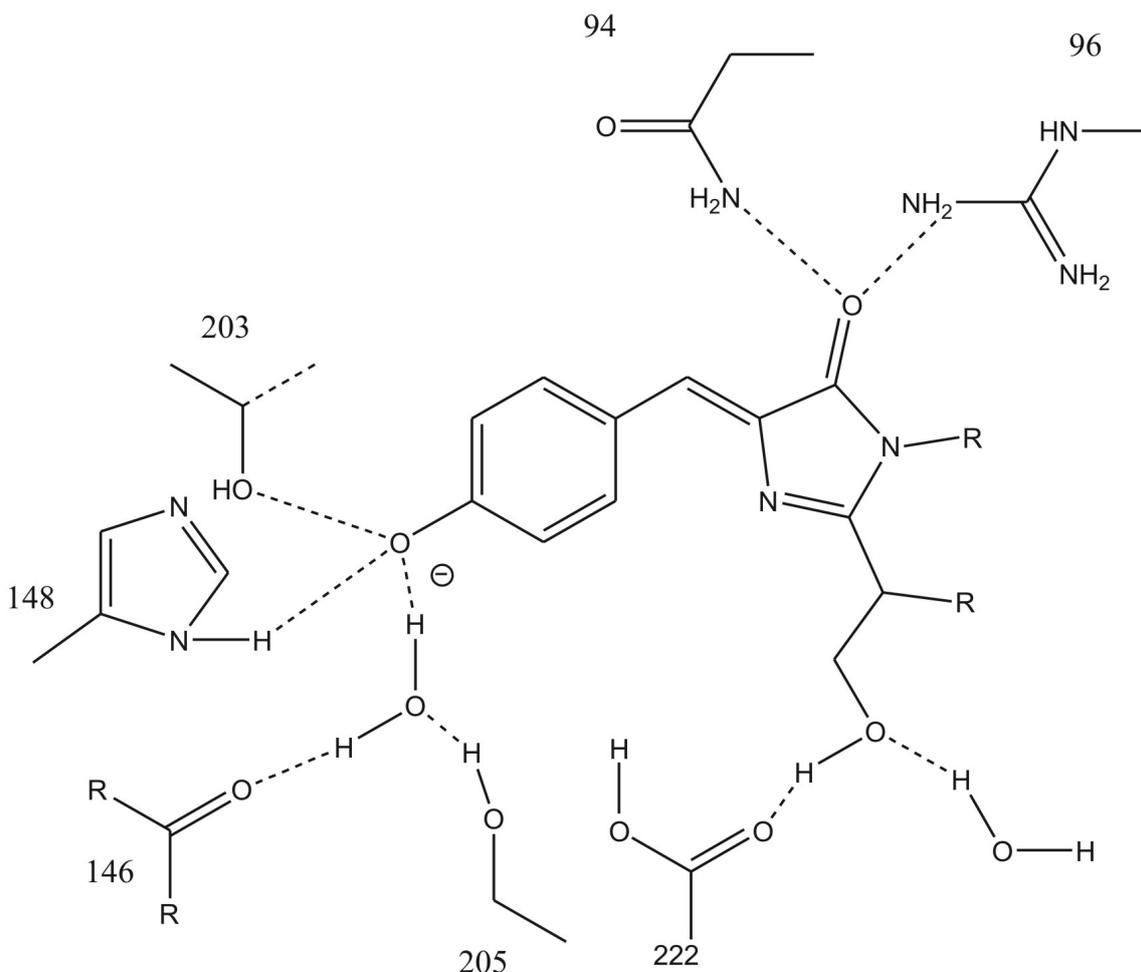


Abbildung 2.6: Der Chromophor von GFP ist in die Molekülmatrix des Proteins eingebettet. Änderungen in der Proteinstruktur können deshalb direkt die strukturellen Gegebenheiten und dadurch die spektralen Eigenschaften beeinflussen. In der Skizze sind die relevanten Aminosäuren eingezeichnet.

Der Austausch von Threonin an Position 203 durch aromatische Aminosäuren führt zur Bildung von Proteinen, die eine gelbe Fluoreszenz aufweisen. Die Ursache dafür liegt an der Wechselwirkung der  $\pi$ -Systeme von Chromophor und der entsprechenden Aminosäure an Position 203.

Geeignete Mutationen können außerdem zu photoaktivierbaren bzw. photokonvertierbaren GFP-Varianten führen, die insbesondere in der Fluoreszenzmikroskopie Ein-

satz finden [68, 69, 70].

Ein für biologische Fluorophore einzigartiger Mechanismus ist der ESPT. Die Emission der anionischen Form des Chromophors liegt bei 509 nm. Die Anregung des neutralen Chromophors sollte theoretisch die Emission von blauem Licht im Bereich von 450 nm bedingen. In der Praxis führt die Anregung des neutralen Chromophors allerdings zur Emission der anionischen Form bei 509 nm.

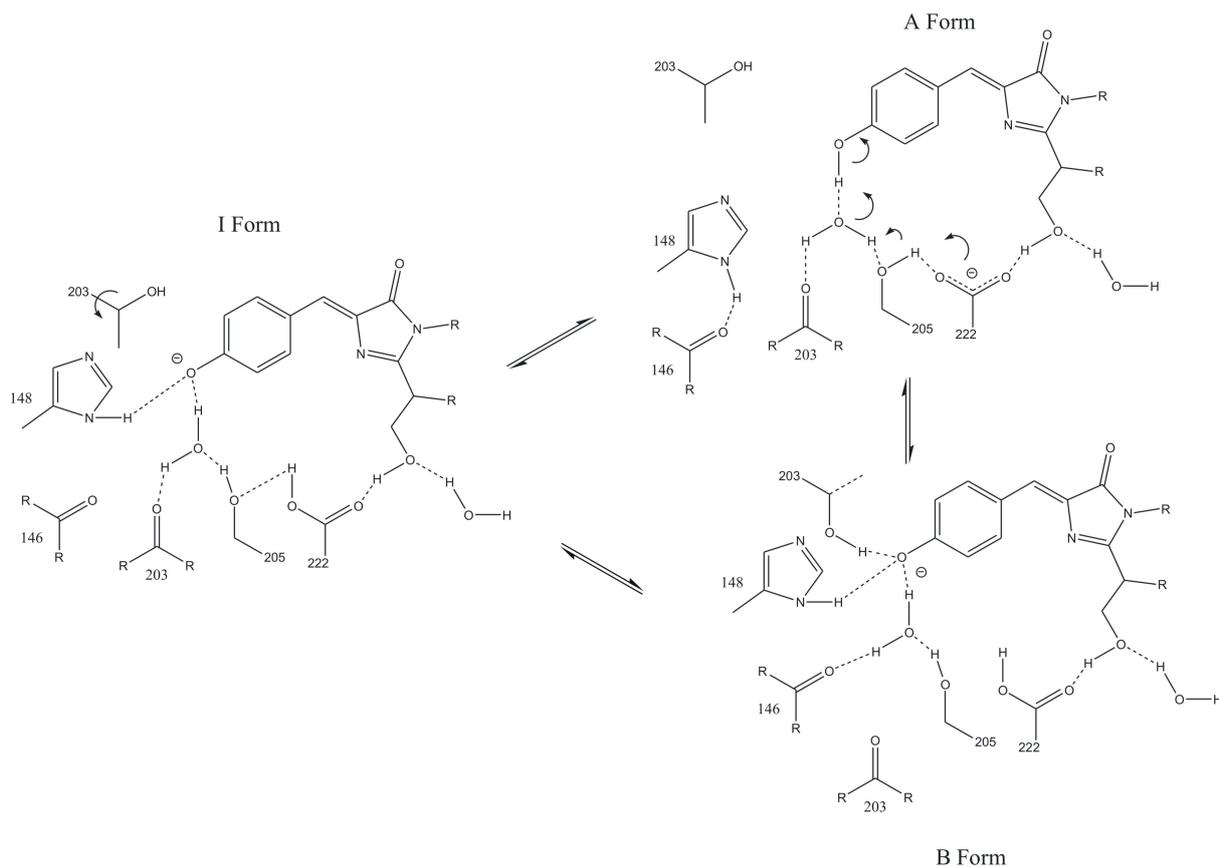


Abbildung 2.7: Darstellung des Protonentransfers im elektronisch angeregten Zustand (ESPT). Nach der Anregung des A Bandes wird ein Proton vom Phenolring des neutralen Chromophors über ein Wasserstoffbrückennetzwerk zur Glutaminsäure an Position 222 des Proteins transferiert. Dieser Protonentransfer ist durch die Pfeile symbolisiert. Dabei entsteht ein Anion im elektronisch angeregten Zustand  $I^*$ , das beim Übergang in den Grundzustand  $I$  ein Photon mit einer Wellenlänge von 509 nm emittiert.

Anregung des Chromophors bei einer Wellenlänge von 475 nm promoviert ein Elektron des anionischen Grundzustands  $B$  in den angeregten anionischen Zustand  $B^*$ . Die Relaxation in den Grundzustand  $B$  erfolgt unter Aussendung eines Photons mit einer Wellenlänge von 503 nm.

Anregung des neutralen Chromophors mit einer Wellenlänge von 395 nm resul-

tiert im angeregten neutralen Zustand  $A^*$ . Von hier ist über ESPT ein Übergang in den angeregten Zustand des Intermediats  $I^*$  möglich, von dem der Chromophor unter Aussendung eines Photons mit einer Wellenlänge von 509 nm in den Grundzustand  $I$  zurückkehren kann. Dabei führt die Anregung des neutralen Chromophors zur Bildung einer starken Säure. Über ein Wasserstoffbrückennetzwerk, vgl. Abbildung 2.7, wird ein Proton vom Phenolring des Chromophors zur Glutaminsäure an Position 222 des Proteins transferiert, wobei ein Anion im elektronisch angeregten Zustand kreiert wird. Die Emission der hier beschriebenen anionischen Form liegt bei 509 nm [71].

Eine weitere Möglichkeit liegt im Übergang von  $I^*$  nach  $B^*$ . Dieser Prozess ist strahlungslos und unwahrscheinlicher als der Übergang  $I^*$  nach  $I$ , weil dazu eine Rotation von Thr203 erforderlich ist. Der Übergang von  $B^*$  nach  $B$  erfolgt hier unter Emission eines Photons mit einer Wellenlänge von 503 nm. Die Ähnlichkeit der Emissionsmaxima von  $I^*$  und  $B^*$  ist bedingt durch die verwandten Strukturen.

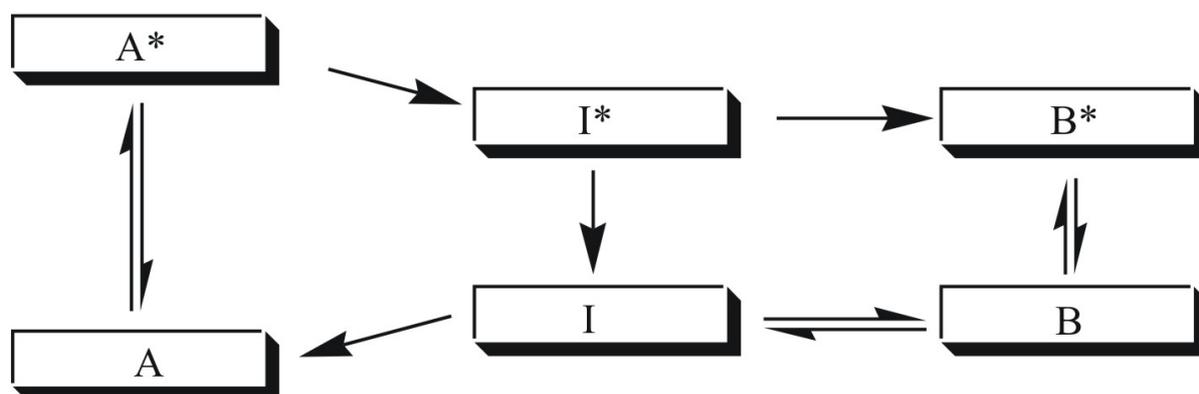


Abbildung 2.8: Energieschema des Protonentransfers im elektronisch angeregten Zustand (ESPT). Aus dem angeregten Zustand  $A^*$  geht der Chromophor in den angeregten Zustand  $I^*$  des Intermediates über. Hier erfolgt der Übergang nach  $I$  unter Aussendung eines Photons. Außerdem kann ein Übergang nach  $B^*$  erfolgen, von wo aus der Chromophor strahlend nach  $B$  relaxiert.

## 2.5 Photokonversion

Eine Anwendungsmöglichkeit von GFP ergibt sich durch die Photoaktivierung (PA). Unter Ausnutzung dieses Phänomens werden gezielt GFP-Moleküle durch ultraviolettes Licht in einem bestimmten spektralen Bereich fluoreszenzaktiv, bzw. deren Fluoreszenz wird verstärkt. In der Fluoreszenzmikroskopie können dadurch Moleküle lokal selektiert und orts aufgelöst verfolgt werden. Bei der PA wird durch Bestrahlung mit Licht im ultravioletten Spektralbereich das Gleichgewicht von der neutralen Form hin

zur anionischen Form verschoben. Die Verschiebung des Protonierungszustandes geht einher mit einer Verschiebung der relativen Intensitäten der Absorptions- und damit verbunden der Anregungsmaxima. Dies ist dargestellt in Abbildung 2.9.

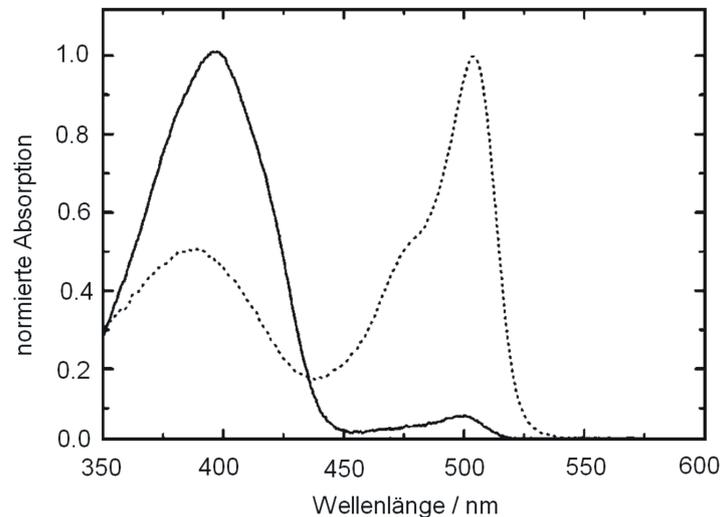


Abbildung 2.9: Änderung des Absorptionsspektrums der GFP-Mutante Thr203Val durch UV Einwirkung. Die durchgezogene Linie stellt das Spektrum vor der Photoaktivierung dar, die gestrichelte Linie nach der Photoaktivierung [72].

Der Prozess der PA beruht auf der Decarboxylierung von Glu222 im neutralen Chromophorzustand [73]. Ein ähnlicher Mechanismus, der durch die Anregung des anionischen Chromophors induziert wird, ist die Photokonversion (PC). Hierbei erfolgt die Phototransformation von GFP durch die Bestrahlung mit Licht im Bereich von 480 nm, das für die Decarboxylierung verantwortlich ist. Das Produkt, das bei PC und bei PA entsteht ist sehr wahrscheinlich das gleiche. Sein Emissionsmaximum liegt bei 510 nm. Die strukturellen Änderungen zeigt Abbildung 2.10.

Allerdings sinkt die Fluoreszenzlebensdauer durch beide Prozesse. Der Einfluss von PC und PA auf die Fluoreszenzlebensdauer ist insbesondere bei Verfahren, die hohe Einstrahlungsintensitäten oder lange Bestrahlungszeiten erfordern störend. Dies gilt beispielsweise für FLIM.

Für die GFP-Mutante Thr203Val führt die Anregung in höher angeregte Zustände der neutralen A Form des Chromophors zu effizienter Photokonversion [75]. Dadurch kann Photokonversion bei der Zweiphotonenmikroskopie zu verkürzten Lebensdauern führen.

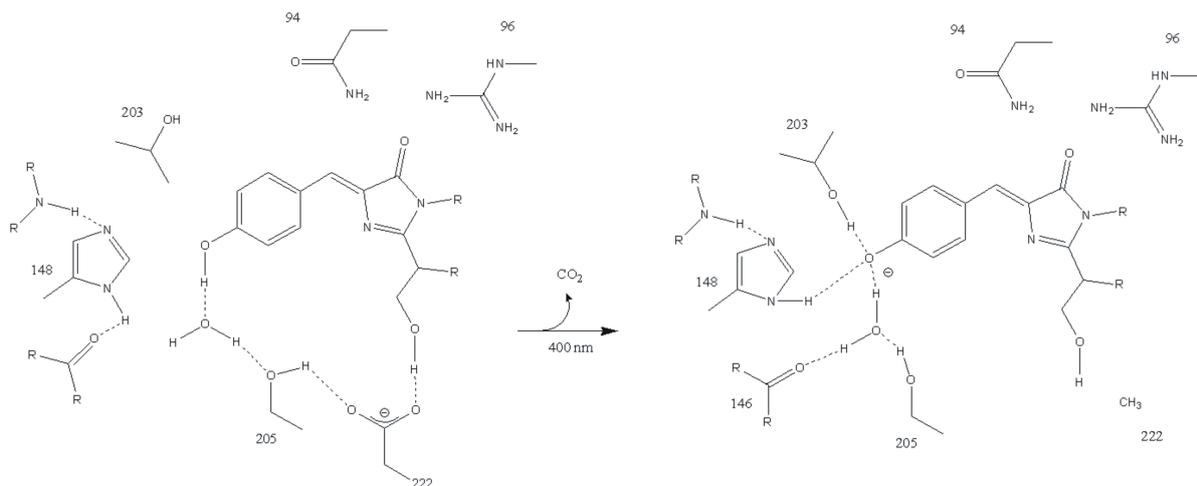


Abbildung 2.10: Die Photoaktivierung von wt-GFP führt zu einer Verschiebung des Gleichgewichts der neutralen RH Form des Chromophors zur anionischen R<sup>-</sup> Form. Ursache dafür ist die Rotation von Thr203 und die Decarboxylierung von Glu222, die zu strukturellen Änderungen führen [74].

## 2.6 Photophysikalische Eigenschaften von GFP

Die Quantenausbeute für das in der Qualle vorkommende Wildtyp-GFP (wtGFP) beträgt 0,79 [76]. GFP weist im Absorptionsspektrum zwei Maxima auf. Ein Maximum liegt bei 395 nm, das A Band; das zweite bei 470 nm, das B Band [76]. Die Intensität des kürzerwelligen Maximums beträgt etwa das Dreifache des langwelligeren Absorptionsmaximums (Abbildung 2.11). Die Extinktionskoeffizienten der entsprechenden Absorptionsmaxima betragen  $30000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  bzw.  $7000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Das relative Verhältnis der beiden Anregungsmaxima unterliegt Einflüssen der Umgebung [77, 78] und ändert sich außerdem durch längeres Einstrahlen von Licht [58]. Dies spielt insbesondere bei der Fluoreszenzmikroskopie eine Rolle, da bei ortsaufgelösten Messungen hohe Bestrahlungsintensitäten auftreten. Die Absorption bei 395 nm geht auf die neutrale Form des Chromophors zurück, die Absorption bei 470 nm auf die anionische Form. Beide emittieren bei 509 nm [79]. Das Absorptions- und das Emissionsspektrum von GFP ist exemplarisch für die Mutante C48S dargestellt in Abbildung 2.11.

Eine weitere Absorptionsbande liegt bei etwa 280 nm. Diese wird durch die aromatischen Seitenketten in der Molekülstruktur verursacht und ist nicht aktiv an der grünen Fluoreszenz von GFP beteiligt. GFP zeichnet sich durch eine hohe Photostabilität, d. h. einer hohen durchschnittlichen Anzahl an emittierten Photonen, die vom Chromophor vor seiner Zerstörung ausgesendet werden können, aus [76]. Eine Ursache dafür ist die Abschirmung des Chromophors vor der Umgebung durch die Prote-

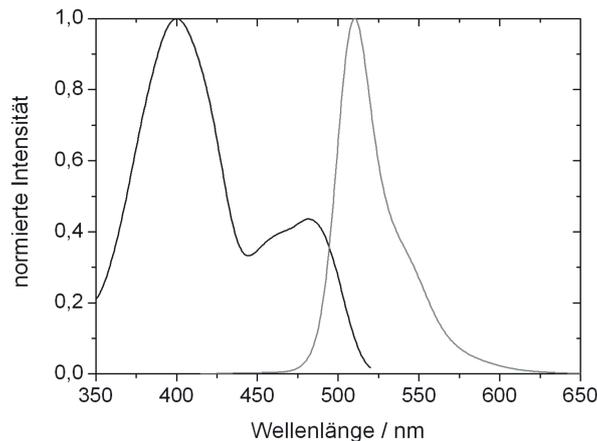


Abbildung 2.11: Absorptionsspektrum und Emissionsspektrum von GFP C48S mit den beiden Absorptionsmaxima, die von der neutralen bzw. von der anionischen Form des Chromophors herrühren. Unabhängig von der Anregungswellenlänge emittieren beide Formen bei 509 nm [76].

instruktur. Die Quantenausbeute des Photobleichens beträgt  $6,1 \cdot 10^{-5}$  für eYFP und  $8,2 \cdot 10^{-5}$  für eGFP [80].

## 2.7 Anwendungen

Für *in vivo* Anwendung ist es wichtig, dass GFP für die meisten prokaryotischen und eukaryotischen Zellen ungiftig ist. Durch die Möglichkeit einer hohen Expression in diesen Zellen ohne einen negativen Effekt auf deren Physiologie eignet sich GFP gut als Fluoreszenzmarker [47], insbesondere im Zusammenhang mit der autokatalytischen intrazellulären Faltung des Chromophors. Eine Anwendung liegt damit in der Visualisierung der Genexpression und der Verfolgung von Proteinen *in vivo*. Dazu wird das Gen des gewünschten Proteins mit dem Gen von GFP fusioniert und das Produkt in die Zielzelle transformiert. Das GFP-markierte Fusionsprotein kann spektroskopisch in Zellen untersucht werden. Das Einbringen von GFP erlaubt die Bestimmung des pH-Wertes in Zellen [81, 82]. Abstandsmessungen sind durch Energietransfer zwischen geeigneten GFP-Paaren möglich. Dazu werden zwei GFP-Mutanten in einem Konstrukt vereinigt und unter Ausnutzung der Abstandsabhängigkeit dieses Energietransfers die Distanz ermittelt [83]. Mit der gleichen Methode kann die DNA-Faltung untersucht werden [84]. Durch die Fusion von GFP an Calmodulin kann die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Zellen bestimmt werden. Dies wird durch eine Konformationsänderung des Calmodulin durch  $\text{Ca}^{2+}$  ermöglicht, die den Energietransfer beeinflusst [85, 86].



# Kapitel 3

## Grundlagen der Fluoreszenz

### 3.1 Quantenmechanische Grundlagen

Die Anwendung optischer Methoden verlangt ein Verständnis der grundlegenden Prozesse, die die Wechselwirkung zwischen Licht und Materie beschreiben. Materie können dabei beispielsweise Biomoleküle sein. Mit Licht sind Photonen gemeint, deren Energie durch Gleichung 3.1 beschrieben wird [87]:

$$E = h \cdot \nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (3.1)$$

In Gleichung 3.1 beschreibt  $h$  das Planck'sche Wirkungsquantum,  $\lambda$  die Wellenlänge,  $\nu$  die Frequenz und  $c$  die Lichtgeschwindigkeit. Aufgrund des Welle-Teilchen-Dualismus kann Licht auch als eine Welle oszillierender, elektrischer und magnetischer Felder angesehen werden. Diese beiden Felder stehen senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des Lichts im Raum und auch orthogonal zueinander.

Biomoleküle sind typischerweise kleiner als die oszillierenden Felder des Lichtes. Die geladenen Komponenten dieser Moleküle, d. h. deren Elektronen, werden durch diese Felder beeinflusst. Photophysikalische Prozesse, wie z. B. Absorption von Photonen oder die Fluoreszenz, hängen damit von der Struktur der Moleküle ab.

### 3.2 Jablonski Diagramm

Durch die Absorption von elektromagnetischer Strahlung der Energie  $E = h \cdot \nu$  kann ein Molekül aus dem elektronischen Grundzustand  $S_0$  in den elektronisch angeregten Zustand  $S_1$  übergehen. Gewöhnlich wird dabei ein Photon absorbiert, es können allerdings auch mehrere Photonen gleichzeitig absorbiert werden [88]. Weiterhin sind

Anregungen in höhere elektronische Niveaus  $S_n$  möglich, die jedoch in Lösungen innerhalb von Pikosekunden unter Energieabgabe zumeist strahlungslos in den ersten angeregten Zustand  $S_1$  relaxieren [89]. Die Rückkehr vom promovierten elektronischen Zustand in den Grundzustand kann auf unterschiedliche Weisen geschehen. Dies zeigt Abbildung 3.1, in der die Ratenkonstanten für die jeweiligen Übergänge eingezeichnet sind.

Unter Missachtung der Auswahlregel  $\Delta S = 0$  kann ein Elektron in den Triplettzustand  $T_1$  übergehen. Dieser Vorgang wird als Interkombination (= *intersystem crossing*, ISC) bezeichnet. Die Verweildauer im Triplettzustand liegt im Bereich von Millisekunden und ist deutlich höher, als im elektronisch angeregten Singulettzustand ( $10^{-7}$ - $10^{-9}$  s). Als Phosphoreszenz wird der spinverbotene Prozess bezeichnet, bei dem das Molekül unter Spinumkehr vom Triplett- in den Singulettzustand übergeht (Abbildung 3.1).

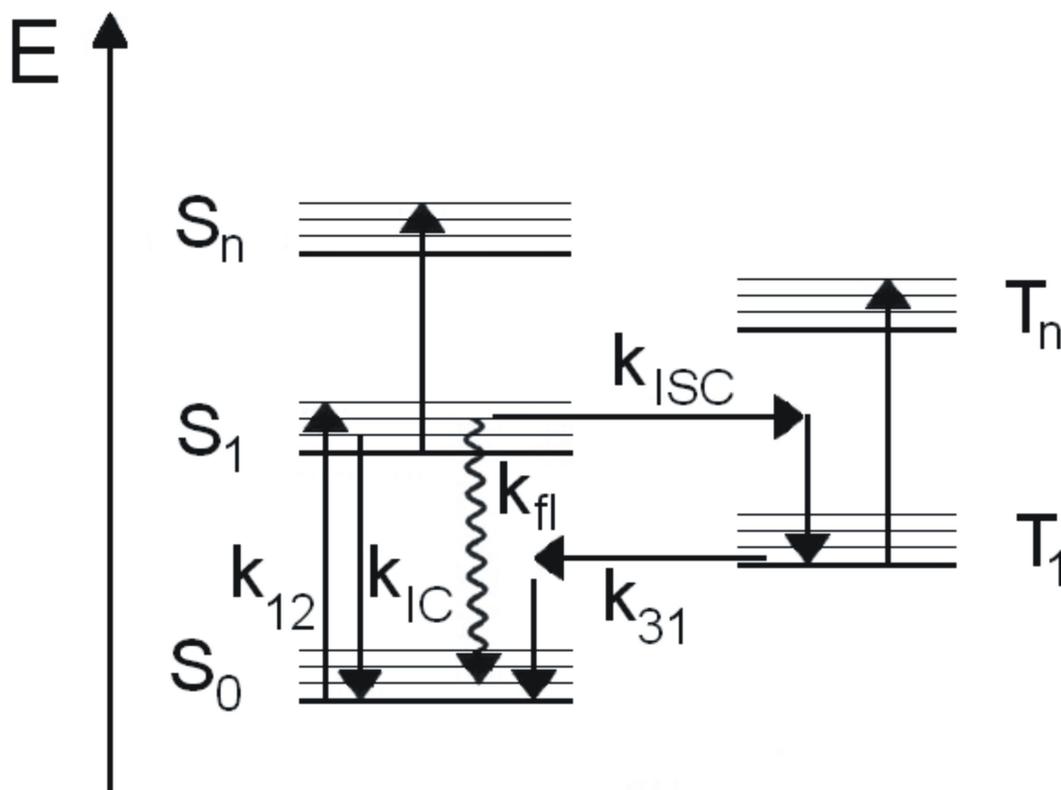


Abbildung 3.1: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm mit den elektronischen Singulett-niveaus ( $S_n$ ) und Triplett-niveaus ( $T_n$ ), sowie den entsprechenden Schwingungsniveaus. ISC bezeichnet den spinverbotenen Übergang vom Singulett- ins Triplett-niveau, IC den Prozess der internen Konversion vom promovierten in das elektronische Grundniveau. Außerdem ist ein strahlender Übergang von  $S_1$  nach  $S_0$  möglich.

Interne Konversion (= *internal conversion, IC*) bezeichnet den intramolekularen, strahlungslosen Übergang von einem höheren in ein tieferes elektronisches Niveau ohne Spinumkehr. Die Energie wird dabei als Wärme abgegeben.

Fluoreszenz wird der strahlende Übergang vom promovierten in den elektronischen Grundzustand genannt. Die Zeit, die sich ein Molekül im angeregten Zustand aufhält, kann experimentell bestimmt werden.

Auskunft über die Wahrscheinlichkeit von Übergängen zwischen verschiedenen Schwingungsniveaus eines Moleküls geben die Franck-Condon-Faktoren [90].

### 3.3 Einstein-Faktoren

Die Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen den beiden elektronischen Zuständen  $S_0$  und  $S_1$  im Zweiniveausystem werden beschrieben durch Ratenkonstanten, die Einstein-Faktoren. Dabei bezeichnet  $A_{21} = k_{rad}$  den Einstein-Faktor für die spontane Emission,  $B_{12}$  für die Absorption und  $B_{21}$  für die stimulierte Emission. Bei der Betrachtung von Zuständen mit der selben Multiplizität gilt:  $B_{21} = B_{12}$ . Verknüpft sind die Einstein-Faktoren über folgende Relation [91]:

$$A_{21} = \frac{8\pi h}{c^3} \cdot \nu^3 \cdot B_{12} \quad (3.2)$$

Hierbei steht  $h$  für das Planck'sche Wirkungsquantum und  $c$  für die Lichtgeschwindigkeit. Eine wichtige Implikation dieser Gleichung ist der stärkere Einfluss der spontanen Emission bei höheren Frequenzen  $\nu$ , d. h. geringeren Wellenlängen. Während Gleichung 3.2 nur für eine bestimmte Wellenlänge Gültigkeit besitzt, ist Gleichung 3.3 über den gesamten Spektralbereich anwendbar [92]:

$$A_{21} = \frac{8\pi n_0^2 \ln(10)}{c^2 N_A} \cdot \frac{\langle \epsilon_{abs}(\nu) / \nu \rangle}{\langle \nu_{fl}^{-3} \rangle} \quad (3.3)$$

In dieser Gleichung gibt  $n_0$  den Brechungsindex des umgebenden Mediums an. Die Verknüpfung von Brechungsindex und  $A_{21}$  kann sich direkt auf die gemessenen Lebensdauerwerte auswirken, beispielsweise bei Messungen in Zellen oder in der Nähe von Glas- oder Metalloberflächen [93].  $N_A$  steht für die Avogadrozahl,  $\epsilon_{abs}$  bezeichnet den molaren Extinktionskoeffizienten. Spitze Klammern bedeuten, dass über den gesamten Spektralbereich integriert werden muss. Weiterhin gilt [94]:

$$\langle \nu_{fl}^{-3} \rangle^{-1} = \frac{\int I_{fl}(\nu) d\nu}{\int \nu^{-3} I_{fl}(\nu) d\nu} \quad (3.4)$$

Die Einstein-Faktoren stehen über folgende Beziehung mit der Lebensdauer des Übergangs in Relation:

$$\tau_{rad} = \frac{1}{A_{21}} = \frac{1}{k_{rad}} \quad (3.5)$$

In Gleichung 3.5 symbolisiert  $\tau_{rad}$  die strahlende Komponente des Übergangs von  $S_1$  nach  $S_0$ . Nur für den Fall, dass keine Quenchingprozesse beteiligt sind und die interne Konversion vernachlässigt werden kann, entspricht diese der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{fl}$ . In der Realität setzt sich die Ratenkonstante für die Fluoreszenz jedoch zusammen aus der Ratenkonstante für den strahlenden Übergang  $k_{rad}$  und der Ratenkonstante der nicht strahlenden Übergänge  $k_{ns}$  gemäß:

$$k_{fl} = k_{rad} + k_{ns} \quad (3.6)$$

Damit ist die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{fl}$  kleiner als die strahlende Lebensdauer, d. h.  $\tau_{fl} < \tau_{rad}$ . Nicht strahlende Prozesse sind interne Konversion, Interkombination und Quenchingmechanismen, wie z. B. FRET, die durch entsprechende Ratenkonstanten  $k_{IC}$ ,  $k_{ISC}$  etc. Eingang in Gleichung 3.6 finden. Für die Fluoreszenzlebensdauer ergibt sich daraus:

$$\tau_{fl} = \frac{1}{k_{rad} + k_{ns}} \quad (3.7)$$

Die Kinetik wird beschrieben durch Gleichung 3.8:

$$\frac{d[S_1]}{dt} = -(k_{rad} + k_{ns}) \cdot [S_1] \quad (3.8)$$

Eine weitere Größe, die für die Fluoreszenzspektroskopie relevant ist, ist die Quantenausbeute  $\Phi_{fl}$  eines Fluorophors. Sie ist definiert durch die Anzahl an Fluoreszenzphotonen, die nach der Absorption einer Menge an Photonen emittiert wird.

$$\Phi_{fl} = \frac{\# \text{ Fluoreszenzphotonen}}{\# \text{ absorbierte Photonen}} \quad (3.9)$$

Die Summe der Quantenausbeuten für die Fluoreszenz  $\Phi_{fl}$ , die Phosphoreszenz  $\Phi_{ph}$  und der nicht strahlenden Prozesse  $\Phi_{ns}$  beträgt eins.

$$\Phi_{fl} + \Phi_{ph} + \sum \Phi_{ns} = 1 \quad (3.10)$$

Die Quantenausbeute der Fluoreszenz ist proportional zur Ratenkonstante der Fluoreszenz gemäß Gleichung 3.11:

$$\Phi_{fl} = \frac{k_{fl}}{\sum k_i} \quad (3.11)$$

Daraus ergibt sich folgender Zusammenhang von Fluoreszenzlebensdauer und der Quantenausbeute der Fluoreszenz:

$$\tau_{fl} = \frac{\Phi_{fl}}{k_{fl}} \quad (3.12)$$

Gute Fluoreszenzfarbstoffe erreichen Quantenausbeuten von über 90 %, z. B. Fluorescein mit  $\Phi_{fl} = 0,92$  [95].

### 3.4 Lambert-Beersches Gesetz

Makroskopisch beschreibt das Lambert-Beersche Gesetz die Absorption elektromagnetischer Strahlung durch Stoffe in Lösungen.

$$OD(\lambda) = \log\left(\frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)}\right) = c \cdot d \cdot \epsilon(\lambda) \quad (3.13)$$

Dabei bezeichnet  $OD(\lambda)$  die optische Dichte oder Absorbanz,  $I_0(\lambda)$  die Intensität des eingestrahnten Lichts,  $I(\lambda)$  die Intensität des transmittierten Lichts und  $c$  die Konzentration der Probe. Die Dicke der Küvette, typischerweise 1 cm, wird durch  $d$  ausgedrückt. Der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon(\lambda)$  stellt eine für den Farbstoff spezifische Größe dar. Er hängt gemäß Gleichung 3.14 mit dem Absorptionsquerschnitt  $\sigma$  eines einzelnen Moleküls zusammen:

$$\sigma = \frac{\epsilon(\lambda)}{N_A} \cdot \ln(10) \quad (3.14)$$

Hierbei steht  $N_A$  für die Avogadrozahl. Der Absorptionsquerschnitt liegt für Fluorophore typischerweise im Bereich von einigen  $\text{\AA}^2$ . Ist der Extinktionskoeffizient eines Stoffes bekannt, so kann auf der Grundlage des Lambert-Beerschen Gesetzes dessen Konzentration bestimmt werden.

### 3.5 Resonanter Energietransfer

Als Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) wird die strahlungslose Energieabgabe in molekularen Systemen bezeichnet. Dabei wird Energie von einem Donor  $D^*$ , der sich im elektronisch angeregten Zustand befindet, auf einen Akzeptor  $A$  übertragen, der

sich zunächst im elektronischen Grundzustand befindet.



Dieser Energietransfer ist stark abstandsabhängig. Somit eignet sich FRET unter anderem zur Abstandsmessung auf molekularem Maßstab [96]. Die Entfernung zwischen Donor und Akzeptor liegt typischerweise im Bereich von 1-10 nm. Da FRET ein Prozess ist, der durch oszillierende Dipole induziert wird, die eine ähnliche Resonanzfrequenz aufweisen, ist die entsprechende Orientierung der beiden Dipole zueinander wichtig. Der spektrale Überlapp des Emissionsspektrums des Donors und des Absorptionsspektrums des Akzeptors ist eine weitere Voraussetzung für das Stattfinden dieses Energietransfers. Dieser wird beschrieben durch das Überlappintegral  $J(\lambda)$ :

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \cdot \epsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda \quad (3.16)$$

Dabei beschreibt  $F_D(\lambda)$  das auf die Fläche normierte Emissionsspektrum des Donors,  $\epsilon_A$  den Extinktionskoeffizienten des Akzeptors und  $\lambda$  die Wellenlänge.

Der Förster-Radius  $R_0$  beschreibt den Abstand zweier FRET Partner, bei dem diese eine FRET Effizienz  $E$  von 50 % besitzen. Es können Abstände von  $0,5 \cdot R_0$  -  $1,5 \cdot R_0$  gemessen werden [97]. Der Förster-Radius ist gegeben durch Gleichung 3.17 [98]:

$$R_0^6 = \frac{9000 \cdot \ln(10) \cdot \kappa^2 \cdot Q_D}{128 \cdot \pi^5 \cdot N_A \cdot n^4} \cdot J(\lambda) \quad (3.17)$$

Der Orientierungsfaktor  $\kappa^2$  bezeichnet die relative Orientierung der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor. Können sich Donor und Akzeptor frei bewegen, so wird aufgrund der zufälligen Orientierung der Dipole  $\kappa^2=2/3$  angenommen [98].  $N_A$  bezeichnet die Avogadrozahl. Der Brechungsindex  $n$  beträgt in Wasser 1,33, für Biomoleküle in wässrigen Lösungen 1,4 [98]. Die Berechnung von  $R_0$  erfordert die Kenntnis des spektralen Überlappintegrals  $J(\lambda)$ .

Schematisch zeigt Abbildung 3.2 das Prinzip des resonanten Energietransfers vom Donor auf den Akzeptor. Die Wellenlänge des vom Donor in Abwesenheit des Akzeptors emittierten Lichts muss kleiner sein, als die Wellenlänge des nach Energieübertrag vom Donor auf den Akzeptor von diesem emittierten Lichts.

In den Emissionsspektren zeigt sich FRET nach der Anregung des Donors durch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität des Donors bei gleichzeitiger Zunahme der Fluoreszenzintensität des Akzeptors.

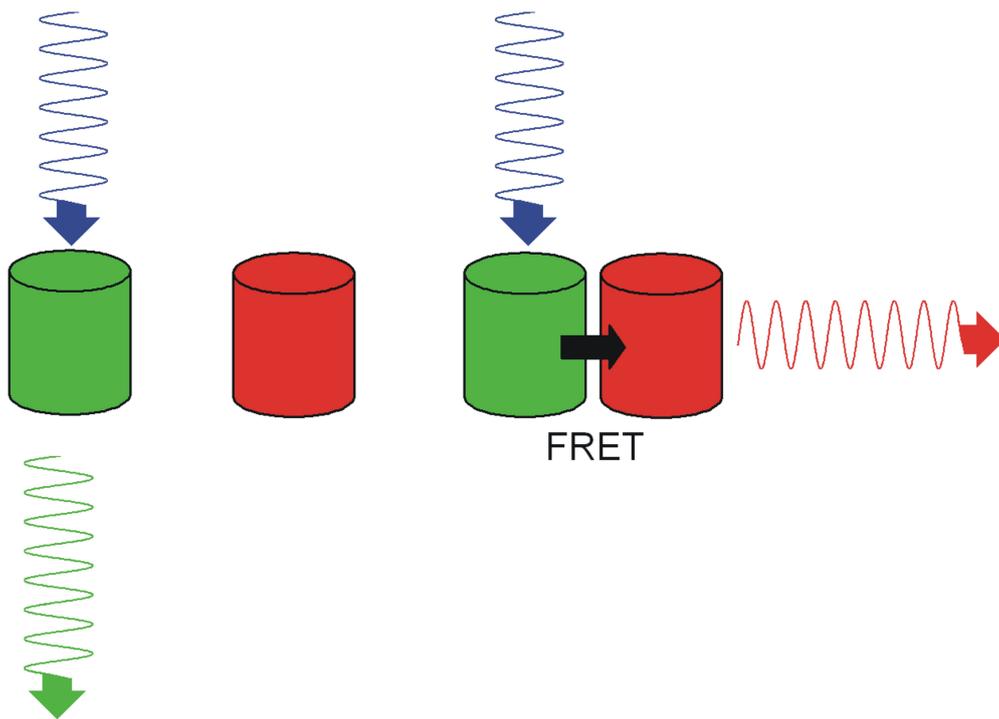


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung zweier Moleküle, die in hinreichend geringer Entfernung FRET zeigen. Energie wird dabei strahlungslos vom Donor zum Akzeptor transferiert. Hierbei emittiert der Akzeptor Licht. Für große Molekülabstände ist kein FRET möglich. Nach Anregung des Donors emittiert dieser selbst Photonen.

Die Effizienz des Energietransfers  $E$  beschreibt den Anteil der vom Donor absorbierten Energie, die auf den Akzeptor übertragen wird. Die FRET-Effizienz bezeichnet somit das Verhältnis der Transferrate durch FRET zur Summe der Zerfallskonstanten des Donors.

$$E = \frac{k_{FRET}}{k_{fl} + k_{IC} + k_{ISC} + k_{FRET}} \quad (3.18)$$

Die Ratenkonstante des Energietransfers  $k_{FRET}$  hängt von der Lebensdauer des Donors in Abwesenheit des Akzeptors  $\tau_D$ , dem Abstand der FRET Partner  $r$  und  $R_0$  ab:

$$k_{FRET} = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (3.19)$$

Damit beträgt die Effizienz  $E = 50\%$ , wenn der Abstand zwischen Donor und Akzeptor gleich dem Förster-Radius ist, d. h.  $r = R_0$ . Einen Zusammenhang zwischen der FRET-Effizienz und der Fluoreszenzlebensdauer ist gegeben durch Gleichung 3.20:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} = \frac{k_{FRET}}{\tau_D^{-1} + k_{FRET}} \quad (3.20)$$

Dabei bezeichnet  $\tau_{DA}$  die Lebensdauer des durch den Akzeptor gequenchten Donors und  $\tau_D$  die Lebensdauer des freien Donors. Die Anwendung von Gleichung 3.20 beschränkt sich auf Donor-Akzeptor-Paare mit konstanter Bindungslänge. Für variable Abstände zwischen Donor und Akzeptor verliert die Gleichung ihre Gültigkeit, da die entsprechende Ratenkonstante gemäß Gleichung 3.17 stark abstandsabhängig ist.

Das Einsetzen von Gleichung 3.19 in Gleichung 3.20 führt zu Gleichung 3.21.

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (3.21)$$

Anwendung findet FRET neben der molekularen Abstandsmessung insbesondere in der Strukturaufklärung, beispielsweise in der Untersuchung von Konformationsänderungen von Proteinen. Diese können durch geeignete Kopplung von Donor und Akzeptor erreicht werden. Die Konformationsänderungen können auch durch die Anwesenheit bestimmter Stoffe bedingt sein. Auf der Grundlage von FRET ist ein Biosensor für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen realisiert worden [86].

# Kapitel 4

## Zeitaufgelöste Spektroskopie

### 4.1 Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen (TCSPC)

Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen bieten Vorteile gegenüber stationären Messungen. Dies gilt zum Beispiel für Fälle, bei denen die zu untersuchenden Fluorophore ähnliche Absorptions- bzw. Emissionsspektren aufweisen, sich aber hinsichtlich ihrer spezifischen Fluoreszenzlebensdauern unterscheiden. Dadurch können die Fluoreszenzsignale dem entsprechenden Fluorophor zugeordnet werden.

Messungen der Fluoreszenzlebensdauer zeichnen sich durch eine hohe Sensitivität aus. Diese resultiert u. a. aus der Insensitivität gegenüber Fluktuationen der Amplituden des Anregungslichtes. Außerdem ist die Bestimmung von  $\tau$  über einen Bereich von etwa sieben Größenordnungen möglich. Dieser liegt zwischen 5 ps und 50  $\mu$ s.

Anwendungen für Lebensdauermessungen finden sich u. a. in der Untersuchung von Proteinen, Membranen und Zellen, der Beobachtung von Energietransfer zwischen Fluorophoren und in der Bestimmung von Ionenkonzentrationen.

Weitere Anwendungen zeitaufgelöster Methoden liegen in Untersuchungen, die Hinweise auf die Struktur der Probe geben. Diese können durch Kenntnis der Mechanismen erfasst werden, die die Lebensdauer beeinflussen (z. B. Quenchingmechanismen, FRET, etc.). Durch Labeln von Molekülen mit geeigneten Substituenten können Phänomene wie die Reorganisation der RNA untersucht werden [99].

Das in Abschnitt 4.2 beschriebene Verfahren der FLIM ermöglicht den orts aufgelösten Einsatz von Lebensdauermessungen. Dadurch eröffnen sich weitere Anwendungen der zeitaufgelösten Spektroskopie.

### 4.1.1 Prinzip des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens

Die Messungen der Fluoreszenzlebensdauern erfolgen über das 1961 entwickelte Verfahren des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens (*time-correlated single photon counting*, TCSPC) [100]. Die zwei gängigen Strategien sind die zeit- und die frequenzabhängige Methode.

Messungen über die frequenzabhängige Methode (= *frequency domain*) [101, 102], enthalten Informationen darüber, welcher Anteil des gemessenen Signals innerhalb eines Frequenzbandes liegt. Dabei wird die Probe mit einer intensitätsmodulierten Lichtquelle angeregt. Durch den Zeitversatz zwischen Absorption und Emission verzögert sich diese relativ zur modulierten Anregung. Aus der Charakteristik der Frequenzantwort, d. h. der Phasenverschiebung zwischen dem Fluoreszenzlicht bezüglich der modulierten Quelle, kann auf Eigenschaften der Probe geschlossen werden.

