

Detektion von Nickel- und Cobaltspezies in einzelnen lebenden Zellen mit hoher lateraler Auflösung

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg–Universität in Mainz

Yvonne Scheller
geb. am 30.09.1980 in Ludwigshafen

Mainz, Oktober 2012

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:17.10.2013

Zusammenfassung

Übergangsmetallen wie Nickel und Cobalt kommt meist eine große Bedeutung als Cofaktor in Enzymen oder Metallkomplexen im Metabolismus von Lebewesen zu. Da eine sehr geringe Konzentration dieser Übergangsmetalle in einer Zelle für deren Funktionalität ausreicht, ist eine konstante Konzentration der Spurenelemente in einer Zelle angestrebt. Durch meist anthropogene Einflüsse sind Pflanzen und Menschen zunehmend hohen Konzentrationen von Übergangsmetallen ausgesetzt, die in Abhängigkeit von ihrer Spezies, der Konzentration und der Lokalisation unterschiedliche Toxizitäten aufweisen können. Die Speziation von Metallen wurde bisher mittels gängiger Analyseverfahren, wie der ICP-MS und ähnlicher Verfahren, anhand von *bulk*-Material durchgeführt. Durch die Entwicklung von optischen Sensoren für Metallionen war es möglich, diese Metalle auch in lebenden Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie zu lokalisieren. Ke und Kollegen (2006, 2007) nutzten einen solchen optischen Sensor – Newport Green DCF, um die Aufnahme von Nickel in humane A543 Lungenbronchialepithelzellen nach Inkubation mit dem wasserlöslichen NiCl_2 (0,5 mM und 1 mM) sowie den wasserunlöslichen Verbindungen Ni_3S_2 ($0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und NiS ($2,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) nachzuweisen und zu lokalisieren und konnten damit eine Akkumulation von Nickel im Zytoplasma und im Zellkern aufzeigen. Dabei war bei wasserlöslichen und wasserunlöslichen Nickelverbindungen Nickel nach 24 h im Zytoplasma und erst nach 48 h im Zellkern zu beobachten.

Da Nickel und Cobalt keine detektierbare Eigenfluoreszenz unter den gegebenen Bedingungen zeigten, wurde für den optischen Nachweis von Nickel und Cobalt mit dem konfokalen Laser-Raster Mikroskop (CLSM) nach der Zugabe der verschiedenen wasserlöslichen und wasserunlöslichen Metallverbindungen NiCl_2 , NiSO_4 , Ni_3S_2 und CoCl_2 in einzelnen lebenden humanen Gingiva-Fibroblasten, sowie in Pflanzenzellen in dieser Arbeit ebenfalls der optische Sensor Newport Green DCF genutzt. Korrespondierend zu den Ergebnissen früherer Arbeiten von Ke *et al.* (2006, 2007), in denen die Nickelaufnahme bei Konzentrationen von $>0,5 \text{ mM NiCl}_2$ bzw. $>0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ Ni}_3\text{S}_2$ gezeigt wurde, wurde Nickel in Fibroblasten in Abhängigkeit von der Spezies mit steigender Metallkonzentration von $100 \mu\text{M}$ bis $500 \mu\text{M}$ nach 16 h im Zytoplasma und zunehmend nach 24 h bis 48 h im Zellkern detektiert. Bei der wasserunlöslichen Verbindung

Ni_3S_2 war der Nachweis von Nickel im Zellkern bereits nach 16 h bis 24 h erfolgreich. Zusätzlich wurden weitere Strukturen wie das Endoplasmatische Retikulum, die Mitochondrien und die Nukleoli durch eine starke Fluoreszenz des optischen Sensors bei Colokalisationsexperimenten mit Organell-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen als *target* für die Nickelbindung vermutet. Die Lokalisation von Cobalt in den Fibroblasten entsprach weitgehend der Lokalisation von Nickel. Im Zellkern war die Cobaltlokalisation jedoch auf die Nukleoli beschränkt. Weiterführende Versuche an humanen Gingiva-Fibroblasten zeigten, dass die Aufnahme der Metalle in die Fibroblasten pH-Wert abhängig war. Niedrige pH-Werte im sauren pH-Bereich verringerten die Aufnahme der Metalle in die Zellen, wobei ein pH-Wert im basischen Bereich keinen bedeutenden Unterschied zum neutralen pH-Bereich aufwies. Im Vergleich zu den Fibroblasten war in Pflanzenzellen zu jedem Zeitpunkt, auch bei geringen Konzentrationen der Metallverbindungen sowie des optischen Sensors, Nickel und Cobalt in den Zellkernen detektierbar. Durch die Eigenschaft der Pflanzenzellen eine Vakuole zu besitzen, war Nickel und Cobalt hauptsächlich in den Vakuolen lokalisiert. Weitere Strukturen wie das Endoplasmatische Retikulum, die Mitochondrien oder auch die Zellwand kamen bei Pflanzenzellen als *target* in Frage.

Die Fluoreszenz und Lokalisation der Metalle in den Fibroblasten waren unabhängig von der Spezies sehr ähnlich, sodass in den Zellen die Spezies anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen kaum unterschieden werden konnten. λ -Scans in verschiedenen *regions of interest* (ROI) wurden durchgeführt, um durch die Fluoreszenzspektren Hinweise auf eine charakteristische Beeinflussung der Bindungspartner von Nickel und Cobalt oder dieser Metalle selbst in den Zellen auf den optischen Sensor zu bekommen und diese dadurch identifizieren zu können. Das Ziel der parallelen Detektion bzw. Lokalisation und gleichzeitigen Speziation bestimmter Nickel- und Cobaltpezies in einzelnen lebenden Zellen konnte in dieser Arbeit durch den optischen Sensor Newport Green DCF nicht erreicht werden.

Summary

Transition metals like nickel and cobalt are very important cofactors in enzymes or metall complexes. Distinct transition metals are essential for the metabolism of nearly all organisms. Because of their efficiency at lowest concentrations, a constant level of transitions metals is aspired. The consequence of an accumulation of transition metals for humans or plants depends on the species, the concentration and the localization inside the cell. Common analytical methods in metal speciation like the ICP-MS use bulk material, but the development of optical probes for transition metals allows the detection of metals in living cells by fluorescence microscopy. Newport Green DCF is one of these optical sensors which allows Ke and colleagues (2006, 2007) to detect nickel in the cytoplasm and the nucleus of human lung bronchoepithelial A543 cells after the incubation with the water soluble NiCl_2 (0,5 mM und 1 mM) and the water insoluble Ni_3S_2 ($0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) and NiS ($2,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Nickel was detected in the cytoplasm after 24 h and first after 48 h in the nucleus in both water soluble and water insoluble nickel species.

Because of non-detectable auto fluorescence of nickel and cobalt under the given conditions the optical probe Newport Green DCF was also used to detect nickel and cobalt in single living human gingiva fibroblasts and plant cells with confocal laser scanning microscopy (CLSM) after addition of the different water soluble and insoluble heavy metal species NiCl_2 , NiSO_4 , Ni_3S_2 and CoCl_2 . Corresponding to results from Ke and colleagues (2006, 2007), where the nickel uptake at concentrations of $>0,5 \text{ mM NiCl}_2$ respectively $>0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ Ni}_3\text{S}_2$ was described, nickel was detected in the cytoplasm and the nucleus after 24 h up to 48 h according to the species, enhanced metal concentration ($100 \mu\text{M}$ up to $500 \mu\text{M}$) and incubation time. The incubation with the water soluble species Ni_3S_2 resulted in nickel detection in the nucleus after 16 h up to 24 h. Additionally, the endoplasmic reticulum, the mitochondria and the nucleoli are considered to be targets for nickel binding. The localization of cobalt in the fibroblasts is nearly identical with the localization of nickel beside the nucleus, where cobalt is limited to the nucleolus. Further experiments on human gingiva fibroblasts indicate a pH dependent uptake of metals in human cells. At acidic pH values the heavy metal uptake decreases in contrast to alkaline pH values, where there are no differences compared to neutral pH value. In comparison to fibroblasts nickel

and cobalt in plant cells are detectable in the nucleus at early incubation times and even at low metal and dye concentrations. Additionally a main part of nickel and cobalt are localized in the vacuoles and further structures like the endoplasmic reticulum, mitochondria or the cell wall are considered to be targets for nickel and cobalt binding in plant cells too.

The fluorescence and the localization of the transition metals nickel and cobalt in fibroblasts are similar, independent of the species, so the species can rarely be distinguished by confocal laser scanning microscope (CLSM) images. For that reason λ -scans in different regions of interest (ROI) inside a cell were accomplished to get hints for a characteristic influence of the binding complexes of nickel and cobalt or of these metals itself to the optical probe to identify different species or complexes. The objective of parallel localization and speciation of nickel and cobalt in single living cells could not be achieved.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Summary	iii
Abkürzungsverzeichnis	xii
1 Einleitung	1
1.1 Metalle in der Umwelt und im Organismus	1
1.2 Essentielle Metalle – Mangel und Überdosis	3
1.3 Die Übergangsmetalle	5
1.3.1 Das Übergangsmetall Nickel	5
1.3.1.1 Nickelvorkommen in der Natur	5
1.3.1.2 Auswirkungen der Nিকেlexposition auf die Pflanzen- und Tierwelt	6
1.3.1.3 Auswirkungen der Nিকেlexposition auf den Menschen	7
1.3.2 Das Übergangsmetall Cobalt	9
1.3.2.1 Cobaltvorkommen in der Natur	9
1.3.2.2 Auswirkungen der Cobaltexposition auf die Pflanzen- und Tierwelt	10
1.3.2.3 Auswirkungen der Cobaltexposition auf den Menschen	10

1.3.3	Aufnahme von Metallen in die Zelle	11
1.4	Aufbau eukaryontischer Zellen	12
1.4.1	Transportproteine	13
1.4.2	Aufrechterhaltung der Homöostase von Metallionen in Zellen	16
1.4.3	Kompartimentierung in eukaryontischen Zellen	17
1.4.4	Fibroblasten	19
1.4.5	Pflanzenzellen	20
1.5	Nachweis von Metallen in Zellen	21
1.5.1	Nachweis von Metallen in <i>bulk</i> -Material	21
1.5.2	Nachweis von Metallen in der Zelle durch Fluoreszenz	22
1.5.2.1	Optische Sensoren für Kationen in Zellen	24
1.5.2.2	Optische Sensoren basierend auf Dichlorofluorescein (DCF)	25
1.6	Zielsetzung	27
2	Material und Methoden	29
2.1	Allgemeine Laborgeräte und Reagenzien	29
2.1.1	Allgemeine Laborgeräte	29
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	30
2.1.3	Chemikalien	30
2.1.4	Zellkulturmedien und Medienzusätze	31
2.1.5	Fluoreszenzfarbstoffe	32
2.2	Zellbiologische Methoden	33
2.2.1	Verwendete Zellen	33
2.2.1.1	Humane Gingiva-Fibroblasten	33

2.2.1.2	Pflanzenzellen aus <i>Catharanthus roseus</i>	33
2.2.2	Kultivierung von Zellen	33
2.2.2.1	Anlage humaner adhärenter Zellen	33
2.2.2.2	Anlage pflanzlicher Suspensionszellen	35
2.2.3	Kryokonservierung und Reaktivierung humaner Gingiva-Fibroblasten	35
2.3	Konfokale Laser Raster Mikroskopie (CLSM)	36
2.3.1	Aufbau und Komponenten des CLSM Leica TCS SP2	38
2.3.2	CLSM-Einstellungen zur Visualisierung von Zellen	42
2.3.3	Fluoreszenzanalyse mittels λ -Scan	42
2.4	Der optische Sensor Newport Green DCF	44
2.4.1	Markierung von Nickel und Cobalt in humanen Gingiva-Fibroblasten mit Newport Green DCF	46
2.4.2	Markierung von Ni und Co in Pflanzenzellen von <i>Catharanthus roseus</i> mit Newport Green DCF	47
2.5	Biochemische Methoden zur Visualisierung verschiedener Organellen	48
2.5.1	Zellkernmarkierung mit Hoechst 33342	48
2.5.1.1	Zellkernmarkierung in humanen Gingiva-Fibroblasten	49
2.5.1.2	Zellkernmarkierung in Pflanzenzellen	49
2.5.2	Nukleinsäuremarkierung in Pflanzenzellen mit SYTO 61	50
2.5.3	Membranmarkierung in humanen Gingiva-Fibroblasten mit CellMask deep red	50
2.5.4	Markierung des ER in humanen Gingiva-Fibroblasten mit ER-Tracker red	51
2.5.5	Markierung des Golgi-Apparates in humanen Gingiva-Fibroblasten mit Bodipy TR	52

2.5.6	Markierung von Pflanzenzellen mit Vybrant Dil	53
3	Ergebnisse	55
3.1	Nickel- und Cobaltdetektion in humanen Gingiva-Fibroblasten	55
3.1.1	Analyse der Eigenfluoreszenz von Nickel- und Cobaltverbindungen	56
3.1.2	Eigenfluoreszenz der humanen Gingiva-Fibroblasten	57
3.1.3	Berechnung der relativen Fluoreszenzintensitäten	59
3.1.4	Einfluss unterschiedlicher Metallkonzentrationen und Inkubationszeiten auf die Newport Green DCF-Fluoreszenz und Lokalisation	60
3.1.4.1	Aufnahme von Nickel in humane Gingiva-Fibroblasten während NiCl ₂ -Exposition	60
3.1.4.2	Aufnahme von Nickel in humane Gingiva-Fibroblasten während NiSO ₄ -Exposition	68
3.1.4.3	Aufnahme von Nickel in humane Gingiva-Fibroblasten während Ni ₃ S ₂ -Exposition	75
3.1.4.4	Aufnahme von Cobalt in humane Gingiva-Fibroblasten während CoCl ₂ -Exposition	84
3.1.4.5	Aufnahme von Nickel in humane Gingiva-Fibroblasten bei 40 µM NiCl ₂ im Medium	91
3.1.5	Nickel- und Cobaltaufnahme in humane Gingiva-Fibroblasten in Abhän- gigkeit des pH-Werts des BME-Mediums	93
3.1.6	Zuordnung der Nickel- und Cobaltlokalisierung durch Newport Green DCF zu ausgewählten Zellkompartimenten	97
3.1.7	Fluoreszenzspektren von Newport Green DCF in BME-Medium	100
3.1.8	Fluoreszenzspektren von Newport Green DCF in humanen Gingiva- Fibroblasten	101

3.1.8.1	Fluoreszenzspektren von Newport Green DCF nach NiCl ₂ - Inkubation	104
3.1.8.2	Fluoreszenzspektren von Newport Green DCF nach NiSO ₄ - Inkubation	107
3.1.8.3	Fluoreszenzspektren von Newport Green DCF nach Ni ₃ S ₂ - Inkubation	109
3.1.8.4	Fluoreszenzspektren von Newport Green DCF nach CoCl ₂ - Inkubation	110
3.2	Nickel- und Cobaltdetektion in Pflanzenzellen von <i>Catharanthus roseus</i>	112
3.2.1	Eigenfluoreszenz der Pflanzenzellen von <i>Catharanthus roseus</i>	113
3.2.2	Einfluss unterschiedlicher Inkubationszeiten von Nickel- und Cobaltver- bindungen auf die Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF und dessen Lokalisation	114
3.2.2.1	Aufnahme von Nickel in Pflanzenzellen von <i>Catharanthus ro- seus</i> während NiCl ₂ -Exposition	115
3.2.2.2	Aufnahme von Nickel in Pflanzenzellen von <i>Catharanthus ro- seus</i> während NiSO ₄ -Exposition	117
3.2.2.3	Aufnahme von Nickel in Pflanzenzellen von <i>Catharanthus ro- seus</i> während Ni ₃ S ₂ -Exposition	119
3.2.2.4	Aufnahme von Cobalt in Pflanzenzellen von <i>Catharanthus ro- seus</i> während CoCl ₂ -Exposition	120
3.2.2.5	Aufnahme von Nickel in Pflanzenzellen von <i>Catharanthus ro- seus</i> während kurzer Inkubationszeiten mit NiCl ₂	123
3.2.3	Zuordnung der Nickel- und Cobaltlokalisierung durch Newport Green DCF zu ausgewählten Zellkompartimenten	124
4	Diskussion	127
4.1	Auswahl der Methode zur optimalen Detektion von Nickel und Cobalt in einzelnen lebenden Zellen	128

4.1.1	Sind Nickel und Cobalt in Zellen durch Eigenfluoreszenz der Metalle mit dem CLSM detektierbar?	128
4.1.2	Der optische Sensor Newport Green DCF für den Nachweis von Nickel und Cobalt	129
4.1.3	Auswirkung der Kationenkonzentration in humanen Gingiva-Fibroblasten auf die Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF	131
4.2	Nachweis von Nickel und Cobalt in humanen Gingiva-Fibroblasten	132
4.2.1	Einfluss unterschiedlicher Metallkonzentrationen und Inkubationszeiten auf deren Aufnahme in humane Gingiva-Fibroblasten und die Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF	132
4.2.2	Nickel- und Cobaltaufnahme in humane Gingiva-Fibroblasten in Abhängigkeit vom pH-Wert des Inkubationsmediums	140
4.2.3	Lokalisation von Nickel und Cobalt in verschiedenen Kompartimenten humaner Gingiva-Fibroblasten und deren Auswirkung auf die Zellen . . .	142
4.2.4	Speziation von Nickel- und Cobaltverbindungen durch Newport Green DCF-Spektren ausgewählter ROIs in Fibroblasten	148
4.3	Nachweis von Nickel und Cobalt in Pflanzenzellen von <i>Catharanthus roseus</i> . . .	151
4.3.1	Einfluss unterschiedlicher Inkubationszeiten von Nickel- und Cobaltverbindungen auf die Fluoreszenz von Newport Green DCF in Pflanzenzellen von <i>Catharanthus roseus</i>	151
4.3.2	Lokalisation von Nickel und Cobalt in Pflanzenzellen von <i>Catharanthus roseus</i>	154
4.4	Vergleich der Nickel- und Cobaltaufnahme und deren Lokalisation zwischen humanen Gingiva-Fibroblasten und <i>Catharanthus roseus</i> -Zellen	156
4.5	Vor- und Nachteile des optischen Sensors Newport Green DCF und der CLSM bei der Detektion von Metallspezies in einzelnen lebenden Zellen	158
4.6	Lokalisation von Metallen in lebenden Zellen durch alternative Methoden	160
4.7	Fazit und Ausblick	161

Inhaltsverzeichnis	xi
Literaturverzeichnis	164
Poster und Vorträge	187
Eidesstattliche Versicherung	189

Abkürzungsverzeichnis

A

A	Adenin
AAS	<i>Atom Absorptions Spektrometrie</i>
AFM	<i>atomic force microscopy</i>
Ag	Silber
AOBS	<i>acousto optical beam splitter</i>
AOTF	<i>acousto optical tuneable filter</i>
Ar	Argon
As	Arsen
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AtIREG1	<i>Arabidopsis thaliana iron-regulated protein 1</i> , deutsch: Eisen-reguliertes Protein 1 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AtRGT1	<i>Arabidopsis thaliana iron-regulated transporter 1</i> , deutsch: Eisen-regulierter Transporter 1 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>

B

Ba	Barium
B	Bor
BME	Basalmedium Eagles
Br	Brom
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , deutsch: Rinderserumalbumin

C

Ca	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
C	Cytosin
C	Kohlenstoff
Cd	Cadmium

CDF	<i>cation diffusion facilitator</i> , deutsch: Protein zur erleichterten Kationendiffusion
°C	Grad Celsius
Ch	Chloroplast
Cl	Chlor
CLSM	<i>confocal laser scanning microscope</i> , deutsch: Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie
cm ²	Quadratcentimeter
Cm	Curium
CO ₂	Kohlendioxid
CoCl ₂	Cobaltchlorid
Co	Cobalt
COPT1	<i>copper transporter 1</i> , deutsch: Kupfer-Transporter 1
CorA	Mg ²⁺ -Transporter
CP	Zytoplasma
Cr	Chrom
CS	Zytosol
Cu	Kupfer

D

DCAA	<i>2,4-dichlorophenoxyacetic acid</i> , deutsch: 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
DCF	Dichlorfluorescein
DCT1	<i>divalent cation transporter 1</i> , deutsch: Transporter 1 für divalente Kationen
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT1	<i>divalent metal transporter 1</i> , deutsch: Transporter 1 für divalente Metalle
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , deutsch: Desoxyribonukleinsäure

E

EDS	<i>energy dispersive spectroscopy</i> , deutsch: Energiedispersive Spektroskopie
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> , deutsch: Ethylendiamintetraessigsäure
EDX	<i>energy dispersive X-ray spectroscopy</i> , deutsch: Energiedispersive Röntgenspektroskopie
Em-Max	Emissionsmaximum
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Eu	Europium
Ex-Max	Extinktionsmaximum/Anregungsmaximum

F

FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , deutsch: Durchflusszytometrie
------	-------	--

FBS *fetal bovine serum*, deutsch: Fetales Rinderserum

FCS *fetal calves serum*, deutsch: Fetales Kälberserum

Fe Eisen

F Fluor

G

×g Erdbeschleunigung

G Guanin

g Gramm

H

H₂O Wasser

HCl Salzsäure

He Helium

HEPES N'-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2 Ethansulfonsäure

Hg Quecksilber

H Wasserstoff

$h\nu_f$ Energie eines Fluoreszenzphotons

$h\nu$ Energie eines Photons

HoxN Nickeltransportprotein

HPLC *high performance liquid chromatography*, deutsch: Hochleistungsflüssigkeitsschromatographie

Hz Frequenz, Längswelle⁻¹

I

ICP-MS *inductively coupled plasma - mass spectrometry*, deutsch: Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma

ICP-OES *inductively coupled plasma - optical emission spectrometry*, deutsch: Optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma

I Iod

IRT1 *iron-regulated transporter 1*, deutsch: Eisen-regulierter Transporter 1

K

kg Kilogramm

K Kalium

L

λ Wellenlänge Lambda

LCS *Leica Confocal Software*

l Liter

LOESS *locally weighted scatterplot smoothing*, deutsch: lokales Glättungsverfahren für Streudiagramme

LS-Medium ... Linsmaier & Skoog-Medium

M

MeHg Methylquecksilber

MgCl₂ Magnesiumchlorid

Mg Magnesium

mg Milligramm

Mi Mitochondrion

min Minute

ml Milliliter

M Kernmembran

m Meter

mM Millimol

mm Millimeter

Mn Mangan

Mo Molybdän

mRNA *messenger ribonucleic acid*, deutsch: *messenger* Ribonukleinsäure

ms Millisekunde

μg Mikrogramm

μl Mikroliter

μM Mikromol

μm Mikrometer

mVal Millival; Val: alte Einheit der Stoffmenge

N

N-CAM *neuronal cell adhesion molecule*

NAA *1-naphtylacetic acid*, deutsch: 1-Naphthylelessigsäure

NA Nicotinamin

Na Natrium

NaOH Natronlauge

Ne Neon

ng Nanogramm

Ni₃S₂ Nickelsubsulfid

NiCl₂ Nickelchlorid

NiCoT Ni/Co-Transporter

Ni Nickel

NiS	Nickelsulfid
NiSO ₄	Nickelsulfat
Nk	Nukleolus
nm	Nanometer
N	Stickstoff
NP-40	Nonidet P-40
Nramp2	<i>natural resistance associated macrophage protein 2</i> , deutsch: Makrophagenprotein 2 der natürlichen Resistenz zugehörig

 O

O Sauerstoff

 P

Pb	Blei
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , deutsch: Phosphat gepufferte Saline
pg	Picogramm
PM	Plasmamembran
PMT	<i>photo multiplier tube</i> , deutsch: Photoelektronenvervielfacher
P	Ni ₃ S ₂ -Partikel
P	Phosphor
ppm	<i>parts per million</i> , deutsch: Teile von einer Million

 R

Rb	Rubidium
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , deutsch: Ribonukleinsäure
ROI	<i>region of interest</i> , deutsch: Bereich von Interesse
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , deutsch: Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur

 S

S ₀	Grundzustand eines Fluorophores
S ₁	Singulettzustand 1; angeregter Zustand eines Fluorophores
S ₂	Singulettzustand 2; angeregter Zustand eines Fluorophores
Se	Selen
Si	Silitium
SNOM	<i>scanning near-field optical microscope</i> , deutsch: Optisches Rasternahfeldmikroskop
Sn	Zinn
S	Schwefel

T	
Ti	Titan
TOF	<i>time of flight</i> , deutsch: Flugzeit
TRLFS	<i>time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy</i> , deutsch: Zeitaufgelöste Laser-Fluoreszenzspektroskopie
T	Thymin
T	Tonoplast
t	Tonne

U	
UO ₂ ²⁺	Uranyl
UpM	Umdrehungen pro Minute
UreH	Nickeltransportprotein
U	Units
U	Uran
UV	Ultra Violett

V	
% v/v	Volumenverhältnis
V-ATPase	vakuoläre ATPase
Va	Vakuole
VitB1	Vitamin B1, Thiamin-Hydrochlorid
V	Vanadium
V	Vesikel
V	Volt

W	
W	Wolfram

X	
XAS	<i>X-ray absorption spectroscopy</i> , deutsch: Röntgenabsorptionsspektroskopie
XRF	<i>X-ray fluorescence analysis</i> , deutsch: Röntgenfluoreszenzanalyse

Z	
ZIP	<i>Zrt- and Irt-related protein</i>
ZK	Zellkern
ZnSO ₄	Zinksulfat
Zn	Zink
ZW	Zellwand

Kapitel 1

Einleitung

Übergangsmetalle sind für den Metabolismus jeden Organismus von Bakterien, Pflanzen bis hin zum Menschen von großer Bedeutung. Sie übernehmen vielfältige Aufgaben in zahlreichen Stoffwechselwegen, können aber einem Organismus bei zu hoher intrazellulärer Konzentration oder in einer bestimmten Metallverbindung schaden. Die Aufnahme der Metalle in Zellen, ihre Aufgaben und Folgen der Akkumulation in den Zellen, sowie Nachweisverfahren für Metalle werden im Folgenden aufgeführt.

1.1 Metalle in der Umwelt und im Organismus

Der Boden ist für viele Mikroorganismen und Bodenlebewesen wie Würmer, Pilze und Pflanzen ein wichtiger Lebensraum. Er dient als Wasserspeicher, der die Organismen mit notwendigen Mineralien und Spurenelementen versorgt, zu denen bestimmte Metalle und Schwermetalle zählen. Diese übernehmen insbesondere die Funktion eines Cofaktors für Enzyme oder sind Bestandteil organischer Komplexe. Beispiele hierfür sind Eisen (Fe) im Hämoglobin, Magnesium (Mg) im Chlorophyll, Cobalt (Co) in Cobalamin, Nickel (Ni) in dem Enzym Urease und der Ni-Fe-Hydrogenase sowie Zink (Zn) in der Superoxid-Dismutase, RNA-Polymerase (RNA, *ribonucleic acid*) und in Zinkfinger-Proteinen zur Faltung von Polypeptidketten. Die Spurenelemente müssen dafür zunächst in die Lebewesen und in die Zellen aufgenommen werden. Diese Metalle sind im Boden oft schwer verfügbar, da sie an Kristallgitter gebunden sind. Unterschiedliche Faktoren wie Azidität, Feuchtigkeit oder Bodentextur beeinflussen die Verfügbarkeit von Metallen für Organismen (Babich und Stotzky, 1982; Soon und Bates, 1982; McIlveen und Negusanti, 1994). Die Metalle, die im Boden und Grundwasser gelöst sind, werden von Bodenorganismen und Pflanzen über spezifische Transporter in der Plasmamembran aufgenommen. Durch Umwelteinflüsse wie z.B. vulkanische Eruptionen oder durch anthropogene Einflüsse wie Industrie, Bergbau

oder Verbrennung fossiler Brennstoffe, reichern sich höhere Konzentrationen an Metallen und Schwermetallen im Boden an. Da Pflanzen kontaminiertem Boden direkt ausgesetzt sind, können sich zu hohe Konzentrationen an Metallen in einem Organismus anreichern und toxisch wirken. Bei Nickel liegt das kritische Level für sensitive Pflanzen bei 10 mg/kg Trockenmasse (Kozlov, 2005). Aber auch chemischen Prozesse, die den Oxidationszustand oder die Spezies dieser Metalle verändern, können die Toxizität eines Metalles ändern, denn die Toxizität eines Metalls kann mit seiner Spezies variieren. Ein bekanntes Beispiel dafür ist das Quecksilber (Hg), das durch Bakterien oder Pilze methyliert wird (Jensen und Jernelöv, 1969; Schröder und Mitchener, 1975; Fischer *et al.*, 1995). Die daraus resultierende lipophile Eigenschaft bewirkt, dass Methylquecksilber (MeHg) stärker in Säugetieren akkumuliert wird als anorganisches Quecksilber und weist dadurch eine sehr hohe Toxizität auf. Kommt es, bedingt durch Luftverschmutzung, insbesondere durch säurebildende Industrie- oder Autoabgase, zu „saurem Regen“, ändern sich die pH-Werte im Boden in den sauren Bereich, wodurch bestimmte Metalle wie Nickel leichter von Bodenpartikeln gelöst werden können. Diese gelangen dadurch vermehrt ins Grundwasser, wo sie für Pflanzen oder Bodenorganismen verfügbar werden, was bei einer zu hohen Konzentration zu einer Schädigung der Pflanzen führen kann (Crooke *et al.*, 1955; Crooke, 1955; Crooke, 1956; Soon und Bates, 1982).

Einige Pflanzen haben eine Strategie entwickelt, um sich vor den toxischen Schwermetallen oder Übergangsmetallen bzw. vor zu hohen intrazellulären Konzentrationen dieser Metalle zu schützen. Sie produzieren z.B. organische Säuren (Krämer *et al.*, 1996) und bestimmte Peptide, sog. Phytochelatine oder Metallothioneine (Steffens, 1990; Rauser, 1999), die die Metalle binden. Je nach Pflanzenart werden diese Komplexe aus Protein und Metall dann in unterschiedlichen Regionen des Pflanzenhabitus gelagert, sodass die Metallionen für den Metabolismus unzugänglich und somit unschädlich werden. Die häufigsten Lagerstätten im Habitus sind die Wurzeln oder die Blätter. Innerhalb einer Zelle sind es meist die Vakuolen, die als Lagerstätte für diese Komplexe aus organischen Säuren und Metallen dienen. Dieser Mechanismus verleiht den Pflanzen ein gewisses Maß an Schwermetalltoleranz.

Es existieren etwa 450 Pflanzenarten, die besonders hohe Konzentrationen von (Schwer)metallionen in ihrem Habitus speichern können und damit zu den sog. Hyperakkumulatoren zählen. Etwa 75 % davon sind Nickelhyperakkumulatoren, darunter einige Vertreter der Gattung *Alyssum* und *Thlaspi*, die in ihren oberirdischen Pflanzenteilen mehr als 10000 ppm Nickel akkumulieren (Jaffre *et al.*, 1976; Brooks *et al.*, 1977; Jaffre *et al.*, 1979; Asemaneh *et al.*, 2006). Normale Pflanzen enthalten Nickelkonzentrationen zwischen 0,1 ppm und 5 ppm (Mitchell, 1945). Diese Hyperakkumulatoren haben besondere Mechanismen zur Detoxifizierung entwickelt (Ingle *et al.*, 2005; Ingle *et al.*, 2008). Zusätzlich zur verstärkten Bildung von Phytochelatinen (Zenk, 1996), Metallothioneinen, Glutathion (Freeman *et al.*,

2004) oder weiteren Komplexbildnern, die die Metallionen binden und als Komplex in Vakuolen speichern, werden bis zu 70 % der Metalle im Apoplasten zumeist an Calcium (Ca)-Bindestellen gebunden (Krämer *et al.*, 2000). Somit beeinflussen die Metalle den Metabolismus im Inneren der Zelle nicht mehr. Da Pflanzen und Pilze, die den Umwelteinflüssen direkt ausgesetzt sind, für eine Reihe an Säugetieren u.a. dem Menschen ein (Grund-)Nahrungsmittel darstellen, können im Zuge der Nahrungskette Metalle und Schwermetalle, die von Pflanzen oder Pilzen aufgenommen wurden, in den Säugerorganismus gelangen, die dort in einer geringen Konzentration essentiell für den Metabolismus sind. Zu hohe Konzentrationen oder bestimmte Spezies können jedoch auch dem menschlichen Organismus schaden und gesundheitliche Probleme hervorrufen. Die potenziell gesundheitsgefährdenden Metalle können zusätzlich über vielfältige Wege neben der Nahrung in den Körper gelangen. So sind Arbeiter in der Bergbau- oder Metallindustrie täglich Metallstäuben ausgesetzt, die abhängig von ihrer Löslichkeit unterschiedliche Verweilzeiten im Körper besitzen, die weiterhin Einfluss auf die Toxizität der Metallspezies haben (Coogan *et al.*, 1989b). Aber auch alltägliche Umstände wie das Tragen von Schmuck, chirurgischen und dentalen Implantaten oder Zahnfüllungen, bestehend aus den unterschiedlichsten Metallen, die oft Nickel- und Cobalt-haltige Legierungen einschließen, können zu einer Akkumulation der Elemente im Körper führen und Allergien sowie gesundheitliche Beschwerden verursachen (Merrit *et al.*, 1981; Basketter *et al.*, 1993; Burrows, 1997; Messer und Lucas, 2000; Garner, 2004).

1.2 Essentielle Metalle – Mangel und Überdosis

Die Grundlage organischer Moleküle wie Aminosäuren, Fettsäuren und Zucker sind die Elemente Wasserstoff (H), Kohlenstoff (C), Sauerstoff (O) und Stickstoff (N). Um einen funktionierenden Stoffwechsel auszubilden, reichen die genannten Elemente alleine nicht aus, sodass weitere Elemente, sog. Spurenelemente wie Natrium (Na), Mg, Kalium (K), Ca, Phosphor (P), Schwefel (S) und Chlor (Cl) nötig sind. Sie übernehmen, als sog. Elektrolyte, Aufgaben wie z.B. den Aufbau von Membranpotenzialen für Transportvorgänge. Die genannten essentiellen Spurenelemente nehmen in Organismen als Bestandteil oder Cofaktor von Enzymen einen hohen Stellenwert im Stoffwechsel ein. Selen-Proteine wie die Glutathionperoxidase enthalten Selen (Se), Eisen ist Bestandteil des Hämoglobins und weiterer Enzyme, Nickel ist im Enzym Urease vorhanden (s. Abbildung 1.1(a)) (Dixon *et al.*, 1975; Bast, 1988; Jabri *et al.*, 1995) und Cobalt dient als Cofaktor u.a. im Cobalamin Coenzym B₁₂ (Vitamin B₁₂) (s. Abbildung 1.1(b)) (Battersby, 1993; Kräutler, 2005) und der Aldehyd-Decarboxylase (Dennis und Kolattukudy, 1992).

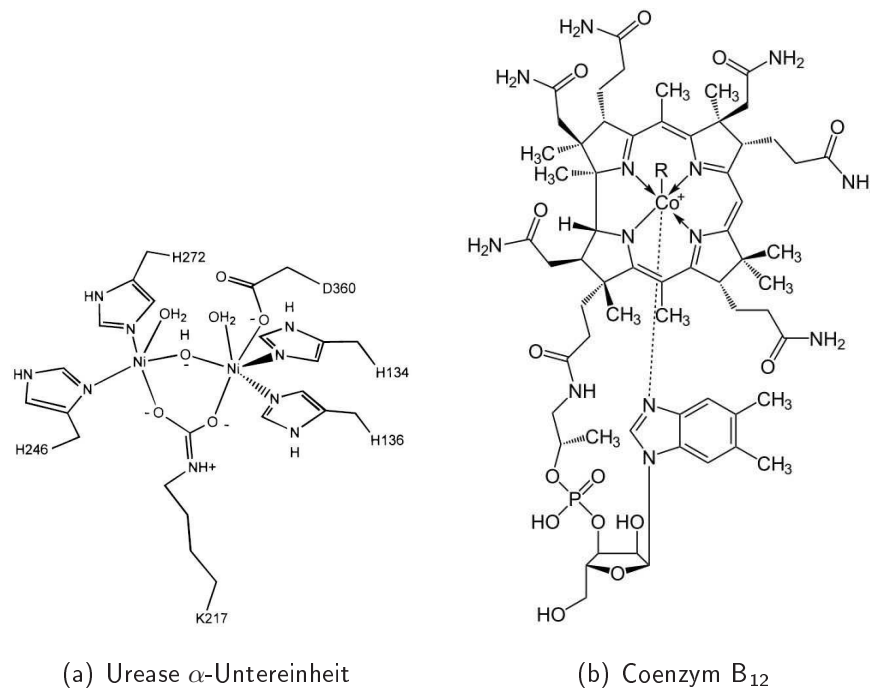


Abbildung 1.1: Struktur von Molekülen mit Metallionen als Cofaktoren. (a) Struktur der Urease α -Untereinheit von *Klebsiella aerogenes* mit zwei Ni-Atomen im aktiven Zentrum; (b) Struktur des Cobalamins Coenzym B₁₂ mit einem Co-Atom im Zentrum.

Zu den essentiellen Spurenelementen, im Speziellen für den Menschen, gehören Molybdän (Mo), Mangan (Mn), Fe, Kupfer (Cu), Zn, Chrom (Cr), Co, Fluor (F), Iod (I), Se, Silicium (Si) und Vanadium (V). Umstritten ist jedoch, ob Arsen (As), Bor (B), Rubidium (Rb), Zinn (Sn) und Ni für den Menschen essentiell sind (Nielsen, 1996). Dass diese Elemente für Pflanzen, einige Tiere (Nielsen und Sandstead, 1974; Uthus und Seaborn, 1996) und verschiedene Mikroorganismen (Pearson *et al.*, 1998) essentiell sind, wurde u.a. durch die Isolierung mehrerer Enzyme wie der Urease, die zwei Nickelatome im aktiven Zentrum enthält (s. Abbildung 1.1(a)) (Carter *et al.*, 2009), gezeigt (Walsh und Orme-Johnson, 1987; Mobley und Hausinger, 1989). Durch den Nachweis von Mangelerscheinungen in Nickel-armer Umgebung, die sich durch Zusatz von Ni(II)-Salzen beheben lassen, wurde zudem die Notwendigkeit dieser Metalle für bestimmte Organismen bewiesen (Dixon *et al.*, 1975; Eskew *et al.*, 1983; Brown *et al.*, 1987). Scharrer und Schropp (1933, 1935) beschrieben einen positiven Effekt von Nickel in der Erde auf das Pflanzenwachstum. In bestimmten Spezies werden weitere Spurenelemente wie Barium (Ba), Blei (Pb), Wolfram (W), Cadmium (Cd) und Brom (Br) als essentiell angenommen. Ein Fehlen essentieller Spurenelemente kann in Lebewesen schwere Mangelerscheinungen wie Anämie bei Eisenmangel oder Hyperplasie bei Iodmangel hervorrufen. Dieser Mangel kann etwa durch vermehrte Ausscheidung, durch Stoffwechselerkrankungen, regionale Gegebenheiten wie geringes Vorkommen im Ackerboden oder Ernährungsgewohnheiten hervorgerufen werden. Eine überhöhte Aufnahme, etwa durch Anreicherung in Nahrungsmitteln oder verschmutzte Luft, kann

eine Vergiftung bewirken, da einige Mikroelemente in zu hoher Konzentration oder bestimmte Spezies hoch toxisch sind. Sie konkurrieren mit essentiellen Elementen wie Fe oder Mg oder ersetzen diese an spezifischen Bindestellen durch ähnliche chemische Eigenschaften und stören dadurch den Metabolismus oder verursachen Krankheiten wie Krebs (zur Übersicht: Durham und Snow, 2006).

1.3 Die Übergangsmetalle

Übergangsmetalle sind chemische Elemente der Ordnungszahlen 21 bis 30, 39 bis 48, 57 bis 80 und 89 bis 112, die sich in der dritten bis zwölften Gruppe des Periodensystems ab der vierten Periode befinden. Es handelt sich dabei um Elemente, die eine unvollständige d-Schale besitzen, bzw. Ionen, die eine unvollständige d-Schale ausbilden. Aufgrund dieser Konfiguration werden sowohl s-Elektronen als auch d-Elektronen als Valenzelektronen wirksam, wodurch Übergangsmetalle viele Oxidationsstufen besitzen können. Die charakteristischen Färbungen und die ausgeprägte Neigung zur Komplexbildung sind auf die teilweise besetzten d-Niveaus zurückzuführen. Da sich in diesen Elementen und den Gruppen entlang jeder Periode die Zunahme an Elektronen in den Orbitalen zeigt, werden diese als Übergangsmetalle bezeichnet.

1.3.1 Das Übergangsmetall Nickel

Nickel mit der Ordnungszahl 28, einer Elektronenkonfiguration von $[\text{Ar}]3d^84s^2$ (Ar, Argon) und einer Atommasse von 58,69 g/mol zählt zu den Übergangsmetallen. Neben den vier stabilen Nickelisotopen ^{60}Ni , ^{61}Ni , ^{62}Ni und ^{64}Ni kommt das Ni-Isotop ^{58}Ni mit einem Anteil von 68 % aller Nickelisotope am häufigsten vor. In chemischen Verbindungen hat Nickel überwiegend die Oxidationsstufe 0 oder +II, wohingegen die Stufen +I und +III seltener und meist instabil sind (Küpper, 2007). Elementares Nickel ist bei 20 °C in Wasser unlöslich, wohingegen sich Ni(II)-Salze in Wasser unter Bildung von Aquakomplexen mit grünlicher Farbe lösen. Unter den wasserlöslichen Nickelverbindungen befinden sich z.B. Ni(II)chlorid-Hexahydrat ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), das die höchste Löslichkeit besitzt, und Ni(II)sulfat (NiSO_4). Nickeloxide und Ni(II)-Sulfide wie Nickelsubdisulfid (Ni_3S_2) sind dagegen wasserunlöslich. Organische Nickelverbindungen wie das Nickeltetracarbonyl sind ebenfalls bekannt. Es bildet in Wasser eine farblose, giftige Flüssigkeit.

1.3.1.1 Nickelvorkommen in der Natur

Nickel ist in der Umwelt relativ weit verbreitet, kommt aber meist in geringen Konzentrationen von durchschnittlich 80 ppm und als Ni^{2+} vor (Sandell und Goldich, 1943). Die Konzentration von Nickel im Boden ist u.a. von der Gesteinsart abhängig. So findet man in Lavagestein oder in tonhaltigem Sediment hohe Konzentrationen an Nickel zwischen 50 ppm und 500 ppm, während

in normalen Böden aus Sandstein oder Kalkstein Konzentrationen unter 50 ppm die Regel sind (Mitchell, 1945; Halstead *et al.*, 1969). Der Massenanteil von Nickel an der Erdhülle beträgt etwa 0,01 %. Es wird als Metall in geringen Mengen z.B. für Nickellegierungen u.a. bei Stählen oder in der Schmuckindustrie benutzt. In der Metall-verarbeitenden Industrie wird Nickel in verschiedenen Verbindungen häufig über die Atemwege aufgenommen, aber auch im Alltag kommen Menschen mit Nickel in Verbindung. Nickel wird auch bei der Herstellung von dentalen oder orthopädischen Implantaten verwendet, sodass bei Korrosionsprozessen oder nach Zerstörung der Implantatoberflächen Nickelionen in den Organismus gelangen können. Der größte Teil des Nickels wird aus Nickel-haltigen Erzen gewonnen, von denen weltweit 1.284.200 t gefördert werden. Hier ist v.a. Nickelmagnetkies zu nennen, der Chalkopyrit (CuFeS_2), Pentlandit ($(\text{Ni,Fe})_9\text{S}_8$) und Spuren von Edelmetallen enthält. Durch Bergbau, Metallindustrie, Kraftwerke, Müllverbrennungsanlagen, Verbrennung fossiler Brennstoffe und Abgase wird Nickel in die Luft emittiert, von wo aus es durch Absetzvorgänge oder den Niederschlag in Böden und Gewässer gelangt. Abwässer, v.a. Industrieabwässer, die ungeklärt in Oberflächengewässer eingeleitet werden, sind eine zusätzliche Quelle für die Anreicherung von Nickel, wodurch eine Nickelkonzentration von 0,2 mg/l im Oberflächenwasser erreicht werden kann (Astrom und Björklund, 1996). Die meisten Nickelpartikel werden von Sediment- und Bodenpartikeln absorbiert, wodurch sie immobil und für Pflanzen nicht verfügbar werden. In einem sauren Milieu ist diese Bindung wie bereits erwähnt jedoch nicht so stark und Nickel kann ins Grundwasser eingetragen werden (Soon und Bates, 1982).

1.3.1.2 Auswirkungen der Nickelexposition auf die Pflanzen- und Tierwelt

Bestimmte Nickelspezies sind in einer bestimmten Konzentration vorteilhaft für die Pflanzen. Scharer und Schropp beschrieben z.B. eine Steigerung des Wachstums von Pflanzen nach der Zugabe geringer Mengen (10^{-9} mVal bis 10^{-8} mVal) NiSO_4 (Scharer und Schropp, 1933). Sowohl Eskew *et al.* (1983, 1984), Brown *et al.* (1987), als auch Gerendás *et al.* (1999) beschrieben später die Essentialität von Nickel für höhere Pflanzen. Der Vorteil könnte u.a. in der Anwesenheit von Nickel in dem Enzym Urease liegen, das die Umsetzung von Harnsäure in Ammoniak katalysiert (Dixon *et al.*, 1975; Polacco, 1977; Dixon *et al.*, 1980). Obgleich Nickel für Mikroorganismen, Pflanzen und Tiere essentiell ist, wiesen Babich und Stolzky (1982) sowie Vergnano und Hunter (1953) darauf hin, dass zu hohe Nickelkonzentrationen in Böden die dort wachsenden Pflanzen schädigen. Durch den direkten Kontakt der Pflanzenwurzel zum Boden kann Nickel abhängig von der Spezies und Konzentration durch passive Diffusion oder aktiven Transport in die Pflanzen aufgenommen werden (Seregin und Kozhevnikova, 2006). Nach überhöhter Nickelaufnahme um das bis zu 10-fache bis 1000-fache der normalen Nickelkonzentration in Pflanzen

(50 mg Ni/kg Trockenmasse) durch kontaminierten Boden zeigen sich bei Pflanzen und Pilzen toxische Effekte in Form von hohen Mortalitätsraten (Poulik, 1997), Wachstumshemmung (Molas, 2002), Hemmung der Mitose- und Enzymaktivität (Madhava Rao und Sresty, 2000; Gajewska *et al.*, 2009), Chlorose (Mishra und Kar, 1974) und sogar Nekrose (Vergnano und Hunter, 1953). Der kontaminierte Boden kann Nickelkonzentrationen von bis zu 24.000 ppm - 53.000 ppm enthalten (Babich und Stotzky, 1982). Im Laufe der Nahrungskette können sich so hohe Nickelkonzentrationen in Tieren anreichern, die wiederum als Teil der Nahrungskette für weitere Organismen wie z.B. den Menschen ein Nahrungsmittel darstellen. Toxische Effekte aufgrund zu hoher Nickelkonzentrationen treten auch bei verschiedenen Mikroorganismen auf, sofern sie nicht Resistenzen gegen Nickel entwickelt haben. In Mikroorganismen haben sich spezifische Transporter zur Aufnahme und Regulation der Homöostase von Nickel und Cobalt entwickelt (Wolfram *et al.*, 1995; Zhang und Gladyshev, 2009; Zhang *et al.*, 2009). Diesen Metallen kommt in Mikroorganismen eine größere Bedeutung als in Säugetieren zu, was besonders am Beispiel der methanbildenden Archaeobakterien zu beobachten ist. Im letzten Schritt der Methanogenese wird mit Hilfe der Methyl-Coenzym M-Reduktase, die von dem Nickeltetrapyrrolhaltigen Cofaktor F₄₃₀ unterstützt wird, ATP (Adenosintriphosphat) gewonnen (Thauer, 1998).

1.3.1.3 Auswirkungen der Nিকেlexposition auf den Menschen

Für den Menschen sind das Trinkwasser und Nahrungsmittel die Hauptquellen der Nickelaufnahme, wodurch durchschnittlich 300 µg Nickel pro Tag vom Körper aufgenommen werden (Barceloux, 1999b). Auch beim Menschen wirken überhöhte Nickelkonzentrationen im Körper toxisch und sogar schon bei Hautkontakt v.a. durch Nickel-haltigen Schmuck oder Kontakt zu Schleimhäuten durch Nickel-haltige dentale Werkstoffe können allergische Reaktionen ausgelöst werden (Stewart, 1933; Merrit *et al.*, 1981; Basketter *et al.*, 1993; Garner, 2004; Thyssen und Menné, 2010). Doch scheinen lösliche Nickelsalze im menschlichen Körper weniger toxisch oder kanzerogen zu sein als wasserunlösliche Nickelsalze (Fletcher *et al.*, 1994; Dunnick *et al.*, 1995). Die unterschiedliche Kanzerogenität der verschiedenen Nickelverbindungen ist u.a. durch ihre Verweildauer im Körper zu erklären. Wasserlösliche Nickelverbindungen verweilen wenige Tage (Halbwertszeit: 1 Tag) im Körper, wohingegen wasserunlösliche Nickelverbindungen wie Sulfide eine Halbwertszeit von etwa 3 Jahren haben (Coogan *et al.*, 1989a). Neben der schädlichen Wirkung wasserlöslicher Nickelverbindungen durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), stellt die Inhalation von wasserunlöslichen Nickelpartikeln ein größeres Risiko für Erkrankungen dar, die besonders bei Arbeitern auftreten, die täglich mit Nickelstaub in Kontakt sind (Doll, 1958; Doll *et al.*, 1970; zur Übersicht: Sunderman, 2001). So erhöht sich der Nickelgehalt in der Umgebungsluft mit normal etwa 6 ng/m³ - 20 ng/m³ durch anthropogene Quellen auf bis zu 150 ng/m³ (Barceloux, 1999b). Diese Nickelpartikel werden durch Phagozytose in die Zellen

aufgenommen und meist in zellkernnahe, saure Vakuolen transportiert, wo die Verbindungen ionisiert werden und schließlich in den Zellkern gelangen (Costa und Mollenhauer, 1980a; Costa und Mollenhauer, 1980b; Costa, 1995; Costa *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2005; Ke *et al.*, 2006). Dort kann Nickel mit unterschiedlichen Strukturen interagieren und auf verschiedene Weise kanzerogen wirken (zur Übersicht: Sutherland und Costa, 2003). Ein erster Angriffspunkt im Zellkern für Nickel sind die Histone bzw. die Aminosäuren Histidin und Lysin der Histonproteine. Die Histone sind für die Struktur von Chromosomen verantwortlich und können posttranslational durch Acetylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Methylierung verändert werden (Peterson und Laniel, 2004), wobei diese Modifikationen auf den aminoterminalen Bereich des Proteins beschränkt sind. Die Histonacetylierung entsteht aus dem Transfer einer Acetylgruppe vom Acetyl-Coenzym A auf die Aminogruppe spezifischer Lysinreste im positiv geladenen aminoterminalen Teil der *core*-Histone und führt letztendlich zur Ladungsneutralisierung der H4-Proteine. Durch die Neutralisierung hervorgerufene verringerte Verbindung zwischen Histon und Desoxyribonukleinsäure (DNA, *deoxyribonucleic acid*) kommt es zum gesteigerten Zugang von Transkriptionsfaktoren zu den Promotorbereichen und damit zur vermehrten Transkription (Grunstein, 1997). Bindet nun Ni^{2+} an Histidin- oder Lysinreste von Histonen, kommt es zu einer Minderung dieser Histonacetylierung und gleichzeitig zur Hypermethylierung von H3 Lysin 9. Dies führt zur Verstärkung der DNA-Kondensation, die Transkription wird eingeschränkt und folglich kommt es zum *genesilencing*. Betrifft dies Tumorsuppressorgene (Klein *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1995; Costa *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2005), kommt es zum *genesilencing* des Tumorsuppressorgens und so zur Tumorbildung (zur Übersicht: Kasprzak *et al.*, 2003). Ein weiterer Angriffspunkt für Ni^{2+} ist die DNA selbst. Der Kontakt von Ni^{2+} mit dem Phosphatrückgrat oder den Basen der DNA resultiert primär in Schäden der Heterochromatinregion von Chromosomen (Sen und Costa, 1985; Broday *et al.*, 1999), wo Seneszenz-induzierende Sequenzen lokalisiert sind (Klein *et al.*, 1991). Heterochromatin enthält mehr Mg^{2+} als Euchromatin, welches durch die Nähe zur Kernmembran durch Ni^{2+} oder Co^{2+} ersetzt werden kann (Lee *et al.*, 1995). Wird Mg^{2+} durch Ni^{2+} ersetzt, führt dies zur Hypermethylierung von Cytosin (C). Diese Hypermethylierung stabilisiert wiederum die Nickel-induzierte Verstärkung der Heterochromatinkondensation (Borochoy *et al.*, 1984; Lee *et al.*, 1995; Broday *et al.*, 1999; Broday *et al.*, 2000). Dieser Vorgang ist in Abbildung 1.2 skizziert. Die verstärkte Chromatinkondensation verhindert die Anlagerung der DNA-Polymerase und damit die Transkription von Genen. *Genesilencing* von Tumorsuppressorgenen ist auch hier die Folge. Zusätzlich zur direkten Beeinflussung der DNA durch Ni^{2+} führen diese divalenten Kationen durch Interaktionen mit Cofaktoren von DNA-Reparaturenzymen, die Fehler in der DNA beseitigen sollen, zu Fehlern beim Einbau der Nukleotide selbst durch die Polymerase (Hartwig *et al.*, 1994; Kasten *et al.*, 1997; Hartwig und Schwerdtle, 2002).

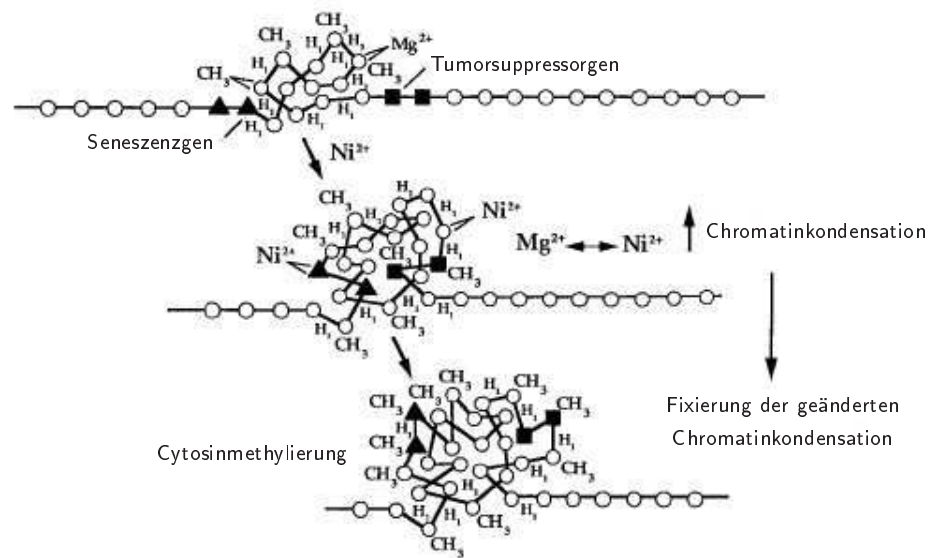


Abbildung 1.2: Schema der kanzerogenen Wirkweise von Nickel in Heterochromatin. Die kanzerogene Wirkweise von Nickel beruht auf dem Austausch von Mg^{2+} durch Ni^{2+} in DNA-Regionen mit Tumorsuppressorgen oder Seneszenzgenen, was zu einer verstärkten Heterochromatinkondensation und deren Stabilisierung durch Hypermethylierung von Cytosin und folglich zu *genesilencing* von Tumorsuppressorgen und Seneszenzgenen führt (Lee *et al.*, 1995).

1.3.2 Das Übergangsmetall Cobalt

Cobalt mit der Ordnungszahl 27 zählt ebenso wie Nickel durch seine unvollständig besetzte d-Schale ($[Ar]3d^74s^2$) zu den Übergangsmetallen. Eine Besonderheit stellt die relative Atommasse des Cobalts dar, die mit 58,93 g/mol größer ist als die des nächsten Elementes im Periodensystem – Nickel. Cobalt besitzt von Natur aus nur ein einziges stabiles Isotop. In chemischen Verbindungen kommt es vorwiegend in den Oxidationsstufen +II und +III vor, jedoch sind die Oxidationsstufen +I, +IV und +V in Verbindungen ebenfalls vertreten. Im chemischen Verhalten ist Cobalt dem Eisen und Nickel ähnlich und so bildet auch Cobalt eine Vielzahl von meist farbigen Komplexen, in denen im Gegensatz zu kovalenten Verbindungen die Oxidationsstufe +III häufiger und stabiler ist als +II.

1.3.2.1 Cobaltvorkommen in der Natur

Mit einer Häufigkeit in der Erdkruste von ca. 0,003 % ist Cobalt ein seltenes Element, das elementar äußerst gering in Meteoriten, sowie im Erdkern vorkommt, wo es mit Nickel, häufig auch mit Kupfer, Silber (Ag), Eisen oder Uran (U) vergesellschaftet ist. Nickel kommt in der Erdkruste mit durchschnittlich 80 ppm etwa drei- bis viermal so häufig vor als Cobalt mit 23 ppm (Sandell und Goldich, 1943). Wichtige Cobaltverbindungen sind das wasserlösliche Co(II)-Chlorid ($CoCl_2$), das wasserunlösliche Co(II)-Oxid oder Co(II,III)-Oxid und Co(II)-Sulfat. Es gibt eine

Reihe von Cobalterzen, in denen sich das Cobalt durch Verwitterung oder andere Prozesse angereichert hat, zu denen u.a. das Cobaltit (CoAsS), Siegenit ($(\text{Co,Ni})_3\text{S}_4$) und Heterogenit (CoOOH) zählen. Aus diesen Erzen wird Cobalt in einem mehrstufigen Prozess gewonnen, sodass es in der Industrie z.B. bei Legierungen von Stählen oder als farbgebendes Pigment eingesetzt werden kann (Barceloux, 1999a). Cobalt ist zwar ein seltenes Element, doch ist es ein weit verbreitetes natürlich vorkommendes Element, das sich im Boden, im Wasser, der Luft und in Pflanzen und Tieren nachweisen lässt. In die Luft und das Wasser gelangt Cobalt durch natürliche Einflüsse wie Wind- und Wassererosion von Cobalt-haltigen Böden und Gesteinen, aber in kleinen Mengen auch durch anthropogene Einflüsse wie der Kohleverbrennung, dem Bergbau, der Verarbeitung von Cobalt-haltigen Erzen und dessen Einsatz in Chemiefabriken. Die Mobilität von Cobalt im Boden wird wie bei Nickel durch saure pH-Werte gefördert. Bei basischen pH-Werten limitiert die Bildung von Hydroxiden und Carbonatkomplexen die Mobilität von Cobalt.

1.3.2.2 Auswirkungen der Cobaltexposition auf die Pflanzen- und Tierwelt

Ob Cobalt essentiell für alle grüne Pflanzen ist, ist noch unklar, aber die Notwendigkeit von Cobalt für das Stickstofffixierende System in marinen Ökosystemen, Cyanobakterien und Leguminosen wurde von Reisenauer (1960) aufgezeigt. Liegt Cobalt als freies Ion vor, wird es leichter von Pflanzen und Tieren aufgenommen. So zeigten Versuche von Kasten und Kollegen (1992) zunächst, dass die Co^{2+} -Aufnahme über Ionenpumpen bis zu einer extrazellulären Konzentration von $400 \mu\text{M CoCl}_2$ exponentiell verläuft. Später wurde beschrieben, dass u.a. ein *divalent metal transporter 1* (DMT1) an der Aufnahme von Co^{2+} in die Zellen beteiligt ist (Gunshin *et al.*, 1997; Komeda *et al.*, 1997; Forbes und Gros, 2003; Garrick *et al.*, 2003). Dadurch kann es zur Akkumulation von Co^{2+} um ein Vielfaches der extrazellulären Konzentration in den Zellen kommen (Kasten *et al.*, 1992), die den Metabolismus durch Konkurrenz mit physiologisch relevanten Ionen stören.

1.3.2.3 Auswirkungen der Cobaltexposition auf den Menschen

Cobalt ist für die menschliche Ernährung ein essentielles Spurenelement als Bestandteil von Cobalaminen wie dem Vitamin B_{12} (Battersby, 1993; Kräutler, 2005), welches beim gesunden Menschen von den Darmbakterien direkt aus Co^{2+} gebildet werden kann und wiederum als Coenzym Bestandteil einiger Enzyme ist. Die Bioverfügbarkeit von Cobalt ist jedoch von der Löslichkeit seiner Verbindungen abhängig. Die benötigte Cobaltmenge beim Menschen von nur etwa $0,2 \mu\text{g}$ pro Tag ist extrem gering und wird vom Körper durch die Atemluft (durch-

schnittliche Konzentration an Cobalt in Luft: 1 ng/m³ bis 2 ng/m³ (Tabor und Warren, 1958)), das Trinkwasser (Cobaltkonzentration in Trinkwasser: <0,1 µg/l bis 5 µg/l (Punsar *et al.*, 1975; Hamilton, 1994)) und v.a. durch die Nahrung in Form von anorganischen Verbindungen aufgenommen, was insgesamt einer täglichen Aufnahme von etwa 20 µg Cobalt entspricht (Ostapczuk *et al.*, 1983). Während Cobaltverbindungen für den Menschen in geringen Konzentrationen essentiell sind, führen größere Überdosen ab etwa 25 mg bis 30 mg pro Tag zu Haut-, Lungen-, Magenerkrankungen, Leber-, Herz-, Schilddrüsen- und Nierenschäden und möglicherweise zu Krebsgeschwüren (Fischer und Rystedt, 1983; Roesems *et al.*, 2000). Ebenso wurde eine Allergie-auslösende Wirkung von Cobalt vergleichbar mit Nickel beschrieben (Thyssen und Menné, 2010). Wie Ni²⁺ (s. Abschnitt 1.3.1) konkurriert intrazelluläres Co²⁺ mit dem Mg²⁺ in Enzymen, stört deren Aktivität und Funktionalität oder ändert die Histonmodifikation und verursacht Hypermethylierung und Ubiquitinierung (Li *et al.*, 2009) der Proteine. Diese Vorgänge können schließlich Einfluss auf die Chromatinkondensation nehmen und ähnliche Störungen in der Genexpression wie Ni²⁺ verursachen (Beyersmann und Hartwig, 1992). Die Hemmung von Polymerasen und DNA-Reparaturenzymen kann durch den Austausch des Katalysators Mg²⁺ durch Ni²⁺ oder Co²⁺ erhöhte Fehlerraten beim Einbau von Nukleotiden in die DNA verursachen (Sirover und Loeb, 1976; Sirover und Loeb, 1977; Hartwig *et al.*, 1994; Kasten *et al.*, 1997).