Bei Messungen mittels der zeitabhängigen Methode (= *time domain*) erfolgt eine periodisch gepulste Anregung der Probe. In dieser Arbeit erfolgt die Bestimmung der Lebensdauern ausschließlich über die zeitabhängige Methode. Dabei werden molekulare Systeme durch Laserpulse mit niedriger Intensität und hoher Frequenz angeregt. Die Ankunftszeiten der dadurch von der Probe emittierten einzelnen Photonen bezüglich des Anregungspulses werden aufgezeichnet [103]. Durch die Auswertung des aus den Ankunftszeiten der Photonen erstellten Histogramms ergeben sich die Parameter des Zerfalls der Probe, die präexponentiellen Faktoren und die Abklingzeiten [104, 105]. Abbildung 4.1 zeigt die Auftragung der emittierten Photonen als Funktion der Ankunftszeit.

Durch den Anregungspuls wird die Anzahl von  $N_0$  Molekülen aus dem elektronischen Grundzustand  $S_0$  in den angeregten Zustand  $S_1$  promoviert (Abbildung 3.1). Der Anregungspuls wird idealerweise als unendlich scharfer  $\delta$ -Puls betrachtet. Mit der Abweichung dieser Annahme in der experimentellen Betrachtung befasst sich Abschnitt 4.1.4. Die Depopulation des angeregten Zustandes erfolgt gemäß:

$$[S_1](t) = N(t) = N_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (4.1)$$

Dabei bezeichnet  $N(t)$  die Anzahl der Moleküle, die sich zum Zeitpunkt  $t$  im angeregten Zustand  $S_1$  befinden. Da die Fluoreszenzintensität  $F$  proportional zur Anzahl der angeregten Moleküle ist, gilt:

$$F(t) = F_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (4.2)$$

Abbildung 4.2 (links) zeigt die lineare Auftragung der Fluoreszenzintensität gegen

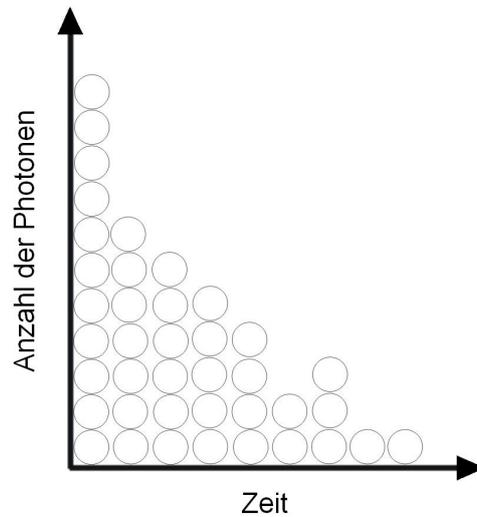


Abbildung 4.1: Auftragung der einzelnen detektierten Fluoreszenzphotonen in Abhängigkeit der Ankunftszeit. Aus dem resultierenden Histogramm nach einer Vielzahl an Ereignissen, kann die Fluoreszenzlebensdauer der Probe bestimmt werden.

die Ankunftszeit der Photonen. Logarithmieren von Gleichung 4.2 ergibt einen linearen Zusammenhang von Ankunftszeit  $t$  und Fluoreszenzintensität:

$$\ln \left( \frac{F_0}{F(t)} \right) = \frac{t}{\tau} \quad (4.3)$$

Die halblogarithmische Darstellung von Ankunftszeit und Fluoreszenzintensität, die einen linearen Verlauf der Kurve zeigt, ist dargestellt in Abbildung 4.2 (rechts). Der Betrag der Steigung der Kurve entspricht der inversen Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$  des Fluorophors.

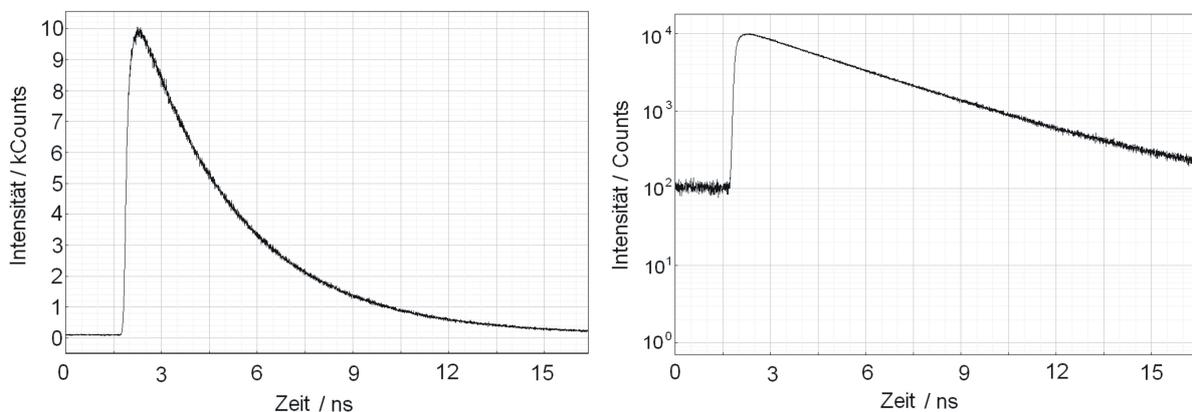


Abbildung 4.2: Lineare Auftragung der Fluoreszenzintensität gegen die Ankunftszeit (links). Halblogarithmische Darstellung der Intensität der emittierten Photonen in Abhängigkeit der Zeit (rechts).

Die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$  beschreibt die Zeitdauer, die sich das entsprechende Molekül durchschnittlich im angeregten Zustand befindet, bevor es unter Aussendung eines Fluoreszenzphotons wieder in den Grundzustand zurückkehrt. Die Lebensdauer bestimmt die Zeit, in der der Fluorophor im angeregten Zustand mit der Umgebung wechselwirken kann [98]. Gleichung 4.4 stellt einen Zusammenhang der Lebensdauer mit den Ratenkonstanten des Systems her:

$$\tau = \frac{1}{k_{rad} + k_{ns}} \quad (4.4)$$

Die Ratenkonstante  $k_{rad}$  beschreibt dabei gemäß dem Jablonski-Diagramm den strahlenden Übergang vom angeregten Zustand  $S_1$  in den Grundzustand  $S_0$ . Die Konstante  $k_{ns}$  fasst die nicht strahlenden Prozesse zusammen und ergibt sich aus Gleichung 4.5:

$$k_{ns} = k_{IC} + k_{ISC} \quad (4.5)$$

### 4.1.2 Pile-up

Voraussetzung für die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer eines Chromophors ist die Detektion maximal eines Photons pro Anregungszyklus. Erreicht ein zweites Photon innerhalb dieses Zeitintervalls den Detektor, führt dies zu einer Störung der Signalfunktion, die als *pile-up* bezeichnet wird [104]. Der Effekt tritt ein, wenn die Zählrate in der Größenordnung weniger Prozente der Frequenz des Anregungslichtes liegt. Durch die Totzeit des Detektors wird von zwei schnell hintereinander den Detektor erreichenden Photonen nur das erste gezählt. Das zweite, langsamere Photon wird nicht erfasst. Dadurch kommt es zur Messung einer scheinbar kürzeren Lebensdauer, als in Wirklichkeit vorliegt. Zur Vermeidung dieses Effekts sollte die Zählrate ein Prozent der Anregungsfrequenz nicht überschreiten [106, 107].

### 4.1.3 Reabsorption

Ein weiteres Phänomen, das Störungen in Lebensdaueremessungen verursachen kann, ist die Reabsorption. Diese Erscheinung tritt auf, wenn Absorptions- und Emissionsspektrum einer Probe überlappen. Moleküle werden durch die Absorption des Anregungslichts in den angeregten Zustand gebracht. Das von den angeregten Molekülen emittierte Licht wird von Molekülen im Grundzustand absorbiert und durch diese wiederum emittiert. Dadurch verändert sich die beobachtete Lebensdauer gegenüber der tatsächlichen Lebensdauer [108]. Reabsorption tritt insbesondere in Proben mit hohen

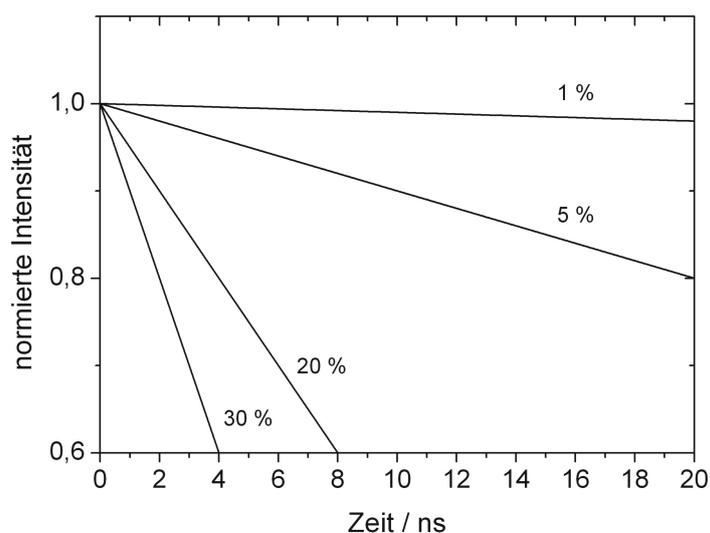


Abbildung 4.3: Störung des Signals bei Messungen durch zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen durch den Effekt des *pile-up*, der zu einer scheinbaren Verkürzung der gemessenen Lebensdauer führt [107]. Dargestellt sind Histogramme für verschiedene Detektionswahrscheinlichkeiten eines Photons nach einem Anregungspuls. Die mit 1 % gekennzeichnete Kurve bezieht sich auf die Detektion eines Fluoreszenzphotons pro 100 Anregungszyklen und beschreibt den tatsächlichen, ungestörten Verlauf.

Konzentrationen bzw. hohen optischen Dichten auf. Die Lebensdauer des Laserfarbstoffes DBPI (N,N'-bis(2,5-di-tert-butylphenyl)-3,4:9,10-perylen-bis(dicarboximid)) in Chloroform (Trichlormethan) beispielsweise ist stark konzentrationsabhängig [109]. Für Messungen der Fluoreszenzlebensdauer ist somit auf eine hinreichende Verdünnung der Proben zu achten.

#### 4.1.4 Instrumentelle Antwortfunktion

Der gemessene Fluoreszenzzerfall entspricht der Faltung der instrumentellen Antwortfunktion (*instrument response function*, IRF) und der tatsächlichen Fluoreszenzfunktion der Probe. Den Zusammenhang zwischen gemessenem Fluoreszenzzerfall, IRF und dem wirklichen Fluoreszenzzerfall beschreibt Gleichung 4.6:

$$S(t) = \int_0^{\infty} E(t')R(t-t')dt'. \quad (4.6)$$

In Gleichung 4.6 bezeichnet  $S(t)$  die Messung,  $E(t')$  die IRF und  $R(t-t')$  den theoretischen Zerfall. Zur fehlerfreien Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer müssen die aufgenommenen Daten entfaltet werden. Die meisten Analyseprogramme führen

dazu allerdings einen iterativen Rekonvolutionsprozess durch. Dadurch wird der wahre Verlauf anhand der experimentell gewonnenen IRF und der gemessenen Zerfallskurve berechnet.

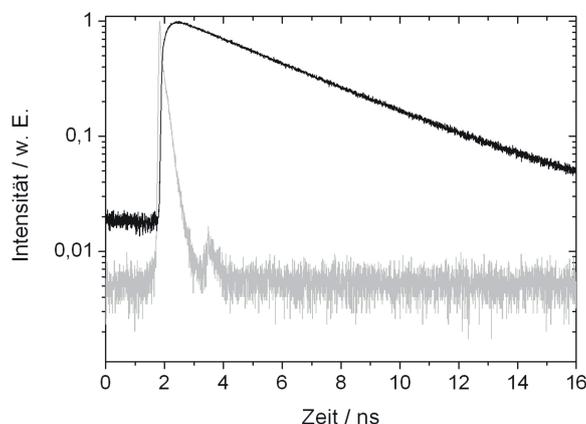


Abbildung 4.4: Experimentell bestimmte IRF (grau) und Zerfallskurve von Fluorescein (schwarz) bei der Anregungswellenlänge  $\lambda_{ex} = 470$  nm. Die Aufnahme der IRF erfolgt mit einer Streulösung, die nicht fluoresziert.

Zur Aufnahme der IRF wird die fluoreszierende Probe durch ein streuendes Medium oder einen Spiegel ersetzt. Es erfolgt die Aufzeichnung einer TCSPC-Kurve. Dabei werden die Photonen des Anregungslichtes detektiert. Die instrumentelle Antwortfunktion für die Entfaltung des Zerfalls der Fluoreszenz wird mit einer verdünnten Streulösung (*Ludox*, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) in Abhängigkeit der Laserwellenlänge und der Laserintensität aufgenommen. Die Halbwertsbreite beträgt für die beiden verwendeten Diodenlaser 200-300 ps. Abbildung 4.4 zeigt die experimentell bestimmte IRF und die Zerfallskurve für Fluorescein bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm.

Die Zeitcharakteristik von Detektoren ist wellenlängenabhängig. Dieser Umstand kann Lebensdauermessungen beeinflussen, da die IRF des Systems bei der Anregungswellenlänge des Lasers aufgenommen wird, die Detektion der Fluoreszenz jedoch bedingt durch die Stokesverschiebung bei einer anderen Wellenlänge erfolgt. Es existieren Methoden zur Korrektur dieses Effektes, auf die allerdings im Rahmen dieser Arbeit verzichtet wird, da diese Beeinträchtigungen hauptsächlich bei älteren Detektoren auftreten [110]. Weiterhin kann die Antwort des Detektors vom Ort abhängen, an dem die Photonen die Photokathode erreichen. Durch eine gute Justierung des Strahlengangs, die sich durch eine geringe FWHM der IRF äußert, kann diese Beeinträchtigung minimiert werden.

### 4.1.5 Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer

Die Auswertung der Messdaten zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer erfolgt softwareunterstützt am Computer (*FluoFit*, *Picoquant*, Berlin, Deutschland). Dies geschieht entweder durch monoexponentielle oder durch biexponentielle Fits gemäß folgender Gleichung:

$$I(t) = \sum a_i \exp(-t \cdot \tau_i^{-1}). \quad (4.7)$$

Hierbei bezeichnen  $a_i$  die präexponentiellen Faktoren, die den Intensitäten der emittierten Photonen der jeweiligen Komponente entsprechen und  $\tau_i$  die entsprechenden Fluoreszenzlebensdauern. Die präexponentiellen Faktoren geben den Anteil der Spezies mit der zugehörigen Lebensdauer an. Es gilt:

$$\sum a_i = 1 \quad (4.8)$$

Die Qualität der Fits wird durch den Parameter  $\chi^2$  ausgedrückt. Für alle Messungen wird auf  $\chi^2 < 1.2$  geachtet. Eine Ausnahme bilden die monoexponentiellen Fits der TCSPC Histogramme von GFP mit hohen Konzentrationen von Kupfer(II)-ionen, deren Verläufe biexponentiellen Charakter besitzen.

### 4.1.6 Aufbau

Die Anregung der Proben wird mit zwei gepulsten Laserdioden, die bei 405 nm bzw. 470 nm emittieren, realisiert (*LDH-P-C-405*, *LDH-P-C-470B*, *Picoquant*, Deutschland). Die Einkopplung in den Strahlengang erfolgt über eine Singlemode Faser und ein Objektiv (*Ultrafluor 10/0,2*, *Zeiss*, Deutschland). Beide Laser werden, soweit nicht anders angegeben, mit einer Frequenz von 40 MHz von einer Treibereinheit betrieben (*PDL 808 MC Sepia*, *Picoquant*, Deutschland). Das entspricht Pulsabständen von 25 ns. Die Laserpulse werden in die Küvette fokussiert. Die Messung des Fluoreszenzsignals findet in 90° Geometrie statt, um die unerwünschte Detektion von Anregungslicht zu unterdrücken. Alle Lebensdauermessungen erfolgen unter Berücksichtigung der Bedingung des magischen Winkels (*magic angle*). Dazu wird ein Polarisator in den Strahlengang eingebracht, der einen Winkel von 54,7° bezüglich der Polarisation des Lasers einnimmt. Dadurch wird die Detektion von Streulicht vermindert und Effekte der Rotation der Moleküle unterdrückt. Die Fluoreszenz wird mit einer Avalanche Photodiode detektiert (*PDM 100ct SPAD*, *Micro Photon Devices*, Italien). Eine Software (*SymPhoTime*, *Picoquant*, Deutschland) übernimmt die elektronische Auswertung der Signale. Der Strahlengang ist dargestellt in Abbildung 4.5.

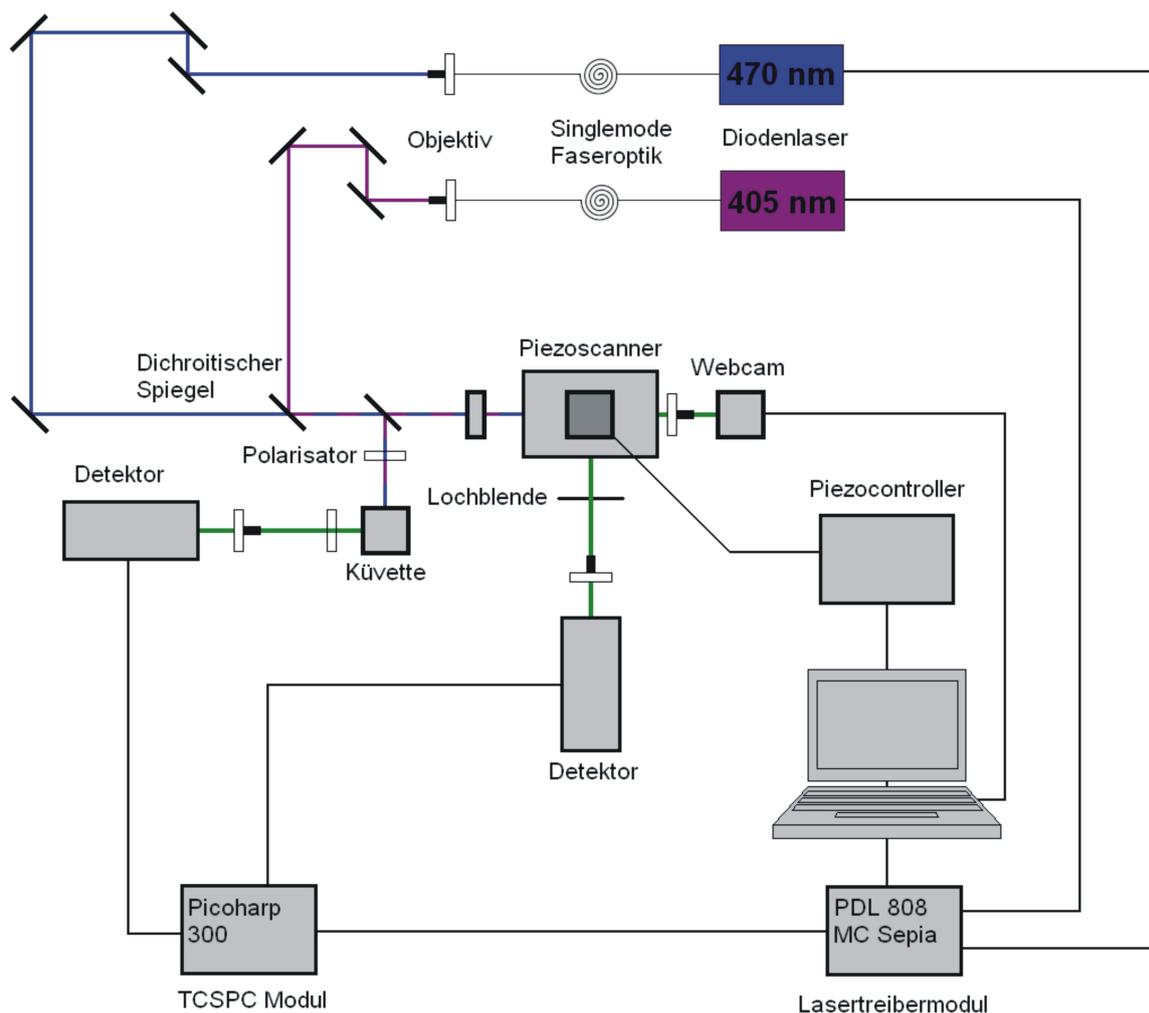


Abbildung 4.5: Skizze des Strahlengangs für den Aufbau des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens und der konfokalen Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie. Nach gepulster Anregung wird das spektral gefilterte Fluoreszenzlicht aus der Küvette in 90° Geometrie detektiert (TCSPC) oder eine Probe in einem inversen Mikroskop mit einem Piezoscanner gerastert (FLIM) und das Fluoreszenzsignal orts aufgelöst analysiert.

#### 4.1.7 Signalverarbeitung

Mit dem Laserpuls, der die Probe in den angeregten Zustand versetzt, wird ein Startsignal ausgesendet. Dadurch wird die Spannungsrampe des Time-to-Amplitude Converters (TAC) getriggert. Eine konstante Stromquelle lädt einen Kondensator auf. Diese Spannungsrampe wird durch das Eintreffen des ersten Fluoreszenzphotons der Probe gestoppt. Die Spannung, die vom TAC ausgegeben wird, ist proportional zur Zeitdifferenz zwischen Start und Stopp des Signals, d. h. sie entspricht der Dauer vom Aussenden des Anregungspulses bis zum Eintreffen des Fluoreszenzphotons beim Detektor.

## 4.2 Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie (FLIM)

Biomedizinische Bildgebungsverfahren [111] erfahren einen Aufschwung durch die Einführung des konfokalen Prinzips in der Mikroskopie [112]. Ein weiterer wesentlicher Schritt in der Entwicklung der Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie ist die Betrachtung der Fluoreszenzlebensdauer als weiterem Parameter neben der Fluoreszenzintensität [113]. Eine geeignete Methode, das Prinzip des TCSPC in Küvetten, räumlich aufgelöst durchzuführen, ist die konfokale Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie (*fluorescence lifetime imaging microscopy*, FLIM). Bei Untersuchungen autofluoreszierender Komponenten von Gewebe bietet die Betrachtung der Fluoreszenzlebensdauer beispielsweise Vorteile gegenüber einer Betrachtung der Fluoreszenzintensität. Der Grund hierfür liegt in der geringen Fluoreszenzintensität der Autofluoreszenz. Durch die spezifischen Lebensdauern können jedoch die entsprechenden Komponenten bestimmt werden [114].

Der Einsatz von FLIM besitzt gegenüber konventioneller Fluoreszenzmikroskopie mehrere Vorteile. Zum einen lassen sich sehr dünne Schichten auch in dicken fluoreszierenden Schichten abbilden. Damit ist es weiterhin möglich, dreidimensionale Bilder mit hoher Auflösung zu erstellen. Diese weisen eine geringe Unschärfe durch Licht auf, das nicht aus der Abbildungsebene stammt [115]. Zum anderen resultieren für quantitative Messungen Vorteile aus der hohen Insensitivität gegenüber Photobleichen, Abschirmung, Absorption durch die Probe und Schwankungen in der Laserintensität.

Die Anwendung von FLIM für die Messung von Ionenkonzentrationen zeichnet sich im Vergleich zu ratiometrischen Verfahren dadurch aus, dass quantitative Ergebnisse ohne umständliche Kalibration erfolgen. Die Möglichkeit der Unterscheidung der freien und der gebundenen Form der Fluoreszenzindikatoren über unterschiedliche Fluoreszenzlebensdauern erlaubt eine selektive und quantitative Abbildung. Einsatz gefunden hat FLIM in der *in vivo* Bestimmung des pH-Wertes [116, 117], der  $\text{Cl}^-$ -Konzentration [118], sowie in der Quantifizierung von  $\text{Ca}^{2+}$  [119, 120].

Auch für die Abbildung von FRET eignet sich FLIM. Dabei wird die Fluoreszenzlebensdauer des Donors durch Energietransfer auf den Akzeptor verkürzt [121]. Die Messung der Lebensdauer ermöglicht somit die Detektion der beiden Zustände. Vorteil gegenüber Verfahren, die auf der Messung der Fluoreszenzintensität basieren, ist die Unabhängigkeit der Lebensdauer von der Konzentration der Fluorophore.

Außerdem können durch den Einsatz von FLIM Hinweise über Änderungen des lokalen Brechwertes bestimmt werden [122].

### 4.2.1 Konfokales Prinzip

In konventionellen Lichtmikroskopen wird neben dem Licht aus der Fokalebene auch Licht, das außerhalb dieser Ebene entstammt, abgebildet (Abbildung 4.6). Das nicht in der Ebene liegende Licht führt zur Unschärfe des Bildes. Das detektierte Licht stellt eine Überlagerung von Licht aus der Ebene und von Licht, das nicht aus der Ebene stammt, dar.

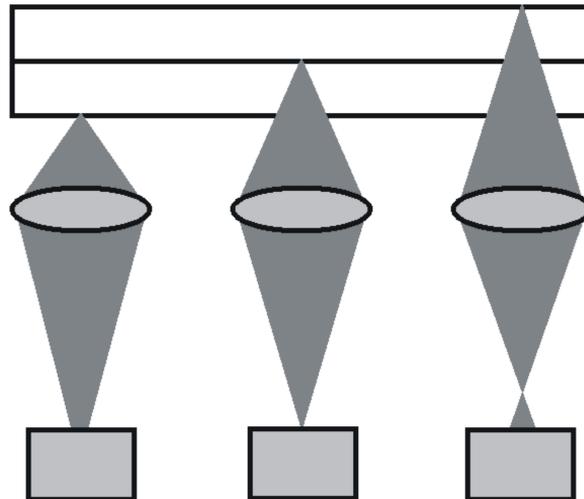


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung des Einsammelns von Fluoreszenzlicht in konventionellen Mikroskopen. Licht, das nicht der Fokalebene entstammt, führt zur Unschärfe des Bildes.

Das konfokale Prinzip beschreibt die Möglichkeit, Anregungslicht in die Probe zu fokussieren und emittiertes Licht ausschließlich aus einem kleinen Volumen in der gewünschten Ebene zu detektieren. Fluoreszenzlicht kann nur diesem Fokuspunkt entstammen. Nachdem das Fluoreszenzlicht vom Objektiv eingesammelt ist, gelangt es zum Detektor. Im Strahlengang befindet sich eine Lochblende, das sogenannte Pinhole, das verhindert, dass Licht, das nicht der Fokalebene entstammt, den Detektor erreicht. Das konfokale Prinzip ist dargestellt in Abbildung 4.7.

### 4.2.2 Aufbau

Zur Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie wird ein Spiegel aus dem Strahlengang entfernt, so dass der Laserstrahl nicht zum TCSPC-Aufbau, sondern über ein Periskop in ein inverses Mikroskop (*Axiocvert 200*, Zeiss, Deutschland) umgelenkt wird. Ein Piezo-scanner (*PI E-710*, Physik Intrumente, Deutschland) realisiert die Ortsauflösung der Messungen. Neben der spektralen Filterung des Fluoreszenzlichts durch geeignete

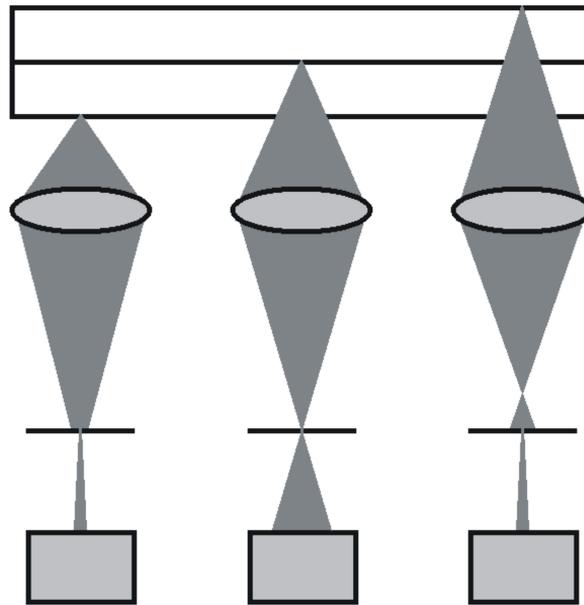


Abbildung 4.7: Darstellung des konfokalen Prinzips. Im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie wird Licht, das nicht aus der Fokalebene stammt, durch die Lochblende am Erreichen des Detektors gehindert.

Fluoreszenzfilter, erfolgt eine räumliche Filterung durch eine in den Strahlengang eingebrachte Lochblende. Grundlage hierfür ist das Prinzip der konfokalen Mikroskopie [123].

Den Strahlengang im Mikroskop zeigt die Abbildung 4.8. Das Anregungslicht wird über einen dichroitischen Spiegel (z405/470rpc, AHF Analystechnik, Deutschland) in das Objektiv geleitet, das den Strahl auf die Probe fokussiert. Das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht gelangt über das Objektiv ins Mikroskop. Nach dem Passieren des dichroitischen Spiegels kann das Fluoreszenzlicht entweder mittels eines Spiegels über eine Linse auf die Webcam geleitet oder auf den Detektor fokussiert werden.

Für die Messungen werden verschiedene Objektive verwendet (C-Apochromat 40x/1,2WKorr, C-Apochromat 63x/1,2WKorr,  $\alpha$ -Plan-Fluar 100x/1,45 Oil, Zeiss, Deutschland). Nach dem Austritt aus dem Mikroskop wird das Fluoreszenzlicht durch eine Lochblende mit einem Durchmesser von 50  $\mu\text{m}$  und zwei Linsen auf die aktive Fläche des Detektors fokussiert.

### 4.2.3 Ergebnisse aus FLIM Messungen

FLIM-Bilder setzen sich aus einer Reihe von Punktmessungen zusammen. Diese werden durch Abrastern der Probe aufgenommen und zu einem Gesamtbild zusammen-

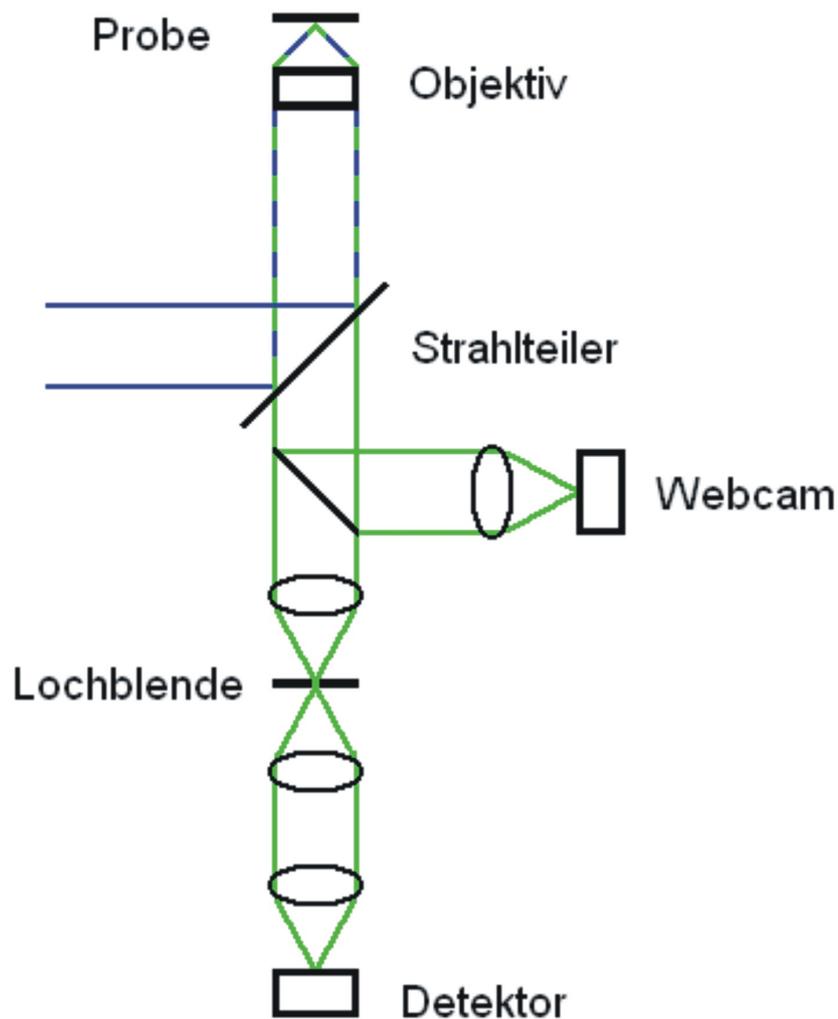


Abbildung 4.8: Skizze des Strahlengangs im Mikroskop für FLIM-Messungen. Das parallele Anregungslicht wird über einen dichroitischen Spiegel in das Objektiv gelenkt und auf die Probe fokussiert. Das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht wird vom Objektiv eingesammelt und passiert aufgrund der Rotverschiebung den dichroitischen Spiegel. Das Licht wird mit einer Linse auf eine Lochblende fokussiert und gelangt anschließend zum Detektor.

gesetzt. Jede Punktmessung entspricht einer Lebensdauermessung, die Informationen über die Fluoreszenzintensität und die Fluoreszenzlebensdauer an dieser Stelle liefert. Es besteht die Möglichkeit einer Intensitätsabbildung, bei der ausschließlich die lokale Fluoreszenzintensität durch die Helligkeit dargestellt wird. Abbildung 4.9 zeigt das Intensitätsbild einer Tabakzelle, die GFP6 exprimiert. Hier sind die Bereiche der Zelle mit hoher Fluoreszenzintensität, an denen GFP exprimiert wird, gut zu erkennen. Das sind der Zellkern und das Zytosol.

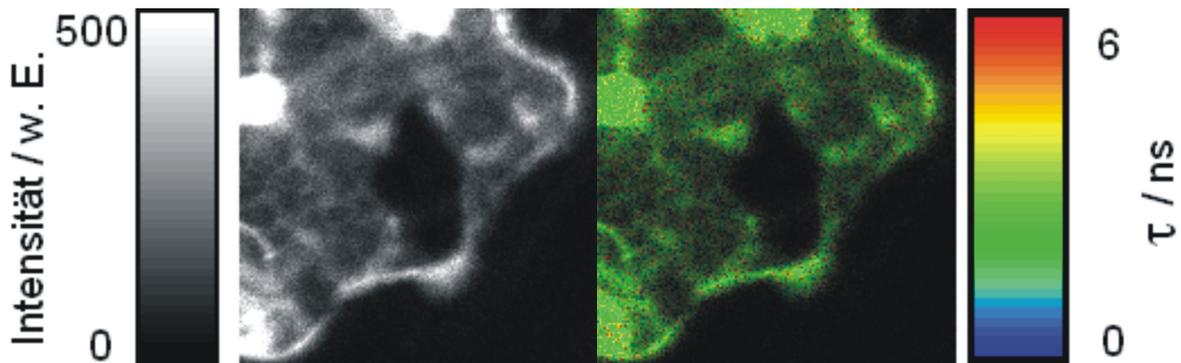


Abbildung 4.9: Konfokale Mikroskopie an einer Tabakzelle, die GFP6 exprimiert. Dargestellt ist die Intensitätsabbildung (links) und das FLIM Bild (rechts) der Aufnahme, das neben der Fluoreszenzintensität auch die Fluoreszenzlebensdauer zeigt.

FLIM-Bilder ergeben sich durch die Erweiterung des Intensitätsbildes um die Fluoreszenzlebensdauer. Dazu wird dieser Parameter farblich kodiert dargestellt. In Abbildung 4.9 entspricht blau einer kurzen Lebensdauer bis etwa einer Nanosekunde, grün dem Bereich von zwei bis vier Nanosekunden. Rot entspricht einer hohen Lebensdauer von fünf bis sechs Nanosekunden. Wie beim Intensitätsbild entspricht die Helligkeit der Fluoreszenzintensität, wobei helle Stellen einer höheren Intensität entsprechen als dunkle Stellen. Auch bei der FLIM-Abbildung sind die Bereiche der Zelle mit einer hohen GFP-Konzentration besonders hell. Die grüne Färbung entspricht einer Lebensdauer von etwa drei Nanosekunden. Damit lassen sich durch FLIM beispielsweise räumlich und zeitlich aufgelöste Änderungen der Lebensdauer beobachten.



# Kapitel 5

## Material und Methoden

### 5.1 Mutationen in GFP

Tabelle 5.1 zeigt die Abkürzungen für die in dieser Arbeit verwendeten Varianten von GFP. Soweit nicht anders angegeben erfolgen die Mutationen in GFP, das *CycleIII* Konstrukte enthält [124], das bedeutet die Mutationen Phe99Ser, Met153Thr und Val163Ala. In dieser Nomenklatur bezeichnet die erste Buchstabensequenz die Aminosäure im Dreibuchstabencode, die sich natürlicherweise an der durch die folgende Zahl bezeichneten Position des Moleküls befindet. Der Buchstabencode, der auf die Zahl folgt, stellt die Aminosäure dar, die die ursprüngliche Aminosäure ersetzt.

Variante	Mutationen
eGFP	-
QC 1	Glu95Cys + Arg109Cys in GFP Cys48Ser
QC 2	Leu221Cys + Ala206Cys in GFP Cys48Ser
QC 3	Ser147Cys + Gln204Cys in GFP Cys48Ser
QC 4	Thr203Phe + Ser204Cys in GFP Cys48Ser + Asn149Cys
fQC 5	Thr203Phe + Glu222Gln
T203H	Thr203His
C48S	Cys48Ser
S65T	Ser65Thr

Tabelle 5.1: Übersicht über die Mutationen der verwendeten GFP-Varianten und deren Bezeichnungen.

## 5.2 Fluoreszenzproteine

Rekombinante Fluoreszenzproteine sind hergestellt im *E. coli* Bakterienstamm BL21 (DE3) unter Kontrolle des T7 Promoters. 250 ml einer Kultur in Luria-Bertani Medium unter Zugabe von Ampicillin (100 µg/ml) werden bei 37 °C unter kontinuierlichem Schütteln bei 220 Umdrehungen pro Minute inkubiert, bis die OD<sub>600</sub> 0,6-0,8 beträgt. Das entspricht der erforderlichen Bakterienzahl pro Milliliter Medium. Die Expression wird durch die Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) in einer finalen Konzentration von 1 mM induziert. Nach weiteren 23 Stunden des Schüttelns mit 170 Umdrehungen pro Minute bei 20 °C wird die Kultur geerntet. Die Proteine, die ein His<sub>6</sub>-Tag am C-Terminus besitzen, werden mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatographie (IMAC) unter Verwendung von Ni<sup>2+</sup>-NTA (Nitrilotriessigsäure) durch Säulen aufgereinigt. Die Reinheit des Proteins wird mit SDS (*sodium lauryl sulfate*) Gelelektrophorese und Coomassie Färbung geprüft. Die Proben werden in einem Phosphatpuffer bei pH 7, (NaCl 115 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4 mM) aufbereitet.

Das gelb fluoreszierende FP eYFP besitzt einen C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag, der auf eine Enteropeptidase Schnittstelle folgt (Asp<sub>4</sub>Lys). Die Abtrennung des His<sub>6</sub>-Tags von einer Teilprobe des eYFP, erfolgt gemäß den Anweisungen des Herstellers unter Verwendung des Tag-off<sup>TM</sup>rEK Cleavage/Capture Kit (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) bei einer Inkubationszeit von 20 Stunden. Das His<sub>6</sub>-Tag Peptid wird durch wiederholte, immobilisierte Metallaffinitätschromatographie mittels Hisselect®Säulen (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) aus der Lösung entfernt. Die Reinheit des eYFP nach dem Abtrennen des His<sub>6</sub>-Tags wird durch SDS Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung bestätigt. Die Durchführung dieser Arbeiten erfolgt durch Silke Altmeier.

## 5.3 Präparation der Proben

Gepufferte Stammlösungen aller verwendeten GFP-Mutanten werden mit destilliertem Wasser verdünnt, um die unerwünschte Bildung von Kupferkomplexen zu vermeiden, die die tatsächliche [Cu<sup>2+</sup>] beeinträchtigen würde. Diese könnten experimentell zu scheinbar geringeren [Cu<sup>2+</sup>] führen. [GFP] liegt bei allen Messungen im submikromolaren Bereich.

Für die Titrationsexperimente und für die Absorptionsmessungen werden die Komplexe  $Cu(SO_4) \bullet 5H_2O$ ,  $Ni(SO_4) \bullet 7H_2O$ ,  $Co(SO_4) \bullet 7H_2O$ ,  $Fe(SO_4) \bullet 7H_2O$ ,  $Mn(SO_4) \bullet H_2O$  und  $Zn(SO_4) \bullet 7H_2O$  in destilliertem Wasser jeweils zu 1 M Stammlösungen auf-

gelöst, die dem Bedarf entsprechend sukzessiv verdünnt werden.

Absorptionsspektren von  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  sind in einer  $1 \cdot 10^{-4}$  M Metallionenkonzentration und einer  $5 \cdot 10^{-4}$  M Konzentration von Poly-l-Histidin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) aufgenommen. Poly-l-Histidin wird verwendet, um die Seitenketten des His<sub>6</sub>-Tags zu simulieren, das die Bindungsstelle des Metallions an das GFP-Molekül darstellt.

## 5.4 *E. coli*-Zellen

*E. coli*-Zellen, die für die Expression der GFP-Mutante T203H, die ein His<sub>6</sub>-Tag besitzt, verwendet werden, werden auf Luria-Bertani-Ampicillin-Agar-Kulturplatten wachsen gelassen. Die Bakterien sind für die FLIM-Messungen auf einem Deckglas in Agarosegel immobilisiert. Die Inkubation mit der  $\text{Cu}^{2+}$  Lösung erfolgt durch die Zugabe eines Tropfens einer 1,0 M  $\text{Cu}^{2+}$  Stammlösung zu den Zellen. Dadurch ergibt sich eine finale  $[\text{Cu}^{2+}]$  von etwa 0,5 M.

## 5.5 Tabakzellen

Für die Expression von DIG3-GFP-6xHis Fusion in Epidermiszellen von Tabakblättern, wird *Solanum lycopersicum* (Tomate) cv. *Bonner Beste DIG3* [125] aus genomischer DNA durch PCR isoliert. Dies erfolgt unter Verwendung folgenden Primer Paares: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTATGACTGGAGGCAAAGAAATC-3' und 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTGGAAACCTTACAACCTACGCA-3'. Dabei ist die genspezifische Sequenz unterstrichen.

Die Aminosäuresequenz von DIG3-GFP-6xHis Fusion lautet: ATG AGT AAA GGA GAA GAA CTT TTC ACT GGA GTT GTC CCA ATT CTT GTT GAA TTA GAT GGT GAT GTT AAT GGG CAC AAA TTT TCT GTC AGT GGA GAG GGT GAA GGT GAT GCA ACA TAC GGA AAA CTT ACC CTT AAA TTT ATT TGC ACT ACT GGA AAA CTA CCT GTT CCA TGG CCA ACC CTG GTC ACC ACC CTG ACC TAC GGC GTG CAG TGC TTC TCC CGT TAC CCT GAT CAT ATG AAG CGG CAC GAC TTC TTC AAG AGC GCC ATG CCT GAG GGA TAC GTG CAG GAG AGG ACC ATC TTC TTC AAG GAC GAC GGG AAC TAC AAG ACA CGT GCT GAA GTC AAG TTT GAG GGA GAC ACC CTC GTC AAC AGG ATC GAG CTT AAG GGA ATC GAT TTC AAG GAG GAC GGA AAC ATC CTC GGC CAC AAG TTG GAA TAC AAC TAC AAC TCC CAC AAC GTA TAC ATC ATG GCC GAC AAG CAA AAG AAC GGC ATC AAA GCC AAC TTC AAG ACC CGC CAC AAC ATC GAA GAC GGC GGC GTG CAA CTC GCT

GAT CAT TAT CAA CAA AAT ACT CCA ATT GGC GAT GGC CCT GTC CTT TTA  
CCA GAC AAC CAT TAC CTG TCC ACA CAA TCT GCC CTT TCG AAA GAT CCC  
AAC GAA AAG AGA GAC CAC ATG GTC CTT CTT GAG TTT GTA ACA GCT GCT  
GGG ATT ACA CAT GGC ATG GAT GAA CTA TAC AAA CAC CAC CAC CAC CAC  
CAC TAA

Das PCR-Fragment ist in den pDONR207-Vektor (*Invitrogen*, Deutschland) subkloniert und in den pMDC83-Vektor eingeführt [126], wobei die Expressionskassette 35-*Spromoter::DIG3-GFP-6xHis::NOSTerminator* erzeugt wird. Das Konstrukt wird in den Bakterienstamm *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (pGV2260) eingeführt. *Nicotiana bentamiana* (Tabak)-Blätter sind mit einer *Agrobacterium*-Suspension infiltriert in einer Infiltrationslösung (2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Deutschland), 0,5 % Glukose (*Duchefa*, Niederlande), 50 mM MES (*Duchefa*, Niederlande), 100 µM Acetosyringon (*Sigma-Aldrich*, Deutschland), pH 5,6) bei OD<sub>600</sub> = 0,8. Die Infiltration erfolgt mit einer Spritze auf der Unterseite der Blätter. Die transformierten Pflanzen werden für eine Zeit von 72 Stunden bei 25 °C in einem Inkubator (E-41L2, *Percival*, USA) unter simulierten Tagesbedingungen aufbewahrt, das bedeutet 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit. Die Präparation der Tabakzellen erfolgt durch Dr. Tzvetina Brumbarova.

## 5.6 Chromophorbildungseffizienz

Für die Experimente zur Bestimmung der Bildungseffizienz der Chromophore in Mutanten von GFP wird der Farbstoff NTA-Atto488 verwendet (*Atto-Tec*, Siegen, Deutschland). Die benutzten Proben werden durch die entsprechende Verdünnung einer  $1,0 \cdot 10^{-3}$  M Stammlösung des Farbstoffes in destilliertem Wasser hergestellt.

Die monomere GFP-Mutante mCherry (*Biocat*, Heidelberg, Deutschland), besitzt ein N-terminales His<sub>6</sub>-Tag. Für die Messungen wird eine  $3,5 \cdot 10^{-5}$  M Stammlösung von mCherry in destilliertem Wasser angesetzt. Zum Labeln von NTA-Atto488 werden entsprechende Verdünnungen der Stammlösung angesetzt.

Die Trennung von überschüssigem freien Farbstoff und gelabeltem GFP erfolgt durch Zentrifugieren (3-18K, Sigma Laborzentrifugen, Deutschland) unter Verwendung eines Filters mit einer Ausschlussgrenze von 10000 Da. Die Zentrifugation erfolgt für eine Dauer von fünf Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute.

## 5.7 Absorptionsspektrometer

Sämtliche Absorptionsspektren sind mit einem Zweistrahl-UV/Vis-Spektrophotometer (V-650, Jasco, Deutschland) aufgenommen. Die optischen Dichten der vermessenen Proben liegen in allen Fällen unter 0,05, die Auflösung bei einem Nanometer.

## 5.8 Fluoreszenzspektrometer

Die Aufnahme der Anregungs- und Emissionsspektren erfolgt bei allen Messungen mit einem Fluoreszenzspektrometer (FP-6500, Jasco, Deutschland) in 90° Geometrie. Die Auflösung beträgt für alle Spektren einen Nanometer.