1.3.3 Aufnahme von Metallen in die Zelle

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass Nickel aus wasserlöslichen Verbindungen nicht in Zellen aufgenommen werden kann, bzw. nur in geringem Maß. Garrick und Kollegen (2003, 2006b) beschrieben jedoch den Metalltransporter DMT1, der in verschiedenen pro- und eukaryontischen Organismen in unterschiedlichen Isoformen vorkommt (auch Nramp2: *natural resistance associated macrophage protein 2* oder DCT1 *divalent cation transporter 1* genannt) (Garrick *et al.*, 2006a) und zunächst als Fe²⁺-Transporter beschrieben wurde (Gruenheid *et al.*, 1995; Gunshin *et al.*, 1997; Gruenheid *et al.*, 2001; Garrick *et al.*, 2003).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass dieser DMT1 sowohl Ni²⁺ und Co²⁺ als auch Mn²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺ und Zn²⁺ transportiert, wobei sich die folgende Transportaffinität des DMT1 herausstellte: Mn²⁺ > Cd²⁺ > Fe²⁺ > Pb²⁺ ~ Co²⁺ ~ Ni²⁺ > Zn²⁺ (Garrick *et al.*, 2003; Garrick *et al.*, 2006b; Garrick *et al.*, 2006a). Hughes und Barrit (1989) beschrieben einen weiteren Kationentransporter für Ca²⁺, dessen Ca²⁺-Influx durch Ni²⁺- und Co²⁺-Exposition vermindert wird. Die Hemmung des Transporters wirkt sich negativ auf die Aufnahme von Ni²⁺ und Co²⁺ aus (Hughes und Barritt, 1989). Neben eukaryontischen Systemen beschrieben Smith und Kollegen (1998) in *Salmonella typhimurium* ein CorA (Mg²⁺- und Co²⁺-Transportprotein), das in der Lage ist, Ni²⁺ über die Membran zu transportieren. Dieses integrale Membranprotein besitzt zwei C-terminale *loops*, die auf der periplasmatischen Seite der Zelle durch mehrere negativ geladene Aminosäuren

negativ geladen sind. Auf der zytoplasmatischen Seite sind sie positiv geladen, was möglicherweise die Ligandenbindung vermittelt und eine Art Mg^{2+} -Transportpore oder Kanal bildet (Smith *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1998) (s. Abschnitt 1.4.1). Des Weiteren existieren prokaryontische Ni^{2+} - und/oder Co^{2+} -Transportsysteme wie HoxN (Wolfram *et al.*, 1995) und NiCoT (Ni/Co-Transporter; auch in Pilzen), die von Eitinger und Kollegen (2005), Zhang und Gladyshev (2009) sowie Zhang und Kollegen (2009) beschrieben wurden. Sie nehmen gezielt Ni^{2+} und Co^{2+} in die Prokaryonten auf, das die Organismen für ihren Metabolismus benötigen.

1.4 Aufbau eukaryontischer Zellen

Man unterscheidet Zellen in Prokaryonten, zu denen Bakterien und Archaeobakterien zählen, und die in Eukaryonten, zu denen Hefen und Zellen höherer Organismen wie Tiere und Pflanzen zählen. Eine schematische Darstellung von tierischen und pflanzlichen Zellen ist in Abbildung 1.3 und Abbildung 1.4 dargestellt. Innerhalb der Eukaryonten werden verschiedene Zelltypen unterschieden, die ausdifferenziert jeweils eine bestimmte Funktion innerhalb eines Organismus ausüben. Mehrere Zelltypen gibt es v.a. bei mehrzelligen Organismen, bei denen eine Zelle eine ihrer Funktion entsprechende Gestalt annimmt. So kann man in tierischen Zellen u.a. Fibroblasten und Osteoblasten mit einem großen Zellkörper und langen zytoplasmatischen Fortsätzen unterscheiden, die für den Aufbau und die Stabilität des Bindegewebes bzw. für den Knochenaufbau verantwortlich sind. Die Erythrozyten im Blut sind dagegen rund und viel kleiner, Nervenzellen haben ein langes Axon zur Reizweiterleitung entwickelt und Stammzellen besitzen die Fähigkeit, sich nahezu in alle Zelltypen ausdifferenzieren zu können. In Pflanzen besitzen Meristemzellen die Fähigkeit, sich in andere Zellen zu differenzieren. Daraus entstehen z.B. Siebzellen oder Schließzellen, die sich in ihrer Form extrem ihren Aufgaben angepasst haben. Wenn eine Zelle eines bestimmten Zelltyps in einen anderen Typ übergeht, wird dieser Vorgang als Differenzierung bezeichnet. In den meisten Fällen bleibt das Genom dabei unverändert und nur das Genexpressionsmuster ändert sich, wodurch sich häufig das Erscheinungsbild der Zelle verändert. Während der Entwicklung vielzelliger Lebewesen sind einige Differenzierungsschritte irreversibel, sodass eine ausdifferenzierte Zelle nicht in der Lage ist, sich in beliebige andere Zellen umzuwandeln. Nur die Stammzellen in tierischen Organismen bzw. Meristemzellen in Pflanzen haben das Potenzial, sich lebenslang zu differenzieren.

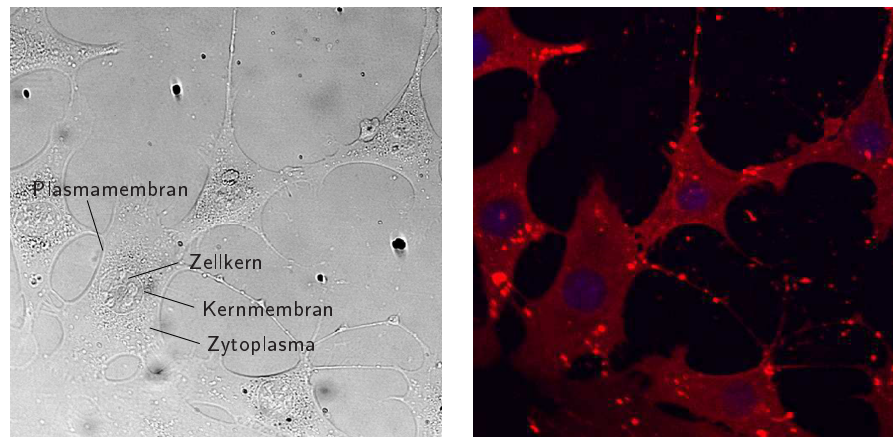
Der Aufbau einer eukaryontischen Zelle ist im Grunde immer gleich. Die Zelle ist von einer Lipiddoppelschicht, der Plasmamembran – in Pflanzenzellen auch Plasmalemma genannt – umgeben, die hauptsächlich von amphipathischen Phospholipiden, meist Phosphatidylcholin, gebildet wird. Die Lipide sind aus einem hydrophilen Kopf und zwei hydrophoben Fettsäuren zusammengesetzt, die über eine Phosphatgruppe mit dem hydrophilen Kopf verbunden sind. Aufgrund dieser Eigenschaften ist die Ausbildung einer Lipiddoppelschicht, bei der sich die hydrophilen Köpfe nach

außen und die hydrophoben Ketten nach innen ausrichten, energetisch am günstigsten. Gleichzeitig wird die Membran zu einer Permeabilitätsbarriere, die lediglich kleine unpolare Moleküle wie molekularen Sauerstoff und Kohlendioxid oder ungeladene polare Moleküle wie Wasser oder Ethanol sehr schnell durch die Membran diffundieren lässt. Glycerin oder Glucose, sowie Kationen oder Anionen diffundieren dagegen sehr langsam oder gar nicht durch die Membran. Diese Permeabilitätsbarriere für Ionen ermöglicht den Aufbau eines Membranpotenzials durch Ladungstrennung, welches für metabolische Prozesse als Energielieferant dient. In die Membran sind deshalb Proteine und Glykolipide an der Oberfläche eingebettet, die Rezeptoreigenschaften besitzen können und die Stoffe, die nicht durch die Membran diffundieren können, gezielt durch diese transportieren. Ihre Form und Stabilität erhalten Zellen durch ein Zytoskelett aus Aktinfasern bzw. bei Pflanzenzellen durch die Ausbildung einer Zellwand aus Cellulose (s. Abschnitte 1.4.4 und 1.4.5).

1.4.1 Transportproteine

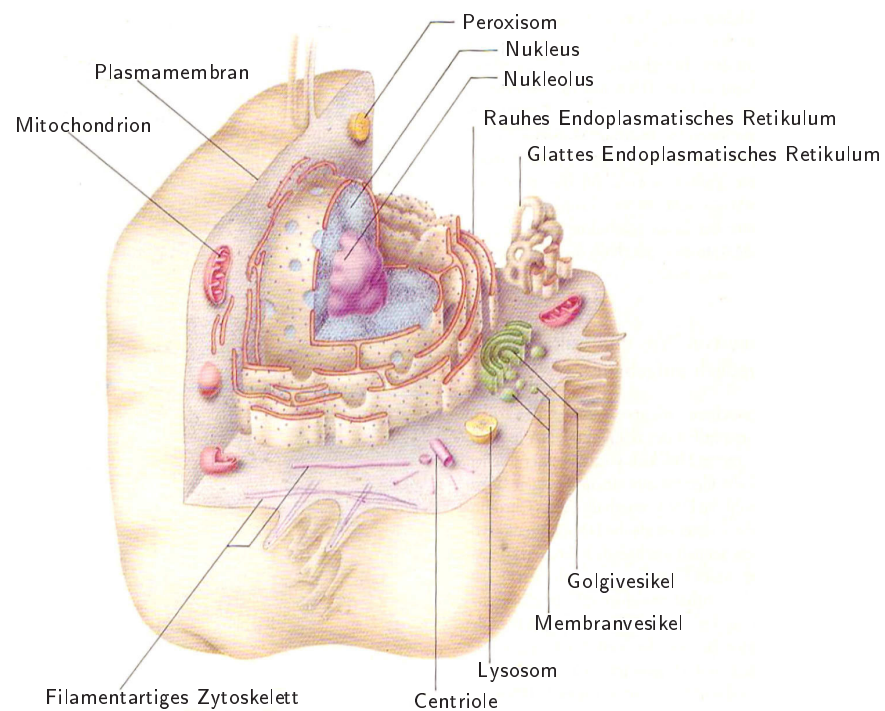
Um den Transport von Ionen und geladenen Molekülen, die aufgrund ihrer Ladung und der großen Hydrathülle nicht in die hydrophobe Phase der Lipiddoppelschicht eintreten können, über die Plasmamembran zu transportieren, werden selektive Kanäle und Pumpen in der Membran benötigt. Neben den Ionenkanälen oder Poren, die einen diffusionsgetriebenen passiven Transport von Metallionen durch die Energie des Konzentrationsgefälles von Innen und Außen ermöglichen, zählen die Uniporter zu den einfachen Transportproteinen (s. Abbildung 1.5), die Ionen gegen einen Gradienten über eine Membran transportieren. Die Energie für diesen Transportprozess wird durch die ATP-Hydrolyse oder die Protonen-Motorische-Kraft, die durch einen elektrochemischen Protonengradient über die Membran entsteht, bereitgestellt. Symporter transportieren Ionen ebenfalls gegen einen Gradienten, nutzen dabei aber die Energie des Gradienten eines zweiten Ions, meist eines Protons (H^+), das sie gleichzeitig in Richtung des Konzentrationsgradienten befördern. Das gleiche Prinzip machen sich Antiporter zu Nutze, die die Gradientenenergie eines Gegenions wie K^+ , Na^+ , aber auch H^+ nutzen, um ein Ion in die Gegenrichtung zu transportieren (s. Abbildung 1.5). Eine weitere Klasse von Transportern sind ATP-Transporter, die Energie aus ATP zur Konformationsänderung eines Transporters und damit zum Transport nutzen (Lodish *et al.*, 1996; zur Übersicht: Saier, 2000).

Für Metallionen, insbesondere divalente Kationen wie Ni^{2+} oder Co^{2+} , wurden Transporter wie der DMT1, CDF (*cation diffusion facilitator*), ZIP (*Zrt- and Irt-related protein*) oder CorA beschrieben (Andrews, 1999; Garrick *et al.*, 2003; Garrick *et al.*, 2006a), die ubiquitär in den meisten Organismen vorhanden sind, aber in unterschiedlichen Organismen in modifizierter Form vorliegen können. UreH (nur in höheren Pflanzen) und NiCoT (nur in Pilzen und Prokaryonten) wurden ebenfalls als Ni^{2+} - und Co^{2+} -Transporter erwähnt (Eitinger *et al.*, 2005).



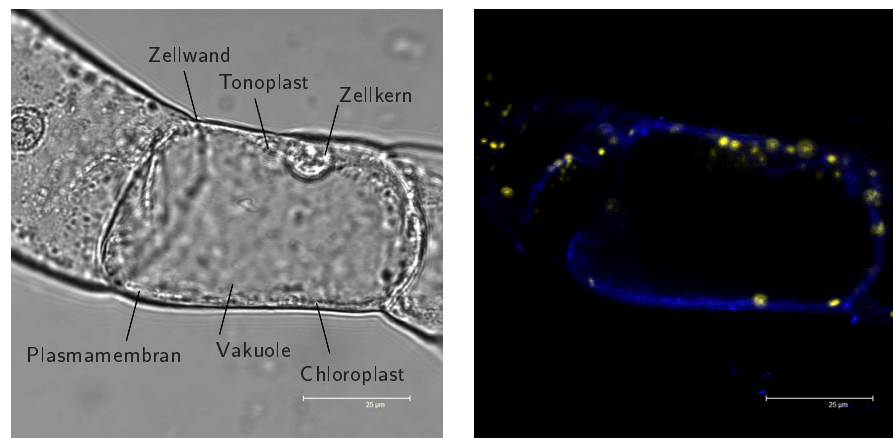
(a) Transmissionsmodus

(b) Fluoreszenzmodus



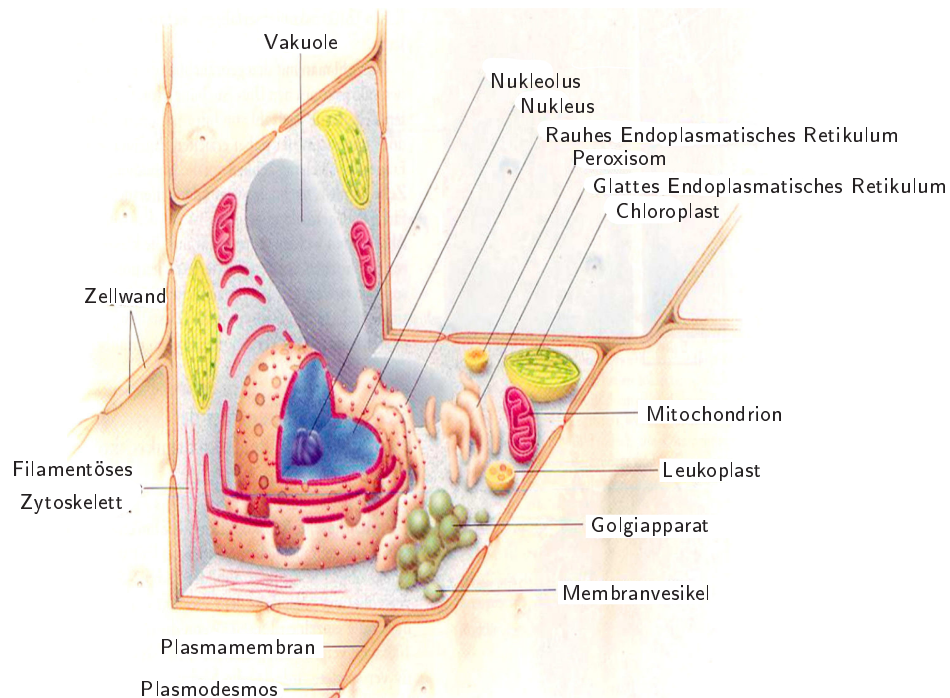
(c) Skizze

Abbildung 1.3: Mikroskopische Darstellung und Skizze einer tierischen Zelle. (a) Mikroskopische Darstellung humaner Gingiva-Fibroblasten im Transmissionsmodus, Kantenlänge: $187 \mu\text{m}$; (b) *Merge* der Fluoreszenzaufnahmen mit dem CLSM (*confocal laser scanning microscope*) Leica TCS SP2 (Objektiv HCX APO 40x/0,8 W U-V-I) der Membranen (rot) humaner Gingiva-Fibroblasten markiert mit CellMask deep red [$5 \mu\text{g}/\text{ml}$], Anregungswellenlänge: 633 nm He/Ne-Laser, Emissionsdetektionsbereich: 650 nm bis 700 nm , PMT-voltage: 677 V , Blendendurchmesser: $127 \mu\text{m}$ (1 Airy) und der Zellkerne (blau), die mit Hoechst 33342 [$5 \mu\text{g}/\text{ml}$] markiert wurden, Anregungswellenlänge: Quecksilberdampfplampe, Emissionsdetektionsbereich: 350 nm bis 480 nm , PMT-voltage: 748 V , Blendendurchmesser: $600 \mu\text{m}$ (4,7 Airy); Kantenlänge: $187 \mu\text{m}$; (c) Schema einer typischen tierischen Zelle (Lodish *et al.*, 1996).



(a) Transmissionsmodus

(b) Fluoreszenzmodus



(c) Skizze

Abbildung 1.4: Mikroskopische Darstellung und Skizze einer pflanzlichen Zelle. (a) Mikroskopische Darstellung von Pflanzenzellen im Transmissionsmodus, Kantenlänge: 101 μm ; (b) *Merge* der Fluoreszenzaufnahmen mit dem CLSM Leica TCS SP2 (Objektiv HCX PL APO 63x/1,2 W CORR CS) der Zellmarkierung mit Vibrant Dil [10 μM] (blau), Anregungswellenlänge: 488 nm Ar-Laser und 543 nm He/Ne-Laser, Emissionsdetektionsbereich: 557 nm bis 602 nm, PMT-voltage: 665 V, Blendendurchmesser: 300 μm (2,24 Airy) und der Eigenfluoreszenz der Chloroplasten (gelb), Anregungswellenlänge: 488 nm Ar-Laser und 543 nm He/Ne-Laser, Emissionsdetektionsbereich: 648 nm bis 702 nm, PMT-voltage: 742 V, Blendendurchmesser: 300 μm (2,24 Airy); Kantenlänge: 101 μm ; (c) Schema einer typischen pflanzlichen Zelle (Lodish *et al.*, 1996).

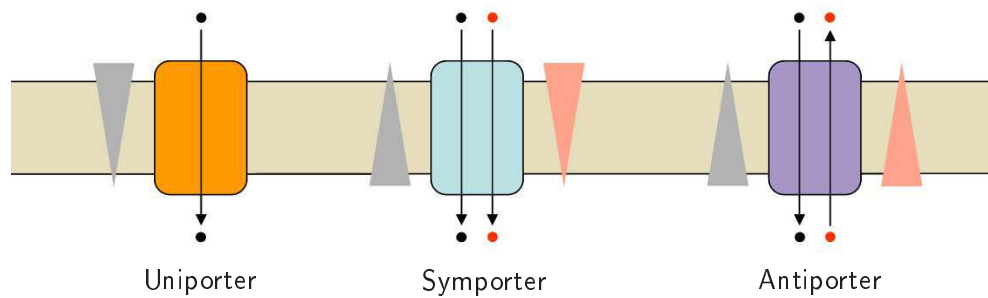


Abbildung 1.5: Skizze der Membrantransportproteine. Die drei Haupttypen von Membrantransportproteinen (nach Lodish *et al.*, 1996). Ein Uniporter transportiert ein Ion (schwarz) mit dem Konzentrationsgradienten über eine Membran. Symporter transportieren ein Ion (schwarz) gegen seinen Konzentrationsgradienten mit der Energie aus dem Transport eines zweiten Ions (rot), das mit dem Gradienten in die selbe Richtung wie das zu transportierende Ion transportiert wird. Die Antiporter nutzen ebenfalls Energie aus dem Transport eines zweiten Ions, das mit dem Gradienten transportiert wird, um Ionen in die Gegenrichtung gegen ihren Gradienten zu transportieren und anzureichern.

Aminosäuren wie Histidin spielen zudem beim Transport von divalenten Kationen eine große Rolle, da diese durch ihren Imidazol-Stickstoff oder die Sulfhydrylgruppe in Cystein eine starke Affinität zu divalenten Kationen aufweisen (Ross und Burrows, 1998). Nickelbindemotive mit konservierten Aminosäuresequenzen wie z.B. PSHAHPHP aus der Deadenylnuklease (Kondo *et al.*, 1995), sind aber auch in Proteinen zu finden, die keine physiologischen Ni^{2+} - oder Co^{2+} -Transporter darstellen. Ähnlich Histidin-reiche Sequenzen findet man in den Zellkernproteinen, v.a. den Histonen, die zur Ni^{2+} -Bindung bei unphysiologisch hohen Nickelkonzentrationen beitragen (Küpper, 2007).

1.4.2 Aufrechterhaltung der Homöostase von Metallionen in Zellen

Wie zuvor erwähnt, ist die Wirkung und der Einfluss eines Ions auf eine Zelle stark von seiner Konzentration abhängig. Die Toxizität von Metallen entsteht meist durch deren Bindung an Sulfhydrylgruppen von Proteinen oder durch Verdrängung der spezifischen Cofaktoren von Proteinen, die zu einer Inaktivierung oder verminderten Aktivität durch Strukturänderung des Proteins führen (Van Assche und Clijsters, 1990). Zur Aufrechterhaltung physiologisch optimaler Bedingungen, also einer Homöostase, haben Zellen mehrere Mechanismen entwickelt. Um die Konzentration eines bestimmten Ions in der Zelle direkt bei der Aufnahme in die Zelle zu regulieren, sind Metalltransporter oft transkriptionell reguliert und verhindern somit die Aufnahme zu hoher Mengen von potenziell toxischen Ionen (Nelson, 1999; Tandy *et al.*, 1999). Die intrazelluläre Bindung von Ionen z.B. an Repressormoleküle stoppt die Translation der Transportproteine. Ein weiterer Schritt in der Regulation der Aufnahme besteht durch die Translation

von *high affinity* Transportproteinen, die bei Mangel eines Ions synthetisiert werden und durch ihre hohe Substratspezifität gezielt Ionen in die Zellen aufnehmen. Im Gegensatz dazu werden *low affinity* Proteine bei Ionenüberschuss translatiert. Die *low affinity* Transporter haben eine geringe Substratspezifität und sind deshalb in der Lage, viele verschiedene Ionen zu transportieren, wodurch eine Akkumulation eines bestimmten Ions verhindert wird. Durch sehr hohe Ionenkonzentrationen konkurrieren jedoch die toxischen Kationen mit physiologischen Kationen um die Bindung an den Transporter wie z.B. einem Mg^{2+} -Transporter, und werden durch diesen vermehrt in die Zellen transportiert. Da es für essentielle Kationen wie Fe^{2+} , Mg^{2+} oder Zn^{2+} zahlreiche Transportmöglichkeiten gibt, wie dem IRT1 (*iron-regulated transporter 1*) (Korshunova *et al.*, 1999), COPT1 (*copper transporter 1*) (Kampfenkel *et al.*, 1995), Transporter der ZIP-Familie (Fox und Guerinot, 1998) oder dem CDF (Paulsen und Saier Jr., 1997), existieren ebenso viele Transportwege für toxische Ionen wie Ni^{2+} und Co^{2+} . Werden trotz der Aufnahmekontrolle überhöhte Metallmengen in eine Zelle aufgenommen, kann die Zelle durch Chelatierung oder Absonderung darauf reagieren und die zytosolische Konzentration an freien Ionen rapide absenken (Palmiter und Findley, 1995; Kim *et al.*, 2004). Daran sind zumeist organische Säuren wie Malat, Citrat, Nicotinamin (von Wirén *et al.*, 1999), Cystein oder Histidin (Rauser, 1999; Clemens, 2001), sowie Phytochelatine und Metallothioneine in Pflanzen (Zenk, 1996; Briat und Lebrun, 1999) beteiligt, die die divalenten Kationen binden. Diese Komplexe oder monovalente und divalente Kationen alleine können weiterführend durch bestimmte Tonoplasttransporter wie K^{+}/H^{+} -Antiporter in die Vakuolen der Pflanzenzellen weitergeleitet werden (Silver und Walderhaug, 1992; Hirschi, 2001; Maeshima, 2001; Gaxiola *et al.*, 2002; Hall, 2002). In einigen Hyperakkumulatoren wurde zusätzlich zu den beschriebenen Detoxifizierungsprozessen die Bindung von toxischen Ionen an die Zellwand bzw. den Apoplasten beschrieben, wo sie u.a. Ca^{2+} -Bindestellen besetzen (Hall, 2002).

1.4.3 Kompartimentierung in eukaryontischen Zellen

Da in eukaryontischen Zellen permanent viele chemische Reaktionen gleichzeitig ablaufen, die oft unterschiedliche und gegensätzliche Reaktionsbedingungen verlangen, entwickelten sich durch Kompartimentierung Reaktionsräume, sog. Organellen oder Kompartimente, die den gleichzeitigen Ablauf dieser Prozesse und deren Reaktionen erlauben. Organellen sind ebenfalls von selektiv permeablen Membranen umschlossen, um so den Aufbau von Konzentrationsgradienten über die Membran zu erlauben, welcher den Aufbau von Membranpotenzialen ermöglicht. Durch die Ausdifferenzierung von Zellen und die damit verbundenen spezifischen Aufgaben, sind die Zellorganellen bei den verschiedenen Zelltypen unterschiedlich ausgeprägt.

Viele Organellen wie das Endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat, Mitochondrien und Chloroplasten sind nicht willkürlich im Zytosol verteilt, sondern durch Anheftung an Mikrotubuli des Zytoskeletts an bestimmten Stellen verankert. Die Mikrotubuli dienen als eine Art Schienensystem, auf dem sich die Organellen bewegen und die ebenso den vesikulären Transport regulieren. Die Organellen haben in eukaryontischen Zellen entsprechende Aufgaben übernommen. Das größte Kompartiment ist das Zytosol, das von der Zytoplasmamembran umgeben ist und alle weiteren Kompartimente der Zelle beinhaltet. Bei einem pH-Wert von 7,2 finden hier Stoffwechselreaktionen und die Proteinsynthese statt. Die Modifikation, Sortierung und Verpackung dieser zytosolischen Proteine und der Lipide bewerkstelligt der Golgi-Apparat. Hierbei handelt es sich um einen membranumschlossenen Reaktionsraum, der aus vier bis sechs Dictyosomen besteht und meist in der Nähe des Zellkerns und Zentrosoms angesiedelt ist, wobei die relative Ausdehnung temporär mit seiner Aktivität und der Funktion variiert. Auf der ER-zugewandten Seite, der *cis*-Golgi-Seite, werden Proteine und Lipide auch vom ER aufgenommen, modifiziert und anschließend über die ER-abgewandte Seite, der *trans*-Golgi-Seite, zu dem Bestimmungsort in der Zelle befördert. Proteine und Lipide, die Lysosome und die Kernmembran als Ziel haben, werden über das ER in die Zielorganellen transportiert, wohingegen im Falle von Mitochondrien, Chloroplasten, Peroxisomen und des Zellkerninneren die Proteine direkt aus dem Zytosol aufgenommen werden. Das ER ist ein kontinuierliches System von miteinander verbundenen Hohlräumen, sog. Zisternen, die sich häufig durch die gesamte Zelle erstrecken. Die ER-Membran umgibt dieses System und geht direkt in die Kernhülle über, sodass das Lumen des ER mit dem Membranzwischenraum der Kernhülle, dem sog. perinukleären Raum, in Verbindung steht. Die Struktur des ER ist ebenfalls dynamisch reguliert und bildet sich in Abhängigkeit vom Zytoskelett ständig neu. Man unterscheidet das glatte ER, das für metabolische Prozesse, die Synthese verschiedener Lipide (v.a. Phospholipide) und Steroide, den Kohlenhydratstoffwechsel, die Entgiftung der Zelle (v.a. in Leberzellen) und die Einlagerung von Calcium zuständig ist und das raue ER, das mit Ribosomen besetzt ist, die die Aufgabe der Proteinsynthese durch Translation der mRNA (*messenger RNA*) in Aminosäureketten übernehmen. Der Zellkern, der wie die meisten Organellen einer eukaryontischen Zelle, von einer Doppelmembran, der Kernmembran, umgeben ist, beinhaltet das Genom einer Zelle, das bei der Zellteilung weitergegeben wird und ist der Ort der DNA- und RNA-Synthese. Die äußere Membran des Zellkerns setzt sich, wie zuvor erwähnt, in der Membran des ER fort, sodass diese miteinander in Kontakt stehen. Die Kernporen, die sich aus Proteinkomplexen in der Kernmembran zusammensetzen, dienen zum einen als selektive Zugänge für den aktiven Transport von großen Molekülen und zum anderen als Wasser gefüllte Kanäle, die freie Diffusion von kleineren, wasserlöslichen Molekülen ermöglichen. Organellen, die für den Abbau von Stoffwechselprodukten oder Zellbestandteilen in den Zellen verantwortlich sind, sind Peroxisome und Lysosome. Lysosome spalten sich vom Golgi-Apparat ab und enthalten hydrolytische Enzyme und Phosphatasen, mit denen sie Organellen,

Makromoleküle oder Partikel, die durch Endozytose in die Zellen aufgenommen wurden, abbauen. In Pflanzenzellen existieren keine Lysosome. Ihre Aufgabe übernehmen dort die Vakuolen. Peroxisome sind für den Abbau von Lipiden und toxischen Molekülen verantwortlich, wodurch die Zellen von Abfallprodukten befreit werden. Die Energie für diese Prozesse liefern die tubulären Mitochondrien in Form von ATP durch oxidative Phosphorylierung, deren Doppelmembran speziell für die Synthese von ATP konstruiert ist. In Pflanzenzellen findet die ATP-Synthese und die Kohlenstofffixierung während der Photosynthese in Chloroplasten statt.

1.4.4 Fibroblasten

Humane Gingiva-Fibroblasten wurden in dieser Arbeit als Testzellen genutzt, um die Aufnahme und Lokalisation von Metallen in humanen Zellen optisch zu untersuchen. Die charakteristischen Merkmale der Fibroblasten sind in diesem Abschnitt dargestellt. Fibroblasten sind adhärenente Zellen, die in Tieren das faserige Bindegewebe bilden. Sie besitzen eine längliche, rechteckige oder dreieckige Form, die eine Länge von 50 μm bis zu 100 μm und eine Breite bis zu 30 μm aufweisen können. Sie sind etwa 3 μm dick und bewegen sich von einer eher konvexen Frontseite aus vorwärts. Charakteristisch für Fibroblasten sind u.a. die irregulären Zellfortsätze, durch die sie in Kultur ein typisches Netzwerk durch den Kontakt zu anderen Zellen ausbilden. Weiterhin ist ihr heller Zellkern mit deutlich sichtbaren Nukleoli, ein großes Netzwerk des ER und ein gut entwickelter Golgi-Apparat typisch für Fibroblasten. Die Zellform und die Bewegung geht hauptsächlich von einem Aktin-Myosin-System aus, das sich in Bündeln von Mikrofilamenten von bis zu 1 μm Dicke und mehreren μm Länge parallel zur Bewegungsrichtung organisiert (Abercrombie, 1978). Fibroblasten sezernieren Kollagene (Green *et al.*, 1966) und andere Matrixkomponenten wie Proteoglykane, die die Adhäsion an Oberflächen gewährleisten. Zu den drei Hauptklassen der Adhäsionsproteine zählen die Ca^{2+} -abhängigen Cadherine und Selectine, sowie Immunglobuline. Cadherine sind integrale Membranproteine, die homotypische Kontakte, also Kontakte mit gleichen Zellen, bilden, wodurch sie für den Zusammenhalt von Zellschichten notwendig sind und gleichzeitig die für die Zelldifferenzierung und Gewebebildung essentiellen Kontakte zwischen Zellen herstellen. Zur Immunglobulinsuperfamilie gehören u.a. die N-CAM-Moleküle (*neural cell adhesion molecule*), die für die Ca^{2+} -unabhängige Zelladhäsion in Nerven- und Muskelzellen verantwortlich sind. Auch diese Proteine gehen homotypische Verbindungen ein. Durch diese spezifischen Proteine wird nicht nur der Zellkontakt zwischen homotypischen Zellen vermittelt, die Proteine verbinden auch das Zellinnere mehrerer Zellen miteinander oder dieses mit der extrazellulären Matrix. Dafür verantwortlich sind u.a. *tight junctions*, Desmosomen und *gap junctions*, die den Austausch kleinerer Moleküle zwischen Zellen erlauben und die Stoffwechselaktivität aller Zellen koordinieren.

1.4.5 Pflanzenzellen

Pflanzenzellen stehen über ihre Wurzeln in direktem Kontakt zu dem Boden, der sie mit Wasser, Nährstoffen und Spurenelementen versorgt. Je nach Bodenart und anthropogenen Einflüssen können sich Metalle zu toxischen Konzentrationen im Boden anreichern, was zu einer erhöhten Aufnahme der Metalle in die Pflanzen führen kann. Die Beobachtung der Metalle im Habitus, aber auch in einzelnen Pflanzenzellen ist daher zunehmend von Bedeutung. Als Testzellen für die Nachweisversuche der Metalle dienten Pflanzenzellen von *Catharanthus roseus*, dem Madagaskar-Immergrün. Merkmale, Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Pflanzenzellen allgemein zu Fibroblasten werden zur Übersicht in diesem Abschnitt beschrieben.

Pflanzenzellen sind in ihrem Grundaufbau den tierischen Zellen sehr ähnlich. Wie jede höher entwickelte Zelle besitzen Pflanzenzellen eine semipermeable Plasmamembran, die das Zellinnere, in die Kanalproteine, periphere Proteine, Cholesterin und Glycoproteine eingebettet sind. Sie besitzen im Zytoplasma Organellen wie den zuvor beschriebenen Zellkern, ER, Golgi-Apparat und Mitochondrien. Zusätzlich enthalten Pflanzenzellen Chloroplasten, die Chlorophyll enthalten und während der Photosynthese Lichtenergie in chemische Energie in Form von Glucose umwandeln. Das Hauptvolumen von bis zu 70 % wird in Pflanzenzellen durch Vakuolen im Zytoplasma eingenommen, die von einer selektivpermeablen Barriere, dem Tonoplasten, umgeben sind, der das Zytosol von dem Vakuoleninhalt trennt. Vakuolen dienen Pflanzenzellen oft als Speicherort für Farbstoffe oder Giftstoffe, aber auch als Reservoir für Nährstoffe und Stoffwechselintermediate. Sehr bedeutend für Pflanzenzellen ist die Ausbildung einer Zellwand, die die Zytoplasmamembran umgibt. Sie verleiht der Pflanzenzelle ihre Form, Stabilität gegen den internen und externen Druck und ist eine Barriere für bestimmte Moleküle. Gleichzeitig ermöglicht sie jedoch die Aufnahme von Nährstoffen für den Metabolismus im Zytosol und die Abgabe von Stoffen nach außen. Die Zellwand besteht aus einer komplexen Mischung von Kohlenhydraten, Proteinen und weiteren Verbindungen wie Cutin (Showalter, 1993) und anorganischen Bestandteilen. Durch die Anlagerung von Cellulose (Hon, 1994) an die Mittellamelle entsteht die primäre Zellwand. Zu diesen Mikrofibrillen aus Cellulose werden weitere Polysaccharide wie Hemicellulose sowie Strukturproteine und Enzyme eingelagert, die zur Bildung der Zellwand beitragen (Heredia *et al.*, 1995).

1.5 Nachweis von Metallen in Zellen

Die Toxizität eines Ions bzw. eines Metalls kann je nach Verbindung oder chemischer Eigenschaft stark variieren. Um Informationen über chemische Verbindungen und damit ihre potenzielle Wirkung in einem Organismus oder einer Zelle zu erhalten, sind detaillierte Analysemethoden notwendig. Im folgenden Abschnitt werden gängige chemische Analyseverfahren zur Speziation vorgestellt.

1.5.1 Nachweis von Metallen in *bulk*-Material

Bisherige Untersuchungen in der Spurenanalytik konzentrierten sich auf Methoden für *bulk*-Material, also für große Probenmengen aus verschiedenen Bestandteilen, die sehr genaue Informationen liefern, welche Spezies in einer Probe vorhanden sind. Ein wichtiges System für die Speziation ist die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (*inductively coupled plasma - mass spectrometry*, ICP-MS), die eine sehr empfindliche Analysenmethode in der anorganischen Elementanalytik darstellt. 1980 wurde die Kopplung des ICP an einen Massenspektrometer von Houk *et al.* beschrieben (Houk *et al.*, 1980).

Mit der ICP-MS können die meisten Elemente des Periodensystems noch in sehr geringen Konzentrationen im Bereich von ng/l bzw. sub ng/l nachgewiesen werden (Skook und Leary, 1996). Weiterhin zeichnet sich die Methode bei der quantitativen Bestimmung durch einen extrem hohen linearen Bereich über bis zu neun Größenordnungen (g/l bis pg/l) aus. Neben quantitativen analytischen Aufgabenstellungen lässt sich mit der ICP-MS auch eine hoch präzise Isotopenanalytik betreiben. Das Prinzip der ICP-MS beruht auf der Erzeugung eines Radiofrequenzfeldes in einer sog. Fackel durch einen Hochfrequenzgenerator und eine Induktionsspule, wodurch eingeführtes Argongas ionisiert wird und ein Plasma entsteht. Die Fackel besteht in den meisten Fällen aus drei konzentrischen Quarzrohren, in welche Argongas mit einer Geschwindigkeit von etwa 1 l/min eingeleitet wird. Im zentralen Rohr der Fackel wird mit dem Argongas ein Aerosol der Probe, die als Flüssigkeit vorliegt, zugeführt, um es im Plasma zu verdampfen und zu ionisieren. Neben Flüssigkeiten kann man auch Feststoffe oder Gase in das Plasma einbringen. Dabei wird der Gasstrom direkt an das Injektorrohr angeschlossen und Feststoffe, die als Pulver vorliegen und vergast werden müssen, werden mit einem Trägerstrom aufgenommen. Sobald im Argongas erste positiv geladene Ionen und die entsprechende Menge Elektronen freigesetzt wurden, werden diese im elektromagnetischen Feld der Induktionsspule beschleunigt. Dabei kollidieren sie mit weiteren Argonatomen und erzeugen durch Ionisierung zusätzliche Ladungsträger. Eine Ionenoptik, die im einfachsten Fall aus einem Zylinder besteht, an die Spannung angelegt wird, bündelt anschließend die Analytationen und leitet den feinen Strahl zu dem Massenspektrometer, der die Ionen ihrer Masse nach detektiert.

Neben der Kopplung eines Plasmas mit dem Massenspektrometer stehen weitere Kopplungsmöglichkeiten zur Verfügung. Bei der Kopplung mit der *time-of-flight* (TOF) Technik wird der Ionenstrahl, der aus der Ionenoptik austritt, paketweise zum Anfang des Flugrohres geleitet. Am anderen Ende des Flugrohres befindet sich der Detektor, der durch negative Spannung beschleunigte positive Ionen detektiert. Da diese Ionen die gleiche (positive) Ladung besitzen, werden sie durch ihre jeweiligen Massen über die Flugweite aufgetrennt und können so differenziert detektiert werden. Eine weitere Technik ist die Quadrupol-Technik, bei der der Ionenstrahl aus der Ionenoptik direkt in das Quadrupol geleitet wird, das aus vier parallel und symmetrisch ausgerichteten, elektrisch leitfähigen Stäben besteht. An diese werden zwei voneinander unabhängige elektrische Spannungen angelegt, die so eingestellt sind, dass es jeweils nur für eine Masse eine stabile Flugbahn gibt, die den Detektor erreicht. Analytische Trennmethode wie *high performance liquid chromatography* (HPLC), Gaschromatographie oder Kapillarelektrophorese lassen sich ebenfalls an die ICP-MS koppeln und erlauben dadurch die Anwendung in der Speziationsanalytik, die u.a. bei der Speziation von Nickel in Hyperakkumulatoren angewendet wurde (Vacchina *et al.*, 2003). Durch die Kopplung der ICP-MS mit einem Laserablationsgerät können Feststoffproben ohne Säureaufschlüsse direkt analysiert werden, indem feinste Teile einer Probe durch einen Laserpuls verdampft und in das Plasma geleitet werden. Damit ist auch eine orts aufgelöste, nahezu zerstörungsfreie Analytik an festen Gegenständen möglich. Andere Methoden zur Elementaranalyse sind *inductively coupled plasma - optical emission spectrometry* (ICP-OES), Röntgenfluoreszenzanalyse (XRF) oder die Atom-Absorptions-Spektrometrie (AAS) (Skook und Leary, 1996). Für die genannten Analysemethoden sind meist große Probenmengen nötig. Sie erlauben keine kontinuierliche Beobachtung lebender Systeme. Detailinformationen über die Lokalisation einer Spezies in einer lebenden Zelle sind oft nur nach zentrifugalen Trennmethode von Zellbestandteilen möglich.

1.5.2 Nachweis von Metallen in der Zelle durch Fluoreszenz

Um Informationen über die Wirkung von Kationen in Zellen zu gewinnen, sei es über Stoffwechsel relevante Ionen wie Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} oder Ca^{2+} oder toxische sowie kanzerogene Verbindungen mit Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} oder Co^{2+} , müssen stoffwechselverträgliche und selektive Nachweismethode gefunden werden, die eine kontinuierliche Beobachtung in lebenden Zellen erlauben. Bei einigen Metallen wie Europium (Eu) (Tits *et al.*, 2003), Curium (Cm) (Stumpf *et al.*, 2001) oder Uran (Arnold *et al.*, 2006) konnte eine spezifische Eigenfluoreszenz des jeweiligen Feststoffes nachgewiesen werden, die jedoch zum Teil einen beträchtlichen Energieeintrag von Lasern erfordern, der die Zellen schädigen würde oder eine hohe Eigenfluoreszenz der Zellbestandteile bewirkt. Um Ionen sichtbar zu machen, die selbst nicht die Fähigkeit zur Fluoreszenz besitzen, werden Fluoreszenzfarbstoffe, sog. optische Sensoren, eingesetzt, die mehr

oder weniger spezifisch die *target*-Ionen binden und mikroskopisch detektiert werden können. Fluoreszenz beschreibt einen Licht emittierenden Prozess, der durch Anregung mit Licht höherer Energie ausgelöst wird. Bei der Anregung eines Moleküls oder Fluorophores durch Licht bestimmter Wellenlänge kommt es zu elektrischen Energieübergängen, die keine Änderung des Elektronenspins beinhalten (Skook und Leary, 1996). Der angeregte Fluorophor verweilt nach der Absorption des Anregungslichts nur eine kurze Zeit von etwa 0,01 ms im angeregten Zustand S_1 oder S_2 , woraufhin dieser in seinen Grundzustand S_0 zurückkehrt. Ein Teil der Energie geht dabei durch einen nicht strahlenden Prozess wie der Schwingungsrelaxation verloren, der Großteil der Energie wird jedoch durch Fluoreszenz abgegeben. Durch den Übergang eines elektronisch angeregten Systems in einen Zustand niedriger Energie wird energieärmeres Licht emittiert. Ein Jablonski-Diagramm stellt dieses System dar (s. Abbildung 1.6).

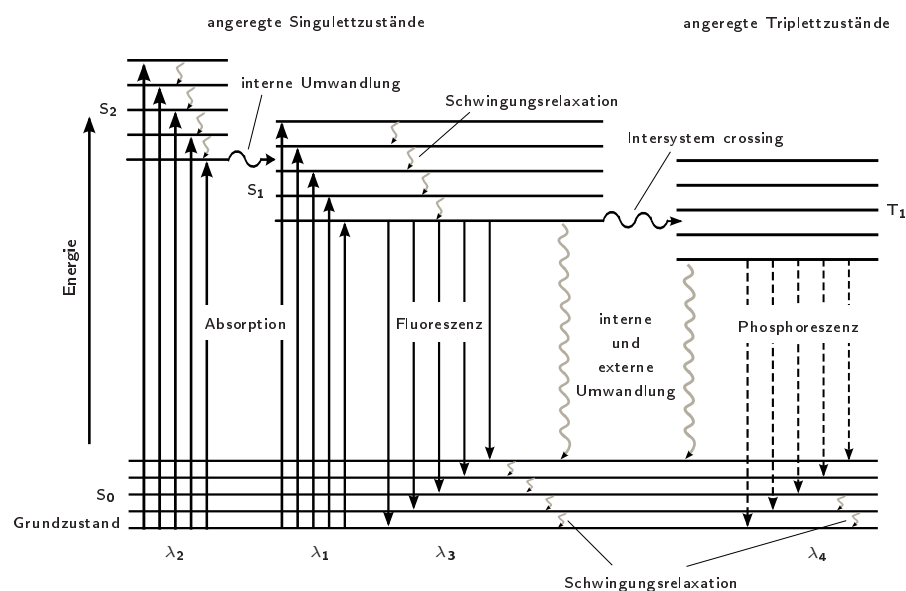


Abbildung 1.6: Jablonski-Diagramm. Partielles Energie-Diagramm eines photolumineszierenden Systems (nach Skook und Leary, 1996). Ein Molekül wird durch Lichtenergie angeregt, sodass es von seinem Grundzustand S_0 in einen angeregten Zustand S_1 oder S_2 übergeht. Nach kurzer Zeit kehrt das Molekül in seinen Grundzustand zurück, wobei ein Großteil der Energie als Fluoreszenz abgegeben wird. Da ein Teil der Energie in nicht strahlenden Prozessen verloren geht, ist die Fluoreszenzstrahlung energieärmer.

Das Jablonski-Diagramm zeigt die relative Lage der elektronischen Energieniveaus eines Moleküls und die beim Elektronenübergang freiwerdenden Energien, die bei der Absorption und Emission von Photonen auftreten. In bindenden Orbitalen liegen die Elektronen normalerweise mit antiparallelem Spin vor, was die sog. Singulett-Zustände S_0 , S_1 oder S_2 charakterisiert. Durch Absorption eines Anregungsphotons ($h\nu$) wird ein Elektron aus dem Grundzustand S_0 in einen der angeregten Zustände S_1 oder S_2 befördert. Aus dem energetisch höher gelegenen angeregten Zustand S_2 ist ein strahlungsloser Übergang in S_1 möglich, ebenso wie von S_1 nach S_0 . Fällt das Elektron in den Grundzustand zurück, entsteht meist Fluoreszenz, d.h., frei werdende

Energie wird in Form von Fluoreszenzphotonen ($h\nu_f$) emittiert. Da die Gesamtenergie konstant bleibt und ein Teil der Anregungsenergie durch Schwingungsrelaxation verloren geht, besitzt das emittierte Licht eine höhere Wellenlänge und damit geringere Energie – man spricht von der Stokes-Verschiebung (Skook und Leary, 1996; Stokes, 1852).

Kato *et al.* (1994) und Wang *et al.* (2004, 2005b, 2005c, 2005d) wählten zum Nachweis von U(VI) zunächst einen Ansatz zur Detektion der Eigenfluoreszenz von U(VI) (Arnold *et al.*, 2006), die Stokes bereits 1853 erforschte (Stokes, 1853), um die chemische Speziation von Uranyl (UO_2^{2+}) in Sedimenten zu beobachten. Die Untersuchungen ergaben, dass die Intensität des Fluoreszenzspektrums und Auflösung sowie die Fluoreszenzlifetime nach Anregung mit einem gepulsten Laser bei 415 nm und Temperaturen nahe der des flüssigen Heliums stark anstieg und ein Maximum bei etwa 517 nm aufwies (Wang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005b; Wang *et al.*, 2005a). Der Eintrag solch hoher Energien ist für die Beobachtung lebender Zellen nicht geeignet, da die Eigenfluoreszenz sehr hoch wäre und die Zellen unter Umständen geschädigt würden. Somit ist der Nachweis von Metallen in lebenden Zellen durch Eigenfluoreszenz lediglich möglich, wenn die Eigenfluoreszenz der Metalle stark genug ist, um nach Anregung mit Licht aus dem sichtbaren Bereich unter biologisch geeigneten Bedingungen detektiert zu werden. Deshalb werden immer neue Fluoreszenzfarbstoffe entwickelt, die bestimmte (divalente) Kationen oder Metalle detektieren. Generell sind fluoreszierende Systeme zumeist Moleküle mit aromatischen Kohlenwasserstoffen wie Anthracen, Naphthalin oder Stilben. Diese Moleküle absorbieren im UV-Bereich und emittieren Licht in einem Wellenlängenbereich von 400 nm bis 500 nm.

Aber auch Heterozyklen, die eine Ringstruktur mit ein oder mehreren Heteroatomen aufweisen, zählen zu fluoreszierenden Molekülen. So beobachtet man auch bei den Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin und Histidin, die ein aromatisches Indol-Ringsystem bzw. heterozyklische Ringe, enthalten, nach Anregung mit UV-Licht Fluoreszenz. Proteine oder Peptide, die diese Aminosäuren enthalten, fluoreszieren ebenfalls.

1.5.2.1 Optische Sensoren für Kationen in Zellen

Moleküle, die als Sensor für Metallionen in Zellen, v.a. in lebenden Zellen, dienen sollen, müssen bestimmte Bedingungen erfüllen. Sie müssen ein bestimmtes Ion gegenüber biologisch zahlreich vorkommenden Kationen wie Na^+ , K^+ , Mg^{2+} und Ca^{2+} diskriminieren, kompatibel mit biologischen Systemen sein, d.h. wasserlöslich und die Untersuchung extrazellulärer, intrazellulärer und subzellulärer Regionen erlauben, dabei aber nicht zytotoxisch wirken. Innerhalb einer Zelle ist es den optischen Sensoren durch eine Erkennungseinheit, dem Ionophor, möglich, die *target*-Ionen zu binden und diese Information an den Signalteil weiterzuleiten. Besteht der Signalteil aus einem Fluorophor, wird die Information über die Bindung eines *target*-Ions in ein optisches

Signal in Form von Änderungen der photooptischen Eigenschaften wie Absorption und Emission des Fluorophors übersetzt, die zumeist auf Elektronentransfer (*photoinduced electron transfer*), Ladungstransfer (*photoinduced charge transfer*) oder Energietransfer zurückzuführen sind (Valeur und Leray, 2000). Die Erkennungseinheit ist dabei für die Selektivität und Effizienz der Bindung verantwortlich, die von der Ligandentopologie, der Kationeneigenschaften und den Lösungsmittleigenschaften abhängt (Kuswandi, 2000). Fluorophore sind Ja/Nein-Systeme, d.h., dass entweder die komplexierte oder die nicht-komplexierte Form fluoresziert und es keine Übergangsformen gibt. Einige Sensoren machen sich die Lumineszenzlöschung durch Schwermetalle zu Nutze, die im Falle von Fe^{3+} , Co^{2+} und Ni^{2+} auf die hohe Anzahl von ungepaarten *spins* zurückzuführen ist (Kuswandi, 2000). Letztendlich sind „*turn-on*“-Systeme mit Erhöhung der Emission oder einem *shift* des Anregungs- und Emissionsprofils gegenüber „*turn-off*“-Systemen mit Emissionslöschung (*quenching*) vorzuziehen (Domaille *et al.*, 2008). Absorbieren diese Farbstoffe im sichtbaren Licht, werden Zellschäden reduziert und die Eigenfluoreszenz von Zellbestandteilen minimiert.

1.5.2.2 Optische Sensoren basierend auf Dichlorofluorescein (DCF)

Für Kationen wie Zn^{2+} (Burdette *et al.*, 2001; Nolan und Lippard, 2001; Gee *et al.*, 2002; Shults *et al.*, 2003; Devinney II *et al.*, 2005), Cu^{2+} (Krämer, 1998) und Fe^{2+} (Thomas *et al.*, 1999; Petrat *et al.*, 2001), denen eine große physiologische Bedeutung zukommt, existieren zahlreiche Fluoreszenzfarbstoffe, die überwiegend Fluorescein als Grundbaustein enthalten (s. Abbildung 1.7) (Muylle *et al.*, 2006). Zinpyr-1 z.B. beinhaltet einen DCF-Reporter, funktionalisiert mit zwei Di-2-Picolylamin-Rezeptoren, dessen Fluoreszenzintensität durch Zn^{2+} -Bindung dreifach erhöht wird (Walkup *et al.*, 2000; Burdette *et al.*, 2001). Die Zinpyr-Farbstoffe, aber auch FluoZin-3 werden in weiten Bereichen der Biologie verwendet, von *Zn-imaging* in Hippocampuszellen (Woodroffe *et al.*, 2004) bis hin zur Verteilung von Zink in *Arabidopsis thaliana* Pflanzenwurzeln (Sinclair *et al.*, 2007) oder Hematozyten (Muylle *et al.*, 2006).

Sensoren, die DCF enthalten, funktionieren nach dem erwähnten Prinzip des *internal charge transfer*, bei dem die Bindung von Metallionen die Elektron-abgebenden Eigenschaften des Elektronen-reichen Rezeptors in seinen photoangeregten Zustand und damit die Fluoreszenzeigenschaften verändert (Gee *et al.*, 2002). Calcein, ein *turn-off*-Farbstoff, beinhaltet einen Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; *ethylenediaminetetraacetic acid*) ähnlichen Rezeptor, der eine zehnfach höhere Selektivität für Fe^{2+} gegenüber Fe^{3+} zeigt, aber gleichzeitig auch signifikante Beeinflussung durch weitere divalente Kationen wie Cu^{2+} , Ni^{2+} und Co^{2+} aufweist (Haugland, 2002).

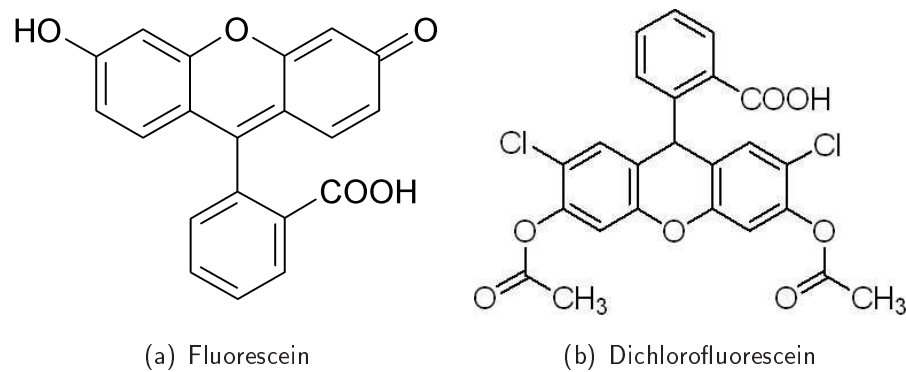


Abbildung 1.7: Fluorescein und Dichlorofluorescein. Fluorescein und Dichlorofluorescein sind die Grundbausteine vieler Fluoreszenzfarbstoffe für die Detektion von divalenten Kationen wie Zn^{2+} , Cu^{2+} und Fe^{2+} . (a) Fluorescein; (b) Dichlorofluorescein.

Es existieren weitere zahlreiche Fluoreszenzfarbstoffe u.a. für Hg^{2+} , Cd^{2+} oder Zn^{2+} , die von Chen und Kollegen (2004) sowie Hinkle und Kollegen (1992) näher beschrieben werden. Für den Nachweis von Ni^{2+} und Co^{2+} existiert ein ebenfalls auf DCF basierender *turn-on* Farbstoff – Newport Green DCF, der in Abschnitt 2.4 näher beschrieben wird. Dieser Fluoreszenzfarbstoff wurde vielfältig genutzt, um unterschiedliche Kationen in Zellen nachzuweisen. Zhao und Kollegen (2009) verglichen die Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF ($10 \mu\text{M}$) nach Zugabe verschiedener Kationen wie Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} und Fe^{3+} und zeigten, dass diese Kationen die Fluoreszenzintensität deutlich stärker erhöhten als Zn^{2+} (das in Zellen natürlicherweise vorkommt). Bereits bei geringen Metallkonzentrationen in einem Bereich von $0,1 \mu\text{M}$ bis zu $2 \mu\text{M}$ nahm die Fluoreszenzintensität exponentiell zu und ging dann in eine Sättigung über. Co^{2+} bewirkte erst bei Konzentrationen von $3 \mu\text{M}$ eine exponentielle Zunahme der Fluoreszenz bis zu einer Konzentration von $200 \mu\text{M}$, ab der Newport Green DCF nur noch mit geringer Fluoreszenzzunahme reagierte (Zhao *et al.*, 2009). Neben beschriebenen Ni^{2+} - oder Co^{2+} -Analysen mit Newport Green DCF durch Spektrometrie in Zellen (Ingle *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2009) benutzten Costa und Kollegen (2005) Newport Green DCF um Ni^{2+} in Tumorzellen (A549) durch Konfokale Fluoreszenzmikroskopie nachzuweisen. Es konnte gezeigt werden, dass nach Inkubation mit 10 mg/ml NiS (Nickelsulfid) ein Großteil der Ni^{2+} -Ionen im Zellkern lokalisiert war. Nach der Zugabe von 1 mM NiCl_2 wurde Fluoreszenz im Zytosol lokalisiert, bei längerer Inkubation akkumulierten Ni^{2+} -Ionen auch im Zellkern. Ke und Kollegen (2006, 2007) zeigten Ähnliches für wasserlösliche und wasserunlösliche Nickelverbindungen. Nach ausreichender Inkubationszeit mit einer wasserlöslichen und wasserunlöslichen Nickelverbindung war Nickel sowohl im Zytosol als auch im Zellkern detektierbar. So erlangte man über diese Arbeiten weiterführende Informationen über die zelluläre Lokalisation von Nickel, zusätzlich zu den Ergebnissen von Thierse *et al.* (2007), der durch FACS (*fluorescence activated cell sorting*)-Analysen zwar extrazelluläres und intrazelluläres Nickel unterscheiden konnte, aber über den genauen Verbleib in der Zelle keine

Informationen erhielt. Cadosch und Kollegen (2009, 2010) benutzten ebenfalls FACS-Analysen, um Titan (Ti) in Zellen sowie membrangebundenes Titan zu lokalisieren. Der Titannachweis mittels Newport Green DCF ist zusätzlich mit dem CLSM (*confocal laser scanning microscope*) möglich.

1.6 Zielsetzung

Metalle haben eine große Bedeutung für den Metabolismus von Lebewesen. Die Metalle, oft Übergangsmetalle wie Zink, Cobalt, Eisen, aber auch Nickel, sind meist als Cofaktoren von Enzymen oder in Metallkomplexen zu finden und dadurch essentiell. Für ihre Aufgabe in den Zellen sind geringe intrazelluläre Konzentrationen ausreichend, sodass diese Elemente auch als Spurenelemente bezeichnet werden. Unter normalen Bedingungen herrscht ein Gleichgewicht der Metallkonzentrationen in den Zellen, doch u.a. durch anthropogene Einflüsse sind Pflanzen und Menschen zunehmend hohen Konzentrationen von Übergangsmetallen im Boden oder der Luft ausgesetzt. Über zahlreiche Wege werden diese in die Organismen aufgenommen und akkumulieren, was zu gesundheitlichen Schäden führen kann. Im Laufe der Nahrungskette können durch Metall belastete Pflanzen Tiere und letztendlich der Mensch zusätzlich mit Schwermetallen belastet werden.

Welchen Einfluss die Metalle in den Zellen auf den Metabolismus haben, ist oft von der Spezies, ihrer Konzentration und der Lokalisation in der Zelle abhängig. Durch etablierte Methoden in der Spurenanalytik wie z.B. der ICP-MS oder ähnlichen Methoden erlangt man sehr genaue Informationen über die Spezies, doch wird hierfür *bulk*-Material eingesetzt, sodass keine Informationen über die Lokalisation der Metalle oder deren Spezies in der Zelle gewonnen werden. Intrazelluläre Reaktionen mit Zellbestandteilen und Austauschreaktionen oder Interaktionen zwischen Zellkompartimenten können ebenfalls nicht beobachtet werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Metalle Nickel und Cobalt spezifisch in einzelnen lebenden Zellen zu detektieren und zu lokalisieren. Für die Detektion von Übergangsmetallen in einzelnen lebenden Zellen mit hoher lateraler Auflösung eignen sich optische Techniken wie die CLSM, die zunächst die Visualisierung von einzelnen lebenden Zellen mit einer lateralen Auflösung von etwa 300 nm ermöglicht. Mit dem CLSM können parallel zu Transmissionsaufnahmen nach der Anregung mit drei verschiedenen Lasern drei Fluoreszenzsignale gleichzeitig detektiert werden, sodass diese durch die Detektion der Eigenfluoreszenz oder Kompartiment-spezifischer Farbstoffe in den Zellen visualisiert werden können. Weiterhin wird die Möglichkeit der direkten Detektion von Metallen durch deren Eigenfluoreszenz oder der indirekten Detektion durch sensitive und spezifische optische Sensoren wie Newport Green DCF, der durch die Komplexbildung der Kationen mit verstärkter Fluoreszenzintensität reagiert, getestet. Durch die Detektion dieser Metalle in

einzelnen lebenden Zellen und der Visualisierung von Zellkompartimenten wird die Aufnahme und Lokalisation von Nickel und Cobalt in Zellen in Abhängigkeit von der Metallkonzentration im Kulturmedium und der Inkubationszeit in humanen Zellen und Pflanzenzellen beobachtet und Unterschiede sowie Gemeinsamkeiten zwischen diesen Zelltypen bestimmt. Die Änderung des pH-Wertes im Kulturmedium von Fibroblasten wird weiterführend die Beeinflussung des extrazellulären pH-Wertes auf die Aufnahme und die Lokalisation der Metalle aufzeigen.

Aufnahmen von Fluoreszenzspektren in bestimmten ROIs (*region of interest*) in Fibroblasten durch λ -Scans werden genutzt, um mögliche Unterschiede der Fluoreszenzspektren des optischen Sensors Newport Green DCF in Abhängigkeit der Komplexepartner und Spezies von Nickel und Cobalt zu erhalten, um die Spezies unterscheiden zu können.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Allgemeine Laborgeräte und Reagenzien

2.1.1 Allgemeine Laborgeräte

Tabelle 2.1: Laborgeräte

Gerät	Typ/Hersteller
CLSM	Leica TCS SP2 X1 (Leica Microsystems Heidelberg, Mannheim)
CLSM Objektiv	40x; HCX Apo 40x/0,8 W U-V I (Leica Microsystems Heidelberg, Mannheim) 63x; HCX PL AP 63x/1,2 W Corr Cs (Leica Microsystems Heidelberg, Mannheim) 50x; HC PL Fluotar 50x/0,8 (Leica Microsystems Heidelberg, Mannheim)
CO ₂ -Inkubator	HERAcell 240 i (Thermo Scientific, Langenselbold)
Feinwaage	Sartorius micro (Sartorius AG, Göttingen)
Magnetrührer	SLR (Schott Instruments, Mainz)
pH-Meter	WTW Series pH 720 (InoLab, Weilheim)
Pipettiergerät	Pipetboy acu (INTEGRA Biosciences, Fernwald)
Pipetten	Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg)
Schüttler	Roto Shake Genie (Scientific Industries, New York)
Schüttler	Certomat MO II (Sartorius, Göttingen)
Sicherheitswerkbank	Microflow Biological Safety Cabinet (Nunc – Thermo Fisher Scientific, Langenselbold)

Gerät	Typ/Hersteller
Vortex	Stuart Vortex Mixer SA8 (Bibby Scientific Limited, Staffordshire)
Wasserbad	1083 (GFL, Burgwedel)
Zentrifuge	Sorvall RT 6000 D; Rotor H-1000 B (Thermo Scientific, Langenselbold)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien

Material	Typ/Hersteller
Einfrierröhrchen	1,8 ml (Nalge Company; 5000-0020)
Einmal-Plastikpipetten	5 ml (Greiner-bio-one; Nr.606180) 10 ml (Greiner-bio-one; Nr. 607180)
Filterspitzen	Tip One 0,1-10 μ l (Star Lab; S1120-3810) Tip One 1-200 μ l (Star Lab; S1120-8810) Tip One 101-1000 μ l (Star Lab; S1126-7810)
Einwegplastikschalen	\varnothing 60 mm / 15 mm (Greiner-bio-one; Nr. 620161)
Polypropylenröhrchen	15 ml (Greiner-bio-one; Nr.188271)
well-Platte	6-well (Nunc; Nr. 40685) 12-well (Greiner-bio-one; Nr. 665180)
Zellkulturflaschen	50 ml (Greiner-bio-one; Nr. 690160)

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 2.3: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
BME-Medium (Basalmedium Eagles) – L-Glutamin	GIBCO invitrogen, Karlsruhe; Nr. 41010
CoCl ₂ ·6H ₂ O (Cobalt(II)chlorid Hexahydrat)	SIGMA Aldrich, Steinheim; Nr. C2911
DCAA (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)	SIGMA Aldrich, Steinheim; Nr. D6679
DMSO (Dimethylsulfoxid)	ROTH, Karlsruhe; Nr. A994
DPBS (Dulbecco´s phosphate buffered saline)	GIBCO invitrogen, Karlsruhe; Nr. 4190
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	BIOCHROM AG, Berlin; L2113

Chemikalie	Hersteller
FBS (<i>fetale bovine serum</i>)	GIBCO invitrogen, Karlsruhe; Nr. 10270
HEPES-Puffer (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure)	GIBCO invitrogen, Karlsruhe; Nr. 15630
L-Glutamin	GIBCO invitrogen, Karlsruhe; Nr. 25030
NP-40 (Nonidet P-40)	SIGMA Aldrich, Steinheim; Nr. N-6507
NAA (<i>1-naphtyl acetic acid</i>)	SIGMA Aldrich, Steinheim; Nr. N1641
NiCl ₂ ·6H ₂ O (Nickel(II)chlorid Hexahydrat)	SIGMA Aldrich, Steinheim; Nr. N6136
NiSO ₄ ·6H ₂ O (Nickel(II)sulfat Hexahydrat)	SIGMA Aldrich, Steinheim; Nr. 467901
Ni ₃ S ₂	SIGMA Aldrich, Steinheim; Nr. 343226
Penicillin/Streptomycin	GIBCO invitrogen, Karlsruhe; Nr. 15140

2.1.4 Zellkulturmedien und Medienzusätze

Tabelle 2.4: Zellkulturmedien und Medienzusätze

Reagenzien	Menge
BME-Medium zur Anzucht von Fibroblasten (Eagle, 1955a; Eagle, 1955b) (GIBCO invitrogen, Karlsruhe; Nr. 41010-026)	
BME – L-Glutamin	500 ml
FBS	50 ml 10 % (v/v)
L-Glutamin [200 mM]	10 ml 4 mM
HEPES [1 M]	10 ml 20 mM
Penicillin/Streptomycin	1 ml 10000 U / 10 mg
Linsmaier und Skoog (LS)-Medium zur Anzucht von Pflanzenzellen (Linsmaier und Skoog, 1965; Lindl, 2002)	
LS-Stocklösung	50 ml
Zucker	30 g
DCAA-Stocklösung	220 µl
NAA-Stocklösung	186 µl
H ₂ O	ad 1 l
pH	5,5 – 6
Stocklösung (1 l) für LS-Medium	
NH ₄ NO ₃	33 g
KNO ₃	38 g

Reagenzien	Menge
KH_2PO_4	3,4 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8,8 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,4 g
H_3BO_3	0,124 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,338 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,212 g
KI	0,0166 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,005 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0005 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0005 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,556 g
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,826 g
Vit B1 (Thiamin-Hydrochlorid)	0,008 g
Myo-Inositol	2 g
DCAA	1 mg/ml Ethanol
NAA	1 mg/ml Ethanol

2.1.5 Fluoreszenzfarbstoffe

Tabelle 2.5: Fluoreszenzfarbstoffe

Farbstoff	Hersteller	Ex/Em-Max [nm]
Bodipy [®] TR C ₅	Molecular Probes invitrogen; Nr. B34400	589/616
CellMask [™] deep red	Molecular Probes invitrogen; Nr. C10046	649/666
ER-Tracker [™] Red	Molecular Probes invitrogen; Nr. E34250	587/615
Hoechst 33342	Molecular Probes invitrogen; Nr. H3570	350/461
Newport Green [™] DCF Di-Kaliumsalz	Molecular Probes invitrogen; Nr. N7990	505/535
Newport Green [™] DCF Diacetat	Molecular Probes invitrogen; Nr. N7991	505/535
SYTO [®] 61	Molecular Probes invitrogen; Nr. S11343	628/645
Vybrant [™] Dil	Molecular Probes invitrogen; Nr. V22885	549/565

2.2 Zellbiologische Methoden

Zellen, die aus Gewebe isoliert werden und in Suspension oder als Monolayer auf Oberflächen wachsen, benötigen bestimmte Bedingungen für ein optimales Wachstum. Diese Bedingungen wie die Temperatur, eine bestimmte CO₂-Konzentration und die Luftfeuchtigkeit variieren von Zelltyp zu Zelltyp und können durch die Inkubation in einem Brutschrank gewährleistet werden. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden sterilisierte Materialien verwendet und Gefäße nur unter einer Sterilbank geöffnet. Im Folgenden werden sowohl die Eigenschaften und Merkmale von Fibroblasten und Pflanzenzellen, als auch deren Inkubationsbedingungen beschrieben.

2.2.1 Verwendete Zellen

2.2.1.1 Humane Gingiva-Fibroblasten

Bei den verwendeten Fibroblasten handelte es sich um Zellen aus humanem Zahnfleischbindegewebe. Diese adhären humanen Gingiva-Fibroblasten sezernieren Kollagene und andere Matrixkomponenten, die an Oberflächen binden und deren Gestalt maßgeblich von Aktin haltigen Stressfasern bestimmt wird. Sie bilden das faserige Bindegewebe in Tieren und Menschen. Charakteristisch sind die vielen irregulären zytoplasmatischen Fortsätze und der große Zellkern (s. Abschnitt 1.4.4). In Zellkultur sind Fibroblasten weniger stark differenziert als im Organismus.

2.2.1.2 Pflanzenzellen aus *Catharanthus roseus*

Für Versuche mit Einzelzellen aus Pflanzen wurden Suspensionszellen von *Catharanthus roseus* verwendet, die aus Kalluskulturen gewonnen wurden. Diese wurden zuvor aus Meristemgewebe hergestellt, das auf Nährmedium mit Phytohormonen und Agar angezogen wurde. Durch die Erhöhung des Vitamin- und Phytohormongehaltes im Medium konnte die Kallusbeschaffenheit so modifiziert werden, dass die Kalli als Zellsuspension leicht in flüssigem Medium unter Schütteln weiter wuchsen (Lindl, 2002).

2.2.2 Kultivierung von Zellen

2.2.2.1 Anlage humaner adhärenter Zellen

Humane Gingiva-Fibroblasten wurden als Vertreter humaner Zellen für Versuche verwendet, in denen Metallionen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit verschiedenen Metallkonzentrationen in einzelnen lebenden humanen Zellen nachgewiesen werden sollten.

Verwendete Materialien:

- BME-Medium (s. Tabelle 2.4)
- 0,05 % EDTA in PBS
- HCl
- NaOH

Durchführung:

Die humanen Gingiva-Fibroblasten wurden in beschichteten 50 ml Kulturflaschen als Monolayer bei 37 °C und 5 % CO₂ mit 4 ml BME-Medium kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurde das Medium gewechselt. Erreichte die Kultur eine Konfluenz von 70 % bis 90 %, wurden die Zellen in neue Flaschen überführt. Beim Passagieren wurde zunächst das Medium entfernt und die Kulturflasche mit 1 ml EDTA (0,05 % in PBS ohne MgCl₂ und CaCl₂) gespült. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml EDTA für 15 min bei 37 °C inkubiert, durch kräftiges Klopfen vom Boden gelöst und in 4 ml BME-Medium aufgenommen. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in eine neue Flasche überführt, in die jeweils 4 ml BME-Medium vorgelegt wurden.

Für die Untersuchungen mit dem CLSM wurden die Zellen auf die gleiche Art wie zuvor beschrieben in 6-*well*-Platten bzw. Petrischalen (Ø 60 mm/15 mm) überführt. Dazu wurden die Fibroblasten wie beschrieben mit EDTA abgelöst, die Zellen in 6 ml Medium aufgenommen und je 1 ml in die *wells* bzw. 2 ml in die Petrischalen überführt. Die *wells* wurden bis zu einem Volumen von 3 ml, die Petrischalen bis 5 ml mit Medium supplementiert.

Beim Expandieren der Zellen wurde ähnlich verfahren. Die Zellen wurden mit EDTA (0,05 %) von dem Flaschenboden abgelöst, die Kulturflaschen mit 4 ml BME gespült und jeweils 2 ml der Suspension in zwei neue Flaschen überführt, die mit 2 ml BME aufgefüllt wurden. 24 h nach dem Überführen bzw. Expandieren der Zellen wurde das Medium nochmals gewechselt, um verbliebenes EDTA zu entfernen.

Zur Ermittlung der pH-abhängigen Metallaufnahme in die Zellen wurde der pH-Wert des BME-Mediums mit HCl auf ca. pH 5 bzw. mit NaOH auf ca. pH 9 eingestellt. Schwankungen im pH-Wert durch die Inkubation im Brutschrank mit CO₂-Zuführung wurden nicht ausgeglichen. Die Zellen wurden je nach Versuch weiter mit Metallverbindungen behandelt.

2.2.2.2 Anlage pflanzlicher Suspensionszellen

Catharanthus roseus wurden als Vertreter der pflanzlichen Zellen für Versuche verwendet, in denen Metallionen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten in lebenden Pflanzenzellen nachgewiesen werden sollen.

Verwendete Materialien:

- LS-Medium (s. Tabelle 2.4)

Durchführung:

Von der *Catharanthus roseus* Zellkultur wurden 200 ml in 500 ml Erlenmeyerkolben mit LS-Medium bei kontinuierlicher Belichtung und einer Temperatur von ca. 22 °C (Raumtemperatur, RT) auf einem Schüttler (Sartorius Certomat MO II) mit 100 UpM kultiviert. Nach sieben Tagen wurden etwa 150 ml der Ausgangskultur in einen 500 ml Erlenmeyerkolben mit 25 ml bis 50 ml frischem LS-Medium überführt.

Für die Nachweisversuche von Ni mit dem CLSM wurden Suspensionskulturen von 150 ml angelegt. In 250 ml Erlenmeyerkolben wurden 100 ml LS-Medium vorgelegt und 50 ml der Zellkultur zugegeben. Die Kultivierung erfolgte ebenfalls bei RT auf dem Schüttler.

2.2.3 Kryokonservierung und Reaktivierung humaner Gingiva-Fibroblasten

Um Fibroblasten über einen längeren Zeitraum zu konservieren, wurde eine Kryokonservierung der Zellen vorgenommen. Die Zellen wurden in Einfriermedium, das DMSO enthält, aufgenommen, um Zellschäden bei der Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -196 °C zu vermeiden.

Verwendete Materialien:

- Einfriermedium: 10 % DMSO in FBS
- EDTA
- BME-Medium

Durchführung:

Zum Einfrieren der Zellen wurde zunächst das Medium aus der Kulturflasche entnommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurde EDTA (0,05 %) zugegeben und die Kultur 15 min bei 37 °C inkubiert, um die Zellen durch Klopfen vom Boden der Kulturflasche abzulösen. Anschließend wurden 10 ml BME-Medium zugegeben, die Suspension in ein 15 ml Polypropylenröhrchen überführt und 6 min bei 125×g zentrifugiert (Sorvall, Langenselbold). Danach wurden die Zellen in 1 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden nach etwa 10 min auf Eis für 1 h bei -20 °C eingefroren und danach für 24 h (bis zu 72 h) bei -80 °C gelagert. Zur dauerhaften Lagerung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt.

Zur Reaktivierung wurden die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen direkt nach dem Entnehmen aus dem Stickstoffbehälter für 2 min in einem Wasserbad bei 37 °C schüttelnd aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml BME-Medium bei 37 °C resuspendiert, in ein 15 ml Polypropylenröhrchen gefüllt und 6 min bei 125×g zentrifugiert. Schließlich wurde das Zellpräzipitat in 2 ml BME-Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche mit 4 ml vorgewärmtem BME-Medium und optimalem pH-Wert zwischen pH 7,0 bis pH 7,6 transferiert. Nach 24 h Inkubation im CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das BME-Medium gewechselt, um verbliebenes DMSO des Einfriermediums zu entfernen (Produktinformation ATCC).

2.3 Konfokale Laser Raster Mikroskopie (CLSM)

Die CLSM wurde erstmals von Marvin Minsky (1955–1961) eingeführt und unterscheidet sich in einigen Punkten von der konventionellen Licht- und Fluoreszenzmikroskopie. Bei der konventionellen Mikroskopie wird eine konventionelle Lichtquelle oder ein Laser eingesetzt, wobei transmittiertes oder reflektiertes Licht durch eine Objektivlinse gesammelt wird, den Mikroskoptubus passiert, daraufhin eine weitere Linse passiert und schließlich als Bild in seiner ursprünglichen Ausrichtung sichtbar wird. Der Aufbau des Strahlengangs bei der konventionellen Mikroskopie kann nicht verhindern, dass Licht, das außerhalb der Fokusebene emittiert oder reflektiert wird, detektiert wird. Die resultierenden Bilder enthalten Informationen sowohl aus der Fokusebene, als auch aus Ebenen darüber und darunter. Eine dreidimensionale Darstellung eines Objektes wird in Folge dessen schwierig und die Bilder sind durch *out-of-focus*-Interferenzen weniger scharf und kontrastreich. Die optische Auflösung bei der konventionellen Mikroskopie ist durch die Wellenlänge limitiert und durch $\frac{1}{2} \lambda$ definiert. Bei der CLSM dagegen wird die Probe mit Laserlicht belichtet, wobei von der Probe emittiertes oder reflektiertes Licht aus einer einzigen Ebene, der Fokalebene, detektiert wird und eine optische Auflösung von 200 nm erreicht werden kann. Sämtliches Licht, das nicht aus dieser Ebene stammt, wird durch eine variabel einstellbare

Detektionslochblende (*pinhole*) unterdrückt. Je kleiner der Durchmesser dieser Lochblende ist, umso weniger Licht gelangt von außerhalb der Fokalebene zum Detektor. Dadurch erhält man ein schärferes Bild mit einer hohen lateralen Tiefenauflösung im Vergleich zur konventionellen Mikroskopie (White *et al.*, 1987; Semwogerere und Weeks, 2005). Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie im Vergleich zur konventionellen Mikroskopie ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

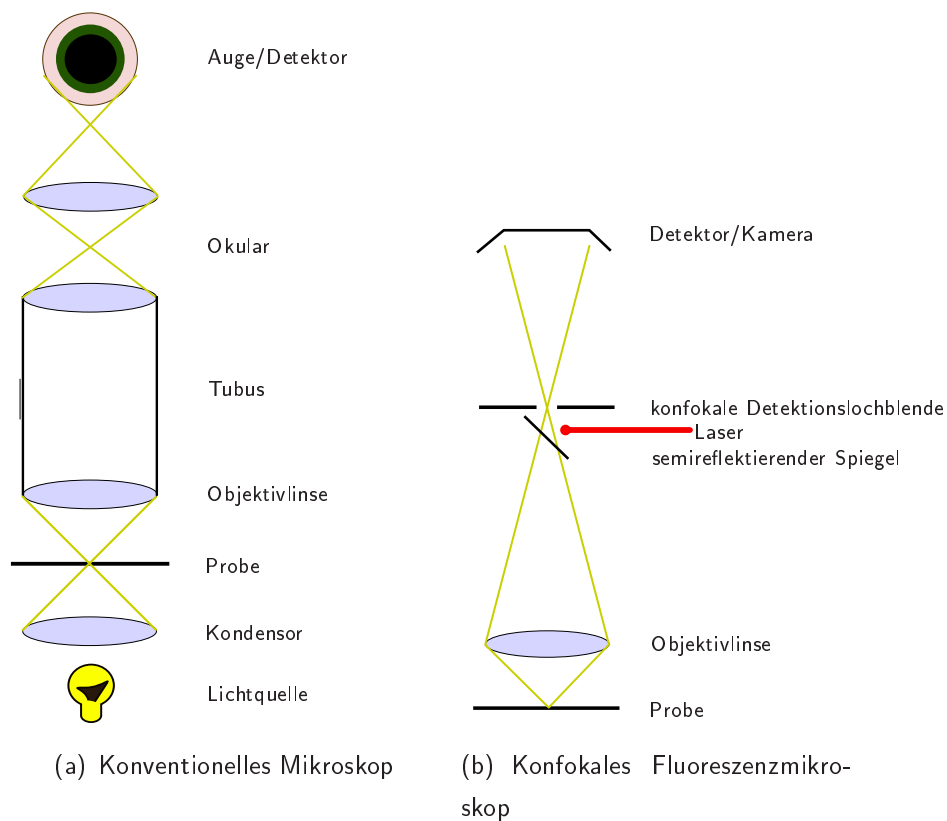


Abbildung 2.1: Vergleich des Strahlengangs eines konventionellen Lichtmikroskops mit dem eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops. (a) Konventionelles Mikroskop: Licht von einer herkömmlichen Lichtquelle trifft nach Passieren des Kondensators auf die Probe. Das die Probe passierende Licht gelangt aus allen Ebenen zur Objektivlinse und über den Tubus zum Okular. Das entstandene Bild besteht aus einer Zusammensetzung der Bilder einzelner Ebenen; (b) Konfokales Fluoreszenzmikroskop: Ein Laserstrahl als Lichtquelle wird über einen Spiegel und die Objektivlinse auf die Probe geleitet. Reflektions- oder Fluoreszenzlicht, das von der Probe emittiert wird, wird von der Objektivlinse aufgenommen und zur konfokalen Detektionslochblende geleitet, die sich vor dem Detektor befindet. Dadurch gelangt lediglich Licht aus einer Ebene, der Fokalebene, zum Detektor.

Als Lichtquelle bei der CLSM werden Laser verwendet, die einen semitransparenten Strahlenteiler passieren, den sog. AOTF (*acousto optical tuneable filter*) (s. Abschnitt 2.3.1). Eine Scanner-Einheit ermöglicht die Belichtung der Probe Zeile für Zeile, was als sog. *line scan* bezeichnet wird, und fügt die einzelnen Bilder zu einem konfokalen Bild zusammen. Dabei bestimmt der *Scanmodus*, welche optischen Ebenen im Präparat beobachtet werden. Grundsätzlich können horizontale *xy*-Schnitte oder vertikale *xz*-Schnitte aufgenommen werden. Durch die Ergänzung

der optischen Schnitte in die dritte Dimension erhält man eine räumliche Darstellung eines Objektes. Aus einer Serie vertikaler *scans*, sog. *slices*, wird mittels Mikroskop-Software *Leica Confocal Software* (LCS) ein dreidimensionales Bild zusammengefügt. Mit Hilfe der CLSM können sowohl transluzente Proben wie Zellen, Bakterien und Weichgewebe, als auch Hartgewebe wie Zähne und Knochen visualisiert werden. Für eine Untersuchung von Oberflächenstrukturen von Hartgeweben eignen sich Trockenobjektive, wohingegen zur Beobachtung von Zellstrukturen Wasser- oder Ölimmersionsojektive verwendet werden. Weitere Informationen sind im Benutzerhandbuch zum CLSM Leica TCS SP2 erhältlich.

2.3.1 Aufbau und Komponenten des CLSM Leica TCS SP2

Das CLSM TCS SP2 von Leica (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim) ist mit drei verschiedenen Lasern ausgestattet, die ein Anregungsspektrum von 488 nm bis 633 nm abdecken. Ein blauer Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm und 514 nm, ein orange-grüner Helium/Neon (He/Ne)-Laser mit den Wellenlängen 543 nm und 594 nm und ein He/Ne-Laser mit einer Wellenlänge von 633 nm ermöglichen durch exakte Einstellung der Anregungswellenlänge und Laserintensität verschiedenste Untersuchungen von Proben im Reflektionsmodus oder Fluoreszenzmodus. Jeder Laserstrahl passiert einen AOTF, der aus einem optisch transparentem Kristall besteht, dessen optische Eigenschaften mittels Ultraschallwellenfeld modifiziert werden (s. Abbildung 2.2). Die Modulation der Kristalleigenschaften des AOTF ermöglicht die Selektion der den Filter passierenden Wellenlängen und die Einstellung der Intensität des Laserstrahls.

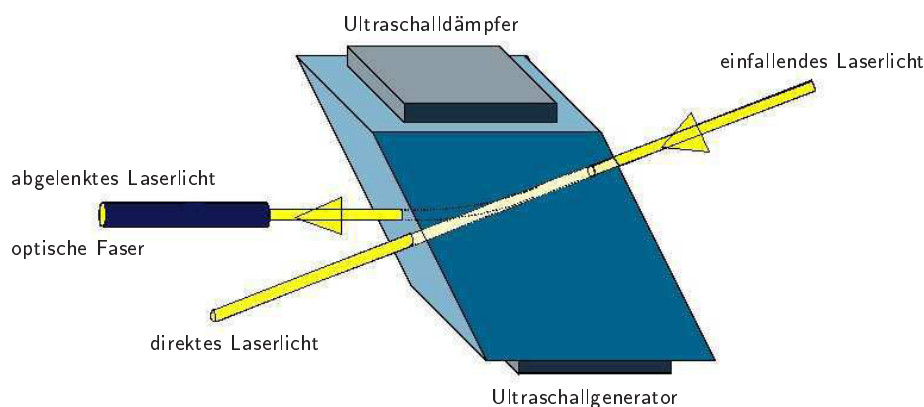


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung eines AOTF. Der AOTF besteht aus einem transparenten Kristall, der durch ein Ultraschallfeld die Einstellung der Wellenlänge und der Intensität eines Laserstrahls ermöglicht (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim).

Der durch das AOTF beeinflusste Laserstrahl passiert die Anregungslochblende und wird über einen akusto-optischen Strahlenteiler (AOBS; *acousto optical beam splitter*) zu dem K-Scanner geleitet, der aus zwei stark reflektierenden Spiegel-ähnlichen Oberflächen besteht, die das Laserlicht durch den hinteren Teil des Objektivs zeilenweise über die Probe leiten. Der Aufbau bzw. die Funktionsweise des AOBS (s. Abbildung 2.3) ist dem des AOTF sehr ähnlich. Der AOBS besteht ebenfalls aus einem optisch transparentem Kristall, der durch akusto-optische Ablenkung mittels Ultraschallwellenfeld gleichzeitig mehrere Anregungslaserlinien zur K-Scanner Einheit leiten kann und ersetzt damit konventionelle AnregungsfILTER. Gleichzeitig wird das Anregungslicht des Lasers auf das Präparat gelenkt und das vom Präparat zurückkommende Fluoreszenzlicht vom reflektierten Anregungslicht getrennt. Der AOBS ist damit ein effektiver Fluoreszenzdetektor (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim).

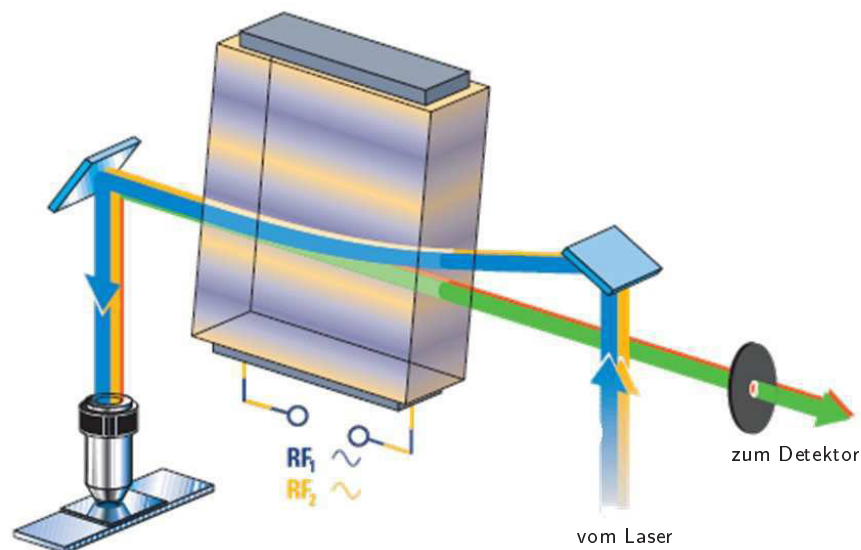


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung eines AOBS. Der AOBS kann durch akusto-optische Beugung einzelne oder verschiedene Anregungswellenlängen eines Lasers gleichzeitig auf eine Probe leiten (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim).

Für das CLSM Leica TCS SP2 stehen verschiedene Objektive zur Verfügung, die die Untersuchung unterschiedlicher Proben ermöglichen. Trockenobjektive mit 2,5-facher oder 10-facher Vergrößerung werden üblicherweise für die Untersuchung von Oberflächenstrukturen an Festkörpern verwendet, Wasser- oder Ölimmersionsojektive mit 20-facher, 40-facher und 63-facher Vergrößerung eignen sich für biologische Präparate wie humane Zellen auf Objektträgern oder in Kultur. Über die Mikroskop-Software LCS sind zudem vier verschiedene *Scangeschwindigkeiten* wählbar (200 Hz, 400 Hz, 800 Hz und 1000 Hz bzw. Bildzeilen/sec), die Einfluss auf die Proben- und die Bildqualität nehmen. Eine niedrige *Scangeschwindigkeit* kann lichtempfindliche Pro-

ben oder Farbstoffe ausbleichen, liefert jedoch durch ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis kontrastreichere Bilder als bei hohen *Scangeschwindigkeiten*. Um Ausbleicheffekte zu verringern, oder um schnelle Veränderungen einer Probe zu beobachten, wählt man daher eine hohe *Scangeschwindigkeit*. Beim *Scanvorgang* wird ein Teil des Lichts von der Probe reflektiert und durch das Objektiv zurück durch den K-Scanner und den AOBS zur konfokalen Detektionslochblende geleitet, die den Licht-limitierenden Faktor im System darstellt. Das Licht, das außerhalb der Fokalebene reflektiert wird, wird an der Konfokalebene von der Blende zurückgehalten, so dass nur Licht aus der Fokalebene zum Detektor hinter der Blende gelangt (s. Abbildung 2.1 und 2.5). Der Blendendurchmesser kann individuell vom Operator auf einen Durchmesser zwischen $20\ \mu\text{m}$ und $600\ \mu\text{m}$ eingestellt werden, wobei es für jedes Objektiv einen optimalen Blendendurchmesser gibt, der mit der Funktion „Airy“ eingestellt und für Leica-Systeme ebenso mit einer Formel berechnet werden kann. Der optimale Öffnungswinkel ist von der Wellenlänge, der Numerischen Apertur und dem Vergrößerungsfaktor des Objektivs abhängig. Eine maximale Auflösung in der z-Dimension, also in der Tiefe, erreicht man mit der Einstellung „Airy 1“, d.h. dass der Durchmesser der konfokalen Detektionslochblende mit dem Durchmesser der Airyscheibe übereinstimmt.

Insgesamt ist das CLSM mit drei Detektoreinheiten ausgestattet, auf die das Licht nach Passieren der konfokalen Detektionslochblende und einem Spektrophotometerprisma trifft. Das reflektierte Licht, bzw. das emittierte Fluoreszenzlicht wird dort in die drei Hauptfarben aufgeteilt und schließlich zu den drei Detektoreinheiten gelenkt (s. Abbildung 2.4).



Abbildung 2.4: Schematische Darstellung eines CLSM-Detektors. Der Detektor ist durch seinen Aufbau in der Lage ausschließlich Licht einer bestimmten Wellenlänge aufzunehmen. Bis zu drei Signale können durch drei Detektoren gleichzeitig aufgenommen werden. Die Empfindlichkeit des Detektors wird durch die Spannung an der Photodiode eingestellt (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim).

Jede Detektoreinheit besteht aus frei beweglichen, reflektierenden Spiegeln, die einen *photomultiplier tube* (PMT) abschirmen und Licht einer bestimmten Wellenlänge, welches nicht auf den Detektor gelangen soll, zum nächsten Detektor lenken und bei diesem Detektor ebenso verfahren. Dadurch können bis zu drei Lichtsignale parallel aufgenommen werden. Die Empfindlichkeit des PMT ist durch die Beschleunigungsspannung (*PMT-voltage*) an der Photodiode einstellbar. Eine zu hohe Beschleunigungsspannung führt dabei zur Überlastung des Detektors, wohingegen durch eine zu geringe Spannung am Photomultiplier kein elektrisches Signal aus den ankommenden Photonen erzeugt werden kann. Auf den Detektor treffendes, störendes Licht verursacht ebenfalls ein elektrisches Signal innerhalb des PMT, das durch die Beschleunigungsspannung in gleichem Maße verstärkt wird wie tatsächlich von der Probe stammendes Licht. Somit werden alle elektrischen Signale, die von den Detektoren gesammelt werden, von der Mikroskop-Software LCS in ein konfokales Bild konvertiert und auf dem Monitor live abgebildet. Die Intensitäten werden in Form von Grauwerten von 1 bis 256 angezeigt, wobei die Software wiederum eine farbige Darstellung des Objekts ermöglicht.

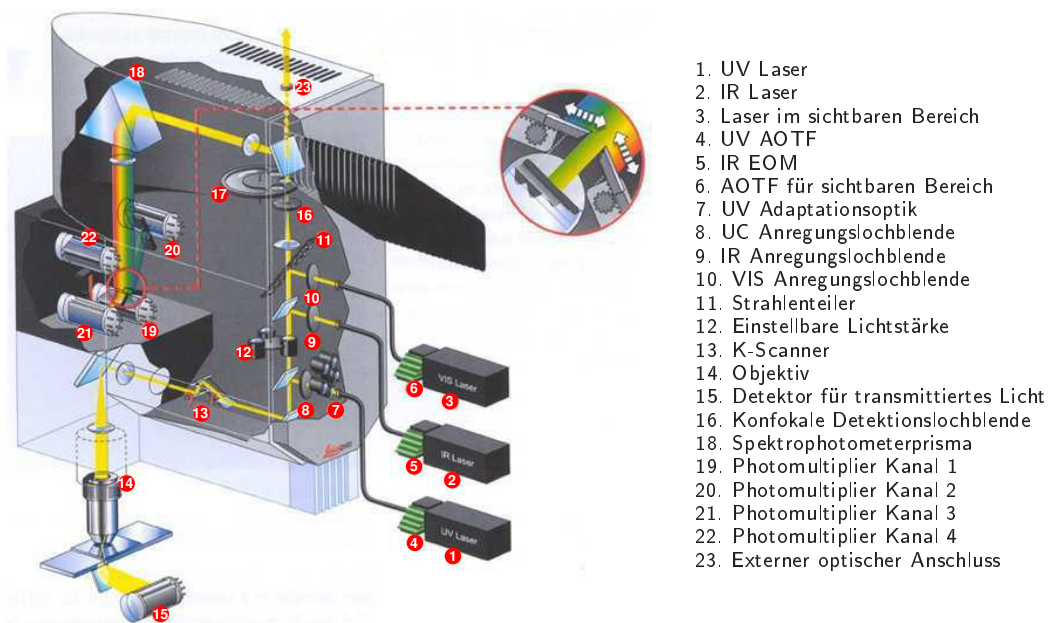


Abbildung 2.5: Aufbau und Strahlengang des CLSM Leica TCS SP2. Das Leica TCS SP2 ist mit mehreren Lasern als Lichtquelle ausgestattet. Der Laserstrahl passiert einen AOTF, um die gewünschten Laserlinien einzustellen. Nach Passieren der Anregungslochblende und des AOBs wird der Laserstrahl zum K-Scanner geleitet, der diesen zeilenweise über die Probe leitet. Durch das Objektiv gelangt der Laserstrahl auf die Probe und reflektiertes oder emittiertes Licht wieder durch das Objektiv, den K-Scanner und den AOBs zurück zum Detektor. Davor befindet sich eine Detektionslochblende, die nur Licht zu den Photodioden lässt, das aus der Fokalebene stammt (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim).

2.3.2 CLSM-Einstellungen zur Visualisierung von Zellen

Zur Visualisierung von humanen Gingiva-Fibroblasten und Pflanzenzellen von *Catharanthus roseus* wurden unterschiedliche Objektive und Einstellungen genutzt. Die Pflanzenzellen wurden mit einem 63-fach Wasserimmersionsobjektiv untersucht, das eine Numerische Apertur von 1,2 hat. Der Blendendurchmesser wurde auf $300\ \mu\text{m}$ (2,24 Airy) eingestellt und die Zellen mit dem Argonlaser (100 %) der Wellenlänge 488 nm belichtet. *Gescannt* wurde in einem Bereich von 510 nm bis 590 nm mit einer Geschwindigkeit von 400 Hz und einer *line average* von 16, d.h. jede Zeile wurde 16 mal aufgenommen und der Durchschnittswert jedes Bildpunktes zur Erstellung des finalen Bildes verwendet. Die Auflösung wurde auf 1024×1024 Pixel eingestellt, sodass ein Bild ohne Zoom eine Kantenlänge von $238,10\ \mu\text{m}$ besaß.

Die Fibroblasten wurden ebenfalls mit dem Argonlaser der Wellenlänge 488 nm belichtet, der mit einer Geschwindigkeit von 400 Hz über die Probe geführt wurde. Ein *line average* von 16 wurde eingestellt und die Emission im Bereich von 510 nm bis 560 nm detektiert. Das Wasserimmersionsobjektiv mit 40-facher Vergrößerung wurde benutzt und der optimale Blendendurchmesser von 1 Airy ($127\ \mu\text{m}$) eingestellt. Bei einer Auflösung von 1024×1024 Pixel betrug die Kantenlänge des Bildausschnittes $375\ \mu\text{m}$. Zusätzlich wurden Transmissionsbilder aufgenommen, um die Morphologie der Zellen zu beobachten.

2.3.3 Fluoreszenzanalyse mittels λ -Scan

Die Funktion des λ -Scans im CLSM ermöglicht die Aufnahme eines Fluoreszenzspektrums in einem variablen Emissionsbereich nach Anregung mit einem Laser. Dabei kann das Spektrum jedes einzelnen Bildpunktes wiedergegeben werden, wenn man die gemessene Fluoreszenzintensität gegenüber der Wellenlänge aufträgt.

Durchführung:

Durch einen λ -Scan bei Belichtung mit dem Argonlaser (488 nm) wurde eine Reihe von Fluoreszenzintensitätswerten einer einzigen optischen Ebene abhängig von der Wellenlänge aufgenommen, die schließlich das Fluoreszenzspektrum der jeweiligen Probe wiedergaben. Dafür wurden zunächst die Grenzpunkte des Messbereichs von 500 nm bis 700 nm und die Anzahl der Messpunkte (100) in der Mikroskop-Software LCS festgelegt. Eine Messreihe aus 100 Messpunkten ergab somit Überlappungen von jeweils 8 nm bei einer Spanne von 200 nm und einem Messbereich von 10 nm pro Messpunkt.

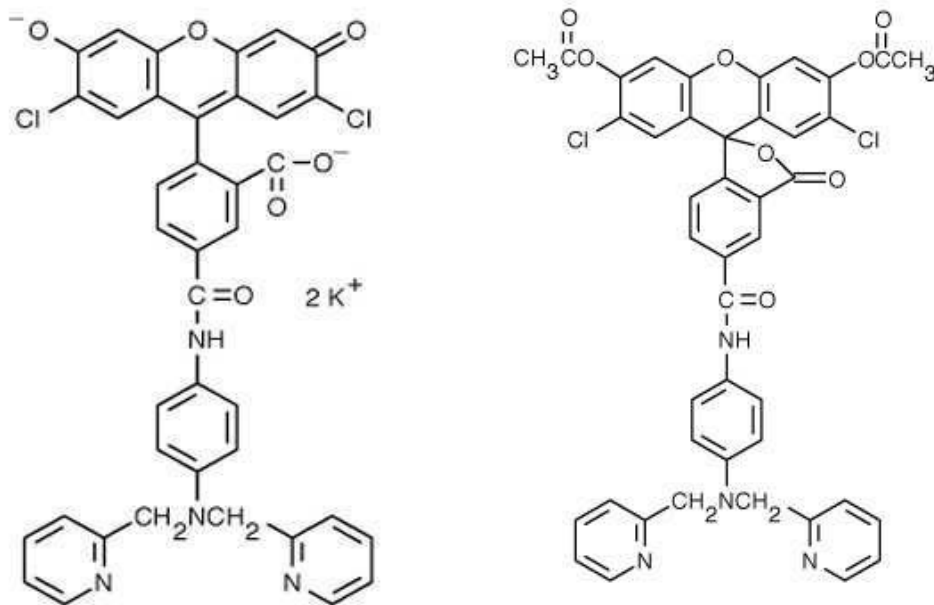
Um die Metallverbindungen auf Eigenfluoreszenz zu analysieren, wurden die Metalle in Festform mittels CLSM mit einem 50-fach Trockenobjektiv untersucht. Dabei wurden die Proben zunächst mit einer UV-Lampe, einem He/Ne-Laser mit Wellenlängen von 514 nm, 543 nm und 633 nm und anschließend mit einem Argonlaser (488 nm) belichtet und die Fluoreszenz über einen Bereich von 500 nm bis 700 nm detektiert.

Die vollständige Funktionalität zur Kationenbindung des optischen Sensors Newport Green DCF entsteht erst nach der Hydrolyse in einer Zelle. Aus diesem Grund wurde zunächst durch eine λ -Scan-Analyse das Emissionsspektrum des Sensors und dessen Fluoreszenzintensität unabhängig von Zellen und Ionen aufgenommen. Dafür wurden in 12-*well*-Platten zu je 1,5 ml BME-Medium pro *well* 1,5 μ l der Newport Green DCF-Stocklösung (1 mg/ml; Endkonzentration: 1 μ g/ml) zugegeben, ein Spektrum durch einen λ -Scan mit dem CLSM Leica TCS SP2 aufgenommen und nach der Zugabe von 1,5 μ l der Metallverbindungen (1 M; Endkonzentration: 1 mM) über eine Zeitspanne von 40 min alle 10 min ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen. Als Kontrolle wurde ein Spektrum von BME-Medium ohne Newport Green DCF und ohne Metallverbindungen aufgenommen. Dazu wurde ein Wasserimmersionsobjektiv mit 40-facher Vergrößerung verwendet und der optische Sensor Newport Green DCF mit dem Argonlaser der Wellenlänge 488 nm angeregt. Der λ -Scan wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt und die Ergebnisse in Form eines Spektrums durch die Software LCS dargestellt.

Um die Newport Green DCF-Spektren in Zellen vor und nach Zugabe von Metallverbindungen mit einem λ -Scan zu untersuchen, wurden Zellen für 24 h in 6-*well*-Platten mit 500 μ M NiCl₂, NiSO₄, Ni₃S₂ oder CoCl₂ bei 37 °C und 5 % CO₂ in BME-Medium inkubiert und nach einem dreimaligen Waschschrift mit PBS mit 500 μ l BME-Medium und 3,5 μ l Newport Green DCF (1 mg/ml; Endkonzentration: 7 μ g/ml) bedeckt und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden die *wells* mit BME-Medium aufgefüllt und die Zellen erneut für 30 min bei 37 °C zur vollständigen Hydrolyse des Farbstoffes inkubiert. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit dem CLSM und Metallverbindungen, noch mit Newport Green DCF inkubiert wurden, aber auch Zellen, denen lediglich Newport Green DCF zugegeben wurde. Die Spektren wurden wie zuvor beschrieben nach Anregung mit dem Argonlaser (488 nm) mit einem λ -Scan aufgenommen.

2.4 Der optische Sensor Newport Green DCF

Der optische Sensor Newport Green DCF basiert auf DCF und existiert sowohl in wasserlöslicher Form als Di-Kaliumsalz (s. Abbildung 2.6(a)), als auch als Diacetat mit Esterbindungen (s. Abbildung 2.6(b)) (Haugland, 2002; Molecular Probes invitrogen, Produktinformation MP 07990). Die wasserlösliche Form kann nicht ohne Weiteres die Membran passieren, im Gegensatz zur Diacetatesterstruktur, die dem Molekül einen ungeladenen Charakter verleiht, wodurch es ungehindert durch die Membran diffundieren kann. Innerhalb einer Zelle werden die lipophilen Gruppen des Moleküls durch unspezifische Esterasen gespalten, was zu einer negativen Ladung führt, sodass es nun die Membran nicht mehr passieren, wohl aber die *target*-Ionen binden kann (Molecular Probes invitrogen, Produktinformation G 002). Newport Green DCF besitzt ein Anregungsmaximum bei 505 nm und ein Emissionsmaximum bei 535 nm (Haugland, 2002).



(a) Newport Green DCF Di-Kaliumsalz

(b) Newport Green DCF Diacetatester

Abbildung 2.6: Struktur des Fluoreszenzfarbstoffes Newport Green DCF. (a) Newport Green DCF als Di-Kaliumsalz ist geladen und nicht membranpermeabel; (b) Newport Green DCF ist durch seine Diacetatesterstruktur membranpermeabel. Esterasen in der Zelle hydrolysieren die Bindung und verhindern die Diffusion aus der Zelle. Das geladene Molekül kann die *target*-Ionen binden. Das Anregungsmaximum liegt bei 505 nm, das Emissionsmaximum bei 535 nm.

Durch die Bindung der *target*-Ionen kommt es innerhalb des Moleküls zu einem Elektronentransfer und schließlich zu einer Verstärkung der Fluoreszenz. Die Fluoreszenzverstärkung ist vom *target*-Ion selbst abhängig. Lediglich divalente Kationen rufen eine Fluoreszenzverstärkung hervor, doch bei den meisten divalenten Kationen wie Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} und Pb^{2+} ist eine sehr geringe Veränderung zu beobachten. Cd^{2+} , Hg^{2+} und Zn^{2+} zeigen etwas stärkere Fluoreszenz-erhöhungen, doch der größte Effekt wird durch Co^{2+} und Ni^{2+} deutlich. Eine Komplexierung des Farbstoffes Newport Green DCF mit $100 \mu\text{M}$ Co^{2+} , Ni^{2+} und Zn^{2+} verstärkt die Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF um das 7- bis 13-fache (Haugland, 2002). Bei geringeren Konzentration von $1 \mu\text{M}$ sind deutliche Fluoreszenzverstärkungen lediglich bei Ni^{2+} detektierbar (s. Abbildung 2.7) (Haugland, 2002).

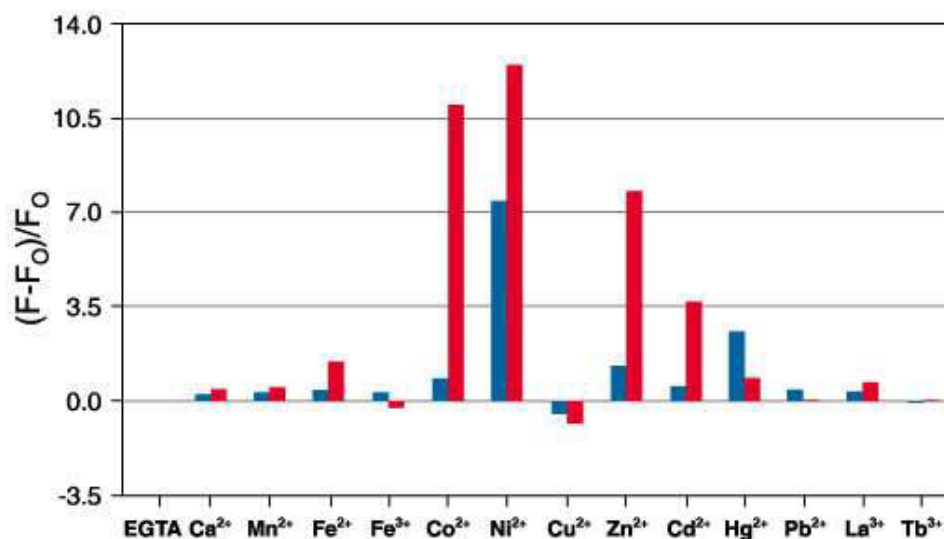


Abbildung 2.7: Fluoreszenzverstärkung von Newport Green DCF durch unterschiedliche Ionen. Der Farbstoff Newport Green DCF ändert seine Fluoreszenzintensität nach Komplexierung mit bestimmten Kationen. Die roten Balken repräsentieren die Erhöhung der Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF durch $100 \mu\text{M}$ eines Ions, die blauen Balken die Reaktion auf $1 \mu\text{M}$ des Ions. Deutliche Intensitätsänderungen (7- bis 13-fach verstärkt zur Ausgangsintensität) entstehen durch die Anwesenheit von $100 \mu\text{M}$ Ni^{2+} , Co^{2+} und Zn^{2+} . Bei Konzentrationen von $1 \mu\text{M}$ zeigt lediglich Ni^{2+} eine deutliche Intensitätserhöhung (Molecular Probes invitrogen, Eugene, OR, USA).

2.4.1 Markierung von Nickel und Cobalt in humanen Gingiva-Fibroblasten mit Newport Green DCF

Die Exposition von Nickel und Cobalt für den Menschen ist vielfältig. Gesundheitliche Beeinträchtigungen sind dabei nicht auszuschließen. Der Nachweis von Ni(II) und Co(II) in einzelnen humanen Fibroblasten mit dem CLSM soll durch hohe laterale Auflösung nähere Hinweise auf den Verbleib der Metalle in den Zellen liefern.

Verwendete Materialien:

- Newport Green DCF
- Metallverbindungen: $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Ni_3S_2 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- BME-Medium
- PBS

Durchführung:

Um die Aufnahme und Lokalisation von Ni(II) und Co(II) aus verschiedenen Verbindungen mittels CLSM zu untersuchen, wurden zunächst Fibroblasten in 6-well-Platten bzw. Petrischalen (\varnothing 60 mm/15 mm) bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert (s. Abschnitt 2.2.2.1) und nach ein bis drei Tagen bei etwa 70 % Konfluenz mit unterschiedlichen Konzentrationen (100 μM , 300 μM und 500 μM) der Metallverbindungen $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Ni_3S_2 und $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (im Folgenden NiCl_2 , NiSO_4 und CoCl_2 genannt) für 16 h, 24 h und 48 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Newport Green DCF (Endkonzentration: 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 60 min bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Um die Hydrolyse von Newport Green DCF zu maximieren, wurden die Zellen nach einem weiteren Waschschrift mit PBS erneut 30 min in BME-Medium bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Zellen, die nicht mit Metallverbindungen inkubiert wurden, wurden in gleicher Weise mit Newport Green DCF behandelt und als Kontrolle mitgeführt. Zellen, die weder mit Metallverbindungen, noch mit Newport Green DCF inkubiert wurden, wurden ebenfalls als Kontrolle eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen unter dem CLSM Leica TCS SP2 mit einem Wasserimmersionsobjektiv mit 40-facher Vergrößerung nach Anregung mit dem Argonlaser (488 nm) untersucht und die Emission zwischen 510 nm und 560 nm detektiert, da das Emissionsmaximum von Newport Green DCF bei 535 nm liegt. Eine Metallkonzentration von 40 μM NiCl_2 wurde den Zellen ebenfalls für 16 h, 24 h und 48 h zugegeben, um zu ermitteln, ob solche geringen Konzentrationen noch mit Newport Green DCF detektierbar sind. Die Markierung mit Newport Green DCF und dessen Detektion wurde dafür wie zuvor in diesem Abschnitt beschrieben durchgeführt.

2.4.2 Markierung von Ni und Co in Pflanzenzellen von *Catharanthus roseus* mit Newport Green DCF

Nickel und Cobalt sind für Pflanzen essentielle Metalle (Brown *et al.*, 1987; Denkhaus und Salnikow, 2002), so dient Nickel z.B. als Cofaktor im Enzym Urease (Dixon *et al.*, 1975) und übernimmt wichtige Aufgaben im Stickstoffstoffwechsel. Zu hohe Konzentrationen oder chemische Modifizierungen essentieller Metalle in Zellen schaden jedoch der Pflanze, wenn keine Detoxifizierung stattfindet. Untersuchungen mit verschiedenen Nickel- und Cobalt-Verbindungen sollten Informationen über die Aufnahme und Speicherung der Metalle in Pflanzenzellen liefern.

Verwendete Materialien:

- Newport Green DCF
- Metallverbindungen: NiCl₂, NiSO₄O, Ni₃S₂, CoCl₂O
- LS-Medium
- PBS
- NP-40

Durchführung:

Die Pflanzenzellen wurden als Suspensionskultur in Erlenmeyerkolben in LS-Medium kultiviert. Sobald die Zellkultur eine ausreichende Dichte erlangt hatte, die etwa drei Tage nach der Überführung in frisches Medium erreicht war, wurden die Metallverbindungen NiCl₂, NiSO₄, Ni₃S₂ und CoCl₂ mit einer Endkonzentration von 100 µM zugegeben. Die Zellen wurden bis zu 120 h inkubiert und Aliquots von je 2 ml in einem Abstand von je 24 h entnommen, in 15 ml Polypropylenröhrchen überführt und 10 min bei 830×g zentrifugiert (Thermo Scientific, Sorvall RT 6000 D). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und das Pellet in 1 ml bis 2 ml PBS aufgenommen. Die Markierung der Metalle in den Zellen erfolgte mit der Endkonzentration von 1 µg/ml der wasserlöslichen Form des Fluoreszenzfarbstoffes Newport Green DCF unter Zusatz von NP-40 (Endkonzentration: 0,1 % v/v), das die Aufnahme des Farbstoffes in die Zellen ermöglichte. Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei RT auf einem Schüttler (Scientific Industries, Roto Shake Genie) und einem zweimaligem Waschschrift mit PBS wurde das Pellet in 2 ml PBS aufgenommen und die Zellen mit dem CLSM Leica TCS SP2 mit 63-fach vergrößerndem Wasserimmersionsobjektiv anhand weniger Tropfen der Suspension untersucht. Angeregt wurde Newport Green DCF mit einem Argonlaser der Wellenlänge 488 nm und die Emission wurde im Bereich von 510 nm bis 560 nm mit einem Blendendurchmesser

von 300 μm (2,24 Airy) detektiert. Kurze Inkubationszeiten von 1 h und 8 h mit NiCl_2 sollen zeigen, wie sich die Aufnahme von Ni bei frühen Inkubationszeitpunkten verhält. Die Prozedur der Probenentnahme und der Ni-Markierung war identisch zu der bei längeren Inkubationszeiten.

2.5 Biochemische Methoden zur Visualisierung verschiedener Organellen

Für die mikroskopische Visualisierung von Organellen und Strukturen einer Zelle existieren zahlreiche Fluoreszenzfarbstoffe. Sie sind meist spezifisch für ein Organell und teilweise in verschiedenen Derivaten mit unterschiedlichen Anregungs- und Emissionsmaxima erhältlich, sodass die parallele Darstellung verschiedener Strukturen wie z.B. der Membranen und des Zellkerns ermöglicht wird.

2.5.1 Zellkernmarkierung mit Hoechst 33342

Um den Zellkern in Fibroblasten und Pflanzenzellen zu markieren, wurde der im blauen Wellenlängenbereich fluoreszierende Farbstoff Hoechst 33342 (Molecular Probes invitrogen, Produktinformation MP 21486) (s. Abbildung 2.8) eingesetzt. Hoechst 33342 ist ein Bisbenzimidazol-derivat, das zellpermeabel ist und die supravitale kleine Furche der DNA mit AT-Selektivität bindet (Portugal und Waring, 1988). AT-reiche doppelsträngige DNA erhöht die Fluoreszenz von Hoechst 33342 zweifach stärker als GC-reiche Stränge, sodass eine Identifizierung der AT-reichen Q-Banden in den Chromosomen stattfindet. Das Anregungsmaximum liegt bei 350 nm, das Emissionsmaximum bei 461 nm, weshalb der Farbstoff mit einer Quecksilberdampfampe angeregt wird.

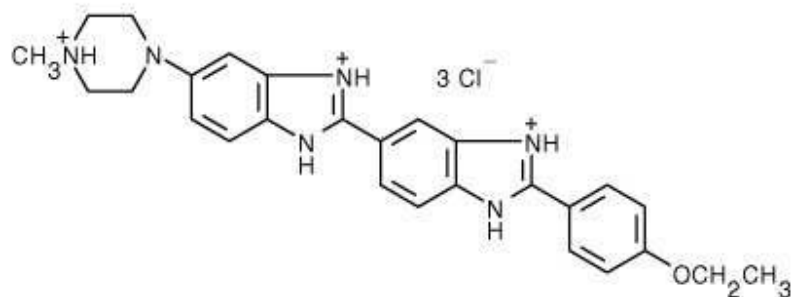


Abbildung 2.8: Struktur von Hoechst 33342. Hoechst 33342 ist ein Bisbenzimidazol-derivat. Der Farbstoff bindet spezifisch an der kleinen Furche der DNA-Doppelhelix, wobei AT-reiche Regionen (Q-Banden) der Chromosomen die Fluoreszenz zweifach stärker als GC-reiche Regionen erhöhen. Das Anregungsmaximum liegt bei 350 nm. Das Emissionsmaximum liegt bei 461 nm.

2.5.1.1 Zellkernmarkierung in humanen Gingiva-Fibroblasten

Verwendete Materialien:

- Hoechst 33342
- BME-Medium
- PBS

Durchführung:

Die Markierung der Zellkerne in Fibroblasten erfolgte in Petrischalen oder 6-*well*-Platten mit dem DNA-spezifischen Farbstoff Hoechst 33342. Das Medium wurde aus den *wells* entnommen und die Färbelösung mit einer Endkonzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in BME-Medium auf die Zellen gegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und die *wells* mit 5 ml bis 7 ml BME-Medium aufgefüllt. Die Visualisierung der Zellkerne erfolgte mit dem Leica CLSM TCS SP2 und einem Wasserimmersionsobjektiv mit 40-facher Vergrößerung. Dafür wurde die Probe mit einer Quecksilberdampfampe beleuchtet und die Fluoreszenz in einem Bereich von 350 nm bis 480 nm detektiert.

2.5.1.2 Zellkernmarkierung in Pflanzenzellen

Verwendete Materialien:

- Hoechst 33342
- PBS

Durchführung:

Bei der Zellkernmarkierung in Pflanzenzellen wurden 2 ml der Zellkultur in einem 15 ml Polypropylenröhrchen für 10 min bei 830 \times g zentrifugiert (Thermo Scientific, Sorvall RT 6000 D). Das Pellet wurde zweimal mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS aufgenommen. Nach Zugabe von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst 33342 wurden die Zellen 60 min bei RT inkubiert, anschließend 10 min zentrifugiert (830 \times g; Thermo Scientific, Sorvall RT 6000 D) und zweimal mit 2 ml PBS gewaschen. Nach Wiederaufnahme des Pellets in 2 ml PBS wurde ein Aliquot (ca. 100 μl) der Suspension auf einen Objektträger gegeben und mit dem Leica CLSM TCS SP2 mit 63-facher Vergrößerung untersucht. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte im Bereich von 350 nm bis 480 nm nach Anregung des Zellkern-spezifischen Farbstoffes mit einer Quecksilberdampfampe.

2.5.2 Nukleinsäuremarkierung in Pflanzenzellen mit SYTO 61

SYTO-Farbstoffe sind membranpermeable Nukleinsäurefarbstoffe, die nicht ausschließlich Zellkerne anfärben, wie z.B. Hoechst 33342. Werden eukaryontische Zellen mit SYTO 61 inkubiert, dessen Anregungsmaximum bei 628 nm und Emissionsmaximum bei 645 nm liegt, zeigen sich Markierungen der Mitochondrien sowie der Nukleinsäuren.

Verwendete Materialien:

- SYTO 61
- PBS

Durchführung:

Für die Markierung der Nukleinsäuren in Pflanzenzellen wurden 2 ml der Zellsuspension in 15 ml Polypropylenröhrchen für 10 min bei 830×g zentrifugiert (Thermo Scientific, Sorvall RT 6000 D) und das Pellet in 1 ml PBS aufgenommen. SYTO 61 (Molecular Probes invitrogen, Produktinformation MP 11340) lag als 5 mM Lösung in DMSO vor und wurde mit einer Endkonzentration von 10 μ M zugegeben. Nach 60 min Inkubation bei RT wurde erneut zentrifugiert, dreimal mit PBS gewaschen und die Emission nach Anregung mit einem He/Ne-Laser der Wellenlänge 633 nm detektiert.

2.5.3 Membranmarkierung in humanen Gingiva-Fibroblasten mit CellMask deep red

Membranfarbstoffe sind in der Regel lipophile Moleküle, die sich in die Membran integrieren und diese somit markieren. Der Membranfarbstoff CellMask deep red (Molecular Probes invitrogen, Produktinformation MP 10045) ist ein amphipathisches Molekül mit lipophiler Einheit, die das Membranbeladen ermöglicht, sowie einem negativ geladenem hydrophilem Teil, der für die Verankerung der Membransonde in der Plasmamembran verantwortlich ist. Der Farbstoff CellMask deep red ist für die Membranmarkierung einer großen Bandbreite von Säugetierzellen geeignet.

Verwendete Materialien:

- CellMask deep red
- PBS
- BME-Medium

Um Membranen in Fibroblasten zu markieren, wurden die Fibroblasten nach dreimaligem Waschschrift mit PBS mit einer Endkonzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CellMask deep red in BME-Medium markiert. Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei 37 °C wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit BME-Medium supplementiert. Die Anregung des Farbstoffes, dessen Anregungsmaximum bei 649 nm liegt, erfolgte mit einem He/Ne-Laser der Wellenlänge 633 nm. Die Emission wurde zwischen 650 nm und 700 nm detektiert.

2.5.4 Markierung des ER in humanen Gingiva-Fibroblasten mit ER-Tracker red

ER-Tracker Farbstoffe sind membranpermeable Farbstoffe zur selektiven Markierung des ER in lebenden Zellen (Molecular Probes invitrogen, Produktinformation MP 12353). Üblicherweise angewandte Konzentrationen sind für die Zellen nicht toxisch. ER-Tracker red (s. Abbildung 2.9) ist ein Wirkstoffkonjugat des Glibenclamids BODIPY TR, das an die Sulphonylurearezeptoren von ATP-sensitiven K^+ -Kanälen bindet, die gehäuft im ER vorkommen (Hambrock *et al.*, 2002). Das Anregungsmaximum dieses ER-selektiven Farbstoffes liegt bei 587 nm und das Emissionsmaximum bei 615 nm.

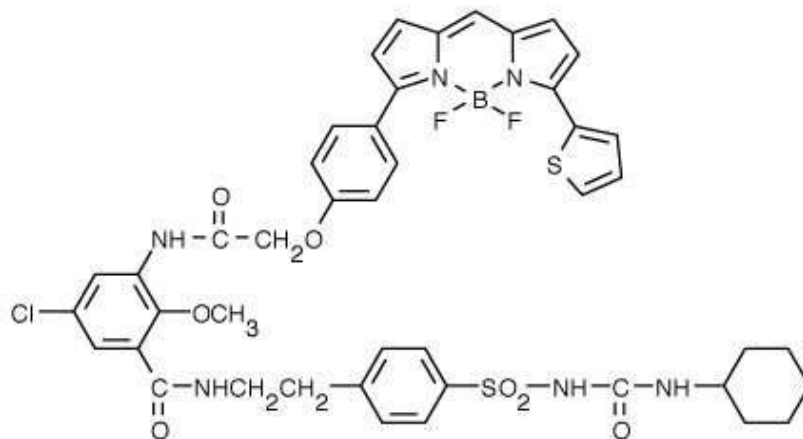


Abbildung 2.9: Struktur des Fluoreszenzfarbstoffes ER-Tracker red. Der zellpermeable Vitalfarbstoff ER-Tracker bindet spezifisch durch sein Konjugat mit Glibenclamin an ATP sensitive K^+ -Kanäle, die vorherrschend im ER vorhanden sind. Das Anregungsmaximum ist bei 587 nm, das Emissionsmaximum bei 615 nm.

Verwendete Materialien:

- ER-Tracker red
- DMSO
- BME-Medium
- PBS

Durchführung:

100 μg des Farbstoffes ER-Tracker red wurden in 110 μl DMSO gelöst, um eine 1 mM Stocklösung herzustellen. Die Endkonzentration des Farbstoffes zur Markierung des ER in Zellen betrug 1 μM in BME-Medium. Bei der Markierung des ER wurden die Zellen 30 min bei 37 °C inkubiert, danach dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit BME-Medium bedeckt. Die Fluoreszenz wurde im Bereich von 610 nm bis 650 nm nach Anregung mit dem He/Ne-Laser der Wellenlänge 594 nm detektiert.

2.5.5 Markierung des Golgi-Apparates in humanen Gingiva-Fibroblasten mit Bodipy TR

Der Golgi-Apparat bildet in Zellen einen membranumschlossenen Reaktionsraum, dem Aufgaben wie die Bildung sekretorischer Vesikel oder die Modifikation von Peptiden zukommt. Er befindet sich meist in der Nähe des Zellkerns und des ER. Der Fluoreszenzfarbstoff Bodipy TR (s. Abbildung 2.10) ist ein Ceramidanalogen, das an Rinderserumalbumin (BSA) komplexiert ist (Molecular Probes invitrogen, Produktinformation MP 01154) und membranpermeabel ist.