# Kapitel 6

## Mathematisches Modell zur Bestimmung von $[\text{Cu}^{2+}]$ aus Messungen der Lebensdauer von GFP

### 6.1 Ratiometrisches Prinzip: Quantifizierung durch Spektroskopie

Im Gegensatz zu makroskopischen Systemen stößt die Quantifizierung von Substanzen in Zellen über konventionelle Verfahren auf schwerwiegende Probleme. Dies gilt z. B. für die elektrochemische Bestimmung des pH-Wertes, die selbst unter Verwendung von Mikroelektroden *in vivo* praktisch nicht realisierbar ist. Eine Lösung für diese Schwierigkeit ist die ratiometrische Messung mittels spektroskopischer Methoden, z. B. der Absorptions- und der Fluoreszenzemissionsspektroskopie. Dabei bildet der eingesetzte Farbstoff einen Komplex mit dem Analyten oder ändert über intramolekulare Reorganisation dessen Struktur. Dies führt dazu, dass sich die beiden Spezies in ihren photophysikalischen Eigenschaften unterscheiden.

Ratiometrische Verfahren beruhen auf der Abhängigkeit des Farbstoffspektrums von der Konzentration des Analyten. Der Farbstoff weist dabei zwei Absorptions- oder Emissionswellenlängen auf, die jeweils für die freie und die komplexierte Form, bzw. die neutrale und die anionische Form charakteristisch sind. Abbildung 6.1 zeigt den Einfluss des pH-Wertes auf das Absorptionsspektrum des Farbstoffes HPTS (8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonat, Pyranin).

Das Vorgehen zur Konzentrationsbestimmung über das ratiometrische Prinzip eines Analyten erfolgt exemplarisch für die pH-Messung. Dabei wird die Absorption  $A$  an zwei Wellenlängen  $\lambda_1$  und  $\lambda_2$  betrachtet. Der Quotient aus  $A(\lambda_1)$  und  $A(\lambda_2)$  bildet

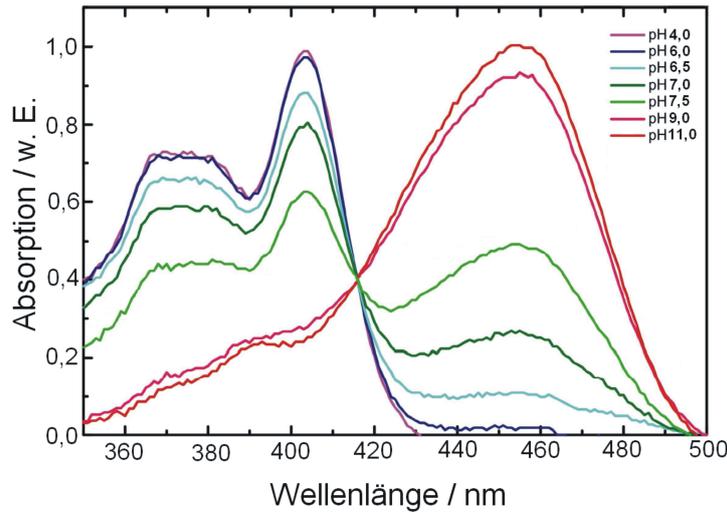


Abbildung 6.1: Absorptionsspektren des Fluoreszenzfarbstoffes HPTS in Abhängigkeit des pH-Wertes. Die Extinktionskoeffizienten betragen  $\epsilon_{max} = 20 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  für die neutrale Form und  $\epsilon_{max} = 24 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  für die anionische Form [127].

dabei das Verhältnis  $R$  gemäß:

$$R = \frac{A(\lambda_1)}{A(\lambda_2)}. \quad (6.1)$$

Dabei setzt sich die Intensität für jede Wellenlänge aus der Summe der beiden Spezies zusammen. Unter Berücksichtigung von  $A = \epsilon \cdot c \cdot d$  kann Gleichung 6.1 damit umgeformt werden zu:

$$R = \frac{\epsilon_{RH}(\lambda_1) \cdot [RH] \cdot d + \epsilon_{R^-}(\lambda_1) \cdot [R^-] \cdot d}{\epsilon_{RH}(\lambda_2) \cdot [RH] \cdot d + \epsilon_{R^-}(\lambda_2) \cdot [R^-] \cdot d}. \quad (6.2)$$

Hierbei bezeichnet  $d$  die Schichtdicke,  $\epsilon$  bezeichnet den molaren Extinktionskoeffizienten der entsprechenden Form. Über das Massenwirkungsgesetz  $K_S = \frac{[H^+] \cdot [R^-]}{[RH]}$  können die Konzentrationen von  $[RH]$  und  $[R^-]$  eliminiert werden.

$$R = \frac{\epsilon_{RH}(\lambda_1) \cdot [H^+] + \epsilon_{R^-}(\lambda_1) \cdot K_S}{\epsilon_{RH}(\lambda_2) \cdot [H^+] + \epsilon_{R^-}(\lambda_2) \cdot K_S} \quad (6.3)$$

Gleichung 6.3 ist unabhängig von der Schichtdicke des Systems, was insbesondere für Anwendungen *in vivo* wichtig ist. Weiterhin ist die Gleichung von den Konzentrationen unabhängig. Problematisch ist jedoch die Ungenauigkeit der absoluten Extinktionskoeffizienten, die zu Fehlern in der Quantifizierung führt. Aus diesem Grund ist die Durchführung einer Kalibrationsmessung notwendig. Diese wird für die Grenzbedingungen maximaler  $[RH]$  und maximaler  $[R^-]$  durchgeführt. Es gilt:

$$R_{max} = \frac{\epsilon_{RH}(\lambda_1)}{\epsilon_{RH}(\lambda_2)} = \frac{A_{RH}(\lambda_1)}{A_{RH}(\lambda_2)} \text{ und } R_{min} = \frac{\epsilon_{R^-}(\lambda_1)}{\epsilon_{R^-}(\lambda_2)} = R_{min} = \frac{A_{R^-}(\lambda_1)}{A_{R^-}(\lambda_2)}.$$

Daraus ergibt sich folgende Gleichung:

$$R = R_{min} + (R_{max} - R_{min}) \cdot \frac{[H^+]}{[H^+] + \frac{A_{R^-}(\lambda_2)}{A_{RH}(\lambda_2)} \cdot K_S}. \quad (6.4)$$

Der dynamische Bereich entspricht der Differenz von  $R_{max}$  und  $R_{min}$ . Falls dieser Bereich groß ist führt das zu einer höheren Genauigkeit in den Messungen, da in diesem Fall größere absolute Änderungen auftreten. Unter Berücksichtigung von  $K'_S = K_S \cdot \frac{A_{R^-}(\lambda_2)}{A_{RH}(\lambda_2)}$  ergibt sich aus Gleichung 6.4:

$$[H^+] = K'_S \cdot \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} = K_S \cdot \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \cdot \frac{\epsilon_{R^-}(\lambda_1)}{\epsilon_{RH}(\lambda_1)} \quad (6.5)$$

Zur pH-Bestimmung kann obige Gleichung durch logarithmieren in eine entsprechende Form gebracht werden.

$$pH = pK'_S + \log \left[ \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right] \quad (6.6)$$

Weist das betrachtete System einen isosbestischen Punkt auf, so kann der Zusammenhang vereinfacht werden. Der Grund hierfür liegt in der Tatsache, dass das Verhältnis der Absorbanz von  $RH$  bzw.  $R^-$  zur Absorbanz am isosbestischen Punkt für den jeweiligen pH-Wert konstant ist. Diese vereinfachte Betrachtung lässt sich beschreiben für  $RH$  durch:

$$R = \frac{A_{\lambda_{max}(RH)}}{A_{\lambda_{iso}}}. \quad (6.7)$$

Analog ergibt sich für  $R^-$ :

$$R = \frac{A_{\lambda_{iso}}}{A_{\lambda_{max}(R^-)}}. \quad (6.8)$$

Damit kann die Bestimmung des pH-Wertes über Absorptionsmessungen des Farbstoffes HPTS durchgeführt werden. Durch den Einsatz anderer Farbstoffe lassen sich mit diesem Prinzip eine Reihe an Substanzen, wie z. B.  $Ca^{2+}$ , quantifizieren [128].

Das ratiometrische Verfahren kann auf die Fluoreszenzemission übertragen werden. Dazu wird die Absorbanz durch die Fluoreszenzintensität ersetzt. Damit verbunden ist jedoch die Messung der Probe bei zwei verschiedenen Anregungswellenlängen, die meist durch die apparativen Gegebenheiten bestimmt sind. Dies ist insbesondere für orts aufgelöste Messungen mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. Der Grund

hierfür liegt vor allem in der Zeit, die eine Abbildung benötigt. Die Darstellung bei der zweiten Wellenlänge erfolgt zeitlich versetzt, so dass sich die Verhältnisse in der Probe in der Zwischenzeit unter Umständen verändert haben können.

Ein wesentlicher Nachteil dieses Verfahrens liegt in der Anwendung in Zellen. Probleme bereiten die Einbringung des Farbstoffes in die Zellen und dessen potentielle Giftigkeit. Durch den Einsatz von Fluoreszenzproteinen, die genetisch in Zellen exprimiert werden können, lassen sich diese Nachteile beheben.

Ein weiteres Problem ergibt sich in Schwankungen der Intensität, die durch die Umgebung hervorgerufen werden. Das führt dazu, dass einem Intensitätswert keine absolute Konzentration zugeordnet werden kann. Somit ist stets eine Kalibrationsmessung erforderlich, die unter den gleichen Bedingungen erfolgen muss, wie sie bei der eigentlichen Messung vorliegen [129]. Dies ist insbesondere für Untersuchungen *in vivo* schwer zu realisieren. Fehler ergeben sich z. B. durch Photobleichen.

Eine Möglichkeit diese Probleme zu überwinden, bietet die Betrachtung der Fluoreszenzlebensdauer. Diese ist unabhängig von der Konzentration des Fluorophors. Durch den Einsatz von Fluoreszenzproteinen lässt sich dieser zudem nicht invasiv in die Zelle einbringen. In den nächsten Abschnitten wird ein Verfahren beschrieben, das auf der Titration der Lebensdauer beruht.

## 6.2 Herleitung über das Massenwirkungsgesetz

Der Verlauf einer Fluoreszenztitration verhält sich analog zum Verlauf einer konventionellen Titration. Dies entspricht zunächst den Erwartungen, da die Fluoreszenzintensität proportional zur Anzahl der fluoreszierenden Moleküle, also der Konzentration der Fluorophore, ist. Der Verlauf einer Titration der Fluoreszenz ist in der Literatur beschrieben [130]. Dieser Ansatz beschränkt sich allerdings auf die Titration der Fluoreszenzintensität und ist bisher nicht auf die Fluoreszenzlebensdauer übertragen. Außerdem gilt er nur unter der Prämisse, dass die Konzentration des freien Liganden der Gesamtkonzentration der eingesetzten Liganden entspricht. Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer Methode, die ohne diese Annahme auskommt, welche die reale Situation nur bedingt wiedergibt. Auf der Grundlage des Massenwirkungsgesetzes wird ein Modell entwickelt, das sich für Titrationsen von Fluorophoren auf der Grundlage der Lebensdauer eignet. Die abgeleitete Formel wird zur Analyse der experimentell bestimmten Werte in Küvettenexperimenten herangezogen. Bei der *in vivo* Quantifizierung von  $[Cu^{2+}]$  ist die Konzentration von GFP in den Zellen unbekannt. Daher ist es erforderlich eine in Abschnitt 6.6 beschriebene GFP-Konzentration nicht

zu überschreiten. Für den Fall geringer [GFP] kann eine vereinfachte Titrationsformel zur Bestimmung von  $[Cu^{2+}]$  angewendet werden.

Die Möglichkeit den Verlauf einer Lebensdauertitration mathematisch zu beschreiben, erlaubt das analytische Arbeiten mit diesem Verfahren. Dadurch kann beispielsweise die Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_d$  bzw. der Bindungskonstante  $K_b$  für reversible Gleichgewichte erfolgen. Außerdem kann durch die Messung von  $\tau$  die Konzentration des Analyten bestimmt werden. Das soll zur Realisierung eines  $Cu^{2+}$  Sensors über Lebensdauermessungen des GFP ausgenutzt werden.

Verfahren, die sich auf die Bestimmung von  $K_d$  beschränken, erfolgen üblicherweise über die lineare Auftragung nach Klotz oder Scatchard [131]. Die linearisierte Darstellung eines Titrationsverlaufes ist jedoch über den gesamten Konzentrationsbereich des Liganden bzw. ohne die Annahme von Näherungen nicht möglich. In linearisierten Auftragungen wird die Konzentration des Komplexes bzw. die Intensität gegen die Konzentration an freiem Liganden aufgetragen. Für die Lebensdauertitration von GFP mit  $Cu^{2+}$  ist jedoch die Konzentration an freien Kupfer(II)-ionen in der Lösung unbekannt. Damit sind diese Ansätze für das System aus GFP und  $Cu^{2+}$  nicht anwendbar. Um eine lineare Auftragung zu ermöglichen, muss für diese Verfahren daher entweder eine Näherung verwendet werden oder die Gesamtmenge an eingesetztem Kupfer muss berücksichtigt werden.

Ausgehend von der sukzessiven mathematischen Herleitung für die Lebensdauertitration erfolgt zunächst die geschlossene, analytische Betrachtung. Diese erfolgt für eine solche Lebensdauertitration ausgehend vom Massenwirkungsgesetz. Dabei wird von der reversiblen Bindung eines Liganden  $L$  ( $Cu^{2+}$ ) an einen Rezeptor  $R$  (GFP) ausgegangen. Über das Modell der Titration kann weiterhin die Konzentration eines dabei beteiligten Stoffes bestimmt werden. In diesem Abschnitt werden zunächst die Zusammenhänge der Dissoziationskonstante und der Konzentrationen der involvierten Substanzen hergestellt. Im nächsten Abschnitt wird das Modell auf die Fluoreszenzlebensdauer angewendet, um damit eine Möglichkeit für die Quantifizierung von Liganden über eine Titration der Fluoreszenzlebensdauer zu entwickeln.

Zur Quantifizierung von  $[Cu^{2+}]$  erfolgt die Aufnahme einer Titrationskurve gegen die Fluoreszenzlebensdauer von GFP. Prinzipiell ist auch die umgekehrte Betrachtung möglich. Diese könnte zur Entwicklung eines Verfahrens zur Bestimmung von [GFP] verwendet werden.

Für ein System aus Ligand  $L$  und Rezeptor  $R$  gilt:



Gleichung 6.9 beschreibt das Gleichgewicht der reversiblen Bindung eines Liganden an einen Rezeptor, die einen Komplex  $L-R$  bilden. Im Fall der Bestimmung der Konzentration von  $\text{Cu}^{2+}$  ist der Rezeptor GFP und damit fluoreszierend. Durch die Anlagerung von  $\text{Cu}^{2+}$  wird die GFP-Fluoreszenz jedoch gequencht. Liganden sind nicht fluoreszierende Kupfer(II)-ionen. Gleichung 6.9 geht von der Annahme aus, dass an ein GFP-Molekül höchstens ein Kupfer(II)-ion gebunden wird. Tatsächlich kann auch mehr als ein Kupfer(II)-ion an das His<sub>6</sub>-Tag des GFP-Moleküls binden. Dies führt jedoch zur Einführung einer weiteren Unbekannten, die die mathematische Beschreibung mit dem Titrationsmodell verkompliziert und die nur für sehr hohe  $[\text{Cu}^{2+}]$  relevant wird. Aufgrund der in Kapitel 7 beschriebenen, guten Übereinstimmung von Theorie und Experiment, wird die Bindung von mehr als einem Ion im Folgenden vernachlässigt. Die Herleitung in diesem Fall wird im Folgenden als analytische Lösung bezeichnet, die Näherung bezieht sich auf die GFP-Konzentration. Unter der Prämisse einer 1:1 Stöchiometrie gilt für das System aus His<sub>6</sub>-GFP und  $\text{Cu}^{2+}$ :



In dieser Gleichung bezeichnet GFP freies GFP, das im Folgenden mit  $\text{GFP}_{\text{frei}}$  gekennzeichnet wird und Cu freie Kupfer(II)-ionen, die mit  $\text{Cu}_{\text{frei}}$  gekennzeichnet werden. Der Übersichtlichkeit halber wird auf die korrekte Angabe der Ladungen verzichtet. GFP-Cu bezeichnet den Komplex aus GFP und  $\text{Cu}^{2+}$ . Eine schematische Skizze der reversiblen Bindung von Kupfer(II)-ionen an GFP-Moleküle über das His<sub>6</sub>-Tag zeigt Abbildung 6.2. Dabei ist der Chromophor in der GFP-Struktur grün dargestellt.  $\text{Cu}^{2+}$  (blau) kann über das His<sub>6</sub>-Tag des GFP-Moleküls an dieses binden.

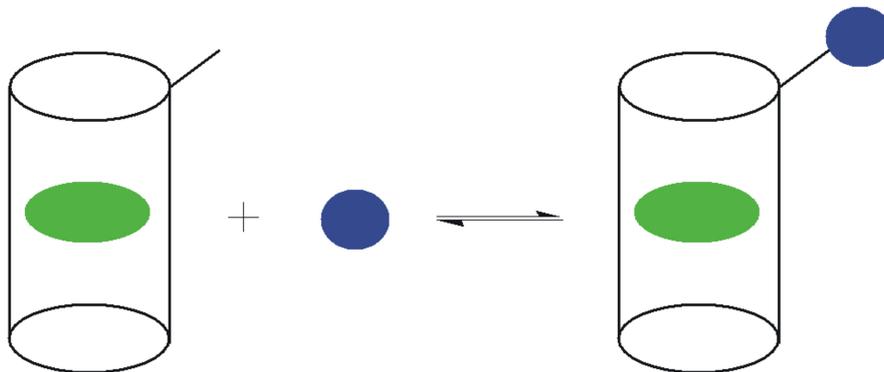


Abbildung 6.2: Schematische Darstellung der Bindung eines Kupfer(II)-ions an ein GFP-Molekül. Die Bindung von Kupfer an GFP erfolgt über das His<sub>6</sub>-Tag. Das reversible Gleichgewicht stellt sich gemäß der Dissoziationskonstante  $K_d$  ein.

Aus Gleichung 6.10 ergibt sich gemäß dem Massenwirkungsgesetz:

$$K_b = \frac{[GFP-Cu]}{[GFP]_{frei} \cdot [Cu]_{frei}} \quad (6.11)$$

bzw.

$$K_d = \frac{[GFP]_{frei} \cdot [Cu]_{frei}}{[GFP-Cu]}. \quad (6.12)$$

Wichtig ist in jedem Fall die Unterscheidung von freiem GFP (=  $GFP_{frei}$ ) in Lösung und der Gesamtmenge an eingesetztem GFP (=  $GFP_{ges}$ ). Gleiches gilt für die Betrachtung von Kupfer. Hier muss zwischen freiem Kupfer (=  $Cu_{frei}$ ) und der Gesamtmenge an eingesetztem Kupfer (=  $Cu_{ges}$ ) unterschieden werden.

Der Anteil an freiem GFP lässt sich über die Bestimmung der Lebensdauer ermitteln. Die Messung der freien  $[Cu^{2+}]$  ist mit den Methoden der Fluoreszenzspektroskopie nicht möglich. Daher ist die Eliminierung von  $[Cu]_{frei}$  aus der Gleichung erforderlich. Dies geschieht durch die Betrachtung der Gesamtmenge an eingesetztem Kupfer. Diese setzt sich zusammen aus freiem  $Cu^{2+}$  und mit GFP komplexiertem  $Cu^{2+}$ :

$$[Cu]_{ges} = [Cu]_{frei} + [GFP-Cu] \Leftrightarrow [Cu]_{frei} = [Cu]_{ges} - [GFP-Cu]. \quad (6.13)$$

Die analoge Betrachtung für die Gesamtmenge an GFP ergibt:

$$[GFP]_{ges} = [GFP]_{frei} + [GFP-Cu] \Leftrightarrow [GFP]_{frei} = [GFP]_{ges} - [GFP-Cu]. \quad (6.14)$$

Einsetzen der Gleichungen 6.14 und 6.13 in 6.12 ergibt:

$$K_d = \frac{[GFP]_{frei} \cdot ([Cu]_{ges} - [GFP-Cu])}{[GFP-Cu]} \quad (6.15)$$

bzw.

$$K_d = \frac{([GFP]_{ges} - [GFP-Cu]) \cdot ([Cu]_{ges} - [GFP-Cu])}{[GFP-Cu]}. \quad (6.16)$$

Um diese Gleichungen zur Quantifizierung von  $[Cu^{2+}]_{ges}$  verwenden zu können, sind weitere Umformungen erforderlich. Weiterhin soll die Abhängigkeit von  $\tau$  erreicht werden. Dies ist in den nächsten Abschnitten dieses Kapitels dargestellt.

## 6.3 Zusammenhang der Lebensdauermessungen mit den Konzentrationen

Die Titration der Fluoreszenzlebensdauer von GFP durch  $\text{Cu}^{2+}$  erfolgt durch die in Kapitel 4 beschriebene Methode des TCSPC. Hierbei bezeichnet  $\text{Cu}^{2+}$  im Folgenden stets  $\text{Cu}_{ges}^{2+}$ . Die Auswertung der Lebensdauermessungen geschieht entweder über monoexponentielle oder über biexponentielle Fits der TCSPC-Histogramme. Dadurch wird den Proben entweder ein spezifischer Wert oder zwei spezifische Werte für  $\tau$  zugeordnet. Es wird folgendes Fitmodell verwendet [132]:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n A_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (6.17)$$

Beim monoexponentiellen Fitten, d. h.  $i=1$ , wird die mittlere Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{av}([\text{Cu}^{2+}])$  von GFP bestimmt. Dabei wird die Tatsache vernachlässigt, dass sich zwei Spezies von GFP in der Lösung befinden; freie GFP-Moleküle und mit Kupfer besetzte Moleküle, die sich in ihrer Lebensdauer und in ihrer Fluoreszenzintensität unterscheiden. Dieser Sachverhalt ist dargestellt in Abbildung 6.3.

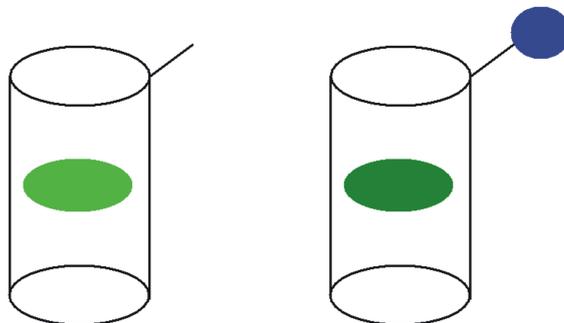


Abbildung 6.3: Schematische Darstellung des Chromophors von GFP. Auf der linken Seite ist kein  $\text{Cu}^{2+}$  an das Molekül gebunden. Dadurch kommt es zu einer höheren Fluoreszenz. Auf der rechten Seite ist ein  $\text{Cu}^{2+}$  an GFP gebunden. Durch FRET wird Energie vom Chromophor auf  $\text{Cu}^{2+}$  übertragen, was sich in einer Reduzierung der Fluoreszenzintensität niederschlägt, das Protein wird „dunkler“.

Biexponentielle Fits zur Auswertung mit  $i=2$  liefern zwei spezifische Lebensdauerwerte,  $\tau_{frei}$  für die ungequenchten GFP-Moleküle und  $\tau_{geb}$  für die durch  $\text{Cu}^{2+}$  gequenchten GFP-Moleküle. Die beiden, für das entsprechende Paar aus der betrachteten GFP-Mutante und  $\text{Cu}^{2+}$  spezifischen Werte  $\tau_{frei}$  und  $\tau_{geb}$ , stellen somit die auf Einzelmolekülniveau beobachtbaren Werte dar, die im Ensemble gemäß deren Verhältnis der mittleren Lebensdauer entsprechen. Die Auswertung auf Grundlage von

biexponentiellen Fits ordnet diesen Lebensdauerwerten die Anteile  $A_{frei}([Cu^{2+}])$  und  $A_{geb}([Cu^{2+}])$  zu. Das gesamte GFP setzt sich aus diesen beiden Spezies zusammen. Diese ergeben sich zu:

$$[GFP]_{frei} = A_{frei} \cdot [GFP]_{ges} \quad (6.18)$$

und

$$[GFP-Cu] = (1 - A_{frei}) \cdot [GFP]_{ges}. \quad (6.19)$$

Damit gilt folgender Zusammenhang gemäß Gleichung 6.14:

$$[GFP]_{ges} = \underbrace{A_{frei} \cdot [GFP]_{ges}}_{[GFP]_{frei}} + \underbrace{A_{geb} \cdot [GFP]_{ges}}_{[GFP-Cu]} \quad (6.20)$$

Für die jeweiligen Anteile gilt:

$$A_{frei} + A_{geb} = 1. \quad (6.21)$$

Die Lebensdauer beträgt  $\tau_{frei} \approx 3$  ns der ungequenchten GFP-Moleküle und  $\tau_{geb} \approx 1$  ns der durch  $Cu^{2+}$  gequenchten Lebensdauer des Komplexes. Die exakten Werte der Lebensdauer variieren für die verwendeten GFP-Mutanten und werden in Küvettenexperimenten ermittelt.

Damit kann die Titrationsformel in Abhängigkeit von  $A_{frei}([Cu^{2+}])$  entwickelt werden. Um daraus die Titrationsformel in Abhängigkeit der mittleren Fluoreszenzlebensdauer  $\tau([Cu^{2+}])$  (vgl. Gleichung 6.28) zu erstellen, muss  $A_{frei}([Cu^{2+}])$  durch  $\tau([Cu^{2+}])$  ersetzt werden. Dies geschieht durch die Verknüpfung der spezifischen Werte der Lebensdauer für die freien und die gebundenen GFP-Spezies mit der mittleren Lebensdauer des Ensembles:

$$\tau([Cu^{2+}]) = A_{frei} \cdot \tau_{frei} + A_{geb} \cdot \tau_{geb} = A_{frei} \cdot \tau_{frei} + (1 - A_{frei}) \cdot \tau_{geb} \quad (6.22)$$

Daraus ergibt sich ein Zusammenhang zwischen  $A_{frei}([Cu^{2+}])$  und  $\tau([Cu^{2+}])$ , der durch folgende Gleichung beschrieben wird:

$$A_{frei}([Cu^{2+}]) = \frac{\tau([Cu^{2+}]) - \tau_{geb}}{\tau_{frei} - \tau_{geb}} \quad (6.23)$$

Gleichung 6.23 ermöglicht die direkte Auftragung der eingesetzten Konzentration an Kupfer(II)-ionen gegen die gemessene Lebensdauer. Hierzu muss die Auftragung des freien Anteils der GFP-Moleküle gegen die Konzentration durch eine Auftragung der mittleren Lebensdauer ersetzt werden. Die mathematische Herleitung zeigt, dass

die Art der Auftragung auf die Ergebnisse der Titration keinen Einfluss hat. Somit ist es unerheblich, ob  $A_{frei}([Cu^{2+}])$  oder  $\tau([Cu^{2+}])$  als Bezugsgröße betrachtet wird. Da für die biexponentielle Auswertung von TCSPC-Histogrammen eine bessere Statistik erforderlich ist, als für die monoexponentielle Auswertung, ist in der Regel, insbesondere bei FLIM-Messungen mit geringen Zählraten, eine Auftragung gegen  $\tau([Cu^{2+}])$  sinnvoll.

## 6.4 Geschlossen analytische Lösung

Im folgenden Abschnitt wird ein Titrationsmodell entwickelt, das ohne Näherung hergeleitet wird und damit eine exakte Quantifizierung von  $[Cu^{2+}]$  über den gesamten Konzentrationsbereich von  $Cu^{2+}$  ermöglicht. Dazu muss die Konzentration an eingesetztem GFP mit in die Titrationsformel eingebracht werden. Für die Anwendung *in vitro* ist dies unproblematisch. Mit der Vorgehensweise bei Messungen *in vivo* befasst sich Abschnitt 6.6. Die Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_d$  erfolgt durch Auflösen der Gleichungen 6.15 bzw. 6.16 nach  $A_{frei}$  bzw.  $\tau_{av}$ . Unter Verwendung der Gleichungen 6.18 und 6.19 ergibt sich für beide Gleichungen:

$$\begin{aligned}
K_d &= \frac{[GFP]_{frei} \cdot ([Cu]_{ges} - [GFP - Cu])}{[GFP - Cu]} = \frac{A_{frei} \cdot [GFP]_{ges} \cdot ([Cu]_{ges} - (1 - A_{frei}) \cdot [GFP]_{ges})}{(1 - A_{frei}) \cdot [GFP]_{ges}} \\
&= \frac{A_{frei} \cdot [Cu]_{ges} - A_{frei} \cdot [GFP]_{ges} + A_{frei}^2 \cdot [GFP]_{ges}}{1 - A_{frei}} \Leftrightarrow \\
K_d &= A_{frei} \cdot K_d + A_{frei} \cdot [Cu]_{ges} - A_{frei} [GFP]_{ges} + A_{frei}^2 \cdot [GFP]_{ges} \quad (6.24) \\
\Leftrightarrow A_{frei}^2 + A_{frei} \left( \frac{K_d + [Cu]_{ges} - [GFP]_{ges}}{[GFP]_{ges}} \right) &= \frac{K_d}{[GFP]_{ges}} \\
\Leftrightarrow \left( A_{frei} + \frac{K_d + [Cu]_{ges} - [GFP]_{ges}}{2 \cdot [GFP]_{ges}} \right)^2 &= \frac{K_d}{[GFP]_{ges}} + \left( \frac{K_d + [Cu]_{ges} - [GFP]_{ges}}{2 \cdot [GFP]_{ges}} \right)^2 \\
\Leftrightarrow \left| A_{frei} + \frac{K_d + [Cu]_{ges} - [GFP]_{ges}}{2 \cdot [GFP]_{ges}} \right| &= \sqrt{\frac{K_d}{[GFP]_{ges}} + \left( \frac{K_d + [Cu]_{ges} - [GFP]_{ges}}{2 \cdot [GFP]_{ges}} \right)^2} \Leftrightarrow \\
A_{frei} &= -\frac{K_d + [Cu]_{ges} - [GFP]_{ges}}{2 \cdot [GFP]_{ges}} \pm \sqrt{\frac{K_d}{[GFP]_{ges}} + \left( \frac{K_d + [Cu]_{ges} - [GFP]_{ges}}{2 \cdot [GFP]_{ges}} \right)^2}. \quad (6.25)
\end{aligned}$$

Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten aus dem Fit ist mit obiger Gleichung aus den Lebensdauerkurven möglich. Um die Messwerte direkt auszuwerten, kann  $A_{frei}([Cu^{2+}])$  durch  $\tau([Cu^{2+}])$  ersetzt werden gemäß Gleichung 6.23. Damit ergibt sich

die Titrationsformel in Abhängigkeit der mittleren Lebensdauer  $\tau([Cu^{2+}])$  zu:

$$\tau([Cu^{2+}]) = \left( -\frac{K_d + [Cu]_{ges} - [GFP]_{ges}}{2 \cdot [GFP]_{ges}} \pm \sqrt{\frac{K_d}{[GFP]_{ges}} + \left( \frac{K_d + [Cu]_{ges} - [GFP]_{ges}}{2 \cdot [GFP]_{ges}} \right)^2} \right) \cdot (\tau_{frei} - \tau_{geb}) + \tau_{geb}. \quad (6.26)$$

## 6.5 Bestimmung der physikalisch sinnvollen Lösung

Gleichung 6.25 (und entsprechend Gleichung 6.26) liefert zwei Lösungen. Über den Grenzwert  $[Cu^{2+}]_{ges} = 0$ , der einem Anteil von  $A_{frei} = 1$  entspricht, wird die physikalisch sinnvolle Lösung ermittelt. Einsetzen von  $[Cu^{2+}]_{ges} = 0$  in Gleichung 6.25 liefert:

$$\begin{aligned} A_{frei} &= -\frac{K_d - [GFP]_{ges}}{2 \cdot [GFP]_{ges}} \pm \sqrt{\frac{K_d}{[GFP]_{ges}} + \left( \frac{K_d - [GFP]_{ges}}{2 \cdot [GFP]_{ges}} \right)^2} \\ &= \frac{-K_d + [GFP]_{ges}}{2 \cdot [GFP]_{ges}} \pm \sqrt{\frac{K_d \cdot 2^2 \cdot [GFP]_{ges}}{2^2 \cdot [GFP]_{ges}^2} + \frac{K_d^2 + [GFP]_{ges}^2 - 2 \cdot K_d \cdot [GFP]_{ges}}{2^2 \cdot [GFP]_{ges}^2}} \\ &= \frac{-K_d + [GFP]_{ges}}{2 \cdot [GFP]_{ges}} \pm \sqrt{\frac{K_d^2 + 2 \cdot K_d \cdot [GFP]_{ges} + [GFP]_{ges}^2}{4 \cdot [GFP]_{ges}^2}} \\ &= \frac{-K_d + [GFP]_{ges}}{2 \cdot [GFP]_{ges}} \pm \sqrt{\frac{(K_d + [GFP]_{ges})^2}{4 \cdot [GFP]_{ges}^2}} \\ &= \frac{-K_d + [GFP]_{ges}}{2 \cdot [GFP]_{ges}} \pm \frac{K_d + [GFP]_{ges}}{2 \cdot [GFP]_{ges}} \end{aligned}$$

Für ein negatives Vorzeichen vor dem Wurzelterm ergibt sich daraus:

$$A_{frei} = \frac{-K_d + [GFP]_{ges} - K_d - [GFP]_{ges}}{2 \cdot [GFP]_{ges}} \Leftrightarrow A_{frei} = -\frac{K_d}{[GFP]_{ges}}.$$

Für ein positives Vorzeichen vor dem Wurzelterm ist die Lösung der Gleichung:

$$A_{frei} = \frac{-K_d + [GFP]_{ges} + K_d + [GFP]_{ges}}{2 \cdot [GFP]_{ges}} = 1.$$

Die Lösung der Titrationsgleichung mit positivem Vorzeichen entspricht der physikalisch sinnvollen, da  $A_{frei} = 1$  die Ausgangsbedingung von  $[Cu^{2+}]_{ges} = 0$  erfüllt. Die Titrationsformel, die im Folgenden zur Bestimmung von  $K_d$  und zur Auswertung der Lebensdauer-titrations durch Auftragung gegen  $A_{frei}([Cu^{2+}])$  verwendet wird, ergibt

sich somit zu:

$$A_{frei} = -\frac{K_d + [Cu]_{ges} - [GFP]_{ges}}{2 \cdot [GFP]_{ges}} + \sqrt{\frac{K_d}{[GFP]_{ges}} + \left(\frac{K_d + [Cu]_{ges} - [GFP]_{ges}}{2 \cdot [GFP]_{ges}}\right)^2} \quad (6.27)$$

Das Ersetzen von  $A_{frei}([Cu^{2+}])$  durch die Lebensdauer  $\tau$  gemäß Gleichung 6.23, führt zur Titrationsgleichung mit den konstanten Parametern  $[GFP]_{ges}$ ,  $\tau_{frei}$ ,  $\tau_{geb}$  und  $K_d$  und der Abhängigkeit der  $\tau$  von der eingesetzten Kupfermenge  $[Cu^{2+}]_{ges}$ :

$$\tau([Cu^{2+}]) = \left( -\frac{K_d + [Cu]_{ges} - [GFP]_{ges}}{2 \cdot [GFP]_{ges}} + \sqrt{\frac{K_d}{[GFP]_{ges}} + \left(\frac{K_d + [Cu]_{ges} - [GFP]_{ges}}{2 \cdot [GFP]_{ges}}\right)^2} \right) \cdot (\tau_{frei} - \tau_{geb}) + \tau_{geb} \quad (6.28)$$

Gleichung 6.28 stellt eine Titrationsgleichung für Lebensdauertitrationsen dar, die einen direkten Zusammenhang zwischen der Konzentration des nicht fluoreszierenden Liganden und der mittleren Fluoreszenzlebensdauer herstellt.

## 6.6 Näherungslösung für geringe GFP-Konzentrationen

Die Gleichungen 6.27 und 6.28 beschreiben den Verlauf der Titrationskurven der Lebensdauer. Diese ermöglichen die Bestimmung von  $K_d$ , falls  $[GFP]$  bekannt ist oder von  $[Cu^{2+}]$ , bei bereits erfolgter Bestimmung von  $K_d$  bei *in vitro* Anwendungen. Ziel dieser Arbeit ist die Bestimmung von  $[Cu^{2+}]$  in Zellen. Hier ist  $[GFP]$  im Allgemeinen nicht bekannt. Die experimentelle Bestimmung ist theoretisch mit FCS möglich, in der Praxis jedoch schwer zu realisieren. Deshalb soll eine Möglichkeit für die *in vivo* Quantifizierung von  $[Cu^{2+}]$  geschaffen werden, die von  $[GFP]$  unabhängig ist. In Abschnitt 6.8 wird anhand von Simulationen gezeigt, dass unter der Bedingung  $[GFP] < K_d$  die Konzentration von GFP vernachlässigt werden kann. Ein Verfahren zur Messung von  $[Cu^{2+}]$  unter dieser Voraussetzung ist beschrieben in Abschnitt 7.1.6.

In diesem Abschnitt wird eine Näherungsformel hergeleitet, die für geringe GFP Konzentrationen, d. h.  $[GFP] < K_d$ , den Verlauf der Titration beschreibt. Ausgehend von Gleichung 6.24 ergibt sich:

$$K_d = A_{frei} \cdot K_d + A_{frei} \cdot [Cu]_{ges} - A_{frei} [GFP]_{ges} + A_{frei}^2 \cdot [GFP]_{ges}$$

$$\Leftrightarrow K_d \cdot (1 - A_{frei}) = A_{frei} \cdot [Cu]_{ges} + [GFP]_{ges} \cdot (A_{frei}^2 - A_{frei})$$

$$\Leftrightarrow K_d \cdot (1 - A_{frei}) + [GFP]_{ges} \cdot (A_{frei} - A_{frei}^2) = A_{frei} \cdot [Cu]_{ges}$$

Es gilt  $1 - A_{frei} \geq A_{frei} - A_{frei}^2 \forall 0 < A_{frei} < 1$ , wegen  $1 - A_{frei} \geq A_{frei} \cdot (1 - A_{frei})$ . Damit kann obiger Term unter Anwendung der Näherung  $[GFP] < K_d$  umgeformt werden zu:

$$K_d \cdot (1 - A_{frei}) = A_{frei} \cdot [Cu]_{ges}$$

Auflösen der Gleichung nach  $A_{frei}$  ergibt daraus:

$$\Leftrightarrow A_{frei} = \frac{K_d}{K_d + [Cu]_{ges}}. \quad (6.29)$$

Die Berücksichtigung des Zusammenhangs von  $A_{frei}$  und  $\tau$  (Gleichung 6.23) ergibt eine Beziehung zwischen der mittleren Fluoreszenzlebensdauer und  $[Cu^{2+}]$ .

$$A_{frei} = \frac{\tau([Cu]) - \tau_{geb}}{\tau_{frei} - \tau_{geb}} = \frac{K_d}{K_d + [Cu]_{ges}} \quad (6.30)$$

Aufgelöst nach  $\tau([Cu])$  ergibt sich daraus die Näherungsformel für  $[GFP] < K_d$ .

$$\tau([Cu^{2+}]) = \tau_{geb} + \frac{(\tau_{frei} - \tau_{geb}) \cdot K_d}{K_d + [Cu]_{ges}} \quad (6.31)$$

Dabei bezeichnet  $\tau([Cu^{2+}])$  die mittlere Fluoreszenzlebensdauer in Abhängigkeit der  $[Cu^{2+}]$ . Die beiden Lebensdauerwerte  $\tau_{frei}$  und  $\tau_{geb}$  sind spezifisch für die verwendete GFP-Mutante. Anhand dieses Modells kann unter Berücksichtigung der Näherung aus einer Messung der mittleren Fluoreszenzlebensdauer die  $[Cu^{2+}]$  bestimmt werden. Der Verlauf der Näherungsformeln 6.29 und 6.31 ist in Abbildung 6.4 gezeigt. Dieser stimmt mit dem Verhalten gemäß Gleichung 6.28 überein (Abb. 6.10). Die Simulation erfolgt für  $\tau_{frei} = 3$  ns und  $\tau_{geb} = 1$  ns.

Gleichung 6.31 kann umgeformt werden zu:

$$[Cu_{ges}^{2+}] = \frac{\tau_{frei} - \tau([Cu])}{\tau([Cu]) - \tau_{geb}} \cdot K_d. \quad (6.32)$$

Gleichung 6.32 entspricht Gleichung 6.5 für die ratiometrische Bestimmung des pH-Werts. Durch die Betrachtung der Lebensdauer entfällt jedoch die Notwendigkeit, das Verhältnis der Extinktionen  $\frac{\epsilon_R(\lambda_1)}{\epsilon_{RH}(\lambda_1)}$  miteinzubeziehen. Damit vereinfacht sich die Quantifizierung der Konzentration des entsprechenden Ions.

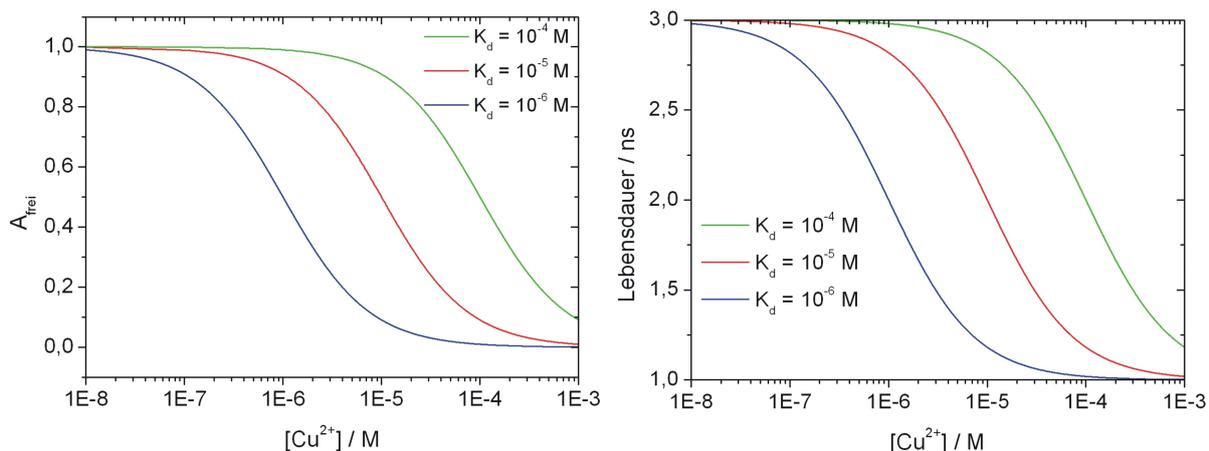


Abbildung 6.4: Simulation des Titrationsverlaufes gemäß den Gleichungen 6.29 (links) und 6.31 (rechts) für  $\tau_{frei} = 3$  ns und  $\tau_{geb} = 1$  ns. Für  $[GFP] < K_d$  entspricht der Kurvenverlauf dem von Gleichung 6.28. Deshalb kann in diesem Fall die Konzentration von GFP vernachlässigt werden. Dies ermöglicht für geringe  $[GFP]$  die *in vivo* Quantifizierung von  $Cu^{2+}$ .

## 6.7 Anwendung auf experimentelle Werte

Der in den vorherigen Abschnitten mathematisch hergeleitete Zusammenhang zwischen der mittleren Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{av}([Cu^{2+}])$  und dem Anteil der Komponente der freien Lebensdauer  $A_{frei}([Cu^{2+}])$  wird experimentell überprüft. Dies sollte ergeben, dass die Verwendung von Gleichung 6.27 das gleiche Resultat liefert, wie die Verwendung von Gleichung 6.26. Die Auftragung geschieht im ersten Fall gegen  $A_{frei}([Cu^{2+}])$ , im zweiten Fall gegen die mittlere Lebensdauer  $\tau_{av}([Cu^{2+}])$ . Dazu erfolgt die Titration der Lebensdauer der GFP-Mutanten T203H in submikromolekularer Konzentration mit  $Cu^{2+}$ . Wie in Abbildung 6.5 gezeigt, führen beide Titrationskurven zum selben Ergebnis.

Das bedeutet in Übereinstimmung mit der mathematischen Herleitung, dass die Auftragung von  $A_{frei}([Cu^{2+}])$  und die Auftragung von  $\tau_{av}([Cu^{2+}])$  einer unterschiedlichen Darstellung des gleichen Sachverhaltes entsprechen. Aufgrund des einfacheren Fitmodells wird im experimentellen Teil eine Auftragung gegen  $\tau_{av}([Cu^{2+}])$  der Auftragung gegen  $A_{frei}([Cu^{2+}])$  vorgezogen.

Weiterhin wird überprüft, ob die Näherungsformel für geringe  $[GFP]$ , das bedeutet  $[GFP] < K_d$ , dem tatsächlichen, experimentell bestimmten Verlauf der Titration entspricht. Dazu erfolgt die Analyse der Titrationskurve von GFP T203H mit der Näherungsformel, dargestellt in Abbildung 6.6.

Abbildung 6.6 zeigt den Verlauf der an die Messwerte angeglichenen Werte der Näherungsformeln 6.29 und 6.31. Die Näherungsformeln beschreiben den Titrations-

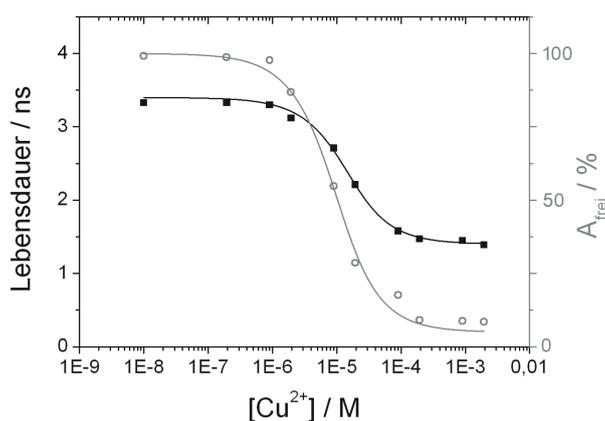


Abbildung 6.5: Vergleich der Ergebnisse der Lebensdauertitration mit  $Cu^{2+}$  durch monoexponentielles Fitten (schwarze Quadrate) mit biexponentiellem Fitten (graue Symbole) von  $\tau$ . Die Titration erfolgt für die selbe Probe von GFP T203H. Die Dissoziationskonstanten ergeben sich zu  $K_d = 1,1 \cdot 10^{-5} M$  für die monoexponentiellen Fits und  $K'_d = 7 \cdot 10^{-6} M$  für die biexponentiellen Fits. Das bedeutet eine gute Übereinstimmung.

verlauf für geringe  $[GFP]$ . Damit kann das Modell auf Messungen *in vivo* angewendet werden, falls die eingesetzte Konzentration an GFP die Dissoziationskonstante nicht überschreitet.