Verwendete Materialien:

- Bodipy TR
- ddH₂O
- BME-Medium

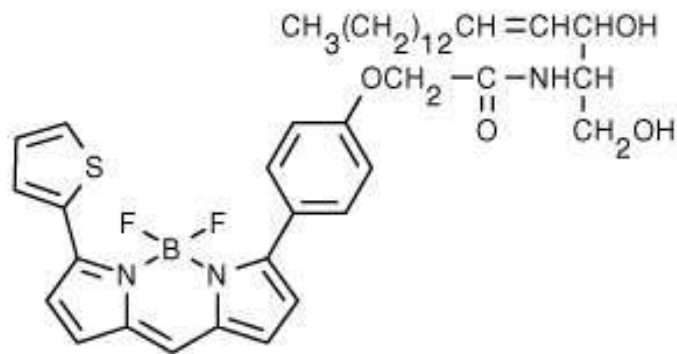


Abbildung 2.10: Struktur des Fluoreszenzfarbstoffes Bodipy TR. Bodipy TR ist ein Ceramidanalogen, das an BSA komplexiert ist und aus *D-erythro*-Sphingosin hergestellt wurde. Der Vitalfarbstoff markiert selektiv den Golgi-Apparat. Das Anregungsmaximum ist bei 589 nm, das Emissionsmaximum bei 617 nm.

Durchführung:

5 mg Bodipy TR wurden in doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) gelöst, sodass eine 0,5 mM Stocklösung vorlag. Die Markierung des Golgi-Apparates erfolgte mit einer Endkonzentration von 5 μM bei 4 °C für 30 min. Danach wurde dreimal mit 4 °C kaltem BME-Medium gewaschen und die Zellen vor dem Mikroskopieren für 30 min in BME-Medium bei 37 °C inkubiert. Die Visualisierung erfolgte mit dem CLSM und einem Objektiv mit 40-facher Vergrößerung. Das Anregungs- bzw. Emissionsmaximum liegt bei 589 nm bzw. 617 nm, weshalb mit einem Laser der Wellenlänge 594 nm angeregt und die Emission im Bereich von 613 nm bis 664 nm detektiert wurde.

2.5.6 Markierung von Pflanzenzellen mit Vybrant Dil

Der Farbstoff Vybrant Dil (s. Abbildung 2.11) ist ein lipophiler Carbocyanin-Farbstoff, der ganze Zellen in Suspension anfärbt (Molecular Probes invitrogen, Produktinformation MP 22885).

Verwendete Materialien:

- Vybrant Dil
- LS-Medium
- PBS

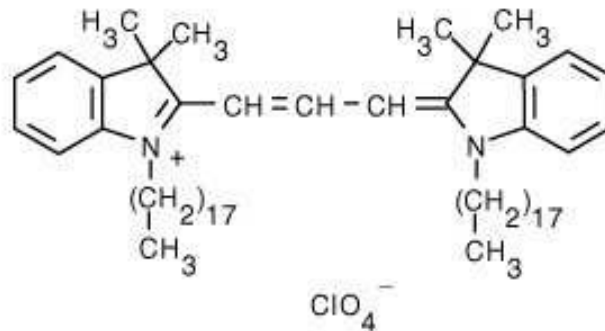


Abbildung 2.11: Struktur des Fluoreszenzfarbstoffes Vybrant Dil. Vybrant Dil ist ein Carbocyanin-Farbstoff mit lipophiler Eigenschaft. Er färbt Zellen gleichmäßig an. Das Anregungsmaximum ist bei 549 nm, das Emissionsmaximum bei 565 nm.

Durchführung:

Zur Färbung der Pflanzenzellen wurden 2 ml der Kultur entnommen und in einem 15 ml Polypropylenröhrchen 10 min bei 830×g zentrifugiert (Thermo Scientific, Sorvall RT 6000 D). Die Zellen wurden in LS-Medium resuspendiert und mit 10 μM Vybrant Dil für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen erneut zentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen und das Zellpellet in 2 ml PBS aufgenommen. Ein Aliquot (ca. 100 μl) der Zellsuspension wurde zur Mikroskopie mit dem Leica CLSM TCS SP2 mit 63-facher Vergrößerung verwendet. Das Anregungsmaximum von Vybrant Dil liegt bei 549 nm, das Emissionsmaximum bei 565 nm, sodass die Fluoreszenz nach Anregung mit einem He/Ne-Laser (543 nm) in einem Bereich von 557 nm bis 602 nm detektiert werden konnte.

Kapitel 3

Ergebnisse

Die Experimente, die zur Detektion und Lokalisation des Nickels und Cobalts in einzelnen lebenden Zellen durchgeführt wurden, wurden im Abschnitt zuvor erläutert. Die Resultate dieser Experimente sind auf den folgenden Seiten zusammengefasst. Die Ergebnisse der humanen Zellen und der Pflanzenzellen wurden separat dargestellt.

3.1 Nickel- und Cobaltdetektion in humanen Gingiva-Fibroblasten

Um Metalle, bzw. bestimmte Spezies, in einzelnen lebenden Zellen mit hoher lateraler Auflösung zu lokalisieren, waren optische Methoden wie die CLSM denkbar. Der optische Nachweis von Metallen in Zellen war jedoch von der Nachweisbarkeit der Metalle im Mikroskop abhängig. Eine Möglichkeit war eine charakteristische Eigenfluoreszenz verschiedener Metalle bzw. Metallverbindungen, die zudem eine direkte Unterscheidung ermöglicht hätte. Eine weitere Möglichkeit der Detektion war durch den Einsatz von optischen Sensoren gegeben. Für die folgenden Nachweisversuche von Metallen in einzelnen lebenden Zellen wurden Nickel- und Cobaltverbindungen gewählt, da sie zum einen essentiell für die meisten Organismen sind, aber zum anderen auch kanzerogene, toxische oder allergene Eigenschaften aufweisen. In den hier gezeigten Versuchen wurden humane Gingiva-Fibroblasten mit geringen Metallkonzentrationen von 100 μM , 300 μM und 500 μM inkubiert, die Metalle anschließend mit Newport Green DCF markiert und die Fluoreszenz des optischen Sensors mittels CLSM detektiert.

3.1.1 Analyse der Eigenfluoreszenz von Nickel- und Cobaltverbindungen

Um eine mögliche Eigenfluoreszenz der Salze der Metallverbindungen NiCl_2 , NiSO_4 , Ni_3S_2 und CoCl_2 zu beobachten, wurden diese mit UV-Licht einer Quecksilberdampfampe, mit gefiltertem rotem, grünem und blauem Licht belichtet und die Fluoreszenzemission beobachtet. Zusätzlich wurde ein λ -Scan in einem Bereich von 500 nm bis 700 nm nach Anregung mit dem Argonlaser (488 nm) durchgeführt. Durch λ -Scans wurde deutlich gezeigt, dass keine detektierbare Eigenfluoreszenz mit dem genutzten System detektierbar war (s. Abbildung 3.1).

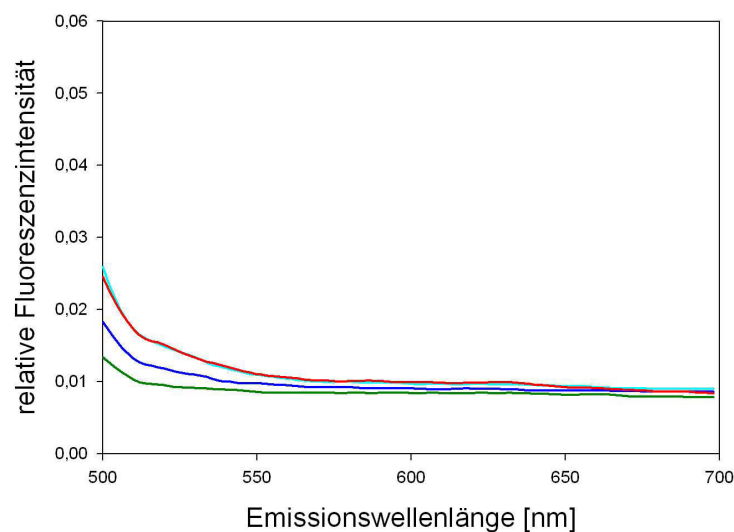


Abbildung 3.1: Vergleich der Emissionsspektren verschiedener Metallverbindungen (Salze). Detektion der Emissionsspektren verschiedener Metallverbindungen mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX APO 40x/0,8 W U-V-I nach Anregung mit dem 488 nm Argonlaser. Die Emissionsintensitäten in einem Bereich von 500 nm bis 700 nm wurden während eines λ -Scans mit einer PMT-voltage von 700 V detektiert. Grünes Spektrum: NiCl_2 , blaues Spektrum: NiSO_4 , hellblaues Spektrum: Ni_3S_2 , rotes Spektrum: CoCl_2 .

Bei jeder der untersuchten Metallverbindung wurden lediglich schwache Signale im Grenzbereich zur Anregungswellenlänge (488 nm) detektiert. Im Bereich von 500 nm bis 550 nm sank die relative Fluoreszenzintensität des detektierten Lichts, die zwischen 0,013 und 0,026 je nach Metallverbindung startete, rapide ab und blieb über den gemessenen Wellenlängenbereich konstant auf diesem Minimum zwischen 0,009 und 0,010. Dabei wurden die Intensitätswerte in Abhängigkeit von der PMT-voltage angegeben, also relative Fluoreszenzintensitätswerte, um später die Intensitätswerte mit anderen Fluoreszenzwerten, die mit unterschiedlichen PMT-voltages detektiert wurden, untereinander vergleichen zu können. Bei 8Bit Bildern wurden analoge Intensitätswerte je nach Signalstärke in 256 verschiedene, digitale Fluoreszenzintensitätswerte umgewandelt. Der Quotient aus diesen Werten und der PMT-voltage ergab den relativen Fluoreszenzintensitätswert.

Da im Spektrum keine Eigenfluoreszenz der Verbindungen gezeigt werden konnte, anhand derer eine Detektion der Verbindungen in einer Zelle oder sogar eine Identifizierung möglich war, musste eine indirekte Nachweismethode für Cobalt und Nickel in den Zellen eingesetzt werden.

3.1.2 Eigenfluoreszenz der humanen Gingiva-Fibroblasten

Bevor der Fluoreszenzfarbstoff Newport Green DCF zur Detektion von Nickel und Cobalt eingesetzt wurde, musste die Eigenfluoreszenz der Zellen bestimmt werden. Die Eigenfluoreszenz der Zellen nach Anregung mit dem Argonlaser sollte zeigen, ob diese die Fluoreszenz des optischen Sensors überstieg und eine Detektion der Metalle durch diesen Sensor verhindern würde. Zunächst wurden vollständig unbehandelte Zellen ohne Zugabe von Metallverbindungen oder Newport Green DCF mit dem Argonlaser der Wellenlänge 488 nm belichtet und die Fluoreszenzemission im Bereich von 510 nm bis 560 nm detektiert, was dem Bereich des Emissionsmaximums von Newport Green DCF entsprach (Molecular Probes invitrogen, Produktinformation MP 07990). Exemplarisch sind diese Zellen in Abbildung 3.2 gezeigt. Bei einem Blendendurchmesser von $300\ \mu\text{m}$ (2,4 Airy) und einer PMT-*voltage* von 700 V wurden sehr schwache Signale in den unbehandelten Zellen detektiert, die sich auf Zellkern-nahe Strukturen beschränkten. Der Zellkern, das Zytosol und Membranen waren nicht fluoreszent. Bei geringeren Blendenöffnungen und PMT-*voltages* war keine Fluoreszenz sichtbar. Die gesamte Zelle als ROI erreichte bei zwei Beispielen aus Abbildung 3.2 einen relativen Fluoreszenzintensitätswert von 0,024 und 0,019, und der Zellkern alleine als ROI erreichte einen Intensitätswert von 0,021 und 0,017. Man darf diese Werte nicht direkt mit den Werten aus den folgenden Ergebnissen vergleichen, da sich diese Intensitätswerte aus Bildern mit einem Blendendurchmesser von $127\ \mu\text{m}$ (1 Airy) berechneten und damit weniger lichtintensiv waren. Die sehr geringe Eigenfluoreszenz der Zellen konnte somit bei den nachfolgenden Versuchen vernachlässigt werden.

Anschließend wurde Fibroblasten, die nicht mit Nickel- oder Cobaltverbindungen inkubiert wurden, Newport Green DCF zugegeben, um die Intensität der Fluoreszenz des Sensors Newport Green DCF in Zellen unabhängig von Nickel und Cobalt zu beobachten. Die Fluoreszenz wurde ebenfalls mit Hilfe des CLSM detektiert. Die Abbildung 3.3 zeigt Fibroblasten, die 60 min mit Newport Green DCF (Endkonzentration: $7\ \mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert wurden und deren emittierte Fluoreszenz mit einer hohen PMT-*voltage* (650 V bzw. 730 V) aufgenommen wurde. Die schwache und diffuse Fluoreszenz um den Zellkern herum ließ keine klaren Strukturen erkennen und für die gesamte Zelle ergaben sich relative Fluoreszenzintensitätswerte von 0,048 bzw. 0,018. Auch im Zytosol war lediglich eine schwache und ebenfalls diffuse Fluoreszenz detektierbar, die die Umrisse der Zellen erkennen ließ. Im Zellkern erkannte man stärker fluoreszierende punktförmige Bereiche, die in ihrer Anzahl und Größe variierten. Der Zellkern selbst wies nach Newport Green DCF-Inkubation keine Fluoreszenz auf.

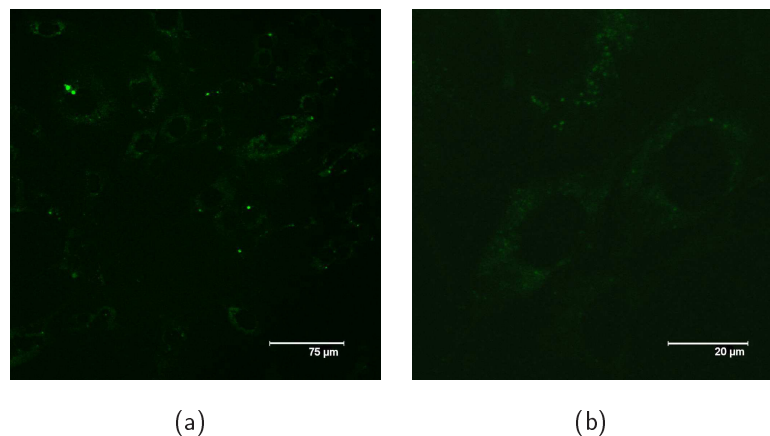


Abbildung 3.2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen humaner Gingiva-Fibroblasten. Detektion der Eigenfluoreszenz von humanen Gingiva-Fibroblasten mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX APO 40x/0,8 W U-V-I, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser, Emissionsdetektionsbereich: 510 nm bis 560 nm, Blendendurchmesser: 300 μm (2,4 Airy). (a) PMT-voltage: 700 V, Kantlänge: 375 μm , relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,024 bzw. 0,021; (b) PMT-voltage: 700 V, Kantlänge: 375 μm , relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,019 bzw. 0,017.

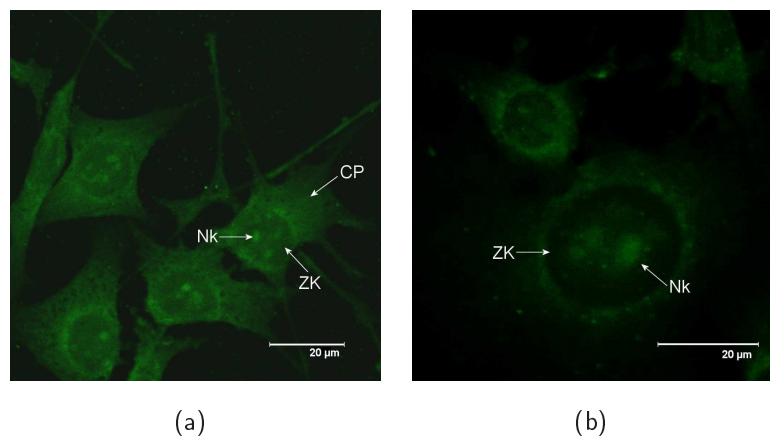


Abbildung 3.3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen humaner Gingiva-Fibroblasten nach Newport Green DCF-Zugabe. Detektion der Newport Green DCF-Fluoreszenz in humanen Gingiva-Fibroblasten mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX APO 40x/0,8 W U-V-I, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser, Emissionsdetektionsbereich: 510 nm bis 560 nm, Blendendurchmesser: 127 μm (1 Airy). (a) PMT-voltage: 650 V, Kantlänge: 100 μm , relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,048 bzw. 0,06; (b) PMT-voltage: 731 V, Kantlänge: 74 μm , relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,018 bzw. 0,032. ZK=Zellkern, CP=Zytoplasma, Nk=Nukleolus.

Es wurden in den Zellkernen Fluoreszenzintensitätswerte von 0,060 bzw. 0,032 erreicht. Diese Fluoreszenzintensitäten von Fibroblasten und Newport Green DCF waren ebenfalls schwach und für die späteren Messungen vernachlässigbar.

3.1.3 Berechnung der relativen Fluoreszenzintensitäten

Die Zellen und deren relative Fluoreszenzintensitäten, die in den Ergebnissen im Folgenden gezeigt werden, stehen beispielhaft für alle Zellen aus den einzelnen Versuchen. Die Intensitätswerte einer ROI waren Mittelwerte aus den Intensitätswerten aller Pixel in dieser ROI, die weiterführend in Abhängigkeit von der PMT-voltage aufgetragen wurden. Zum einen wurde eine komplette Zelle als ROI definiert, zum anderen lediglich der Zellkern – in beiden Fällen ohne Berücksichtigung einer inhomogenen Verteilung der Intensitäten innerhalb einer ROI. Um den Bereich der Linearität einzugrenzen, in der die Intensitätswerte optimal verglichen werden konnten, wurden zunächst beispielhaft die Fluoreszenzintensitäten einer Zelle nach Inkubation mit 500 μM NiCl_2 (24 h) und anschließender Inkubation mit Newport Green DCF (Endkonzentration: 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mit steigender PMT-voltage detektiert. Die Erstellung eines Diagramms (s. Abbildung 3.4) anhand der Intensitätswerte von Newport Green DCF in einer Zelle zeigte den linearen Bereich für einen Wellenlängenbereich von etwa 550 nm bis 800 nm, sodass die relative Fluoreszenzintensitätswerte in diesen Spannungsbereichen durch die Errechnung des Quotienten aus Intensitätswert und PMT-voltage vergleichbar wurden.

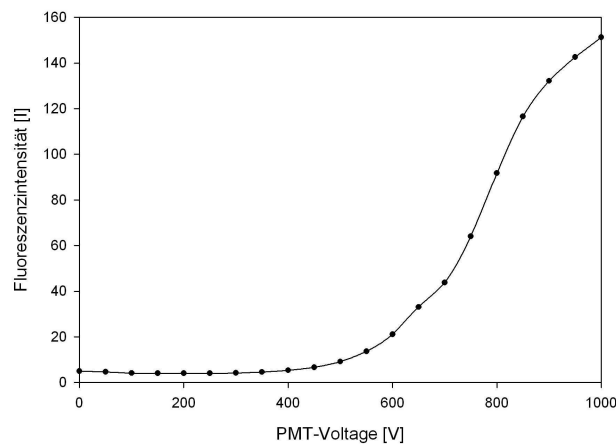


Abbildung 3.4: Veränderung der Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF in humanen Gingiva-Fibroblasten in Abhängigkeit von der PMT-voltage. Zellen wurden 24 h mit 500 μM NiCl_2 und anschließend mit 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Newport Green DCF inkubiert. Angeregt wurde der Farbstoff mit einem 488 nm Argonlaser des CLSM Leica TCS SP2 (Objektiv HCX APO 40x/0,8 W U-V-I). Die Emission wurde in einem Bereich zwischen 510 nm und 560 nm mit ansteigender PMT-voltage in Abständen von 50 V zwischen 0 V und 1000 V detektiert. Ab 450 V stieg die Fluoreszenzintensität stark an, ging ab etwa 550 V in einen linearen Bereich über und begann ab ca. 800 V in einen gesättigten Bereich überzugehen.

3.1.4 Einfluss unterschiedlicher Metallkonzentrationen und Inkubationszeiten auf die Newport Green DCF-Fluoreszenz und Lokalisation

Die Detektion von Nickel und Cobalt in einzelnen lebenden Zellen mit hoher lateraler Auflösung war mit den üblichen analytischen Methoden zur Speziesanalyse nicht möglich. Eine Alternative stellte die Fluoreszenzdetektion mit Hilfe eines Mikroskops dar, wobei die Möglichkeit einer Eigenfluoreszenz der Metalle bzw. die Detektion der Fluoreszenz eines Spezies-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes bestand. Da Nickel- und Cobaltverbindungen keine Eigenfluoreszenz aufwiesen und somit nicht ohne konjugierte Farbstoffe nachgewiesen werden konnten, mussten diese Metallverbindungen zur Lokalisation in der Zelle mit einem Farbstoff markiert werden, der spezifisch divalente Kationen bindet und dessen Fluoreszenzintensität besonders durch Ni^{2+} und Co^{2+} verstärkt wird. In den folgenden Abschnitten wird beschrieben, wie sich die Inkubation von Fibroblasten mit unterschiedlichen Konzentrationen und Inkubationszeiten verschiedener Metallverbindungen auf die Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF und die Lokalisation der Metalle in den Fibroblasten auswirkte. Es wurden jeweils vier Zellen zur Fluoreszenzintensitätsbestimmung ausgewählt, von denen jeweils zwei in den Abbildungen dargestellt sind. Die Versuche sollten Hinweise liefern, ob es Unterschiede zwischen den verschiedenen Verbindungen und Konzentrationen hinsichtlich ihrer Aufnahme, Lokalisation und deren intrazellulären Transport zu beobachten gibt.

Für die Markierung des Nickels und Cobalts orientierten wir uns an den Angaben von Ke *et al.* (2007), die den Farbstoff Newport Green DCF verwendeten, um in einzelnen Epithelzellen (A549) Nickel nach Zugabe von 500 μM und 1000 μM NiCl_2 bzw. 0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Ni_3S_2 nachzuweisen.

Durch die Inkubation von Zellen mit 10% bis zu 50% der Konzentrationen an Metallverbindungen, die bei Ke *et al.* (2007) eingesetzt wurden und die anschließende Markierung mit Newport Green DCF gleicher Konzentration wie bei Ke *et al.* (2007), wurde die Detektion geringer Konzentrationen von Nickel und Cobalt durch mikroskopische Beobachtung getestet.

3.1.4.1 Aufnahme von Nickel in humane Gingiva-Fibroblasten während NiCl_2 -Exposition

NiCl_2 ist eine wasserlösliche Nickelverbindung, in der Nickel zweiwertig vorliegt. Das verwendete NiCl_2 ist als Salz sowie als Lösung in Wasser grün. Aufgrund seiner starken Wasserlöslichkeit wird NiCl_2 als weniger kanzerogen beschrieben als wasserunlösliche Verbindungen, da in einem Organismus durch *clearing*-Effekte die Verbindungen schneller ausgewaschen werden als es bei

wasserunlöslichen Verbindungen der Fall ist. Um die Aufnahme und Lokalisation solcher wasserlöslicher Verbindungen in den Zellen zu beobachten, wurden humane Gingiva-Fibroblasten mit drei verschiedenen Konzentrationen der NiCl_2 -Lösung (Endkonzentration: $100 \mu\text{M}$, $300 \mu\text{M}$ und $500 \mu\text{M}$) für 16 h, 24 h und 48 h inkubiert und Ni(II) mit dem optischen Sensor Newport Green DCF detektiert.

Inkubation humaner Gingiva-Fibroblasten mit unterschiedlichen NiCl_2 -Konzentrationen für 16 h:

In Abbildung 3.5(a) und 3.5(d) sind mikroskopische Aufnahmen des CLSM im Fluoreszenzmodus von humanen Gingiva-Fibroblasten abgebildet, die 16 h mit $100 \mu\text{M}$ NiCl_2 und anschließend mit Newport Green DCF inkubiert wurden. Gescannt wurde mit einer PMT-*voltage* von 650 V bis 700 V, sodass durch die starke Spannung am Detektor selbst schwache Fluoreszenz im Zytosol zu erkennen war. Stärkere Fluoreszenzintensitäten waren hauptsächlich auf das Zentrum der Zelle um den Zellkern konzentriert (s. Abbildung 3.5(a)), die unklare und diffuse Strukturen erkennen ließen. Im Zellkern selbst war kaum Fluoreszenz zu beobachten (s. Abbildung 3.5(d)). Ebenfalls sehr diffus und schwach zu erkennen waren in den Zellkernen jedoch fluoreszierende punktförmige Bereiche (Nk) (s. Abbildung 3.5(a) und 3.5(d)), die zuvor bei den unbehandelten Zellen schon aufgetreten waren (s. Abbildung 3.3(a)). Die relativen Fluoreszenzintensitäten der kompletten Zellen wurden anhand von vier Beispielbildern, darunter Abbildung 3.5(a) und 3.5(d), bestimmt und lagen zwischen 0,027 und 0,086. Definierte man den Zellkern als ROI, errechneten sich Werte zwischen 0,033 und 0,147.

Die Erhöhung der NiCl_2 -Konzentration im BME-Medium auf $300 \mu\text{M}$ zeigte deutliche Veränderungen in der Newport Green DCF Fluoreszenzintensität (s. Abbildung 3.5(b) und 3.5(e)). Bereits bei PMT-*voltages* zwischen 400 V und 500 V war deutlich Fluoreszenz in den Zellen zu erkennen, die in den meisten Zellen homogen im Zytosol detektierbar war. Bei den Zellen nach 16 h Inkubation mit $100 \mu\text{M}$ NiCl_2 betrug die PMT-*voltage* über 650 V. Dominierend waren auch hier stark fluoreszierende Bereiche um den Zellkern herum, die eine retikuläre Struktur (ER) ausbildeten (s. Abbildung 3.5(e)). Diese breitete sich teilweise bis zum Rand der Zelle ins Zytosol aus (s. Abbildung 3.5(e)) und war von kleinen, nicht fluoreszierenden Vesikeln (s. Markierung V in Abbildung 3.5(b)) durchbrochen. Im Inneren des Zellkerns war vergleichsweise schwache Fluoreszenz zu beobachten, jedoch traten punktförmige Bereiche durch ihre starke Fluoreszenz hervor, die aufgrund des Zellkernaufbaus, der Lage und Anzahl als Nukleoli (Nk) identifiziert werden konnten. Die relativen Fluoreszenzintensitätswerte, die man anhand der Software LCS bestimmen konnte, bestätigten die optisch wahrnehmbare Steigerung der Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF, die sich für komplette Zellen auf Werte zwischen 0,084 und 0,146 und für Zellkerne auf Werte zwischen 0,082 und 0,220 um das 2-fache verstärkte.

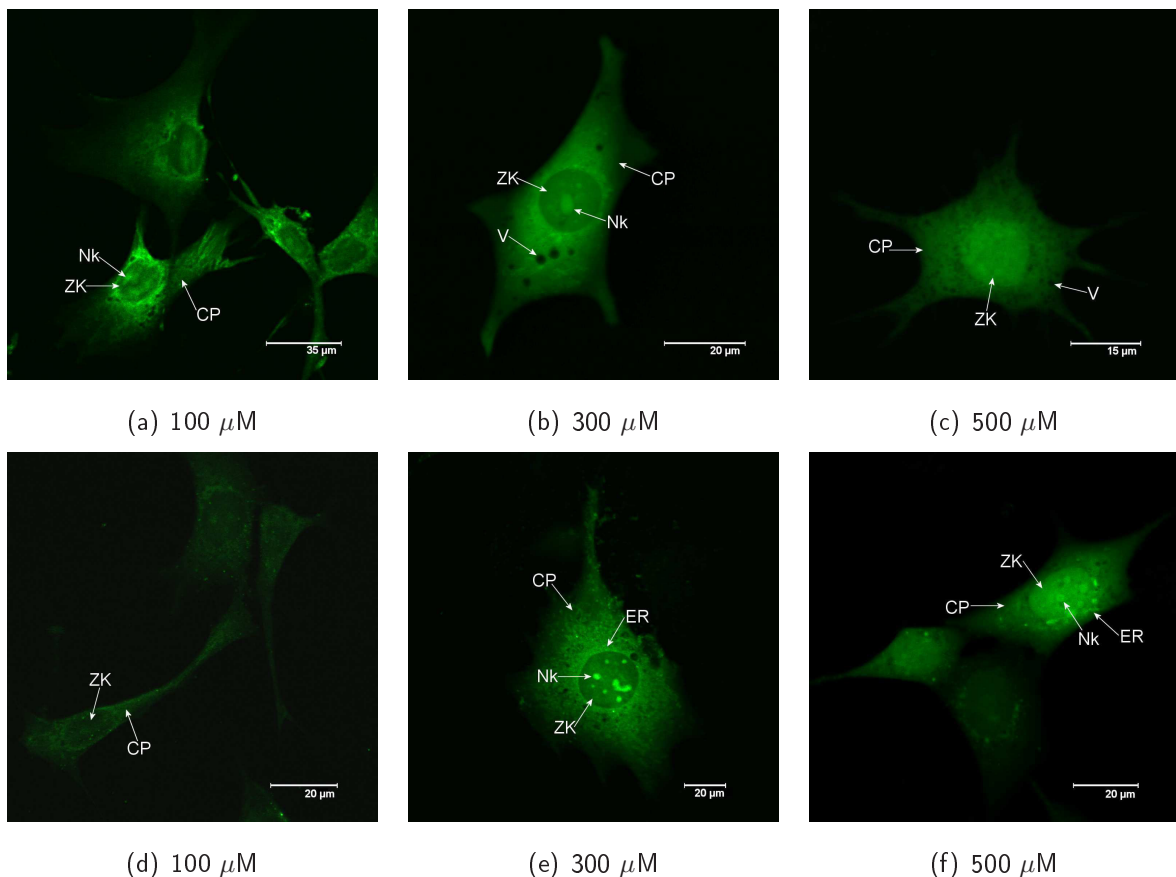


Abbildung 3.5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen humaner Gingiva-Fibroblasten nach 16 h Inkubation mit NiCl_2 . Markierung von Ni(II) mit $7 \mu\text{g/ml}$ Newport Green DCF. Detektion mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX APO 40x/0,8 W U-V-I, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser, Emissionsdetektionsbereich: 510 nm bis 560 nm, Blendendurchmesser: $127 \mu\text{m}$, (1 Airy). (a) PMT-voltage: 648 V, Kantenlänge: $173 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,086 bzw. 0,147; (b) PMT-voltage: 401 V, Kantenlänge: $92 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,145 bzw. 0,220; (c) PMT-voltage: 453 V, Kantenlänge: $80 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,102 bzw. 0,178; (d) PMT-voltage: 650 V, Kantenlänge: $112 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,027 bzw. 0,033; (e) PMT-voltage: 501 V, Kantenlänge: $181 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,146 bzw. 0,082; (f) PMT-voltage: 470 V, Kantenlänge: $114 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,082 bzw. 0,179. ZK=Zellkern, CP=Zytoplasma, Nk=Nukleolus, ER=Endoplasmatisches Retikulum, V=nicht fluoreszierendes Vesikel.

Eine weitere Änderung in der Lokalisation von Newport Green DCF war bei einer NiCl_2 -Konzentration von $500 \mu\text{M}$ nach 16 h zu beobachten (s. Abbildung 3.5(c) und 3.5(f)). Beim überwiegenden Teil der beobachteten Zellen war die retikuläre Struktur um den Zellkern reduziert. Dafür wies der Zellkern eine homogene Fluoreszenz mit hoher Intensität im kompletten Kompartiment auf, wodurch der Zellkern deutlich vom umgebenden Zytosol abgrenzbar war (s. Abbildung 3.5(c)). Die stark fluoreszierenden, punktförmigen Nukleoli waren weiterhin existent,

jedoch durch die stärkere Fluoreszenz im Zellkern und dem daraus resultierenden schwächeren Kontrast weniger dominant (s. Abbildung 3.5(f)). Das Zytosol war weitgehend homogen mit dem Farbstoff Newport Green DCF gefüllt, was auf die verstärkte Aufnahme und Akkumulation von Nickel in die Zellen hinwies, und beinhaltete nicht fluoreszierende Vesikel (s. Abbildung 3.5(c)). Bei wenigen Zellen war jedoch zu beobachten, dass noch keine Fluoreszenz im Zellkern vorhanden und die Netzstruktur um den Zellkern weiterhin stark ausgeprägt war. Die Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit $500 \mu\text{M}$ NiCl_2 erreichte für Zellen Werte zwischen 0,069 und 0,102 und für Zellkerne zwischen 0,074 und 0,173.

Inkubation humaner Gingiva-Fibroblasten mit unterschiedlichen NiCl_2 -Konzentrationen für 24 h:

Abbildung 3.6 zeigt Zellen, die 24 h mit verschiedenen NiCl_2 -Konzentrationen behandelt wurden. Zunächst sieht man in Abbildung 3.6(a) und 3.6(d) Zellen, die in BME-Medium mit einer NiCl_2 -Endkonzentration von $100 \mu\text{M}$ inkubiert wurden. Ähnlich der Abbildung 3.5 beobachtete man stark ausgeprägte, fluoreszierende Strukturen um den Zellkern, die sich mal mehr, mal weniger in das Zytosol ausbreiteten, das selbst relativ homogen fluoreszierte (s. Abbildung 3.6(d)). Im Zentrum der Zellen befand sich der Zellkern, der eine schwache Fluoreszenz zeigte (s. Abbildung 3.6(a) bis 3.6(d)), wohingegen man in einigen wenigen Zellen bereits stärkere Fluoreszenz im Zellkern beobachten konnte. Wie bereits bei den Zellen nach 16 h Inkubation beschrieben, enthielt der Zellkern ebenfalls fluoreszierende Nukleoli, die in ihrer Anzahl variierten (s. Abbildung 3.6(d)). Die relative Fluoreszenzintensität in den ausgewählten Zellen lag zwischen 0,123 und 0,170 für Zellen und bei Zellkernen als ROI zwischen 0,167 und 0,247 und damit nach zusätzlichen 8 h deutlich höher als nach 16 h bei gleicher NiCl_2 -Konzentration.

In Abbildung 3.6(b) und 3.6(e) sind exemplarisch mikroskopische Bilder von Zellen abgebildet, die 24 h mit $300 \mu\text{M}$ NiCl_2 inkubiert wurden. Die Zellen zeigten kurze zytoplasmatische Fortsätze, die wie das gesamte Zytosol schwach fluoreszierten. Die Fluoreszenz im Zytosol verdeutlichte die Aufnahme von Nickel in die Zellen. Die Fluoreszenz im Zytoplasma konzentrierte sich hauptsächlich um den Zellkern herum, war stark ausgeprägt und verzweigte sich in Form eines Netzwerkes im Zytosol nach außen hin abschwächend (s. Abbildung 3.6(b)). nicht fluoreszierende Bereiche waren auch in Abbildung 3.6(e), mit einem Pfeil gekennzeichnet, erkennbar, die das Zytosol bzw. die retikulären Strukturen um den Zellkern unterbrachen. Im Inneren des komplett mit Fluoreszenz ausgefüllten Zellkerns waren wie zuvor stark fluoreszierende Nukleoli zu sehen (s. Abbildung 3.6(b)), sodass die Intensität der Fluoreszenz auf Werte zwischen 0,066 und 0,153 für komplette Zellen und 0,222 und 0,260 für Zellkerne im Vergleich zu $100 \mu\text{M}$ weiter anstieg.

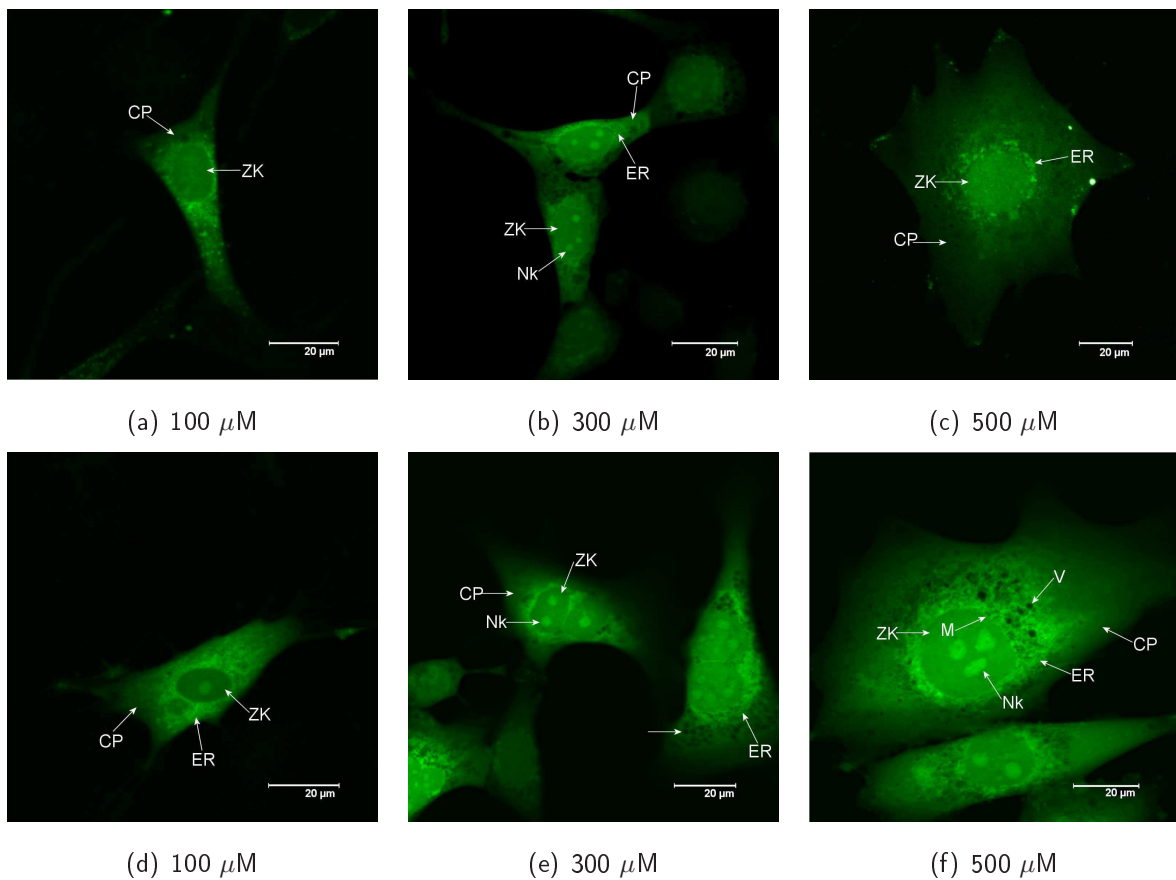


Abbildung 3.6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen humaner Gingiva-Fibroblasten nach 24 h Inkubation mit NiCl_2 . Markierung von Ni(II) mit $7 \mu\text{g/ml}$ Newport Green DCF. Detektion mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX APO 40x/0,8 W U-V-I, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser, Emissionsdetektionsbereich: 510 nm bis 560 nm, Blendendurchmesser: $127 \mu\text{m}$, (1 Airy). (a) PMT-voltage: 515 V, Kantenlänge: $107 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,123 bzw. 0,167; (b) PMT-voltage: 449 V, Kantenlänge: $113 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,153 bzw. 0,222; (c) PMT-voltage: 551 V, Kantenlänge: $140 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,073 bzw. 0,164; (d) PMT-voltage: 459 V, Kantenlänge: $105 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,145 bzw. 0,172; (e) PMT-voltage: 420 V, Kantenlänge: $121 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,126 bzw. 0,260; (→) nicht fluoreszierendes Vesikel; (f) PMT-voltage: 410 V, Kantenlänge: $113 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,154 bzw. 0,294. ZK=Zellkern, CP=Zytoplasma, Nk=Nukleolus, ER=Endoplasmatisches Retikulum, V=nicht fluoreszierendes Vesikel, M=Kernmembran.

Eine sehr starke Fluoreszenz im Zellkern war bei einer weiteren Erhöhung der NiCl_2 -Konzentration auf $500 \mu\text{M}$ nach 24 h zu beobachten (s. Abbildung 3.6(c) und 3.6(f)). Der Zellkern und die Nukleoli traten durch ihre starke Fluoreszenzintensität mit Werten zwischen 0,164 und 0,294 deutlich von dem umgebenden Zytoplasma mit Fluoreszenzwerten zwischen 0,073 und 0,154 hervor (s. Abbildung 3.6(f)), das selbst sehr homogen vom Fluoreszenzfarbstoff Newport Green DCF erfüllt war und nur gelegentlich von nicht fluoreszierenden Vesikeln unterbrochen wurde (s.

Markierung (V→) in Abbildung 3.6(f)). Das fluoreszierende Netzwerk um den Zellkern herum war mitunter in seiner Ausbreitung in der Zelle reduziert (s. Abbildung 3.5(b)), aber in seiner Fluoreszenzintensität weiterhin stark. Gleichzeitig war eine deutlich fluoreszierende Kernmembran sichtbar, die den Übergang der ER-Membran und des Netzwerkes in die Kernmembran aufzeigte (s. Markierung (M→) in Abbildung 3.6(f)).

Inkubation humaner Gingiva-Fibroblasten mit unterschiedlichen NiCl₂-Konzentrationen für 48 h:

Nach 48 h Inkubation mit 100 μM NiCl₂ war in den Zellen eine ausgeprägte Netzstruktur durch starke Fluoreszenz auffällig sichtbar (s. Abbildung 3.7(d)), die sich vom Zellkern ausgehend teilweise bis zur Zytoplasmamembran ausbreitete und von nicht fluoreszierenden Vesikeln (s. Markierung in Abbildung 3.7(a)) unterbrochen wurde. Im umgebenden Zytosol war die Fluoreszenz schwächer ausgeprägt. In einigen Zellen konnte man bereits Fluoreszenzsteigerungen im Zellkern beobachten (s. Abbildung 3.7(d)), der zusätzlich fluoreszierende Nukleoli beinhaltete. So wurden durch die starke Fluoreszenz des ER in kompletten Zellen relative Fluoreszenzwerte zwischen 0,087 und 0,153 errechnet und für Zellkerne Werte zwischen 0,074 und 0,251.

Nach einer Inkubationszeit von 48 h mit 300 μM NiCl₂ genügten bereits geringe PMT-*voltages*, um den Fluoreszenzfarbstoff Newport Green DCF und damit das gebundene Ni(II) zu detektieren. Im Zytosol war die Fluoreszenzintensität geringer als im Zellkern (s. Abbildung 3.7(b)), da sich im Zellkern der Farbstoff Newport Green DCF konzentrierte. Das Zytosol war häufiger von nicht fluoreszierenden Vesikeln unterbrochen (s. Markierung V in Abbildung 3.7(e)). Ebenfalls starke Fluoreszenz zeigte der Bereich um den Zellkern herum, der wie zuvor schon erwähnt, bei hohen NiCl₂-Konzentrationen im Zellkern nur gering ausgeprägt war. Dadurch wurden relative Fluoreszenzintensitätswerte in der Zelle zwischen 0,081 und 0,154 und im Zellkern zwischen 0,166 und 0,215 erreicht.

Intensitätswerte zwischen 0,059 und 0,153 für Zellen bzw. zwischen 0,103 und 0,254 für Zellkerne wurden nach 48 h Inkubation mit 500 μM NiCl₂ erreicht (s. Abbildung 3.7(c) und 3.7(f)). Eine deutliche Steigerung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den Zellen mit 100 μM und 300 μM NiCl₂ war nicht zu beobachten. Wie bei den Zellen zuvor nach Inkubation mit 300 μM NiCl₂ trat ein stark fluoreszierendes Netzwerk in Form eines Ringes um den Zellkern hervor (s. Abbildung 3.7(c)). Vereinzelt verzweigte es sich im Zytosol. In allen Zellen fluoreszierte der Zellkern homogen und beinhaltete zugleich stark fluoreszierende Nukleoli, die bei allen vorher gezeigten Zellen zu sehen waren.

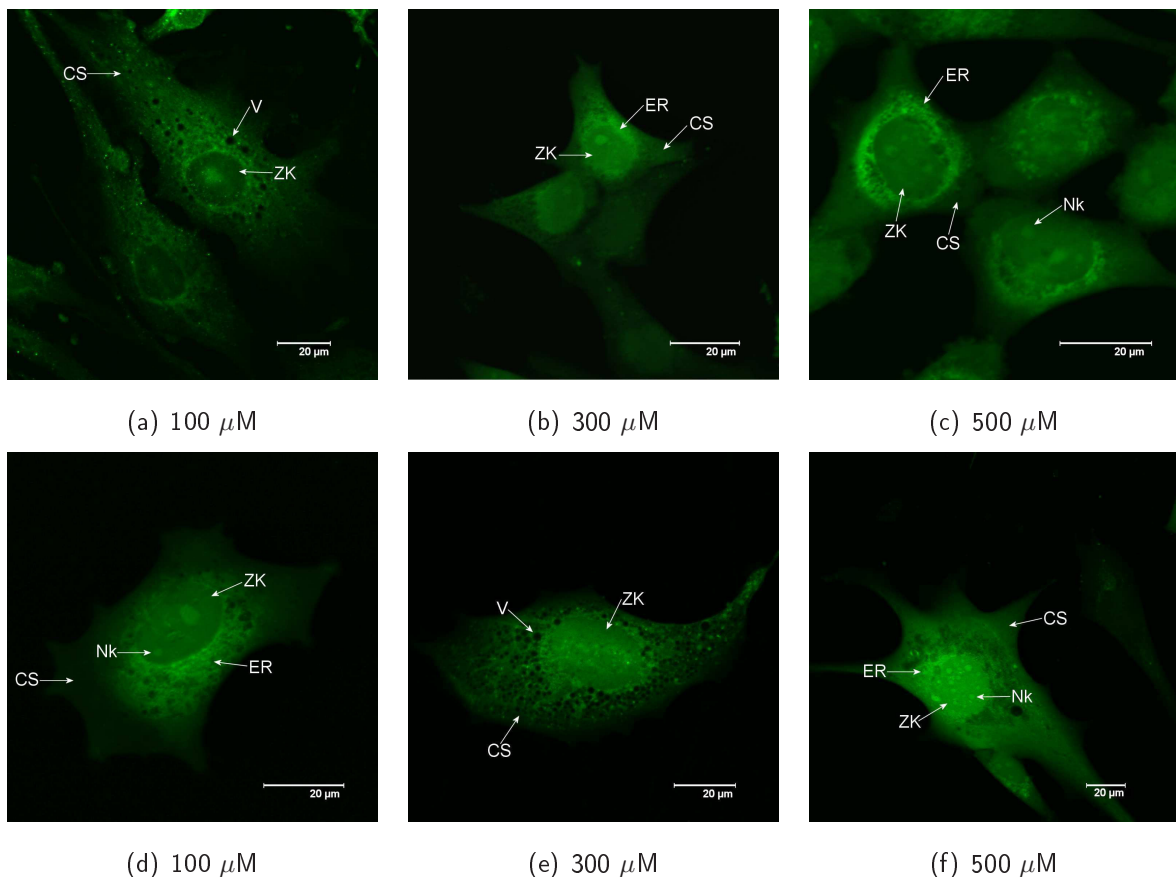


Abbildung 3.7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen humaner Gingiva-Fibroblasten nach 48 h Inkubation mit NiCl_2 . Markierung von Ni(II) mit $7 \mu\text{g/ml}$ Newport Green DCF. Detektion mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX APO 40x/0,8 W U-V-I, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser, Emissionsdetektionsbereich: 510 nm bis 560 nm, Blendendurchmesser: $127 \mu\text{m}$, (1 Airy). (a) PMT-voltage: 580 V, Kantenlänge: $140 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,100 bzw. 0,074; (b) PMT-voltage: 440 V, Kantenlänge: $108 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,121 bzw. 0,179; (c) PMT-voltage: 401 V, Kantenlänge: $81 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,126 bzw. 0,167; (d) PMT-voltage: 430 V, Kantenlänge: $93 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,098 bzw. 0,169; (e) PMT-voltage: 499 V, Kantenlänge: $121 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,084 bzw. 0,166; (f) PMT-voltage: 430 V, Kantenlänge: $192 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,153 bzw. 0,254. ZK=Zellkern, CS=Zytosol, Nk=Nukleolus, ER=Endoplasmatisches Retikulum, V= nicht fluoreszierendes Vesikel.

Vergleich der relativen Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der NiCl_2 -Konzentration und der Inkubationszeit:

Im folgenden Abschnitt verdeutlichen die gezeigten Graphen die Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensitäten innerhalb einer Metallverbindung von steigenden Metallkonzentrationen und Inkubationszeiten. Dazu wurden pro Messpunkt Intensitätswerte aus vier verschiedenen Zellen

gewonnen und die Werte für die gesamten Zellen und den Zellkern getrennt aufgetragen. Als Kontrolle dienten Zellen, die zum einen weder mit Metallverbindungen, noch mit Newport Green DCF versetzt wurden, zum anderen Zellen, die zwar nicht mit Metallverbindungen inkubiert wurden, dafür aber mit Newport Green DCF.

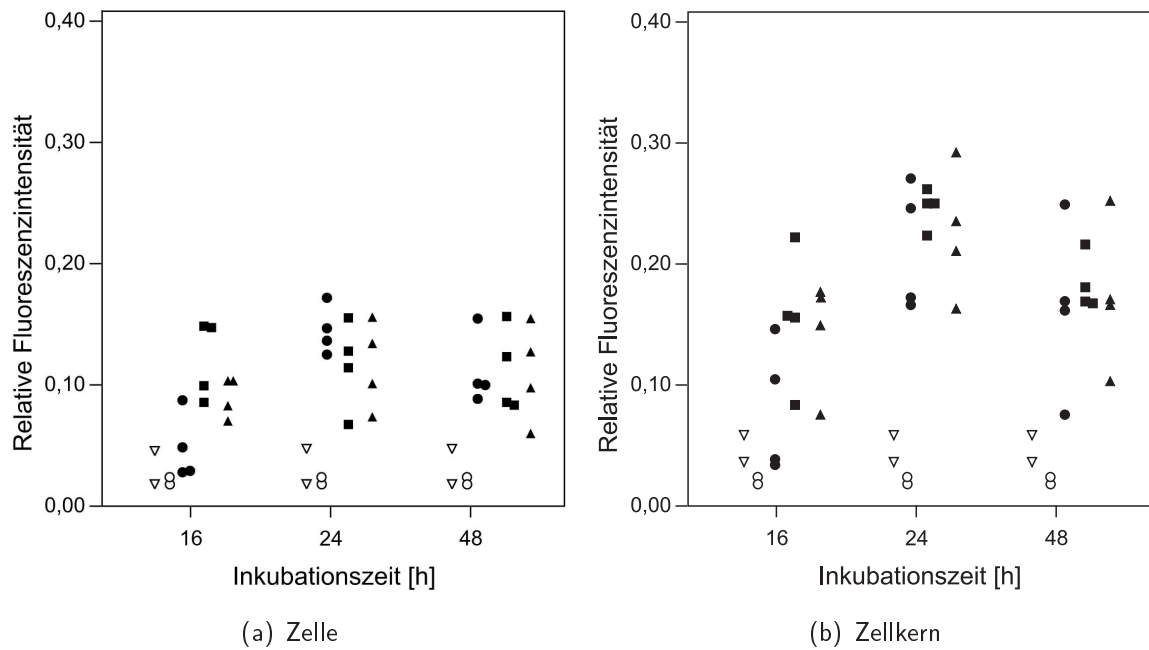


Abbildung 3.8: Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF in NiCl_2 -behandelten humanen Gingiva-Fibroblasten. Die Werte der relativen Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF in NiCl_2 -behandelten humanen Gingiva-Fibroblasten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für verschiedene NiCl_2 -Konzentrationen (● $100 \mu\text{M}$, ■ $300 \mu\text{M}$, ▲ $500 \mu\text{M}$) stammen aus vier Zellen. Sie zeigen eine Erhöhung der relativen Fluoreszenzintensität in Zellen über die Zeit, die geringfügig von der NiCl_2 -Konzentration im BME-Medium abhängig ist. Eine 3-fache bis 7-fache Erhöhung der relativen Fluoreszenzintensität im Vergleich zu Intensitätswerten aus unbehandelten Zellen mit Newport Green DCF (▽) sind messbar. Die Intensität der Eigenfluoreszenz unbehandelter Zellen (○) ist sehr gering. (a) Veränderung der relativen Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF in der gesamten Zelle; (b) Veränderung der relativen Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF im Zellkern.

Es war zu beobachten, dass nach 16 h Inkubation mit NiCl_2 die relativen Fluoreszenzintensitätswerte der kompletten Zellen niedrig waren (s. Abbildung 3.8(a)) und lediglich eine leichte Erhöhung der Fluoreszenzintensität in den Zellen mit $300 \mu\text{M}$ oder $500 \mu\text{M}$ NiCl_2 im BME-Medium messbar war. Nach 24 h und 48 h Inkubation mit NiCl_2 zeigten sich jeweils kaum Unterschiede in der Fluoreszenzintensität zwischen allen drei Konzentrationen. Im Vergleich zu den Werten nach 16 h waren sie jedoch leicht gestiegen. Insgesamt ergaben sich in kompletten Zellen Erhöhungen der Fluoreszenzintensität nach NiCl_2 -Zugabe um das 2-fache bis 4-fache. Einzelne Zellen zeigten sogar bis zu 5-fach höhere Werte im Vergleich zu den Kontrollzellen mit Newport Green DCF. Im Zellkern war ein ähnlicher Trend der Fluoreszenzintensität zu be-

obachten. Die geringsten Fluoreszenzintensitäten wurden nach 16 h Inkubation mit 100 μM NiCl_2 erreicht, die aber mit zunehmenden Inkubationszeiten dennoch anstiegen. Die Werte nach 16 h Inkubation mit 300 μM und 500 μM NiCl_2 waren höher als bei 100 μM . Nach 24 h und 48 h näherten sich die Intensitätswerte bei allen drei getesteten Konzentrationen einander an. Insgesamt ergaben sich im Zellkern höhere Fluoreszenzwerte als in der gesamten Zelle, die im Vergleich zu den Kontrollwerten mit Newport Green DCF 3,5-fach bis 5-fach verstärkt waren.

3.1.4.2 Aufnahme von Nickel in humane Gingiva-Fibroblasten während NiSO_4 -Exposition

NiSO_4 ist wie NiCl_2 eine wasserlösliche Nickelverbindung. In wässriger Lösung liegt Nickel als Ni^{2+} vor und wird durch aktiven Transport in die Zellen aufgenommen. Die Versuche mit einer zweiten wasserlöslichen Nickelverbindung sollten zeigen, ob es Unterschiede in der Aufnahme und Lokalisation des Nickels bei verschiedenen wasserlöslichen Verbindungen gibt und ob man diese anhand der Eigenschaften des optischen Sensors unterscheiden kann. Die für die folgenden Versuche verwendeten Endkonzentrationen von NiSO_4 im BME-Medium (100 μM , 300 μM und 500 μM) und die Inkubationszeiten (16 h, 24 h und 48 h) waren identisch zu den Versuchen mit NiCl_2 . Die Aufnahme und Lokalisation von Ni(II) wurde ebenfalls durch die Inkubation mit dem optischen Sensor Newport Green DCF und dessen Detektion mit dem CLSM beobachtet.

Inkubation humaner Gingiva-Fibroblasten mit unterschiedlichen NiSO_4 -Konzentrationen für 16 h:

Ähnlich wie zuvor bei den Zellen mit NiCl_2 dominierte nach kurzer Inkubationszeit von 16 h und geringer NiSO_4 -Konzentration von 100 μM eine stark ausgeprägte und fluoreszierende retikuläre Struktur (ER) um den Zellkern, wie durch die CLSM-Aufnahmen der Fibroblasten zu sehen war (s. Abbildung 3.9(a)). Das Zytosol zeigte dagegen nur geringe diffuse Fluoreszenz, sodass erst durch höhere PMT-voltages zwischen 600 V und 700 V die Umrise der Zellen durch die Fluoreszenz zu erkennen waren. Im Zellkern selbst konnte man beim überwiegenden Teil der Fibroblasten keine Fluoreszenz beobachten, sodass man auf eine minimale Aufnahme von Nickel schließen konnte (s. Abbildung 3.9(a)). Vereinzelt beobachtete man jedoch Zellen mit einem homogen fluoreszierenden Zellkern, bei denen das umgebende Zytosol ebenfalls nur schwache Fluoreszenz aufwies. Um den Zellkern herum war eine retikuläre Struktur mit hoher Fluoreszenz ausgebildet. Zusätzlich war in diesen Zellen die Kernmembran und der angrenzende Bereich sehr stark fluoreszent (s. Markierung M→ in Abbildung 3.9(d)). Deutlich sah man in den Fibroblasten, dass im Zytosol Vesikel existierten, die keine Fluoreszenz trugen (s. Markierung V→ in Abbildung 3.9(d)).

Mit den gezeigten Aufnahmen als Grundlage für eine Angabe der relativen Fluoreszenzintensitätswerte erhielt man Werte für die Zellen zwischen 0,041 und 0,121; für Zellkerne zwischen 0,078 und 0,300, die im Vergleich zu den korrespondierenden Werten aus Zellen mit $100 \mu\text{M}$ NiCl_2 nach 16 h höher waren.

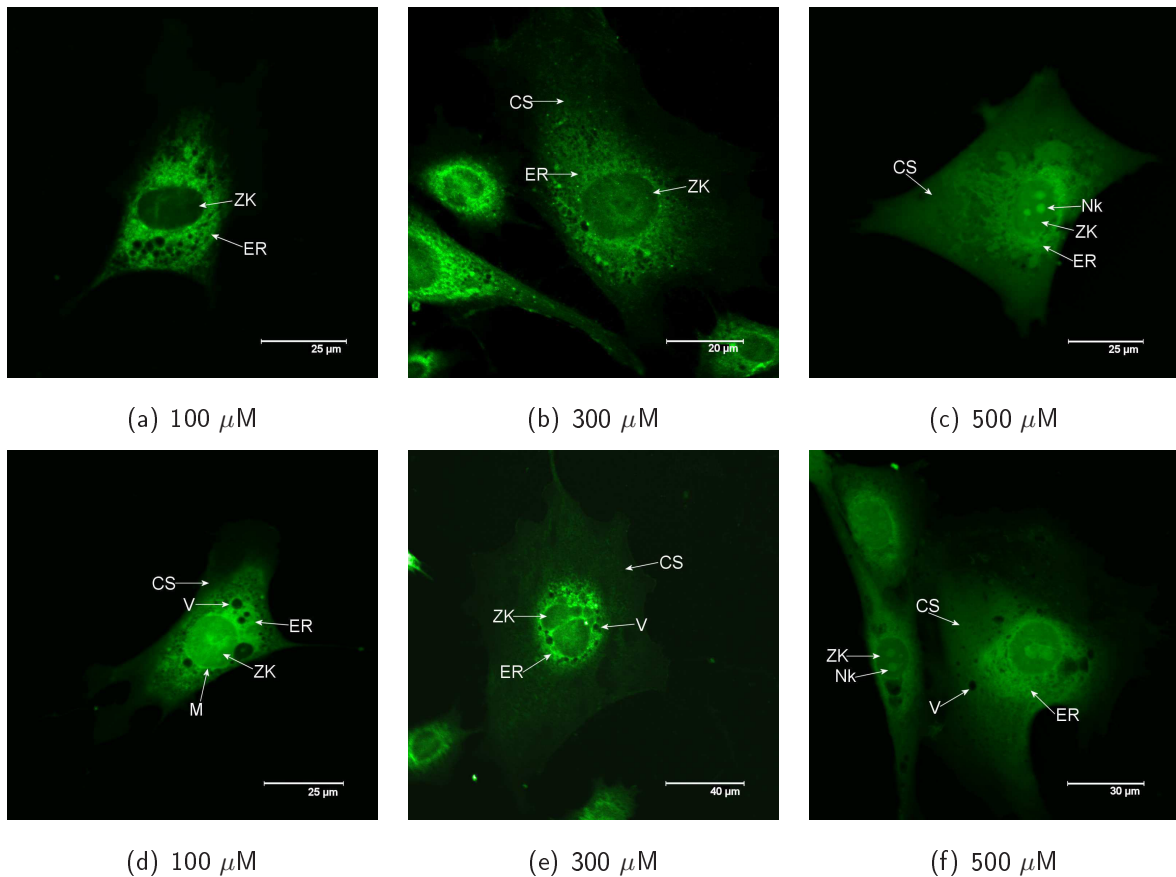


Abbildung 3.9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen humaner Gingiva-Fibroblasten nach 16 h Inkubation mit NiSO_4 . Markierung von Ni(II) mit $7 \mu\text{g/ml}$ Newport Green DCF. Detektion mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX APO 40x/0,8 W U-V-I, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser, Emissionsdetektionsbereich: 510 nm bis 560 nm, Blendendurchmesser: $127 \mu\text{m}$, (1 Airy). (a) PMT-voltage: 652 V, Kantenlänge: $167 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,041 bzw. 0,078; (b) PMT-voltage: 628 V, Kantenlänge: $194 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,056 bzw. 0,100; (c) PMT-voltage: 463 V, Kantenlänge: $124 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,137 bzw. 0,260; (d) PMT-voltage: 526 V, Kantenlänge: $117 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,060 bzw. 0,096; (e) PMT-voltage: 601 V, Kantenlänge: $190 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,054 bzw. 0,136; (f) PMT-voltage: 432 V, Kantenlänge: $146 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,081 bzw. 0,214. ZK=Zellkern, CS=Zytosol, Nk=Nukleolus, ER=Endoplasmatisches Retikulum, V=nicht fluoreszierendes Vesikel, M=Kernmembran.

Fibroblasten, die 16 h mit 300 μM NiSO_4 und anschließend mit dem Fluoreszenzfarbstoff Newport Green DCF inkubiert wurden, sind in Abbildung 3.9(b) und 3.9(e) abgebildet. Die Zellen waren in ihrem Fluoreszenzmuster untereinander sehr ähnlich und zeigten eine ausgeprägte Netzstruktur (ER) um den Zellkern herum (s. Abbildung 3.9(e)), die das schwach fluoreszierende Zytosol mal mehr, mal weniger nach außen hin durchzog und ebenfalls Vesikel beinhaltete. Der Zellkern mit seiner schwachen Fluoreszenz war durch die hohe Fluoreszenzintensität dieses Netzwerks um den Zellkern herum deutlich vom Zytosol abgrenzbar. So erreichten die Zellkerne relative Fluoreszenzintensitätswerte zwischen 0,094 und 0,136, die Zellen zwischen 0,056 und 0,097, was lediglich eine schwache Steigerung zu Zellen nach 16 h Inkubation mit 100 μM NiSO_4 bedeutete.