## 6.8 Simulation des theoretischen Verlaufs der Titrationskurve

### 6.8.1 Simulation mit konstanter Dissoziationskonstante

Die aus der theoretischen Herleitung erhaltenen Titrationskurven sollen simuliert und der Einfluss der eingesetzten GFP-Konzentration auf den Kurvenverlauf untersucht werden. Das ist notwendig, da die Bestimmung von  $[GFP]$  in den Zellen nicht trivial ist. Insbesondere ist es notwendig, den Bereich festzulegen, in dem  $[GFP]$  vernachlässigt werden kann. Für diesen Bereich besteht die Möglichkeit zur Quantifizierung von  $Cu^{2+}$  unabhängig von der intrazellulären  $[GFP]$ .

Zur Untersuchung des  $[GFP]$ -Einflusses werden Titrationskurven bei einem konstanten Wert für die Dissoziationskonstante von  $K_d = 1 \cdot 10^{-5} M$  simuliert. Die Gesamtmenge an eingesetztem Kupfer wird jeweils über einen Konzentrationsbereich von  $[Cu]_{ges} = 1 \cdot 10^{-8}$  bis  $1 \cdot 10^{-2} M$  variiert. Die theoretischen Titrationsverläufe werden für die GFP-Gesamtkonzentrationen  $[GFP]_{ges} = 1,5 \cdot 10^{-3}, 1,5 \cdot 10^{-4}, 1,5 \cdot 10^{-5}, 1,5 \cdot 10^{-6}, 1,5 \cdot 10^{-7}$  und  $1,5 \cdot 10^{-8} M$  simuliert. Abbildung 6.7 zeigt die Ergebnisse

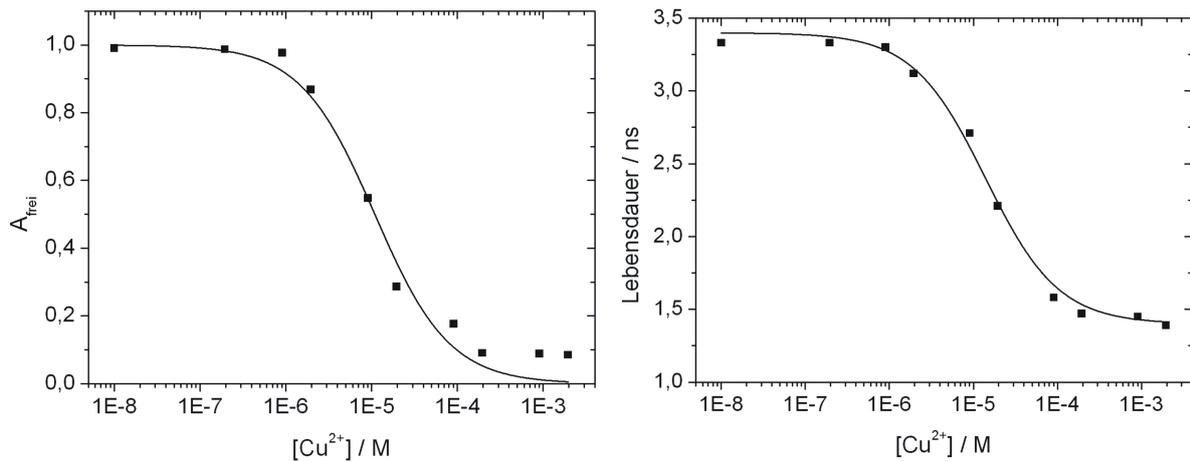


Abbildung 6.6: Fit der experimentellen Titration von GFP T203H in einer Konzentration von  $5 \cdot 10^{-7}$  M mit den Näherungsformeln 6.29 (links) und 6.31 (rechts). Der theoretische Verlauf entspricht den Messwerten der Lebensdauertitration.

dieser Simulation als Auftragung von  $[Cu^{2+}]$  gegen den Anteil an freiem GFP  $y = A_{frei}([Cu^{2+}])$  (links) und gegen die Lebensdauer  $y = \tau([Cu^{2+}])$  (rechts).

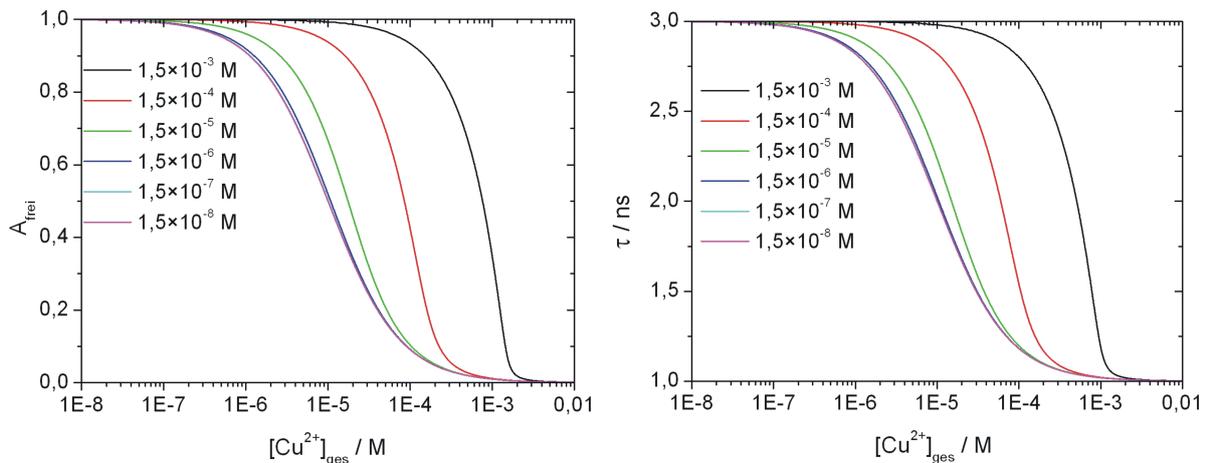


Abbildung 6.7: Simulation zur Untersuchung des Einflusses der GFP-Konzentration auf das Titrationsverhalten mit  $Cu^{2+}$  bei einem vorgegebenen konstanten Wert für die Dissoziationskonstante von  $K_d = 1 \cdot 10^{-5}$  M. Das Titrationsverhalten wird dabei gemäß den Gleichungen 6.27 und 6.28 simuliert.

### 6.8.2 Ergebnis der Simulation mit konstanter $K_d$

Die Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_d$  aus einer experimentell bestimmten Titrationskurve über Lebensdauermessungen ist generell möglich. Dabei spielt es keine Rolle, ob die mittlere Lebensdauer von GFP betrachtet wird, oder der aus biexponentiellem Fitten bestimmte Anteil freier GFP-Moleküle, wie Abbildung 6.7 zeigt. Für

[GFP] / M	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-7}$	$1,5 \cdot 10^{-8}$
$[\text{Cu}^{2+}](A_{\text{frei}}^{50\%}) / \text{M}$	$7,6 \cdot 10^{-4}$	$8,5 \cdot 10^{-5}$	$1,8 \cdot 10^{-5}$	$1,1 \cdot 10^{-5}$	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$1,0 \cdot 10^{-5}$

Tabelle 6.1: Übersicht über die  $[\text{Cu}^{2+}]$  der simulierten Titrationskurven aus Abbildung 6.7 mit variablen GFP-Konzentrationen und  $K_d = 1,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ , an denen  $A_{\text{frei}} = 0,5$  beträgt.

Titrationen mit unbekannter [GFP] ist zu beachten, dass die Konzentration an eingesetztem GFP den Wert von  $K_d$  nicht übersteigt, wie die Annäherung der Kurvenverläufe für niedrige [GFP] im Einklang mit den Ergebnissen aus Abschnitt 6.6 zeigt. Bei höheren [GFP] muss diese in der Formel berücksichtigt werden. Die exakte Bestimmung von  $K_d$  für hohe [GFP] kann damit ausschließlich bei bekannter [GFP] erfolgen. Für Messungen mit unbekannter GFP-Konzentration muss diese unterhalb des Wertes von  $K_d$  liegen. Dies ist der Fall beim Vorgehen *in vivo*.

Bereits bei einer GFP-Konzentration von  $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  und  $K_d = 1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ , ergibt sich eine Abweichung bezüglich der  $[\text{Cu}^{2+}]$  von  $0,8 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  gegenüber der tatsächlichen  $[\text{Cu}^{2+}]$ , vgl. Tabelle 6.1. Beträgt die GFP-Konzentration  $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ , ergibt sich eine Abweichung in der  $[\text{Cu}^{2+}]$  von  $8,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ . Eine präzise Bestimmung der  $[\text{Cu}^{2+}]$  ist ohne die Kenntnis der eingesetzten [GFP] dann nicht möglich.

Bei der Bestimmung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  in Zellen, ist die Konzentration von GFP nicht bekannt. Liegt diese über dem Wert von  $K_d$ , ergeben sich Probleme in der Genauigkeit der Messung, wie die Simulationen zeigen. Deshalb muss auf  $[\text{GFP}] < K_d$  geachtet werden oder eine Messung von [GFP] erfolgen. Diese muss in der Titrationsgleichung berücksichtigt werden. Im Fall unbekannter [GFP], die  $K_d$  nicht übersteigen, erfolgt die Auswertung anhand einer Kalibrationsmessung. Dieses Vorgehen ist beispielhaft beschrieben für die GFP-Mutante T203H in Abschnitt 7.1.6.

### 6.8.3 Einfluss der Variation der Dissoziationskonstante auf den Titrationsverlauf

Um den Einfluss der Dissoziationskonstante auf den Verlauf der Titrationskurve zu untersuchen, wird die Simulation von Titrationskurven mit  $K_d = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $K_d = 1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  und  $K_d = 1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  gemäß den Gleichungen 6.27 bzw. 6.28 durchgeführt. Es werden dabei jeweils GFP-Konzentrationen von  $[\text{GFP}]_{\text{ges}} = 1,5 \cdot 10^{-3}$ ,  $1,5 \cdot 10^{-4}$ ,  $1,5 \cdot 10^{-5}$ ,  $1,5 \cdot 10^{-6}$ ,  $1,5 \cdot 10^{-7}$  und  $1,5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$  betrachtet. Die Lebensdauertitration erfolgt über einen  $[\text{Cu}^{2+}]$ -Bereich von  $[\text{Cu}]_{\text{ges}} = 1 \cdot 10^{-8}$  bis  $1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ . Dargestellt sind die Ergebnisse dieser Simulationen in Abbildung 6.8 und 6.9. Die Simulationen erfolgen in diesem Fall gegen den Anteil freier GFP-Moleküle, sowie gegen  $\tau_{av}$ .

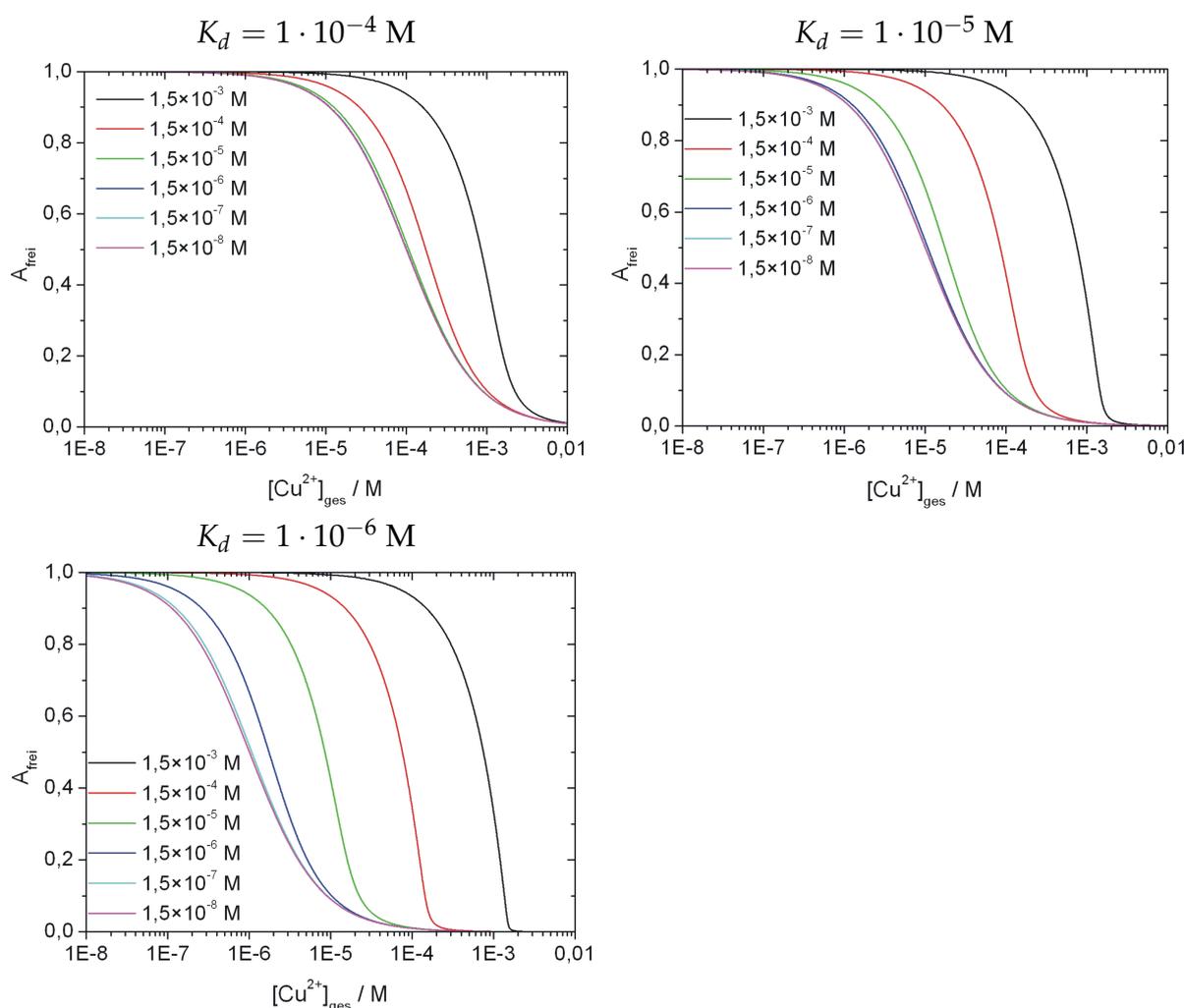


Abbildung 6.8: Einfluss der Dissoziationskonstante  $K_d$  auf den Verlauf der Titrationskurven in Abhängigkeit der eingesetzten GFP-Konzentrationen. Betrachtung des Anteils an freiem GFP  $A_{frei}$ .

#### 6.8.4 Ergebnis der Variation von $K_d$

Der Einfluss der Dissoziationskonstante  $K_d$  auf die Titrationskurve resultiert aus dem Verhältnis von  $[GFP]$  zu  $K_d$ . Abbildung 6.8 zeigt die Simulation für den Anteil an freiem GFP  $A_{frei}$ , Abbildung 6.9 für die durchschnittliche Lebensdauer  $\tau_{av}$ . Die Kurvenverläufe und damit auch die  $[Cu^{2+}]$ , bei denen  $A_{frei}$  bzw.  $\tau_{av}$  auf die Hälfte des Ausgangswertes abgefallen ist, verhalten sich identisch. Dies bestätigt den im vorherigen Abschnitt hergeleiteten Zusammenhang der Fluoreszenzlebensdauer mit der Konzentration. Für die Analyse der Titration bedeutet das, dass es keinen Unterschied macht, ob die Auftragung der  $[Cu^{2+}]$  gegen die mittlere Lebensdauer oder gegen den Anteil an freiem GFP erfolgt.

Aus den Abbildungen 6.8 und 6.9 geht hervor, dass für  $K_d = 1,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  die Kur-

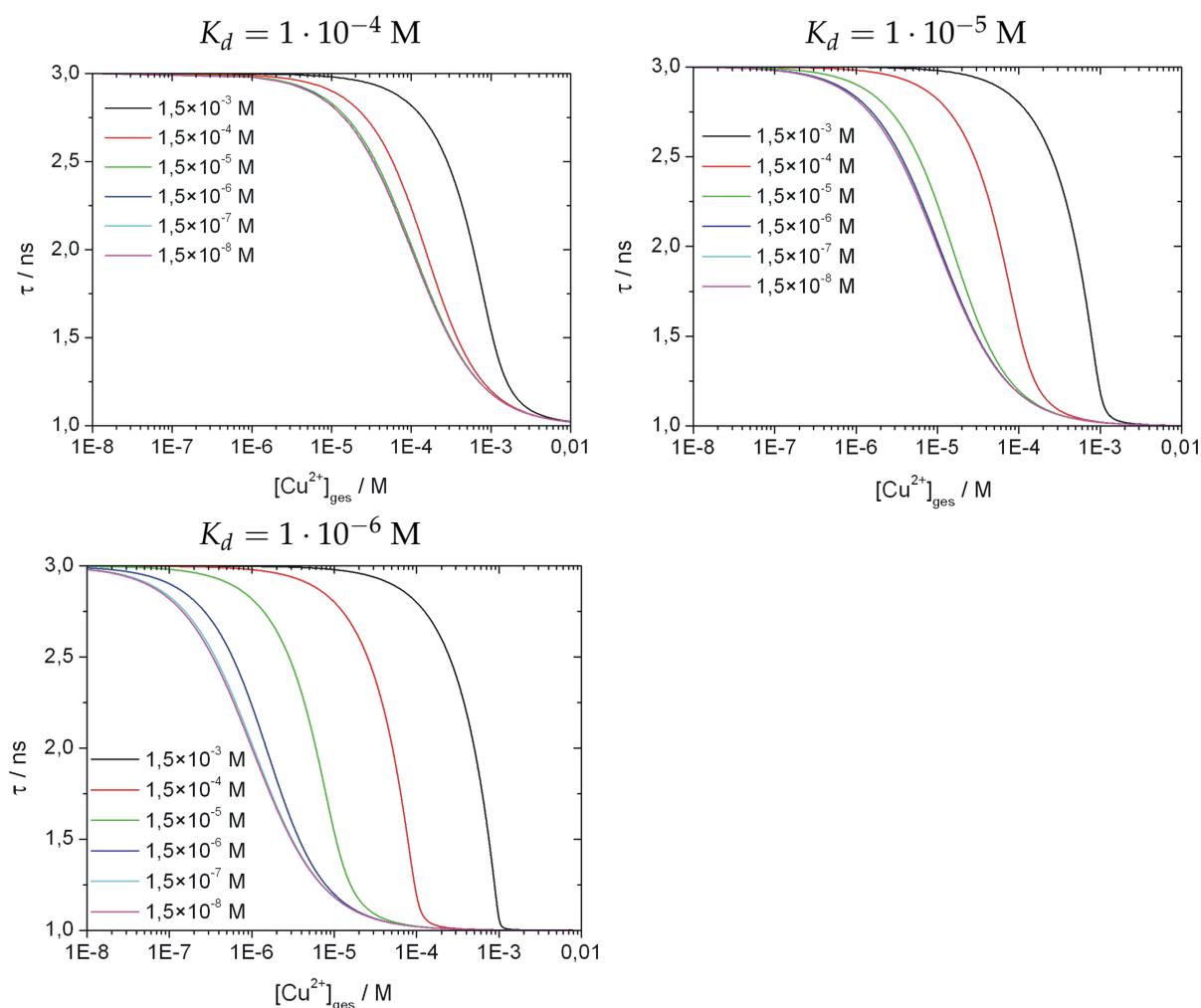


Abbildung 6.9: Einfluss der Dissoziationskonstante  $K_d$  auf den Verlauf der Titrationskurven in Abhängigkeit der eingesetzten GFP-Konzentrationen. Betrachtung der Lebensdauer  $\tau([Cu^{2+}])$ .

venverläufe unter der Bedingung  $[GFP] < 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  nahezu identisch sind. Erst wenn  $[GFP] \approx K_d$  weichen sie davon ab. Für  $[GFP] \gg K_d$ , also für  $[GFP] = 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ , ist die simulierte Titrationskurve nicht nur hin zu höheren  $[Cu^{2+}]$  verschoben, es tritt auch eine Änderung der Steigung ein.

Für eine quantitative Bestimmung der  $[Cu^{2+}]$  über Lebensdauermessungen muss die eingesetzte GFP-Konzentration somit unter dem Wert der Dissoziationskonstante liegen. Sonst werden vermeintlich höhere Kupfer(II)-ionen-Konzentrationen benötigt, um ein Quenchen der Lebensdauer auf den theoretisch zu erwartenden Wert zu erreichen. Damit kann nach der Bestimmung der für das betrachtete System aus Rezeptor und Ligand spezifischen Dissoziationskonstante der Bereich festgelegt werden, den die Konzentration des eingesetzten GFP nicht überschreiten darf, um keine Fehler bei der Auswertung zu machen.

Für die Titration von GFP mit  $\text{Cu}^{2+}$  liegt die Dissoziationskonstante im mikromolaren Bereich, vgl. Kapitel 7. Titrationsen mit [GFP] im submikromolaren Konzentrationsbereich können daher mit der Titrationsformel ohne Berücksichtigung der eingesetzten GFP-Konzentration durchgeführt werden, ohne dass es zu relevanten Fehlern kommt.

### 6.8.5 Simulation der Titrationsformel und der Näherungsformel

Um die mathematisch hergeleitete Näherungsformel 6.31 mit der exakten Titrationsformel 6.28 zu vergleichen, werden beide Gleichungen mit  $K_d = 1 \cdot 10^{-5}$  M simuliert. Da die Näherungsformel nur für  $[\text{GFP}] < K_d$  gilt, wird zur Simulation der Titrationsformel  $[\text{GFP}] = 5 \cdot 10^{-7}$  M verwendet. Die Ergebnisse der Simulationen zeigt Abbildung 6.10.

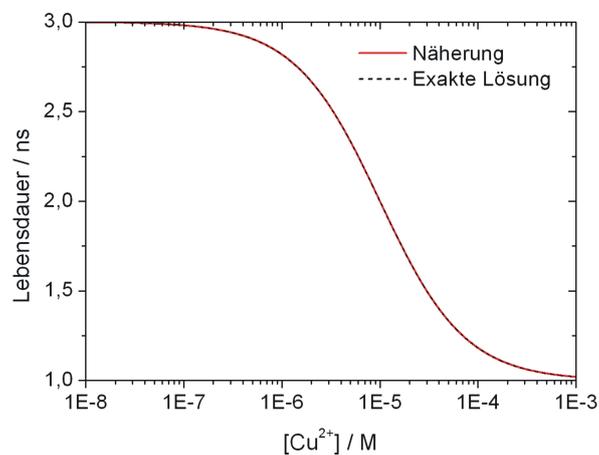


Abbildung 6.10: Simulation der Näherungsformel 6.31 sowie der exakten Formel 6.28 für  $K_d = 1 \cdot 10^{-5}$  M. Die Simulation der exakten Formel erfolgt für  $[\text{GFP}] = 5 \cdot 10^{-7}$  M.

Die Übereinstimmung des Kurvenverlaufs der Gleichungen 6.31 und 6.28 zeigt Abbildung 6.10. Dies entspricht den Erwartungen, da die Näherungsformel direkt der Titrationsformel entspringt. Weiterhin zeigt Abbildung 6.6 die Beschreibung der experimentell ermittelten Titrationskurve für GFP T203H in einer Konzentration von  $5 \cdot 10^{-7}$  M, in Analogie zur Simulation. Damit kann sowohl für die theoretische Betrachtung als auch für die Ergebnisse der Experimente die Näherungsformel unter der Bedingung  $[\text{GFP}] < K_d$  für die Beschreibung von Titrationskurven der Fluoreszenzlebensdauer verwendet werden.

## 6.9 Diskussion der Ergebnisse von Kapitel 6

Über das Massenwirkungsgesetz kann die Titrationsformel 6.27 hergeleitet werden, die sich für die Quantifizierung *in vitro* von  $[\text{Cu}^{2+}]$  eignet. Einführen der Fluoreszenzlebensdauer in die Gleichung, ermöglicht die Analyse von  $[\text{Cu}^{2+}]$  auf der Basis von TCSPC Messungen. Für die Bestimmung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  in Zellen ist Gleichung 6.28 in dieser Form nicht anwendbar, da  $[\text{GFP}]$  nicht bekannt und eine Messung *in vivo* nicht trivial ist. Deshalb erfolgt unter der Voraussetzung geringer  $[\text{GFP}]$ , d. h.  $[\text{GFP}] < K_d$ , die Entwicklung einer Näherungslösung. Damit ist mit der Beschränkung auf diese Näherung die Quantifizierung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  *in vivo* möglich. Die Titrationsgleichungen 6.27 und 6.28 werden simuliert. Dabei erfolgt die Variation der Parameter  $K_d$  und  $[\text{GFP}]$ . Weiterhin ist der Zusammenhang der Auftragung gegen den Anteil freier Moleküle und gegen die mittlere freie Lebensdauer untersucht und experimentell überprüft. Außerdem erfolgt die Simulation der Näherungsformeln 6.29 und 6.31. Für diese Gleichungen erfolgt ebenfalls die Anpassung an die Messwerte für die GFP-Mutante T203H. Dabei zeigt sich, dass der Titrationsverlauf für  $[\text{GFP}] < K_d$  mit den Näherungsformeln beschrieben werden kann.

Die Ergebnisse aus Kapitel 6 stellen damit ein System dar, mit dem über TCSPC Messungen an GFP  $[\text{Cu}^{2+}]$  *in vitro* bestimmt werden kann. Für den Fall geringer  $[\text{GFP}]$  kann dies auf Lebensdauertitrationsen *in vivo* angewendet werden. Mit der experimentellen Anwendung dieser Resultate befasst sich Kapitel 7.



# Kapitel 7

## Experimenteller Teil

### 7.1 Quantifizierung von Kupfer(II)-ionen

#### 7.1.1 Verfahren zur Bestimmung von $[\text{Cu}^{2+}]$

Die Relevanz von  $\text{Cu}^{2+}$  in der Biologie, der Medizin und in den Lebenswissenschaften ist in der Einleitung dargelegt. Viele Vorgänge, an denen  $\text{Cu}^{2+}$  beteiligt ist, weisen eine starke Abhängigkeit von dessen Konzentration auf. Das bedeutet, dass die Konzentration von  $\text{Cu}^{2+}$  in einem bestimmten Bereich liegen muss, damit  $\text{Cu}^{2+}$  keine toxischen oder defizitären Effekte hervorbringt. Deshalb ist nicht nur die Detektion, sondern auch die Quantifizierung von  $\text{Cu}^{2+}$  ein wichtiges Ziel. Dies gilt nicht nur für Küvettenexperimente, sondern insbesondere für Vorgänge *in vivo*, da intrazellulären Vorgängen eine wichtige Rolle zukommt.

In der Literatur ist eine Vielzahl an Verfahren zur Bestimmung der  $[\text{Cu}^{2+}]$  beschrieben. Alle diese Ansätze zeichnen sich dadurch aus, dass Manipulationen des zu untersuchenden Systems erforderlich sind. Dadurch unterscheiden sie sich wesentlich von der im Rahmen dieser Arbeit verfolgten Methode zur Quantifizierung von  $\text{Cu}^{2+}$  über Messungen von  $\tau$  am GFP.

Eine Möglichkeit zur Quantifizierung liegt in der Messung der Fluoreszenzintensität von Quantenpunkten. Hierbei werden mit L-Cystein bedeckte ZnS Quantenpunkte als fluoreszierende Sensoren für  $\text{Cu}^{2+}$  eingesetzt [133]. Ein weiterer Weg ergibt sich durch mit Chitosan modifizierte Quantenpunkte [134]. In diesem Fall erfolgt die Quantifizierung ebenfalls über die Detektion der Fluoreszenz, die von der  $[\text{Cu}^{2+}]$  abhängt. Beide Verfahren sind selektiv gegenüber einer Vielzahl an weiteren Metallionen.

Eine weitere Option basiert auf den elektroanalytischen Methoden der Potentiometrie und der Voltammetrie [135]. Mit Polypyrrol modifizierte Elektroden dienen durch induzierte Bindungsstellen als  $\text{Cu}^{2+}$ -Sensoren. Die potentiometrische Antwort

der Elektroden weist dabei eine lineare Abhängigkeit von  $[\text{Cu}^{2+}]$  auf. Die voltammetrische Detektion von  $\text{Cu}^{2+}$  wird im Gegensatz dazu durch die Anwesenheit von  $\text{Hg}^{2+}$  und  $\text{Ag}^+$  signifikant gestört. Diese Verfahren eignen sich nicht zur intrazellulären Bestimmung von  $[\text{Cu}^{2+}]$ .

Zudem bestehen Ansätze zur Bestimmung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  über die optische Detektion von Schiff'schen Basen. Durch die Einbettung einer fluoreszierenden Schiff'schen Base in Polyvinylchlorid (PVC) kann ein System geschaffen werden, das reversibel auf  $\text{Cu}^{2+}$  durch Fluoreszenzlöschung reagiert [136]. Eine weitere fluoreszierende Schiff'sche Base in einem Gemisch aus Methanol und Wasser weist ebenfalls eine Abhängigkeit der Emissionseigenschaften von  $[\text{Cu}^{2+}]$  auf [137]. Durch die Einbettung in PVC bzw. durch die Verwendung von Methanol als Lösungsmittel ist der Einsatz in Zellen nicht möglich.

Weiterhin ist ein elektrochemischer Weg beschrieben [138]. Dabei führt die Bildung von Komplexen zwischen  $\text{Cu}^{2+}$  und Quercetin auf der Oberfläche einer Elektrode zur Möglichkeit der elektrochemischen Detektion von  $\text{Cu}^{2+}$ . Auch dieses Verfahren eignet sich nicht für die Untersuchung der  $[\text{Cu}^{2+}]$  in lebenden Zellen.

Eine Gemeinsamkeit dieser Verfahren ist die Notwendigkeit, dass die sensitive Einheit von außen in die zu untersuchende Zelle gebracht werden muss, bzw. dass eine intrazelluläre Anwendung nicht möglich ist. Durch diesen destruktiven Prozess sind sie für Anwendungen *in vivo* nicht oder nur bedingt einsetzbar. Wünschenswert ist daher eine Möglichkeit, den Sensor nicht invasiv in die Zellen einzuführen. Weiterhin ist die Verwendung für quantitatives Arbeiten in Zellen anhand dieser Methoden nicht möglich, da die Ergebnisse der Messungen von der Konzentration des Sensors abhängen. Diese ist in den meisten Fällen unbekannt und zudem lokal unterschiedlich, da eine homogene Verteilung über eine einzelne Zelle oder einem Bereich einer Vielzahl von Zellen nicht gewährleistet werden kann. Damit ist eine Kalibrationsmessung der zu untersuchenden Zelle vor der eigentlichen Messung erforderlich, die ohne die Anwesenheit des Analyten zu erfolgen hat. Das ist in der Praxis unerwünscht und umständlich, in den meisten Fällen dadurch sogar ausgeschlossen.

Eine Lösung, die sensitive Einheit nicht invasiv in die Zellen einzubringen, stellt der Einsatz von Fluoreszenzproteinen (FP) dar. Diese lassen sich genetisch in Zellen exprimieren. Dadurch werden Störungen von Zellfunktionen durch Eingriffe in das Zellsystem vermieden. Bisherige Verfahren zur Detektion von  $\text{Cu}^{2+}$  beruhen auf Messung der Fluoreszenzintensität der FP. Sensoren auf der Basis von DsRed, einem rot fluoreszierenden Protein aus der Koralle *Discosoma sp.* [139], für  $\text{Cu}^{2+}$  sind beschrieben [140, 141, 142]. Diese zeigen eine Abhängigkeit von  $[\text{Cu}^{2+}]$ . Andere Übergangsmetalle hingegen haben keinen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität der FP. Somit ist

die selektive intrazelluläre  $\text{Cu}^{2+}$ -Detektion auf diese Weise prinzipiell möglich. Eine Quantifizierung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  kann für geringe Konzentrationen an FP in Küvettenexperimenten erfolgen.

In Zellen kann die Bestimmung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  durch diesen Ansatz nicht erfolgen, weil die Fluoreszenzintensität des Fluorophors in Zellen lokal unterschiedlich ist. Ein gemessener Intensitätswert stellt daher kein absolutes Maß für  $[\text{Cu}^{2+}]$  dar. Außerdem führt die Absorption von Licht, die von der Umgebung der Zelle abhängt und nicht als konstant betrachtet werden kann, im Falle der Messung der Fluoreszenzintensität zu Fehlern. Daher soll der Einfluss der Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  auf die Fluoreszenzlebensdauer von Mutanten des GFP mit His<sub>6</sub>-Tag untersucht werden. Insbesondere die Abhängigkeit eines möglichen Quencheffektes von der Konzentration des Quenchers, also des Kupfer(II)-ions, ist von Interesse, da sich hieraus die Möglichkeit der quantitativen Bestimmung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  ergibt.

Es zeigt sich, dass neben der Fluoreszenzintensität auch die Fluoreszenzlebensdauer von Mutanten des GFP durch die Präsenz von  $\text{Cu}^{2+}$  verkürzt wird. Die Messung des Quencheffekts auf  $\tau$  von GFP durch die Anwesenheit von  $\text{Cu}^{2+}$  hat gegenüber einer Messung der Abnahme der Intensität den Vorteil, dass dieser Effekt weitestgehend unabhängig von der GFP-Konzentration ist. Der Einfluss von  $[\text{GFP}]$  auf die Abnahme von  $\tau$  ist in Kapitel 6 beschrieben. Da die Bestimmung der Konzentration von GFP in Zellen problematisch ist, eröffnet sich daraus die Möglichkeit zur Entwicklung eines Sensors für  $\text{Cu}^{2+}$ , der für Anwendungen *in vivo* geeignet ist.

Im Folgenden wird eine Methode zur Quantifizierung *in vitro* und zur intrazellulären Quantifizierung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  beschrieben, die auf der Messung von  $\tau$  basiert. Dazu erfolgt die Titration von  $\tau$  einer Mutante des GFP durch  $\text{Cu}^{2+}$ . Aus dem Verlauf der Titrationskurve kann direkt auf  $[\text{Cu}^{2+}]$  geschlossen werden. Somit ist bei diesem Verfahren keine Referenzmessung nötig, es ist ein selbst referenzierendes System. Die Quantifizierung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  durch eine Titration von  $\tau$  wird zunächst in Küvettenexperimenten durchgeführt. Anschließend erfolgt die Bestimmung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  in *E. coli*-Zellen, die GFP exprimieren. Weiterhin wird die  $\text{Cu}^{2+}$ -Aufnahme durch Tabakzellen, die GFP enthalten, demonstriert.

Die Entwicklung dieser Methode erfolgt exemplarisch für die GFP-Mutante T203H. Die Ergebnisse lassen sich jedoch auf weitere Mutanten von GFP übertragen, wie in Anhang A gezeigt. Weiterhin werden die Bindungsstelle und der Mechanismus, der zur Verkürzung von  $\tau$  führt, identifiziert. Damit steht ein vollständig charakterisiertes System zur intrazellulären Bestimmung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  auf Grundlage der Titration von  $\tau$  des GFP zur Verfügung.

### 7.1.2 Einfluss von $\text{Cu}^{2+}$ auf die Fluoreszenzlebensdauer

Zunächst erfolgt die Bestimmung der intrinsischen Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$  der GFP-Mutanten T203H. Die besondere Eignung dieser GFP-Mutante resultiert aus zwei Gründen.

Zum einen ist für GFP T203H das Auftreten eines photophysikalischen Prozesses, dem Transfer von Protonen in einen angeregten Zustand (*excited state proton transfer* = *ESPT*), charakteristisch. Dabei wird ein Proton vom Tyrosin des neutralen Chromophors über ein Netzwerk aus Wasserstoffbrücken an den finalen Akzeptor Glutaminsäure 222 transferiert [143, 144, 145]. Hierbei entsteht ein angeregter anionischer Zustand, der grünes Licht emittiert. So lange grünes Licht vom GFP emittiert wird, kann damit sichergestellt werden, dass E222 intakt ist. Folglich kann eine Abnahme der Fluoreszenzlebensdauer durch Photokonversion ausgeschlossen werden [146, 147, 72].

Weiterhin weist diese GFP-Mutante ein monoexponentielles Abklingverhalten aus dem nicht betroffenen  $I^*$  Zustand auf [148]. Dies vereinfacht die Auswertung der Ergebnisse der Titrations von  $\tau$  durch  $\text{Cu}^{2+}$ . Die mittlere Lebensdauer weist dann genau eine spezifische Komponente für die freien GFP-Moleküle und eine spezifische Komponente für die komplexierten GFP-Moleküle in variablen Verhältnissen auf. Besitzt schon GFP selbst multiexponentiellen Charakter, so wird dieser durch das Auftreten von Komplexen mit verschiedenen  $\tau$  äußerst kompliziert. Eine Bestimmung der Anteile wird in diesem Fall nahezu unmöglich.

Nach der Messung von  $\tau$  wird zunächst die Abhängigkeit von  $\tau$  von GFP T203H durch  $[\text{Cu}^{2+}]$  untersucht. Hierzu erfolgt die sukzessive Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  zu einer Lösung von GFP T203H. Den Einfluss von  $\text{Cu}^{2+}$  in unterschiedlichen Konzentrationen auf  $\tau$  zeigt Abbildung 7.1.

Abbildung 7.1 zeigt TCSPC Histogramme für die GFP-Mutante T203H in einer Konzentration von  $5,0 \cdot 10^{-7}$  M ohne Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  (rot), sowie nach der Zugabe von  $5,0 \cdot 10^{-6}$  M (grün) bzw.  $2,5 \cdot 10^{-3}$  M  $\text{Cu}^{2+}$  (blau). Die ungequenchte Lebensdauer von GFP T203H beträgt 3,4 ns. Bei einer  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration von  $5,0 \cdot 10^{-6}$  M beträgt die Lebensdauer 2,5 ns, bei  $2,5 \cdot 10^{-3}$  M nur noch 1,4 ns. Die Werte für  $\tau$  entstammen dabei Ergebnissen aus monoexponentiellen Fits, die bei hohen  $[\text{Cu}^{2+}]$  im millimolaren Bereich nicht mehr den tatsächlichen Verlauf der Histogramme wiedergeben. Trotzdem eignen sich diese gemittelten Lebensdauerwerte gut für die Wiedergabe des wirklichen Sachverhaltes, wie in Kapitel 6 dargelegt wird. Somit eignet sich GFP T203H qualitativ für die Bestimmung von  $[\text{Cu}^{2+}]$ .

Die Ergebnisse zeigen, dass nicht nur die Fluoreszenzintensität, wie in Abbildung 7.2 dargestellt, sondern auch die Fluoreszenzlebensdauer von GFP T203H mit His<sub>6</sub>-

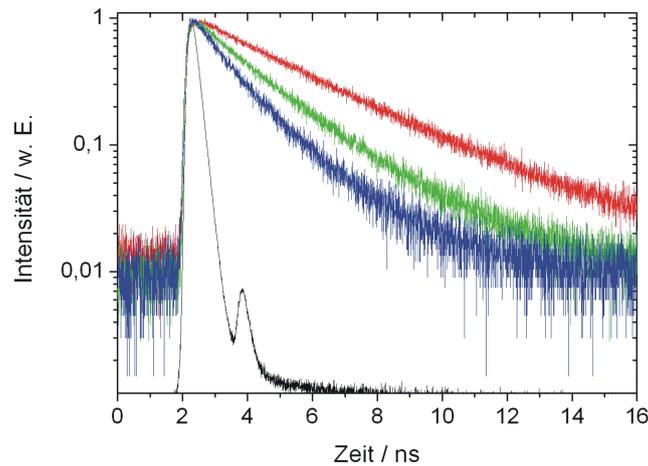


Abbildung 7.1: Lebensdauerhistogramme für die GFP-Mutante T203H bei Anregung mit  $\lambda_{ex} = 405$  nm. Die intrinsische Lebensdauer  $\tau_{fl} = 3,4$  ns (rot) reduziert sich bei einer  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration von  $5,0 \cdot 10^{-6}$  M auf 2,5 ns (grün), bei  $2,5 \cdot 10^{-3}$  M  $[\text{Cu}^{2+}]$  auf nur noch 1,4 ns (blau). Die IRF ist schwarz dargestellt.

Tag durch die Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  gequencht wird. Daher soll die Entwicklung eines Titrationsmodells für  $\tau$  von GFP durch  $\text{Cu}^{2+}$  in Analogie zum bestehenden Ansatz der Titration der Fluoreszenzintensität erfolgen [130]. Die Anwendung dieses Modells soll die Bestimmung der  $[\text{Cu}^{2+}]$ , sowie der Dissoziationskonstanten  $K_d$  ermöglichen.

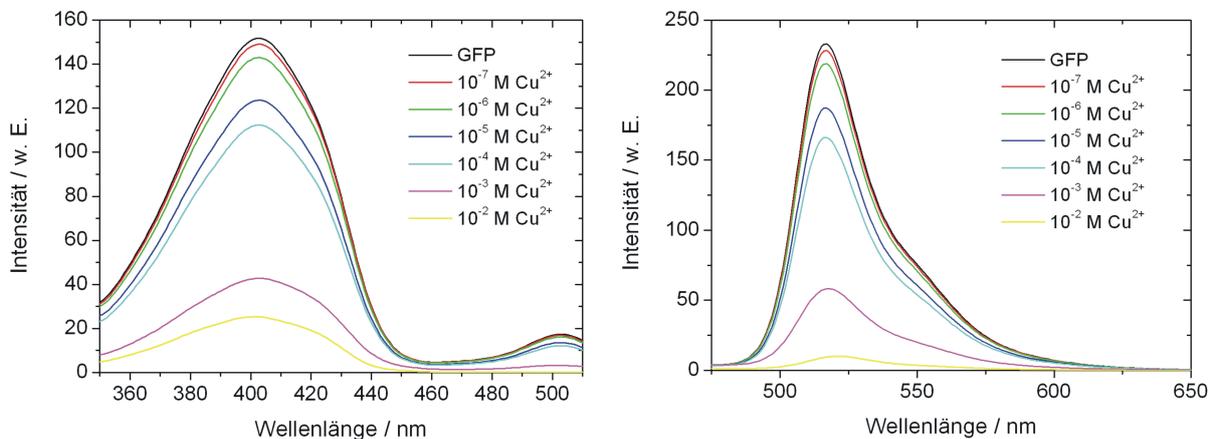


Abbildung 7.2: Die sukzessive Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  führt zur Abnahme der Fluoreszenzintensität von GFP T203H. Dargestellt ist der Einfluss verschiedener  $[\text{Cu}^{2+}]$  auf die Anregungsspektren (links), sowie auf die Emissionsspektren des GFP. Die Konzentration von GFP beträgt  $5 \cdot 10^{-7}$  M. Weiterhin ist  $\lambda_{ex} = 400$  nm und  $\lambda_{em} = 530$  nm.

### 7.1.3 Bestimmung der Bindungsstelle

Vor der Entwicklung des Modells zur Lebensdauer Titration von GFP durch  $\text{Cu}^{2+}$  wird der Mechanismus, der zur Reduzierung von  $\tau$  führt, aufgeklärt. Als erstes erfolgt dabei die Untersuchung der möglichen Bindungsstelle von  $\text{Cu}^{2+}$  an das GFP-Molekül.

Viele GFP-Mutanten besitzen mit dem His<sub>6</sub>-Tag eine Bindungsstelle für Schwermetallionen, wie beispielsweise Kupfer, Zink und Nickel [149, 150]. Es befindet sich meist am C- oder N-Terminus des Proteins. Die Einführung dieses His<sub>6</sub>-Tags, das aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinen aufgebaut ist, ermöglicht die Aufreinigung von GFP. Dabei binden die Proteine über das His<sub>6</sub>-Tag an in einer Säule immobilisierten Ni-NTA. Die anschließende Elution der gebundenen Proteine erfolgt beispielsweise über Komplexbildner wie EDTA (*Ethylendiamintetraessigsäure*).

Zur Verifizierung der These, dass  $\text{Cu}^{2+}$  an das His<sub>6</sub>-Tag des GFP bindet und dass diese Bindung Ursache für die Abnahme der Fluoreszenzlebensdauer ist, wird das His<sub>6</sub>-Tag enzymatisch abgeschnitten und der Einfluss der Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  untersucht. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten GFP-Mutanten besitzen die enzymatische Trennstelle für das His<sub>6</sub>-Tag nicht. Deshalb erfolgt dieser Versuch für eYFP, welches ein His<sub>6</sub>-Tag aufweist, das sich enzymatisch vom eYFP-Molekül abtrennen lässt. Es wird der Einfluss des His<sub>6</sub>-Tags auf die Fluoreszenzintensität und auf die Fluoreszenzlebensdauer von eYFP in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration an  $\text{Cu}^{2+}$  untersucht.

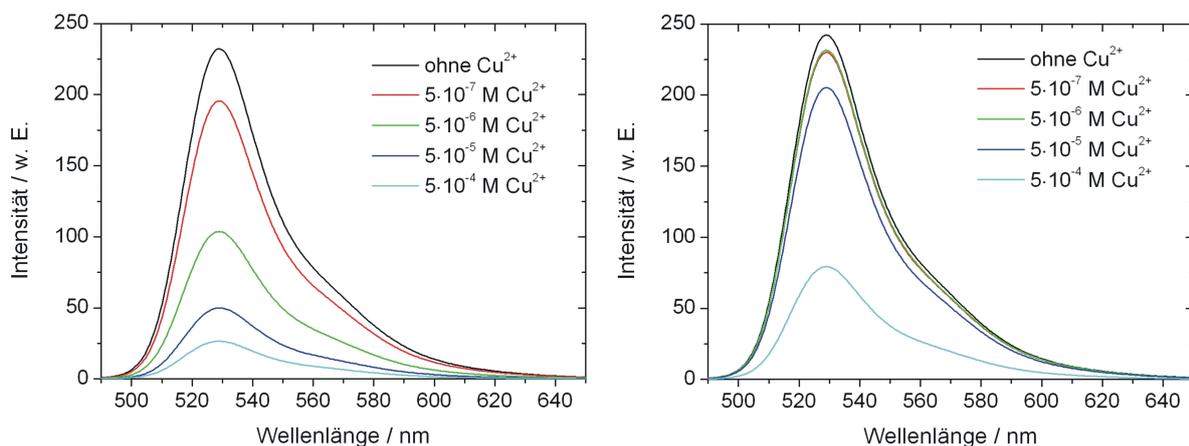


Abbildung 7.3: Einfluss der Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  auf die Fluoreszenzintensität von eYFP mit intaktem und entferntem His<sub>6</sub>-Tag. Für eYFP mit intaktem His<sub>6</sub>-Tag kommt es bereits bei  $[\text{Cu}^{2+}]$  im  $\mu\text{M}$  Konzentrationsbereich zu einer signifikanten Abnahme der Fluoreszenzintensität (links), während bei eYFP mit abgeschnittenem His<sub>6</sub>-Tag erst bei wesentlich höheren  $[\text{Cu}^{2+}]$  eine Abnahme erfolgt (rechts).  $[\text{Cu}^{2+}]$  wird dabei sukzessive von  $5,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$  auf  $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  erhöht.