Zellen, die für 16 h mit 500 μM NiSO_4 behandelt wurden (s. Abbildung 3.9(c) und 3.9(f)), zeigten eine geringfügig erhöhte und zugleich homogenere Fluoreszenzintensität, sowohl im Zytosol, als auch im Zellkern, im Vergleich zu geringeren Konzentrationen von NiSO_4 im BME-Medium. Die homogene Fluoreszenz im Zytosol wurde teilweise durch nicht fluoreszierende Vesikel unterbrochen (s. Abbildung 3.9(f)). Um den Zellkern herum, der bereits Fluoreszenz zeigte und stark fluoreszierende Nukleoli enthielt, war das fluoreszierende Netzwerk sichtbar, doch durch die gestiegene Fluoreszenz im Zytosol war der Kontrast nicht so deutlich und das Netzwerk weniger dominant (s. Abbildung 3.9(f)). In diesen Zellen wurden Intensitätswerte für Zellen zwischen 0,049 und 0,137 und für Zellkern zwischen 0,085 und 0,214 errechnet. Ein geringer Anteil der Zellen, der in der Abbildung nicht aufgeführt wird, zeigte weder im Zellkern noch im Zytosol Fluoreszenz, jedoch war die retikuläre, fluoreszierende Struktur um den Zellkern herum stark ausgeprägt.

Inkubation humaner Gingiva-Fibroblasten mit unterschiedlichen NiSO_4 -Konzentrationen für 24 h:

Zellen, die 24 h mit 100 μM NiSO_4 inkubiert wurden, sind in Abbildung 3.10(a) und 3.10(d) dargestellt. Ein Anteil der Fibroblasten zeigte lediglich das schwach und diffus fluoreszierende Netzwerk des ER, das sich im ebenfalls schwach fluoreszierenden Zytosol weitläufig ausbreitete (s. Abbildung 3.10(a)). Dennoch war zu erkennen, dass die Zellen lange Ausläufer bildeten und der Zellkern nur eine schwache Fluoreszenz besaß. Die fluoreszierenden Strukturen waren in Abbildung 3.10(d) klarer und stärker in ihrer Intensität, beschränkten sich jedoch auf Zellkern-nahe Regionen und den Zellkern mit seinen Nukleoli, der von einer fluoreszierenden Membran begrenzt wurde. Damit ergaben sich relative Fluoreszenzintensitätswerte der Zellen in Abhängigkeit von der PMT-voltage zwischen 0,055 und 0,134 und für die Zellkerne zwischen 0,074 und 0,317, was lediglich eine geringe Erhöhung der Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF im Vergleich zu den Werten bei 16 h Inkubation mit 100 μM NiSO_4 bedeutete.

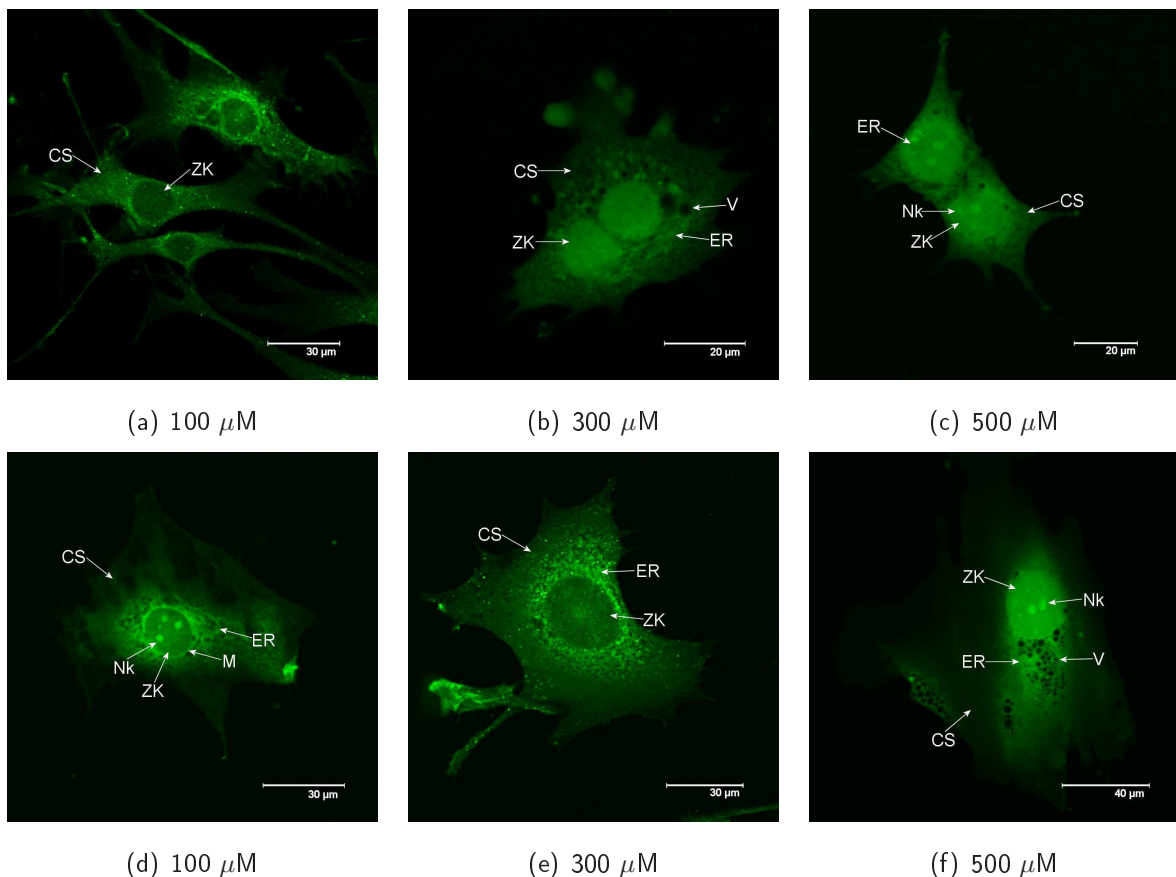


Abbildung 3.10: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen humaner Gingiva-Fibroblasten nach 24 h Inkubation mit NiSO_4 . Markierung von Ni(II) mit $7 \mu\text{g/ml}$ Newport Green DCF. Detektion mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX APO 40x/0,8 W U-V-I, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser, Emissionsdetectionsbereich: 510 nm bis 560 nm, Blendendurchmesser: $127 \mu\text{m}$, (1 Airy). (a) PMT-voltage: 650 V, Kantenlänge: $154 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,060 bzw. 0,074; (b) PMT-voltage: 459 V, Kantenlänge: $92 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,102 bzw. 0,211; (c) PMT-voltage: 424 V, Kantenlänge: $118 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,179 bzw. 0,291; (d) PMT-voltage: 611 V, Kantenlänge: $137 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,085 bzw. 0,208; (e) PMT-voltage: 652 V, Kantenlänge: $146 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,087 bzw. 0,148; (f) PMT-voltage: 473 V, Kantenlänge: $171 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,078 bzw. 0,317; ZK=Zellkern, CS=Zytosol, Nk=Nukleolus, ER=Endoplasmatisches Retikulum, V=nicht fluoreszierendes Vesikel, M=Kernmembran.

Nach 24 h mit $300 \mu\text{M}$ NiSO_4 konnte man unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten und Lokalisationen in den Metall-behandelten Zellen beobachten. Einerseits gab es Zellen, deren Fluoreszenz sich im Zellkern konzentrierte (s. Abbildung 3.10(b)), der selbst mal mehr mal weniger von der retikulären, fluoreszierenden Struktur (ER) umgeben war, und andererseits gab es Zellen, die kaum Fluoreszenz im Zellkern erkennen ließen (s. Abbildung 3.10(e)), der aber als solches durch das stark fluoreszierende Netzwerk um ihn herum zu identifizieren war. In allen Zellen zeigte

sich jedoch Fluoreszenz und damit Nickel im Zytosol, das teilweise nicht fluoreszierende Vesikel enthielt (s. Abbildung 3.10(b)). Die Fluoreszenzintensität erreichte in Zellen Werte zwischen 0,079 und 0,126 und im Zellkern zwischen 0,148 und 0,272.

Etwas höhere Fluoreszenzintensitätswerte zwischen 0,078 und 0,179 wurden in Zellen erreicht, die in Abbildung 3.10(c) und 3.10(f) dargestellt sind. Insgesamt hatte sich durch die Inkubation mit 500 μM NiSO_4 über 24 h die Konzentration von Ni(II) in den Zellen im Vergleich zu 300 μM nur leicht erhöht. Fluoreszenzintensitäten zwischen 0,175 und 0,353 wurden dagegen in den Zellkernen dieser Zellen erreicht (s. Abbildung 3.10(f)), die 24 h mit 500 μM NiSO_4 inkubiert wurden. Dies bedeutete eine deutliche Zunahme der Ni(II)-Konzentration in den Zellkernen. Dieses Ergebnis wurde durch die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen optisch bestätigt. Es zeigte sich eine homogene Fluoreszenz in den Zellkernen, die zusätzlich fluoreszierenden Nukleoli enthielten (s. Abbildung 3.10(c)). Das zuvor beschriebene stark fluoreszierende Netzwerk um den Zellkern herum war bei diesen Zellen dagegen weniger stark ausgeprägt. Zugleich wurden nicht fluoreszierende Vesikel innerhalb des Zytoplasmas beobachtet (s. Markierung in Abbildung 3.10(f)).

Inkubation humaner Gingiva-Fibroblasten mit unterschiedlichen NiSO_4 -Konzentrationen für 48 h:

Um die Fluoreszenz des optischen Sensors Newport Green DCF in Fibroblasten zu beobachten, die 48 h mit 100 μM NiSO_4 inkubiert wurden (s. Abbildung 3.11(a) und 3.11(d)), mussten PMT-*voltages* zwischen 504 V und 686 V eingestellt werden. Man erkannte, dass die Fluoreszenz innerhalb des Zytoplasmas sehr inhomogen verteilt war. nicht fluoreszierende Vesikel (V) und ein fluoreszierendes Netzwerk (ER) waren ebenfalls zu sehen (s. Abbildung 3.11(d)). Der Zellkern, der überwiegend homogen fluoreszierte und sich dadurch optisch von dem Zytosol abgrenzte, war im Zentrum der Zellen gut zu erkennen. Nukleoli waren hier nicht zu beobachten (s. Abbildung 3.11(a)). Es ergaben sich relative Fluoreszenzintensitätswerte für die Zellen zwischen 0,053 und 0,149 und für Zellkerne zwischen 0,103 und 0,344.

In allen untersuchten Zellen resultierte eine Erhöhung der NiSO_4 -Konzentration auf 300 μM in einer deutlichen Fluoreszenzerhöhung im Zellkern, der von einem diffus fluoreszierenden Zytosol umgeben war (s. Abbildung 3.11(e)). Die Netzstruktur (ER), die bei den zuvor gezeigten Zellen teilweise sehr deutlich zu sehen war, war hier kaum zu erkennen. Bereits bei geringen PMT-*voltages* von etwa 500 V waren die Zellen in ihrer Struktur zu erkennen (s. Abbildung 3.11(b)). So ergaben sich Intensitätswerte für die Fluoreszenz kompletter Zellen zwischen 0,088 und 0,166 und für Zellkerne zwischen 0,164 und 0,335.

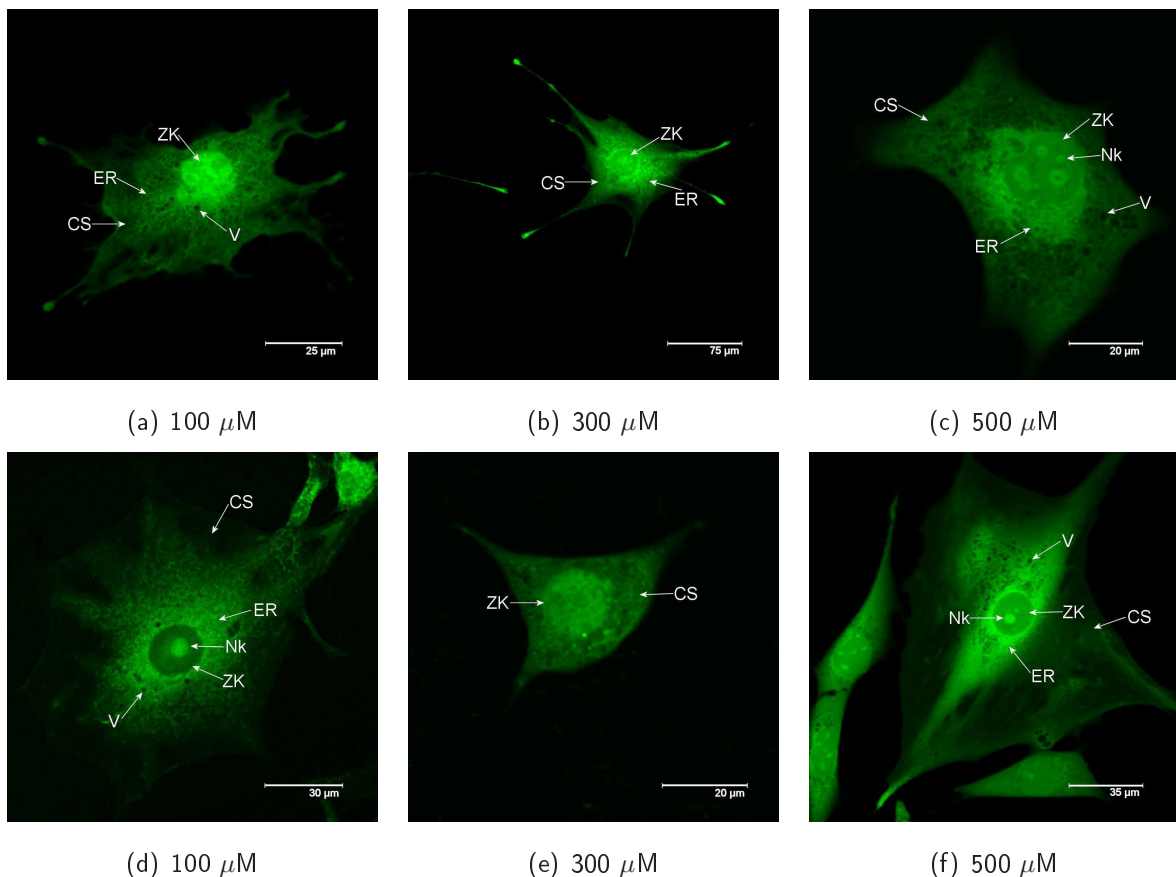


Abbildung 3.11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen humaner Gingiva-Fibroblasten nach 48 h Inkubation mit NiSO_4 . Markierung von Ni(II) mit $7 \mu\text{g/ml}$ Newport Green DCF. Detektion mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX APO 40x/0,8 W U-V-I, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser, Emissionsdetectionsbereich: 510 nm bis 560 nm, Blendendurchmesser: $127 \mu\text{m}$, (1 Airy). (a) PMT-voltage: 514 V, Kantenlänge: $122 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,111 bzw. 0,344; (b) PMT-voltage: 501 V, Kantenlänge: $375 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,166 bzw. 0,335; (c) PMT-voltage: 413 V, Kantenlänge: $101 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,154 bzw. 0,303; (d) PMT-voltage: 686 V, Kantenlänge: $144 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,066 bzw. 0,149; (e) PMT-voltage: 535 V, Kantenlänge: $87 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,115 bzw. 0,198; (f) PMT-voltage: 470 V, Kantenlänge: $176 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,132 bzw. 0,364. ZK=Zellkern, CS=Zytosol, Nk=Nukleolus, ER=Endoplasmatisches Retikulum, V=nicht fluoreszierendes Vesikel.

Sehr starke Fluoreszenzintensitäten, die sich teilweise zu vorherigen Intensitäten von $100 \mu\text{M}$ und $300 \mu\text{M}$ verdoppelten, wurden insbesondere in den Zellkernen und um diese herum detektiert (s. Abbildung 3.11(c) und 3.11(f)). So erreichten komplette Zellen relative Fluoreszenzintensitäten von 0,132 bis 0,245 und Zellkerne alleine von 0,303 bis 0,364. Diese Zellen wurden für 48 h mit $500 \mu\text{M}$ NiSO_4 behandelt und zeigten eine stark fluoreszierende retikuläre Struktur (ER), die sich um den Zellkern konzentrierte und gering im Zytosol ausbreitete (s. Abbildung 3.11(c)). Die

Zellkerne selbst waren komplett fluoreszent und beinhalteten sichtbar die stark fluoreszierenden Nukleoli. Im Zytosol, das im Vergleich zum Zellkern geringere Fluoreszenz zeigte, waren vermehrt kleine Vesikel zu beobachten, die nicht fluoreszierten (s. Markierung V in Abbildung 3.11(c)).

Vergleich der relativen Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der NiSO₄-Konzentration und der Inkubationszeit:

Stellte man die relativen Fluoreszenzintensitätswerte aus den Beispielzellen nach NiSO₄-Behandlung für die unterschiedlichen Inkubationszeiten und NiSO₄-Konzentrationen graphisch dar, so erkannte man in kompletten Zellen (s. Abbildung 3.12(a)) eine stetige Zunahme der Intensitätswerte innerhalb einer NiSO₄-Konzentration mit zunehmender Inkubationszeit. Auch bei identischen Inkubationszeiten war eine metallkonzentrationsabhängige Verstärkung der Fluoreszenzintensitäten zu beobachten, die mit steigender NiSO₄-Konzentration einen stärkeren Anstieg der Fluoreszenzintensität bewirkte. Die relativen Fluoreszenzintensitätswerte nach 16 h Inkubation mit NiSO₄ erhöhten sich dabei im Vergleich zu unbehandelten Zellen mit Newport Green um das 2-fache. Die Werte erhöhten sich auf das 3-fache bis 4,5-fache nach 24 h Inkubation mit 300 μM und 500 μM und sogar auf das bis zu 6-fache nach 48 h Inkubation mit 500 μM NiSO₄, wobei die geringeren Konzentrationen eine 5-fache Erhöhung der Fluoreszenzintensität bewirkten.

In den Zellkernen waren schon nach 16 h höhere Intensitätswerte als in kompletten Zellen messbar, wobei die Kontrollwerte in den Zellkernen im Vergleich zu den Kontrollwerten der kompletten Zellen etwas höher waren. Eine NiSO₄-konzentrationsabhängige Steigerung der Fluoreszenzintensitätswerte von Newport Green DCF war sowohl in den gesamten Zellen, als auch in den Zellkernen zu jedem getesteten Zeitpunkt sichtbar, wobei die größte Zunahme der Fluoreszenzintensität jeweils bei 500 μM NiSO₄ im Medium zu beobachten war. So erreichten zu jedem Messzeitpunkt die Zellen mit 100 μM NiSO₄ geringere Fluoreszenzintensitätswerte als die Zellen mit 300 μM und diese wiederum geringere Werte als Zellen mit 500 μM NiSO₄ im BME-Medium. Insgesamt erhöhte sich die Fluoreszenzintensität mit steigender NiSO₄-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle um das 2-fache (100 μM) bis 3,5-fache (500 μM) nach 16 h Inkubation mit NiSO₄, um das 4-fache bis 6-fache nach 24 h Inkubation und um das 5-fache bis 7-fache nach 48 h.

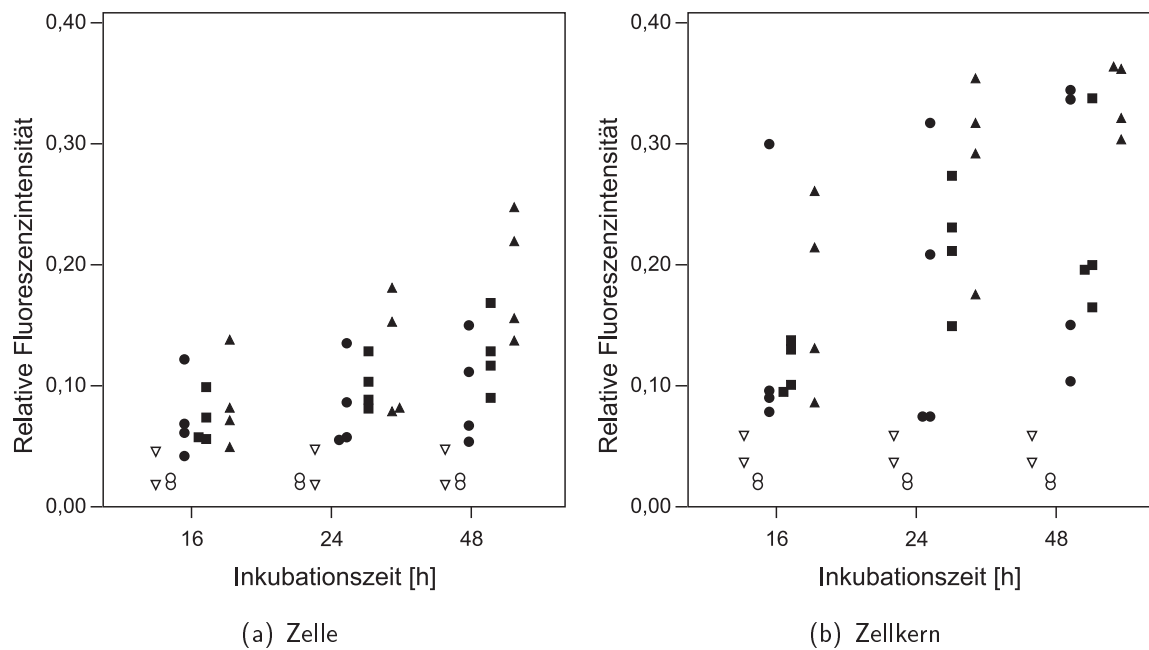


Abbildung 3.12: Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF in NiSO₄-behandelten humanen Gingiva-Fibroblasten. Die Werte der relativen Fluoreszenzintensitäten von Newport Green DCF in NiSO₄-behandelten humanen Gingiva-Fibroblasten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für verschiedene NiSO₄-Konzentrationen (• 100 µM, ■ 300 µM, ▲ 500 µM) stammen aus vier Beispielzellen. Intensitätswerte aus Zellen, die nur mit Newport Green DCF behandelt wurden (▽). Die Intensität der Eigenfluoreszenz unbehandelter Zellen (○). (a) Veränderung der relativen Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF in der gesamten Zelle; (b) Veränderung der relativen Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF im Zellkern.

3.1.4.3 Aufnahme von Nickel in humane Gingiva-Fibroblasten während Ni₃S₂-Exposition

Ni₃S₂ ist in Wasser wesentlich unlöslicher als NiCl₂ oder NiSO₄. Deshalb wird es in Form von kristallinen Partikeln über Phagozytose in Zellen aufgenommen und dort in sauren Vakuolen gelöst (Costa und Mollenhauer, 1980a; Costa und Mollenhauer, 1980b; Costa *et al.*, 1981b; Costa *et al.*, 1981a; Abbracchio *et al.*, 1982a). Ni₃S₂ wurde aufgrund dieser Eigenschaften als weitere Nickelverbindung beobachtet, um mögliche Unterschiede in der Aufnahme und Lokalisation im Vergleich zu wasserlöslichen Verbindungen aufzuzeigen.

Inkubation humaner Gingiva-Fibroblasten mit unterschiedlichen Ni₃S₂-Konzentrationen für 16 h:

Gab man in das BME-Medium 100 µM Ni₃S₂ für 16 h hinzu und inkubierte anschließend die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Newport Green DCF, zeigte sich bei der Detektion mit dem CLSM im Fluoreszenzmodus eine schwache Fluoreszenz in den Zellen (s. Abbildung 3.13(a) und 3.13(d)), die Intensitäten zwischen 0,040 und 0,064 für Zellen und 0,065 und 0,113 für die Zellkerne ergaben. Die Werte befanden sich in etwa im Bereich der Fluoreszenzintensitätswerte

von NiCl_2 und NiSO_4 . Diese Fluoreszenz wurde in den Ni_3S_2 -behandelten Zellen besonders um den Zellkern herum ringförmig sichtbar und breitete sich ins Zytosol aus (s. Abbildung 3.13(d)), das selbst eine schwache und diffuse Fluoreszenz besaß. Der Zellkern zeigte kaum Fluoreszenz (s. Abbildung 3.13(d)), was durch die Intensitätswerte bereits zu erkennen war. Auffällig waren die in Abbildung 3.13(a) mit einem Pfeil markierten punktförmigen Strukturen mit starker Fluoreszenz, die sich über die gesamte Zelle ausbreiteten.

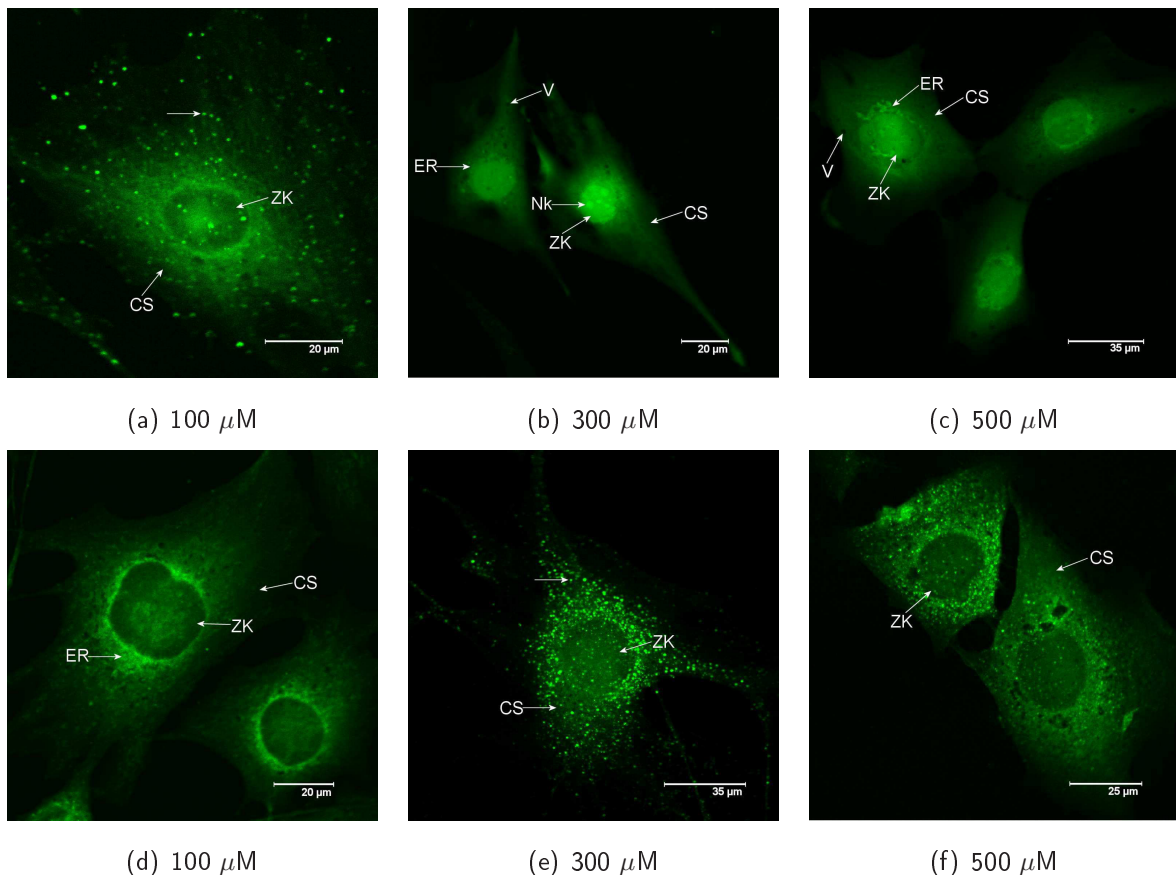


Abbildung 3.13: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen humaner Gingiva-Fibroblasten nach 16 h Inkubation mit Ni_3S_2 . Markierung von Ni(II) mit $7 \mu\text{g}/\text{ml}$ Newport Green DCF. Detektion mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX APO 40x/0,8 W U-V-I, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser, Emissionsdetectionsbereich: 510 nm bis 560 nm, Blendendurchmesser: $127 \mu\text{m}$, (1 Airy). (a) PMT-voltage: 731 V, Kantenlänge: $96 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,040 bzw. 0,098; (→) Markierung punktförmig fluoreszierender Bereiche im Zytosol; (b) PMT-voltage: 500 V, Kantenlänge: $158 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,103 bzw. 0,381; (c) PMT-voltage: 503 V, Kantenlänge: $173 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,069 bzw. 0,185; (d) PMT-voltage: 613 V, Kantenlänge: $125 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,064 bzw. 0,133; (e) PMT-voltage: 654 V, Kantenlänge: $160 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,046 bzw. 0,111; (f) PMT-voltage: 623 V, Kantenlänge: $129 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,062 bzw. 0,081. ZK=Zellkern, CS=Zytosol, Nk=Nukleolus, ER=Endoplasmatisches Retikulum, V=nicht fluoreszierendes Vesikel.

Die gleichen punktförmig fluoreszierenden Strukturen konnte man auch bei den Zellen beobachten, die 16 h mit $300 \mu\text{M}$ Ni_3S_2 inkubiert wurden (s. Abbildung 3.13(e)). In diesen Zellen war abgesehen von den fluoreszierenden punktförmigen Strukturen kaum Fluoreszenz im Zytosol und Zellkern detektierbar, was durch die relativen Fluoreszenzintensitätswerte von 0,046 für die Zelle und 0,111 für den Zellkern deutlich wurde. Andere Zellen zeigten bereits durch eine deutliche, homogene Fluoreszenz im Zellkern und Zytosol die Aufnahme von Nickel in den Zellkern (s. Abbildung 3.13(b)). Durch die starke Fluoreszenz im Zellkern und dessen Nukleoli wurden relative Fluoreszenzintensitäten zwischen 0,307 und 0,381 erreicht.

Beobachtete man die Werte im Zytoplasma zwischen 0,103 und 0,153, wurde bereits eine deutliche Fluoreszenzsteigerung durch die Bindung von Ni(II) an Newport Green DCF erreicht, die die Werte der Zellen mit löslichen Nickelverbindungen zu diesem Zeitpunkt deutlich überstiegen. Bei den Zellen mit starker Fluoreszenz im Zellkern war die retikuläre, fluoreszierende Struktur (ER) um den Zellkern stark reduziert (s. Abbildung 3.13(b)). Zusätzlich zu den nicht fluoreszierenden Vesikeln in Abbildung 3.13(b) waren weitere nicht fluoreszierende Bereiche in dem stark fluoreszierenden Zytosol einiger Zellen sichtbar (s. Abbildung 3.14(b)), die keine Vesikel-ähnliche Struktur aufwiesen. Ein Vergleich dieser nicht fluoreszierenden Bereiche in den Fibroblasten in der Fluoreszenzaufnahme (s. Abbildung 3.14(b)) mit der Aufnahme der Zelle im Transmissionsmodus (s. Abbildung 3.14(a)) zeigte, dass sich an diesen Stellen Ni_3S_2 -Partikel befanden, die von der Zelle phagozytiert und noch nicht aufgelöst wurden.

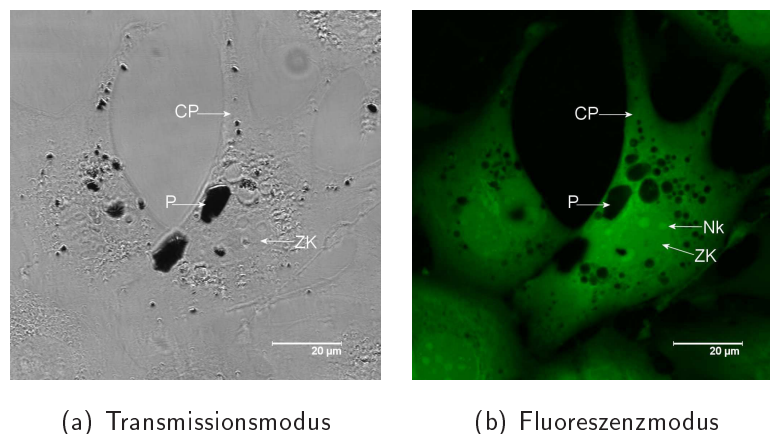


Abbildung 3.14: Aufnahme von Ni_3S_2 -Partikeln in humane Gingiva-Fibroblasten. (a) Ni_3S_2 -Partikel waren im Transmissionsmodus als schwarze Partikel sichtbar; (b) Im Fluoreszenzmodus entstand ebenfalls in Bereichen der Fibroblasten ein Areal, in dem keine Fluoreszenz von Newport Green DCF detektierbar war. Detektion der Fluoreszenz mit dem CLSM Leica TCS SP2, HCX APO 40x/0,8 W U-V-I, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser, Emissionsdetektionsbereich: 510 nm bis 560 nm, Blendendurchmesser: $127 \mu\text{m}$ (1 Airy); PMT-voltage: 422 V; Kantlänge $108 \mu\text{m}$. ZK=Zellkern, CP=Zytosol, Nk=Nukleolus, P= Ni_3S_2 -Partikel.

Im Vergleich zu den deutlich erkennbaren nicht fluoreszierenden Vesikeln, die im Transmissionsmodus als Ni_3S_2 -Partikel erkennbar waren (s. Abbildung 3.14(a)), waren bei den punktförmig fluoreszierenden Strukturen, die in der kompletten Zelle beobachtet wurden (s. Abbildung 3.15(b)), im Transmissionsmodus (s. Abbildung 3.15(a)) keine Auffälligkeiten zu beobachten.

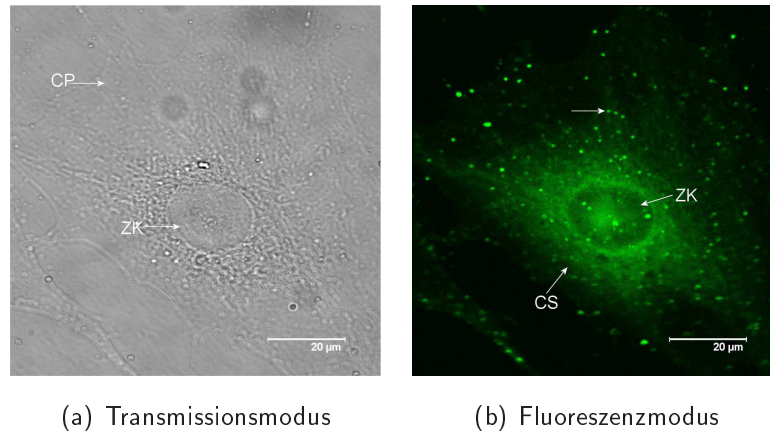


Abbildung 3.15: Vergleich von Fluoreszenzaufnahmen mit Transmissionaufnahmen von humanen Gingiva-Fibroblasten nach Ni_3S_2 -Zugabe. Humane Gingiva-Fibroblasten nach Inkubation mit Ni_3S_2 und Newport Green DCF. Die auffällig fluoreszierenden Bereiche in den Fibroblasten zeigten im Transmissionsmodus keine besonderen Strukturen. Detektion mit dem CLSM Leica TCS SP2, HCX APO 40x/0,8 W U-V-I, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser, Emissionsdetectionsbereich: 510 nm bis 560 nm, Blendendurchmesser: 127 μm (1 Airy). (a) Transmissionsmodus; Kantenlänge: 96 μm ; (b) Fluoreszenzmodus; PMT-voltage: 731 V, Kantenlänge: 96 μm . ZK=Zellkern, CS=Zytosol, CP=Zytoplasma, (→) Markierung punktförmig fluoreszierender Bereiche im Zytoplasma.

Die mikroskopischen Aufnahmen der Fibroblasten, die 16 h mit 500 μM Ni_3S_2 inkubiert wurden (s. Abbildung 3.13(c) und 3.13(f)), zeigten zum einen Zellen, die nur die retikuläre Fluoreszenz (ER) um den Zellkern und kaum Fluoreszenz im Zytosol oder Zellkern aufwiesen, aber teilweise die fluoreszierenden, punktförmigen Strukturen über die Zelle verteilt enthielten (s. Abbildung 3.13(f)). Zum anderen waren Zellen zu sehen, bei denen Fluoreszenz im Zellkern und im Zytosol homogen war und die nicht fluoreszierende Vesikel beinhalteten (s. Abbildung 3.13(c)). Wie die Transmissionaufnahmen zeigten, wurden die nicht fluoreszierenden Vesikel nicht durch die großen Ni_3S_2 -Partikel erzeugt. Im Zellkern selbst waren wiederum die stärker fluoreszierenden Nukleoli zu erkennen, wobei die fluoreszierende Struktur um den Zellkern herum bei den Zellen mit starker Fluoreszenz im Zellkern nicht so stark ausgeprägt war. So lagen aufgrund der Unterschiedlichkeit der Zellen die relativen Fluoreszenzintensitätswerte der kompletten Zellen zwischen 0,062 und 0,123 und bei den Zellkernen zwischen 0,081 und 0,281.

Inkubation humaner Gingiva-Fibroblasten mit unterschiedlichen Ni₃S₂-Konzentrationen für 24 h:

Wurde die Inkubationsdauer der Fibroblasten mit 100 μM Ni₃S₂ im BME-Medium von 16 h auf 24 h verlängert, so konnte man eine Erhöhung der relativen Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF auf Werte zwischen 0,079 und 0,251 für komplette Zellen und zwischen 0,116 und 0,331 für Zellkerne feststellen (s. Abbildung 3.16(a) und 3.16(d)). Die Differenzen in der Fluoreszenzintensität innerhalb dieser Gruppe entstanden durch Unterschiede in der Lokalisation des Fluoreszenzfarbstoffes in den Zellen, denn ein Teil der Zellen zeigte starke Fluoreszenz im Zytosol und Zellkern, sowie ein stark ausgeprägtes, fluoreszierendes Netzwerk (ER) um den Zellkern herum (s. Abbildung 3.16(a)). Ein anderer Teil wies keine Fluoreszenz im Zellkern und nur geringe Fluoreszenz im Zytosol auf. Bei diesen Zellen war jedoch das fluoreszierende Netzwerk (ER) um den Zellkern herum deutlich sichtbar (s. Abbildung 3.16(d)).

Fibroblasten, die 24 h mit 300 μM Ni₃S₂ inkubiert wurden (s. Abbildung 3.16(b) und 3.16(e)), zeigten durchweg einen homogen fluoreszierenden Zellkern mit Nukleoli (s. Abbildung 3.16(e)). Um den Zellkern herum waren die Strukturen, die eine starke Fluoreszenz zeigten, als Netzwerk zu erkennen, aber in der Ausprägung reduziert (s. Abbildung 3.16(b)). Newport Green DCF fluoreszierte im Zytosol im Vergleich zum Zellkern weniger intensiv, aber homogen. Zudem enthielt das Zytosol nicht fluoreszierende Vesikel. Im Transmissionsmodus war jedoch zu erkennen, dass diese Vesikel teilweise Ni₃S₂-Partikel enthielten (s. Abbildung 3.16(e)). Abgesehen von den Vakuolen oder Vesikeln mit und ohne Partikel waren keine weiteren Unterschiede zwischen diesen Zellen zu beobachten. So erreichten die kompletten Zellen relative Fluoreszenzintensitätswerte zwischen 0,125 und 0,247 und die Zellkerne zwischen 0,253 und 0,406, was eine weitere Steigerung der Newport Green DCF-Fluoreszenzintensität und damit der Ni(II)-Konzentration, im Vergleich zu kürzeren Inkubationszeiten und geringeren Metallkonzentrationen, bedeutete.

Eine weitere Erhöhung der Ni₃S₂-Konzentration im BME-Medium auf 500 μM resultierte in ähnlichen Ergebnissen wie zuvor bei den Zellen mit 300 μM beschrieben. Es zeigte sich ein stark fluoreszierender Zellkern und ein minimal ausgeprägtes Netzwerk um den Zellkern herum. Der Zellkern war nach der Zugabe von 500 μM Ni₃S₂ noch deutlicher als zuvor bei 300 μM als fluoreszierendes Oval mit den stark fluoreszierenden Nukleoli zu erkennen (s. Abbildung 3.16(f)). Im gesamten Zytosol war der Farbstoff durch die Bindung von Ni(II) zu erkennen. Auch in den Zellen nach Inkubation mit 500 μM Ni₃S₂ erkannte man nicht fluoreszierende Vesikel, die im Transmissionsmodus zum einen Partikel erkennen ließen und zum anderen nicht (s. Abbildung 3.16(f)). In einigen Zellen war das fluoreszierende Netzwerk um den Zellkern deutlich ausgeprägter als in Abbildung 3.16(c). Dafür fluoreszierte der Zellkern umso stärker.

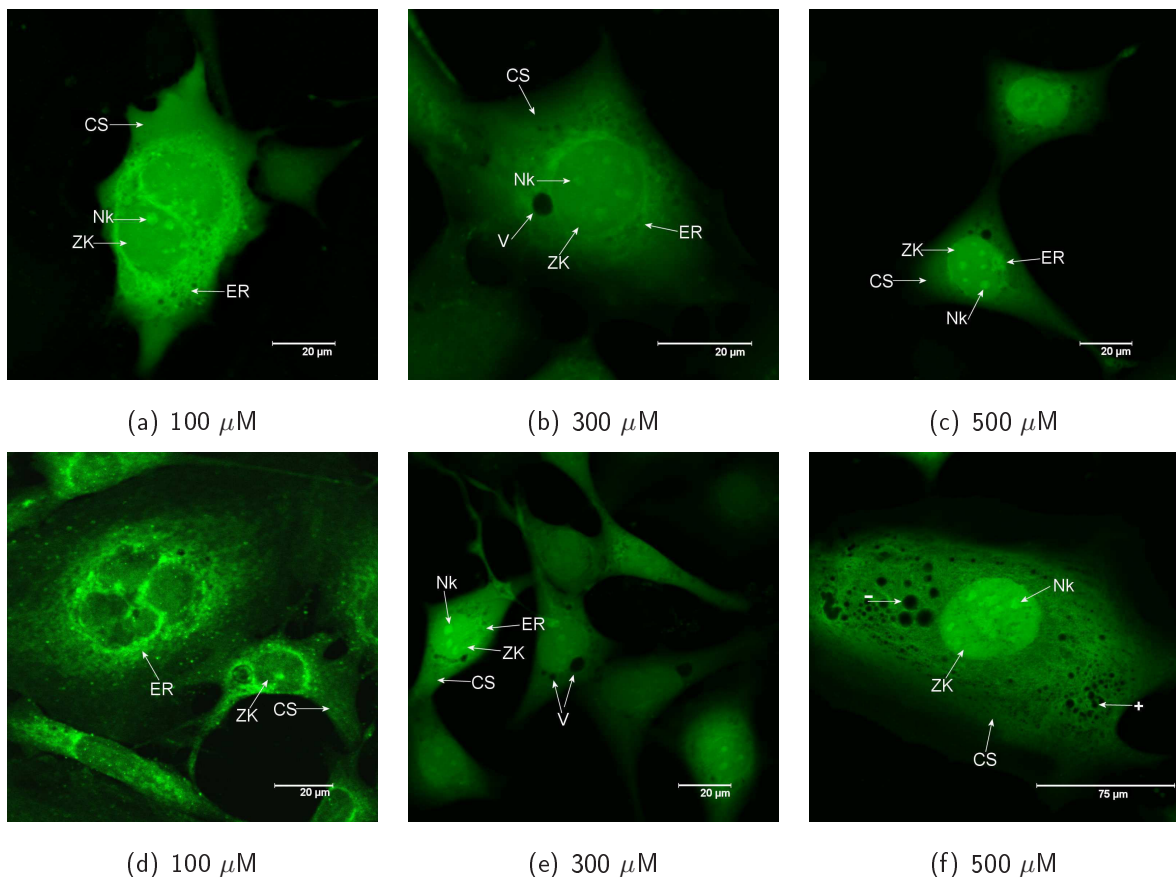


Abbildung 3.16: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen humaner Gingiva-Fibroblasten nach 24 h Inkubation mit Ni_3S_2 . Markierung von Ni(II) mit $7 \mu\text{g/ml}$ Newport Green DCF. Detektion mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX APO 40x/0,8 W U-V-I, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser, Emissionsdetectionsbereich: 510 nm bis 560 nm, Blendendurchmesser: $127 \mu\text{m}$, (1 Airy). (a) PMT-voltage: 494 V, Kantenlänge: $119 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,251 bzw. 0,331; (b) PMT-voltage: 451 V, Kantenlänge: $79 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,125 bzw. 0,253; (c) PMT-voltage: 394 V, Kantenlänge: $143 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,166 bzw. 0,351; (d) PMT-voltage: 684 V, Kantenlänge: $128 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,080 bzw. 0,133; (e) PMT-voltage: 451 V, Kantenlänge: $141 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,247 bzw. 0,400; (f) PMT-voltage: 465 V, Kantenlänge: $202 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,132 bzw. 0,297; (- →) Markierung eines nicht fluoreszierenden Vesikels im Zytoplasma ohne Partikel, (+ →) Markierung eines nicht fluoreszierenden Vesikels im Zytoplasma, das kleine Partikel enthält. ZK=Zellkern, CS=Zytosol, Nk=Nukleolus, ER=Endoplasmatisches Retikulum, V=nicht fluoreszierendes Vesikel.

Es gab jedoch auch wenige Zellen, die noch keine Fluoreszenz im Zellkern und Zytoplasma aufwiesen, aber eine starke Intensität von Newport Green DCF um den Zellkern konzentrierten. So ergaben sich relative Fluoreszenzintensitätswerte zwischen 0,066 und 0,166 für Zellen bzw. 0,133 und 0,361 für Zellkerne.

Inkubation humaner Gingiva-Fibroblasten mit unterschiedlichen Ni_3S_2 -Konzentrationen für 48 h:

Nach 48 h Inkubation mit $100 \mu\text{M Ni}_3\text{S}_2$ war im Zytosol der Fibroblasten bei PMT-*voltages* von ca. 500 V Fluoreszenz detektierbar. Deutlich davon abgrenzbar waren auch hier in einigen Zellen die Zellkerne, die eine homogene Fluoreszenz aufwiesen, fluoreszierende Nukleoli beinhalteten und von einem meist gering ausgeprägten Netzwerk (ER) mit stärkerer Intensität umgeben waren (s. Abbildung 3.17(a)). Dieses Netzwerk war bei Zellen, die kaum Fluoreszenz im Zellkern und dem Zytosol zeigten, stärker ausgeprägt (s. Abbildung 3.17(d)). Selbst nach 48 h waren bei den getesteten Nickelkonzentrationen noch Vakuolen in den Fibroblasten detektierbar, die kleine Ni_3S_2 -Partikel enthielten, die noch nicht gelöst waren und somit keine Fluoreszenz aufwiesen (s. Abbildung 3.17(d)). So erreichten die vier Beispielzellen aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation des Farbstoffes relative Fluoreszenzintensitätswerte zwischen 0,041 und 0,126 für komplette Zellen und zwischen 0,087 und 0,335 für Zellkerne.

Einen durchweg stark fluoreszierenden Zellkern mit Nukleoli, die in ihrer Zahl variierten, konnte man in Zellen beobachten, die 48 h in BME-Medium mit $300 \mu\text{M Ni}_3\text{S}_2$ inkubiert wurden (s. Abbildung 3.17(b) und 3.17(b)). Der Zellkern war zumeist nur von einem gering ausgeprägten fluoreszierenden Netzwerk umgeben (s. Abbildung 3.17(b)). Das Zytosol war homogen fluoreszent, beinhaltete aber kleine nicht fluoreszierende Vakuolen, die zumeist in Zellkernnähe kleine Ni_3S_2 -Partikel enthielten (s. Abbildung 3.17(e)). Die Intensitätswerte erreichten für Zellen Werte von 0,070 bis 0,112 und für Zellkerne zwischen 0,148 und 0,338 und zeigten somit kaum eine Steigerung zu den Zellen nach 48 h mit $100 \mu\text{M Ni}_3\text{S}_2$.

In Abbildung 3.17(c) und 3.17(f) sind Zellen abgebildet, die 48 h mit $500 \mu\text{M Ni}_3\text{S}_2$ inkubiert wurden. Die Fibroblasten zeigten durchweg eine hohe Fluoreszenzintensität für Zellen von 0,108 bis 0,157 bzw. für Zellkerne von 0,232 bis 0,393, die vor allem im Zellkern zu beobachten war, der homogen fluoreszierte und Nukleoli zeigte (s. Abbildung 3.17(f)). Um den Zellkern herum war eine stark fluoreszierende Kernmembran (s. Abbildung 3.17(c)) und ein gering ausgeprägtes fluoreszierendes Netzwerk zu beobachten, das auch hier durch Vesikel unterbrochen wurde, die jedoch kleiner und in geringerer Anzahl in der Nähe des Zellkerns zu beobachten waren (s. Abbildung 3.17(c)). Die Fluoreszenzintensität stieg dadurch an und erreichte die höchsten Intensitätswerte in dieser Gruppe.

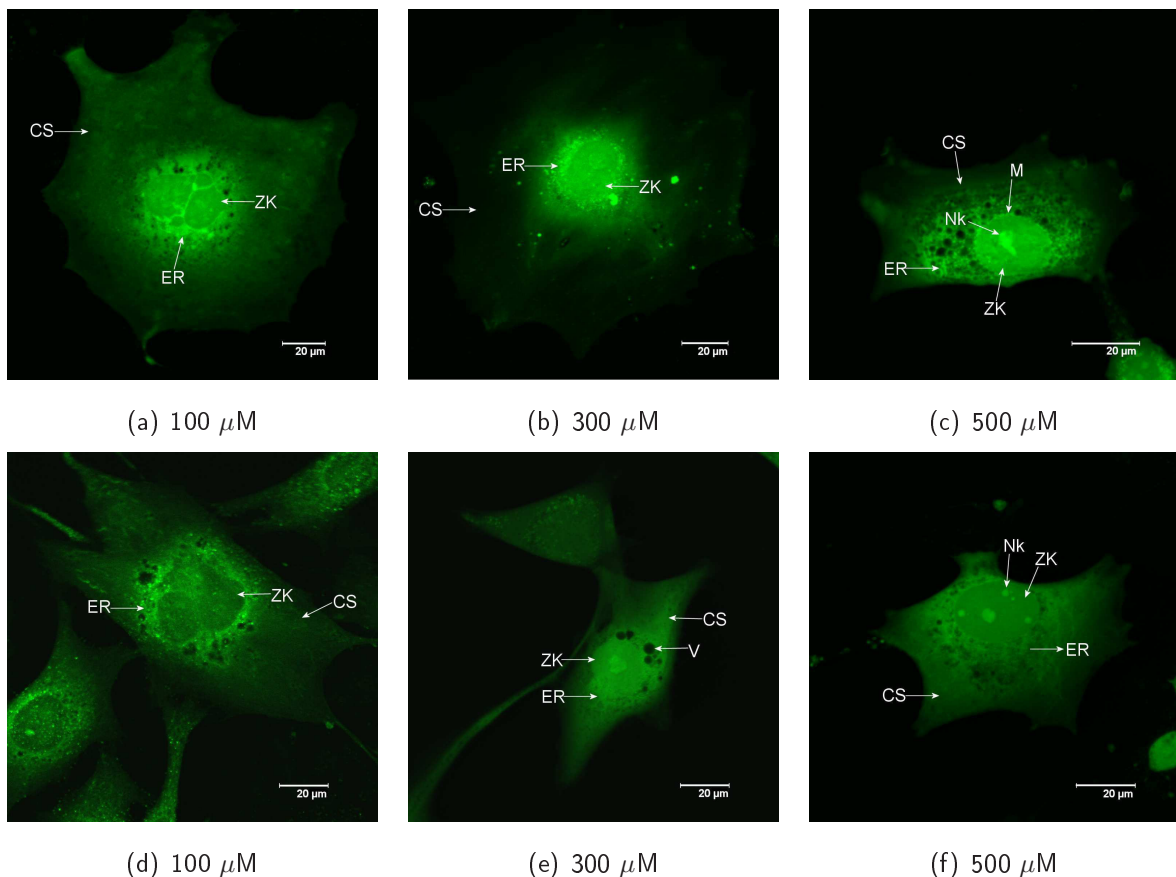


Abbildung 3.17: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen humaner Gingiva-Fibroblasten nach 48 h Inkubation mit Ni_3S_2 . Markierung von Ni(II) mit $7 \mu\text{g/ml}$ Newport Green DCF. Detektion mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX APO 40x/0,8 W U-V-I, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser, Emissionsdetektionsbereich: 510 nm bis 560 nm, Blendendurchmesser: $127 \mu\text{m}$, (1 Airy). (a) PMT-voltage: 511 V, Kantenlänge: $172 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,126 bzw. 0,335; (b) PMT-voltage: 555 V, Kantenlänge: $161 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,070 bzw. 0,338; (c) PMT-voltage: 460 V, Kantenlänge: $110 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,157 bzw. 0,395; (d) PMT-voltage: 661 V, Kantenlänge: $153 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,072 bzw. 0,128; (e) PMT-voltage: 455 V, Kantenlänge: $152 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,112 bzw. 0,262; (f) PMT-voltage: 459 V, Kantenlänge: $126 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,148 bzw. 0,251. ZK=Zellkern, CS=Zytosol, Nk=Nukleolus, ER=Endoplasmatisches Retikulum, M=Kernmembran, V=nicht fluoreszierendes Vesikel.

Vergleich der relativen Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Ni_3S_2 -Konzentration und der Inkubationszeit:

Stellt man die relativen Fluoreszenzintensitätswerte des Newport Green DCF in Abhängigkeit ihrer Inkubationszeit für die verschiedenen Ni_3S_2 -Konzentrationen in einem Graphen dar, so sieht man, dass sowohl in kompletten Zellen, als auch in den Zellkernen bereits nach 16 h

Inkubation mit Ni_3S_2 Unterschiede in der Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF bei unterschiedlichen Ni_3S_2 -Konzentrationen entstanden (s. Abbildung 3.18(a)). Der Anstieg bei $300 \mu\text{M}$ und $500 \mu\text{M}$ Ni_3S_2 war im Vergleich zur Kontrolle höher, als es bei $100 \mu\text{M}$ Ni_3S_2 der Fall war. Eine Zunahme der Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Ni_3S_2 -Konzentration war ebenso nach 24 h und 48 h zu beobachten, wobei die Zunahme im Zellkern deutlicher war. Dabei ist hervorzuheben, dass nach 24 h die höchsten Intensitätswerte gemessen wurden.

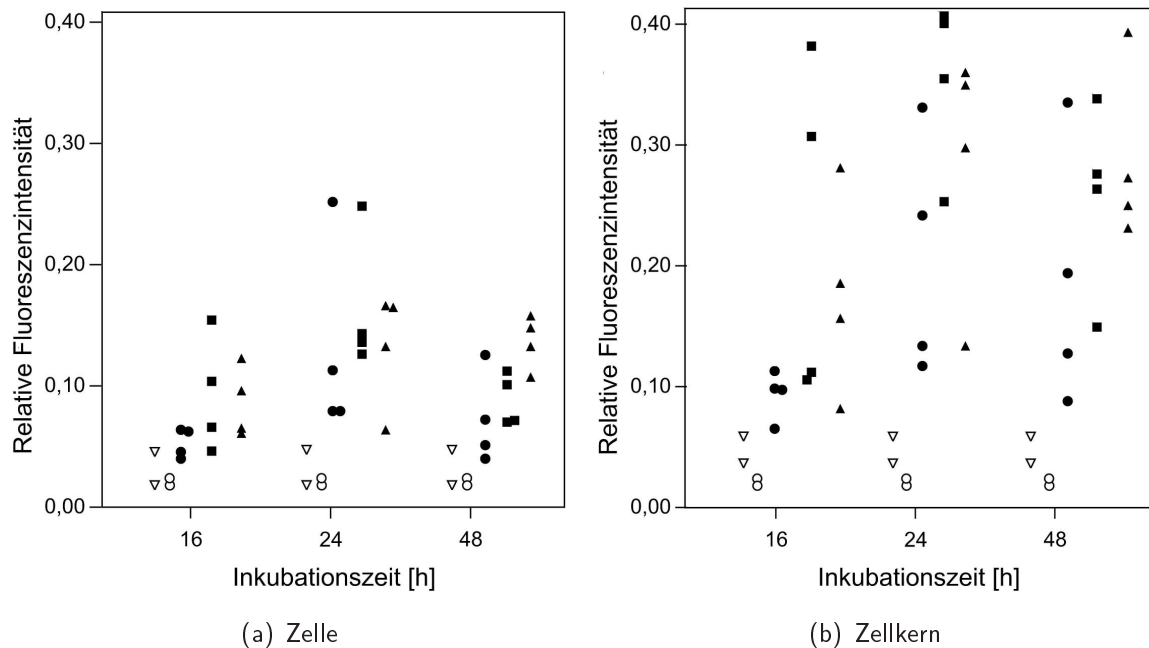


Abbildung 3.18: Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF in Ni_3S_2 -behandelten humanen Gingiva-Fibroblasten. Die Werte der relativen Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF in Ni_3S_2 -behandelten humanen Gingiva-Fibroblasten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für verschiedene Ni_3S_2 -Konzentrationen (● $100 \mu\text{M}$, ■ $300 \mu\text{M}$, ▲ $500 \mu\text{M}$) stammen aus den Beispielzellen der Abbildungen 3.13 bis 3.17. Sowohl in den kompletten Zellen, als auch in den Zellkernen war eine Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität zu beobachten, wobei die Werte im Zellkern schwankten. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen mit Newport Green DCF (▽) und unbehandelten Zellen ohne Newport Green DCF (○) stiegen die Intensitätswerte deutlich an. (a) Veränderung der relativen Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF in der gesamten Zelle; (b) Veränderung der relativen Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF im Zellkern.

Beobachtete man jede Konzentration für sich, stellte sich eine ähnliche Tendenz der Intensitätsentwicklung der Fluoreszenzwerte dar. Sowohl bei der Inkubation mit $100 \mu\text{M}$, als auch mit $300 \mu\text{M}$ Ni_3S_2 stieg die Fluoreszenzintensität in kompletten Zellen und in den Zellkernen von 16 h auf 24 h an und sank nach 48 h wieder. Lediglich bei der Inkubation der Zellen mit $500 \mu\text{M}$ Ni_3S_2 setzte sich dieser Trend nicht fort. Eine geringe, aber dennoch stetige Steigerung der Intensitäten von Zeitpunkt 16 h auf 48 h war hier sichtbar. Im Vergleich zu den Kontrollwerten wurde durch die Inkubation der Zellen mit Ni_3S_2 und anschließender Zugabe von Newport Green DCF dessen relative Fluoreszenzintensität in kompletten Zellen um das 1,5-fache bis 3-fache nach 16 h, um das 4-fache bis 4,5-fache nach 24 h und um das 3-fache bis 4-fache nach

48 h verstärkt. Bewertete man nur die Fluoreszenz im Zellkern, stellte man zunächst fest, dass die Werte teilweise stark schwankten, im Mittel jedoch eine Steigerung der Intensität bei allen verwendeten Konzentrationen von Zeitpunkt 16 h bis 48 h sichtbar war. Auch in den Zellkernen wurden die höchsten Intensitätswerte nach 24 h erreicht, wobei der Unterschied zu den Werten nach 48 h gering war. Die Intensitätswerte der einzelnen Konzentrationen stiegen sichtbar im Vergleich von 16 h und 24 h an, wobei die deutlichste Entwicklung bei einer Ni_3S_2 -Konzentration von $500 \mu\text{M}$ detektiert wurde. Im Vergleich zu den Kontrollen erzielte man in den Zellkernen eine 2-fache Verstärkung der Fluoreszenzintensität nach 16 h mit $100 \mu\text{M Ni}_3\text{S}_2$ bis zu einer 3-fachen Erhöhung mit $500 \mu\text{M}$, eine 4-fache bis 7-fache Erhöhung erreichte man nach 24 h und 4-fache bis 6-fache Verstärkungen nach 48 h Inkubation mit steigenden Ni_3S_2 -Konzentrationen.

3.1.4.4 Aufnahme von Cobalt in humane Gingiva-Fibroblasten während CoCl_2 -Exposition

Cobalt ist für den menschlichen Organismus ein essentielles Metall, das in Enzymen oder organischen Molekülen enthalten ist. In höheren Konzentrationen wirkt es jedoch toxisch. Der Einfluss sehr hoher Cobaltkonzentrationen und deren Lokalisation in einer humanen Zelle nach Zugabe von CoCl_2 ins Medium, in dem Co als Co(II) vorliegt, wurden untersucht, um die Interaktion mit Zellbestandteilen zu zeigen und Vergleiche mit Ni(II) aufzustellen. Nachdem auch bei CoCl_2 -Salz keine Eigenfluoreszenz nach Anregung mit dem 488 nm Argonlaser festgestellt werden konnte, wurde ebenfalls Newport Green DCF genutzt, um Co(II) zu detektieren. Zweiwertiges Cobalt bewirkt wie zweiwertiges Nickel die Verstärkung der Fluoreszenzintensität des Fluoreszenzfarbstoffes Newport Green DCF (Haugland, 2002), sodass bei den Versuchen zur Detektion von Co(II) in einzelnen lebenden Zellen der Fluoreszenzfarbstoff Newport Green DCF mit gleicher Konzentration und Inkubationszeit eingesetzt wurde wie bei der Detektion von Ni(II) . CoCl_2 wurde zunächst dem BME-Medium in gleichen Konzentrationen und für identische Zeitintervalle wie bei den Nickelverbindungen zugegeben. Durch die Detektion von Co(II) mit Newport Green DCF wurden Hinweise über die Aufnahme und Lokalisation von Co(II) bei verschiedenen Inkubationszeiten und Konzentrationen in den Zellen gewonnen.

Inkubation humaner Gingiva-Fibroblasten mit unterschiedlichen CoCl_2 -Konzentrationen für 16 h:

Als erstes wurden die humanen Gingiva-Fibroblasten mit $100 \mu\text{M CoCl}_2$ für 16 h inkubiert. Bei PMT-voltages in einem Bereich von 650 V war schwache Fluoreszenz im Zytoplasma zu beobachten, dagegen verstärkte Fluoreszenz um den Zellkern herum. Die starke Fluoreszenz bildete sich auch in diesen Zellen als Netzwerk (ER) aus (s. Abbildung 3.19(a)). Der Zellkern zeigte kaum Fluoreszenz, enthielt aber fluoreszierende Nukleoli, die in Abbildung 3.19(d) zu sehen sind.

Die Messung der Fluoreszenzintensität ergab somit für komplette Zellen Werte zwischen 0,034 und 0,072 und für Zellkerne zwischen 0,052 und 0,171, die hauptsächlich durch die starke Fluoreszenz der Nukleoli bestimmt wurden.