Dazu werden Proben von eYFP mit intaktem und mit entferntem His<sub>6</sub>-Tag in gleichen Konzentrationen von  $5 \cdot 10^{-7}$  M hergestellt und spektroskopisch untersucht. Abbildung 7.3 zeigt die Fluoreszenzintensität von eYFP mit intaktem und mit abgeschnittenem His<sub>6</sub>-Tag bei sukzessiver Erhöhung der  $[\text{Cu}^{2+}]$ . Diese beginnt mit der Probe ohne Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  und erfolgt für  $[\text{Cu}^{2+}]$  von  $5,0 \cdot 10^{-7}$  M bis  $5,0 \cdot 10^{-4}$  M. Dabei wird deutlich, dass die Kurven für die beiden eYFP-Proben erhebliche Unterschiede aufweisen. In Tabelle 7.1 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

$[\text{Cu}^{2+}] / \text{M}$	eYFP mit His <sub>6</sub> -Tag		eYFP ohne His <sub>6</sub> -Tag	
	I / w. E.	$\Delta I / \%$	I / w. E.	$\Delta I / \%$
0	232	0	242	0
$5 \cdot 10^{-7}$	195	16	232	4
$5 \cdot 10^{-6}$	104	55	230	5
$5 \cdot 10^{-5}$	50	78	206	15
$5 \cdot 10^{-4}$	26	89	80	67

Tabelle 7.1: Fluoreszenzintensität der eYFP-Lösung mit  $[\text{eYFP}] = 5 \cdot 10^{-7}$  M, die durch die sukzessive Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  abnimmt. Dargestellt sind die Intensitäten in den Emissionsmaxima von eYFP mit und von eYFP ohne His<sub>6</sub>-Tag.

Eine signifikante Abnahme der Fluoreszenzintensität von eYFP in Abwesenheit von  $\text{Cu}^{2+}$  erfolgt für eYFP mit intaktem His<sub>6</sub>-Tag bereits bei  $[\text{Cu}^{2+}]$  im  $\mu\text{M}$  Bereich. Bei eYFP mit abgeschnittenem His<sub>6</sub>-Tag ist erst bei deutlich höheren Konzentrationen an  $\text{Cu}^{2+}$  eine Abnahme der Emissionsintensität erkennbar. Während bei  $[\text{Cu}^{2+}] = 5,0 \cdot 10^{-6}$  M (grüne Kurve in Abb. 7.3) für die Probe mit intaktem His<sub>6</sub>-Tag eine Abnahme um 55 % erfolgt, erfährt die Probe mit entferntem His<sub>6</sub>-Tag eine deutlich geringere Intensitätsabnahme um nur 5 %. Für eYFP mit intaktem His<sub>6</sub>-Tag ergibt sich bei  $[\text{Cu}^{2+}] = 5,0 \cdot 10^{-5}$  M (blaue Kurve in Abb. 7.3) eine Abnahme der Intensität um 78 %, für eYFP ohne His<sub>6</sub>-Tag hingegen nur um 15 %. Die geringe Abnahme der Fluoreszenzintensität bei eYFP mit entferntem His<sub>6</sub>-Tag, die erst bei hohen  $[\text{Cu}^{2+}]$  auftritt, spricht für das His<sub>6</sub>-Tag als Bindungsstelle von  $\text{Cu}^{2+}$  an eYFP.

Dass im Fall von eYFP mit abgeschnittenem His<sub>6</sub>-Tag überhaupt eine sichtbare Reduzierung der Intensität auftritt, entspricht zunächst nicht den Erwartungen. Eine mögliche Ursache liegt vermutlich in der Bindung von  $\text{Cu}^{2+}$  an andere mögliche Bindungsstellen im eYFP, z. B. verschiedene Aminosäuren, die eine höhere Dissoziationskonstante besitzen [151]. Die Entstehung solcher Komplexe sollte aber ebenfalls die Fluoreszenz quenchen und ist eine Erklärung dafür, dass auch bei eYFP mit abgetrenntem His<sub>6</sub>-Tag eine Reduktion der Emissionsintensität zu beobachten ist.

In Abbildung 7.4 sind die entsprechenden Anregungsspektren von eYFP dargestellt. Wieder werden  $[\text{Cu}^{2+}]$  von  $5,0 \cdot 10^{-7}$  M bis  $5,0 \cdot 10^{-4}$  M eingesetzt. Auch hier

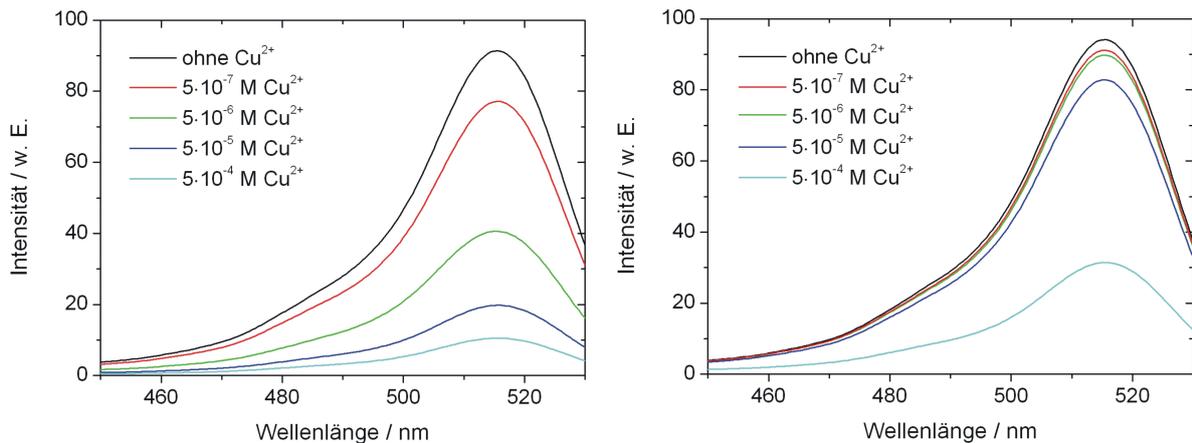


Abbildung 7.4: Einfluss der Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  auf die Anregungsintensität von eYFP mit intaktem und entferntem  $\text{His}_6$ -Tag. Für eYFP mit intaktem  $\text{His}_6$ -Tag kommt es bereits bei  $[\text{Cu}^{2+}]$  im  $\mu\text{M}$  Bereich zu signifikanter Abnahme der Anregungsintensität (links), während bei eYFP mit abgeschnittenem  $\text{His}_6$ -Tag erst bei wesentlich höheren  $[\text{Cu}^{2+}]$  eine Abnahme erfolgt (rechts).  $[\text{Cu}^{2+}]$  wird dabei sukzessive von  $5,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$  auf  $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  erhöht.

erfolgt die Abnahme der Intensität bei eYFP mit intaktem  $\text{His}_6$ -Tag bereits bei geringeren  $[\text{Cu}^{2+}]$ , als bei eYFP mit abgeschnittenem  $\text{His}_6$ -Tag. Die Abnahme der Anregungsintensitäten ist gezeigt in Tabelle 7.2.

	eYFP mit $\text{His}_6$ -Tag		eYFP ohne $\text{His}_6$ -Tag	
$[\text{Cu}^{2+}] / \text{M}$	I / w. E.	$\Delta I / \%$	I / w. E.	$\Delta I / \%$
0	92	0	94	0
$5 \cdot 10^{-7}$	77	16	91	3
$5 \cdot 10^{-6}$	41	55	90	4
$5 \cdot 10^{-5}$	20	78	83	12
$5 \cdot 10^{-4}$	11	89	31	67

Tabelle 7.2: Fluoreszenzintensität der eYFP Lösung mit  $[\text{eYFP}] = 5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ , die durch die sukzessive Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  abnimmt. Dargestellt sind die Intensitäten in den Anregungsmaxima von eYFP mit und von eYFP ohne  $\text{His}_6$ -Tag.

Die Beobachtungen der Anregungsintensitäten und der Emissionsintensitäten liefern die selben Resultate. Die Anregungsintensität bei  $[\text{Cu}^{2+}] = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  (blaue Kurve in Abb. 7.4) zeigt eine Abnahme für eYFP mit  $\text{His}_6$ -Tag um 78%. Ist der  $\text{His}_6$ -Tag des eYFP abgeschnitten, so geht die Intensität nur um 12% zurück. Dass es bei  $[\text{Cu}^{2+}] = 5,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  (türkise Kurve in Abb. 7.4) selbst bei eYFP ohne  $\text{His}_6$ -Tag zu einer drastischen Reduzierung der Anregungsintensität um 67% kommt, liegt in Analogie zur Reduzierung der Emission in der möglichen Bindung von  $\text{Cu}^{2+}$  an andere Bindungsstellen im Protein. Trotzdem liegt die Intensitätsabnahme deutlich unter der von eYFP

mit His<sub>6</sub>-Tag, die bei 89 % liegt.

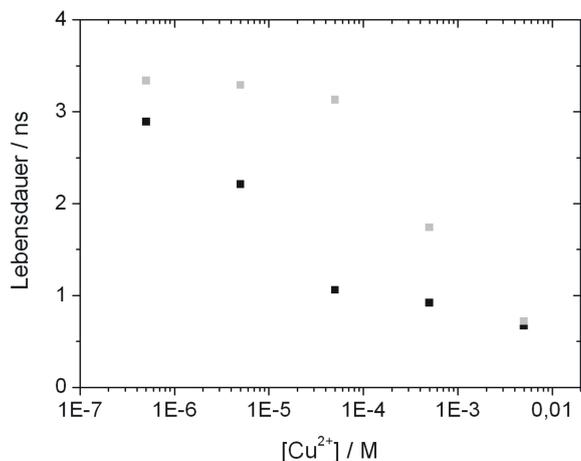


Abbildung 7.5: Titration der Fluoreszenzlebensdauer von eYFP mit intaktem und entferntem His<sub>6</sub>-Tag mit Cu<sup>2+</sup>. Eine deutliche Abnahme der Lebensdauer erfolgt für eYFP mit intaktem His<sub>6</sub>-Tag bereits bei [Cu<sup>2+</sup>] im  $\mu$ M Bereich. Für eYFP mit entferntem His<sub>6</sub>-Tag sind hingegen wesentlich höhere Konzentrationen erforderlich, um Quenching von  $\tau$  zu erzielen. Dargestellt sind  $\tau$  Werte, die aus monoexponentiellen Fits gewonnen sind.

Für beide Varianten von eYFP erfolgt außerdem die Messung von  $\tau$  in Abhängigkeit von [Cu<sup>2+</sup>]. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 7.5. In Analogie zu den Ergebnissen der Messungen der Fluoreszenzintensität, ist beim Einfluss von Cu<sup>2+</sup> auf die Lebensdauer ein Unterschied zwischen eYFP mit intaktem und mit abgetrenntem His<sub>6</sub>-Tag erkennbar. Für die eYFP-Probe mit intaktem His<sub>6</sub>-Tag erfolgt eine deutliche Abnahme der Lebensdauer bereits bei [Cu<sup>2+</sup>] im  $\mu$ M Bereich, wohingegen für die eYFP-Probe mit entferntem His<sub>6</sub>-Tag ein Einfluss von Kupfer auf die Lebensdauer erst bei deutlich höheren Konzentrationen erfolgt. Um den selben Quencheffekt zu erzielen, ist bei der Probe ohne His<sub>6</sub>-Tag eine [Cu<sup>2+</sup>] erforderlich, die etwa um den Faktor 100 gegenüber der Probe mit intaktem His<sub>6</sub>-Tag erhöht ist. Auch hier liegt die Ursache für das Auftreten der Reduzierung von  $\tau$  wahrscheinlich in der Präsenz weiterer Bindungsstellen für Cu<sup>2+</sup>, die eine geringere Affinität als das His<sub>6</sub>-Tag zeigen. Insbesondere zur Beobachtung von durch Cu<sup>2+</sup> bedingten Einflüssen auf  $\tau$  in Zellen für niedrige [Cu<sup>2+</sup>], wie sie im physiologischen Bereich vorliegen, ist die Präsenz eines His<sub>6</sub>-Tags in den verwendeten Mutanten von GFP unabdingbar.

Die Ergebnisse dieser Messungen zeigen, dass das His<sub>6</sub>-Tag entsprechend den Vermutungen als Bindungsstelle für Cu<sup>2+</sup> an GFP verantwortlich ist. Für die Bestimmung von [Cu<sup>2+</sup>] *in vitro* und *in vivo* heißt das, dass die Mutanten von GFP, die für Titrationsexperimente eingesetzt werden, ein His<sub>6</sub>-Tag besitzen müssen.

Mutanten von GFP, die kein His<sub>6</sub>-Tag besitzen, sind deutlich insensitiver gegenüber Cu<sup>2+</sup>. Diese können zur Entwicklung eines Sensors für höhere [Cu<sup>2+</sup>] eingesetzt werden. Im für Zellen physiologisch relevanten Konzentrationsbereich ist das jedoch nicht von Interesse.

#### 7.1.4 Mögliche Quenchmechanismen

Die Abnahme der Lebensdauer von GFP durch die Präsenz von Cu<sup>2+</sup> wird als Quenchen bezeichnet. Es gibt mehrere Quenchmechanismen, die sich in ihren Auswirkungen auf die Fluoreszenzintensität und auf die Fluoreszenzlebensdauer des GFP unterscheiden. Einige dieser Quenchmechanismen führen zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität, ohne dass die Fluoreszenzlebensdauer beeinträchtigt wird. Bei anderen Quenchmechanismen kommt es neben der Abnahme der Intensität auch zu einer Abnahme der Lebensdauer. Im Folgenden werden die in Frage kommenden Quenchmechanismen diskutiert, um die Ursache für das Lebensdauerquenchen von GFP zu analysieren.

Statisches Quenchen im konventionellen Sinne beschreibt Quenchen, das durch die Bildung eines Komplexes des Fluorophors hervorgerufen wird. Der zunächst fluoreszierende Fluorophor ist innerhalb des Komplexes nicht mehr fluoreszenztüchtig. Dadurch sinkt die Fluoreszenzintensität. Einen Einfluss auf  $\tau$  hat die Entstehung solcher Komplexe jedoch nicht, weil diese kein Fluoreszenzlicht emittieren und damit nicht zu Messungen von  $\tau$  beitragen [152]. Dieser Zusammenhang wird beschrieben durch Gleichung 7.1 [98].

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 \quad (7.1)$$

Hier bezeichnet  $\tau_0$  die intrinsische Lebensdauer des Fluorophors. Diese wird nach der Zugabe des Quenchers mit  $\tau$  bezeichnet. Beim statischen Quenchen hat die Zugabe des Quenchers keinen Einfluss auf  $\tau_0$ . Die Anlagerung von Cu<sup>2+</sup> an ein in das Gerüst des GFP eingebautes His<sub>6</sub>-Tag, kann zu einer Verminderung der Fluoreszenzintensität des GFP führen [153, 154]. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus Abschnitt 7.1.2 überein. Abbildung 7.2 zeigt die Abnahme der Fluoreszenzintensität von GFP T203H in Abhängigkeit der eingesetzten [Cu<sup>2+</sup>]. Da im System aus GFP und Cu<sup>2+</sup> neben einer Abnahme der Fluoreszenzintensität auch eine Reduzierung von  $\tau$  beobachtet wird, vgl. Abbildung 7.1, kann statisches Quenchen als Ursache für das Sinken von  $\tau$  ausgeschlossen werden.

Dynamisches Quenchen beschreibt das Phänomen der Kollision von Fluorophor und Quencher, während sich der Fluorophor im angeregten Zustand befindet. Durch die Kollision erfolgt die Relaxation in den Grundzustand. Das führt sowohl zu einer

Abnahme der Fluoreszenzintensität, als auch zur Reduzierung von  $\tau$ . Für einen typischen Quencher mit einer Diffusionskonstanten von  $D = 2,5 \cdot 10^{-5} \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}$ , wie etwa für Sauerstoff und  $\tau = 3 \text{ ns}$ , ergibt sich gemäß  $\sqrt{(\Delta x^2)} = \sqrt{2D\tau}$  eine Entfernung von etwa 4 nm, die der Quencher in diesen 3 ns zurücklegen kann. Für eine  $1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  GFP-Lösung beträgt der Abstand zweier GFP-Moleküle etwa 1  $\mu\text{m}$ . Selbst bei Konzentrationen des Quenchers in millimolaren Konzentrationen, die einer Entfernung von etwa 100 nm entsprechen, kann dynamisches Quenchen damit ausgeschlossen werden. Unterstützt wird diese Abschätzung durch die Abnahme der Fluoreszenzintensität durch dynamisches Quenchen, die der Stern-Volmer-Gleichung für dynamisches Quenchen folgt [98]:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV} \cdot [Q]. \quad (7.2)$$

Dabei bezeichnet  $I_0$  die Fluoreszenzintensität der GFP-Lösung in Abwesenheit des Quenchers  $Q$ , der hier  $\text{Cu}^{2+}$  entspricht.  $I$  beschreibt die Intensität in Abhängigkeit von  $[\text{Cu}^{2+}]$ ,  $K_{SV}$  die Stern-Volmer-Konstante. Die Fluoreszenzintensitäten  $I_0$  und  $I$  der GFP-Mutante T203H (Abb. 7.2), sowie von  $\frac{I_0}{I}$ , sind in Tabelle 7.3 dargestellt.

$[\text{Cu}^{2+}] / \text{M}$	$I / \text{w. E.}$	$\frac{I_0}{I}$
0	233	1,00
$10^{-7}$	228	1,02
$10^{-6}$	219	1,06
$10^{-5}$	187	1,25
$10^{-4}$	166	1,40

Tabelle 7.3: Fluoreszenzintensität der GFP T203H Lösung mit  $[\text{GFP}] = 5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ , die durch die sukzessive Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  abnimmt. Die Auftragung von  $\frac{I_0}{I}$  gegen  $[\text{Cu}^{2+}]$  gibt Hinweise auf den verantwortlichen Quenchmechanismus.

Die Stern-Volmer-Auftragung in Abbildung 7.6 ergibt einen nichtlinearen Kurvenverlauf. Damit ist dynamisches Quenchen nicht die Ursache, die für das Quenchen der Fluoreszenzintensität und der Fluoreszenzlebensdauer verantwortlich ist.

Photoinduzierter Elektronentransfer (PET) ist ein molekularer Mechanismus, der für Abstände von unter einem Nanometer auftritt [155]. Aufgrund der geometrischen Struktur von GFP, bei der der Abstand zwischen Chromophor und N- bzw. C-Terminus, an dem sich der His<sub>6</sub>-Tag befindet mehr als zwei Nanometer beträgt, ist der Abstand zwischen Chromophor und über das His<sub>6</sub>-Tag gebundene  $\text{Cu}^{2+}$  somit deutlich größer als ein Nanometer. Dadurch kann PET als Quenchmechanismus ausgeschlossen werden.

Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) quencht sowohl die Fluoreszenzintensität als auch die Fluoreszenzlebensdauer. FRET tritt für Entfernungen zwischen Donor und

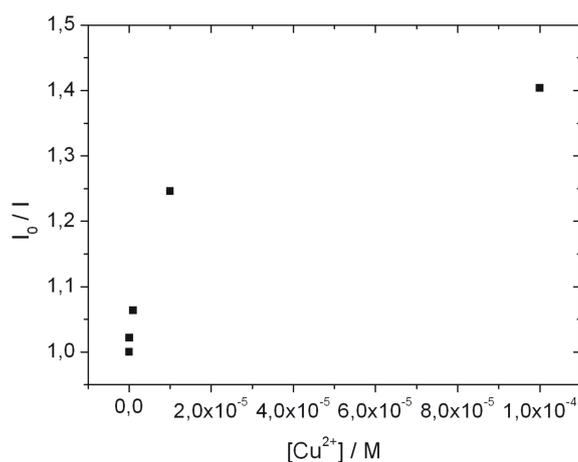


Abbildung 7.6: Stern-Volmer-Auftragung der Fluoreszenzintensitäten. Der nichtlineare Kurvenverlauf schließt dynamisches Quenchen als Ursache der Reduzierung der Lebensdauer aus.

Akzeptor im Bereich weniger Nanometer auf. Das stimmt mit den geometrischen Gegebenheiten des GFP überein. Da weiterhin der spektrale Überlapp der Fluoreszenz von GFP mit der Absorption mit an Imidazolringen komplexiertem  $\text{Cu}^{2+}$  gegeben ist, wird FRET als wahrscheinlicher verantwortlicher Quenchmechanismus im nächsten Abschnitt genauer untersucht.

### 7.1.5 FRET führt zur Reduzierung der Lebensdauer

Die Ausmaße eines GFP-Moleküls betragen 4,2 (Höhe) × 2,4 nm (Breite) [50]. Der Chromophor befindet sich in der Mitte der fassartigen Struktur. Damit beträgt der Abstand zwischen FRET-Donor und FRET-Akzeptor etwa 2-3 nm. Dies liegt im Bereich, in dem FRET auftritt. Die geometrischen Voraussetzungen für FRET zwischen dem Chromophor von GFP und am His<sub>6</sub>-Tag komplexiertem  $\text{Cu}^{2+}$  sind somit erfüllt.

Eine weitere Bedingung für FRET ist der spektrale Überlapp der Emission des Donors und der Absorption des Akzeptors. Das entspricht dem Überlapp des Emissionsspektrums der GFP-Mutante T203H mit dem Absorptionsspektrum von  $\text{Cu}^{2+}$ , das an einen Imidazolring gebunden ist. Um die spektrale Eignung von GFP und  $\text{Cu}^{2+}$  als FRET-Paar zu bestimmen, erfolgt die Aufnahme eines Absorptionsspektrums des FRET-Akzeptors. Dazu wird ein Komplex von  $\text{Cu}^{2+}$  und Polyhistidin hergestellt. Dieser soll die Seitenketten des His<sub>6</sub>-Tags simulieren. Außerdem wird das Emissionsspektrum der GFP-Mutante T203H nach Anregung mit  $\lambda_{ex} = 405$  nm aufgenommen. Die beiden Spektren sind dargestellt in Abbildung 7.7.

Eine letzte Bedingung, die Voraussetzung für FRET ist, ergibt sich aus der relati-

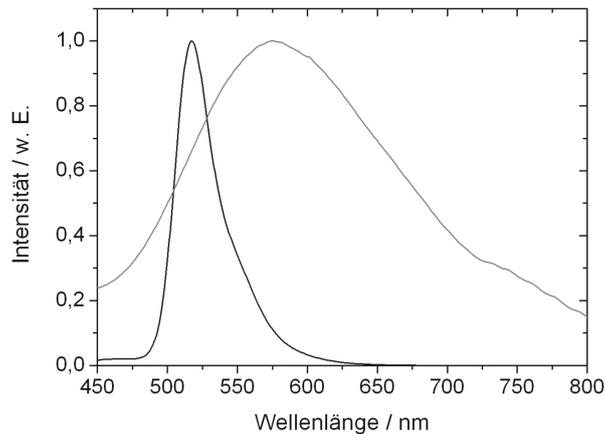


Abbildung 7.7: Spektraler Überlapp des Donor-Emissionsspektrums von GFP T203H (schwarz,  $\lambda_{ex} = 405$  nm) mit dem Absorptionsspektrum des Komplexes von  $\text{Cu}^{2+}$  und Polyhistidin (grau). Die Exktinktion im Maximum beträgt  $\epsilon_{max}$  ( $\lambda_{max} = 575$  nm) =  $112 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Die Breite des Spektrums des Akzeptors von etwa 200 nm trägt zu einem hohen Überlappintegral  $J(\lambda)$  bei.

ven Orientierung der Dipole. Können sich Donor und Akzeptor frei bewegen, so wird aufgrund der zufälligen Orientierung der Dipole  $\kappa^2=2/3$  angenommen [98]. Begründen lässt sich diese Annahme für an das His<sub>6</sub>-Tag gelabelte GFP-Moleküle durch die Flexibilität der Metallionenkomplexe am His<sub>6</sub>-Tag.

Alle drei Bedingungen, die für FRET notwendig sind, sind für das FRET-Paar GFP T203H und  $\text{Cu}^{2+}$  erfüllt. Die Ergebnisse der Intensitäts- und der Lebensdauertitratio- nen implizieren FRET als verantwortlichen Quenchmechanismus.

Ein weiteres Indiz für das Auftreten von FRET liegt in der Abnahme der Intensität des Donors, bei gleichzeitigem Anstieg der Akzeptorfluoreszenz. Da im Fall von  $\text{Cu}^{2+}$  ein nicht fluoreszierender Komplex vorliegt, ist die Verifizierung dieses Sachverhaltes nicht möglich.

Eine charakteristische Größe für FRET ist der Förster-Radius  $R_0$ . In die Formel zur Berechnung des Förster-Radius zwischen GFP und dem entsprechenden Metallion, geht dessen Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  ein (Formel 3.17). Aus dem Absorptionsspektrum des Komplexes aus  $\text{Cu}^{2+}$  und Polyhistidin, der eine starke blaue Färbung aufweist, ergibt sich  $\epsilon_{Cu} = 112 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  in guter Übereinstimmung mit Literaturwerten [156]. Die Quantenausbeute einer Mutante von GFP mit der Mutation T203H beträgt  $QD = 0,78$  [157], der Brechungsindex in Wasser beträgt  $n = 1,33$ , für Biomoleküle in wässrigen Lösungen  $n = 1,4$  [98].  $N_A$  beschreibt die Avogadro-Konstante. Für den Orientierungs- faktor wird  $\kappa^2 = 2/3$  eingesetzt [158].

Mit diesen Größen ergibt sich für das FRET-Paar GFP T203H und an Polyhistidin

komplexiertem  $\text{Cu}^{2+}$  ein Überlappintegral von  $J(\lambda) = 6,7 \cdot 10^{12} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{nm}^4$  und daraus ein Förster-Radius von  $R_0 = 2,1 \pm 0,1 \text{ nm}$ . Da der Abstand zwischen Chromophor und  $\text{Cu}^{2+}$  ungefähr den gleichen Betrag aufweist wie  $R_0$ , sollte die Effizienz für FRET etwa 50 % betragen.

Aus Gleichung 3.20 wird die FRET-Effizienz mit den Lebensdauerwerten der freien Spezies von GFP T203H mit  $\tau_D = 3,4 \text{ ns}$  und den mit  $\text{Cu}^{2+}$  komplexierten GFP-Molekülen mit  $\tau_{DA} = 1,4 \text{ ns}$  ermittelt. Dies ergibt  $E = 0,59$ . Gleichung 3.21 bezieht den berechneten Förster-Radius in die Betrachtung von  $E$  mit ein. Der Abstand  $R$  entspricht dabei der Entfernung von Chromophor und  $\text{Cu}^{2+}$ . Aus den molekularen Dimensionen des Moleküls, das eine Größe von  $4,2 \times 2,4 \text{ nm}$  aufweist [50], ergibt sich unter Vernachlässigung der Länge des His<sub>6</sub>-Tags eine Entfernung zwischen  $1/2 \times 4,2 \text{ nm} = 2,1 \text{ nm}$ , falls sich das His<sub>6</sub>-Tag in zentraler Position befindet und  $\sqrt{2,1^2 + 1,2^2} \text{ nm} = 2,4 \text{ nm}$ , falls das His<sub>6</sub>-Tag an der Ecke zu finden ist. Einsetzen des berechneten Förster-Radius für den Komplex zwischen GFP und  $\text{Cu}^{2+}$  von  $R_0 = 2,1 \text{ nm}$  und  $R = 2,1 \text{ nm}$ , ergibt daraus gemäß Gleichung 3.21 eine FRET-Effizienz von  $E = 0,50$ . Damit kann selbst für das System aus GFP T203H und an Polyhistidin gebundenem  $\text{Cu}^{2+}$  ein Förster-Radius ermittelt werden, der den experimentellen Werten entspricht. Die leichte Abweichung der durch die Lebensdauern bestimmten Effizienz von 59 % und der über den Förster-Radius ermittelten Effizienz von 50 % hat ihre Ursache in der Betrachtung des künstlichen Systems mit Polyhistidin, das nicht exakt mit der tatsächlichen Bindungsstelle im GFP, dem His<sub>6</sub>-Tag, übereinstimmt.

### 7.1.6 Bestimmung von $K_d$

Der Verlauf der Lebensdauer in Abhängigkeit von  $[\text{Cu}^{2+}]$  entspricht dem einer Titrationskurve in Analogie zum Verlauf der Fluoreszenzintensität als Funktion von  $[\text{Cu}^{2+}]$  [130]. In Kapitel 6 wird aus dem Zusammenhang zwischen  $[\text{Cu}^{2+}]$  und der Fluoreszenzintensität ein Zusammenhang zwischen  $[\text{Cu}^{2+}]$  und  $\tau$  hergeleitet. Dieser wird ausgedrückt durch Gleichung 6.28. Damit ergibt sich die Möglichkeit zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten  $K_d$  aus einer Lebensdauertitration durch  $\text{Cu}^{2+}$ . Die Bestimmung von  $K_d$  erfolgt durch Fitten der experimentell aufgenommenen Titrationskurve von  $\tau$  durch  $\text{Cu}^{2+}$  mit Gleichung 6.28.

Die Bestimmung von  $K_d$  für GFP-Mutante T203H und  $\text{Cu}^{2+}$  erfolgt aus Titrationskurven, die sich aus der  $\text{Cu}^{2+}$ -Lebensdauertitration ergeben. Die eingesetzte Konzentration beträgt  $[\text{GFP}] = 1,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ . Aus den Lebensdaueremessungen ohne Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  bzw. bei maximaler Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  ergeben sich  $\tau_{\text{frei}} = 3,4 \text{ ns}$  und  $\tau_{\text{geb}} = 1,4 \text{ ns}$ . Der Fit gemäß Gleichung 6.28 ergibt  $K_d = 11 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  (Abbildung 7.8).

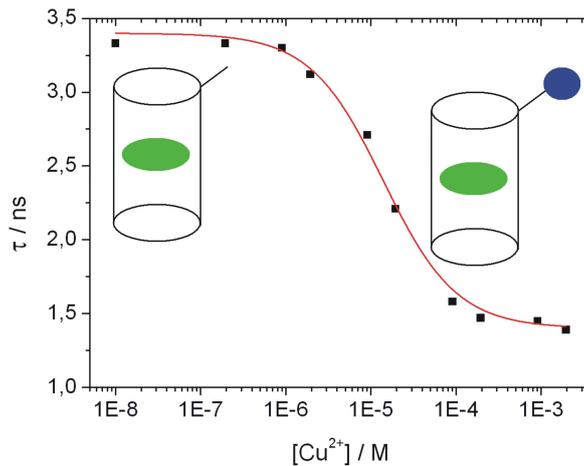


Abbildung 7.8: Bestimmung von  $K_d$  aus der Titration von GFP T203H in einer Konzentration von  $1,5 \cdot 10^{-6}$  M mit  $\text{Cu}^{2+}$ . Die Messung von  $K_d$  erfolgt über einen Fit mittels der Titrationsformel, vgl. Gleichung 6.28. Diese Titration stellt die Kalibrationsmessung für die Bestimmung der intrazellulären  $[\text{Cu}^{2+}]$  dar.

Außerdem erfolgt für GFP T203H die Bestimmung von  $K'_d$  aus der Auftragung gegen den Anteil freier GFP-Moleküle. Daraus ergibt sich  $K'_d = 7 \cdot 10^{-6}$  M (Abb. 6.5). Damit beträgt  $K_d = (9 \pm 2) \mu\text{M}$  für die GFP-Mutante T203H und  $\text{Cu}^{2+}$ . Mit dem experimentell bestimmten Wert von  $K_d$  für GFP T203H ergibt sich die Möglichkeit zur Bestimmung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  in lebenden Zellen, die diese Mutante exprimieren.

Der Fit dieses Titrationsverlaufes stellt dazu die Referenz der Lebensdauerwerte in Abhängigkeit von  $[\text{Cu}^{2+}]$  dar und wird im Folgenden zur Bestimmung der intrazellulären Konzentration von  $\text{Cu}^{2+}$  in *E. coli* verwendet. Zur Ermittlung der  $[\text{Cu}^{2+}]$  in der Zelle, wird der gemessene Lebensdauerwert dem entsprechenden Konzentrationswert an  $\text{Cu}^{2+}$  aus der Kalibrationskurve zugeordnet. Unter der Voraussetzung, dass die GFP-Konzentration in der Zelle unter dem  $K_d$ -Wert liegt, erfolgt damit eine Bestimmung des intrazellulären  $\text{Cu}^{2+}$ -Gehaltes.

### 7.1.7 Selektivität

Für die Entwicklung eines selektiven  $\text{Cu}^{2+}$ -Sensors ist es wichtig, mögliche Einflüsse ebenfalls in den Proben vorhandener Ionen oder Stoffe auf  $\tau$  auszuschließen. Der Fokus liegt hierbei auf den biologisch relevanten Ionen von Eisen, Kobalt, Zink, Mangan und Nickel. Der als FRET identifizierte Quenchemechanismus basiert auf dem spektralen Überlapp des Emissionsspektrums von GFP mit dem Absorptionsspektrum des Metallions. Für  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$ , die selbst im Komplex mit Polyhistidin keine relevante Absorption im sichtbaren Spektralbereich aufweisen, wird kein FRET und

damit keine Verkürzung von  $\tau$  erwartet. Komplexe von Polyhistidin mit  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$  absorbieren zwar, jedoch ist das Maximum von  $\text{Ni}^{2+}$  stark rotverschoben und die absolute Absorption von  $\text{Co}^{2+}$  im Vergleich zu  $\text{Cu}^{2+}$  gering, wie in Abbildung 7.9 gezeigt. Deshalb sollten die untersuchten Metallionen zu keiner signifikanten Abnahme der Lebensdauer von GFP führen.

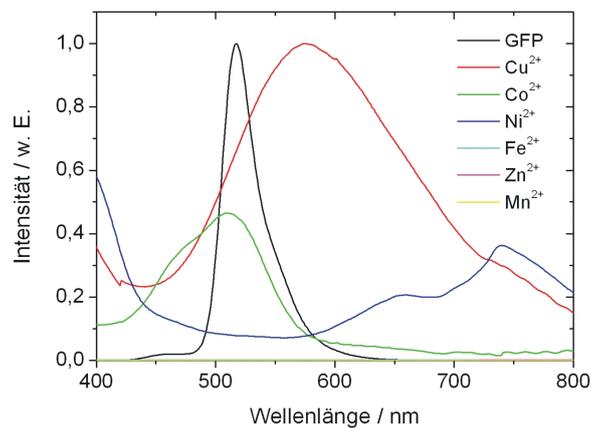


Abbildung 7.9: Spektraler Überlapp des Donor-Emissionsspektrums von GFP T203H (schwarz,  $\lambda_{ex} = 405$  nm) mit den Absorptionsspektren der Komplexe von Polyhistidin mit  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$ .

Um eine mögliche störende Beeinflussung der Lebensdauer der verwendeten GFP-Mutanten auszuschließen, werden Lösungen dieser Mutanten mit den entsprechenden Metallionen inkubiert. Für die Metallionen  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  in einer Konzentration von 10 mM ist keine Veränderung der Fluoreszenzlebensdauer von GFP T203H erkennbar. Diese Beobachtung stimmt überein mit den Absorptionsspektren dieser Ionen, die keine relevante Absorption im sichtbaren Spektralbereich aufweisen. Deshalb sind Paare aus Mutanten von GFP und  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  trotz der Möglichkeit einen Komplex über das  $\text{His}_6$ -Tag zu bilden, für FRET nicht geeignet. Sie sind somit insensitive gegenüber diesen Metallionen.

Die Zugabe einer  $\text{Ni}^{2+}$ -Lösung zu einer Endkonzentration von 10 mM, führt zu einer geringfügigen Abnahme der Lebensdauer von  $3,4 \pm 0,1$  ns auf  $3,2 \pm 0,1$  ns. Eine 10 mM Konzentration von  $\text{Co}^{2+}$  führt zur Reduktion der Lebensdauer von  $3,4 \pm 0,1$  ns auf  $2,8 \pm 0,1$  ns. Die vollständigen Titrationskurven der  $\tau$  von GFP T203H für  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$  sind abgebildet in Anhang B. Aufgrund dieser Ergebnisse ergibt sich ein signifikanter Einfluss auf die Lebensdauer von GFP T203H ausschließlich für  $\text{Co}^{2+}$  bei Konzentrationen im millimolaren Bereich. Für die Quantifizierung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  *in vivo* ist dieser Effekt vernachlässigbar, da diese Konzentrationen nicht im physiologischen, sondern im für die Zellen toxischen Bereich liegen.

Zur Messung der Extinktionskoeffizienten von Kupfer-, Kobalt- und Nickelkomplexen mit Polyhistidin, werden deren Absorptionsspektren aufgenommen. Dabei beträgt die Konzentration der Metallionen  $1 \cdot 10^{-4}$  M, Polyhistidin wird im Überschuss dazugegeben. Die Ergebnisse für Kupfer, Kobalt und Nickel sowie die berechneten Überlappintegrale und Förster-Radien für GFP T203H sind dargestellt in Tabelle 7.4.

	Cu <sup>2+</sup>	Co <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>
$\epsilon / \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	112	52	41
$\lambda_{max} / \text{nm}$	575	509	740
$J(\lambda) / 10^{12} \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{nm}^4$	6,70	2,97	0,71
$R_0 / \text{nm}$	2,1	1,8	1,4

Tabelle 7.4: Ergebnisse der Absorptionsmessungen von Metallionen-Polyhistidin-Komplexen zur Bestimmung der Extinktionskoeffizienten. Aus der Extinktion und den Spektren ergeben sich die Überlappintegrale und die Förster-Radien. Die Ergebnisse für Kupfer, Kobalt und Nickel sind dargestellt.

Zur Charakterisierung von FRET und dem Vergleich zwischen den Metallionen Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> und Co<sup>2+</sup>, werden die Förster-Radien  $R_0$  für die FRET-Paare dieser Ionen mit GFP T203H ermittelt. Da relevantes Quenchen der Lebensdauer von GFP ausschließlich von zweiwertigen Kupferionen verursacht wird, wird für die weiteren, für FRET relevanten Ionen von Kobalt und Nickel, ein kürzerer  $R_0$  erwartet.

Die Bestimmung der  $R_0$  für Kupfer, Kobalt und Nickel für die GFP-Mutante T203H erfolgt gemäß Gleichung 3.17. Das dargestellte Emissionsspektrum entspricht dem normierten Emissionsspektrum von GFP T203H, während die Absorptionsspektren des entsprechenden Metallions als Komplex mit Polyhistidin eingesetzt werden. Die Spektren für GFP T203H und die Komplexe aus Polyhistidin und Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> und Ni<sup>2+</sup> sind dargestellt in Abbildung 7.9.

Die Berechnung von  $R_0$  von Kobalt und Nickel erfolgt gemäß Gleichung 3.17. Die Konstanten werden in Analogie der Bestimmung von  $R_0$  von GFP und Cu<sup>2+</sup> übernommen. Es ergeben sich  $R_0^{Co} = 1,8$  nm für Kobalt und  $R_0^{Ni} = 1,4$  nm für Nickel. Diese Ergebnisse stimmen mit den Erwartungen überein. Weiterhin zeigt sich, dass mit  $R_0^{Co} = 1,8$  nm für Co<sup>2+</sup> und  $R_0^{Ni} = 1,4$  nm für Ni<sup>2+</sup> die Förster-Radien dieser Ionen den Ergebnissen der Messungen von  $\tau$  entsprechen. Bei diesen führt die gleiche Ionenkonzentration zu einer stärkeren Reduzierung von  $\tau$  bei Co<sup>2+</sup>, bedingt durch den größeren  $R_0$  im Vergleich zu Ni<sup>2+</sup>.

Zum einen entspricht der Förster-Radius für Kupfer und GFP  $R_0 = 2,1$  nm ungefähr dem geometrischen Abstand von Donor und Akzeptor auf molekularer Ebene. Eine Bindung von Cu<sup>2+</sup> an das His<sub>6</sub>-Tag führt damit zu effizientem Energietransfer, wie er experimentell beobachtet wird. Zum anderen sind die Förster-Radien für Ko-

balt und Nickel kleiner als für Kupfer. Deshalb muss für FRET der Abstand zwischen diesen Ionen und GFP deutlich kleiner sein als bei Kupfer, um die gleiche Effizienz aufzuweisen. Dies ist aber durch die geometrischen Gegebenheiten nicht möglich. Auch dieser Umstand entspricht somit den Resultaten aus den Experimenten.

Zur Quantifizierung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  in der Küvette und in lebenden Zellen ist der Einfluss anderer Substanzen unerwünscht. Verschiedene Metallionen binden an das His<sub>6</sub>-Tag [149]. Solange jedoch wie für  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$  kein FRET zwischen GFP und diesen Ionen stattfindet, wird die Lebensdauer dadurch nicht direkt beeinträchtigt. Ein Problem, das die Messwerte beeinflussen kann, ist die Bindung dieser Ionen an das His<sub>6</sub>-Tag, wodurch es zur Konkurrenz mit  $\text{Cu}^{2+}$  um die Bindungsstelle kommen kann. Dieser Effekt kann für hohe Konzentrationen an Metallionen auftreten, wodurch  $[\text{Cu}^{2+}]$  fälschlicherweise als zu gering gemessen wird. Um den Einfluss der Bindung von Metallionen, die die Lebensdauer von GFP nicht verkürzen, durch die Belegung der Bindungsstelle für  $\text{Cu}^{2+}$  zu bestimmen, sind weitergehende Experimente nötig. Insgesamt ist die Messung der Fluoreszenzlebensdauer von GFP zur Bestimmung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  eine im untersuchten Rahmen selektive Methode.

### 7.1.8 Reversibilität der Bindung

Die Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  zu GFP führt zur Bildung von Komplexen zwischen GFP und  $\text{Cu}^{2+}$ . Dabei bindet  $\text{Cu}^{2+}$  an das His<sub>6</sub>-Tag der GFP-Moleküle. Um die mögliche Reversibilität der Bindung zu untersuchen, wird zu einer GFP-Lösung  $\text{Cu}^{2+}$  gegeben. Vor und nach der Zugabe erfolgt die Bestimmung von  $\tau$ . Anschließend erfolgt die Zugabe von Imidazol in verschiedenen Konzentration. Die Titrationskurven sind ermittelt für die GFP-Mutante QC 2 in submikromolarer Konzentration.

Die Ergebnisse dieses Experiments sind dargestellt in Abbildung 7.10. Hierbei werden die  $[\text{Cu}^{2+}]$  sukzessive verzehnfacht, ausgehend von  $1 \cdot 10^{-6}$  M bis zu  $1 \cdot 10^{-3}$  M. Die Konzentrationen von Imidazol betragen  $2 \cdot 10^{-3}$ ,  $2 \cdot 10^{-2}$  und  $2 \cdot 10^{-1}$  M.

Neben dem Einfluss der Imidazolzugabe auf die Lebensdauer, wird der Effekt auf die Fluoreszenzintensität untersucht. Dabei wird das Spektrum von GFP QC 2 mit  $\text{Cu}^{2+}$  in einer Konzentration von  $[\text{Cu}^{2+}] = 1 \cdot 10^{-3}$  M versetzt. Es erfolgt die Aufnahme von Emissionsspektren zunächst ohne Imidazol. Anschließend wird das Spektrum jeweils nach der Zugabe von  $2 \cdot 10^{-3}$  M und  $2 \cdot 10^{-1}$  M Imidazol erneut vermessen. Den Einfluss der Zugabe von Imidazol auf die Intensität der Emission von GFP QC 2 zeigt Abbildung 7.11.

Sowohl die Fluoreszenzlebensdauer als auch die Fluoreszenzintensität von His<sub>6</sub>-GFP wird durch  $\text{Cu}^{2+}$  gequenchet. Die Zugabe von Imidazol, das  $\text{Cu}^{2+}$  bindet, hebt

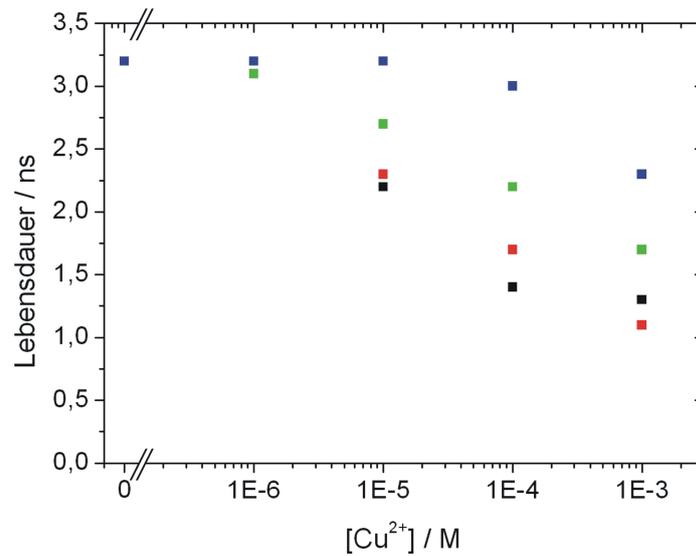


Abbildung 7.10: Die Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  zu einer Lösung mit GFP führt zu einer signifikanten Abnahme von  $\tau$ . Diese Lebensdauerabnahme kann durch die Zugabe von Imidazol aufgehoben werden. Ursache ist die Bereitstellung alternativer Bindungsstellen für  $\text{Cu}^{2+}$ . Schwarz entspricht der Titration ohne Imidazol, rot mit  $2 \cdot 10^{-3}$  M, grün mit  $2 \cdot 10^{-2}$  M und blau mit  $2 \cdot 10^{-1}$  M Imidazol.

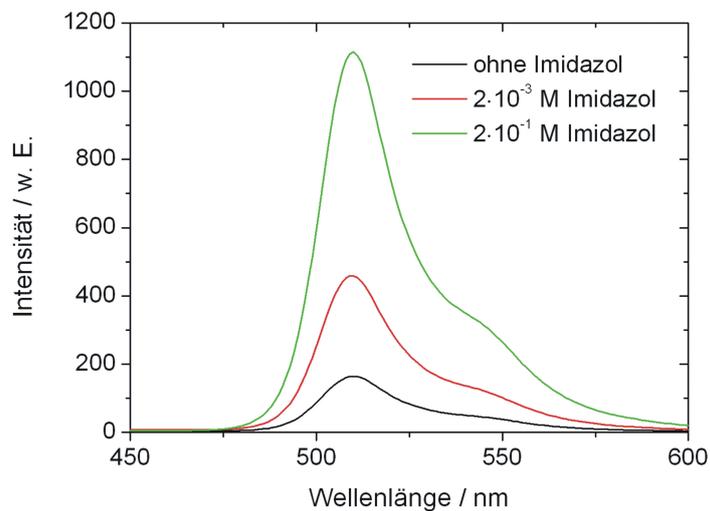


Abbildung 7.11: Die Zugabe von Imidazol in verschiedenen Konzentrationen zu einer Lösung von GFP QC 2 mit  $[\text{Cu}^{2+}] = 1 \cdot 10^{-3}$  M führt zu einer signifikanten Änderung der Intensität der Emission. Höhere Konzentrationen an Imidazol erhöhen die Fluoreszenz von GFP QC 2 durch die Bindung von  $\text{Cu}^{2+}$ .

diesen Effekt in beiden Fällen zumindest teilweise wieder auf. Damit bestätigt sich die Reversibilität der Bindung von  $\text{Cu}^{2+}$  an das His<sub>6</sub>-Tag des Proteins.