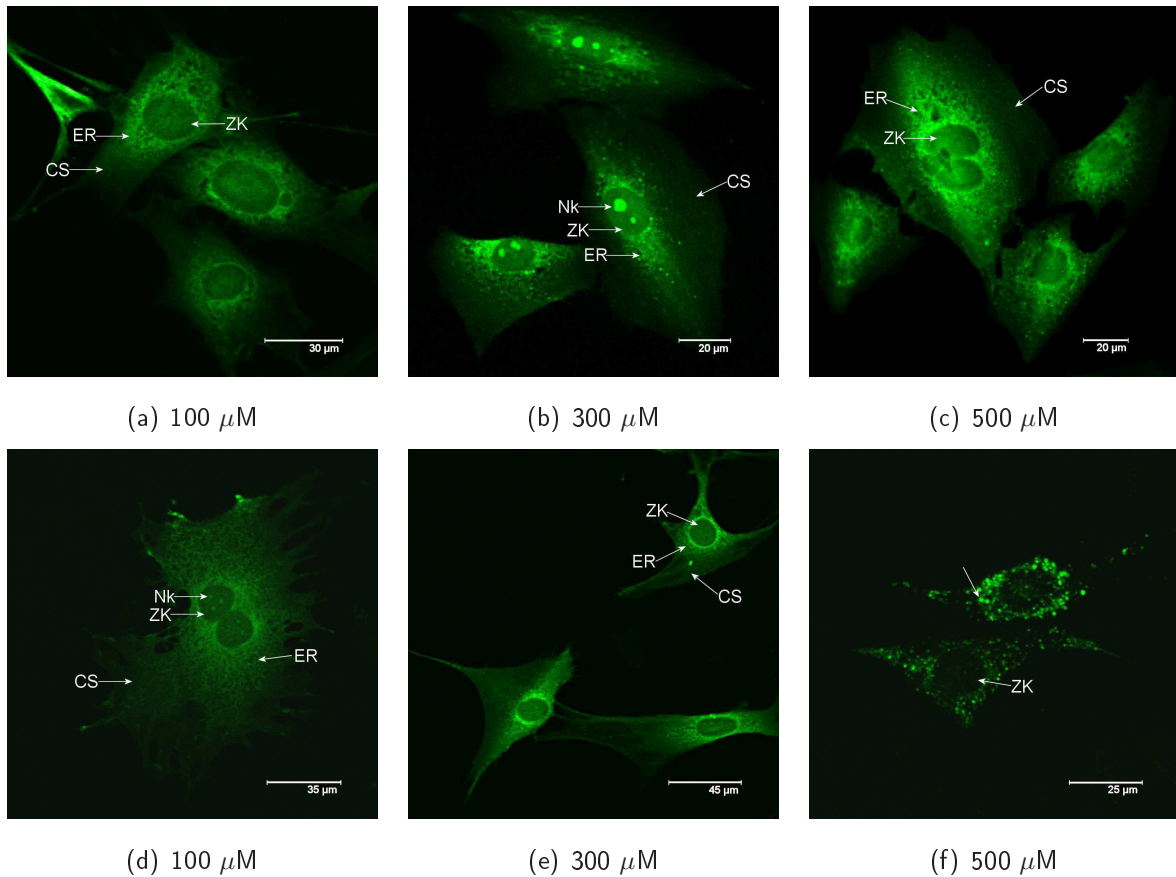


Abbildung 3.19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen humaner Gingiva-Fibroblasten nach 16 h Inkubation mit CoCl_2 . Markierung von Co(II) mit $7 \mu\text{g/ml}$ Newport Green DCF. Detektion mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX APO 40x/0,8 W U-V-I, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser, Emissionsdetectionsbereich: 510 nm bis 560 nm, Blendendurchmesser: $127 \mu\text{m}$, (1 Airy). (a) PMT-voltage: 665 V, Kantenlänge: $143 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,072 bzw. 0,098; (b) PMT-voltage: 701 V, Kantenlänge: $143 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,066 bzw. 0,158; (c) PMT-voltage: 601 V, Kantenlänge: $166 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,109 bzw. 0,173; (d) PMT-voltage: 655 V, Kantenlänge: $176 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,043 bzw. 0,073; (e) PMT-voltage: 671 V, Kantenlänge: $231 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,086 bzw. 0,124; (f) PMT-voltage: 688 V, Kantenlänge: $128 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,026 bzw. 0,017; (→) Markierung von punktförmig fluoreszierenden Strukturen im Zytoplasma. ZK=Zellkern, CS=Zytosol, Nk=Nukleolus, ER=Endoplasmatisches Retikulum.

Starke Fluoreszenz um den Zellkern herum war bei den Zellen in Abbildung 3.19(b) und 3.19(e) nach Behandlung mit $300 \mu\text{M}$ CoCl_2 für 16 h zu beobachten. Eine tubuläre oder retikuläre Struktur war hier weniger deutlich zu erkennen. Diese fluoreszierenden, retikulären Struk-

turen (ER) erstreckten sich zumeist in Richtung der längeren Seiten der Zelle ins Zytosol (s. Abbildung 3.19(b)), das selbst lediglich schwache Fluoreszenz aufwies. Der Zellkern zeigte auch hier kaum Fluoreszenz auf, aber die Nukleoli fluoreszierten sehr stark (s. Abbildung 3.19(b)). Insgesamt war die relative Fluoreszenzintensität in den Zellkernen mit Werten zwischen 0,078 und 0,168 und für komplette Zellen zwischen 0,061 und 0,086 gering und vergleichbar mit den Zellen nach der Inkubation mit 100 μM CoCl_2 für 16 h.

Die Fibroblasten, die in Abbildung 3.19(c) und 3.19(f) abgebildet sind, wurden 16 h mit 500 μM CoCl_2 inkubiert und danach Co(II) mit Newport Green DCF detektiert. Es war deutlich sichtbar, dass der Zellkern trotz Erhöhung der CoCl_2 -Konzentration keine oder nur sehr schwache Fluoreszenz aufwies, jedoch in einigen Zellen schwach fluoreszierende Nukleoli enthielt (s. Abbildung 3.19(c)).

Im ebenfalls schwach fluoreszierenden Zytosol trat in Zellkernnähe stärkere Fluoreszenz auf, die, wie zuvor bei 100 μM CoCl_2 (s. Abbildungen 3.19(a) und 3.19(d)) schon beschrieben, eine Art Netzwerk ausbildete. Zumeist waren diese Zellkern-umrandenden Strukturen sehr diffus. Abweichend zu den anderen Zellen zeigten sich in Abbildung 3.19(f) fluoreszierende, punktförmige Strukturen, die sich im kompletten Zytoplasma ausbreiteten und sich besonders um den Zellkern konzentrierten (s. Markierung in Abbildung 3.19(f)). Somit ergaben sich relative Fluoreszenzintensitätswerte zwischen 0,026 und 0,109 für komplette Zellen und Werte zwischen 0,017 und 0,173 für Zellkerne.

Inkubation humaner Gingiva-Fibroblasten mit unterschiedlichen CoCl_2 -Konzentrationen für 24 h:

Eine Verlängerung der Inkubationszeit von 16 h auf 24 h mit 100 μM CoCl_2 zeigte, dass keine Veränderung in der Lokalisation des Farbstoffes Newport Green DCF im Vergleich zu den Ergebnissen nach 16 h erfolgte und auch keine wesentliche Erhöhung der Fluoreszenzintensität sowohl im Zytosol als auch im Zellkern bestand (s. Abbildung 3.20(a) und 3.20(d)). Die relative Fluoreszenzintensitätswerte lagen zwischen 0,042 und 0,079 für die kompletten Zellen und 0,057 und 0,123 für Zellkerne. Im Zellkern selbst konnte man hauptsächlich die Fluoreszenz der Nukleoli beobachten (s. Abbildung 3.20(a)). Um den Zellkern herum war auch hier erhöhte Fluoreszenzintensität in Form eines Netzwerkes zu beobachten, das sich ins sehr schwach fluoreszierende Zytosol ausbreitete (s. Abbildung 3.20(d)).

Ein sehr ähnliches Fluoreszenzmuster wie in den Abbildungen 3.20(a) und 3.20(d) bei 100 μM CoCl_2 war in den Abbildungen 3.20(b) und 3.20(e) nach Inkubation mit 300 μM CoCl_2 zu beobachten. Deutlich grenzte sich ein stärker fluoreszierender Ring um den Zellkern ab (s. Abbildung 3.20(b)), der sich in Form eines Netzwerkes oder längeren tubulären Strukturen im Zytosol ausbreitete (s. Abbildung 3.20(e)). Das Zytosol selbst war nur schwach fluoreszent. Durch diese

geringe Fluoreszenz im Zytosol waren die Intensitätswerte für komplette Zellen mit Werten zwischen 0,034 und 0,068 gering. Die Fluoreszenzintensität im Zellkern war ebenfalls gering, wobei die Fluoreszenzintensität des gesamten Zellkerns hauptsächlich auf die deutliche Fluoreszenz der Nukleoli zurückzuführen war (s. Abbildung 3.20(e)). Für den Zellkern ergaben sich Werte zwischen 0,079 und 0,149.

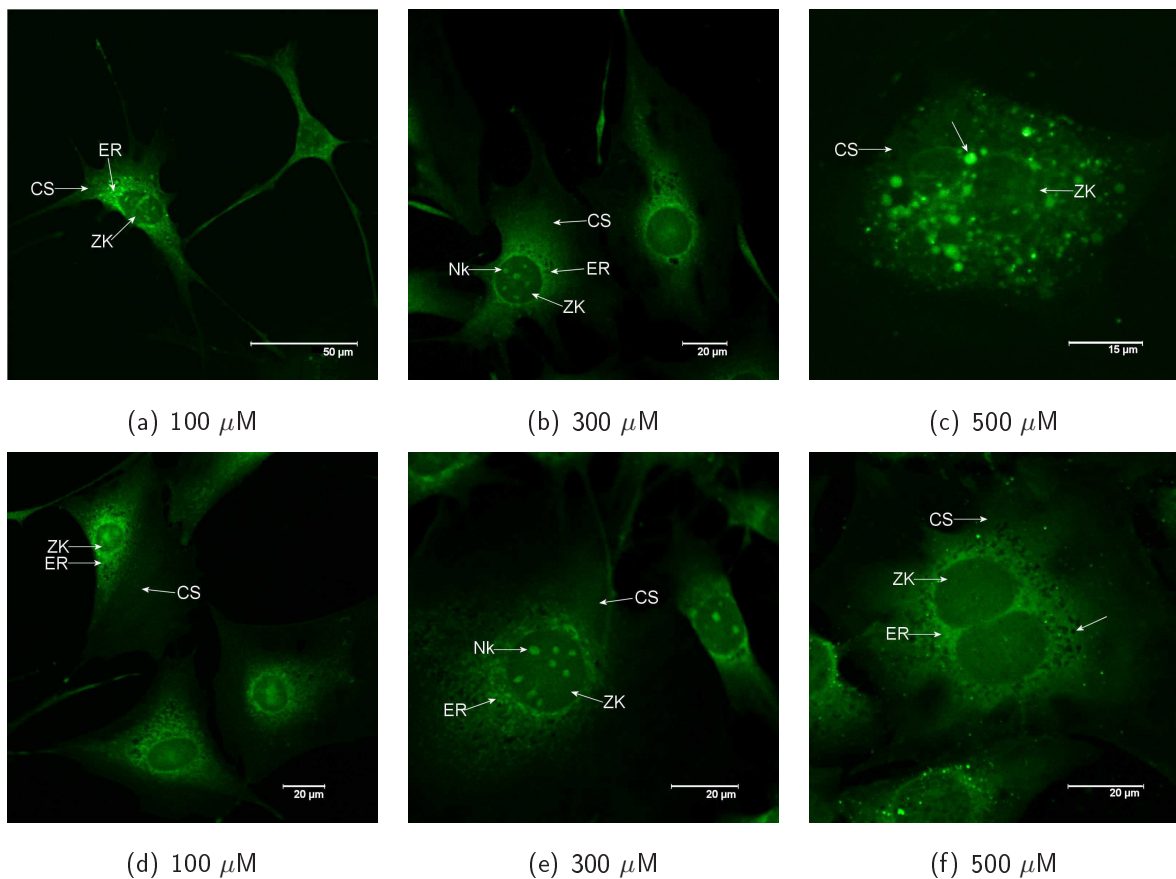


Abbildung 3.20: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen humaner Gingiva-Fibroblasten nach 24 h Inkubation mit CoCl_2 . Markierung von Co(II) mit $7 \mu\text{g/ml}$ Newport Green DCF. Detektion mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX APO 40x/0,8 W U-V-I, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser, Emissionsdetectionsbereich: 510 nm bis 560 nm, Blendendurchmesser: $127 \mu\text{m}$, (1 Airy). (a) PMT-voltage: 640 V, Kantenlänge: $175 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,079 bzw. 0,123; (b) PMT-voltage: 640 V, Kantenlänge: $168 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,055 bzw. 0,088; (c) PMT-voltage: 661 V, Kantenlänge: $76 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,048 bzw. 0,086; (→) Markierung eines fluoreszierenden Vesikels im Zytosol; (d) PMT-voltage: 601 V, Kantenlänge: $90 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,052 bzw. 0,097; (e) PMT-voltage: 629 V, Kantenlänge: $111 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,034 bzw. 0,080; (f) PMT-voltage: 621 V, Kantenlänge: $98 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,049 bzw. 0,090; (→) Markierung eines nicht fluoreszierenden Vesikels im Zytosol. ZK=Zellkern, CS=Zytosol, Nk=Nukleolus, ER=Endoplasmatisches Retikulum.

Bei Inkubationszeiten von 24 h mit hohen CoCl_2 -Konzentrationen von $500 \mu\text{M}$ (s. Abbildung 3.20(c) und 3.20(f)) hatte sich an dem Fluoreszenzmuster innerhalb der Zelle im Vergleich zu den zuvor gezeigten Zellen wenig geändert. Das Zytosol sowie der Zellkern fluoreszierten kaum (s. Abbildung 3.20(f)). Lediglich um den Zellkern herum war bei den meisten Zellen durch Cobaltakkumulation starke Fluoreszenz zu beobachten, die von nicht fluoreszierenden Vesikeln unterbrochen war (s. Markierung in Abbildung 3.20(f)). Die Zellen in Abbildung 3.20(c) zeigten dieses Netzwerk kaum. Vielmehr wurden fluoreszierende Vesikel-ähnliche Strukturen sichtbar (s. Markierung in Abbildung 3.20(c)), die sich in unterschiedlicher Größe im Zytoplasma befanden. Somit ergaben sich für diese Zellen mit $500 \mu\text{M}$ CoCl_2 Intensitätswerte zwischen 0,036 und 0,062 und für die Zellkerne Werte zwischen 0,033 und 0,130.

Inkubation humaner Gingiva-Fibroblasten mit unterschiedlichen CoCl_2 -Konzentrationen für 48 h:

In Abbildung 3.21 sind Zellen abgebildet, die 48 h mit verschiedenen CoCl_2 -Konzentrationen inkubiert wurden. Selbst nach dieser langen Inkubationszeit mit $100 \mu\text{M}$ (s. Abbildung 3.21(a) und 3.21(d)) war weder eine deutliche Veränderung in der Intensität der Fluoreszenz noch in ihrer Lokalisation im Vergleich zu den Zellen, die 16 h oder 24 h mit $100 \mu\text{M}$ CoCl_2 inkubiert wurden, zu erkennen. Die Fluoreszenz im Zytosol war schwach und teilweise diffus. Das zumeist gering ausgeprägte Netzwerk um den Zellkern herum zeigte stärkere Fluoreszenzintensitäten (s. Abbildung 3.21(a) und 3.21(d)). Der Zellkern wies kaum Fluoreszenz auf, enthielt jedoch in ihrer Anzahl variierend, zum Teil sehr stark, fluoreszierende Nukleoli (s. Abbildung 3.21(d)). So lagen die relativen Fluoreszenzintensitätswerte für Zellen bei 0,049 bis 0,077 und für Zellkerne aufgrund der Nukleoli bei 0,083 bis 0,149.

Auch nach 48 h Inkubation mit $300 \mu\text{M}$ CoCl_2 war die Fluoreszenz in den Zellen zumeist diffus und schwach (s. Abbildung 3.21(b)). Sie beschränkte sich auf die Nukleoli und auf Zellkern-nahe Regionen im Zytosol, die sich von der Kernmembran beschränkt retikulär ins Zytosol ausbreiteten (s. Abbildung 3.21(b)). Bei einer Konzentration von $300 \mu\text{M}$ CoCl_2 im BME-Medium konnte man nach 48 h Inkubation Zellen beobachten, die punktförmig fluoreszierende Strukturen oder Fragmente in Zellkernnähe enthielten (s. Markierung in Abbildung 3.21(e)). So entstanden bei PMT-voltages von ca. 600 V relative Fluoreszenzintensitätswerte zwischen 0,034 und 0,061 für Zellen bzw. zwischen 0,045 und 0,155 für Zellkerne.

Ähnlich gering ausgeprägte retikuläre Strukturen (ER) und punktförmige Fluoreszenz waren auch bei der höchsten CoCl_2 -Konzentration von $500 \mu\text{M}$ zu sehen (s. Abbildung 3.21(c) und 3.20(f)). Fluoreszierende, punktförmige Strukturen waren in diesen Zellen vermehrt um den Zellkern orientiert (s. Markierung in Abbildung 3.21(c)). Die Anhäufung der Fluoreszenz um den Zellkern in Form eines diffusen Netzwerkes in den anderen Zellen blieb bestehen (s. Abbildung 3.21(f)). Die Form der Zellen war hier kaum zu erkennen, da lediglich sehr geringe Fluoreszenz im

Zytosol detektiert werden konnte, genauso wie im Zellkern, der selbst keine Fluoreszenz aufwies. Hier ergaben sich relative Fluoreszenzintensitätswerte zwischen 0,064 und 0,099 für den Zellkern und für die kompletten Zellen zwischen 0,050 und 0,085.

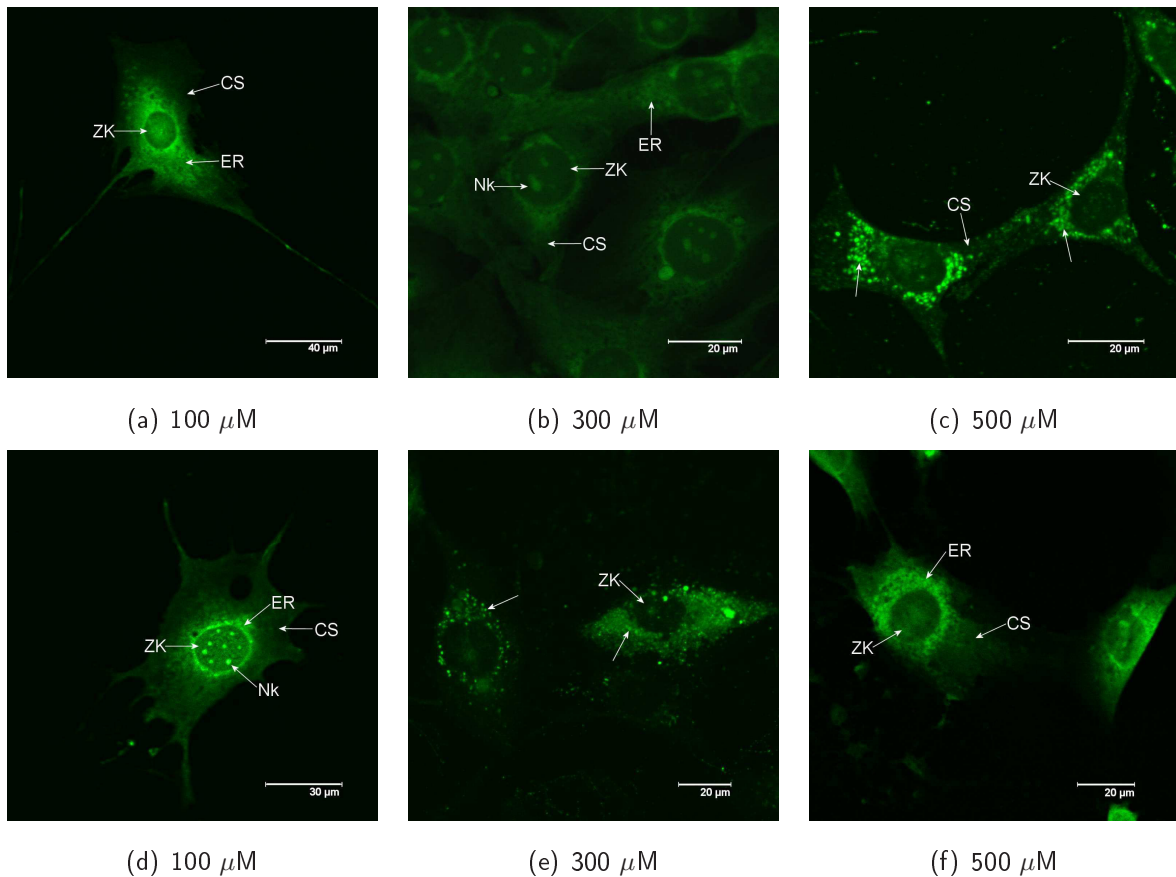


Abbildung 3.21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen humaner Gingiva-Fibroblasten nach 48 h Inkubation mit CoCl_2 . Markierung von $\text{Co}(\text{II})$ mit $7 \mu\text{g}/\text{ml}$ Newport Green DCF. Detektion mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX APO 40x/0,8 W U-V-I, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser, Emissionsdetectionsbereich: 510 nm bis 560 nm, Blendendurchmesser: $127 \mu\text{m}$, (1 Airy). (a) PMT-voltage: 674 V, Kantenlänge: $197 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,070 bzw. 0,083; (b) PMT-voltage: 586 V, Kantenlänge: $102 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,034 bzw. 0,051; (c) PMT-voltage: 623 V, Kantenlänge: $98 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,085 bzw. 0,074; (d) PMT-voltage: 666 V, Kantenlänge: $146 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,075 bzw. 0,149; (e) PMT-voltage: 750 V, Kantenlänge: $134 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,056 bzw. 0,155; (f) PMT-voltage: 703 V, Kantenlänge: $130 \mu\text{m}$, relative Fluoreszenzintensität in der Zelle bzw. im Zellkern: 0,070 bzw. 0,099. ZK=Zellkern, CS=Zytosol, Nk=Nukleolus, ER=Endoplasmatisches Retikulum, (\rightarrow) Markierung fluoreszierender, punktförmiger Strukturen.

Vergleich der relativen Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der CoCl_2 -Konzentration und der Inkubationszeit:

Die relativen Fluoreszenzintensitäten von Newport Green DCF in CoCl_2 -behandelten Zellen waren, wie in Abbildung 3.22 zu erkennen ist, gering und im Vergleich zu den Kontrollen nur minimal erhöht. In kompletten Zellen (s. Abbildung 3.22(a)) war in jeder einzelnen Konzentration nur ein geringer Unterschied zwischen den Werten nach 16 h, 24 h und 48 h Inkubationszeit zu sehen. Auch der Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der drei getesteten Konzentrationen zu einem Zeitpunkt konnte kaum eine Steigerung der Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit der Konzentrationen aufweisen. Verglichen mit Zellen, denen kein CoCl_2 , aber Newport Green DCF zugesetzt wurde, war die Intensität in einer kompletten Zelle nach CoCl_2 -Zugabe durch die Bindung von Co(II) maximal 2-fach verstärkt. Betrachtete man nur die Zellkerne dieser Zellen, war die Verstärkung der Fluoreszenzintensitäten um das bis zu 3-fache messbar, wobei die stärkeren Intensitäten hauptsächlich durch die starke Fluoreszenz der Nukleoli verursacht wurde.

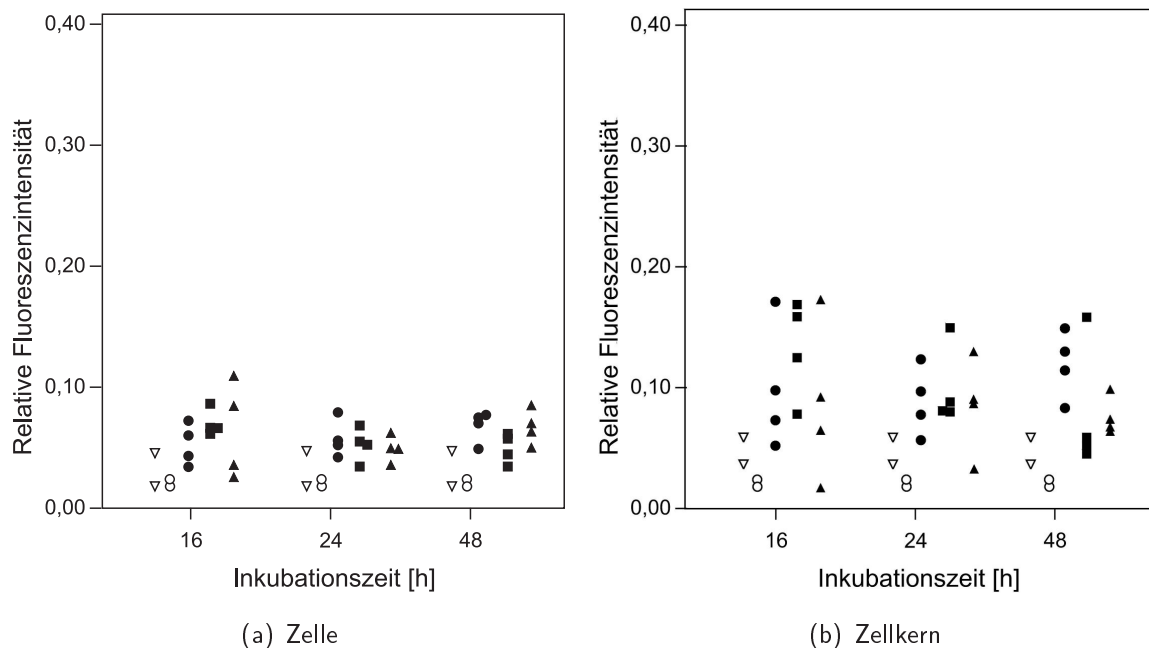


Abbildung 3.22: Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF in CoCl_2 -behandelten humanen Gingiva-Fibroblasten. Die Werte der relativen Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF in CoCl_2 -behandelten humanen Gingiva-Fibroblasten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für verschiedene CoCl_2 -Konzentrationen (● $100 \mu\text{M}$, ■ $300 \mu\text{M}$, ▲ $500 \mu\text{M}$) stammen aus den Beispielzellen der Abbildungen 3.19 bis 3.21. Die Steigerung der relativen Fluoreszenzintensitäten ist minimal und im Vergleich zu den Kontrollen (▽ unbehandelte Zellen mit Newport Green DCF, ○ unbehandelte Zellen ohne Newport Green DCF) maximal 3-fach erhöht. (a) Veränderung der relativen Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF in der gesamten Zelle; (b) Veränderung der relativen Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF im Zellkern.

Auch im Zellkern waren bei den drei gemessenen Zeitpunkten bei den verschiedenen Cobaltkonzentrationen relativ konstant. Eine Beeinflussung der Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF durch verschiedene CoCl_2 -Konzentrationen und Inkubationszeiten war gering.

3.1.4.5 Aufnahme von Nickel in humane Gingiva-Fibroblasten bei $40 \mu\text{M NiCl}_2$ im Medium

Die Versuche mit $100 \mu\text{M}$, $300 \mu\text{M}$ und $500 \mu\text{M}$ der unterschiedlichen Metallverbindungen NiCl_2 , NiSO_4 , Ni_3S_2 und CoCl_2 für verschiedene Inkubationszeiten ergaben, dass eine Detektion der Metalle durch den optischen Sensor Newport Green DCF unter diesen Versuchsbedingungen mit dem CLSM möglich war und dass die Zugabe der genannten Verbindungen zum BME-Medium zur Erhöhung der Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF in Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration, Inkubationsdauer und Verbindung führte. Nickelverbindungen hatten dabei einen größeren Effekt als Co(II) , wobei besonders die NiSO_4 - und Ni_3S_2 -Zugabe in BME-Medium zur Verstärkung der Fluoreszenzintensitäten führte. Die Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF war in Strukturen um den Zellkern am höchsten und konzentrierte sich mit zunehmender Inkubationszeit bei Nickelverbindungen im Zellkern, was bei CoCl_2 nicht der Fall war.

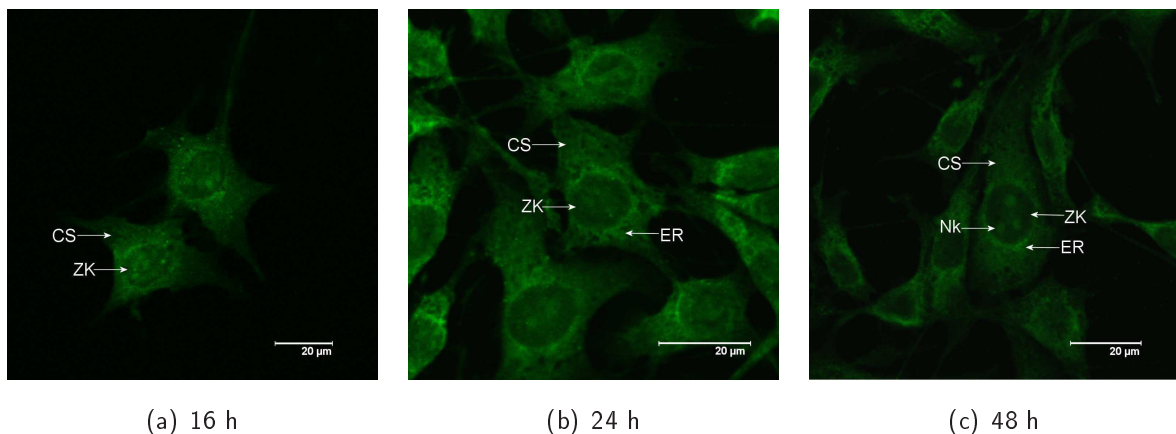


Abbildung 3.23: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen humaner Gingiva-Fibroblasten nach Inkubation mit $40 \mu\text{M NiCl}_2$. Markierung von Ni(II) mit $7 \mu\text{g/ml}$ Newport Green DCF. Detektion mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX APO 40x/0,8 W U-V-I, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser, Emissionsdetektionsbereich: 510 nm bis 560 nm, Blendendurchmesser: $127 \mu\text{m}$ (1 Airy). (a) Inkubationszeit: 16 h, PMT-voltage: 700 V, Kantenlänge: $129 \mu\text{m}$.; (b) Inkubationszeit: 24 h, PMT-voltage: 600 V, Kantenlänge: $81 \mu\text{m}$; (c) Inkubationszeit: 48 h, PMT-voltage: 600 V, Kantenlänge: $105 \mu\text{m}$. ZK=Zellkern, CS=Zytosol, Nk=Nukleolus, ER=Endoplasmatisches Retikulum.

NiCl_2 konnte selbst bei der niedrigsten Konzentration im BME-Medium eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF bewirken. Da es kaum Unterschiede in den Fluoreszenzmustern der verschiedenen Nickelverbindungen gab, wurde NiCl_2 für die folgenden Versuche ausgewählt. Diese Versuche sollten zeigen, ob auch bei Konzentrationen von $40 \mu\text{M NiCl}_2$ im

BME-Medium genügend Nickel in die Zellen aufgenommen wurde, die dadurch eine deutlich messbare Verstärkung der Newport Green DCF-Fluoreszenz bewirkte und damit die Detektion und Lokalisation von Ni(II) nach kurzen Inkubationszeiten und geringen Konzentrationen erlaubte. Die CLSM-Aufnahmen zu diesen Versuchen wurden mit stärkeren PMT-*voltages* als bei höheren NiCl₂-Konzentrationen aufgenommen und sind beispielhaft in Abbildung 3.23 abgebildet. Die Fluoreszenzintensität war bei den Aufnahmen gering, dennoch stellte sich wieder die starke Fluoreszenz der Zellkern-nahen Bereiche heraus, die jedoch keine klaren Strukturen erkennen ließen, sich aber ins Zytosol ausbreiteten. Das Zytosol selbst wies nur geringe Fluoreszenz auf. Der Zellkern enthielt nur die schwach fluoreszierenden Nukleoli, die in ihrer Struktur sehr diffus zu erkennen waren.

Vergleich der relativen Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der NiCl₂-Konzentration von 40 μM und der Inkubationszeit:

Verglich man die Intensitätswerte der Zellen, die mit 40 μM NiCl₂ inkubiert wurden mit Werten von Zellen, die mit höheren NiCl₂-Konzentrationen inkubiert wurden (s. Abbildung 3.24), erkannte man deutlich, dass die Fluoreszenzintensitäten sowohl bei kompletten Zellen, als auch bei Zellkernen stets unterhalb derer mit höheren Konzentrationen lagen und maximal eine 2-fache Verstärkung nach 24 h erreichten. Nach 16 h Inkubation mit 40 μM NiCl₂ wurden Werte gemessen, die sich im Bereich der Kontrollen befanden, also fast keine Fluoreszenzerhöhung ergaben. Nach längeren Inkubationszeiten stiegen die Werte in den kompletten Zellen leicht an und erreichten selbst nach 48 h keine weitere Erhöhung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu 16 h und 24 h (s. Abbildung 3.24(a)). Im Zellkern alleine waren die Unterschiede der Intensitätswerte zwischen den Zellen, die mit 40 μM oder 100 μM NiCl₂ inkubiert wurden, etwas größer (s. Abbildung 3.24(b)). Auch im Zellkern wurden lediglich 2-fache Erhöhungen der Fluoreszenzintensitäten gemessen, wobei bei höheren NiCl₂-Konzentrationen im BME-Medium die Verstärkung im Zellkern höher war als im Vergleich zu kompletten Zellen. So wurde eine schwache, aber stetige Steigerung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit von 16 h auf 24 h und weiter auf 48 h auch bei 40 μM NiCl₂ beobachtet, die den gleichen Trend wie bei höheren Konzentrationen über 100 μM NiCl₂ anzeigte.

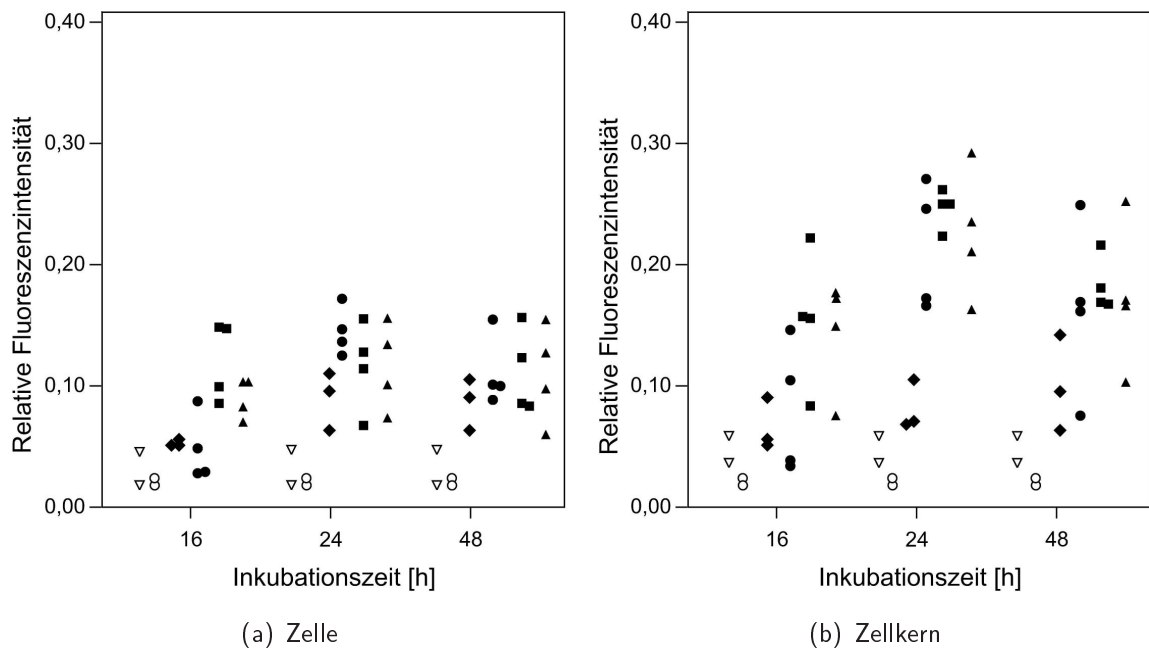


Abbildung 3.24: Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF in humanen Gingiva-Fibroblasten nach der Inkubation mit vier unterschiedlichen NiCl_2 -Konzentrationen.

Die Werte der relativen Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF in NiCl_2 -behandelten humanen Gingiva-Fibroblasten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für verschiedene NiCl_2 -Konzentrationen (◆ $40 \mu\text{M}$, ● $100 \mu\text{M}$, ■ $300 \mu\text{M}$, ▲ $500 \mu\text{M}$) stammen aus den Beispielzellen der Abbildungen 3.5 bis 3.7. Ergänzt wurden Werte von Zellen mit $40 \mu\text{M}$ NiCl_2 (s. Abbildung 3.23), deren Intensitäten geringer sind als bei höheren Konzentrationen, aber höher als die der Kontrollen (∇ unbehandelte Zellen mit Newport Green DCF, ∘ unbehandelte Zellen ohne Newport Green). (a) Veränderung der relativen Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF in der gesamten Zelle; (b) Veränderung der relativen Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF im Zellkern.

3.1.5 Nickel- und Cobaltaufnahme in humane Gingiva-Fibroblasten in Abhängigkeit des pH-Werts des BME-Mediums

Es ist bekannt, dass der pH-Wert des Kulturmediums die Löslichkeit bestimmter Metallverbindungen beeinflusst, aber auch die Aufnahme von Kationen in Zellen ist pH-Wert abhängig. Die Aufnahme von Ionen und Molekülen in eine Zelle ist durch die semipermeable Membran kontrolliert. Diese enthält Transporter, die selektiv für Kationen oder größere Moleküle sind. Die Aufnahme von divalenten Kationen erfolgt ebenfalls über Transporter, die in verschiedenen Organismen variieren können. Bekannte Beispiele für Protonen-abhängige Transporter für divalente Kationen in den unterschiedlichsten Organismen sind DMT1 und seine Homologe oder der DCT1 (Gunshin *et al.*, 1997; Nishimura *et al.*, 1998; Forbes und Gros, 2003; Garrick *et al.*, 2003; Ingle *et al.*, 2008).

Der Protonen-abhängige Transport von Co^{2+} und Ni^{2+} durch den DCT1 in Zellen bzw. Vakuolen wurde auch von Ingle *et al.* (2001) beschrieben. BME-Medium hat üblicherweise einen pH-Wert von ca. 7. Da die Aufnahme von Ni^{2+} und Co^{2+} an bestimmte Transporter gekoppelt ist, die Protonen abhängig funktionieren können (s. Abschnitt 1.4.1) (Gunshin *et al.*, 1997; Garrick *et al.*, 2003; Garrick *et al.*, 2006b), wurde untersucht, ob unterschiedliche pH-Werte im BME-Medium während der Zugabe von Nickel- und Cobaltverbindungen Einfluss auf die Aufnahme und Lokalisation der Newport Green DCF-Fluoreszenz und damit des gebundenen Ni(II) oder Co(II) nehmen. Mögliche Unterschiede in der Lokalisation von Newport Green DCF in Abhängigkeit von der Metallverbindung und des pH-Wertes würden Hinweise auf den Aufnahmemechanismus geben.

Zellen, die im BME-Medium mit unterschiedlichen pH-Werten für 24 h inkubiert wurden, sind in Abbildung 3.25 und 3.26 gezeigt. Getestet wurden die Metallverbindungen NiCl_2 , NiSO_4 , Ni_3S_2 und CoCl_2 in einer Konzentration von $500 \mu\text{M}$, da nach 24 h mit $500 \mu\text{M}$ bei allen getesteten Verbindungen das charakteristische Fluoreszenzmuster detektierbar war. Nach dem Austausch des Nickel- bzw. Cobalt-haltigen BME-Mediums mit verändertem pH-Wert nach 24 h mit neutralem BME-Medium wurde diesem für 60 min Newport Green DCF bei neutralem pH-Wert zugegeben, sodass dieser optische Sensor akkumuliertes Ni(II) und Co(II) in den Zellen nach der Inkubation mit den Metallverbindungen bei saurem und neutralem pH-Wert binden konnte und durch die resultierende Fluoreszenzverstärkung mit dem CLSM detektiert werden konnte.

Das BME-Medium hatte normalerweise einen pH-Wert von ca. 7. Die Ergebnisse in den Abschnitten zuvor wurden bei diesem pH-Wert gewonnen und sind zum direkten Vergleich mit den Ergebnissen mit anderen pH-Werten des BME-Mediums in den Abbildungen 3.25(b), 3.25(e), 3.25(h) und 3.26(b) nochmals dargestellt. Bei neutralem pH-Wert zeigte sich nach der Inkubation der humanen Gingiva-Fibroblasten mit wasserlöslichen und wasserunlöslichen Nickelverbindungen (s. Abbildung 3.25(b), 3.25(e) und 3.25(h)) untereinander ein sehr ähnliches Fluoreszenzmuster. Newport Green DCF war stark fluoreszent in den Zellen. Zum einen war die Fluoreszenz als Netzwerk um den Zellkern sichtbar, das von Zelle zu Zelle unterschiedlich stark ausgeprägt war, zum anderen war starke Fluoreszenz im Zellkern enthalten. Bereits bei PMT-voltages von ca. 480 V konnte bei allen getesteten Nickelverbindungen in BME-Medium mit pH 7 Newport Green DCF-Fluoreszenz detektiert werden. In Zellen, die mit CoCl_2 inkubiert wurden (s. Abbildung 3.26(b)), war schwächere Fluoreszenz im Zytoplasma detektierbar, im Zellkern war kaum Fluoreszenz detektierbar.

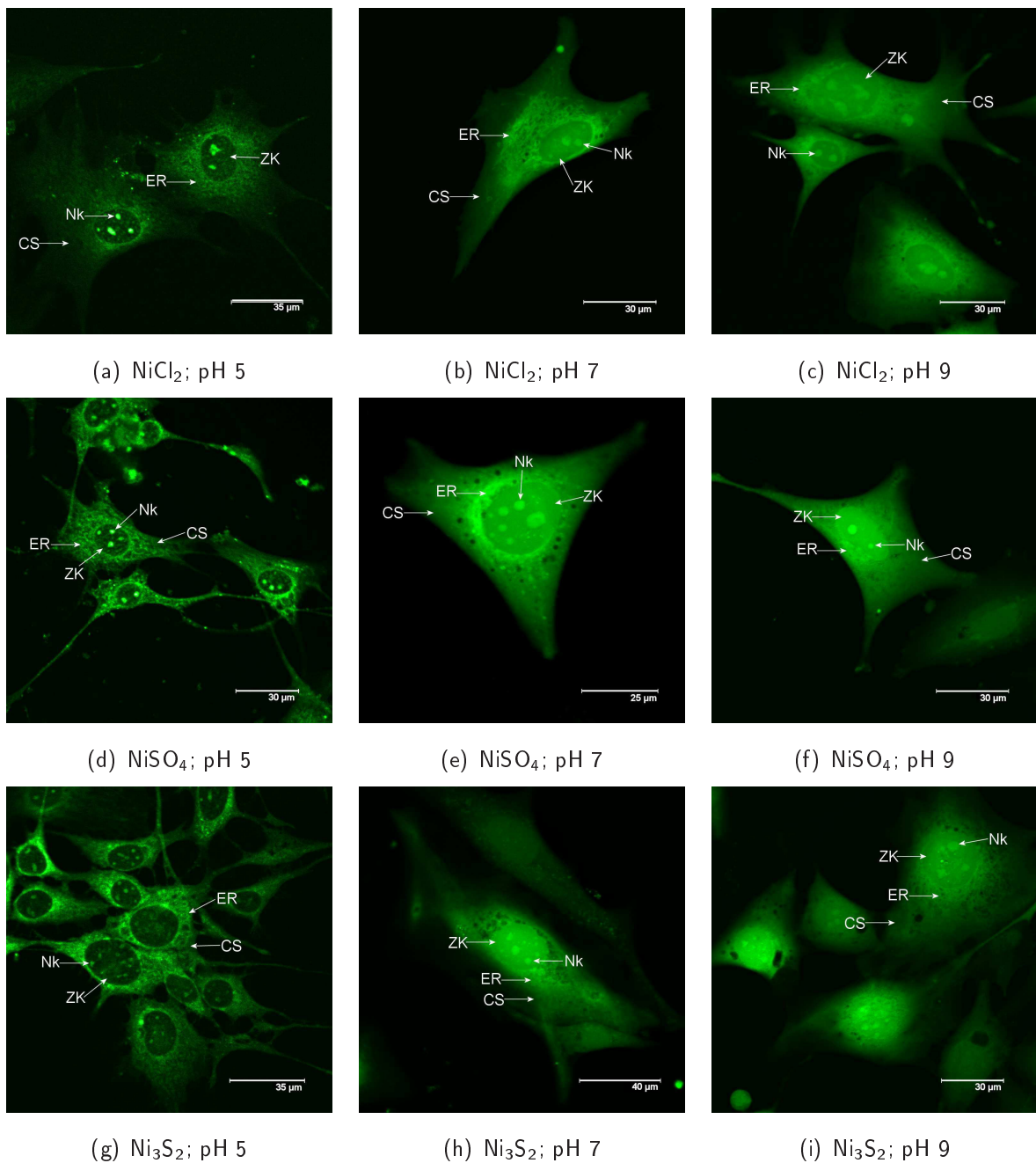


Abbildung 3.25: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen humaner Gingiva-Fibroblasten nach 24 h Inkubation mit 500 μM unterschiedlicher Nickelverbindungen in Abhängigkeit des pH-Werts im BME-Medium. Markierung von Ni(II) mit 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Newport Green DCF. Detektion mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX APO 40x/0,8 W U-V-I, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser, Emissionsdetectionsbereich: 510 nm bis 560 nm, Blendendurchmesser: 127 μm (1 Airy). (a) PMT-voltage: 722 V, Kantenlänge: 160 μm ; (b) PMT-voltage: 482 V, Kantenlänge: 135 μm ; (c) PMT-voltage: 434 V, Kantenlänge: 152 μm ; (d) PMT-voltage: 649 V, Kantenlänge: 156 μm ; (e) PMT-voltage: 472 V, Kantenlänge: 108 μm ; (f) PMT-voltage: 482 V, Kantenlänge: 135 μm ; (g) PMT-voltage: 686 V, Kantenlänge: 153 μm ; (h) PMT-voltage: 477 V, Kantenlänge: 161 μm ; (i) PMT-voltage: 434 V, Kantenlänge: 158 μm . ZK=Zellkern, CS=Zytosol, Nk=Nukleolus, ER=Endoplasmatisches Retikulum.

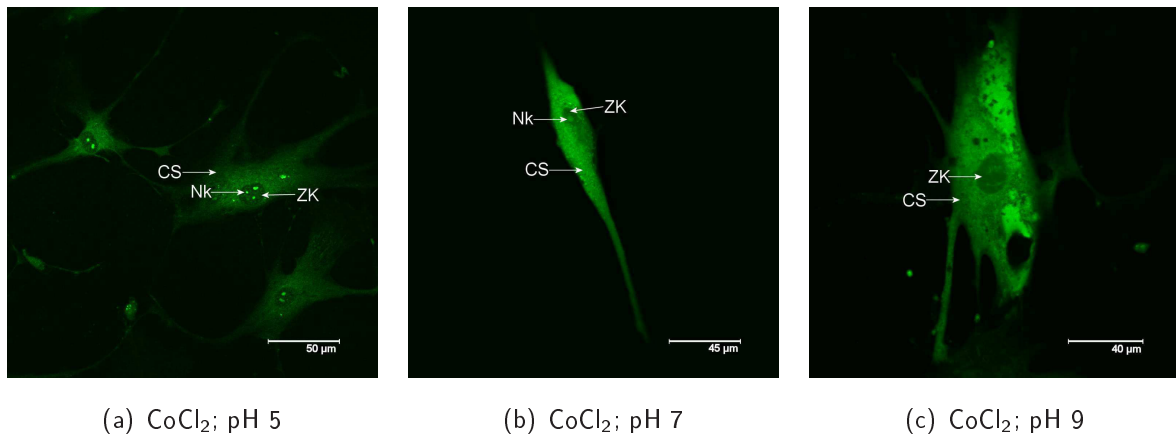


Abbildung 3.26: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen humaner Gingiva-Fibroblasten nach 24 h Inkubation mit 500 μM CoCl_2 in Abhängigkeit des pH-Werts im BME-Medium. Markierung von Co(II) mit 7 $\mu\text{g/ml}$ Newport Green DCF. Detektion mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX APO 40x/0,8 W U-V-I, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser, Emissionsdetektionsbereich: 510 nm bis 560 nm, Blendendurchmesser: 127 μm (1 Airy). (a) PMT-voltage: 692 V, Kantenlänge: 260 μm ; (b) PMT-voltage: 526 V, Kantenlänge: 234 μm ; (c) PMT-voltage: 465 V, Kantenlänge: 199 μm . ZK=Zellkern, CS=Zytosol, Nk=Nukleolus.

Änderte man der pH-Wert in den basischen Bereich auf pH 9, beobachtete man ein Fluoreszenzmuster, das dem der Fibroblasten bei pH 7 sehr ähnlich war. So war bei den drei getesteten Nickelverbindungen gleichermaßen das fluoreszierende Netzwerk um den Zellkern stark ausgeprägt und breitete sich ins Zytosol aus, das selbst zumeist homogene Fluoreszenz zeigte (s. Abbildung 3.25(c), 3.25(f) und 3.25(i)). Der Zellkern beinhaltete ebenfalls den Fluoreszenzfarbstoff und ließ die Nukleoli durch starke Fluoreszenz des Sensors Newport Green DCF deutlich im Zellkern erkennen. Durch die Bindung des Newport Green DCF an Ni(II) war zu sehen, dass Nickel auch bei pH-Werten im basischen Bereich in die Zellen aufgenommen und vom Zytosol weiter in den Zellkern transportiert wurde. Bei CoCl_2 -behandelten Zellen (s. Abbildung 3.26(c)) war wie bei den Zellen, die bei pH 7 im BME-Medium mit CoCl_2 inkubiert wurden, keine Fluoreszenz im Zellkern zu detektieren. Vereinzelt wurden schwach fluoreszierende Nukleoli in den Zellkernen in variierender Anzahl sichtbar. Auch im Zytosol war die Fluoreszenz schwach, schien jedoch geringfügig stärker zu sein als bei Zellen, die bei pH 7 im BME-Medium mit CoCl_2 inkubiert wurden. Das charakteristische Netzwerk mit starker Fluoreszenz um den Zellkern herum war kaum zu beobachten.

Wurden die Fibroblasten dagegen in BME-Medium mit einem sauren pH-Wert von pH 5 mit den vier verschiedenen Metallverbindungen inkubiert (s. Abbildung 3.25(a), 3.25(d), 3.25(g) und 3.26(a)), zeigte sich nach der Inkubation mit dem Nickel- und Cobaltsensor Newport Green DCF in allen Zellen das gleiche Fluoreszenzmuster. So war bei PMT-voltages von ca. 700 V

im Zytosol schwache Fluoreszenz detektierbar, jedoch im Vergleich zu neutralem und basischem pH-Wert ein sehr diffus und schwach fluoreszierendes Netzwerk um den Zellkern sichtbar. Im Zellkern selbst war keine Fluoreszenz zu detektieren, jedoch fluoreszierende Nukleoli im Zellkern, die in ihrer Anzahl von Zelle zu Zelle variierten. Ein Unterschied zwischen Zellen nach Nickel- und Cobaltinkubation war minimal in der Fluoreszenzintensität, aber in der Lokalisation des Fluoreszenzfarbstoffes nicht vorhanden.

Die Ergebnisse der Versuche mit unterschiedlichen pH-Werten im BME-Medium zeigten, dass bei einem sauren pH-Wert (pH 5) im BME-Medium eine verringerte Aufnahme oder Akkumulation von Nickel stattfand, die die Fluoreszenzverstärkung von Newport Green DCF in den Zellen verringerte. Bei neutralem und basischem pH-Wert waren die Ergebnisse sehr ähnlich und entsprachen den Ergebnissen aus Abschnitt 3.1. Bei pH 7 und pH 9 im BME-Medium war Ni(II) in ausreichender Konzentration in den Zellen vorhanden, sodass eine detektierbare Fluoreszenzverstärkung von Newport Green DCF erfolgte. Ein Unterschied innerhalb der Nickelverbindungen in Abhängigkeit des pH-Werts konnte nicht festgestellt werden. Unterschiede zwischen Nickel- und Cobaltverbindungen waren nur bei neutralem und basischem pH-Wert sichtbar. Sie bezogen sich besonders auf die Fluoreszenz im Zellkern.

3.1.6 Zuordnung der Nickel- und Cobaltlokalisation durch Newport Green DCF zu ausgewählten Zellkompartimenten

Die CLSM-Aufnahmen der vorangegangenen Versuche zeigten, dass eine Zuordnung der Nickel- und Cobaltlokalisation zu einem Zellareal oder Organell durch einen Vergleich mit den Transmissionsaufnahmen der Zellen nur beschränkt möglich war. So konnte zwar die Fluoreszenz dem Zellkern, den Nukleoli und dem Zytosol zugeordnet werden, jedoch konnten weitere, u.a. kleinere Strukturen, nicht eindeutig bestimmt werden. Deshalb wurde eine parallele Markierung der divalenten Kationen durch Newport Green DCF und der Organellen mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt, um nähere Hinweise zu bekommen, in welchen Zellarealen der Farbstoff Newport Green DCF und damit die Metalle Ni(II) und Co(II) zu finden waren. Nach der Inkubation der Zellen mit NiCl₂ wurde den Zellen Newport Green DCF und ein Organell-spezifischer Fluoreszenzfarbstoff zugegeben. Da die verwendeten Farbstoffe unterschiedliche Anregungs- und Emissionswellenlängen bedienten (s. Abbildung 3.27(f)), war eine gleichzeitige Detektion der Newport Green DCF-Fluoreszenz und der Organell-spezifischen Farbstoffe, und dadurch die Zuordnung von Newport Green DCF zu den jeweiligen Organellen möglich. Nach einem λ -Scan sah man in den Spektren deutlich die Unterschiede in den Emissionsmaxima der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe (s. Abbildung 3.27(f)). So hatte Newport Green DCF sein Emissionsmaximum im grünen Bereich (532 nm), ER-Tracker red und Bodipy TR im roten Bereich (622 nm bzw.

626 nm) und CellMask deep red im dunkelroten Bereich (662 nm). Der Nachweis konnte somit durch die drei Detektoren im CLSM parallel durchgeführt werden und dem jeweiligen Farbstoff und Zellkompartiment zugeordnet werden.

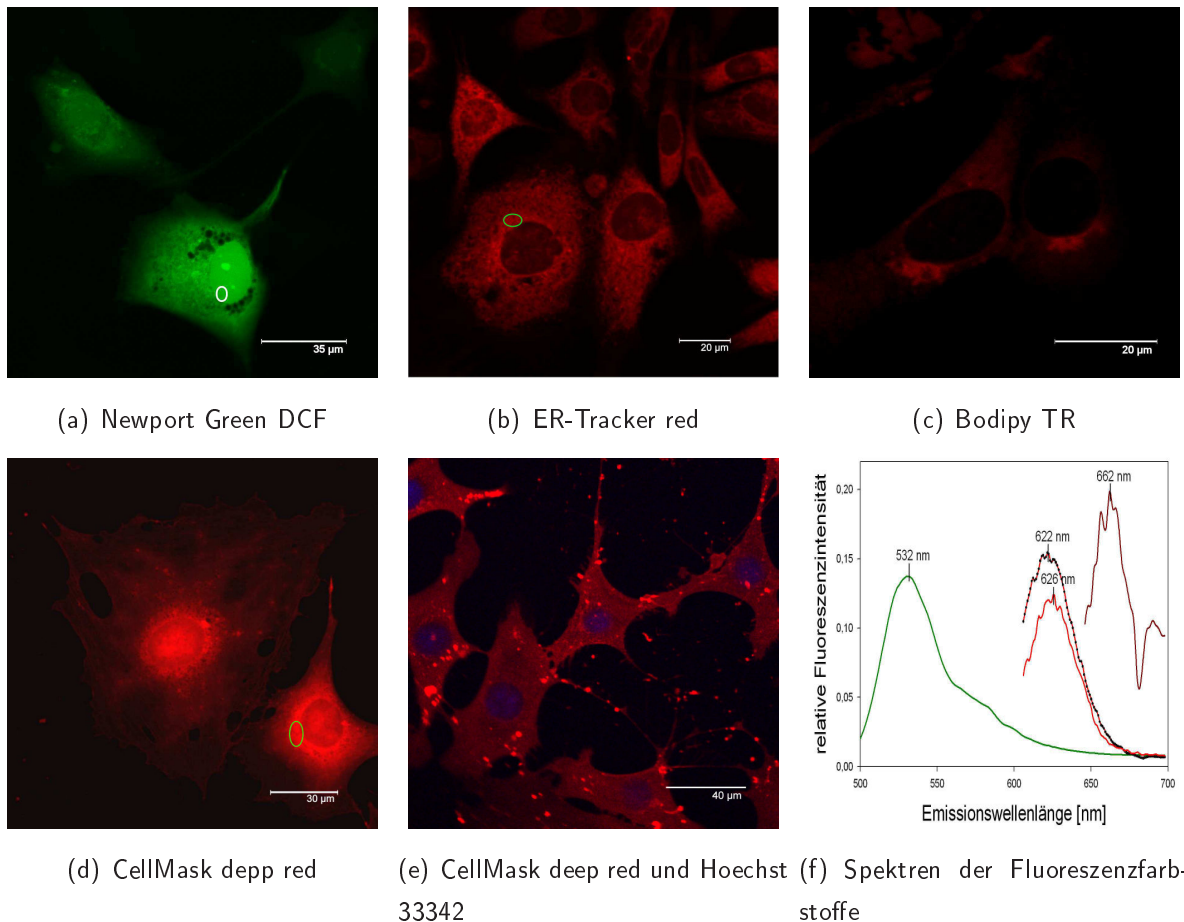
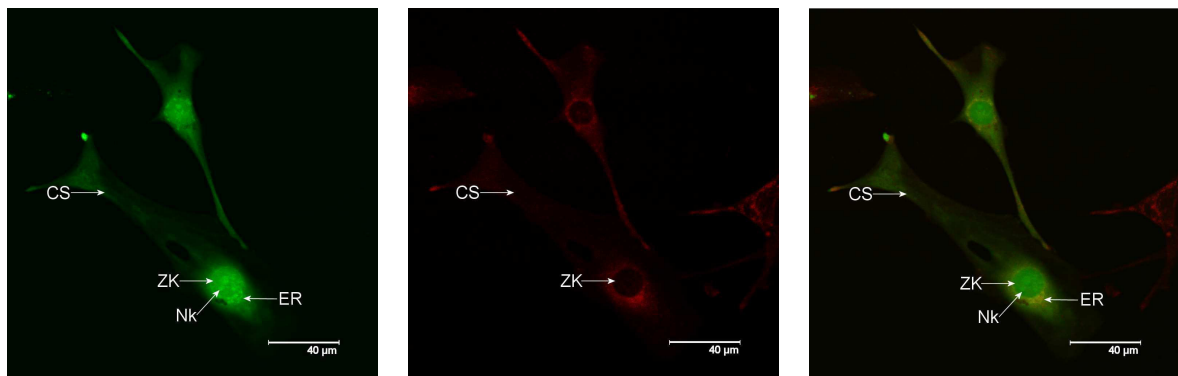


Abbildung 3.27: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen humaner Gingiva-Fibroblasten nach Inkubation mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen und deren Spektren. Detektion verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe in humanen Gingiva-Fibroblasten mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX APO 40x/0,8 W U-V-I, Blendendurchmesser 127 μm (1 Airy). (a) Detektion von Ni(II) mittels Newport Green DCF (60 min, 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in Fibroblasten nach 24 h Inkubation mit 500 μM NiCl_2 , Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser, PMT-voltage 520 V; Kantenlänge: 154 μm ; (b) Detektion des ER mittels ER-Tracker red (30 min, 1 μM) in Fibroblasten, Anregungswellenlänge: 594 nm He/Ne-Laser, PMT-voltage 499 V; Kantenlänge: 145 μm ; (c) Detektion des Golgi-Apparates mittels Bodipy TR (30 min, 5 μM) in Fibroblasten, Anregungswellenlänge: 594 nm He/Ne-Laser, PMT-voltage 700 V; Kantenlänge: 73 μm ; (d) Detektion der Zellmembranen mittels CellMask deep red (60 min, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in Fibroblasten, Anregungswellenlänge: 633 nm He/Ne-Laser, PMT-voltage 536 V; Kantenlänge: 166 μm ; (e) Detektion der Zellmembranen mittels CellMask deep red (60 min, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Anregungswellenlänge: 633 nm He/Ne-Laser, PMT-voltage 677 V und gleichzeitig der Zellkerne mit Hoechst 33342 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Anregung durch Quecksilberdampf Lampe; Kantenlänge: 187 μm ; (f) Spektren der Fluoreszenzfarbstoffe aus dem markierten Bereich der Abbildungen 3.27(a), 3.27(b), 3.27(c) und 3.27(d); — Newport Green DCF, — Bodipy TR, - - ER-Tracker red, — CellMask deep red.

Zunächst wurde anhand von Transmissionsaufnahmen und Zellkernmarkierungen mit Hoechst 33342 der Zellkern in den Fibroblasten identifiziert (s. Abbildung 3.27(e)). In den meisten Fibroblasten zeigten die Zellkerne ihre normale ovale Form. In einigen Zellen konnten unabhängig von der Verbindung morphologisch veränderte Zellkerne beobachtet werden. Um den Zellkern herum wurde Fluoreszenz von Newport Green DCF, wie zuvor gezeigt, meist in Form eines Netzwerkes detektiert, das von Zelle zu Zelle unterschiedlich stark ausgeprägt war (s. Abbildung 3.28(b) und 3.27(b)). Durch eine isolierte Markierung des ER mit ER-Tracker red konnte gezeigt werden, dass das ER ein ähnliches Netzwerk ausbildete, als es nach Ni(II)-Markierung mit Newport Green DCF in Zellen beobachtet wurde. Die parallele Färbung des ER mit ER-Tracker red und des Ni(II) mit Newport Green DCF zeigte durch die anschließend zusammengefassten CLSM-Aufnahmen, dass sich die Farbstoffe teilweise in ihrer Lokalisation überschneiden, aber keine totale Übereinstimmung bestand. Ni(II) akkumulierte folglich an ER-Strukturen (s. Abbildung 3.28(c)).



(a) Newport Green DCF

(b) ER-Tracker red

(c) Merge

Abbildung 3.28: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen humaner Gingiva-Fibroblasten nach Inkubation mit Newport Green DCF und ER-Tracker red. Parallele Markierung von Ni(II) mit Newport Green DCF und des ER mit dem Fluoreszenzfarbstoff ER-Tracker red. Detektion mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX APO 40x/0,8 W U-V-I, Blendendurchmesser 127 μm (1 Airy), Kantenlänge 210 μm . (a) Detektion von Ni(II) mittels Newport Green DCF (60 min, 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$) nach Inkubation der Zelle mit 300 μM NiCl_2 (24 h), Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser, Emissionsdetektionsbereich: 510 nm bis 560 nm, PMT-voltage 479 V; (b) Detektion des ER-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes ER-Tracker red (30 min, 1 μM), Anregungswellenlänge: 594 nm He/Ne-Laser, Emissionsdetektionsbereich: 610 nm bis 650 nm, PMT-voltage 712 V; (c) Merge der Aufnahmen 3.28(a) und 3.28(b). ZK=Zellkern, CS=Zytosol, Nk=Nukleolus, ER=Endoplasmatisches Retikulum.

Diese retikulären Strukturen, die durch Fluoreszenz sichtbar wurden, waren sowohl nach ER-Markierung mit ER-Tracker red, als auch nach Ni(II)- und Co(II)-Markierung mit Newport Green DCF in Zellen unter dem CLSM zu beobachten. Von Zelle zu Zelle waren diese Netzwerke unterschiedlich stark ausgeprägt, so war in den Fibroblasten (s. Abbildung 3.28(a)) mit zunehmender Inkubationszeit und Ausgangskonzentration der Metallverbindungen im BME-Medium

dieses Netzwerk relativ gering ausgeprägt. In Zellkernnähe waren diese retikulären und tubulären Strukturen bei wasserlöslichen und wasserunlöslichen Metallverbindungen oft nach längeren Inkubationszeiten oder höheren Metallkonzentrationen in der Ausprägung verringert (s. Abbildung 3.7(c) und 3.16(c)) und besonders bei CoCl_2 -behandelten Zellen als punktförmige Strukturen oder Fragmente zu beobachten (s. Abbildung 3.19(f) und 3.21(c)). Der Golgi-Apparat, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bodipy TR markiert wurde (s. Abbildung 3.27(c)) und nahe am ER auf einer Zellkernseite lokalisiert ist (s. Abbildung 3.27(c)), konnte mit Newport Green DCF nicht eindeutig an gleicher Stelle detektiert werden. Teilweise wurde die Fluoreszenz von Newport Green DCF im Bereich der Kernmembran deutlich (s. Abbildung 3.6(f)), sodass Ni(II) ebenfalls an der Kernmembran lokalisiert war.

3.1.7 Fluoreszenzspektren von Newport Green DCF in BME-Medium

Der optische Sensor Newport Green DCF besitzt ein Anregungsmaximum bei 505 nm und ein Emissionsmaximum bei 535 nm (Molecular Probes invitrogen, Produktinformation MP 07990). Ein λ -Scan mittels CLSM bei Anregung mit einem Argonlaser der Wellenlänge 488 nm detektierte die Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF in BME-Medium im Bereich von 500 nm bis 700 nm (s. Abschnitt 2.3.3). Da die Zellen in BME-Medium inkubiert wurden und das gleiche Medium anschließend bei der Visualisierung der Zellen bzw. von Newport Green DCF mit dem CLSM eingesetzt wurde, wurde zunächst ein Spektrum von BME-Medium bei neutralem pH-Wert aufgenommen (s. Abbildung 3.29(f)). Alle Spektren, die im Folgenden gezeigt werden, stellen relative Fluoreszenzwerte dar und wurden mathematisch nach dem LOESS-Verfahren geglättet. In den Abbildungen 3.29 wurde das Spektrum von BME-Medium grau dargestellt. Es wurden relative Fluoreszenzintensitäten von 0,015 bei 500 nm erreicht, die bei ca. 510 nm bereits auf einen konstanten Intensitätswert von 0,013 sanken (s. Abbildung 3.29(f)). Das bedeutete, dass es sich bei diesen Intensitätswerten um das Basislevel der BME-Medium-Fluoreszenz handelte, das keinen Einfluss auf das Newport Green DCF-Spektrum nahm. In einem weiteren Schritt wurde dem BME-Medium ausschließlich Newport Green DCF in einer Endkonzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zugegeben und über einen Zeitraum von 40 min alle 10 min die Fluoreszenzintensität durch einen λ -Scan gemessen. Damit wurde gezeigt, welches Spektrum Newport Green DCF ohne die Bindung an Metalle besaß und ob es später nach der Zugabe der Metallverbindungen eine Beeinflussung der Spektren gab. In Abbildung 3.29 wurde lediglich das Spektrum nach 40 min schwarz gezeigt, da die Spektren nach 10 min, 20 min und 30 min den gleichen Verlauf zeigten, die Fluoreszenzintensität jedoch mit zunehmender Zeit anstieg. Das Spektrum von BME-Medium mit Newport Green DCF zeigte vor dem Glätten ein Emissionsmaximum bei 532 nm mit einer schwachen Schulter bei 526 nm, die durch das Glätten verschwand und den

Verlauf des Spektrums mit dem Maximum minimal langwellig auf 534 nm verschob (s. Abbildung 3.29(f)). Der Intensitätswert von 0,034 bei diesem Emissionsmaximum von 534 nm nach 40 min war gering, jedoch deutlich höher als bei BME-Medium alleine.

In den Abbildungen 3.29(a) bis 3.29(d) sind die Spektren von Newport Green DCF in BME-Medium nach der Zugabe verschiedener Metallverbindungen nach verschiedenen Inkubationszeiten zwischen 0 min und 40 min einzeln aufgeführt. Nach der Zugabe der Metallverbindungen in das BME-Medium mit Newport Green DCF erhöhte sich die relative Fluoreszenzintensität innerhalb von 40 min bei allen vier getesteten Verbindungen nur gering von 0,034 auf ca. 0,035 bis 0,057 je nach Metallverbindung. Die größte Steigerung war nach 40 min bei NiCl_2 (s. Abbildung 3.29(a)) mit einem Wert von 0,057 zu beobachten, was einer Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität um das 1,7-fache entsprach (s. Abbildung 3.29(a) und 3.29(e)). Bei den anderen Nickelverbindungen und CoCl_2 waren dagegen kaum Änderungen in der Fluoreszenzintensität zur Kontrolle (BME-Medium mit Newport Green DCF) detektierbar (NiSO_4 : 0,037, Ni_3S_2 : 0,039 und CoCl_2 : 0,035). Der Verlauf der Spektren blieb nach Zugabe der Metallverbindungen im Vergleich zu dem Spektrum mit Newport Green DCF ohne Metallverbindungen erhalten, wenn auch die Schulter bei 526 nm bei den nicht geglätteten Spektren nach Zugabe von Metallverbindungen etwas stärker ausgeprägt war und die Spektren geringfügig breiter wurden.

3.1.8 Fluoreszenzspektren von Newport Green DCF in humanen Gingiva-Fibroblasten

Die Ergebnisse in den Abschnitten 3.1.4 und 3.1.5 zeigten, dass Newport Green DCF von den Zellen aufgenommen wurde, da Fluoreszenz sichtbar war. Die Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF war abhängig von der Metallverbindung, deren Konzentration, Inkubationszeit und auch von dem pH-Wert des BME-Mediums. Das bedeutete, dass die Kationen Ni^{2+} und Co^{2+} , oder ihre Verbindungen, ebenfalls in Abhängigkeit von dem pH-Wert im BME-Medium und ihrer Konzentration in die Zellen aufgenommen wurden. Eine Unterscheidung der verschiedenen Spezies war aufgrund der Lokalisation von Ni(II) und Co(II) innerhalb einer Zelle nur bedingt möglich. Eine Unterscheidung zwischen Co(II) und Ni(II) anhand der Newport Green DCF-Lokalisation oder der Fluoreszenzintensität war ebenfalls schwierig, da die Fluoreszenzen sehr ähnlich waren. Ni(II) und Co(II) waren lediglich durch die An- bzw. Abwesenheit von Fluoreszenz im Zellkern und die geringe Fluoreszenzverstärkung zu unterscheiden.

Ein λ -Scan von unterschiedlichen Bereichen in Metall-behandelten Zellen sollte in einem weiteren Versuch bestätigen, dass sich die Fluoreszenz in den Zellen auf Newport Green DCF zurückführen lässt und Hinweise liefern, ob sich das Fluoreszenzspektrum von Newport Green DCF innerhalb einer Zelle durch die Bindung verschiedener Kationen oder ihrer Verbindungen und Komplexe

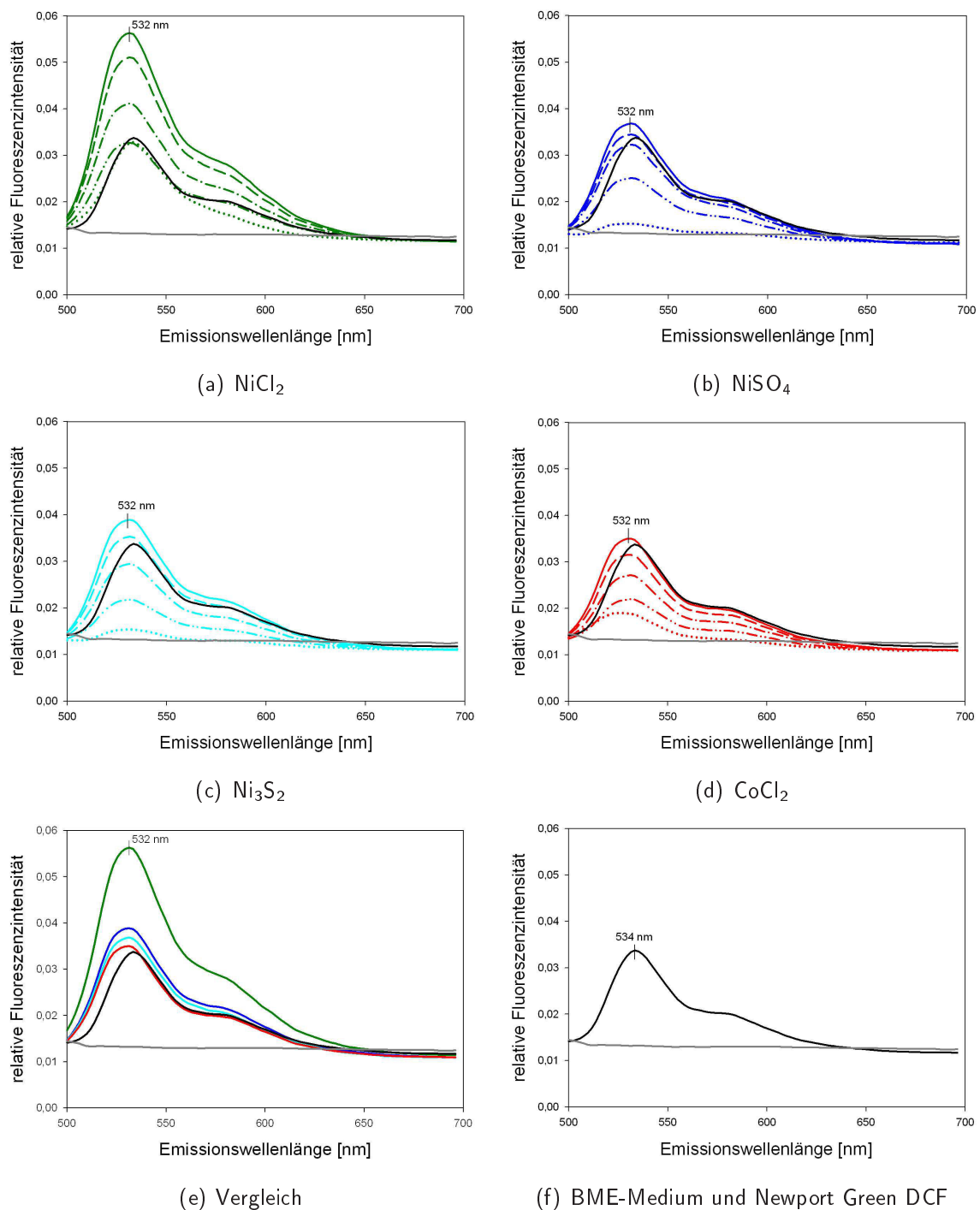


Abbildung 3.29: Fluoreszenzspektren von Newport Green DCF in BME-Medium nach Inkubation mit verschiedenen Metallverbindungen. BME-Medium mit Newport Green DCF wurde über einen Zeitraum von 40 min mit NiCl_2 (a), NiSO_4 (b), Ni_3S_2 (c) und CoCl_2 (d) inkubiert. In Abständen von 10 min wurden Fluoreszenzintensitäten von Newport Green DCF nach Anregung mit einem Argonlaser der Wellenlänge 488 nm in einem Bereich zwischen 500 nm und 700 nm in einem λ -Scan mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX APO 40x/0,8 W U-V-I (Blendendurchmesser: 127 μm (1 Airy)) detektiert. Das resultierende Spektrum wurde zusammen mit den Spektren von BME-Medium (grau) und BME-Medium mit Newport Green DCF (schwarz) aufgetragen. $\cdots\cdots$ Inkubationszeit $t=0$ min, $-\cdot-\cdot-$ $t=10$ min, $-\cdot-\cdot-$ $t=20$ min, $-\cdot-\cdot-$ $t=30$ min, $-\cdot-\cdot-$ $t=40$ min. (e) Newport Green DCF-Spektren nach 40 min Inkubation mit den getesteten Metallverbindungen. Die Farben der Spektren korrespondieren mit den Farben für die einzelnen Metallverbindungen in (a) bis (d); (f) Spektrum von BME-Medium (grau) und Newport Green DCF in BME-Medium (schwarz).

charakteristisch änderte. Es wurde ebenfalls untersucht, ob durch einen λ -Scan eine Unterscheidung der gebundenen Metalle möglich war oder ob die Lokalisation in verschiedenen Organellen das Spektrum beeinflusste.

Um die Auswirkungen der Metalle auf Newport Green DCF-Spektren in humanen Gingiva-Fibroblasten ohne und nach Zugabe von Metallverbindungen festzustellen, wurde zunächst die Eigenfluoreszenz der humanen Gingiva-Fibroblasten detektiert. Dazu wurden Spektren in humanen Gingiva-Fibroblasten aufgenommen, die weder mit Metallverbindungen, noch mit Newport Green DCF behandelt wurden. Diese unbehandelten Fibroblasten zeigten alle schwach und amorph fluoreszierende Strukturen am äußeren Rand des Zellkerns nach Anregung mit dem Argonlaser (488 nm) (s. Abbildung 3.30(a)). Ein λ -Scan der fluoreszierenden ROIs der unbehandelten Fibroblasten (s. Abbildung 3.30(b)) zeigte das Fluoreszenzspektrum dieser ROIs in den Zellen nach Anregung mit dem 488 nm Argonlaser und ob Eigenfluoreszenzen bzw. deren Spektren bei der Detektion des Fluoreszenzfarbstoffes Newport Green DCF störten.

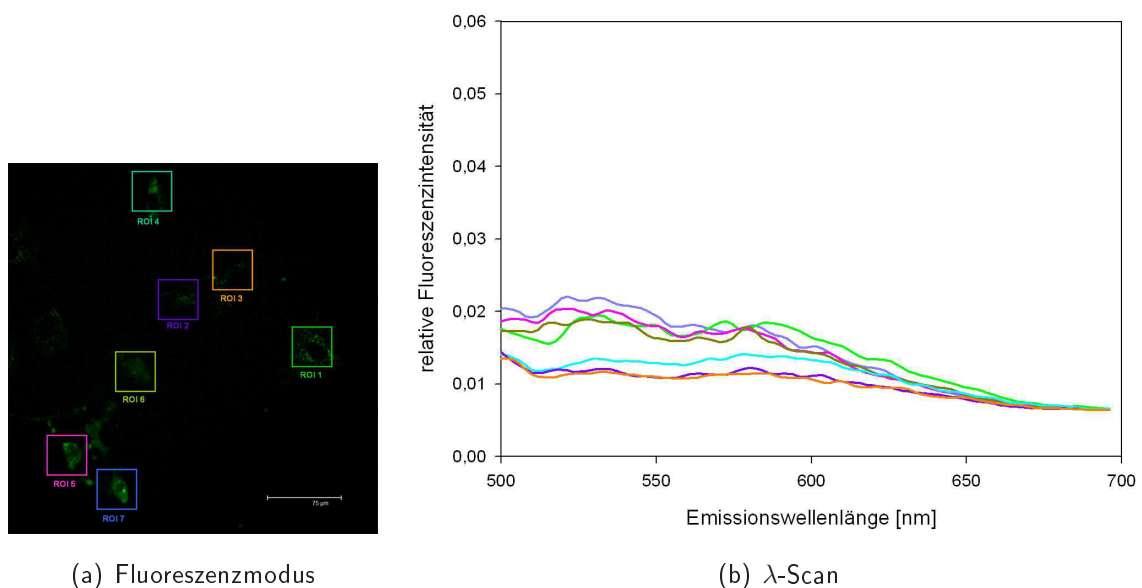


Abbildung 3.30: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme un behandelter humaner Gingiva-Fibroblasten. λ -Scan von unbehandelten humanen Gingiva-Fibroblasten mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX APO 40x/0,8 W U-V-I, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser, Emissionsdetektionsbereich: 500 nm bis 700 nm, Blendendurchmesser: 127 μm (1 Airy). (a) Merge der durchschnittlichen Fluoreszenzintensitätswerte; PMT-voltage: 830 V, Kantenlänge: 375 μm ; (b) Fluoreszenzspektren der Fibroblasten ohne Zusatz von Metallverbindungen oder Fluoreszenzfarbstoffen. Die Spektren in (b) entsprechen den ROIs in (a).

Die Abbildung 3.30(a) zeigt eine CLSM-Aufnahme humaner Gingiva-Fibroblasten, die aus 100 Einzelaufnahmen des λ -Scans zusammengesetzt wurde. Aus den Intensitätswerten der verschiedenen ROIs, die Zellen oder definierte Zellareale miteinbezogen, entstanden Spektren, die in Abbildung 3.30(b) zu sehen sind und die farblich mit der Markierung der ROIs in Abbildung 3.30(a) korrelieren. Die relative Fluoreszenzintensität war bei allen Spektren sehr gering und lag zwischen 0,006 und 0,022. Die Spektren der Eigenfluoreszenz der Zellen waren wellenartig mit sehr schwacher Amplitude, die bei etwa 540 nm und 580 nm eine geringe Erhöhung der Intensität zeigten. Mit zunehmender Wellenlänge näherte sich die Fluoreszenzintensität asymptotisch einem konstantem Minimum an. Da die Intensitätswerte der Eigenfluoreszenz der Zellen unter der von Newport Green DCF in Medium lagen (s. Abbildung 3.29(e)) und ein kaum zu bestimmendes Spektrum aufzeigten, konnte die Eigenfluoreszenz der Zellen in den folgenden Messungen im Hinblick auf die Fluoreszenzintensität vernachlässigt werden.

Um die Newport Green DCF-Spektren in Zellen ohne und nach Zugabe der Metallverbindungen vergleichen zu können, wurde zuvor ein λ -Scan von unbehandelten Zellen mit Newport Green DCF durchgeführt. Diese Spektren sind in den Abbildungen 3.31 bis 3.34 schwarz dargestellt.

3.1.8.1 Fluoreszenzspektren von Newport Green DCF nach NiCl₂-Inkubation

Die Bindung von Nickel an den Sensor bewirkte eine Verstärkung der Fluoreszenzintensität des Chromophors. Ob die Bindung des *target*-Ions Ni²⁺ ebenfalls Einfluss auf das Fluoreszenzspektrum von Newport Green DCF nimmt, wurde im Folgenden untersucht. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 500 μ M NiCl₂ in BME-Medium für 24 h inkubiert. Anschließend wurde Ni(II) mit Newport Green DCF markiert und mit Hilfe eines λ -Scans Spektren von Newport Green DCF in verschiedenen Bereichen der Zellen aufgenommen. Ein möglicher Einfluss der *target*-Strukturen in den Organellen oder anderer Moleküle auf die Spektren wurde ebenfalls untersucht.

Die Fluoreszenzspektren in Abbildung 3.31 repräsentieren Newport Green DCF-Spektren, die in verschiedenen Zellarealen wie dem Zellkern, dem Zytosol, dem Nukleolus oder dem ER von humanen Gingiva-Fibroblasten aufgenommen wurden. Die Fibroblasten wurden 24 h mit 500 μ M NiCl₂ inkubiert und Ni(II) anschließend mit Newport Green DCF markiert (in Abbildung 3.31(a) jeweils grün dargestellt). In jedem Graph wurden sowohl Spektren des gleichen Bereiches aus unterschiedlichen Zellen, die unter gleichen Bedingungen inkubiert wurden, aufgeführt, als auch ein Spektrum aus den Mittelwerten aller gezeigten Spektren eines Zellbereiches (in Abbildung 3.31(a) orange dargestellt). Ein Spektrum aus unbehandelten Zellen mit Newport Green DCF (in Abbildung 3.31(a) schwarz dargestellt) diente als Kontrollspektrum. In Abbildung 3.31(a) wurden zunächst Spektren aufgeführt, die am Rand des Zytosols der humanen Gingiva-Fibroblasten

aufgenommen wurden. Es fiel auf, dass die meisten Spektren sehr geringe Fluoreszenzintensitäten besaßen, aber trotz ihrer unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten einen ähnlichen Verlauf zeigten und minimale Unterschiede von bis zu 3 nm in der Lage ihrer Maxima ausprägten. Je schwächer die Fluoreszenzintensität war, desto uneindeutiger war der Verlauf der Spektren. Weitere Spektren bildeten ein deutliches Maximum bei 530 nm mit Schultern im Bereich von 558 nm bis 571 nm und 586 nm (s. Pfeil bei Spektrum □ in Abbildung 3.31(a)).

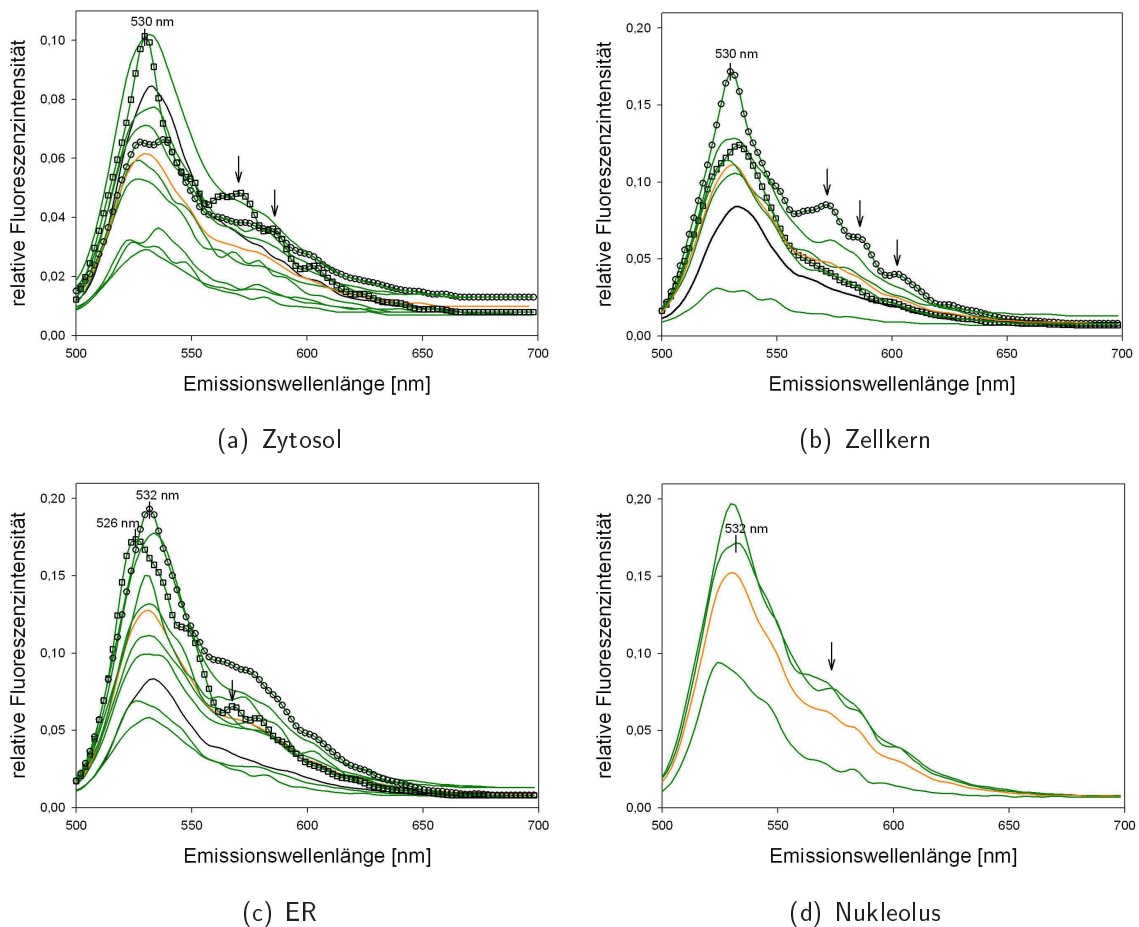


Abbildung 3.31: Fluoreszenzspektren von Newport Green DCF in humanen Gingiva-Fibroblasten nach deren Inkubation mit NiCl_2 . λ -Scan von NiCl_2 -behandelten humanen Gingiva-Fibroblasten nach Newport Green DCF-Zugabe mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX APO 40x/0,8 W U-V-I, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser, Emissionsdetectionsbereich: 500 nm bis 700 nm, Blendendurchmesser: 127 μm (1 Airy). Die Fibroblasten wurden für 24 h NiCl_2 mit einer Konzentration von 500 μM im BME-Medium inkubiert. Nach der Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes Newport Green DCF (60 min, 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurden Fluoreszenzspektren in verschiedenen Bereichen der Fibroblasten aufgenommen (grün). (a) Zytosol; (b) Zellkern; (c) ER; (d) Nukleolus. Ein Spektrum aus den Mittelwerten dieser Fluoreszenzspektren ist orange dargestellt; ein Kontrollspektrum aus unbehandelten Fibroblasten mit Newport Green DCF ist schwarz dargestellt.

Verglichen mit den Kontrollspektren unbehandelter humaner Gingiva-Fibroblasten mit Newport Green DCF (schwarz) waren die Maxima der meisten Spektren leicht kurzwellig verschoben. Spektren, die im Zellkern aufgenommen wurden, sind in Abbildung 3.31(b) gezeigt. Auch hier wurde das Kontrollspektrum von Newport Green DCF in unbehandelten humanen Gingiva-Fibroblasten in schwarz dargestellt, sowie das Spektrum aus den Mittelwerten der Spektren aus den Zellkompartimenten orange. Bei den Spektren, die im Zellkern aufgenommen wurden, fiel auf, dass diese in ihrer Lage der Maxima und im Verlauf geringe Unterschiede zu den Kontrollen und untereinander ausbildeten. Ein Teil der Spektren (s. ○ in Abbildung 3.31(b)) wies ein Maximum bei 530 nm mit teilweise starken Schultern bei 572 nm, 586 nm und 602 nm auf (s. Pfeil in Abbildung 3.31(b)). Andere Spektren (□) bildeten nach Glättung ein Maximum bei 534 nm wie bei der Kontrolle (in Abbildung 3.31(b) schwarz) aus und verliefen identisch. Insgesamt waren die Fluoreszenzintensitäten in den Zellen mit Werten bis ca. 0,10 deutlich höher als im Zytoplasma.

Einige Spektren, die nach Zugabe von NiCl_2 und Newport Green DCF in einem Bereich aufgenommen wurden, der das ER mit einbezog (s. Abbildung 3.31(c)), waren dem Kontrollspektrum in Medium (s. Abbildung 3.29) durch ihren Verlauf mit einem Maximum bei 532 nm ähnlich (○). Eine schwache Schulter, die im Kontrollspektrum in BME-Medium mit Newport Green DCF aufgenommen wurde, war in diesem Spektrum über einen Bereich von 560 nm bis 580 nm (○) deutlicher ausgeprägt (s. Pfeil in Abbildung 3.31(c)). Vereinzelt wurden Spektren aufgenommen, die ein sehr breites Maximum ausbildeten (in Abbildung 3.31(c) mit □ gekennzeichnet). Der Verlauf des Spektrums (□) war kurzwellig verschoben, mit einem Maximum bei 526 nm, einer Schulter bei 548 nm und weiteren leichten Erhöhungen der Fluoreszenzintensität bei 568 nm (s. Pfeil in Abbildung 3.31(c)). Diese Erhöhung der Fluoreszenz befand sich im Bereich der Erhöhung des Spektrums ○. Dieses Spektrum ○ wurde in einem sehr stark fluoreszierenden Bereich nahe des Zellkerns aufgenommen. Die Intensität der Spektren im Bereich des ER stieg bis zu 0,2 an.

Die Spektren, die in fluoreszierenden Bereichen im Nukleolus aufgenommen wurden (s. Abbildung 3.31(d)), waren bis auf minimale Schwankungen im Bereich des Maximums um 532 nm gleich. Der Verlauf der Spektren im Nukleolus glich dem der Kontrollspektren von Newport Green DCF im BME-Medium mit einem direkten Anstieg der Fluoreszenzintensität zum Maximum bei 532 nm und dem welligen Verlauf im Bereich um 580 nm (s. Abbildung 3.29).

3.1.8.2 Fluoreszenzspektren von Newport Green DCF nach NiSO₄-Inkubation

Auch in Zellen, die mit NiSO₄ inkubiert wurden, wurden Spektren in unterschiedlichen Kompartimenten der Zellen aufgenommen und mit den Kontrollspektren verglichen, um mögliche Beeinflussungen der Spektren durch die Ni(II)-Bindung oder der Ni(II)-Komplexe an Newport Green DCF zu detektieren (s. Abbildung 3.32). In NiSO₄-behandelten humanen Gingiva-Fibroblasten war zu beobachten, dass der Verlauf einiger Newport Green DCF-Spektren (s. ○ Abbildung 3.32(a)) im Zytosol der NiSO₄-behandelten Zellen denen von Newport Green DCF im BME-Medium alleine und denen von Newport Green DCF in unbehandelten Fibroblasten ähnlich war. Sie besaßen ein Maximum bei 533 nm, wobei bei ca. 580 nm die Fluoreszenz nochmal leicht anstieg (s. Pfeil in Abbildung 3.32(a)). Weitere Spektren (□) aus dem Zytosol besaßen, wie die Kontrollspektren im Zytosol (schwarz) unbehandelter Zellen mit Newport Green DCF, ein Maximum bei 531 nm. Weiter in den kürzeren Wellenlängenbereich verschoben war das Spektrum (△), das in einem Pseudopodium aufgenommen wurde und starke Fluoreszenz in einem flächigen, begrenzten Bereich zeigte. Die Fluoreszenzintensität dieses Spektrums war jedoch gering. Das Maximum befand sich bei 528 nm mit einer Schultern bei 540 nm. Insgesamt ergab sich aus allen Werten der einzelnen Spektren ein Spektrum mit einem schwachen Maximum bei 532 nm (in Abbildung 3.32(a) orange).

Detektierte man die Fluoreszenz der Zellkerne NiSO₄-behandelter Zellen, ergaben sich die in Abbildung 3.32(b) dargestellten Spektren. Im Vergleich zu den Kontrollspektren in BME-Medium zeigte ein Teil der Spektren (○) kaum Unterschiede im Verlauf und lediglich minimale Verschiebungen in der Lage der Maxima (Maximum bei 532 nm; Kontrolle bei 531 nm und 534 nm). Es wurden auch Spektren aufgenommen (□), die mit einem Maximum bei 528 nm deutlich kurzwellig verschoben waren und bei 572 nm deutliche Schultern ausbildeten (s. Pfeil in Abbildung 3.32(b)), sowie welche, die mit einem Maximum bei 538 nm und Schultern bei 524 nm und 566 nm leicht langwellig verschoben waren (s. Abbildung 3.32(b)). Auch bei den Spektren, die im Zellkern aufgenommen wurden, errechnete sich durch die unterschiedlichen Maxima und Intensitätswerte ein Mittelwertspektrum, das kein eindeutiges Maximum ausbildete (in Abbildung 3.32(b) orange).

Im Bereich des ER (s. Abbildung 3.32(c)) konnte man ebenfalls Spektren (○) aufnehmen, die im Vergleich zu den Kontrollspektren von Newport Green DCF in unbehandelten Zellen (in Abbildung 3.32(c) schwarz) kurzwellig verschoben waren. Ihre Maxima lagen bei 525 nm bzw. 528 nm im Vergleich zu den Maxima der meisten Spektren um 532 nm. Andere Spektren und die mit □ gekennzeichneten, waren wiederum den Kontrollspektren von Newport Green DCF in Zellen und BME-Medium ähnlicher und zeigten im λ -Scan den gleichen Verlauf sowie ebenfalls

ein Maximum bei 532 nm bzw. 533 nm. Eine dritte Art von Spektren (Δ) bildete ein Maximum bei 535 nm aus und zeigte im längerwelligen Bereich des Maximums bei 566 nm und 586 nm leichte Erhöhungen der Fluoreszenzintensität.

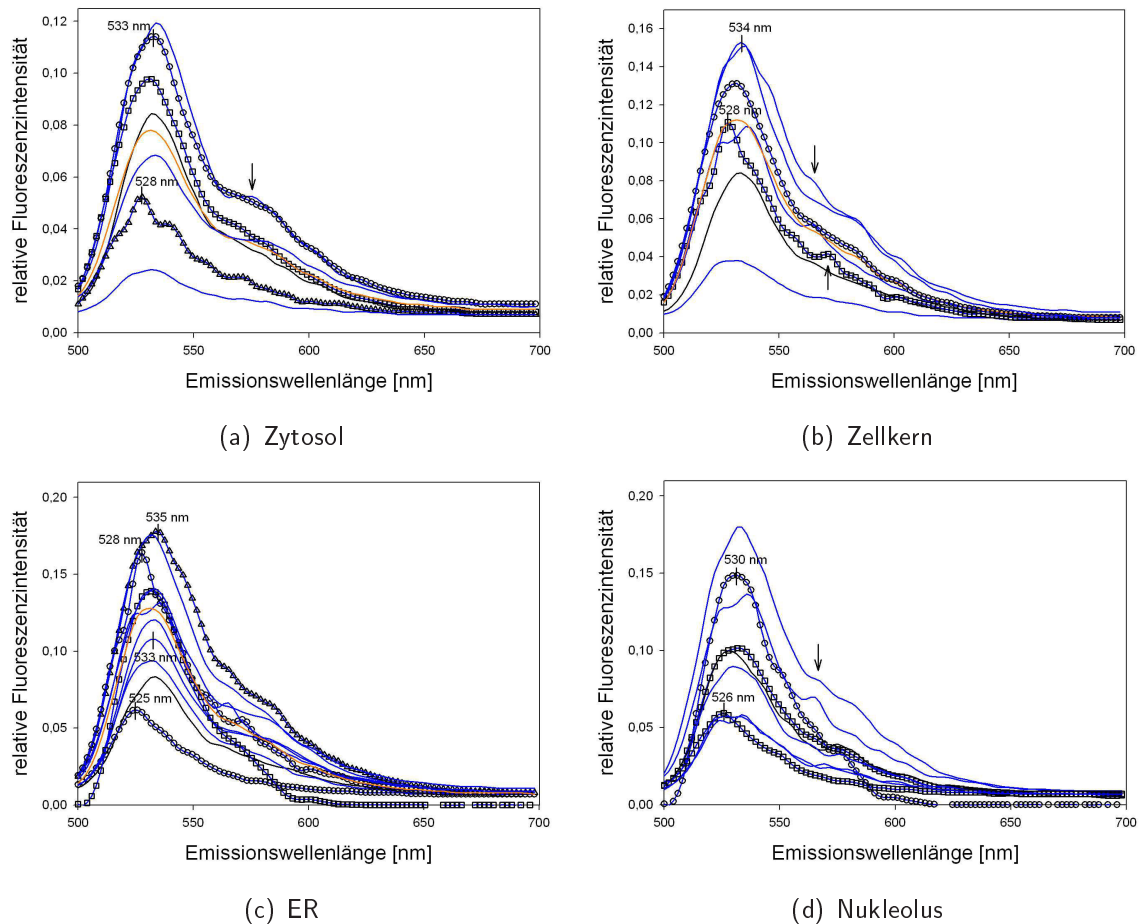


Abbildung 3.32: Fluoreszenzspektren von Newport Green DCF in humanen Gingiva-Fibroblasten nach deren Inkubation mit NiSO_4 . λ -Scan von NiSO_4 -behandelten humanen Gingiva-Fibroblasten nach Newport Green DCF-Zugabe mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX APO 40x/0,8 W U-V-I, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser, Emissionsdetectionsbereich: 500 nm bis 700 nm, Blendendurchmesser: 127 μm (1 Airy). Die Fibroblasten wurden für 24 h NiSO_4 mit einer Konzentration von 500 μM im BME-Medium inkubiert. Nach der Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes Newport Green DCF (60 min, 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurden Fluoreszenzspektren in verschiedenen Bereichen der Fibroblasten aufgenommen. (a) Zytosol; (b) Zellkern; (c) ER; (d) Nukleolus. Ein Spektrum aus den Mittelwerten dieser Fluoreszenzspektren ist orange dargestellt; ein Kontrollspektrum aus unbehandelten Zellen mit Newport Green DCF ist schwarz dargestellt.

Die Spektren, die im Nukleolus NiSO_4 -behandelter Zellen aufgenommen wurden (s. Abbildung 3.32(d)), zeigten im Vergleich zu den Kontrollspektren in BME-Medium leichte Veränderungen. Die meisten Spektren bildeten kein deutliches Maximum aus (\circ und \square), das sich jeweils längerwellig des Maximums der Kontrolle in unbehandelten Zellen mit Newport Green DCF (in Abbildung 3.32(d) schwarz) befand. Weitere Spektren, die in ihrer Intensität deutlich schwächer waren, zeigten ein kurzwellig verschobenes Maximum bei 526 nm (\square) bzw. langwellig verschobe-

nes auf 536 nm. Der Bereich in den Zellen, in denen die Spektren aufgenommen wurden, war im Vergleich zur umgebenden Zelle bzw. dem Zellkern stärker fluoreszent und deutlich abgrenzbar, aber in seiner Struktur unauffällig. Auch bei den Spektren, die in den Nukleoli aufgenommen wurden, war eine leichte Zunahme der Fluoreszenzintensität im Bereich von 560 nm bis 580 nm zu beobachten, bevor die Fluoreszenzintensität gegen ein Minimum sank (s. Pfeil in Abbildung 3.32(d)).

3.1.8.3 Fluoreszenzspektren von Newport Green DCF nach Ni_3S_2 -Inkubation

Spektren, die in Ni_3S_2 -behandelten Zellen aufgenommen wurden, variierten in den jeweiligen Zellkompartimenten kaum. So zeigte sich zunächst bei Spektren aus dem Zytosol (s. Abbildung 3.33(a)), dass die Maxima der Fluoreszenzspektren in Ni_3S_2 -behandelten Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollen in Zellen (schwarze) nahezu identisch waren (s. Abbildung 3.33(a)) und auch mit dem Maximum im Newport Green DCF-Spektrum in BME-Medium übereinstimmten (s. Abbildung 3.29). Die Spektren sowie das resultierende Mittelwertspektrum (in Abbildung 3.33(a) orange) zeigten die zuvor bereits beschriebene Erhöhung der Fluoreszenzintensität im Bereich von 560 nm bis 580 nm.

Im Zellkern aufgenommene Spektren (s. Abbildung 3.33(b)) bildeten eine Schulter bei 560 nm bis 580 nm aus, die zumeist jedoch nur schwach war. Lediglich das Spektrum, das mit \circ gekennzeichnet wurde, zeigte im Verlauf eine stärker ausgeprägte Schulter in diesem Wellenlängenbereich (s. Pfeil in Abbildung 3.33(b)). Die Maxima der Newport Green DCF-Spektren in den Zellkernen der Zellen, die mit Ni_3S_2 inkubiert wurden (in Abbildung 3.33(b) hellblau), sowie die Kontrollspektren (schwarz) und das durchschnittliche Spektrum (orange), waren in ihrem Verlauf charakteristisch für das Newport Green DCF-Spektrum und wiesen ein identisches Maximum bei 534 nm auf (s. Abbildung 3.33(b)).

Die Spektren in Abbildung 3.33(c), die im Bereich des ER Ni_3S_2 -behandelter Zellen aufgenommen wurden, bildeten großteils ein Maximum bei 533 nm aus. Mit einem Maximum bei 534 nm waren andere Spektren minimal verschoben und zeigten einen identischen Verlauf (\circ). Lediglich das Spektrum mit der Kennzeichnung \square bildete nach Glättung ein Maximum bei 531 nm und eine etwas deutlichere Schulter bei 580 nm im Vergleich zu den anderen Spektren in dieser Abbildung.

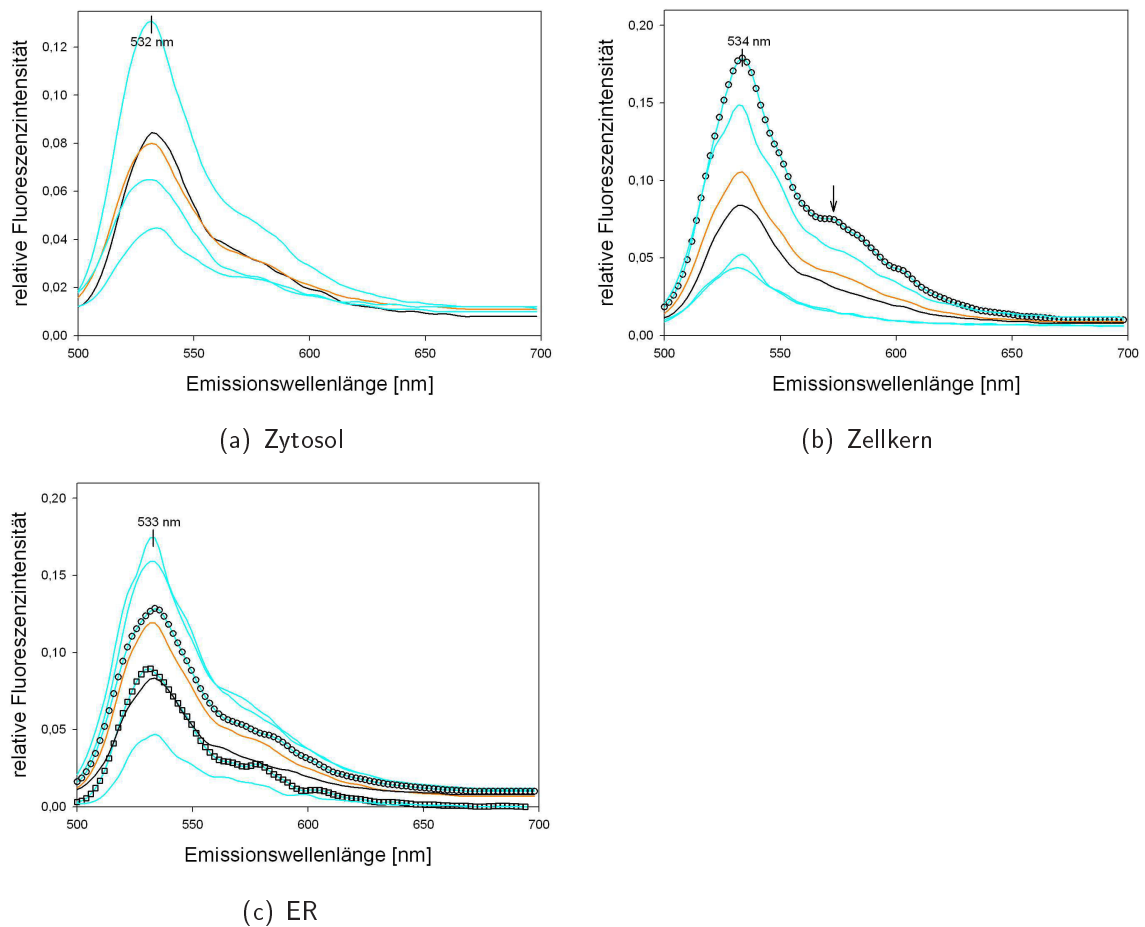


Abbildung 3.33: Fluoreszenzspektren von Newport Green DCF in humanen Gingiva-Fibroblasten nach deren Inkubation mit Ni_3S_2 . λ -Scan von Ni_3S_2 -behandelten humanen Gingiva-Fibroblasten nach Newport Green DCF-Zugabe mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX APO 40x/0,8 W U-V-I, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser, Emissionsdetektionsbereich: 500 nm bis 700 nm, Blendendurchmesser: 127 μm (1 Airy). Die Fibroblasten wurden für 24 h Ni_3S_2 mit einer Konzentration von 500 μM im BME-Medium inkubiert. Nach der Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes Newport Green DCF (60 min, 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurden Fluoreszenzspektren in verschiedenen Bereichen der Zellen aufgenommen. (a) Zytosol; (b) Zellkern; (c) ER. Ein Spektrum aus den Mittelwerten dieser Fluoreszenzspektren ist orange dargestellt; ein Kontrollspektrum aus unbehandelten Fibroblasten mit Newport Green DCF ist schwarz dargestellt.

3.1.8.4 Fluoreszenzspektren von Newport Green DCF nach CoCl_2 -Inkubation

Die letzte Verbindung, deren Einfluss auf die Newport Green DCF-Spektren untersucht wurde, war CoCl_2 . Die Fluoreszenzspektren im Zytosol (s. Abbildung 3.34(a)) der CoCl_2 -behandelten Zellen bildeten Maxima bei 533 nm bzw. 534 nm aus und waren dem Kontrollspektrum in Zellen (schwarz) ähnlich. In den Spektren nach CoCl_2 -Zugabe waren lediglich schwache Schultern zu erkennen. Im Vergleich zu den Kontrollspektren von Newport Green DCF in BME-Medium (s.

Abbildung 3.29) waren die Maxima minimal um 1 nm bis 2 nm in den längeren Wellenlängenbereich von 532 nm auf 533 nm bzw. 534 nm verschoben. Alle Spektren zeigten untereinander einen sehr ähnlichen Verlauf mit geringen Fluoreszenzintensitäten, die im Bereich der Kontrollspektren in unbehandelten Zellen lagen.

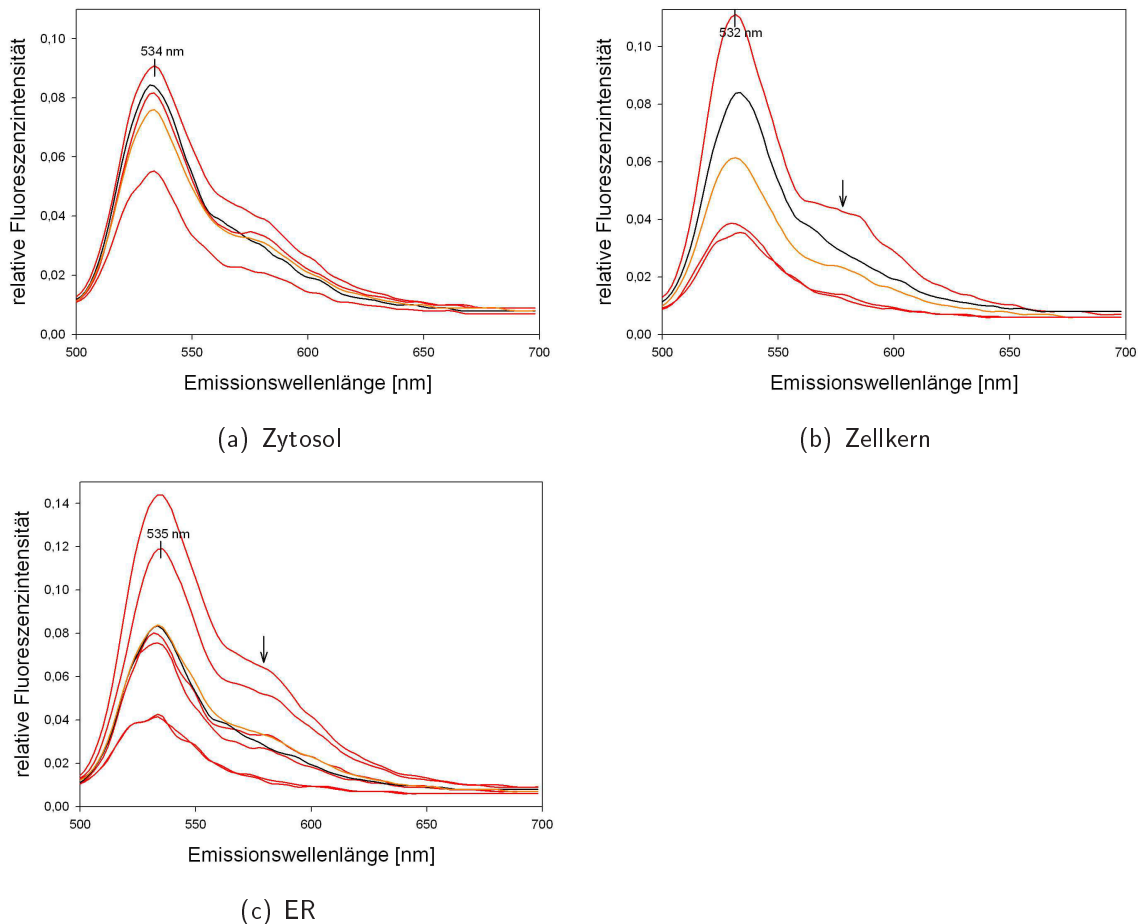


Abbildung 3.34: Fluoreszenzspektren von Newport Green DCF in humanen Gingiva-Fibroblasten nach deren Inkubation mit CoCl_2 . λ -Scan von CoCl_2 -behandelten Fibroblasten nach Newport Green DCF-Zugabe mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX APO 40x/0,8 W U-V-I, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser, Emissionsdetektionsbereich: 500 nm bis 700 nm, Blendendurchmesser: 127 μm (1 Airy). Die Fibroblasten wurden für 24 h CoCl_2 mit einer Konzentration von 500 μM im BME-Medium inkubiert. Nach der Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes Newport Green DCF (60 min, 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurden Spektren in verschiedenen Bereichen der Fibroblasten aufgenommen. (a) Zytosol; (b) Zellkern; (c) ER. Ein Spektrum aus den Mittelwerten dieser Fluoreszenzspektren ist orange dargestellt; ein Kontrollspektrum aus unbehandelten Zellen mit Newport Green DCF ist schwarz dargestellt.

Spektren von Newport Green DCF, die nach CoCl_2 -Inkubation im Zellkern dieser Fibroblasten aufgenommen wurden (s. Abbildung 3.34(b)), stimmten im Verlauf mit dem Kontrollspektrum in den Zellen (schwarz) und den beiden Kontrollspektren in BME-Medium (s. Abbildung 3.29) überein. Sie zeigten Maxima bei 532 nm oder 534 nm. In BME-Medium lagen die Maxima

bei 532 nm. Das Kontrollspektrum in unbehandelten Zellen (schwarz) zeigte ein Maximum bei 534 nm. Ein Spektrum zeigte in einem Bereich von ca. 560 nm bis 590 nm eine leichte Erhöhung der Fluoreszenzintensität (s. Pfeil in Abbildung 3.34(b)), die bereits zuvor bei Fluoreszenzspektren anderer Metallverbindungen beobachtet werden konnte. Da die Spektren aus dem Zellkern CoCl_2 -behandelter Fibroblasten untereinander ähnlich waren, war das Spektrum aus den Mittelwerten (orange) im Verlauf und Lage der Maxima allen Spektren gleich.

Bei der Beobachtung der Spektren aus dem ER (s. Abbildung 3.34(c)) fiel auf, dass die Fluoreszenzspektren von Newport Green DCF nach CoCl_2 -Zugabe ein Maximum bei 533 nm bzw. 535 nm ausbildeten, das im Vergleich zur Kontrolle in BME-Medium mit einem Maximum bei 532 nm (s. Abbildung 3.29 schwarz) leicht längerwellig verschoben war. Auch im Bereich des ER zeigten die Spektren im Wellenlängenbereich zwischen 570 nm und 590 nm ebenfalls eine Schulter (s. Pfeil in Abbildung 3.34(c)).

Schlussfolgerung:

Insgesamt zeigten die Spektren bei allen getesteten Verbindungen einen sehr ähnlichen Verlauf und die Maxima lagen in einem engen Bereich zwischen 532 nm und 535 nm. Spektren, die einen dazu abweichenden Verlauf zeigten, traten nicht gehäuft bei einer bestimmten Verbindung oder einem Zellareal auf. Ein Vergleich der Spektren aus den jeweiligen Kompartimenten der einzelnen Metallverbindungen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kompartimenten der gleichen Metallverbindung. Verglich man die Spektren der verschiedenen Metallverbindungen untereinander, konnte man ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Spezies feststellen. In jeder Gruppe waren Spektren zu beobachten, die in ihrem Verlauf geringe Unterschiede zu anderen Zellen zeigten, doch charakteristische Veränderungen durch eine bestimmte Spezies oder ein bestimmtes Kompartiment wurden nicht festgestellt.

3.2 Nickel- und Cobaltdetektion in Pflanzenzellen von *Catharanthus roseus*

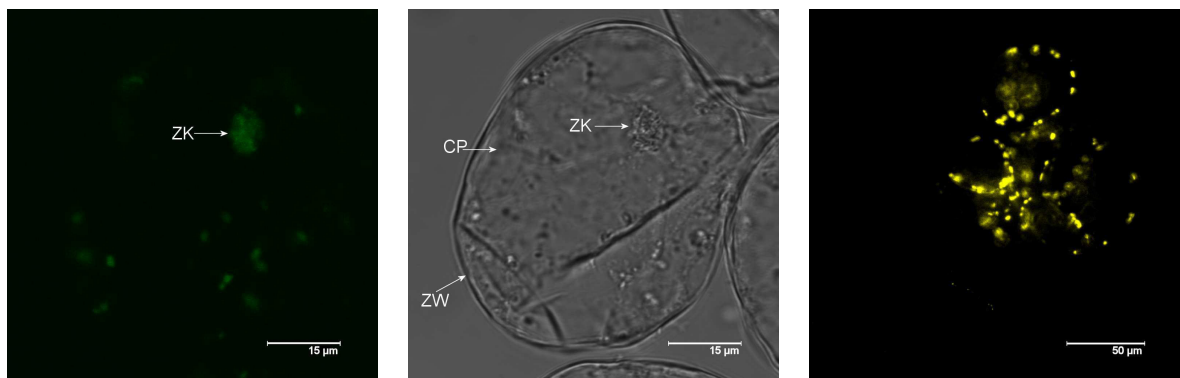
Nickel und Cobalt sind für Pflanzen essentielle Metalle (Linsmaier und Skoog, 1965). Trotzdem kann es durch erhöhte Konzentrationen von essentiellen Metallen im Boden, denen Pflanzen direkt ausgesetzt sind, zu einer erhöhten Aufnahme in die Pflanzen kommen, die den Metabolismus negativ beeinflussen und toxische Auswirkungen zeigen kann. Die Inkubation von Pflanzensuspensionszellen mit vier verschiedenen Metallverbindungen sollte Hinweise auf die Aufnahme und Speicherung von essentiellen Metallverbindungen in Pflanzenzellen liefern. *Catharanthus roseus* diente dabei als Testorganismus. In das LS-Medium wurden die Metallverbindungen NiCl_2 , NiSO_4 , Ni_3S_2 und CoCl_2 mit einer Endkonzentration von $100 \mu\text{M}$ zugegeben. Nach einer defi-

nierten Inkubationszeit zwischen 24 h und 120 h wurde jeweils in 24 h-Abständen ein Teil der Zellen entnommen, mit PBS gespült und anschließend mit dem optischen Ni(II)- und Co(II)-Sensor Newport Green DCF versetzt, um Ni(II) und Co(II) in den *Catharanthus roseus*-Zellen zu detektieren.

3.2.1 Eigenfluoreszenz der Pflanzenzellen von *Catharanthus roseus*

Um auch in den Pflanzenzellen eine störende Eigenfluoreszenz der Zellen ausschließen zu können, wurde zunächst, wie bei den Fibroblasten, die Eigenfluoreszenz der Pflanzenzellen untersucht. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension unter dem CLSM mit dem Argonlaser (488 nm) angeregt. In Abbildung 3.35(a) ist die Eigenfluoreszenz der *Catharanthus roseus*-Zellen in einem Wellenlängenbereich zwischen 510 nm und 590 nm und von 649 nm bis 670 nm, also einem Wellenlängenbereich, der den Emissionsbereich von Newport Green DCF beinhaltet, aufgezeigt. Es zeigte sich, dass in diesem Wellenlängenbereich zwischen 510 nm und 590 nm lediglich schwache und diffuse Fluoreszenz in begrenzten Arealen in den Zellen existierte. Diese Areale konnten anhand von Transmissionsaufnahmen den Zellkernen zugeordnet werden (s. Abbildung 3.35(b)). In den anderen Kompartimenten wie dem Zytosol, der Vakuole oder der Zellwand, war keine Fluoreszenz in diesem Wellenlängenbereich nach Anregung mit dem Argonlaser zu beobachten. Wurde der Detektionsbereich auf 649 nm bis 702 nm eingegrenzt, wurden stark fluoreszierende Bereiche in der Nähe der Zellwand sichtbar. Bei diesen stark fluoreszierenden Bereichen handelte es sich um Chloroplasten, deren Chlorophyll-*a* und Chlorophyll-*b* Licht in einem Spektralbereich von 400 nm bis 500 nm absorbierten und ihre Energie in einem längeren Wellenlängenbereich wieder abgaben. Durch die Vakuole, die einen Großteil des Zellvolumens einnahm, wurden die Chloroplasten an den Rand des Zytosols gedrängt. Da die Fluoreszenz von Newport Green DCF in einem Wellenlängenbereich von 510 nm bis 590 nm detektiert wurde, störte folglich die Fluoreszenz der Chloroplasten nicht die Detektion von Newport Green DCF. Die geringe Eigenfluoreszenz der Zellen und deren Kompartimente konnte also bei der Detektion von Newport Green DCF vernachlässigt werden.

Wurden unbehandelte Pflanzenzellen von *Catharanthus roseus* mit Newport Green DCF versetzt, war eine homogene, aber sehr schwache Fluoreszenz innerhalb der Zellen zu erkennen (s. Abbildung 3.36). Bis auf den Zellkern, der geringfügig höhere Fluoreszenz als das Zytosol zeigte, traten keine besonderen Bereiche in der Zelle mit erhöhter Fluoreszenzintensität hervor und somit konnte auch die geringe Eigenfluoreszenz von Newport Green DCF bei der Detektion von Ni(II) und Co(II) in den Pflanzenzellen durch diesen Sensor vernachlässigt werden.



(a) Fluoreszenzmodus 510 nm bis 590 nm

(b) Transmissionsmodus

(c) Fluoreszenzmodus 649 nm bis 702 nm

Abbildung 3.35: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Catharanthus roseus* Pflanzenzellen. Die Eigenfluoreszenz von *Catharanthus roseus*-Suspensionszellen wurde mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX PL APO 63x/1,2 W CORR CS detektiert; Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser. (a) Emissionsdetektionsbereich: 510 nm bis 590 nm, Blendendurchmesser: 600 μm (4,48 Airy), PMT-voltage: 609 V, Kantenlänge: 76 μm ; (b) Mikroskopische Aufnahme einer Pflanzenzelle im Transmissionsmodus, Kantenlänge: 76 μm ; (c) Laser: (33 %), Emissionsdetektionsbereich: 649 nm bis 702 nm, Blendendurchmesser: 600 μm (4,48 Airy), PMT-voltage: 830 V, Kantenlänge: 238 μm . ZK=Zellkern, CP=Zytoplasma, ZW=Zellwand.

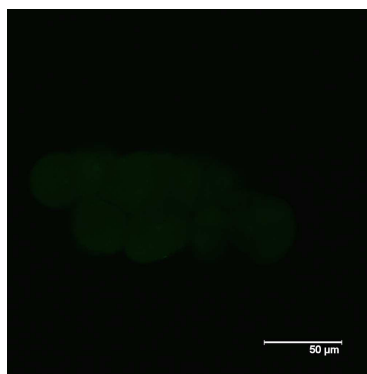


Abbildung 3.36: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Catharanthus roseus*-Pflanzenzellen nach Newport Green DCF-Zugabe. Detektion von Newport Green DCF in unbehandelten *Catharanthus roseus*-Pflanzenzellen mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX PL APO 63x/1,2 W CORR CS; Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser, Emissionsdetektionsbereich: 509 nm bis 543 nm, Blendendurchmesser: 300 μm (2,24 Airy), PMT-voltage: 500 V, Kantenlänge: 238 μm .

3.2.2 Einfluss unterschiedlicher Inkubationszeiten von Nickel- und Cobaltverbindungen auf die Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF und dessen Lokalisation

Nickel stellt für viele Pflanzen ein essentielles Spurenelement dar. Im Boden wird es aus verschiedenen Verbindungen gelöst und kann über die Wurzeln in die Pflanzen aufgenommen werden.

Spurenelemente können jedoch durch unnatürlich hohe Konzentrationen der Verbindungen im Boden vermehrt aufgenommen werden, was in zu hohen intrazellulären Metallkonzentrationen resultiert, die für einen Metabolismus toxische Auswirkungen haben können. Eine überhöhte intrazelluläre Nickelkonzentration kann für Pflanzen, die nicht an hohe Nickelkonzentrationen angepasst sind, toxisch sein. Für die Versuche wurden $100 \mu\text{M}$ der Metallverbindungen eingesetzt, um eine unnatürlich hohe Metallkonzentration zu testen, die das Überleben der Pflanzenzellen über längere Zeiten erlaubte.

3.2.2.1 Aufnahme von Nickel in Pflanzenzellen von *Catharanthus roseus* während NiCl_2 -Exposition

Um die Aufnahme von Nickel und die Abhängigkeit der Aufnahme von der Expositionszeit mit der löslichen Nickelverbindung NiCl_2 in Pflanzenzellen zu beobachten und Nickel in Pflanzenzellen zu lokalisieren, wurden *Catharanthus roseus*-Zellen in Suspension mit $100 \mu\text{M}$ NiCl_2 in LS-Medium für 120 h inkubiert. Alle 24 h wurden Aliquots entnommen und die Zellen mit Newport Green DCF inkubiert, um Ni(II) zu markieren. Mit dem CLSM wurde die Fluoreszenz des optischen Sensors Newport Green DCF detektiert.