Nicht nur Imidazol, sondern auch Wasserstoffperoxid hebt den quencheden Effekt von  $\text{Cu}^{2+}$  auf die Fluoreszenzintensität und auf  $\tau$  bis zu einem bestimmten Grad wieder auf. Während die Ursache bei Imidazol in der Erhöhung der Anzahl weiterer Bindungsstellen für  $\text{Cu}^{2+}$  liegt, ist die Ursache für diesen Effekt bei  $\text{H}_2\text{O}_2$  nicht klar. Hierzu sind tiefergehende Untersuchungen nötig. Die Relevanz dieser Aufhebung des lebensdauerverkürzenden Effektes in biologischen Systemen sollte allerdings gering sein, bedingt durch die niedrige  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  in lebenden Zellen unter physiologischen Bedingungen. Damit kann diese für die intrazelluläre Messung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  vernachlässigt werden.

### 7.1.9 Einfluss von $\text{Cu}^{2+}$ auf weitere Mutanten von GFP

Die GFP-Mutante T203H zeichnet sich durch die im vorherigen Abschnitt beschriebenen besonderen photophysikalischen Eigenschaften aus. Eine tiefergehende Analyse der Komplexbildung und des verantwortlichen Quenchingmechanismus erfolgt daher exemplarisch an dieser Mutante. Trotzdem wird zunächst der Einfluss von zweiwertigen Kupferionen auf die Fluoreszenzintensität und auf die Lebensdauer weiterer GFP-Mutanten untersucht. Dazu werden Titrations von  $\tau$  der GFP-Mutanten T203V, QC 2, fQC 5, S65T und eYFP mit  $\text{Cu}^{2+}$  durchgeführt. Alle Mutanten besitzen ein His<sub>6</sub>-Tag. Die Ergebnisse dieser Titrations sind in Anhang A zusammengefasst. Sämtliche Titrations führen zu einer Reduzierung der Fluoreszenzintensität sowie der Fluoreszenzlebensdauer nach der Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$ .

Neben dem His<sub>6</sub>-Tag zeichnen sich alle Mutanten durch ähnliche spektrale Eigenschaften aus. Dies äußert sich dadurch, dass selbst bei unterschiedlichen Anregungsspektren, die Emission in der selben Region des sichtbaren Spektrums erfolgt. Das unterstützt die These, dass die spektralen Eigenschaften eine Voraussetzung für den verantwortlichen Quenchmechanismus FRET bilden. Sensitiv gegenüber  $\text{Cu}^{2+}$  sind folglich alle Mutanten von GFP, die ein His<sub>6</sub>-Tag besitzen und ein hohes Maß an spektralem Überlapp der Emission dieser GFP-Mutante und der Absorption von komplexiertem  $\text{Cu}^{2+}$  aufweisen. In Tabelle 7.5 sind die FRET-Effizienzen für die untersuchten Mutanten dargestellt. Die Förster-Radien aller untersuchten Mutanten betragen 2,0 bis 2,2 nm (Tabelle A.1 in Anhang A). Dies unterstützt FRET als Quenchmechanismus, der sich auch in der Verkürzung der Lebensdauer äußert.

Mutante	$\tau_{frei}$	$\tau_{gebunden}$	Effizienz
T203H	3,4	1,4	0,59
T203V	3,1	1,0	0,68
eYFP	2,7	1,5	0,44
S65T	2,7	1,2	0,56
fQC 5	3,1	0,9	0,71
QC 2	3,3	1,3	0,61

Tabelle 7.5: Übersicht über  $\tau_{frei}$  und die durch  $\text{Cu}^{2+}$  verkürzte Lebensdauer  $\tau_{geb}$  verschiedener Mutanten von GFP. Aus diesen Werten sind die FRET-Effizienzen berechnet.

### 7.1.10 Diskussion der $\text{Cu}^{2+}$ Quantifizierung

Bestehende Verfahren zur Bestimmung von  $[\text{Cu}^{2+}]$ , die auf intensitätsabhängigen Messungen basieren, haben den Nachteil, dass eine Referenzmessung nötig ist. Ohne diese Referenzmessung kann dem ermittelten Intensitätswert keine absolute  $[\text{Cu}^{2+}]$  zugeordnet werden, da dieser von der lokalen  $[\text{GFP}]$  abhängt. Mit der in Kapitel 6 hergeleiteten Übertragung dieses Ansatzes auf  $\tau$  besteht die Möglichkeit, diese Referenzmessungen zu umgehen.

Zunächst wird gezeigt, dass  $\text{Cu}^{2+}$  neben der Fluoreszenzintensität von  $\text{His}_6\text{-GFP}$  auch  $\tau$  quencht. Weiterhin wird experimentell nachgewiesen, dass das Ausmaß des Quenchens von der Konzentration von  $\text{Cu}^{2+}$  abhängig ist. Dabei führen höhere  $[\text{Cu}^{2+}]$  zu einem stärkeren Quenchen von  $\tau$  des GFP.

Das  $\text{His}_6$ -Tag wird als Bindungsstelle von  $\text{Cu}^{2+}$  an GFP-Moleküle identifiziert. Deshalb zeigt die Fluoreszenzintensität und die Lebensdauer der untersuchten Mutanten eine Änderung durch die Präsenz von  $\text{Cu}^{2+}$ , da alle einen  $\text{His}_6$ -Tag besitzen. Weiterhin erfolgt die Bestimmung der Dissoziationskonstanten, die  $K_d = (9 \pm 2) \mu\text{M}$  für die GFP-Mutante T203H und  $\text{Cu}^{2+}$  beträgt. Diese Bestimmung ist wichtig für das Prinzip der quantitativen Messungen, das im folgenden Abschnitt beschrieben wird.

Unter verschiedenen möglichen Mechanismen, die für die Verkürzung von  $\tau$  in Frage kommen, wird FRET als verantwortlich für die Reduzierung von  $\tau$  bestimmt. Dafür sprechen neben der Bildung eines Komplexes auch die spektralen Voraussetzungen, d. h. der spektrale Überlapp der Emissionsspektren von GFP mit dem Absorptionsspektrum des Komplexes aus Polyhistidin und  $\text{Cu}^{2+}$ . Hierbei wird der Förster-Radius zu  $R_0 = 2,1 \pm 0,1 \text{ nm}$  und die FRET-Effizienz zu  $E = 0,59$  berechnet. Auch die geometrischen Voraussetzungen, d. h. ein Abstand von Chromophor zu  $\text{Cu}^{2+}$  von etwa 2,1 Nanometer, unterstützen FRET als verantwortlichen Mechanismus.

Die Selektivität des Sensors für  $\text{Cu}^{2+}$  ist gewährleistet, da die Lebensdauer von

GFP durch andere Metallionen nicht beeinträchtigt wird. Die Förster-Radien für  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$ , die deutlich kleiner sind als der Förster-Radius von  $\text{Cu}^{2+}$ , bestätigten die experimentellen Ergebnisse dieser Lebensdauertitrations.

Ein weiteres Ergebnis ist die Reversibilität der Bindung zwischen GFP und  $\text{Cu}^{2+}$ , die durch den Einsatz von Imidazol wieder aufgehoben wird.

Die bisher beschriebenen Ergebnisse gelten nicht nur für die GFP-Mutante T203H. Sie lassen sich auf weitere Mutanten von GFP übertragen, die ein  $\text{His}_6$ -Tag besitzen, wie in Anhang A gezeigt. Dies entspricht den Erwartungen, da die Emissionsspektren der Mutanten nur geringe spektrale Verschiebungen aufweisen, die sich durch das breite Absorptionsband des Komplexes aus Polyhistidin und  $\text{Cu}^{2+}$  kaum auf den jeweiligen Förster-Radius auswirken.

In Kapitel 6 ist die Entwicklung eines mathematischen Modells beschrieben, das die Bestimmung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  in Abhängigkeit von  $A_{\text{frei}}$  oder in Abhängigkeit von  $\tau$  ermöglicht. Dieses Modell kann für  $[\text{GFP}] < K_d$  im Falle unbekannter  $[\text{GFP}]$  angewendet werden. Ist diese Bedingung nicht erfüllt, so kann das Modell erweitert werden und unter Einbeziehung von  $[\text{GFP}]$  Anwendung finden.

Somit kann ein Verfahren entwickelt werden, das durch die Messung von  $\tau$  die Quantifizierung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  erlaubt. Durch die überflüssig gewordene Referenzmessung und durch die Möglichkeit der genetischen Expression von GFP in Zellen, weist diese Methode zwei wesentliche Vorteile gegenüber den bestehenden Verfahren auf.

Die Quantifizierung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  mittels einer Titration von  $\tau$  von  $\text{His}_6$ -GFP ist nicht beschränkt auf Messungen *in vitro*, sondern kann auch auf Messungen *in vivo* angewendet werden. Da  $[\text{GFP}]$  in Zellen in der Regel unbekannt ist und die Bestimmung nicht unproblematisch ist, muss dabei auf  $[\text{GFP}] < K_d$  geachtet werden, um das mathematische Modell zur Bestimmung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  verwenden zu können. Dies erlaubt die Übertragung der Ergebnisse von den Küvettenexperimenten auf Untersuchungen *in vivo*. Im nächsten Abschnitt ist die Aufnahme von  $\text{Cu}^{2+}$  durch Tabakzellen beschrieben. Außerdem wird die Quantifizierung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  in *E. coli*-Zellen aufgezeigt.

## 7.2 Bestimmung von $[\text{Cu}^{2+}]$ in Zellen

### 7.2.1 Theoretischer Ansatz

Durch Küvettenexperimente ist der Mechanismus, der dem Quenchen von Fluoreszenzintensität und Fluoreszenzlebensdauer zugrunde liegt, als FRET identifiziert. Außerdem ist die Bindungsstelle von  $\text{Cu}^{2+}$  an das GFP aufgeklärt. Diese erfolgt über den in der Struktur von GFP integrierten His<sub>6</sub>-Tag. Die Dissoziationskonstante beträgt für das FRET-Paar GFP T203H und  $\text{Cu}^{2+}$   $K_d = (9 \pm 2) \mu\text{M}$ . Der Förster-Radius für dieses FRET-Paar ist ebenfalls berechnet. Er beträgt  $R_0 = 2,1 \text{ nm}$ . Damit ist die Quantifizierung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  *in vitro* möglich. Der nächste Schritt liegt in der Übertragung dieser Methode auf die *in vivo*-Bestimmung von  $[\text{Cu}^{2+}]$ . Die Grundlage hierzu ist das in Kapitel 6 beschriebene Modell und die entsprechende Titrationsformel. Damit ist die Messung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  in Zellen prinzipiell möglich.

Die Bestimmung der Konzentration von  $\text{Cu}^{2+}$  in *E. coli*-Zellen, die GFP exprimieren und in Tabakzellen, in die GFP eingebracht ist, erfolgt nicht invasiv über die Messung der Fluoreszenzlebensdauer. Wie in Kapitel 6 beschrieben, kann dabei entweder der Anteil freier GFP-Moleküle  $A_{\text{frei}}$  oder die mittlere Lebensdauer  $\tau_{av}$  des GFP in Betracht gezogen werden. Den Auswertungen der Messungen in den Zellen liegt im Folgenden stets  $\tau_{av}$  zu Grunde. Dadurch vereinfacht sich die Auswertung der aus TCSPC-Histogrammen gewonnenen Daten. Außerdem ist die Anforderung an die absolute Zählrate durch das einfachere Fitmodell geringer. Dies ist insbesondere bei FLIM-Messungen zu beachten, da eine gute Statistik hier sehr lange Messzeiten erfordert.

In Zellen sind die Konzentrationen von  $\text{Cu}^{2+}$  und von GFP unbekannt. Damit ist eine direkte Bestimmung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  nicht möglich, falls die GFP-Konzentration den Wert der Dissoziationskonstante überschreitet, wie in Abschnitt 6.8 gezeigt. Außerdem muss für die Anwendung von Gleichung 6.28  $K_d$  bekannt sein.

Die Konzentration von  $\text{Cu}^{2+}$  kann unter dieser Voraussetzung durch die im vorherigen Abschnitt ermittelte Kalibrationskurve bestimmt werden. Die Aufnahme der entsprechenden Titrationskurve der in den Zellen exprimierten GFP-Mutante erfolgt in der Küvette. Für die GFP-Variante T203H ist diese Kalibrationskurve dargestellt in Abbildung 7.8. Die Aufnahme erfolgt bei geringer GFP-Konzentration ( $[\text{GFP}] < K_d$ ), um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden. Aus dieser Kalibrationstitration können die konstanten Parameter  $\tau_{\text{frei}}$  und  $\tau_{\text{geb}}$  sowie die Dissoziationskonstante  $K_d$  bestimmt werden.

Um die Kupferaufnahme durch die Zellen zu dokumentieren, werden FLIM-Bilder dieser Zellen aufgenommen und  $[\text{Cu}^{2+}]$  anhand der Kalibrationskurve bestimmt. An-

schließlich erfolgt die externe Zugabe einer  $\text{Cu}^{2+}$ -Lösung. Nachdem die Zellen Zeit hatten,  $\text{Cu}^{2+}$  aufzunehmen, erfolgt eine erneute FLIM-Messung. Wiederum wird dem gemessenen Wert der Fluoreszenzlebensdauer durch Abgleich mit der Kalibrationsgeraden die intrazelluläre  $[\text{Cu}^{2+}]$  zugeordnet. Dabei sollte sich diese durch die Aufnahme von  $\text{Cu}^{2+}$  erhöhen. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in den nächsten Abschnitten dargestellt.

### 7.2.2 Bestimmung von $[\text{Cu}^{2+}]$ in *E. coli*-Zellen

Es werden *E. coli*-Zellen verwendet, die die GFP-Mutante T203H exprimieren. GFP wird ausschließlich im Innern der Zellen exprimiert, so dass sich diese Zellen zur Untersuchung der Kupferaufnahme durch die Zellen eignen. Extrazelluläre Kupfer(II)-ionen führen aufgrund der Vakanz von GFP nicht zu einer Beeinflussung der Lebensdauer von GFP. *E. coli*-Zellen eignen sich für die Untersuchungen gut, da sie bereits für die Expression der verschiedenen Varianten von GFP verwendet werden.

Die GFP-Mutante T203H wird ausgewählt, weil keine Änderung der Fluoreszenzlebensdauer durch Photokonversion zu erwarten ist. Weiterhin ist der monoexponentielle Charakter der Lebensdauer dieser Mutante wünschenswert.

Die FLIM-Messungen werden an auf einem Deckglas in Agarosegel immobilisierten Zellen durchgeführt, um die mögliche Bewegung der Zellen zu verhindern. Darauf erfolgt die Zugabe eines Tropfens einer 1 M  $\text{Cu}^{2+}$ -Lösung zu den Zellen. Daraus ergibt sich eine finale Konzentration von etwa 0,5 M  $\text{Cu}^{2+}$ . Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde, in der die Zellen  $\text{Cu}^{2+}$  aufnehmen können, wird die Probe erneut mit FLIM vermessen.

Die Abnahme der Fluoreszenzlebensdauer durch  $\text{Cu}^{2+}$  ist deutlich erkennbar, wie in Abbildung 7.12 gezeigt. Sie verringert sich von zunächst 2,2 ns auf 1,6 ns eine Stunde nach der Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$ . Die Lebensdauer von 2,2 ns bei den Zellen ohne Zugabe von  $[\text{Cu}^{2+}]$  weicht deutlich von der Lebensdauer der freien Moleküle von GFP T203H mit 3,4 ns ab. Die Ursache kann in der Tatsache begründet liegen, dass der Brechungsindex  $n_0$  einen Einfluss auf die Lebensdauer hat [159]. Der Brechwertindex reinen Wassers, wie er in den Küvettenexperimenten vorliegt, unterscheidet sich vom Brechwertindex von Wasser mit hohem Proteingehalt, wie er in den Zellen vorliegt. Eine weitere Ursache liegt in der natürlichen Präsenz von Kupfer(II)-ionen in *E. coli*, deren Konzentration im mikromolaren Bereich liegt [160]. Dadurch wird durch die bereits vor der externen Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  in den Zellen vorhandenen Kupfer(II)-ionen die Lebensdauer deutlich reduziert.

Die Abnahme der Fluoreszenzintensität entspricht ebenfalls den Erwartungen. Der

Grund hierfür liegt im Quenching der Intensität durch  $\text{Cu}^{2+}$ . Um mögliches Photo-bleichen als Ursache für die Reduzierung der Fluoreszenzintensität auszuschließen, wird hier jedoch eine andere Stelle auf der Probe untersucht, so dass der Intensitätsunterschied auch an einer geringeren punktuellen GFP-Konzentration liegen könnte. Auf die Ergebnisse der Quantifizierung der  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration in den Zellen hat die Abnahme der Intensität in jedem Fall keinen Einfluss.

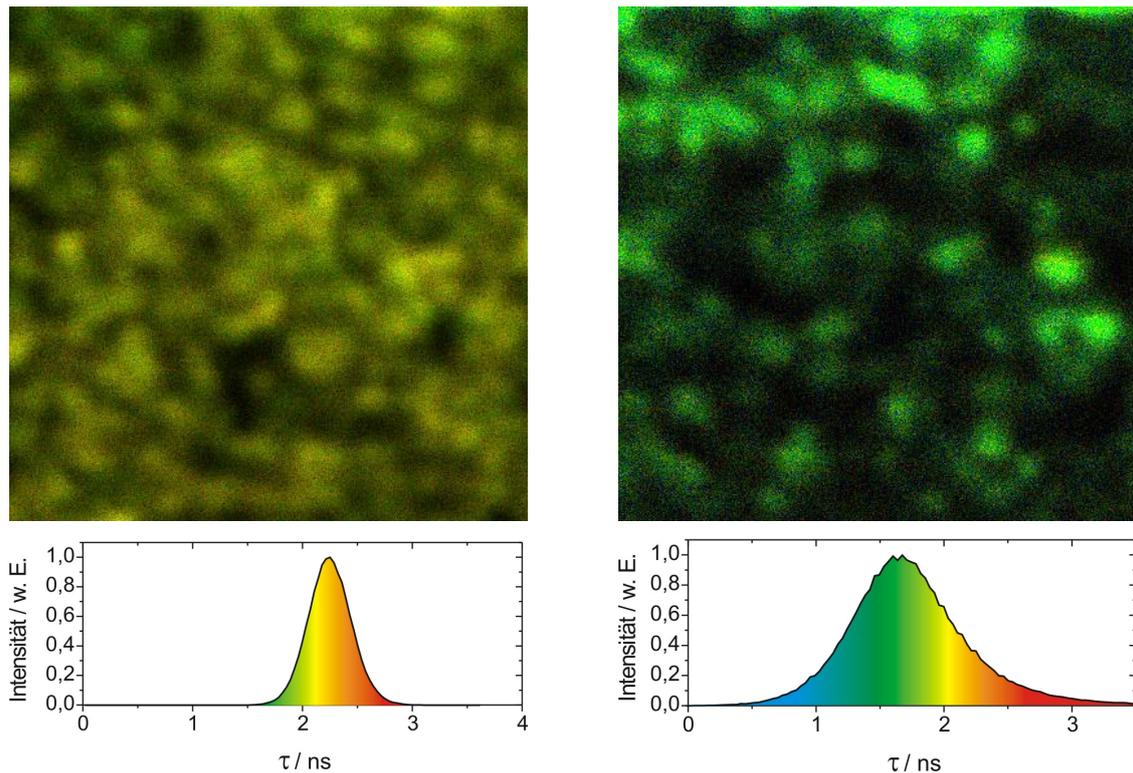


Abbildung 7.12: FLIM-Bilder von *E. coli*-Zellen, die die GFP-Mutante T203H exprimieren, vor und nach der Inkubation mit einem Tropfen einer 1,0 M Lösung von Kupfer(II)-ionen. Der  $15 \times 15 \mu\text{m}^2$  große Ausschnitt der immobilisierten Zellen zeigt eine Abnahme der mittleren Lebensdauer von 2,2 auf 1,6 ns. Die Anregungswellenlänge beträgt  $\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$ .

Aus den Werten der mittleren Fluoreszenzlebensdauer erfolgt die Bestimmung der entsprechenden  $[\text{Cu}^{2+}]$  in den *E. coli*-Zellen. Dazu werden die Lebensdauerwerte vor und nach der Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  mit den  $[\text{Cu}^{2+}]$  der Titrationskurve (vgl. Abbildung 7.8) verglichen. Abbildung 7.13 zeigt die Titrationskurve für GFP T203H, in die die mittleren Lebensdauerwerte aus den FLIM-Bildern eingezeichnet sind.

Der blaue Pfeil zeigt die gemessene Lebensdauer in den *E. coli*-Zellen vor der Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$ . Diese beträgt  $\tau = 2,2 \text{ ns}$ . Aus der Kalibrationskurve ergibt sich  $[\text{Cu}^{2+}]$  für diesen Lebensdauerwert von  $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ . Die Lebensdauer nach der Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  beträgt 1,6 ns. Der grüne Pfeil gibt den entsprechenden Wert für  $[\text{Cu}^{2+}]$  von  $1 \cdot 10^{-4}$

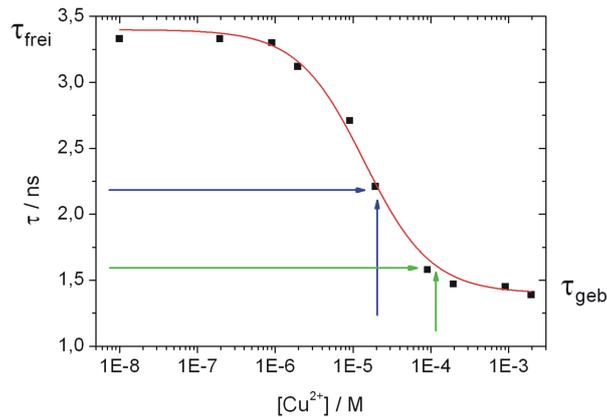


Abbildung 7.13: Bestimmung der  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration aus der Titration der GFP-Mutante T203H mit Kupfer in *E. coli*. Die Messung von  $K_d$  erfolgt über fitten mittels der Titrationsformel, vgl. Gleichung 6.28.  $[\text{Cu}^{2+}]$  in den Zellen vor (blau) und nach (grün) der Kupferzugabe kann anhand der Lebensdauerwerte aus dem Graphen abgelesen werden.

M an. Die externe Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  führt damit zu einer Verfünffachung der  $[\text{Cu}^{2+}]$  innerhalb der Zellen. FLIM an lebenden Zellen, die His<sub>6</sub>-GFP exprimieren, stellt somit eine im Prinzip geeignete Methode zur intrazellulären Quantifizierung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  dar. Zur genauen absoluten Bestimmung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  sind Maßnahmen, wie z. B. die Einbeziehung des Brechungsindex und des pH-Wertes nötig.

### 7.2.3 Untersuchung der $\text{Cu}^{2+}$ Aufnahme in Tabakzellen

Es erfolgt die Untersuchung der Aufnahme von  $\text{Cu}^{2+}$  durch Tabakzellen, die GFP6 exprimieren. Die Expression des GFP erfolgt ausschließlich im Zytosol der Zellen sowie im Zellkern. Diese Tatsache erlaubt in Analogie zum Vorgehen bei den *E. coli*-Zellen die Untersuchung der  $\text{Cu}^{2+}$ -Aufnahme, da nur in den Zellen vorhandene Kupfer(II)-ionen die Lebensdauer von GFP beeinflussen können. Durch eine große Vakuole in der Zelle, die kein GFP enthält, ist die Fluoreszenz nur in einem Bereich am Rand der Zelle zu sehen. Da GFP6 ebenfalls ein His<sub>6</sub>-Tag enthält, wird die Abnahme der Lebensdauer durch Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  erwartet.

Für den Versuch werden Tabakblätter zwischen zwei Deckgläser geklemmt. An den Grenzen der Deckgläser wird Wasser eindiffundiert. FLIM-Bilder werden vor und 30 Minuten nach der Zugabe einer 0,5 M Kupfersulfatlösung aufgenommen, was einer  $[\text{Cu}^{2+}]$  der Probe von etwa 0,2 M entspricht. Die Aufnahmen erfolgen an der selben Stelle auf der Probe. Abbildung 7.14 zeigt die Ergebnisse dieses Versuchs.

Die durchschnittliche Fluoreszenzlebensdauer des in den Tabakzellen exprimier-

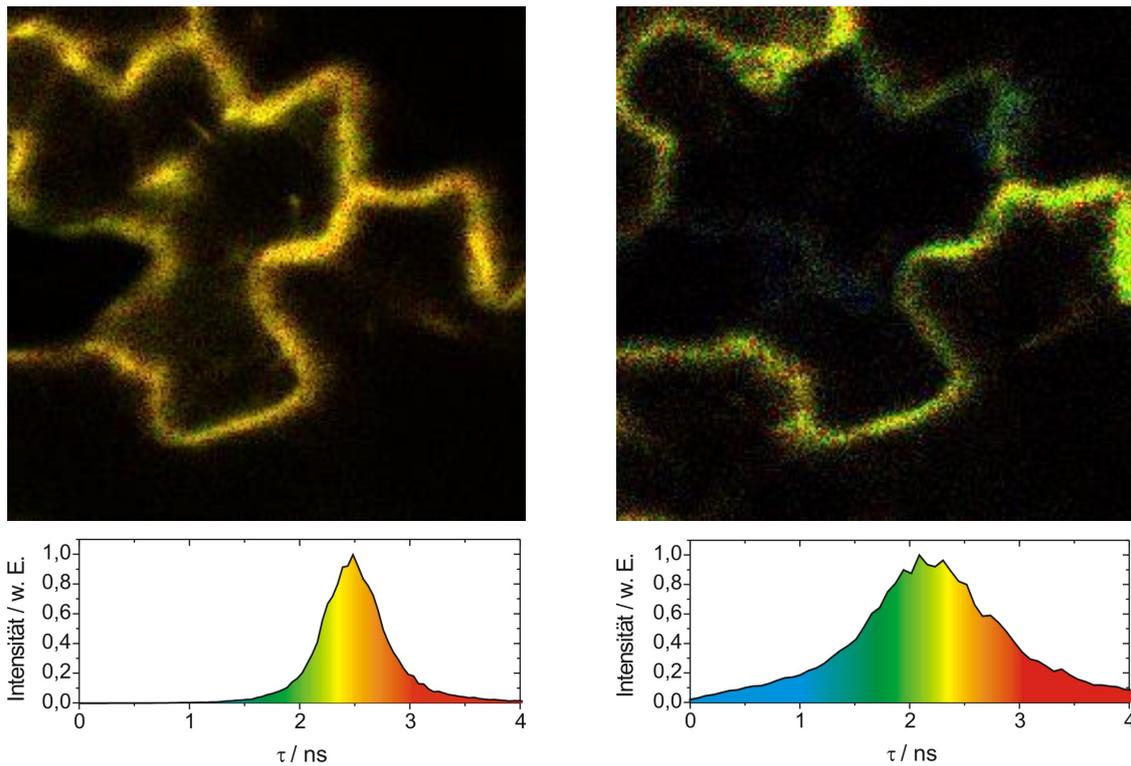


Abbildung 7.14: FLIM-Bilder von Tabakzellen vor und 30 Minuten nach der Inkubation mit  $0,5 \text{ M Cu}^{2+}$ . Der Ausschnitt hat eine Größe von  $80 \times 80 \mu\text{m}^2$ . Die Abnahme der durchschnittlichen Fluoreszenzlebensdauer von 2,5 auf 2,2 ns korrespondiert mit der Zunahme der Konzentration von  $\text{Cu}^{2+}$  in den Zellen. Die Anregungswellenlänge beträgt  $\lambda_{ex} = 470 \text{ nm}$ .

ten GFP6 beträgt 2,5 ns vor der Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$ . Dreißig Minuten nach der Zugabe von 0,5 M Kupfersulfatlösung sinkt die Lebensdauer auf 2,2 ns (Abbildung 7.14). Dies ist auf die Aufnahme von  $\text{Cu}^{2+}$  durch die Tabakzellen zurückzuführen. Eine Bestimmung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  in den Zellen ist schwer möglich. Dies liegt daran, dass für das in den Zellen exprimierte GFP6 keine Titrationskurve bestimmt werden kann, da dieses nur innerhalb der Zellen vorliegt. Trotzdem ist die Aufnahme von  $\text{Cu}^{2+}$  qualitativ durch FLIM an diesen Zellen visualisierbar. Das bedeutet, dass auch in Tabakzellen die Aufnahme von Kupfer(II)-ionen nicht invasiv und zeitaufgelöst studiert werden kann. Liegt zudem eine Probe der in den Zellen verwendeten GFP-Mutante vor, mit der im Küvettenexperiment eine Kalibrationskurve erstellt werden kann, so ist auch in diesen Zellen die Quantisierung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  über Messungen der Fluoreszenzlebensdauer prinzipiell möglich. Eine Einschränkung in der Exaktheit absoluter Werte ergibt sich analog zu den Resultaten der *E. coli*-Zellen durch den Einfluss von  $n_0$ , Fremdionen, etc.

## 7.2.4 Diskussion der Messungen in Zellen

Durch FLIM an His<sub>6</sub>-GFP enthaltenen Zellen kann die Aufnahme von Cu<sup>2+</sup> durch *E. coli* und durch Tabakzellen gezeigt werden. Die Möglichkeit der qualitativen Aufnahme ist sogar möglich, wenn die verwendete GFP-Mutante nicht spektroskopisch charakterisiert ist, solange diese ein His<sub>6</sub>-Tag besitzt und die Emission der Mutante mit der breiten Absorption von an Imidazolringen komplexiertem Cu<sup>2+</sup> überlappt. Dies zeigt sich durch die geringen Abweichungen in den Förster-Radien von eGFP und eYFP, vgl. Anhang A.

Es wird gezeigt, dass durch die Titration von  $\tau$  von His<sub>6</sub>-GFP mit Cu<sup>2+</sup> die Möglichkeit besteht,  $K_d$  zu bestimmen. Die Ermittlung erfolgt dabei über ein mathematisches Modell, dessen Entwicklung in Kapitel 6 beschrieben ist. Anhand einer Kalibrationstirration der GFP-Mutante T203H kann den gemessenen Werten von  $\tau$  in *E. coli*-Zellen eine [Cu<sup>2+</sup>] zugeordnet werden. Dadurch wird ein Weg aufgezeigt, über qualitative Aussagen hinaus auch quantitativ [Cu<sup>2+</sup>] intrazellulär zu bestimmen. Dies geschieht exemplarisch an *E. coli*-Zellen. Damit steht im Prinzip eine Möglichkeit zur Verfügung, ohne die Durchführung einer Referenzmessung und nicht invasiv quantitative Messungen *in vivo* zu realisieren.

Das Verfahren der Fluoreszenzlebensdauertitration von FP zeichnet sich gegenüber bestehenden Verfahren dadurch aus, dass es durch die genetische Expression von His<sub>6</sub>-GFP die nicht invasive Bestimmung der Konzentration von Cu<sup>2+</sup> in lebenden Zellen ermöglicht. Dadurch kommt es nicht zu Schädigungen in der Zellmembran durch die Einbringung des Sensors. Es erlaubt die Quantifizierung von [Cu<sup>2+</sup>] und ist dabei selbst referenzierend.

Probleme bestehen bei diesem Verfahren in dem unbekanntem Brechwert in den Zellen. Außerdem ist der Einfluss des pH-Wertes bei den durchgeführten Messungen unberücksichtigt. Hierzu sind weitergehende Untersuchungen nötig. Auch die Belegung des His<sub>6</sub>-Tags durch andere Metallionen ist bisher nicht in die Betrachtungen mit einbezogen. Ein weiterer Aspekt liegt in der genauen Analyse des Zelllysates. Hier muss ausgeschlossen werden, dass diese Substanzen enthält, die die Fluoreszenzlebensdauer von GFP beeinflussen und so die Ergebnisse der [Cu<sup>2+</sup>] Bestimmung verfälschen.

## 7.3 Detektion von Eisen(II)-ionen

### 7.3.1 $\text{Fe}^{2+}$ sensitive GFP-Mutante

Im vorhergehenden Kapitel ist der Einfluss von  $\text{Cu}^{2+}$  auf  $\tau$  von verschiedenen GFP-Mutanten beschrieben. Die Abnahme von  $\tau$  zeigt sich dabei als selektiv für  $\text{Cu}^{2+}$ . Das bedeutet, dass die Präsenz anderer Metallionen zu keiner signifikanten Änderung von  $\tau$  führt. Dies gilt auch für  $\text{Fe}^{2+}$ . Einzig die als Negativkontrolle gedachte Zugabe von zweiwertigen Eisenionen zu Lösungen der GFP-Mutante C48S, bei der an Position 48 Cystein durch Serin ersetzt ist, zeigt eine Reduzierung der Fluoreszenzlebensdauer. Diese beträgt für eine  $1,2 \cdot 10^{-6}$  M Lösung von GFP C48S  $\tau = 3,3$  ns. Eine  $\text{Fe}^{2+}$ -Titration dieser Mutanten zeigt Abbildung 7.15:

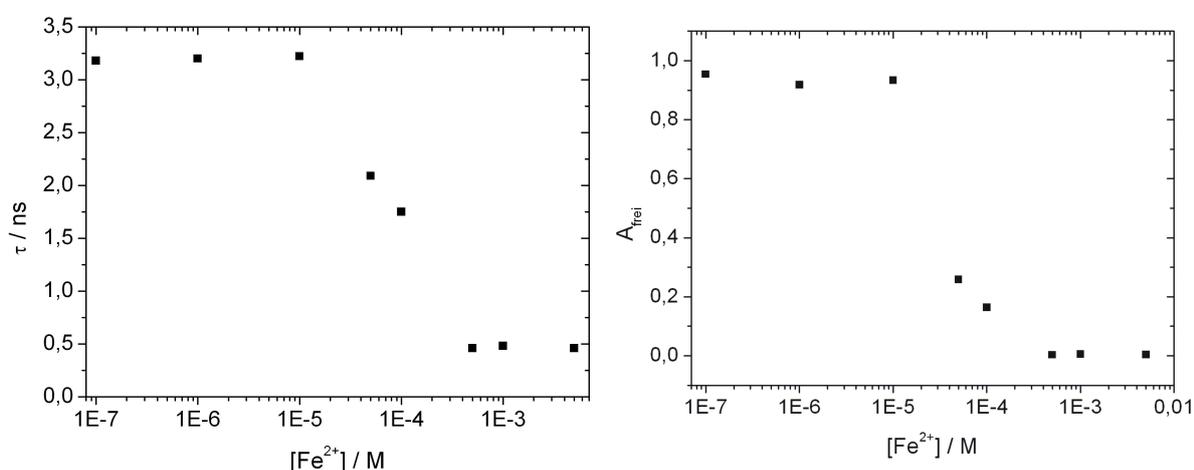


Abbildung 7.15: Titration der Fluoreszenzlebensdauer der GFP-Mutante C48S mit  $\text{Fe}^{2+}$ , die eine Abnahme der Lebensdauer mit steigender  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration von 3,3 ns auf 0,5 ns aufweist. Hierbei bezeichnet  $\tau$  die durch monoexponentielle Fits gewonnenen Werte der Lebensdauer,  $A_{\text{frei}}$  den Anteil der langen Lebensdauerkomponente.

Die biexponentielle Auswertung der Lebensdauer Titration von GFP C48S führt zu zwei spezifischen Lebensdauerkomponenten,  $\tau_{\text{frei}} = 3,3$  ns für die nicht durch  $\text{Fe}^{2+}$  gequenchte Komponente und  $\tau_{\text{geb}} = 0,4$  ns für die in ihrer Lebensdauer verkürzten Komponente. Die Anteile der präexponentiellen Faktoren variieren entsprechend den durch monoexponentielle Fits gewonnenen Daten.

Die Intensität des Anregungs- und des Emissionsspektrums von GFP C48S wird durch die Zugabe von  $\text{Fe}^{2+}$  ebenfalls gequenchet. Abbildung 7.16 zeigt das Quenching der Anregungsintensität von GFP C48S in einer Konzentration von  $1,2 \cdot 10^{-6}$  M durch die Zugabe von  $\text{Fe}^{2+}$  in verschiedenen Konzentrationen. Die Abbildung zeigt die absoluten und die normierten Anregungsspektren bei einer Emissionswellenlänge von 530 nm. Die  $\text{Fe}^{2+}$  Titration verringert die absolute Intensität der Anregung. Auf das

Verhältnis der beiden Anregungsbanden der A- und der B-Form des Chromophors hat dies jedoch keinen Einfluss.

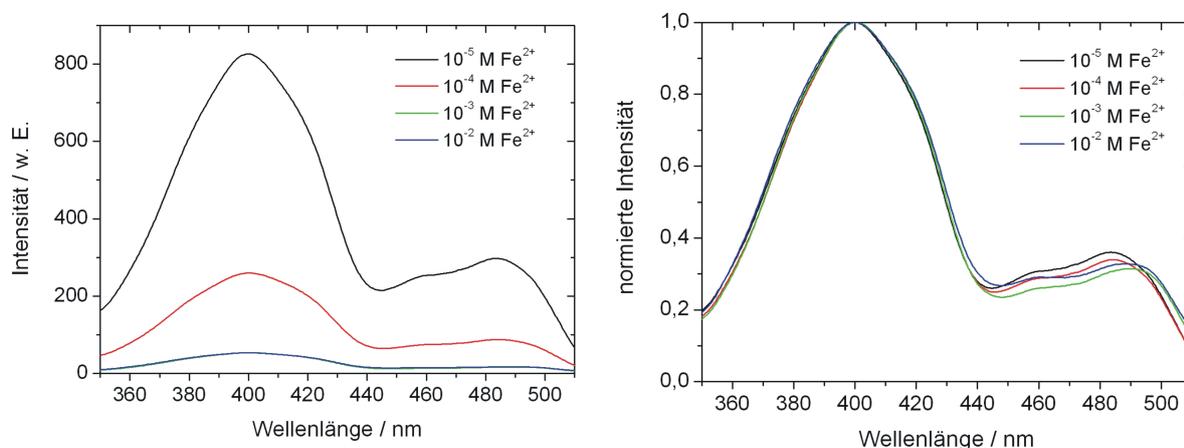


Abbildung 7.16: Abnahme der Anregungsintensität der GFP-Mutante C48S aufgrund der Zugabe von  $\text{Fe}^{2+}$  in verschiedenen Konzentrationen (links). Der entsprechende Quencheffekt für die Anregungsintensität in Abhängigkeit der  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration nach der Normierung der Spektren (rechts).

Auch die Fluoreszenzintensität von GFP C48S wird durch  $\text{Fe}^{2+}$  gequencht. Die Reduzierung einer  $1,2 \cdot 10^{-6}$  M Lösung von GFP C48S durch  $2,0 \cdot 10^{-2}$  M  $\text{Fe}^{2+}$  ist dargestellt in Abbildung 7.17. Die Anregungswellenlänge ist  $\lambda_{ex} = 405$  nm. Die ursprüngliche Intensität sinkt durch die  $\text{Fe}^{2+}$ -Zugabe auf 8 % des Ausgangswertes.

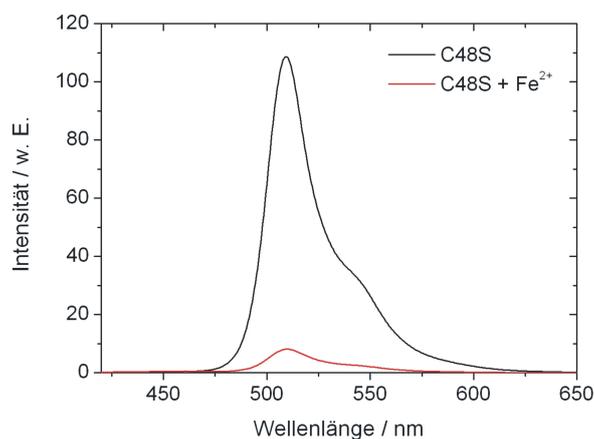


Abbildung 7.17: Abnahme der Fluoreszenzintensität von GFP C48S durch  $\text{Fe}^{2+}$ . Die Abbildung zeigt Emissionsspektren nach Anregung mit  $\lambda_{ex} = 405$  nm.

Die Zugabe von  $\text{Fe}^{2+}$  zu den GFP-Mutanten QC 1, QC 2, fQC 5 und T203H zeigt kein Quenching. Weder die Fluoreszenzintensität, noch die Fluoreszenzlebensdauer dieser GFP-Varianten werden durch die Zugabe von  $\text{Fe}^{2+}$  selbst in Konzentrationen bis 0,1 M beeinflusst.

Für die spektrale Änderung und die Änderung von  $\tau$  von GFP C48S durch  $\text{Fe}^{2+}$  ist der Oxidationszustand der Eisenionen von Bedeutung. Nur die Anwesenheit von  $\text{Fe}^{2+}$  führt zu einer Reduzierung der Intensität und der Lebensdauer.  $\text{Fe}^{3+}$  hingegen beeinträchtigt diese beiden Parameter nicht. Dies äußert sich darin, dass die Zugabe von  $\text{Fe}^{2+}$  zu GFP C48S die Lebensdauer zunächst quencht. Eine erneute TCSPC-Messung zwei Tage nach dem Hinzufügen von  $\text{Fe}^{2+}$  zeigt wieder die ungequenchte Lebensdauer der GFP-Mutante. Eine Erklärung für diese Beobachtung ist vermutlich die Oxidation von  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  durch den in der Küvette gelösten Sauerstoff. Dies entspricht dem Ergebnis der Addition von  $\text{Fe}^{3+}$  zu einer Probe von GFP C48S. Auch hier zeigt sich weder in der Fluoreszenzintensität noch in  $\tau$  des GFP eine Änderung. Weitere Untersuchungen zum Einfluss des Oxidationszustandes der Eisenionen sind erforderlich. Eine Möglichkeit dazu besteht in der externen *in vitro*-Änderung des Oxidationszustandes der Eisenionen bei gleichzeitiger spektroskopischer Untersuchung.

Da sowohl die Lebensdauer als auch die Fluoreszenzintensität bei GFP C48S durch die Zugabe von  $\text{Fe}^{2+}$  gequencht werden, ist die Untersuchung des verantwortlichen Quenchmechanismus von Bedeutung. Dieser ist, im Gegensatz zur Abnahme der Lebensdauer durch  $\text{Cu}^{2+}$  aufgrund von FRET, nicht geklärt. Allerdings kann FRET in diesem Fall nicht die Ursache sein. Der Grund liegt an dem Absorptionsspektrum von Eisen(II)-ionen, das selbst nach der Zugabe von Polyhistidin keine Absorption im relevanten sichtbaren Spektralbereich aufweist (Abbildung 7.9). Damit ist Energietransfer via FRET vom GFP auf einen Komplex aus  $\text{Fe}^{2+}$  und His<sub>6</sub>-Tag nicht möglich. Außerdem sollte FRET für alle GFP-Mutanten stattfinden, die ein His<sub>6</sub>-Tag besitzen. Dies wird jedoch nicht beobachtet.

Die Bildung eines Komplexes aus  $\text{Fe}^{2+}$  und GFP als Ursache für statisches Quenching erscheint unwahrscheinlich, da auch alle anderen untersuchten Mutanten von GFP ein His<sub>6</sub>-Tag enthalten, in diesen Fällen aber kein Quenching durch  $\text{Fe}^{2+}$  beobachtet werden kann. Einzig eine für GFP C48S spezifische Bindung von  $\text{Fe}^{2+}$  könnte statisches Quenching erklären.

Eine mögliche Ursache könnte in einer Elektronentransferreaktion liegen. Die Aufklärung des verantwortlichen Mechanismus ist eine noch zu lösende Aufgabe.

### 7.3.2 Diskussion der Ergebnisse der Detektion von $\text{Fe}^{2+}$

Mit dem Quenchen der Lebensdauer der GFP-Mutanten C48S ergibt sich prinzipiell die Möglichkeit zur Konzeptionierung eines Eisen(II)-Sensors für Anwendungen *in vivo*. Die Quantifizierung von  $\text{Fe}^{2+}$  kann dabei entsprechend einer modifizierten Variante des Modells, das für  $\text{Cu}^{2+}$  entwickelt wurde, erfolgen. Dazu muss diese GFP-

Mutante in Zellen exprimiert werden. Um einen Sensor zu entwickeln, der insensitiv gegenüber  $\text{Cu}^{2+}$  ist, darf die exprimierte GFP-Mutante C48S kein His<sub>6</sub>-Tag besitzen.

Die Expression von GFP C48S ohne His<sub>6</sub>-Tag und einer weiteren GFP-Mutante, deren Anregungsmaximum sich nicht mit dem von GFP C48S überschneidet, kann die Entwicklung eines Sensors ermöglichen, der eine Unterscheidung zwischen  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{2+}$  gewährleistet. Dazu müssen zwei FLIM-Bilder der selben Zelle bei verschiedenen Anregungswellenlängen oder bei spektral aufgelöster Detektion der Emission aufgenommen werden.

Können zwei verschiedene Mutanten von GFP mit gleichen Anregungs- aber unterschiedlichen Emissionsmaxima in Zellen exprimiert werden, so ist durch spektrale Trennung der Lebensdauerkomponenten durch eine FLIM-Messung die Quantifizierung von  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{2+}$  in einer Zelle möglich. Dies ist schematisch dargestellt in Abbildung 7.18.

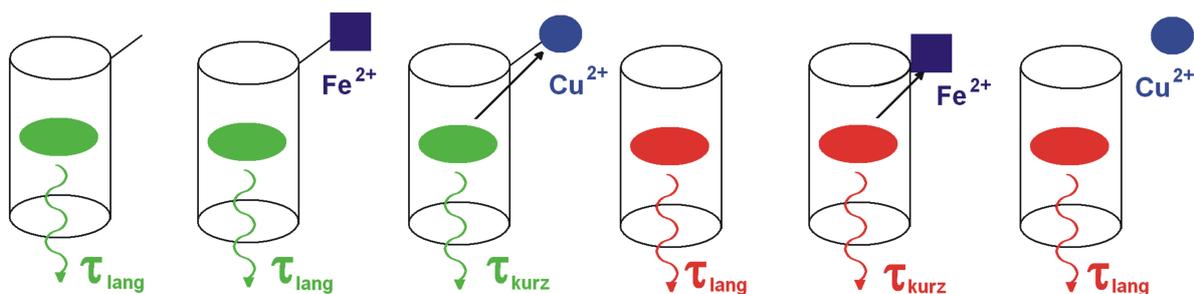


Abbildung 7.18: Möglichkeit zur Unterscheidung zwischen  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  über Änderungen der Lebensdauer. Die Lebensdauer des GFP mit His<sub>6</sub>-Tag wird durch  $\text{Cu}^{2+}$  verkürzt, ändert sich jedoch nicht durch  $\text{Fe}^{2+}$ . Beim RFP ohne Bindungsstelle für  $\text{Cu}^{2+}$  verhält es sich genau umgekehrt.

Der nächste Schritt ist in jedem Fall die Aufklärung des für das Quenching verantwortlichen Mechanismus. Dadurch kann gezielt ein Titrationsmodell entwickelt werden, das die Quantifizierung von  $\text{Fe}^{2+}$  ermöglicht. Weiterhin könnten die Ergebnisse auf weitere Mutanten von GFP übertragen werden.

## 7.4 Bestimmung der Bildungseffizienz des Chromophors von GFP

### 7.4.1 Prinzip zur Bestimmung der Bildungseffizienz mittels TCSPC

Die Relevanz von GFP als Fluorophor mit seinen vielfältigen Einsatzmöglichkeiten ist in Kapitel 2 ausführlich dargelegt. Von besonderer Wichtigkeit ist dabei die Möglichkeit GFP genetisch in Zellen zu exprimieren. Die autokatalytische Bildung des Chromophors erlaubt den Einbau intakter Fluorophore in lebende Zellen ohne die Zugabe weiterer Substanzen in Präsenz von molekularem Sauerstoff. Allerdings erfolgt nicht bei allen GFP-Molekülen der finale Faltungsschritt. Das hat die Bildung nicht fluoreszierender GFP-Moleküle zur Folge. Für viele Anwendungen von GFP, insbesondere für den qualitativen Einsatz, z. B. als Fluoreszenzmarker, ist dieser Umstand vernachlässigbar, da eine hinreichende Anzahl an fluoreszierendem GFP im Ensemble vorhanden ist. In Abbildung 7.19 sind GFP-Moleküle mit intaktem und mit defektem Chromophor skizziert.

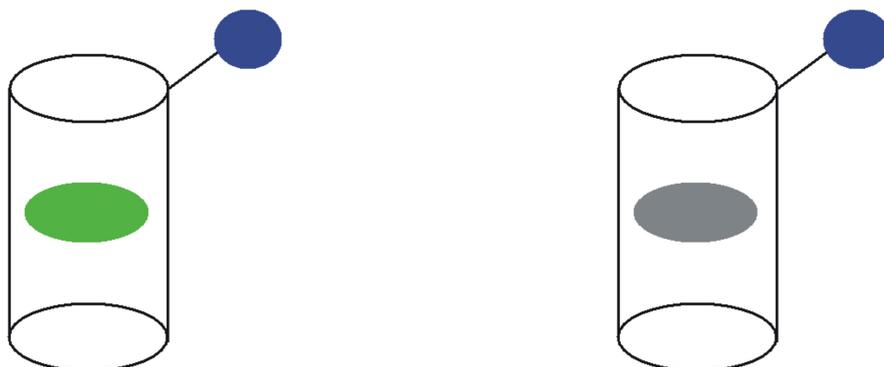


Abbildung 7.19: Skizze der fassartigen Struktur von GFP mit intaktem Chromophor (grün) und blauem Ligand (links). Darstellung von GFP mit defektem Chromophor (grau), ebenfalls mit einem Liganden (rechts). Nur bei GFP-Molekülen mit intaktem Chromophor, können die Liganden detektiert werden.

Quantitatives Arbeiten mit GFP ist jedoch nur möglich, wenn das Verhältnis von intakten Chromophoren zu defekten Chromophoren bekannt ist. Der Anteil an defekten Chromophoren in einem Ensemble aus GFP-Molekülen muss in der Betrachtung der Gesamtzahl an GFP-Molekülen berücksichtigt werden. Die Ursache hierfür liegt in der Tatsache begründet, dass Moleküle mit defektem Chromophor nicht fluoreszieren, trotzdem aber z. B. Liganden binden können. Die Bildung von Komplexen, die über eine Änderung der Fluoreszenzlebensdauer als Maß für die Konzentration des Liganden verwendet wird, führt zu fehlerhaften Ergebnissen, wenn der Chromophor

nicht in jedem GFP-Molekül ausgebildet ist. Ist beispielsweise nur in jedem zweiten GFP-Molekül der Chromophor ausgebildet, so muss die doppelte Konzentration an Liganden vorliegen, um den gleichen Effekt einer Lebensdaueränderung zu erzielen, da die *dunklen* GFP-Moleküle in gleichem Maße Liganden binden wie die *hellen* (Abbildung 7.19). Weil die defekten Chromophore keine Fluoreszenz zeigen, bleibt der Effekt der Bindung an diese Moleküle jedoch unberücksichtigt. Dadurch ergeben sich Fehler in der experimentell bestimmten Ligandenkonzentration.

Weiterhin kann dies unter anderem bei FRET-Messungen zu falschen Ergebnissen führen. Hierbei entspricht ein defekter Chromophor dem Fehlen des FRET-Partners. Quantitativ führt das zu einer scheinbar verminderten FRET-Rate. Um solche Fehler zu vermeiden ist es notwendig Methoden zu entwickeln, die die Bildungseffizienz von Chromophoren in GFP zu ermitteln in der Lage sind. Mit der Kenntnis dieser Effizienz können mögliche Fehler in der quantitativen Betrachtung korrigiert werden.

Bisherige Ansätze zur Bestimmung der Bildungseffizienz von GFP basieren auf Messungen durch die Methoden der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (*fluorescence correlation spectroscopy*, FCS) [161] und der Fluoreszenz Kreuzkorrelationsspektroskopie (*fluorescence cross-correlation spectroscopy*, FCCS) [162]. Dabei werden FRET geeignete Farbstoffmoleküle an GFP gelabelt. Die Unterscheidung von GFP mit defektem und intaktem Chromophor erfolgt bei diesem Ansatz über FRET vom GFP auf den Farbstoff. Das heißt, der Farbstoff emittiert rotverschoben im Bezug auf das GFP. Voraussetzung für diese Methoden ist, im Gegensatz zur im Rahmen dieser Arbeit angewandten Methode über die Messung der Fluoreszenzlebensdauer, die Kenntnis des Verhältnisses von Farbstoff zu GFP. Das Labeln eines GFP-Moleküls mit mehreren Farbstoffmolekülen verändert das Resultat der Messungen. Das erfordert das Einbeziehen der Effizienz des Labels vom Farbstoff an GFP. Dadurch ergibt sich ein weiterer Parameter, der diese Art zur Ermittlung der Chromophorbildungseffizienz verkompliziert. Außerdem ist zur Bestimmung der Chromophorbildungseffizienz die FCS-Messung der Probe zunächst nach der Anregung des GFP, anschließend nach der direkten Anregung des Farbstoffes nötig.

Eine weitere Methode zur Ermittlung des Anteils an fluoreszierenden Proteinen ergibt sich durch die Einzelmolekülspektroskopie. Dabei werden ebenfalls GFP-Moleküle mit einem für FRET geeigneten Farbstoff gelabelt. Überschüssiger freier Farbstoff wird entfernt. Die gelabelten GFP-Moleküle werden immobilisiert und können durch FLIM visualisiert werden. Da FRET nur vom Farbstoff auf GFP mit intaktem Chromophor stattfinden kann, ergibt sich die Möglichkeit der Unterscheidung von GFP mit intaktem und GFP mit defektem Chromophor durch die Wellenlänge der Fluoreszenz der einzelnen Moleküle. Zur Bestimmung der Chromophorbildungseffizienz werden die

Moleküle mit GFP-Fluoreszenz gezählt und mit der Anzahl der Moleküle mit Farbstofffluoreszenz verglichen. Über das Verhältnis wird die Effizienz der intakt gebildeten Chromophore bestimmt.

Durch die Messung der Fluoreszenzlebensdauer an mit einem für FRET geeigneten Farbstoff gelabelten GFP-Molekülen, ergibt sich eine Möglichkeit zur Bestimmung der Bildungseffizienz der Chromophore in GFP. Dabei wird GFP mit einem Farbstoff gelabelt, dessen Emission gegenüber der Absorption des GFP blauverschoben ist. Eine Anregung des Farbstoffes führt zu dessen Fluoreszenz, falls dieser an ein GFP-Molekül mit defektem Chromophor gelabelt ist. Ist der Farbstoff an GFP mit intaktem Chromophor gebunden, kann Energie des angeregten Farbstoffes teilweise durch FRET auf GFP übertragen werden. Dies ist dargestellt in Abbildung 7.20. Der Farbstoff entspricht dabei dem FRET-Donor, das GFP-Molekül mit intaktem Chromophor dem FRET-Akzeptor. Es kommt zur Abnahme der blauen Fluoreszenz des Farbstoffes bei gleichzeitiger Erhöhung der Emission des GFP. Durch die Beobachtung der Fluoreszenz ergibt sich daraus prinzipiell die Möglichkeit, die Chromophorbildungseffizienz ratiometrisch zu ermitteln. Dies erfolgt aus dem Verhältnis der Emissionsintensitäten von GFP und Farbstoff.

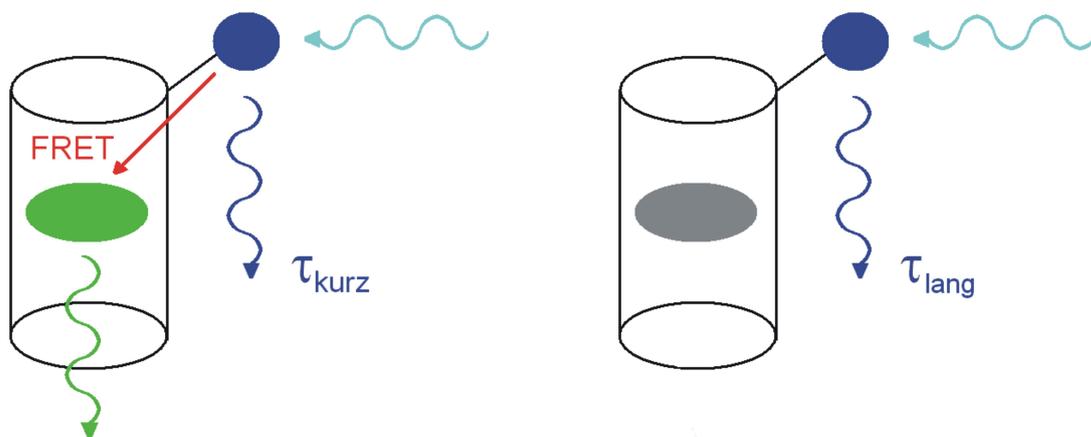


Abbildung 7.20: Skizze von GFP mit intaktem Chromophor (grün) und blauem Ligand (links). FRET zwischen Farbstoff und Chromophor des GFP führt zu einer Reduzierung der Lebensdauer des Farbstoffes. Darstellung von GFP mit defektem Chromophor (grau), ebenfalls mit blauem Liganden (rechts). Hier kommt es nicht zu FRET, da der Akzeptor defekt ist. Dadurch bleibt die ursprüngliche Lebensdauer des Farbstoffes unberührt.

Eine Vereinfachung des Vorgehens, bei dem nur eine Anregungswellenlänge nötig ist, wird durch die Messung der Fluoreszenzlebensdauer des Farbstoffes erreicht. Dessen intrinsische Lebensdauer wird zunächst in Abwesenheit von GFP bestimmt. Anschließend wird der Farbstoff an GFP gelabelt. Durch FRET vom Farbstoff auf GFP-

Moleküle mit intaktem Chromophor, nimmt neben der Fluoreszenzintensität auch die Lebensdauer des Farbstoffes ab. Durch spektrale Filterung des Fluoreszenzlichtes, die die Fluoreszenz von GFP unterdrückt, kann über die Messung der Reduzierung der Lebensdauer des Farbstoffes die Chromophorbildungseffizienz berechnet werden.

Ein Vorteil gegenüber den FCS- und FCCS-Ansätzen ergibt sich daraus, dass zur Bestimmung der Chromophorbildungseffizienz mittels TCSPC das Verhältnis von Farbstoff zu GFP nicht berücksichtigt werden muss, solange keine freien Farbstoffmoleküle vorliegen. In der Praxis wird dies durch Zentrifugation der Probe unter Verwendung eines Filters mit einer entsprechenden Ausschlussgrenze idealerweise in Verbindung mit einem Überschuss an GFP erreicht. Das Labeln eines GFP-Moleküls mit mehreren Farbstoffmolekülen verändert das Resultat der Messungen nicht, da an GFP mit intaktem und defektem Chromophor stets die selbe Anzahl an Farbstoffmolekülen gebunden wird. Es ändert sich damit nur die absolute Absorption durch den Farbstoff, nicht aber die FRET-Effizienz der Farbstoffmoleküle, die an fluoreszierende GFP-Moleküle gebunden sind.

Im Gegensatz zur Bestimmung der Effizienz durch die Einzelmolekülmethode, ist das TCSPC-Experiment praktikabler und schneller, da eine Messung in der Küvette ausreicht, um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten. Da TCSPC-Messungen Küvettenexperimenten entsprechen, kann auf einen komplizierten FLIM-Aufbau verzichtet werden.

Die Bestimmung der Chromophorbildungseffizienz über die Fluoreszenzlebensdauer basiert auf FRET zwischen Farbstoff und GFP. Dieser Energietransfer zeigt sich experimentell in einer Änderung der spektralen Eigenschaften der Probe. Anregung des Donors in Abwesenheit des Akzeptors führt zur Emission des Donors. Die Zugabe des Akzeptors führt bei Anregung des Donors zu einer Abnahme der Donor-Fluoreszenz, bei gleichzeitigem Auftreten von Fluoreszenz durch den Akzeptor. Durch diesen Energietransfer vom Donor zum Akzeptor ergibt sich ein zusätzlicher Weg zur Energieabgabe für den Donor.

Dieser Energietransfer beeinflusst außerdem die Fluoreszenzlebensdauer des Donors. Besitzt das GFP-Molekül einen defekten Chromophor, so ist kein Energieübertrag vom Farbstoff auf das GFP möglich. In Gleichung 7.3 ist der Fall für einen intakten Chromophor dargestellt durch die zusätzliche Ratenkonstante  $k_{FRET}$ . Da die Summe der Ratenkonstanten gleich der reziproken Lebensdauer ist, führt resonanter Energietransfer zu deren Verkürzung vgl. Gleichung 7.3.

$$\frac{1}{\tau} = k_{fl} = k_{rad} + k_{ns} + (k_{FRET}) \quad (7.3)$$

Hierbei bezeichnet  $\tau$  die Fluoreszenzlebensdauer,  $k_{fl}$  die Ratenkonstante für die Fluoreszenzlebensdauer. Die Ratenkonstanten  $k_{rad}$  und  $k_{ns}$  bezeichnen die strahlenden bzw. nicht strahlenden Prozesse und  $k_{FRET}$  die Ratenkonstante für FRET.

### 7.4.2 Labeln von NTA-Atto488 an mCherry

Das Prinzip zur Bestimmung der Bildungseffizienz von Chromophoren wird demonstriert für das FP mCherry. An dieses wird ein Atto-Farbstoff gelabelt (*NTA-Atto488*, Atto-Tec, Deutschland). Die Auswahl des FRET-Paares ergibt sich einerseits durch den Umstand, dass für mCherry mit NTA-Atto488 ein Farbstoff vorliegt, der die spektralen Anforderungen erfüllt, wie die in Abbildung 7.22 gezeigten Anregungs- und Emissionsspektren von mCherry und von NTA-Atto488 zeigen.

Weiterhin besitzt der Fluoreszenzfarbstoff NTA-Atto488 eine Nitrilotriessigsäure-Gruppe (NTA). Die NTA-Gruppe ist ein starker Chelatbildner, der sich durch eine hohe Affinität gegenüber Polyhistidin-Tags auszeichnet. Dadurch lässt sich der Farbstoff ohne größeren chemischen Aufwand an das His<sub>6</sub>-Tag am N-Terminus von mCherry anbringen. Abbildung 7.21 zeigt die Bindung von NTA-Atto488 über die NTA-Gruppe an das His<sub>6</sub>-Tag des Fluoreszenzproteins mCherry.

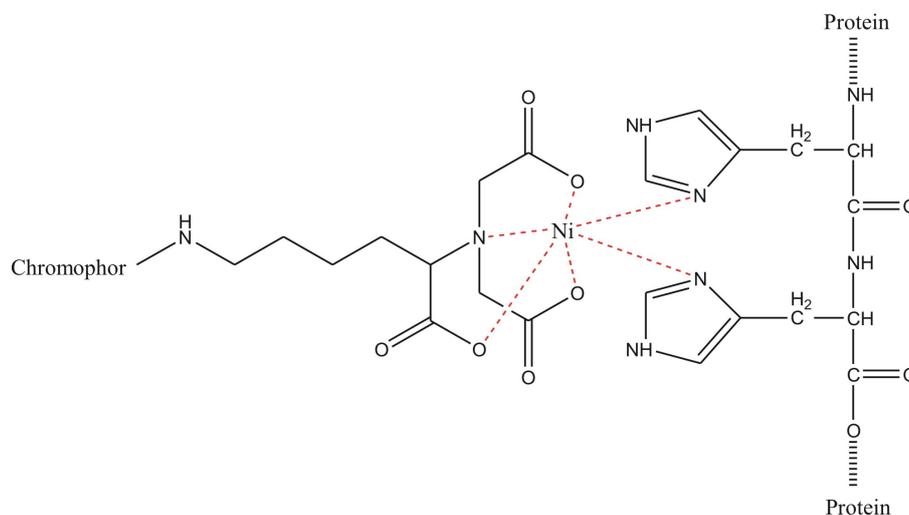


Abbildung 7.21: Chemische Struktur der Bindung zwischen NTA-Atto488 und mCherry. Der Farbstoff ist über die NTA-Gruppe an das His<sub>6</sub>-Tag des mCherry gebunden.

Zudem sind sowohl die monomere GFP-Mutante mCherry als auch der verwendete Farbstoff NTA-Atto488 kommerziell erhältlich. Für TCSPC-Messungen des Farbstoffes muss eine Laserquelle geeigneter Wellenlänge zur Verfügung stehen, um diesen anregen zu können. Im Arbeitskreis ist ein gepulster Laser vorhanden, der bei 470 nm

emittiert und der somit im Anregungsspektrum von NTA-Atto488 liegt. Gleichzeitig führt diese Wellenlänge nicht zu einer wesentlichen Anregung von mCherry.

Das Labeln erfolgt gemäß der Anleitung von *Sigma-Aldrich*. Nur die Inkubationszeit wird von zwei auf acht Stunden erhöht, um das Maß der erfolgreich an mCherry gelabelten Farbstoffe zu maximieren.

### 7.4.3 Bestimmung der Bildungseffizienz

Die Demonstration des dargelegten Prinzips zur Bestimmung der Chromophorbildungseffizienz erfolgt exemplarisch für die GFP-Variante mCherry und den für diese Mutante von GFP FRET-geeigneten Farbstoff NTA-Atto488. Die Messung der Chromophorbildungseffizienz anderer GFP-Mutanten kann über die Anwendung der gleichen Methode bei Auswahl eines für diese Mutante FRET-geeigneten Farbstoffes erfolgen, der sich an die gewünschte GFP-Mutante labeln lässt.

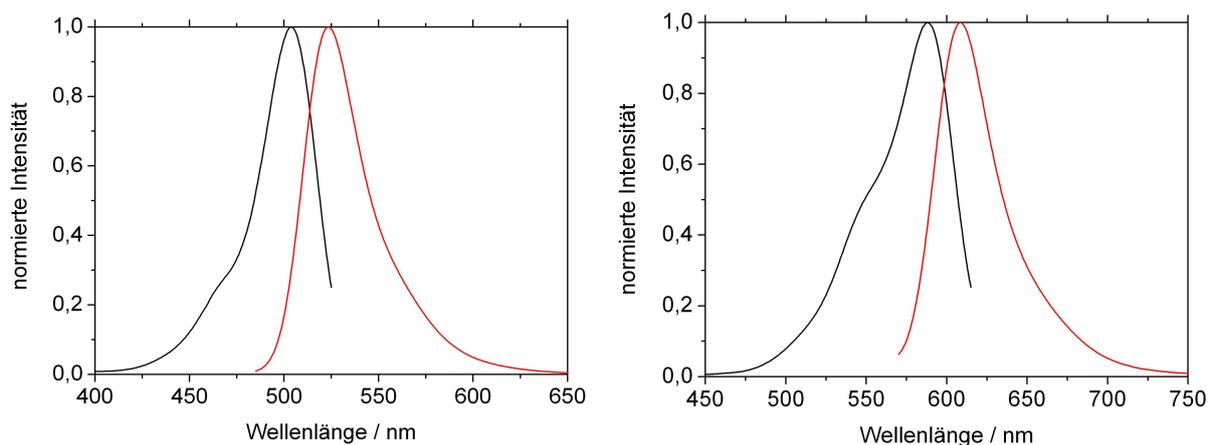


Abbildung 7.22: Anregungs- und Emissionsspektrum von NTA-Atto488 nach Anregung mit  $\lambda_{ex} = 470$  nm bzw. Emission bei  $\lambda_{em} = 540$  nm (links). Anregungs- und Emissionsspektrum von mCherry nach Anregung mit  $\lambda_{ex} = 550$  nm bzw. Emission bei  $\lambda_{em} = 630$  nm (rechts).

Um als FRET-Paar geeignet zu sein, müssen drei Voraussetzungen zwischen Donor und Akzeptor erfüllt sein. Zum einen muss die parallele Orientierung der Dipole von Chromophor und Farbstoff gewährleistet sein. Das ist durch die Flexibilität des Farbstoffes um die Bindungsstelle, das His<sub>6</sub>-Tag, der Fall.

Des Weiteren ist ein hinreichend großer spektraler Überlapp zwischen Emission des Farbstoffes und Absorption von mCherry nötig, um die Eignung für FRET zu erfüllen. Abbildung 7.22 zeigt die Anregungs- und Emissionsspektren für den freien Farbstoff NTA-Atto488 und für ungelabeltes mCherry. Das Absorptionsmaximum von NTA-Atto488 liegt bei 501 nm, das Emissionsmaximum bei 523 nm. Der Farbstoff eignet

sich somit zur Anregung mit einem Laser, der bei 470 nm emittiert. Das Anregungsmaximum von mCherry liegt bei 587 nm. Die maximale Emission ergibt sich für 610 nm.

Der spektrale Überlapp vom Emissionsspektrum des Atto-Farbstoffes mit dem Anregungsspektrum von mCherry ist dargestellt in Abbildung 7.23. Es ist eine deutliche spektrale Überschneidung der beiden Spektren zu erkennen, die auf ein hohes Überlappintegral  $J(\lambda)$  hinweist.

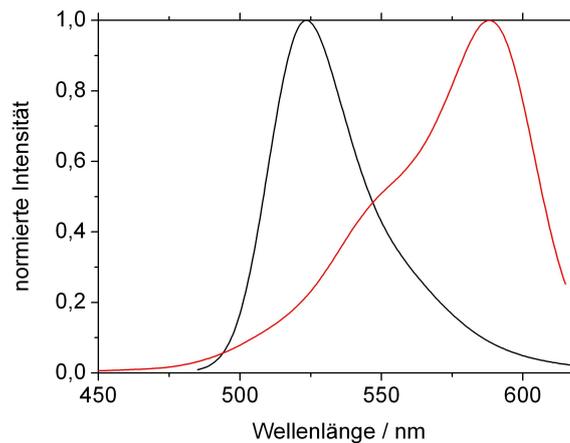


Abbildung 7.23: Spektraler Überlapp des Emissionsspektrums von NTA-Atto488 nach Anregung bei  $\lambda_{ex} = 470$  nm und des Anregungsspektrums von mCherry bei  $\lambda_{em} = 630$  nm. Damit ist eine Voraussetzung für FRET gewährleistet.

Die dritte Voraussetzung für FRET ist der Abstand zwischen FRET-Donor und FRET-Akzeptor. Dieser liegt bedingt durch die Molekülstruktur von mCherry zwischen zwei und drei Nanometer und damit im für FRET typischen Bereich.

Ein gutes Maß für die Eignung als FRET-Paar ist der Förster-Radius  $R_0$ . Dieser trägt den geometrischen Gegebenheiten auf molekularer Ebene Rechnung. Ein hoher  $R_0$  ist eine Voraussetzung für FRET. Die Berechnung von  $R_0$ , die später explizit erfolgt, ergibt  $R_0 = 5,5$  nm. Dies bestätigt die Erfüllung der Kriterien für FRET zwischen mCherry und NTA-Atto488.

Um eine genaue Bestimmung der Bildungseffizienz zu gewährleisten, muss die Emission von mCherry durch Anregung bei der Wellenlänge von 470 nm des Lasers ausgeschlossen werden. Es zeigt sich eine geringe Emission von mCherry im Emissionsmaximum von  $\lambda_{em}^{max} = 610$  nm bei  $\lambda_{ex} = 470$  nm, die gegenüber der Anregung in der Nähe des Maximum bei  $\lambda_{ex} = 550$  nm weniger als 2,5 % beträgt. Durch die Verwendung eines geeigneten Emissionsfilter, der im Wellenlängenbereich von 500 - 550 nm transmittiert, insbesondere im Wellenlängenbereich der Fluoreszenz von mCherry hingegen die Transmission blockiert, wird die Detektion von Fluoreszenz von mCherry

ry nach direkter Anregung mit Laserlicht bei Messungen von  $\tau$  minimiert.

Die Bestimmung der Effizienz der Energieübertragung durch FRET erfolgt durch Auswertung von Lebensdauermessungen. Zunächst wird die Lebensdauer von NTA-Atto488 ohne die Anwesenheit von mCherry bestimmt. Anschließend wird NTA-Atto488 an mCherry gelabelt und die Lebensdauer dieser Probe bestimmt. Hierbei wird ausschließlich die Fluoreszenz des Farbstoffes betrachtet.

Für das exakte quantitative Arbeiten ist es erforderlich, einen Überschuss an mCherry zu gewährleisten. Dadurch soll sichergestellt werden, dass alle in der Küvette befindlichen Farbstoffmoleküle an die GFP-Mutante mCherry gelabelt sind und kein freier Farbstoff mehr vorliegt. Das Vorhandensein von freiem Farbstoff würde die Bestimmung hin zu einem vermeintlich erhöhten Anteil an defektem Chromophor verfälschen, da für freie Farbstoffmoleküle kein FRET stattfindet. Möglicher überschüssiger Farbstoff wird daher im Anschluss an den Labelvorgang durch Zentrifugieren mit einem Filter der Ausschlussgrenze von 10000 Da aus der Probe entfernt.

Für die Lebensdauer von NTA-Atto488 ergibt sich nach Anregung mit Licht der Wellenlänge  $\lambda_{ex} = 470$  nm und spektraler Trennung durch einen 525-50 Filter eine Fluoreszenzlebensdauer von  $\tau_{FS} = 2,3$  ns. Das Abklingverhalten der Fluoreszenz wird in diesem Fall als monoexponentiell betrachtet. Die Messung der Lebensdauer, der mit mCherry gelabelten Farbstoffprobe, führt zu einer reduzierten, durch monoexponentiellen Fit bestimmten Lebensdauer von  $\tau_{mono} = 2,0$  ns. Die Lebensdauerhistogramme der beiden Proben zeigt Abbildung 7.24.

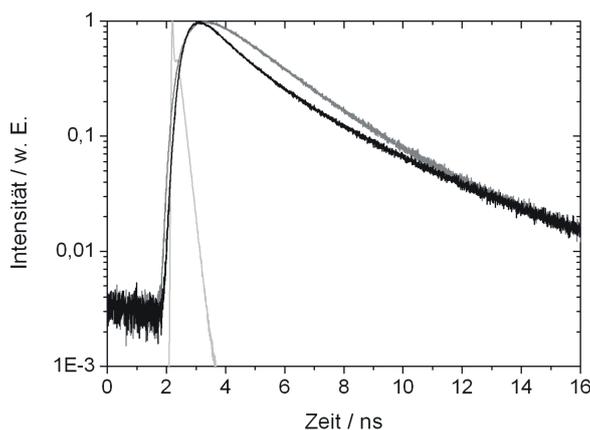


Abbildung 7.24: Lebensdauerhistogramme von freiem NTA-Atto488 (dunkelgrau) sowie von an mCherry gelabeltem Farbstoff (schwarz). Die Anregung erfolgt bei beiden Messungen mit  $\lambda_{ex} = 470$  nm, die IRF ist in hellgrau dargestellt.

Dabei ist zu beachten, dass der tatsächliche Zerfall der Fluoreszenz biexponentiell verläuft. Eine monoexponentielle Auswertung liefert somit einen Näherungswert, der

nicht der tatsächlichen Lebensdauer entspricht, sondern einer gemittelten Lebensdauer, die sich aus den beiden Komponenten des ungequenchten Farbstoffes  $\tau_{lang}$  und des gequenchten Farbstoffes  $\tau_{kurz}$  zusammensetzt. Die Anteile des ungequenchten ( $\tau_{lang} = 2,3$  ns) und des durch mCherry gequenchten Atto-Farbstoffes ( $\tau_{kurz}$ ) werden im Folgenden durch biexponentielles Fitten bestimmt. Gleichzeitig ergibt sich durch die Auswertung der Lebensdauerdaten die kurze Lebensdauerkomponente. Die Mischung der beiden Spezies des Atto-Farbstoffes in der Küvette ist schematisch dargestellt in Abbildung 7.25.

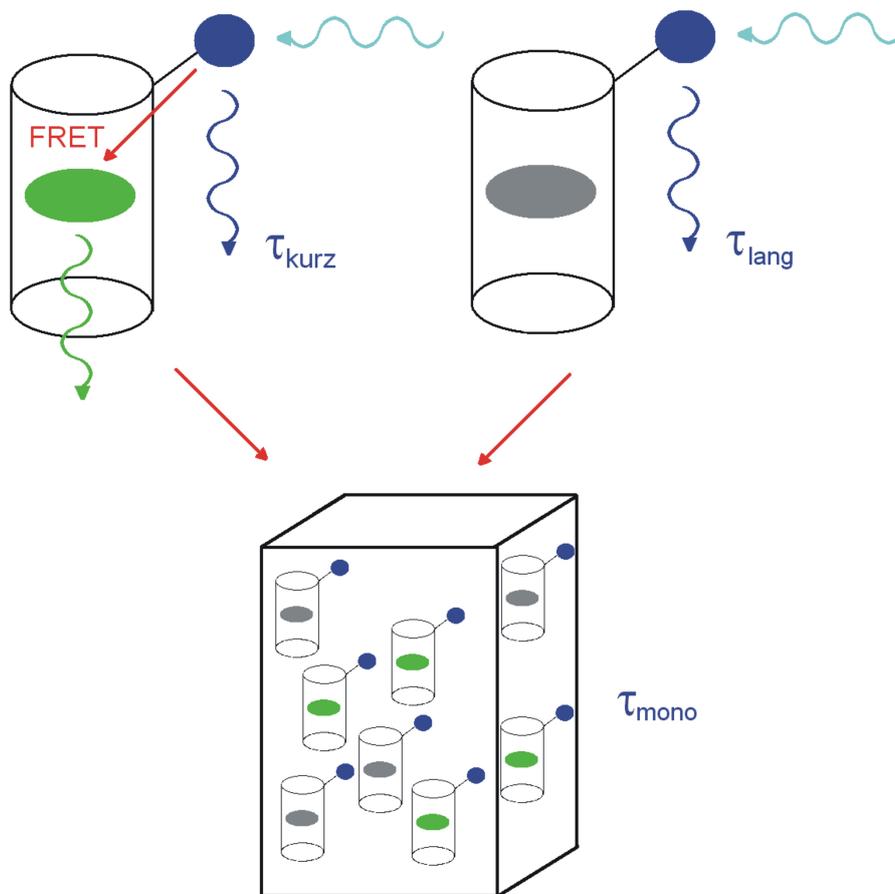


Abbildung 7.25: Auf Einzelmolekülniveau liegen zwei fluoreszierende Spezies vor. Zum einen an GFP mit intaktem Chromophor gebundener Atto-Farbstoff, zum anderen an GFP mit defektem Chromophor gebundener Atto-Farbstoff. In der Küvette liegt ein Ensemble aus diesen beiden Spezies vor, deren Anteile durch eine biexponentielle Charakterisierung der Fluoreszenzlebensdauer bestimmt werden.

Da nicht alle Chromophore intakt sind, liegt die experimentell bestimmte monoexponentielle Lebensdauer  $\tau_{mono} = 2,0$  ns über der tatsächlichen Lebensdauerkomponente ( $\tau_{kurz}$ ), die im konkreten Fall des gelabelten Farbstoffes an GFP mit intaktem Chromophor vorliegt. Biexponentielles Rekonvolutionsfitten gemäß Gleichung 4.7 führt zu

einer kurzen Lebensdauerkomponente von  $\tau_{kurz} = 1,1$  ns. Neben den beiden spezifischen Werten für die Lebensdauer des freien und des gelabelten Atto-Farbstoffes, liefert die Auswertung die dazugehörigen absoluten präexponentiellen Faktoren  $a_{lang} = 24360$  und  $a_{kurz} = 11520$ . Diese entsprechen den relativen Anteilen  $A_{lang} = 67,9\%$  und  $A_{kurz} = 32,1\%$ . Damit ist die Bestimmung der Effizienz der Chromophorbildung möglich. Eine Übersicht über die Ergebnisse der Lebensdauern und deren absolute sowie relative Anteile ist dargestellt in Tabelle 7.6.

	Lebensdauer / ns	Anteil absolut	Anteil / %
Chromophor intakt	$1,1 \pm 0,1$	$11520 \pm 200$	$32,1 \pm 0,6$
Chromophor defekt	$2,3 \pm 0,1$	$24360 \pm 300$	$67,9 \pm 0,8$

Tabelle 7.6: Ergebnisse der biexponentiellen Auswertung der Lebensdaueremessungen von NTA-Atto488. Die Auswertung erfolgt für die Fluoreszenzlebensdauer des Atto-Farbstoffes nach dessen Labeln an den FRET-Akzeptor mCherry. Die Lebensdauer  $\tau_{lang}$  entspricht dabei der Lebensdauer von NTA-Atto488 in Abwesenheit von mCherry.

Der Anteil an Spezies mit verkürzter Lebensdauer, deren Ursache in FRET vom Atto-Farbstoff auf mCherry begründet liegt, repräsentiert mCherry-Moleküle, deren Chromophor intakt ist. Diesen Ergebnissen zufolge, liegen bei 32,1 % der mCherry-Moleküle intakt ausgebildete Chromophore vor. Bei 67,9 %, bei denen keine Abnahme der Fluoreszenzlebensdauer vorliegt und somit kein FRET stattfinden kann, ist der Chromophor defekt.

Die Bestimmung der FRET-Effizienz  $E$  erfolgt gemäß Gleichung 3.20 mit  $\tau_{DA} = 1,1$  ns und  $\tau_D = 2,3$  ns:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} = 0,52 \quad (7.4)$$

Damit beträgt die FRET-Effizienz 52 %. Der für das FRET-Paar NTA-Atto488 und mCherry spezifische Förster-Radius  $R_0$  wird gemäß Gleichung 3.17 aus dem auf die Fläche normierten Emissionsspektrum von NTA-Atto488 und dem Absorptionsspektrum von mCherry berechnet. Die Quantenausbeute von NTA-Atto488 beträgt laut Herstellerangaben  $\Phi_D = 0,80$ . Aufgrund der Flexibilität des His<sub>6</sub>-Tags wird  $\kappa^2 = 2/3$  für die Berechnung verwendet, für den Brechungsindex wird  $n = 1,4$  für Biomoleküle in wässrigen Lösungen angenommen. Gleichung 3.17 ergibt einen Förster-Radius von  $R_0 = 5,5$  nm. Das Überlappintegral beträgt dabei  $J(\lambda) = 2,28 \cdot 10^{15} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{nm}^4$ .

Für GFP-Moleküle mit intaktem Chromophor sollte FRET nicht nur die Lebensdauer des gelabelten Farbstoffes quenchen, sondern auch zu einer spektralen Veränderung führen. Anregung von NTA-Atto488 bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{ex} = 470$  nm, bei der mCherry nicht absorbiert, sollte durch Energietransfer zu einer Emission von mCherry führen. Das Emissionsspektrum des mit Farbstoff gelabelten mCherry nach Anregung

mit einer Wellenlänge von  $\lambda_{ex} = 470$  nm ist dargestellt in Abbildung 7.26.

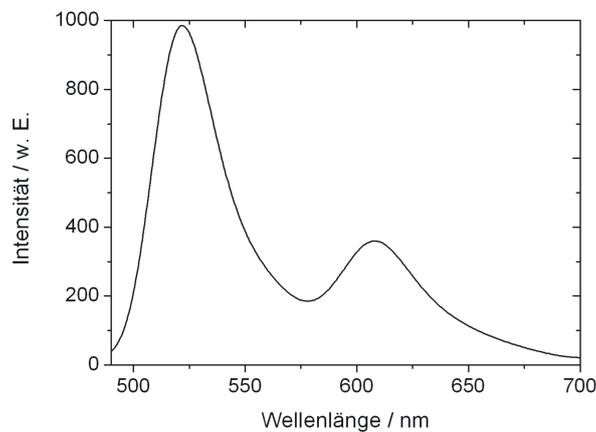


Abbildung 7.26: Das Auftreten von FRET vom Farbstoff NTA-Atto488 zu mCherry äußert sich nicht nur in einer Verkürzung der Lebensdauer des Farbstoffs, sondern auch in dem Auftreten von mCherry-Fluoreszenz nach Anregung mit  $\lambda_{ex} = 470$  nm.

Die Anregung von NTA-Atto488 mit  $\lambda_{ex} = 470$  nm führt zu einer Emission des Farbstoffes. Den Erwartungen entsprechend ist außerdem die Emission von mCherry zu sehen, die durch FRET induziert ist. Eine alternative Möglichkeit für das Auftreten der Emission von mCherry liegt theoretisch im strahlenden Energietransfer vom Farbstoff auf mCherry. Die Reabsorption der Emission des Farbstoffes durch mCherry kann die Ergebnisse in Experimenten beeinträchtigen, die auf der Messung der Fluoreszenzintensität beruhen. Für Verfahren, die auf der Basis von Lebensdauerexperimenten basieren spielt dies keine Rolle, da in den Lebensdauerexperimenten Fluoreszenz von mCherry aus dem Strahlengang gefiltert wird und nur die Emission des Farbstoffes detektiert wird. Somit bietet diese Methode zur Bestimmung der Chromophorbildungseffizienz einen Vorteil gegenüber intensitätsbasierten Verfahren.

#### 7.4.4 Diskussion der Bestimmung der Chromophorbildungseffizienz

Mittels des hier demonstrierten Verfahrens TCSPC-Messungen von Farbstoffen, die an GFP gelabelt sind, durchzuführen, lässt sich der Anteil intakt ausgebildeter Chromophore in Mutanten von GFP bestimmen. Das Emissionsspektrum des Farbstoffes muss dazu mit dem Absorptionsspektrum des GFP überlappen, um ein geeignetes FRET-Paar zu bilden. Im TCSPC-Histogramm entspricht dabei die lange Lebensdauerkomponente dem Anteil an defekten Chromophoren. Die zweite Lebensdauerkomponente, die durch FRET verkürzt ist, ist ein Maß für den Anteil von GFP mit intaktem Chromophor. Diese Methode stellt somit eine Möglichkeit dar, aus einer Lebensdauerexperimenten den Grad der Chromophorbildung zu bestimmen.

Kontrollexperimente zur Bestätigung der Ergebnisse dieser Methode stehen zu diesem Zeitpunkt noch aus. Dies kann beispielsweise der Vergleich der Ergebnisse zu Effizienzuntersuchungen einer auf gleichem Wege erzeugten Probe von mCherry mit einer der alternativen Methoden sein. Die Probe kann mit dem Lebensdaueransatz und außerdem z. B. mit dem FCS-Ansatz analysiert werden. Eine Übereinstimmung der Ergebnisse wäre ein Hinweis darauf, dass diese Methode geeignet für die Bestimmung der Chromophorbildungseffizienz ist.

Ein weiteres Experiment besteht im Vergleich der Chromophorbildungseffizienz einer mCherry-Probe vor und nach der Zerstörung des Chromophors. Zunächst muss dazu die Chromophorbildungseffizienz einer mCherry-Probe bestimmt werden. Nachdem in dieser Probe ein Anteil der intakten Chromophore zerstört ist, erfolgt die erneute Bestimmung des Anteils intakt gebliebener Chromophore. Hier müsste eine Abnahme zu beobachten sein, die sich in einer Erhöhung des Anteils der langen Lebensdauerkomponente zeigen sollte. Probleme liegen hierbei in der praktischen Umsetzung. Der Chromophor muss fluoreszenzuntüchtig gemacht werden, ohne dabei die Struktur des GFP zu ändern. Dies kann durch Photobleichen oder den Einsatz entsprechender Chemikalien erfolgen.

Mit dem in diesem Kapitel entwickelten Verfahren eröffnet sich die Möglichkeit zur Bestimmung der Effizienz der Chromophorbildung von Mutanten des GFP. Dieses bietet gegenüber bestehenden Verfahren Vorteile bezüglich der Schnelligkeit des Prozesses und der Einfachheit der Auswertung. Die Kenntnis des Anteils fluoreszenzuntüchtiger Chromophore ist ein wesentlicher Faktor, der den Einsatz von GFP als quantitativen Biosensor erst ermöglicht.

# Kapitel 8

## Zusammenfassung und Ausblick

GFP zeichnet sich durch seine vielseitigen spektralen Eigenschaften aus. Es kann durch geeignete Mutationen in der Molekülstruktur nahezu alle Farben im sichtbaren Spektralbereich annehmen. Zusammen mit der Möglichkeit, das Protein in Zellen zu exprimieren, stellt GFP ein wichtiges Werkzeug in der Biologie und in den Lebenswissenschaften dar. Dabei gehen mittlerweile die Anwendungen über die klassischen qualitativen Verfahren, insbesondere der Fluoreszenzmarkierung, hinaus. Mit dem quantitativen Arbeiten treten Ursachen auf, die zu Fehlern führen können. Diese müssen berücksichtigt werden. Dies gilt beispielsweise bei der Detektion von Substanzen *in vivo* und deren Konzentrationsmessung sowie bei FRET-Messungen zur Bestimmung von molekularen Abständen. Fehler beim quantitativen Arbeiten entstehen hauptsächlich durch die Vernachlässigung der Tatsache, dass nicht alle GFP-Moleküle intakte ausgebildete Chromophore besitzen. Deshalb ist für diese Einsatzgebiete von GFP die Bestimmung des Anteils fluoreszenztüchtiger Chromophore notwendig. Bleibt diese unberücksichtigt, ergeben sich systematische Fehler in Abstandsmessungen und in Konzentrationsbestimmungen. In dieser Arbeit wird eine Methode beschrieben, die die Bestimmung des Verhältnisses von fluoreszierenden zu defekten Chromophoren in GFP erlaubt.

Der entwickelte Ansatz zur Bestimmung der Bildungseffizienz von Chromophoren in Fluoreszenzproteinen erfolgt über Lebensdauermessungen von Fluoreszenzfarbstoffen, die an GFP-Molekülen angebracht sind. Durch FRET erfolgt Energieübertrag vom Farbstoff auf GFP, falls dieses einen intakten Chromophor aufweist. Dadurch verkürzt sich die Lebensdauer des Farbstoffes. Ist der Chromophor des GFP defekt, kann keine Energie transferiert werden und die Lebensdauer ändert sich nicht. Aus dem Grad der Lebensdaueränderung kann damit der Anteil an GFP mit fluoreszenzfähigen Chromophoren berechnet werden.

Für das FRET-Paar mCherry und NTA-Atto488 kann mit dieser Methode ein Anteil

intakt ausgebildeter Chromophore von  $32,1 \pm 0,6\%$  bestimmt werden. Kontrollmessungen stehen zum jetzigen Zeitpunkt noch aus.

Diese Methode zeichnet sich gegenüber bestehenden Verfahren durch den geringen experimentellen Aufwand und die einfache Auswertung der gewonnenen Daten aus. Außerdem lässt sie sich auf weitere Mutanten von GFP anwenden. Das erfordert die Wahl von Partnern, die für die entsprechenden Varianten FRET-geeignet sind. Damit ist diese Methode bestens geeignet, um für quantitatives Arbeiten mit GFP standardmäßig die Chromophorbildungseffizienz festzustellen. Die Bestimmung der Bildungseffizienz von eYFP könnte beispielsweise mit einem Naphthalinfarbstoff (2-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonylchlorid, Invitrogen, Deutschland) gelingen, der mit eYFP ein effizienteres FRET-Paar darstellt als mCherry und NTA-Atto488 und der sich durch eine lange Fluoreszenzlebensdauer von ungefähr 20 ns auszeichnet. Eine lange Lebensdauer ist vorteilhaft, da sich größere Änderungen in  $\tau$  ergeben. Dadurch erhöht sich die Genauigkeit der Messungen.

Die Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der Bildungseffizienz der Chromophore in GFP ist eine wesentliche Voraussetzung für quantitatives Arbeiten mit diesem Protein und seinen Mutanten. Dies umfasst auch den Einsatz von GFP als Biosensor für Schwermetallionen. In dieser Arbeit wird das Verfahren der Titration der Fluoreszenzintensität von Mutanten von GFP so modifiziert, dass es sich für eine Titration der Fluoreszenzlebensdauer eignet. Dadurch entfällt die Notwendigkeit einer Referenzmessung, da die Lebensdauer im Gegensatz zur Intensität einer bestimmten  $[\text{Cu}^{2+}]$  zugeordnet werden kann, ohne von der lokalen  $[\text{GFP}]$  oder von Absorption der Fluoreszenz durch die Umgebung der Zelle beeinflusst zu werden. Die Titration der Fluoreszenzlebensdauer ist damit ein selbst referenzierendes Verfahren.

Für die Realisierung dieser Methode wird der dafür relevante mathematische Hintergrund entwickelt und schließlich auf die Lebensdauertitration angewendet. Dazu wird ausgehend vom Massenwirkungsgesetz eine Formel hergeleitet, die die Titration der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von  $[\text{Cu}^{2+}]$  erlaubt. Die Entwicklung eines Verfahrens für die Titration der Fluoreszenzlebensdauer wird durch das Einführen des Zusammenhangs zwischen Fluoreszenzintensität und Fluoreszenzlebensdauer ermöglicht. Die Ergebnisse dieser Herleitung liefern eine Gleichung, die die Lebensdauertitration beschreibt. Die gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten ermöglicht die Bestimmung der Dissoziationskonstanten und eignet sich weiterhin zur Bestimmung der  $[\text{Cu}^{2+}]$  *in vitro*.

Für den Einsatz in Zellen eignet sich die auf diesem Weg hergeleitete Formel nicht, da  $[\text{GFP}]$  *in vivo* unbekannt ist. Deshalb wird eine Näherungsformel hergeleitet, die die Titration für geringe GFP-Konzentrationen, d. h.  $[\text{GFP}] < K_d$ , beschreibt. Damit kann

die Methode der Lebensdauertitration den Einsatz bei Experimenten in Zellen finden. Dies wird demonstriert für *E. coli*-Zellen und für Tabakzellen.

Die hergeleiteten Formeln werden simuliert. Dabei erfolgt eine Variation von  $K_d$  und [GFP]. Die Reduzierung von [GFP] führt entsprechend den Erwartungen zu einer Grenzkonzentration, unterhalb derer der Einfluss von [GFP] gemäß der Näherung vernachlässigt werden kann.

Neben der Formulierung des mathematischen Modells, das die Quantifizierung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  erlaubt, liegt ein Schwerpunkt auf der Untersuchung und der Charakterisierung des Mechanismus, der die Reduzierung der Lebensdauer bedingt. Als verantwortlichen Prozess für die Abnahme der Fluoreszenzintensität und der Fluoreszenzlebensdauer von GFP durch  $\text{Cu}^{2+}$  wird FRET ermittelt. In diesem Kontext erfolgt die Ermittlung des Förster-Radius des Komplexes aus GFP und  $\text{Cu}^{2+}$  von  $R_0 = 2,1 \pm 0,1$  nm sowie der Komplexe von GFP mit den physiologisch relevanten Ionen von Kobalt und Nickel. Diese besitzen  $R_0^{\text{Co}} = 1,8 \pm 0,1$  nm und  $R_0^{\text{Ni}} = 1,4 \pm 0,1$  nm. Die Ergebnisse erklären die Sensitivität von  $\tau$  von GFP gegenüber  $\text{Cu}^{2+}$ , wohingegen  $\text{Co}^{2+}$  und  $\text{Ni}^{2+}$  diese kaum beeinträchtigen. Auch die Metallionen  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{2+}$  können als mögliche Quencher der Fluoreszenzintensität und  $\tau$  ausgeschlossen werden. Damit liegt mit His<sub>6</sub>-GFP ein  $\text{Cu}^{2+}$  selektiver Sensor vor.

Weitere Experimente zur näheren Charakterisierung der Bindung von  $\text{Cu}^{2+}$  an das His<sub>6</sub>-Tag mittels ESR unterstützen die Beobachtungen dieser Arbeit [163]. Die Dissoziationskonstante beträgt  $K_d = (9 \pm 2)$   $\mu\text{M}$  für das FRET-Paar aus der GFP-Mutante T203H und  $\text{Cu}^{2+}$ .

Für Anwendungen in der Biologie ist nicht nur die Kenntnis des Mechanismus und die theoretische Bestimmung des Kurvenverlaufs der Titration, sondern auch der Einsatz in Zellen wünschenswert. Die entwickelte Methode der Lebensdauertitration kann nach der Aufnahme einer Kalibrationstitration auch *in vivo* erfolgen. Dies wird mit der Aufnahme von FLIM-Bildern in *E. coli*-Zellen und in Tabakzellen demonstriert. Dabei kann die  $\text{Cu}^{2+}$ -Aufnahme in Tabakzellen gezeigt und ein Prinzip zur Bestimmung von  $[\text{Cu}^{2+}]$  in *E. coli*-Zellen beschrieben werden.

Neben  $\text{Cu}^{2+}$  ist  $\text{Fe}^{2+}$  ein biologisch relevantes Metallion. Ein wichtiger Schritt zur Entwicklung eines  $\text{Fe}^{2+}$ -Sensors ist die durch diese Ionen beobachtete Lebensdauerverkürzung der GFP-Mutante C48S. Im Gegensatz zum Quenchen von  $\tau$  von His<sub>6</sub>-GFP durch  $\text{Cu}^{2+}$ , kann der Mechanismus für die Reduzierung von  $\tau$  in C48S durch  $\text{Fe}^{2+}$  im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Sicher ist, dass diese nicht durch FRET bedingt ist, da Komplexe von  $\text{Fe}^{2+}$  und Imidazolringen keine nennenswerte Absorption im sichtbaren Spektralbereich zeigen und damit nicht als FRET-Akzeptoren in Frage kommen. Deshalb ist die Analyse des verantwortlichen Quenchmechanismus

ein wichtiges Ziel. Dazu gehört die Untersuchung der Bindung von  $\text{Fe}^{2+}$  an GFP. Dies gibt Hinweise auf den zugrundeliegenden Quenchmechanismus. Unabhängig von der Aufklärung des Quenchmechanismus, ist die Realisierung eines  $\text{Fe}^{2+}$ -Sensors durch die Expression der GFP-Mutante C48S in Zellen prinzipiell denkbar. Ein Problem dabei ist die unerwünschte Sensitivität dieses Systems gegenüber  $\text{Cu}^{2+}$ , welches durch die Expression von C48S ohne His<sub>6</sub>-Tag vermieden werden kann.

Durch die gleichzeitige Expression von C48S ohne His<sub>6</sub>-Tag und einer Mutante von GFP mit einem Anregungsmaximum, das nicht zur Anregung von C48S führt, besteht die Möglichkeit durch spektrale Selektion der Fluoreszenz ein System zu schaffen, das wellenlängenabhängig zwei Schwermetallionen mit einer Messung zu quantifizieren erlaubt. Auch die Verwendung zweier Mutanten von GFP, die verschiedene Emissionsmaxima besitzen, eignen sich im Prinzip für die Konstruktion eines solchen Sensors.

Zusammenfassend wird in dieser Arbeit ein Verfahren zur intrazellulären  $\text{Cu}^{2+}$ -Quantifizierung beschrieben, das auf der Messung der Fluoreszenzlebensdauer von GFP basiert, das in die Zellen eingebracht ist. Das zur Bestimmung der Konzentration erforderliche mathematische Modell wird entwickelt. Weiterhin wird eine Methode zur Bestimmung der Chromophorbildungseffizienz von GFP beschrieben und die Effizienz für mCherry ermittelt.

# Anhang A

## Lebensdauertitrations an weiteren Mutanten von GFP

In Kapitel 7 ist die Methode der Lebensdauertitration von GFP durch Kupfer(II)-ionen beschrieben. Dabei erfolgt das Vorgehen zur Aufklärung des verantwortlichen Mechanismus und zur Quantifizierung von  $\text{Cu}^{2+}$  exemplarisch für die GFP-Mutante T203H. Neben dieser Variante von GFP, führt die Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  bei weiteren Mutanten, die die Voraussetzungen für FRET erfüllen, zu einer Reduzierung der Fluoreszenzlebensdauer.

Alle untersuchten Mutanten besitzen ein His<sub>6</sub>-Tag. Außerdem weisen sie einen hohen spektralen Überlapp mit dem Absorptionsspektrum des Komplexes aus GFP und  $\text{Cu}^{2+}$  auf. Somit eignen sich diese Mutanten ebenfalls zur Bestimmung von  $[\text{Cu}^{2+}]$ . Die Titrationskurven der Lebensdauern und die Anregungs- und Emissionsspektren der Mutanten T203V, eYFP, S65T, fQC 5 und QC 2 von GFP sind im Folgenden abgebildet. In Tabelle A.1 sind die zugehörigen Förster-Radien zusammengestellt.

Mutante	T203V	eYFP	S65T	fQC 5	QC 2
$J(\lambda) / 10^{12} \cdot \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{nm}^4$	6,70	8,18	6,53	7,20	6,10
$R_0 / \text{nm}$	2,1	2,2	2,1	2,1	2,0

Tabelle A.1: Übersicht über  $J(\lambda)$  und  $R_0$  verschiedener Mutanten von GFP. Die gute Übereinstimmung in  $R_0$  liegt in der Ähnlichkeit der spektralen Eigenschaften der Mutanten begründet.

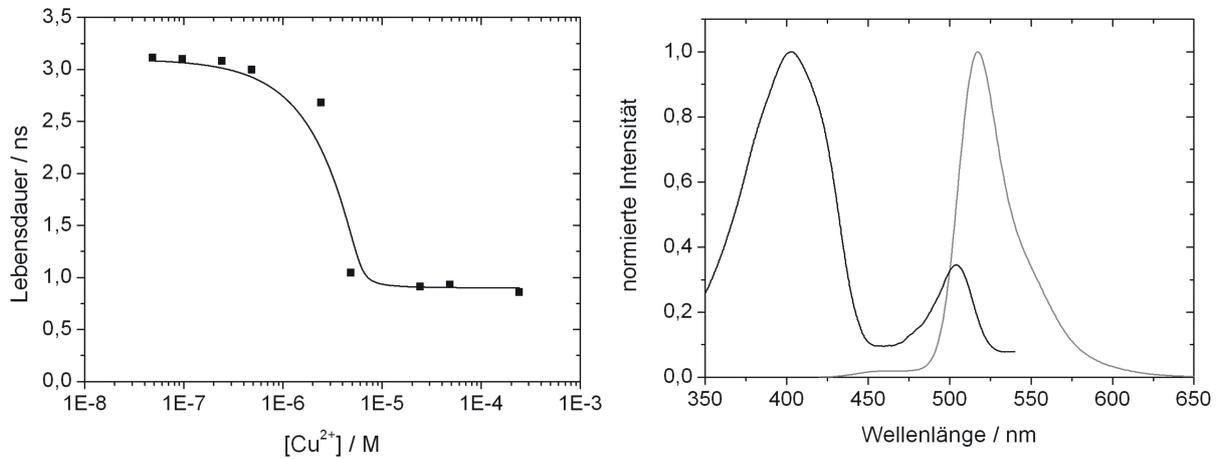


Abbildung A.1: Titration der Lebensdauer der GFP-Mutante T203V durch  $\text{Cu}^{2+}$  mit  $\lambda_{ex} = 405$  nm. Außerdem ist das Anregungsspektrum bei  $\lambda_{em} = 530$  nm sowie das Emissionsspektrum bei  $\lambda_{ex} = 405$  nm abgebildet.

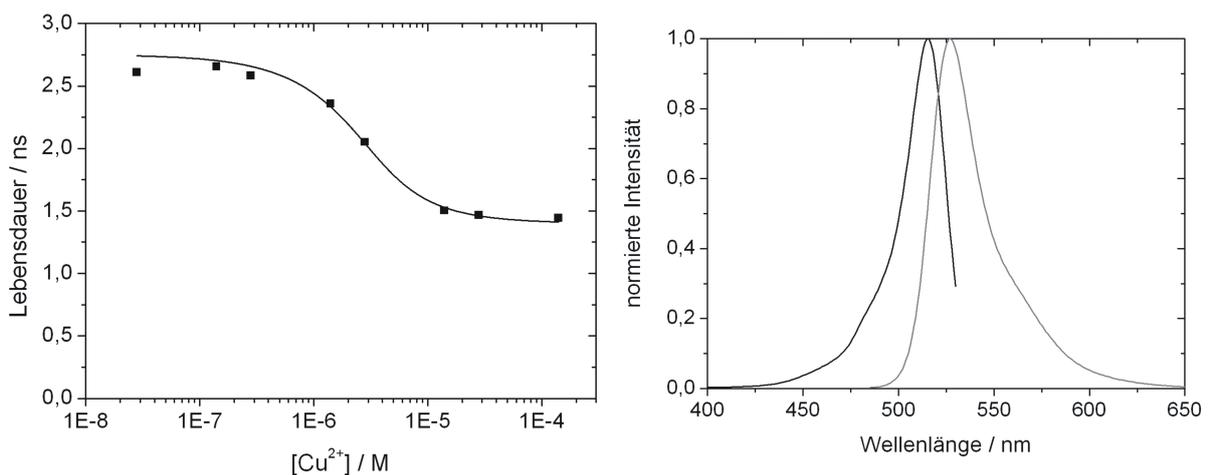


Abbildung A.2: Titration der Lebensdauer von eYFP durch  $\text{Cu}^{2+}$  mit  $\lambda_{ex} = 470$  nm. Außerdem ist das Anregungsspektrum bei  $\lambda_{em} = 550$  nm sowie das Emissionsspektrum bei  $\lambda_{ex} = 470$  nm abgebildet.

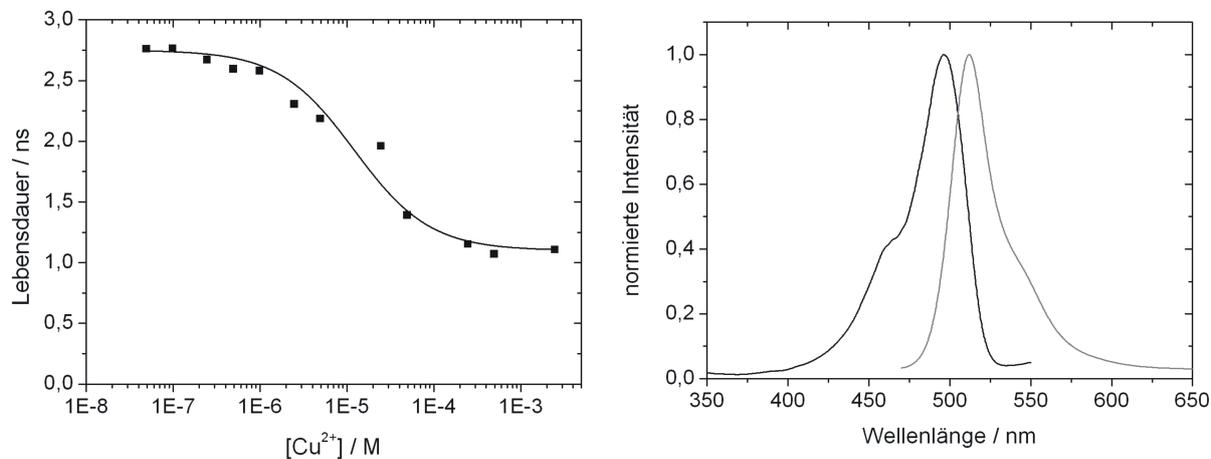


Abbildung A.3: Titration der Lebensdauer der GFP-Mutante S65T durch  $\text{Cu}^{2+}$  mit  $\lambda_{ex} = 470$  nm. Außerdem ist das Anregungsspektrum bei  $\lambda_{em} = 570$  nm sowie das Emissionsspektrum bei  $\lambda_{ex} = 450$  nm abgebildet.

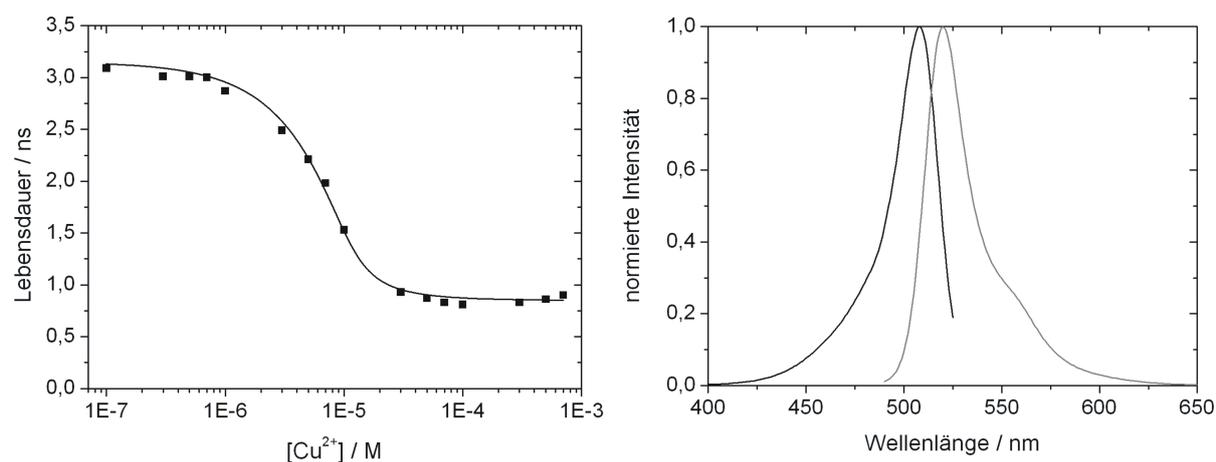


Abbildung A.4: Titration der Lebensdauer der GFP-Mutante fQC 5 durch  $\text{Cu}^{2+}$  mit  $\lambda_{ex} = 470$  nm. Außerdem ist das Anregungsspektrum bei  $\lambda_{em} = 530$  nm sowie das Emissionsspektrum bei  $\lambda_{ex} = 470$  nm abgebildet.

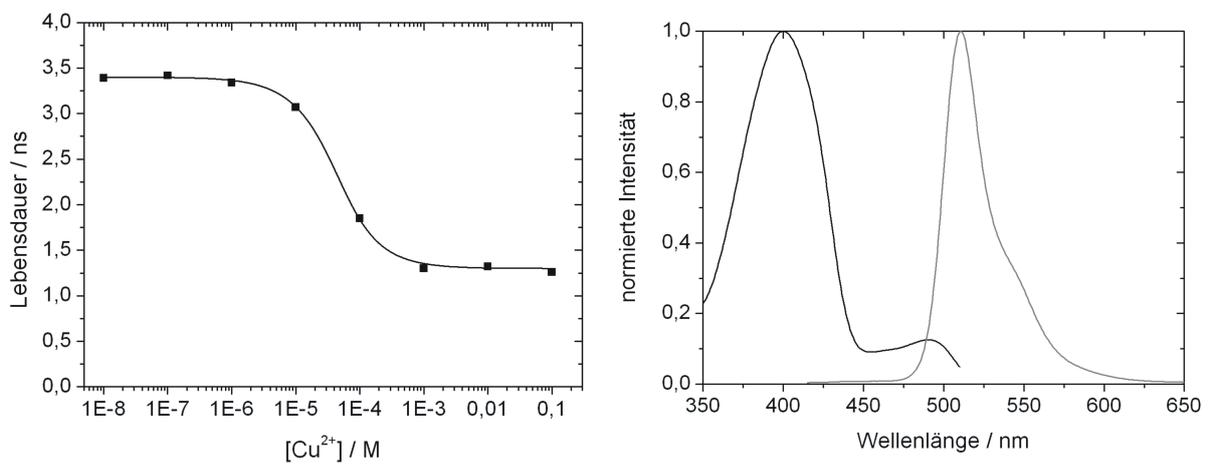


Abbildung A.5: Titration der Lebensdauer der GFP-Mutante QC 2 durch Cu<sup>2+</sup> mit  $\lambda_{ex} = 405$  nm. Außerdem ist das Anregungsspektrum bei  $\lambda_{em} = 530$  nm sowie das Emissionsspektrum bei  $\lambda_{ex} = 405$  nm abgebildet.

## Anhang B

# Einfluss von $\text{Ni}^{2+}$ und $\text{Co}^{2+}$ auf die Lebensdauer von GFP T203H

Die Entwicklung eines für  $\text{Cu}^{2+}$  sensitiven Sensors ist beschrieben für die GFP-Mutante T203H. Der Einfluss der Metallionen  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$  auf die Lebensdauer ist marginal. Abbildung B.1 zeigt die Titrations der Fluoreszenzlebensdauer von GFP T203H in submikromolarer Konzentration durch diese beiden Ionen. Es zeigt sich ein vernachlässigbarer Einfluss sowohl von  $\text{Ni}^{2+}$  als auch von  $\text{Co}^{2+}$  auf die Lebensdauer von GFP T203H, selbst bei millimolaren Konzentrationen. Die Anregungswellenlänge dabei beträgt  $\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$ , die Emission wird unter Verwendung eines 525-50 Filters selektiert.

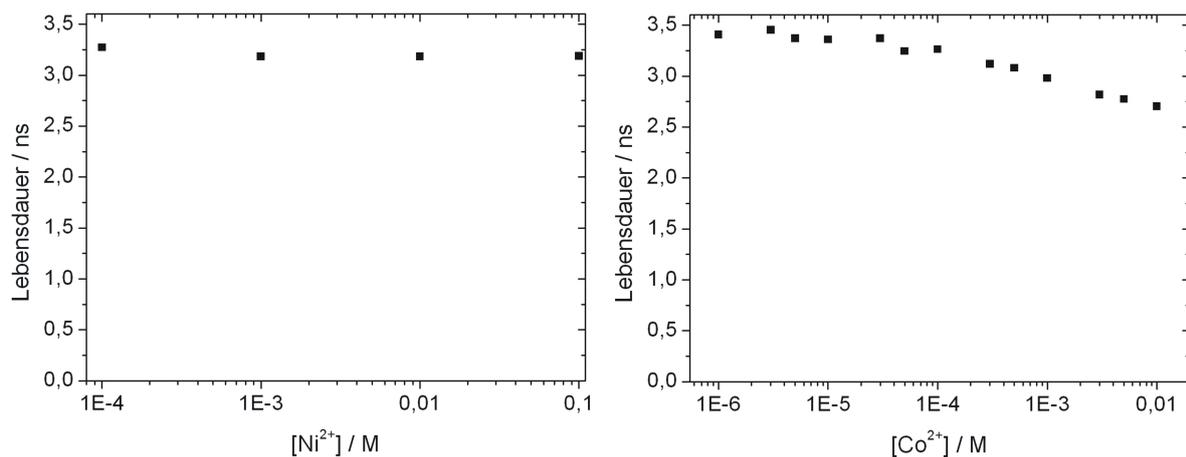


Abbildung B.1: Titration der Fluoreszenzlebensdauer der GFP-Mutante T203H mit  $\text{Ni}^{2+}$  und mit  $\text{Co}^{2+}$ .

# Danksagung

Prof. Dr. Gregor Jung für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, Offenheit, Ideenreichtum und die eingehende Betreuung.

Prof. Dr. Ingolf Bernhardt für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens.

Den Doktoranden des AKs Dagmar, Nicole, Silke und Christian sowie Stephan, Minh, Marcel, Björn, Michael und Andreas.

Prof. Dr. Marc Schneider und Dr. Xavier Le Guével für die konstruktive Kooperation.

Dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Petra Bauer, insbesondere Dr. Rumen Ivanov und Dr. Tzvetina Brumbarova, für die gute Zusammenarbeit.

Dr. Lars Kästner und Prof. Dr. Peter Lipp vom Uniklinikum Homburg, die freundlicherweise ihren Laser zur Verfügung gestellt haben.

Dr. Reinhard Kappl für die Durchführung von ESR-Messungen.

Den Sekretärinnen Frau Weidenfeld, Frau Theobald und Frau Kraus für die gute Organisation und stete Hilfsbereitschaft.

Maike Schug fürs sorgfältige Korrekturlesen.

Alexandra Blum für echtes Englisch.

# Publikationen

I. Sayhan, B. Hötzer, J. Wöllenstein, E. Rose, T. Becker, *Dye-based light sensor for tag integration* (2007), Proc. SPIE 6589, 65890A.

A. Schmitt, B. Hinkeldey, B. Hötzer, G. Jung, *Mechanistic Studies of Oxidation Reactions by Fluorescence Spectroscopy: A critical assessment*, *J. Phys. Org. Chem.* (2009) **22**, 1233-1238.

B. Hötzer, R. Ivanov, T. Brumbarova, S. Altmeier, R. Kappl, P. Bauer, G. Jung, *Determination of copper(II) ion concentration by lifetime measurements of green fluorescent protein*, eingereicht.

X. Le Guével, B. Hötzer, G. Jung, M. Schneider, *NIR-emitting fluorescent gold nanoclusters doped in silica nanoparticles*, *J. Mater. Chem.* (2010), akzeptiert.

X. Le Guével, B. Hötzer, G. Jung, K. Hollemeyer, V. Trouillet, M. Schneider, *Formation of fluorescent metal (Au, Ag) nanoclusters capped in bovine serum albumin followed by fluorescence and spectroscopy*, eingereicht.

G. Jung, A. Brockhinke, T. Gensch, B. Hötzer, S. Schwedler, S. Koyadan Veettil, *Fluorescence Lifetime of Fluorescent Proteins*, *Fluorescent Proteins: from Fundamental Research to Bioanalytics*, Springer Verlag, akzeptiert.

# Konferenzbeiträge

Vortrag: B. Hötzer, G. Jung, *Quantification of Cu(II) by FLIM, Nanosensor/Microscopy Workshop*, 26.-28. Juli 2010, Dornburg/Jena.

Vortrag: B. Hötzer, S. Altmeier, G. Jung, *Detection of copper ions by lifetime measurements of GFP*, 109. Hauptversammlung der Deutschen Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie e. V., 13.-15. Mai 2010, Bielefeld.

Poster: D. Auerbach, A. Grüter, B. Hötzer, G. Jung, *Ultrasensitive Determination of the Chromophore Formation Efficiency of GFP*, Annual Meeting of the German Biophysical Society, 3.-6. Oktober 2010, Bochum.

Poster: B. Hötzer, S. Altmeier, G. Jung, *GFP as Biosensor for Metal Ion Concentration and Redox Potential*, 108. Hauptversammlung der Deutschen Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie e. V., 21.-23. Mai 2009, Köln.

Poster: B. Hötzer, S. Altmeier, G. Jung, *GFP as Versatile Tool in Biosciences*, 11th Conference on Methods and Applications of Fluorescence: Spectroscopy, Imaging and Probes, 6.-9. September 2009, Budapest.

Poster: B. Hötzer, D. Auerbach, S. Gerharz, S. Altmeier, G. Jung, *Ultrasensitive Determination of the Chromophore Formation Efficiency of GFP*, 11th Conference on Methods and Applications of Fluorescence: Spectroscopy, Imaging and Probes, 6.-9. September 2009, Budapest.

Poster: B. Hötzer, S. Altmeier, G. Jung, *GFP as Sensor for Metal Ion Concentration and Redox Potential*, 14th International Workshop on „Single Molecule Spectroscopy and Ultrasensitive Analysis in Life Sciences“, 17.-19. September 2008, Berlin.

Poster: S. Altmeier, B. Hötzer, G. Jung, *GFP as Biosensor for Ion Concentration*, 10th Conference on Methods and Applications of Fluorescence: Spectroscopy, Imaging and Probes, 9.-12. September 2007, Salzburg.

# Literaturverzeichnis

- [1] W. E. Moerner, D. P. Fromm, *Rev. Sci. Instrum.* (2003) **74**, 3597-3619.
- [2] E. Haustein, P. Schwille, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* (2007) **36**, 151-169.
- [3] A. Kiel, J. Kovacs, A. Mokhir, R. Krämer, D. Herten, *Angew. Chem. Int. Ed.* (2007) **46**, 3363-3366.
- [4] J. La Clair, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) **94**, 1623-1628.
- [5] R. Bailey, A. Smith, S. Nie, *Physica E* (2004) **25**, 1-12.
- [6] X. Gao, Y. Cui, R. Levenson, L. Chung, S. Nie, *Nat. Biotechnol.* (2004) **22**, 969-976.
- [7] X. Michalet, F. Pinaud, L. Bentolila, J. Tsay, S. Doose, J. Li, G. Sundaresan, A. Wu, S. Gambhir, S. Weiss, *Science* (2005) **307**, 538-544.
- [8] C. A. J. Lin, T. Y. Yang, C. H. Lee, S. H. Huang, R. A. Sperling, M. Zanella, J. K. Li, J. L. Shen, H. H. Wang, H. I. Yeh, W. J. Parak, W. H. ACS *Nano* (2009) **3**, 395-401.
- [9] J. Zheng, J. T. Petty, R. M. Dickson, *J. Am. Chem. Soc.* (2003) **125**, 7780-7781.
- [10] J. Bulte, D. Kraitchman, *Nmr Biomed.* (2004) **17**, 484-499.
- [11] S. Agnihotri, N. Mallikarjuna, T. Aminabhavi, *J. Control. Release* (2004) **100**, 5-28.
- [12] K. Soppimath, T. Aminabhavi, A. Kulkarni, W. Rudzinski, *J. Control. Release* (2001) **70**, 1-20.
- [13] M. Vallet-Regi, F. Balas, D. Arcos, *Angew. Chem. Int. Ed.* (2007) **46**, 7548-7558.
- [14] Y. Rahimi, *Chromatographia* (2007) **65**, 429-433.
- [15] A. A. Deniz, T. A. Laurence, M. Dahan, D. S. Chemla, P. G. Schultz, S. Weiss, *Annu. Rev. Phys. Chem.* (2001) **52**, 233-253.
- [16] Y. Zhang, X. Guo, W. Si, L. Jia, X. Qian, *Org. Lett.* (2008) **10**, 473-476.

- [17] Y Xiang, A. Tong, *J. Lumin.* (2008) **23**, 28-31.
- [18] F. Bergstrom, I. Mikhalyov, P. Hagglof, R. Wortmann, T. Ny, L. B. A. Johansson, *J. Am. Chem. Soc.* (2002) **124**, 196-204.
- [19] D. P. Barondeau, C. J. Kassmann, J. A. Tainer, E. D. Getzoff, *J. Am. Chem. Soc.* (2001) **124**, 3522-3524.
- [20] T. Brumbarova, P. Bauer, *Plant Physiol.* (2005) **137**, 1018-1026.
- [21] M. E. Conrad, J. N. Umbreit, *Am. J. Hematol.* (2000) **64**, 287-298.
- [22] W. C. Kao, Y. R. Chen, E. C. Yi, H. Lee, Q. Tian, K. M. Wu, S. F. Tsai, S. S.-F. Yu, Y. J. Chen, R. Aebersold, S. I. Chan, *J. Biol. Chem.* (2004) **279**, 51554-51560.
- [23] R. Schmauder, F. Librizzi, G. W. Canters, T. Schmidt, T. J. Aartsma, *ChemPhysChem* (2005) **6**, 1381-1386.
- [24] N. J. Robinson, D. R. Winge, *Annu. Rev. Biochem.* (2010) **79**, 537-562.
- [25] K. W. Penfield, A. Gerwith, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* (1985) **107**, 4519-4529.
- [26] G. Peers, N. M. Price, *Nature* (2006) **441**, 341-344.
- [27] D. H. Nies, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1999) **51**, 730-750.
- [28] S. J. Lippard, J. M. Berg, *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, CA, 1994.
- [29] M. L. Kramer, H. D. Kratzin, B. Schmitt, A. Römer, O. Windl, S. Liemann, S. Hornemann, H. Kretzschmar, *J. Biol. Chem.* (2001) **276**, 16711-16719.
- [30] L. Rossi, M. F. Lombardo, M. R. Ciriolo, *Neurochem. Res.* (2004) **29**, 493-504.
- [31] E. Epstein, A. J. Bloom, *Mineral nutrition of plants: principles & perspectives*, 2nd edition. Sinauer Associates, Inc., 2004.
- [32] K. Balamurugan, W. Schaffner, *Biochim. Biophys. Acta.* (2006) **1763**, 737-746.
- [33] B. Halliwell, J. M. Gutteridge, *Biochem. J.* (1984) **219**, 1-14.
- [34] G. Borkow, J. Gabbay, *FASEB J.* (2004) **18**, 1728-1730.
- [35] H. T. Michels, W. Moran, J. Michel, *Advanced Materials & Processes* (2008) **166**, 57-58.

- [36] A. Ala, A. P. Walker, K. Ashkan, J. S. Dooley, M. L. Schilsky, *The Lancet* (2007) **369**, 397-408.
- [37] C. J. Sarell, C. D. Syme, S. E. J. Rigby, J. H. Viles, *Biochemistry* (2009) **48**, 4388-4402.
- [38] M. M. O. Peña, J. Lee, D. J. Thiele, *J. Nutr.* (1999) **129**, 1251-1260.
- [39] O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga, *J. Cell. Comp. Physiol.* (1962) **59**, 223-239.
- [40] F. H. Johnson, O. Shimomura, Y. Saiga, L. C. Gersham, G. T. Reynolds, J. R. Waters, *J. Cell. Comp. Physiol.* (1962) **60**, 85-104.
- [41] K. A. Lukyanov, A. F. Fradkov, N. G. Gurskaya, M. V. Matz, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, M. L. Markelov, A. G. Zaraisky, X. Zhao, Y. Fang, W. Tan, S. A. Lukyanov, *J. Biol. Chem.* (2000) **275**, 25879-25882.
- [42] M. Zimmer, *Chem. Soc. Rev.* (2009) **38**, 2823-2832.
- [43] H. Morise, O. Shimomura, F. H. Johnson, J. Winant, *Biochem.* (1974) **13**, 2656-2662.
- [44] O. Shimomura, *FEBS Lett.* (1979) **104**, 220-222.
- [45] M. Ormö, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, S. J. Remington, *Science* (1996) **273**, 1392-1395.
- [46] D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, M. J. Cornier, *Gene* (1992) **111**, 229-233.
- [47] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher, *Science* (1994) **263**, 802-805.
- [48] S. Inouye, F. I. Tsuji, *FEBS Letters* (1994) **341**, 277-280.
- [49] M. Ehrenberg, Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry 2008, *The green fluorescent protein: discovery, expression and development*, The Royal Swedish Academy of Sciences, 2008.
- [50] F. Yang, L. G. Moss, G. N. Phillips, *Nat. Biotechnol.* (1996) **14**, 1246-1251.
- [51] T. D. Craggs, *Chem. Soc. Rev.* (2009) **38**, 2865-2875.
- [52] B. G. Reid, G. C. Flynn, *Biochemistry* (1997) **36**, 6789-6791.
- [53] W. W. Ward, C. W. Cody, R. C. Hart, M. J. Cormier, *Photochem. Photobiol.* (1980) **31**, 611-615.

- [54] S. H. Bokman, W. W. Ward, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1981) **101**, 1372-1380.
- [55] C. W. Cody, D. C. Prasher, W. M. Westler, F. G. Prendergast, W. W. Ward, *Biochemistry* (1993) **32**, 1212-1218.
- [56] L. Zhang, H. N. Patel, J. W. Lappe, R. M. Wachter, *J. Am. Chem. Soc.* (2006) **128**, 4766-4772.
- [57] R. Heim, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994) **91**, 12501-12504.
- [58] A. B. Cubitt, R. Heim, S. R. Adams, A. E. Boyd, L. A. Gross, R. Y. Tsien, *Trends Biochem. Sci.* (1995) **20**, 448-455.
- [59] T. I. Wood, D. P. Barondeau, C. Hitomi, C. J. Kassmann, J. A. Tainer, E. D. Getzoff, *Biochemistry* (2005) **44**, 16221-16220.
- [60] R. M. Wachter, *Acc. Chem. Res.* (2007) **40**, 120-127.
- [61] H. Niwa, S. Inouye, T. Hirano, T. Matsuno, S. Kojima, M. Kubota, M. Ohashi, F. I. Tsuji, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1996), **93**, 13617-13622.
- [62] S. Kojima, H. Ohkawa, T. Hirano, S. Maki, H. Niwa, M. Ohashi, S. Inouye, F.I. Tsuji, *Tetrahedron Lett.* (1998) **39**, 5239-5242.
- [63] K. L. Litvinenko, N. M. Webber, S. R. Meech, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* (2002) **75**, 1065-1070.
- [64] K. L. Litvinenko, N. M. Webber, S. R. Meech, *Chem. Phys. Lett.*, (2001) **346**, 47-53.
- [65] N. M. Webber, K. L. Litvinenko, S. R. Meech, *J. Phys. Chem. B* (2001) **105**, 8036-8039.
- [66] R. Heim, R. Y. Tsien, *Curr. Biol.* (1996) **6**, 178-182.
- [67] H. Lossau, A. Kummer, R. Heinecke, F. Pollinger-Dammer, C. Kompa, G. Bieser, T. Jonsson, C. M. Silva, M. M. Yang, D. C. Youvan, *Chem. Phys.* (1996) **213**, 1-16.
- [68] J. Lippincott-Schwartz, E. Snapp, A. Kenworthy, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* (2001) **2**, 444-456.
- [69] R. Ando, H. Hama, M. Yamamoto-Hino, H. Mizuno, A. Miyawaki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2002) **99**, 12651-12656.
- [70] H. Tsutsui, S. Karasawa, H. Shimizu, N. Nukina, A. Miyawaki, *EMBO Reports* (2005) **6**, 233-238.

- [71] S. R. Meech, *Chem. Soc. Rev.* (2009) **38**, 2922-2934.
- [72] G. Jung, M. Werner, M. Schneider, *ChemPhysChem* (2008) **9**, 1867-1874.
- [73] J. van Thor, *Photoconversion of the Green Fluorescent Protein and related proteins, Fluorescence Lifetime of Fluorescent Proteins*, Springer Verlag, akzeptiert.
- [74] G. H. Patterson, J. Lippincott-Schwartz, *Science*, (2002) **297**, 1873-1876.
- [75] F. Langhojer, F. Dimler, G. Jung, T. Brixner, *Biophys. J.* (2009) **96**, 2763-2770.
- [76] R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* (1998) **67**, 509-544.
- [77] W. W. Ward, S. H. Bokman, *Biochemistry* (1982) **21** 4535-4540.
- [78] W. W. Ward, H. J. Prentice, A. F. Roth, C. W. Cody, S. C. Reeves, *Photochem. Photobiol.* (1982) **35**, 803-808.
- [79] J. Kahana, P. Silver, *Current protocols in molecular biology*, F. Ansabel et al. (eds.), Green and Wiley, New York, 1996.
- [80] S. Veettil, N. Budisa, G. Jung, *Biophys. Chem.* (2008) **136**, 38-43.
- [81] M. Kneen, J. Farinas, Y. Li, A. S. Verkmann, *Biophys. J.* (1998) **74**, 1591-1599.
- [82] R. B. Robey, O. Ruiz, A. V. Santos, J. Ma, F. Kear, L. J. Wang, C. J. Li, A. A. Bernardo, J. A. Arruda, *Biochemistry* (1998) **37**, 9894-9901.
- [83] R. D. Mitra, C. M. Silva, D. C. Youvan, *Gene* (1996) **173**, 13-17.
- [84] D. Klostermeier, D. P. Millar, *Methods* (2001) **23**, 240-254.
- [85] A. Miyawaki, J. Llopis, R. Heim, J. M. McCaffery, J. A. Adams, M. Ikura, R. Y. Tsien, *Nature* (1999) **388**, 882-887.
- [86] A. Miyawaki, O. Griesbeck, R. Heim, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999) **96**, 2135-2140.
- [87] P. J. Walla, *Modern Biophysical Chemistry*, Wiley-VCH, 2009.
- [88] M. Göppert-Mayer, *Annalen der Physik* (1931), **9**, 273-294.
- [89] M. Kasha, *Disc. Faraday Soc.* (1950) **9**, 14-19.
- [90] J. Franck, *Trans. Faraday Soc.* (1926) **21**, 536-542.

- [91] R. C. Hilborn, *Am. J. Phys.* (1982) **50**, 982-986.
- [92] S. J. Strickler, R. A. Berg, *J. Chem. Phys.* (1962) **37**, 814-822.
- [93] Y. Fu, J. Zhang, J. R. Lakowicz, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (2008) **376**, 712-717.
- [94] G. Jung, A. Brockhinke, T. Gensch, B. Hötzer, S. Schwedler, S. Koyadan Veettil, *Fluorescence Lifetime of Fluorescent Proteins*, Springer Verlag, akzeptiert.
- [95] D. Magde, R. Wong, P. G. Seybold, *Photochem. Photobiol.* (2002) **75**, 327-334.
- [96] D. Klostermeier, D. P. Millar, *Biopolymers* (2002) **61**, 159-179.
- [97] A. Dietrich, V. Buschmann, C. Müller, M. Sauer, *Reviews in Molecular Biotechnology* (2002) **82**, 211-231.
- [98] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd edition, Kluwer Academic, New York, 1999.
- [99] S. Weiss, *Science* (1999) **283**, 1676-1683.
- [100] L. M. Bollinger, G. E. Thomas, *Rev. Sci. Instrum.* (1961) **32**, 1044-1050.
- [101] E. Gratton, M. Limkeman, *Biophys. J.* (1983) **44**, 315-324.
- [102] J. R. Lakowicz, B. P. Maliwal, *Biophys. Chem.* (1985) **21**, 61-78.
- [103] B. Valeur, J.-C. Brochon, *New Trends in Fluorescence Spectroscopy: Applications to Chemical and Life Sciences*, Springer, 2001.
- [104] D. V. O'Connor, D. Phillips, *Time-correlated single photon counting*, Academic Press, London, 1984.
- [105] D. J. S. Birch, R. E. Imhof, *Time-domain fluorescence spectroscopy using time-correlated single-photon counting in Topics in Fluorescence Spectroscopy Vol. 1, Techniques*, ed. J. R. Lakowicz, Plenum Press, New York, 1991.
- [106] T. Salthammer, *J. Fluoresc.* (1992) **2**, 23-27.
- [107] J. N. Demas, *Excited State Lifetime Measurements*, Academic Press, New York, 1983.
- [108] W. Becker, *Advanced time-correlated single photon counting techniques*, Springer, 2005.
- [109] S. A. El-Daly, S. Hirayama, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* (1997) **110**, 59-65.

- [110] D. Bebelaar, *Rev. Sci. Instrum.* (1986) **57**, 1116-1125.
- [111] J. G. White, W. B. Amos, M. Fordham, *J. Cell. Biol.* (1987) **105**, 41-48.
- [112] M. Minsky, *Scanning* (1988) **10**, 128-138.
- [113] I. Bugiel, K. König, H. Wabnitz, *Lasers Life Sci.* (1989) **3**, 47-53.
- [114] K. König, I. Riemann, *J. Biom. Opt.* (2003) **8**, 432-439.
- [115] J. B. Pawley, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Plenum Press, New York, 1995.
- [116] J. E. Whitaker, R. P. Hangland, F. G. Prendergast, *Anal. Biochem.* (1991) **194**, 330-334.
- [117] H.-J. Lin, P. Herman, J. R. Lakowicz, *Cytometry* (2003) **52A**, 77-89.
- [118] J. A. Dix, A. S. Verkman, *Biophys. J.* (1990) **57**, 231-240.
- [119] J. R. Lakowicz, H. Szmanski, K. Nowaczyk, M. L. Johnson, *Cell. Calcium* (1992) **13**, 131-147.
- [120] J. R. Lakowicz, H. Szmanski, K. Nowaczyk, M. L. Johnson, *Cell. Calcium* (1994) **15**, 7-27.
- [121] F. S. Wouters, P. I. H. Bastiaens, *Curr. Biol.* (1999) **9**, 1127-1130.
- [122] B. Treanor, P. M. P. Lanigan, K. Suhling, T. Schreiber, I. Munro, M. A. A. Neil, D. Phillips, D. M. Davis, P. M. W. French, *J. Microsc.* (2005) **217**, 36-43.
- [123] J. Dapprich, U. Mets, W. Simm, M. Eigen, R. Riegler, *Exp. Tech. Phys.* (1995) **41**, 259-264.
- [124] A. Cramer, E. A. Whitehorn, E. Tate, W. P. C. Stemmer, *Nat. Biotechnol.* (1996) **14**, 315-319.
- [125] Y. Tao, P. K. Rao, S. Bhattacharjee, S. B. Gelvin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2004) **101**, 5164-5169.
- [126] M. D. Curtis, U. Grossniklaus, *Plant Physiol.* (2003) **133**, 462-469.
- [127] G. Jung, *Praktikumsskript Bioanalytik, Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, Technische Biochemie, Biophysikalische Chemie*, Universität des Saarlandes, 2010.

- [128] A. Minta, J. P. Kao, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* (1989) **264**, 8171-8178.
- [129] A. P. Demchenko, *J. Fluoresc.* (2010) **20**, 1099-1128.
- [130] S. Voss, A. Skerra, *Prot. Engin.* (1997) **10**, 975-982.
- [131] A. Demchenko, *Introduction to Fluorescence Sensing*, Springer Verlag, 2008.
- [132] *FluoFit, User's Manual and Technical Data*, Version 4.2, Picoquant.
- [133] M. Koneswaran, R. Narayanaswamy, *Sensors and Actuators B: Chemicals* (2009) **139**, 104-109.
- [134] S. Lai, X. Chang, C. Fu, *Microchim. Acta* (2009) **165**, 39-44.
- [135] A. Zanganeh, M. Amini, *Sensors and Actuators B: Chemicals* (2009) **135**, 358-365.
- [136] N. Aksuner, E. Hendren, I. Yilmaz, A. Cukurovali, *Sensors and Actuators B: Chemicals* (2008) **134**, 510-515.
- [137] M. Yildirim, J. Kaya, *J. Fluoresc.* (2010) **20**, 771-777.
- [138] G. R. Xu, Y. Yuan, S. Kim, J. J. Lee, *Electroanalysis* (2008) **20**, 1690-1695.
- [139] L. A. Gross, G. S. Baird, R. C. Hoffman, K. K. Baldrige, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) **97**, 11990-11995.
- [140] P. Eli, A. Chakrabartty, *Protein Science* (2006) **15**, 2442-2447.
- [141] Y. Rahimi, A. Goulding, S. Shrestha, S. Mirpuri, S. K. Deo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2008) **370**, 57-61.
- [142] J. P. Sumner, N. M. Westerberg, A. K. Stoddard, T. K. Hurst, M. Cramer, R. B. Thompson, C. A. Fierke, R. Kopelman, *Biosens. Bioelectron.* (2006) **21**, 1302-1308.
- [143] A. D. Kummer, J. Wiehler, H. Rehaber, C. Kompa, B. Steipe, M. E. Michel-Beyerle, *J. Phys. Chem. B* (2000) **104** 4791-4798.
- [144] M. A. Lill, V. Helms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2002) **99**, 2778-2781.
- [145] J. N. Henderson, R. Gepshtein, J. R. Heenan, K. Kallio, D. Huppert, S. J. Remington, *J. Am. Chem. Soc.* (2009) **131**, 4176-4177.
- [146] G. Jung, J. Wiehler, A. Zumbusch, *Biophys. J.* (2005) **88**, 1932-1947.
- [147] G. Jung, A. Zumbusch, *Microsc. Res. Tech.* (2006) **69**, 175-185.

- [148] M. Chatteraj, B. A. King, G. U. Bublitz, S. G. Boxer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1996) **93**, 8362-8367.
- [149] T. A. Richmond, T. T. Takahashi, R. Shimkhada, J. Bernsdorf, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2000) **268**, 462-465.
- [150] N. Tansila, K. Becker, C. I. Na-Ayudhya, V. Prachayasittikul, L. Bülow, *Biotechnol. Lett.* (2008) **30**, 1391-1396.
- [151] E. W. Wilson, M. H. Kasperian, R. B. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* (1970) **92**, 5365-5372.
- [152] M. R. Eftink, C. Ghiron, *Anal. Biochem.* (1981) **114**, 199-227.
- [153] C. Isarankura-Na-Ayindhyn, T. Tantimongcolwat, H. J. Galla, V. Prachayasittihad, *Biol. Trace Elem. Res.* (2010) **134**, 352-363.
- [154] E. G. Guignet, R. Hovius, H. Vogel, *Nat. Biotechnol.* (2004) **22**, 440-444.
- [155] S. Doose, H. Neuweiler, M. Sauer, *ChemPhysChem* (2009) **10**, 1389-1398.
- [156] J. T. Edsall, G. Felsenfeld, D. S. Goodman, F. R. N. Gurd, *J. Am. Chem. Soc.* (1954) **76**, 3054-3061.
- [157] M. Zimmer, *Chem. Rev.* (2002) **102**, 759-781.
- [158] R. E. Dale, J. Eisinger, W. E. Blumberg, *Biophys. J.* (1979) **26**, 161-194.
- [159] K. Suhling, J. Siegel, D. Phillips, P. M. W. French, S. Lévêque-Fort, S. E. D. Webb, D. M. Davis, *Biophys. J.* (2002) **83**, 3589-3595.
- [160] C. Petersen, L. B. Møller, *Gene* (2000) **261**, 289-298.
- [161] D. Magde, E. Elson, W. W. Webb, *Phys. Rev. Lett.* (1972) **29**, 705-708.
- [162] P. Schwille, F. J. Meyer-Almes, R. Rigler, *Biophys. J.* (1997) **72**, 1878-1886.
- [163] B. Hötzer, R. Ivanov, T. Brumbarova, S. Altmeier, R. Kappl, P. Bauer, G. Jung, *Determination of copper(II) ion concentration by lifetime measurements of green fluorescent protein*, eingereicht.