Bei den in Abbildung 3.37(a) gezeigten Zellen, die 24 h mit NiCl_2 inkubiert wurden, erkannte man bereits nach 24 h deutliche Fluoreszenz in der gesamten Zelle und starke Fluoreszenz im Zellkern in nahezu allen untersuchten Zellen. Die Fluoreszenzintensität im Zellkern war in einem punktförmigen Bereich noch höher (s. Markierung ZK in Abbildung 3.37(a)). Am Zellrand konnten amorphe Strukturen beobachtet werden (s. Markierung 2 in Abbildung 3.37(a)), die sich von der homogenen Fluoreszenz im Zellinneren durch stärkere Fluoreszenzintensitäten abhoben. In der mikroskopischen Aufnahme in Abbildung 3.37(a) erkannte man ebenfalls, dass sich außerhalb des Bereiches, der die amorphen, fluoreszierenden Strukturen beinhaltet, ein schmaler Bereich ohne Fluoreszenz befand, der nach außen hin wiederum von einer fluoreszierenden Linie begrenzt wurde (s. Markierung 1 in Abbildung 3.37(a)).

Auch nach 48 h Inkubation mit $100 \mu\text{M}$ NiCl_2 wurde eine deutliche und starke Fluoreszenz von Newport Green DCF im Zellkern sichtbar, die die Lokalisation von Ni(II) zeigte. Die Fluoreszenzintensität schien nach 48 h Inkubation mit $100 \mu\text{M}$ NiCl_2 nicht stärker zu sein als nach 24 h. Der Zellkern war auch in diesen Zellen am äußeren Rand der Zelle lokalisiert und durch starke Fluoreszenz sichtbar (s. Abbildung 3.37(b)). Am Zellrand detektierte man wie in den Zellen, die 24 h mit NiCl_2 inkubiert wurden, deutlich kleinere, amorphe, fluoreszierende Strukturen, die den inneren Rand der Zelle abgrenzten und sich klar von der homogenen Fluoreszenz im Zytosol bzw. der Vakuole mit starker Fluoreszenz abhoben (s. Abbildung 3.37(b)).

Die Inkubation mit NiCl_2 für 72 h führte in einigen Pflanzenzellen zu einer leichten Erhöhung der Fluoreszenzintensität. Deutlich war hier wiederum der Zellkern (s. Markierung ZK in Abbildung 3.37(c)), sowie die amorphen Strukturen am Rand des Zytosols mit starker Fluoreszenz zu sehen (s. Abbildung 3.37(c)). Im Zytoplasma war ebenfalls Fluoreszenz zu beobachten, die geringer als im Zellkern war. In Abbildung 3.37(c) konnte man ebenfalls erkennen, dass sich zwischen einer fluoreszierenden Linie am äußeren Zellrand und dem Zytosol ein nicht fluoreszierender Bereich bildete (s. Markierung 1 in Abbildung 3.37(c)).

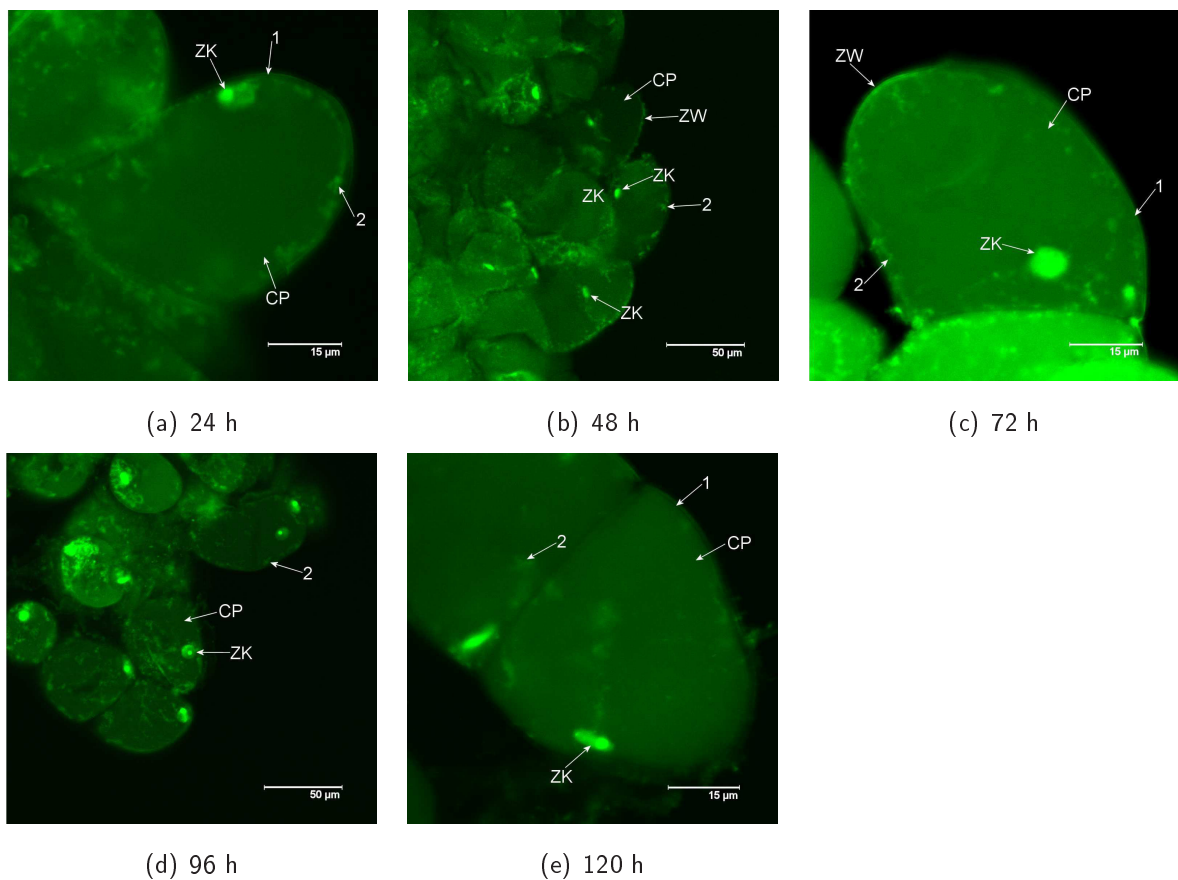


Abbildung 3.37: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Catharanthus roseus*-Zellen nach Inkubation mit $100 \mu\text{M NiCl}_2$. Markierung von Ni(II) mit $1 \mu\text{g/ml}$ Newport Green DCF. Detektion mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX PL APO 63x/1,2 W CORR CS, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser. (a) Emissionsdetektionsbereich: 510 nm bis 590 nm, Blendendurchmesser: $600 \mu\text{m}$ (4,48 Airy), PMT-voltage: 551 V, Kantenlänge: $76 \mu\text{m}$; (b) Emissionsdetektionsbereich: 510 nm bis 590 nm, Blendendurchmesser: $600 \mu\text{m}$ (4,48 Airy), PMT-voltage: 548 V, Kantenlänge: $238 \mu\text{m}$; (c) Emissionsdetektionsbereich: 510 nm bis 590 nm, Blendendurchmesser: $600 \mu\text{m}$ (4,48 Airy), PMT-voltage: 551 V, Kantenlänge: $77 \mu\text{m}$; (d) Emissionsdetektionsbereich: 510 nm bis 590 nm, Blendendurchmesser: $600 \mu\text{m}$ (4,48 Airy), PMT-voltage: 552 V, Kantenlänge: $238 \mu\text{m}$; (e) Emissionsdetektionsbereich: 510 nm bis 590 nm, Blendendurchmesser: $600 \mu\text{m}$ (4,48 Airy), PMT-voltage: 551 V, Kantenlänge: $78 \mu\text{m}$; ZK=Zellkern, CP=Zytoplasma, ZW=Zellwand, 1=nicht fluoreszierender Zwischenraum im Bereich der Zellwand, 2=amorphe, fluoreszierende Strukturen.

Das gleiche Fluoreszenzmuster wie zuvor beschrieben, war auch nach 96 h Inkubation der *Catharanthus roseus*-Zellen mit NiCl_2 zu beobachten: ein fluoreszierendes Zytoplasma, fluoreszierende amorphe Strukturen, die sich am Zellrand befanden, und ein fluoreszierender Zellkern (s. Abbildung 3.37(d)) mit einem stärker fluoreszierenden, punktförmigen Bereich (s. Abbildung 3.37(d)), der sich deutlich von den umgebenden Strukturen in seiner Intensität unterschied. Eine Veränderung in der Fluoreszenzintensität oder der Lokalisation des Sensors Newport Green DCF und damit von Ni(II) war nicht zu beobachten.

Die Abbildung 3.37(e) zeigte Pflanzenzellen von *Catharanthus roseus*, die 120 h mit NiCl_2 inkubiert wurden. Die zwei Zellen, die nebeneinander lagen, ließen wie zuvor jeweils deutlich den Zellkern mit einem Bereich erhöhter Fluoreszenz erkennen, sowie Bereiche in den Pflanzenzellen, die eine etwas höhere Fluoreszenzintensität im Vergleich zum Zytosol und der Vakuole aufwiesen, aber keine klare Struktur ausbildeten. Auch am äußeren Rand dieser Zellen im Bereich der Zellwand konnte man erkennen, dass es einen nicht fluoreszierenden Streifen in den Zellen gab und die Zellwand starke Fluoreszenz aufwies (s. Markierung 1 in Abbildung 3.37(e)). Durch diese fluoreszierende Linie am Zellrand und ein homogen fluoreszierendes Zytosol entstand ein Bereich ohne Fluoreszenz.

3.2.2.2 Aufnahme von Nickel in Pflanzenzellen von *Catharanthus roseus* während NiSO_4 -Exposition

NiSO_4 war wie NiCl_2 eine wasserlösliche Nickelverbindung, in der Nickel zweiwertig vorliegt. Die Pflanzenzellen wurden mit $100 \mu\text{M}$ NiSO_4 in LS-Medium für 24 h bis 120 h inkubiert, um die Aufnahme und Lokalisation von Nickel in den Pflanzenzellen in 24 h-Intervallen zu beobachten. Die erste Probe der Zellkultur wurde nach 24 h entnommen, mit Newport Green DCF inkubiert und mit dem CLSM untersucht (s. Abbildung 3.38(a)). In den CLSM-Aufnahmen war deutlich Fluoreszenz in den Zellen zu detektieren, was auf eine Aufnahme des Nickels in die Zellen und die Detektion mit dem Farbstoff Newport Green DCF hinwies. Am Zellrand häuften sich wie zuvor bei den NiCl_2 -behandelten Zellen fluoreszierende, amorphe Strukturen an (s. Markierung 1 in Abbildung 3.38(a)). Sehr deutlich war auch der fluoreszierende Zellkern mit einem punktförmigen Bereich stärkerer Fluoreszenzintensität zu erkennen (s. Markierung ZK in Abbildung 3.38(a)). Am Rand der linken Zelle in Abbildung 3.38(a) war ein nicht fluoreszierender Raum zwischen dem fluoreszierenden Zytosol und dem fluoreszierenden Zellrand sichtbar (s. Markierung 2 in Abbildung 3.38(a)), der kein Ni(II) enthielt.

Nach 48 h Inkubationszeit war ebenfalls Fluoreszenz in ähnlichen Zellbereichen zu beobachten, wie in den Zellen mit $100 \mu\text{M}$ NiSO_4 nach 24 h Inkubation. Der Zellkern fluoreszierte stark, am Zellrand waren kleinere, amorphe, fluoreszierende Strukturen lokalisiert und das Zytosol

bzw. die Vakuolen enthielten den Farbstoff Newport Green DCF, dessen Fluoreszenzintensität durch die Anwesenheit von Ni(II) verstärkt wurde (s. Abbildung 3.38(b)). Einige Zellen zeigten minimale Fluoreszenz im Zytoplasma, jedoch stärkere Fluoreszenz im Bereich der Zellwand (s. Markierung ZW in Abbildung 3.38(b)). Eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenzintensität in den Zellen allgemein war optisch nicht zu verzeichnen.

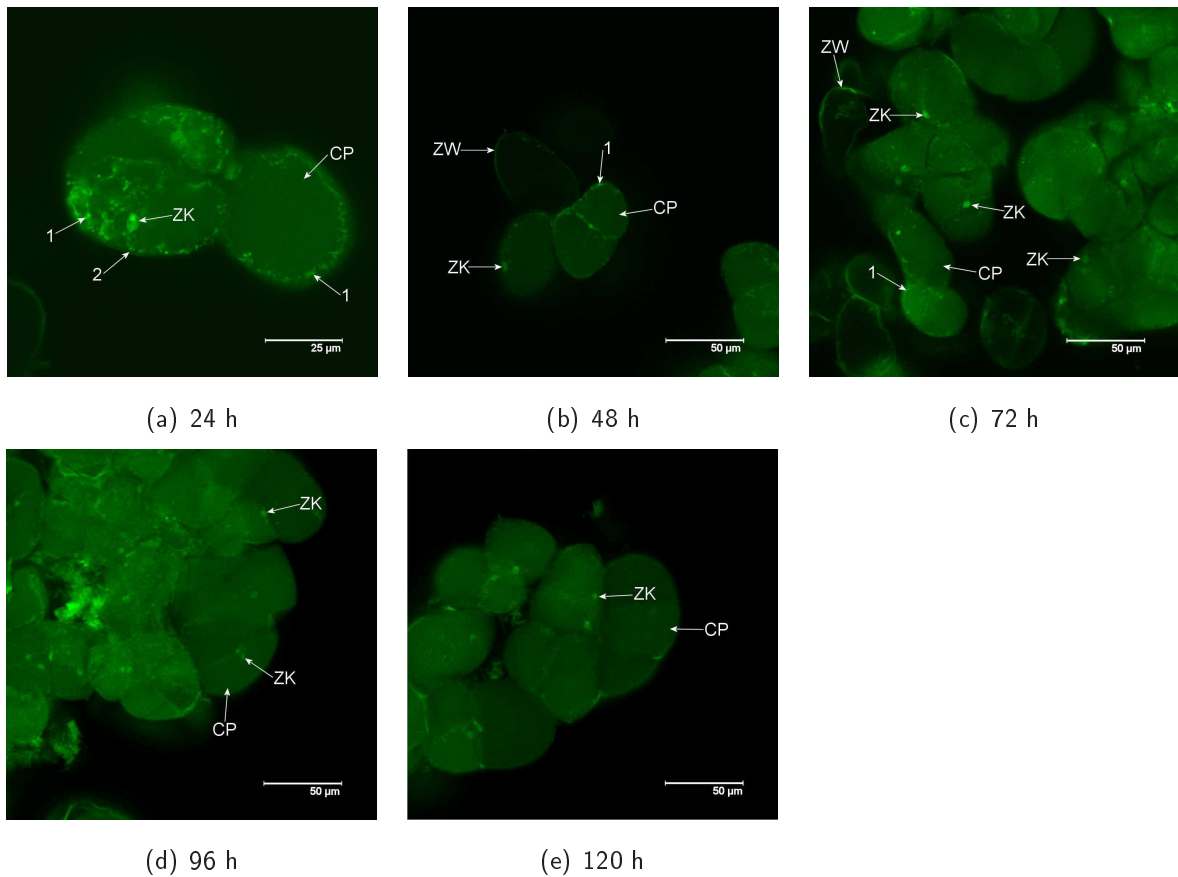


Abbildung 3.38: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Catharanthus roseus*-Zellen nach Inkubation mit 100 μM NiSO_4 . Markierung von Ni(II) mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Newport Green DCF. Detektion mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX PL APO 63x/1,2 W CORR CS, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser. (a) Emissionsdetektionsbereich: 509 nm bis 543 nm, Blendendurchmesser: 300 μM (2,24 Airy), PMT-voltage: 601 V, Kantenlänge: 238 μm ; (b) Emissionsdetektionsbereich: 509 nm bis 549 nm, Blendendurchmesser: 300 μM (2,24 Airy), PMT-voltage: 553 V, Kantenlänge: 238 μm ; (c) Emissionsdetektionsbereich: 509 nm bis 552 nm, Blendendurchmesser: 300 μM (2,24 Airy), PMT-voltage: 601 V, Kantenlänge: 238 μm ; (d) Emissionsdetektionsbereich: 509 nm bis 550 nm, Blendendurchmesser: 300 μM (2,24 Airy), PMT-voltage: 600 V, Kantenlänge: 238 μm ; (e) Emissionsdetektionsbereich: 509 nm bis 562 nm, Blendendurchmesser: 300 μM (2,24 Airy), PMT-voltage: 603 V, Kantenlänge: 238 μm . ZK=Zellkern, CP=Zytoplasma, ZW=Zellwand, 1=amorphe, fluoreszierende Strukturen, 2=nicht fluoreszierender Zwischenraum im Bereich der Zellwand.

Nach 72 h Inkubation mit $100 \mu\text{M NiSO}_4$ (s. Abbildung 3.38(c)) zeigte sich in den *Catharanthus roseus*-Zellen eine etwas höhere Fluoreszenzintensität als zuvor in Zellen nach 24 h bzw. 48 h Inkubation. Die Zellkerne waren nahezu in allen Zellen durch stärkere Fluoreszenz im Vergleich zur homogenen Fluoreszenz im umgebenden Zytoplasma erkennbar (s. Markierung ZK in Abbildung 3.38(c)). Durchtrennt wurde die homogene Fluoreszenz von am Zellrand befindlichen amorphen, fluoreszierenden Strukturen, die bereits erwähnt wurden. In wenigen Zellen konnte keine Fluoreszenz im Zytoplasma detektiert werden, wohl aber im Bereich der Zellwand.

Nach 96 h (s. Abbildung 3.38(d)) und 120 h (s. Abbildung 3.38(e)) NiSO_4 -Exposition war der überwiegende Teil der Zellen homogen mit Fluoreszenz erfüllt. An den fluoreszierenden Strukturen hatte sich im Vergleich zu kürzeren Inkubationszeiten mit $100 \mu\text{M NiSO}_4$ nichts geändert. Der Zellkern war der am stärksten fluoreszierende Bereich in den Zellen und teilweise konnten am Zellrand amorphe, fluoreszierende Strukturen beobachtet werden.

3.2.2.3 Aufnahme von Nickel in Pflanzenzellen von *Catharanthus roseus* während Ni_3S_2 -Exposition

Als Vergleich zu der Aufnahme wasserlöslicher Nickelverbindungen in Pflanzenzellen wurde die Nickelaufnahme einer wasserunlöslichen Nickelverbindung am Beispiel von Ni_3S_2 getestet. Die Inkubationsbedingungen und die Ni(II)-Markierung mit Newport Green DCF erfolgten nach den gleichen Methoden wie bei den wasserlöslichen Nickelverbindungen. In Abbildung 3.39(a) sind die CLSM-Aufnahmen der Zellen dargestellt, die 24 h mit Ni_3S_2 inkubiert wurden. Nach dieser Zeit wurde in den kompletten Zellen Fluoreszenz detektiert, doch die Fluoreszenzintensität war etwas schwächer als bei den zuvor gezeigten Zellen nach der Inkubation mit den wasserlöslichen Nickelverbindungen NiCl_2 und NiSO_4 (s. Abbildung 3.37 und 3.38). Diffus erkannte man stärker fluoreszierende Strukturen am Zellrand bzw. in Zellkernnähe (s. Markierung 1 in Abbildung 3.39(a)), der selbst lediglich schwach und nur in wenigen Zellen durch sein Fluoreszenz erkennbar war.

Längere Inkubationszeiten der Pflanzenzellen mit $100 \mu\text{M Ni}_3\text{S}_2$ von 48 h bis 120 h (s. Abbildung 3.39(b) bis 3.39(e)) zeigten nur leichte Erhöhungen der Fluoreszenzintensitäten von Newport Green DCF und damit nur eine geringe Erhöhung der Nickelkonzentration in den Pflanzenzellen. Alle Zellen zeigten homogene, wenn auch schwache Fluoreszenz im Zytoplasma. Teilweise konnte man die etwas stärker fluoreszierenden, amorphen Strukturen (s. Markierung 1 in Abbildung 3.39(b)) sowie fluoreszierende Zellkerne (s. Markierung ZK in Abbildung 3.39(d)) in der Zelle beobachten. In einem Teil der Zellen waren nach 72 h Ni_3S_2 -Inkubation fluoreszierende Zellwände wie bei den wasserlöslichen Nickelverbindungen zu erkennen, die einen nicht fluoreszierenden Bereich außerhalb des fluoreszierenden Zytoplasmas begrenzten (s. Abbildung 3.39(c)).

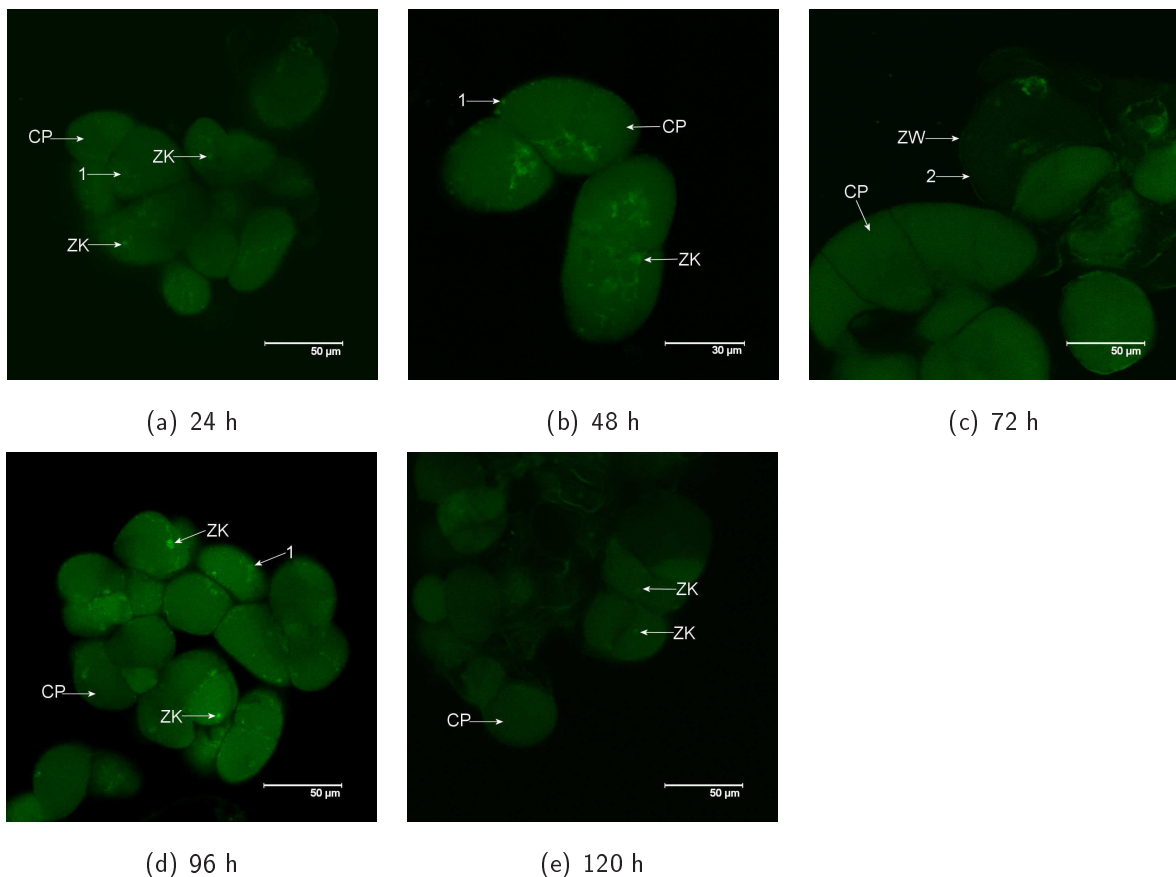


Abbildung 3.39: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Catharanthus roseus*-Zellen nach Inkubation mit $100 \mu\text{M Ni}_3\text{S}_2$. Markierung von Ni(II) mit $1 \mu\text{g/ml}$ Newport Green DCF. Detektion mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX PL APO 63x/1,2 W CORR CS, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser. (a) Emissionsdetectionsbereich: 509 nm bis 543 nm, Blendendurchmesser: $300 \mu\text{M}$ (2,24 Airy), PMT-voltage: 601 V, Kantenlänge: $238 \mu\text{m}$; (b) Emissionsdetectionsbereich: 509 nm bis 549 nm, Blendendurchmesser: $300 \mu\text{M}$ (2,24 Airy), PMT-voltage: 603 V, Kantenlänge: $141 \mu\text{m}$; (c) Emissionsdetectionsbereich: 510 nm bis 561 nm, Blendendurchmesser: $300 \mu\text{M}$ (2,24 Airy), PMT-voltage: 680 V, Kantenlänge: $238 \mu\text{m}$; (d) Emissionsdetectionsbereich: 509 nm bis 550 nm, Blendendurchmesser: $300 \mu\text{M}$ (2,24 Airy), PMT-voltage: 604 V, Kantenlänge: $238 \mu\text{m}$; (e) Emissionsdetectionsbereich: 509 nm bis 562 nm, Blendendurchmesser: $300 \mu\text{M}$ (2,24 Airy), PMT-voltage: 601 V, Kantenlänge: $238 \mu\text{m}$. ZK=Zellkern, CP=Zytoplasma, ZW=Zellwand, 1=amorphe, fluoreszierende Strukturen, 2=nicht fluoreszierender Zwischenraum im Bereich der Zellwand.

3.2.2.4 Aufnahme von Cobalt in Pflanzenzellen von *Catharanthus roseus* während CoCl_2 -Exposition

Eine vierte Verbindung, die den Pflanzenzellen zugegeben wurde, war CoCl_2 . CoCl_2 ist wie NiCl_2 eine wasserlösliche Verbindung, bei der die divalenten Kationen über Transporter in Zellen aufgenommen werden. Cobalt ist für Pflanzen ein essentielles Spurenelement, aber auch die Cobaltakkumulation in Zellen kann toxische Auswirkungen haben. Um die Aufnahme und Lokalisation des Cobalts in den Zellen zu beobachten, wurden die *Catharanthus roseus*-Zellen über

einen Zeitraum von 24 h bis 120 h mit 100 μM CoCl_2 inkubiert. In 24 h-Intervallen wurde wie zuvor bei Nickel ein Teil der Zellkultur entnommen, Cobalt mit Newport Green DCF markiert und die Lokalisation des Cobalts durch die Detektion des Newport Green DCF mittels CLSM bestimmt (s. Abschnitt 2.4.2).

In Abbildung 3.40(a) ist zu sehen, dass bereits nach 24 h Inkubation mit 100 μM CoCl_2 Fluoreszenz in den Zellen detektierbar war. Die Fluoreszenz war im Zellinneren weitestgehend homogen, wobei vereinzelt am Zellrand kleine amorphen Strukturen mit stärkerer Fluoreszenz erkennbar waren. In einigen Zellen war zudem der Zellkern (s. Markierungen ZK in Abbildung 3.40(a)) sowie die Zellwand fluoreszent (s. Markierungen ZW in Abbildung 3.40(a)). Die Intensität der Fluoreszenz war bereits nach 24 h etwas höher als in Zellen, die mit Nickelverbindungen inkubiert wurden.

Eine starke Fluoreszenz im Bereich der Zellwand war ebenfalls 48 h nach der CoCl_2 -Zugabe zu beobachten und schien noch stärker als bei den Zellen nach 24 h Inkubation zu sein (s. Markierung ZW in Abbildung 3.40(b)). Weniger stark, aber homogen fluoreszent war das Zytoplasma, wobei man kaum die fluoreszierenden amorphen Strukturen sowie fluoreszierende Zellkerne beobachten konnte.

Nach 72 h Inkubation der Pflanzenzellen mit 100 μM CoCl_2 (s. Abbildung 3.40(c)) sah man den linienförmig fluoreszierenden Bereich an der Zellwand nicht so stark ausgeprägt, dafür waren die Vakuolen im Zytosol deutlich durch ihre starke Fluoreszenz sichtbar (s. Markierung Va in Abbildung 3.40(c)). Durch das geringere Volumen der Vakuolen war das Zytosol mit seinen Bestandteilen nicht so weit an den Zellrand gedrängt, sodass kleine amorphe Strukturen, die eine hohe Fluoreszenzintensität besaßen, besser sichtbar wurden (s. Markierung in Abbildung 3.40(c)). In den anderen Zellen (s. Abbildung 3.40(a), 3.40(b), 3.40(d) und 3.40(e)) konnte man die Vakuolen nicht so detailliert beobachten, dafür aber die fluoreszierenden Zellkerne.

Eine Steigerung der Inkubationszeit auf 96 h und 120 h veränderte kaum die Fluoreszenzintensität der Zellen. Das Zytosol bzw. die Vakuolen zeigten wie zuvor bei 24 h bis 72 h eine homogene Fluoreszenz. An den Rand der Zelle gedrückt erkannte man durch Fluoreszenz die amorphen Strukturen (s. Markierung 1 in Abbildung 3.40(e)) und die Zellkerne (s. Markierung ZK in Abbildung 3.40(d)). In der Abbildung 3.40(d) deutlich sichtbar war zudem die Fluoreszenz der Zellwand und/oder Membran mit einem nicht fluoreszierenden Zwischenraum (s. Markierung 2 in Abbildung 3.40(d)).

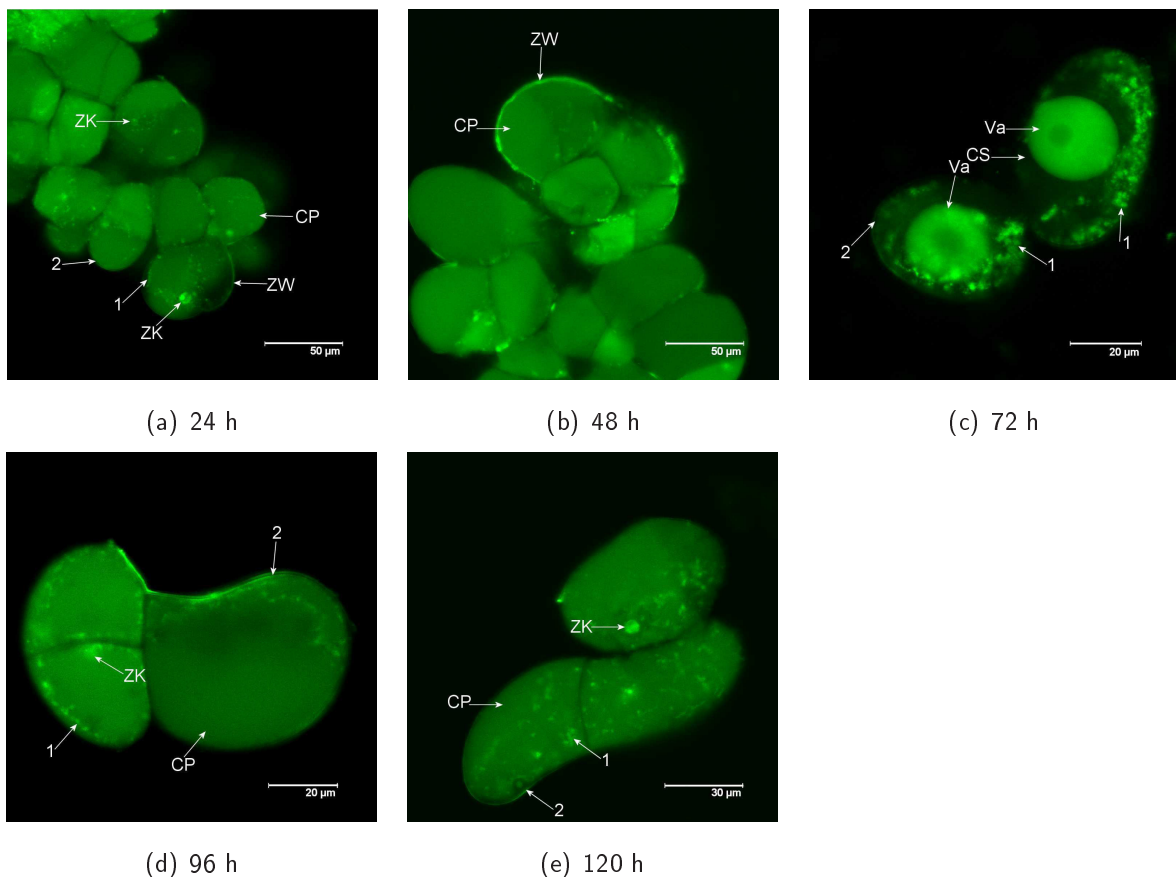


Abbildung 3.40: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Catharanthus roseus*-Zellen nach Inkubation mit 100 μM CoCl_2 . Markierung von Co(II) mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Newport Green DCF. Detektion mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX PL APO 63x/1,2 W CORR CS, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser. (a) Emissionsdetectionsbereich: 510 nm bis 590 nm, Blendendurchmesser: 600 μm (4,48 Airy), PMT-voltage: 555 V, Kantenlänge: 238 μm ; (b) Emissionsdetectionsbereich: 510 nm bis 590 nm, Blendendurchmesser: 600 μm (4,48 Airy), PMT-voltage: 552 V, Kantenlänge: 238 μm ; (c) Emissionsdetectionsbereich: 510 nm bis 590 nm, Blendendurchmesser: 600 μm (4,48 Airy), PMT-voltage: 551 V, Kantenlänge: 104 μm ; (d) Emissionsdetectionsbereich: 510 nm bis 590 nm, Blendendurchmesser: 600 μm (4,48 Airy), PMT-voltage: 553 V, Kantenlänge: 108 μm ; (e) Emissionsdetectionsbereich: 510 nm bis 590 nm, Blendendurchmesser: 600 μm (4,48 Airy), PMT-voltage: 550 V, Kantenlänge: 143 μm ; ZK=Zellkern, CP=Zytoplasma, CS=Zytosol, ZW=Zellwand, Va=Vakuole, 1=amorphe, fluoreszierende Strukturen, 2=nicht fluoreszierender Zwischenraum im Bereich der Zellwand.

Die Detektion des Fluoreszenzfarbstoffes Newport Green DCF in Pflanzenzellen zeigte, dass der Farbstoff in die Pflanzenzellen aufgenommen wurde und nach der Zugabe von Nickel- und Cobaltverbindungen in das LS-Medium in den Zellen in seiner Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den unbehandelten Zellen verstärkt wurde. Bereits nach 24 h Inkubation der Pflanzenzellen mit Nickel- und Cobaltverbindungen wurden die Kationen in die Zellen aufgenommen, die für die Verstärkung der Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF verantwortlich waren. Ni(II) und Co(II) wurden im Zytosol, der Vakuole, dem Zellkern und an amorphen Strukturen im Zytosol

nachgewiesen. Dabei konnte kein Unterschied in der Lokalisation der Kationen in den Zellen zwischen den Inkubationszeiten oder den verschiedenen Metallverbindungen festgestellt werden. Eine deutliche Steigerung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Inkubationszeit konnte ebenfalls nicht beobachtet werden.

3.2.2.5 Aufnahme von Nickel in Pflanzenzellen von *Catharanthus roseus* während kurzer Inkubationszeiten mit NiCl_2

Inkubationszeiten von 24 h bis 120 h der *Catharanthus roseus*-Zellen mit den Metallverbindungen und die anschließende Markierung von Ni(II) und Co(II) mit dem optischen Sensor Newport Green DCF resultierte in deutlicher Fluoreszenz in den Zellen, die eindeutig von der Fluoreszenz der unbehandelten Kontrollzellen nach Zugabe von Newport Green DCF unterschieden werden konnte. Die Verstärkung der Fluoreszenz des optischen Sensors ließ auf die Aufnahme von Ni(II) und Co(II) in die Zellen und deren intrazelluläre Kompartimente nach mindestens 24 h schließen.

Die Ni(II)- und Co(II)-Detektion nach kürzeren Inkubationszeiten von 1 h und 8 h wurde genutzt, um Hinweise zu bekommen, ob bereits nach dieser Zeit Nickel und Cobalt in Pflanzenzellen von *Catharanthus roseus* aufgenommen wurden. Weiterhin wurde die Detektion von Newport Green DCF und die zeitabhängige Änderung der Lokalisation der Metalle in der Zelle überprüft.

Die Experimente mit kurzer Inkubationszeit wurden lediglich mit NiCl_2 durchgeführt, da bei den zuvor beschriebenen Experimenten keine relevanten Unterschiede in der Lokalisation und Fluoreszenzintensität zwischen den Verbindungen zu beobachten waren und die Detektion von Ni(II) nach NiCl_2 -Zugabe erfolgreich war. Die Entnahme der Proben und die Markierung des Ni(II) in der Zelle durch Newport Green DCF erfolgte wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben. Auch die Detektion mit dem CLSM erfolgte unter identischen Bedingungen wie bei den Langzeitexperimenten. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Zellen nach 1 h und 8 h Inkubation mit $100 \mu\text{M}$ NiCl_2 sind in Abbildungen 3.41 gezeigt. Nach einstündiger Inkubation der Pflanzenzellen mit NiCl_2 und anschließender Markierung des Ni(II) mit Newport Green DCF war bereits Fluoreszenz in den Zellen zu beobachten (s. Abbildung 3.41(a)). Dabei war jedoch die Fluoreszenzintensität im Zytosol und in der Vakuole gering. Am Zellrand waren schon nach 1 h die amorphen Strukturen (s. Markierung 1 in Abbildung 3.41(a)) durch starke Fluoreszenz sichtbar und deutlich von der Fluoreszenz im Zellkern abgrenzbar (s. Markierung ZK in Abbildung 3.41(a)). Die Markierung 2 in dieser Abbildung weist auf einen Bereich der Zellwand hin, der stark fluoreszierte und zum Zellrand hin einen nicht fluoreszierenden Bereich abgrenzte. Nach innen wurde dieser Bereich durch das Zytosol mit den stark fluoreszierenden amorphen Strukturen abgegrenzt.

Nach achtstündiger Inkubation der *Catharanthus roseus*-Zellen mit $100 \mu\text{M NiCl}_2$ war die Fluoreszenzintensität im Zytosol und der Vakuole im Vergleich zur einstündigen Inkubation mit NiCl_2 in einigen Zellen etwas gestiegen (s. Abbildung 3.41(b)). Nach 8 h Inkubation schien sich die Fluoreszenz von den Randbereichen der Zelle mehr ins Zytosol bzw. die Vakuole auszuweiten, sodass die Fluoreszenzintensität dort höher war als nach 1 h Inkubation (s. Abbildung 3.41(b)). Die Fluoreszenzintensitäten waren nach 1 h und 8 h Inkubation mit NiCl_2 überwiegend geringer im Vergleich zu längeren Inkubationszeiten ab 24 h. Genauso deutlich wie nach 1 h Inkubation mit NiCl_2 waren auch in den Zellen nach 8 h Inkubation die fluoreszierenden, amorphen Strukturen am Zellrand zu erkennen (s. Markierung in Abbildung 3.41(a)), die zuvor bei den längeren Inkubationszeiten beschrieben wurden. Ebenfalls deutlich fluoreszierte der Zellkern, der auch in Zellen fluoreszierte, bei denen in den Vakuolen oder im Zytosol die Fluoreszenzintensität weniger stark war (s. Markierung in Abbildung 3.41(b)). Eine Nickelaufnahme und die Lokalisation von Ni(II) in den Zellen nach kurzen Inkubationszeiten von 1 h und 8 h konnte hiermit ebenfalls gezeigt werden.

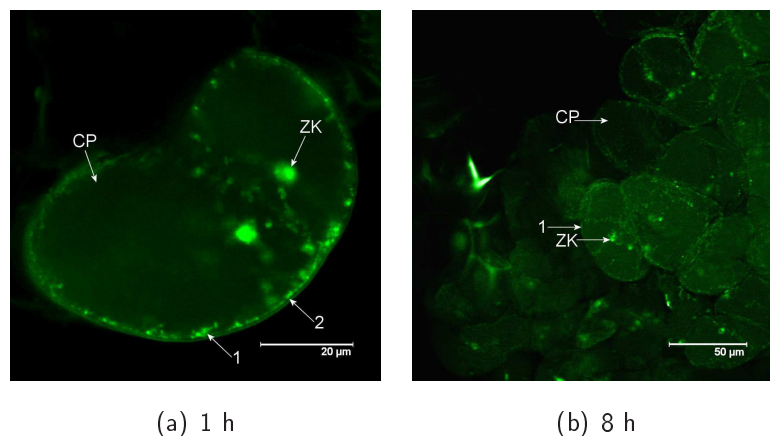


Abbildung 3.41: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Catharanthus roseus*-Zellen nach 1 h und 8 h Inkubation mit $100 \mu\text{M NiCl}_2$. Markierung von Ni(II) mit $1 \mu\text{g/ml}$ Newport Green DCF. Detektion mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX PL APO 63x/1,2 W CORR CS, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser. (a) Inkubationszeit: 1 h, Emissionsdetektionsbereich: 510 nm bis 561 nm, Blendendurchmesser: $300 \mu\text{M}$ (2,24 Airy), PMT-voltage: 603 V, Kantenlänge: $80 \mu\text{m}$; (b) Inkubationszeit: 8 h, Emissionsdetektionsbereich: 509 nm bis 543 nm, Blendendurchmesser: $300 \mu\text{M}$ (2,24 Airy), PMT-voltage: 601 V, Kantenlänge: $238 \mu\text{m}$. ZK=Zellkern, CP=Zytosol, 1=amorphe, fluoreszierende Strukturen, 2=nicht fluoreszierender Zwischenraum im Bereich der Zellwand.

3.2.3 Zuordnung der Nickel- und Cobaltlokalisierung durch Newport Green DCF zu ausgewählten Zellkompartimenten

Die Lokalisation von Ni(II) und Co(II) in Pflanzenzellen nach deren Inkubation mit verschiedenen Metallverbindungen konnte durch den optischen Sensor Newport Green DCF mit dem CLSM be-

stimmt werden. Eine Zuordnung der Fluoreszenz des Ni(II)- und Co(II)-komplexierenden Newport Green DCF zu Kompartimenten oder Arealen von Pflanzenzellen fand durch Fluoreszenzfarbstoffe für bestimmte Zellkompartimente statt. Durch die Vakuolen, die bis zu 80 % des Zellvolumens einnehmen konnten, war eine genaue Beobachtung der Kompartimente erschwert und weniger deutlich als bei den Fibroblasten. Die parallele Markierung von Ni(II) mit Newport Green DCF und von Nukleinsäuren mit SYTO 61 (s. Abbildung 3.42) unterstützten die Zuordnung zu den Zellkernen und Mitochondrien. Aufgrund der deutlich unterschiedlichen Anregungsmaxima von Newport Green DCF und SYTO 61 konnten die Farbstoffe parallel detektiert werden, ohne dass sich die Fluoreszenzen gegenseitig beeinflussten. Die fluoreszierenden amorphen Strukturen, die nach Newport Green DCF-Zugabe sichtbar wurden, konnten durch SYTO 61 u.a. den Mitochondrien zugeordnet werden. Unter Berücksichtigung von Transmissionsaufnahmen wurde das Bild der Pflanzenzelle vervollständigt, sodass durch die Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen mit den Transmissionsaufnahmen (s. Abbildung 3.42(c)) die Lokalisation von Newport Green DCF und damit Ni(II) und Co(II) bestätigt wurde.

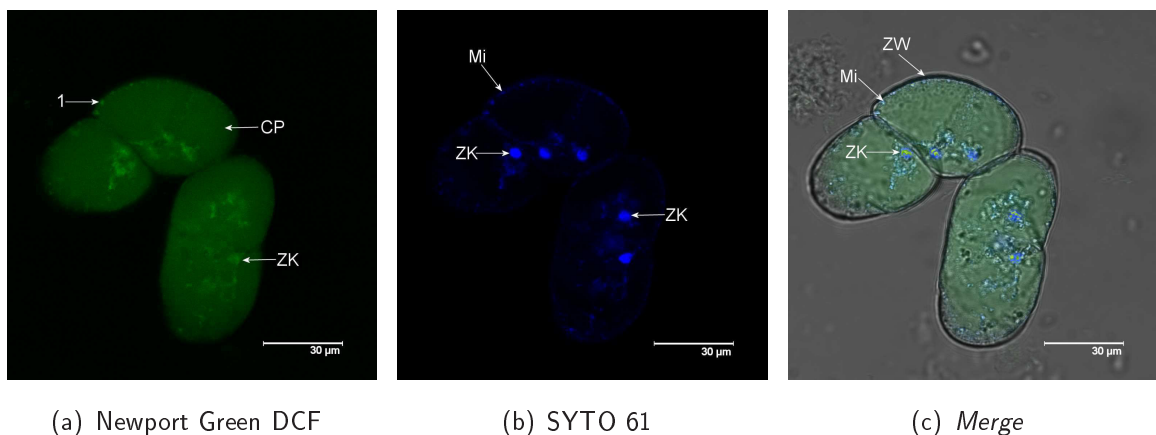


Abbildung 3.42: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Catharanthus roseus*-Zellen nach Inkubation mit dem Nukleinsäure-spezifischen Farbstoff SYTO 61.

Parallele Markierung von Ni(II) mit Newport Green DCF und Nukleinsäuren mit SYTO 61. Detektion mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX PL APO 63x/1,2 W CORR CS, Blendendurchmesser 300 μM (2,24 Airy), Kantenlänge 141 μm . (a) Detektion von Newport Green DCF nach Inkubation der Zellen mit 100 μM Ni_3S_2 (48 h) und anschließender Inkubation mit Newport Green DCF (60 min, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser, Emissionsdetektionsbereich: 509 nm bis 549 nm, PMT-voltage 603 V; (b) Detektion des Nukleinsäure-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes SYTO 61 (60 min, 10 μM), Anregungswellenlänge: 633 nm He/Ne-Laser, Emissionsdetektionsbereich: 659 nm bis 689 nm, PMT-voltage 599 V; (c) Merge der Abbildungen 3.42(a) und 3.42(b). ZK=Zellkern, CP=Zytosol, ZW=Zellwand, Mi=Mitochondrien, 1=amorphe, fluoreszierende Strukturen.

Die CLSM-Aufnahmen in Abbildung 3.42(a) und 3.42(b), sowie die Überlagerung der Aufnahmen der Newport Green DCF-Fluoreszenz und der SYTO 61-Fluoreszenz mit der Transmissionsaufnahme (s. Abbildung 3.42(c)) zeigten nicht, dass es in Nickel-behandelten Zellen Fluoreszenz in

der Zellwand gab, die auf eine Nickelakkumulation hindeutete. In zuvor gezeigten Zellen konnte jedoch Newport Green DCF in der Zellwand beobachtet werden. Ergänzend zur Nukleinsäuremarkierung mit SYTO 61 wurde der lipophile Farbstoff Vybrant Dil verwendet, um hauptsächlich Membranen in Zellen zu markieren. Durch diese Färbung wurde die Zytoplasmamembran und der Tonoplast sichtbar (s. Abbildung 3.43(b)) mit dazwischen liegenden Zellkernen, Mitochondrien und Chloroplasten. Dadurch zeigte sich, dass die Vakuolen nahezu das komplette Zellvolumen ausnutzten und somit ein Großteil des Nickels in den Vakuolen lokalisiert war. Durch die Anregung der Pflanzenzellen mit einem Argonlaser und die Detektion der Fluoreszenz in einem Bereich zwischen 650 nm und 700 nm wurden die Chloroplasten sichtbar (s. Abbildung 3.43(a)), die keine übereinstimmende Lokalisation mit Newport Green DCF aufwiesen und somit kein Ni(II) an Strukturen der Chloroplasten nachwiesen.

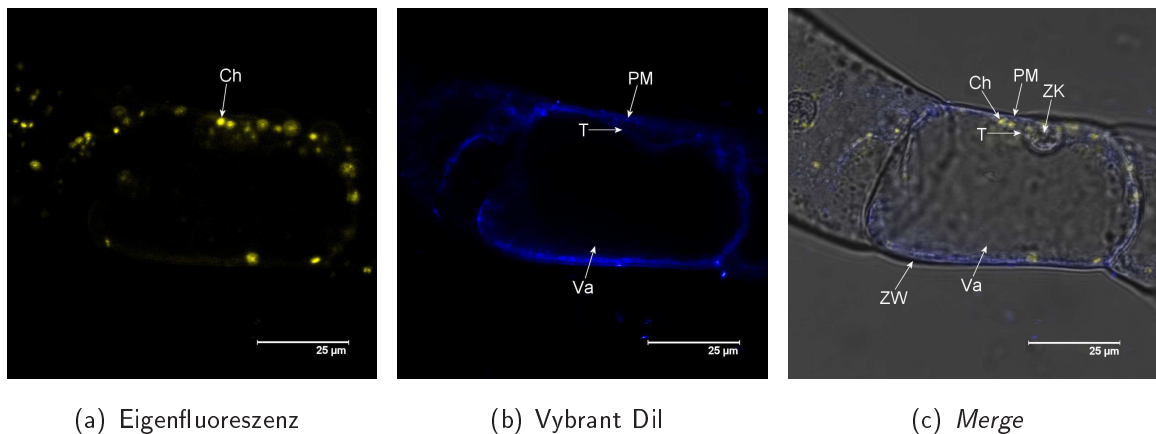


Abbildung 3.43: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Catharanthus roseus*-Zellen nach Inkubation mit Vybrant Dil. Parallele Detektion von Zellkompartimenten mit dem CLSM Leica TCS SP2, Objektiv HCX PL APO 63x/1,2 W CORR CS, Blendendurchmesser 300 μM (2,24 Airy), Kantenlänge 101 μm . (a) Detektion der Chloroplasten, Anregungswellenlänge: 488 nm Argonlaser und 543 nm He/Ne-Laser, Emissionsdetektionsbereich: 648 nm bis 702 nm, PMT-voltage 742 V; (b) Detektion des Fluoreszenzfarbstoffes Vybrant Dil (30 min, 10 μM , Anregungswellenlänge: 543 nm He/Ne-Laser, Emissionsdetektionsbereich: 557 nm bis 602 nm, PMT-voltage 665 V; (c) Merge der Abbildungen 3.43(a) und 3.43(b). ZK=Zellkern, ZW=Zellwand, Va=Vakuole, T=Tonoplast, Ch=Chloroplasten, Va=Vakuole, PM=Plasmamembran.

Kapitel 4

Diskussion

Im Rahmen des Graduiertenkollegs 826 „Spurenanalytik von Elementspezies: Methodenentwicklung und Anwendungen“ sollte eine Methode entwickelt werden, mit deren Hilfe Informationen über die Lokalisation und Speziation von Nickel und Cobalt in einzelnen lebenden Zellen mit hoher lateraler Auflösung gewonnen werden können. Als Modell für humane Zellen dienten humane Gingiva-Fibroblasten. *Catharanthus roseus*-Zellen wurden als Modell für Pflanzen eingesetzt. Die Zellen wurden mit vier Metallverbindungen (NiCl_2 , NiSO_4 , Ni_3S_2 und CoCl_2) unter verschiedenen Bedingungen inkubiert. Die Aufnahme und Lokalisation der Metalle wurde mit dem CLSM beobachtet. Eine detailliertere Beschreibung der Aufnahme und Lokalisation des Nickels als bei Costa *et al.* (2005) oder Ke *et al.* (2007), aber auch des Cobalts war dabei angestrebt. Costa und Kollegen beschrieben, dass nach 48 h bis 72 h der Großteil des Nickels in A549 Zellen nach der Inkubation mit NiS im Zellkern lokalisiert war. Dagegen wurde der Hauptanteil des Nickels nach NiCl_2 -Zugabe in diesem Zeitraum im Zytoplasma detektiert. Ke und Kollegen beschrieben ebenfalls die Lokalisation des Nickels lediglich im Zytoplasma und nach 48 h im Zellkern. Die A549 Zellen waren dabei höheren Nickelkonzentrationen von $>500 \mu\text{M NiCl}_2$ bzw. $>0,5 \mu\text{g/cm}^2 \text{Ni}_3\text{S}_2$ ausgesetzt, als in dieser Arbeit zur Detektion von Nickel in Fibroblasten verwendet wurden. Des Weiteren wurde die Möglichkeit untersucht, die Nickel- und Cobaltspezies und deren Konzentrationen in den einzelnen lebenden Zellen zu bestimmen. Nickel und Cobalt sind zum einen wichtig für den Stoffwechsel verschiedener Organismen, können jedoch bei erhöhter Exposition gesundheitsschädlich sein.

4.1 Auswahl der Methode zur optimalen Detektion von Nickel und Cobalt in einzelnen lebenden Zellen

Die Detektion von Nickel und Cobalt in einzelnen lebenden Zellen sollte mit Hilfe der für die Analytik unüblichen Methode, der konfokalen Lasermikroskopie, durchgeführt werden. Im Gegensatz zu den üblichen Methoden der chemischen Analytik wie der Massenspektrometrie, bei denen *bulk*-Material eingesetzt werden, konnten bei der CLSM einzelne lebende Zellen beobachtet werden und gleichzeitig wurde die Lokalisation der Metalle in der Zelle ermöglicht. Des Weiteren sollte mit der Detektion von Metallen in lebenden Zellen mit dem CLSM die Vergleichbarkeit mit lebenden Organismen wie dem Menschen oder Nutzpflanzen erhöht werden.

4.1.1 Sind Nickel und Cobalt in Zellen durch Eigenfluoreszenz der Metalle mit dem CLSM detektierbar?

Für den Nachweis der Elemente Nickel und Cobalt in den einzelnen lebenden Zellen wurden zwei Ansätze der optischen Detektion verfolgt. Der erste beruhte auf dem direkten Nachweis der Kationen oder ihrer Verbindungen durch deren Eigenfluoreszenz. Ausführlich wurde ein solcher Nachweis bereits für Cm(III) (Tits *et al.*, 2003) und U(VI) (Meinrath, 1997; Baumann *et al.*, 2005; Arnold *et al.*, 2006) in Lösung oder an Mineralen gebunden beschrieben, wobei jeweils zwei verschiedene Spezies anhand ihrer Fluoreszenzspektren unterschieden werden konnten. Bei beiden Elementen zeigten sich durch TRLFS (*time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy*) Fluoreszenzemission in einem Bereich zwischen 595 nm und 630 nm mit einem *Peak*-Maximum bei 620 nm für Cm(III) bzw. *Peak*-Maxima bei 470 nm und 635 nm für U(VI). Doch um diese Fluoreszenz zu aktivieren, waren Laser mit sehr hoher Energie (266 nm) und tiefe Temperaturen im Bereich von -263 °C nötig, die eine Anwendung bei lebenden Zellen unmöglich machten. Der Eintrag hoher Energien würde zudem die Eigenfluoreszenz der Zellen erheblich steigern, da aromatische Aminosäuren wie Histidin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin sowie andere aromatische Verbindungen in den Zellen zu Fluoreszenz angeregt würden, die eine Detektion möglicher schwacher Fluoreszenzen von Metallen erschweren würde. Um diese Effekte zu minimieren und die Zellen geringst möglich zu schädigen, wurde untersucht, ob die in dieser Arbeit eingesetzten Metallverbindungen eine Eigenfluoreszenz nach Anregung mit verschiedenen Lasern der Wellenlänge 633 nm, 654 nm und 488 nm aufweisen, die unter normalen Bedingungen eingesetzt werden können. Wie die Ergebnisse zeigten (s. Abbildung 3.1), war selbst bei dem stärksten der getesteten Laser, dem Argonlaser mit 488 nm, keine Eigenfluoreszenz von Nickel- und Cobalterbindungen unter den gegebenen Bedingungen detektierbar. Lediglich eine Reflektion des Laserlichts wurde detektiert, sodass die Eigenfluoreszenz der Schwermetalle zur Detektion in den Zellen nicht eingesetzt werden konnte.

4.1.2 Der optische Sensor Newport Green DCF für den Nachweis von Nickel und Cobalt

Da ein Nachweis der Metalle Nickel und Cobalt durch deren Eigenfluoreszenz nicht möglich war, musste eine Nachweismethode verwendet werden, die indirekt die Metalle in den lebenden Zellen durch Fluoreszenz detektieren konnte. Dazu eigneten sich optische Sensoren, die spezifisch diese Kationen komplexierten und dadurch in ihrer Fluoreszenz verstärkt wurden. *Quenching*-Farbstoffe, die durch die Bindung ihrer *target*-Ionen mit Fluoreszenzlöschung reagieren, waren für diese Anwendung ungeeignet, da diese meist physiologische, divalente Kationen spezifischer binden als Ni^{2+} oder Co^{2+} . So fiel die Wahl auf den optischen Sensor Newport Green DCF, der spezifisch Ni^{2+} und Co^{2+} bindet (Haugland, 2002). Eine Rezeptoreinheit bindet das *target*-Ion und gibt die Information an den Fluorophor weiter, der mit einer verstärkten Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit des komplexierten Ions reagiert. Ni^{2+} und Co^{2+} bewirken dabei die stärksten Fluoreszenzsteigerungen. Dieser optische Sensor Newport Green DCF wurde ebenfalls mit dem Argonlaser (488 nm) angeregt, da sein Anregungsmaximum bei 505 nm und sein Emissionsmaximum bei 535 nm liegt (Haugland, 2002). In der Literatur sind unterschiedliche Newport Green DCF-Konzentrationen und Inkubationszeiten mit dem optischen Sensor zur Markierung von Ni^{2+} beschrieben. Ingle *et al.* (2008) z.B. inkubierten isolierte Protoplasten von Pflanzenzellen 15 min nach der Zugabe von $300 \mu\text{M}$ NiSO_4 für 60 min bei RT mit $30 \mu\text{M}$ Newport Green DCF. Eine deutliche, homogene Fluoreszenz des Sensors durch die Bindung von Ni(II) war in den Vakuolen der Protoplasten zu beobachten. Ke *et al.* (2007) dagegen nutzten geringere Konzentrationen von $7 \mu\text{M}$ Newport Green DCF und inkubierten A549-Zellen für 30 min bei 37°C , um in den Adenokarzinomzellen aus humanem Lungen-Bronchialepithel Nickel zu detektieren. In den A549-Zellen wurde Nickel durch Newport Green DCF im Zytoplasma und im Zellkern nach Inkubation der Zellen mit $>500 \mu\text{M}$ des wasserlöslichen NiCl_2 bzw. $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ des wasserunlöslichen Ni_3S_2 detektiert (Ke *et al.*, 2007). Detailliertere Informationen, die über das Zytoplasma und den Zellkern hinaus gehen, wurden nicht beschrieben. Eine Konzentration des optischen Sensors Newport Green DCF von $7 \mu\text{M}$ reichte jedoch aus, um Ni(II) nach Inkubation der Zellen mit $>500 \mu\text{M}$ der Nickelverbindungen in Medium zu detektieren. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb ebenfalls $7 \mu\text{g}/\text{ml}$ Newport Green DCF für 60 min zur Detektion von Ni(II) und Co(II) eingesetzt. Gleichzeitig sollte die längere Inkubationszeit mit Newport Green DCF die Detektion geringerer Mengen Nickel ermöglichen, ohne die Hintergrundfluoreszenz der Zellen durch zu hohe Farbstoffkonzentrationen zu erhöhen.

Wie die Abbildungen 3.2 und 3.3 erkennen ließen, war die Hintergrundfluoreszenz der Kontrollzellen ohne Newport Green DCF und die der Kontrollzellen mit Newport Green DCF erst bei sehr hohen PMT-*voltages* von 650 V bis 750 V zu sehen und zugleich sehr diffus, sodass ein deutlicher Unterschied zwischen der Fluoreszenzintensität und des Fluoreszenzmusters von Kontrollzellen und Nickel- und Cobalt-behandelten Zellen zu sehen sein würde.

Um die Hintergrundfluoreszenz der unbehandelten Zellen und derer, die mit Newport Green DCF behandelt wurden, zu untersuchen, wurde zu den Zellen kein bzw. ausschließlich 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Newport Green DCF zugegeben und diese danach mit dem Argonlaser angeregt. Schon die CLSM-Aufnahmen zeigten, dass die Hintergrundfluoreszenz der unbehandelten Fibroblasten sehr schwach war und $\frac{1}{5}$ bis $\frac{1}{10}$ der später gemessenen relativen Fluoreszenzintensitäten nach Nickel- und Cobalt-Zugabe betrug, sodass bei Verstärkung der Fluoreszenzintensität durch Ni(II)- und Co(II)-Bindung ein deutlicher Unterschied der relativen Fluoreszenzintensität von Nickel- und Cobalt-behandelten Zellen zu Kontrollzellen bestand. Die Zugabe von Newport Green DCF zu den unbehandelten humanen Gingiva-Fibroblasten und *Catharanthus roseus*-Pflanzenzellen resultierte in geringer Erhöhung der relativen Fluoreszenzintensität. Zum einen besaß Newport Green DCF eine bestimmte Grundfluoreszenz und zum anderen hatte der Sensor natürlich vorkommende Ionen wie Zn^{2+} gebunden, die für eine geringe Verstärkung der Fluoreszenzintensität verantwortlich waren. Newport Green DCF war jedoch insensitive gegenüber millimolaren Konzentrationen von Mg^{2+} und Ca^{2+} (Dineley *et al.*, 2002). Ein λ -Scan von unbehandelten humanen Gingiva-Fibroblasten bestätigte zudem durch eine sehr geringe Fluoreszenzintensität des Spektrums und eine kaum zu bestimmende Form des Fluoreszenzspektrums, dass die Detektion von Ni(II) und Co(II) mit dem optischen Sensor Newport Green DCF nicht beeinflusst wurde. Ergänzend dazu zeigten die Fluoreszenzintensitäten von Newport Green DCF in BME-Medium bei einem λ -Scan nach Anregung mit dem Argonlaser, dass Newport Green DCF auch ohne die Bindung von Ionen nach Anregung mit dem Argonlaser eine gewisse Grundfluoreszenz besaß. Durch die Hydrolyse der Esterbindung des Newport Green DCF-Moleküls in den Zellen war die Rezeptoreinheit in der Lage, *target*-Ionen zu binden. Außerhalb von Zellen in BME-Medium fand die Hydrolyse nicht statt. Diese anschließende Bindung der *target*-Kationen in den Zellen steigerte die Intensität in Abhängigkeit der *target*-Ionen und deren Konzentration, wobei in BME-Medium mit Newport Green DCF die relative Fluoreszenzintensität selbst nach der Zugabe von Metallverbindungen in das Medium minimal war. V.a. Ni(II) und Co(II) steigerten die Fluoreszenzintensität des optischen Sensors Newport Green DCF (Haugland, 2002) in den Zellen, wodurch dieser optische Sensor für den Nachweis von Ni(II) und Co(II) in einzelnen lebenden Zellen in dieser Arbeit eingesetzt wurde.

Die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Spannung am Detektor, der PMT-*voltage*, wurde ebenfalls untersucht. Ein linearer Bereich zwischen 550 V und 800 V, in dem die Erhöhung der Fluoreszenzintensität linear zur Spannungserhöhung am Detektor war, wurde bestimmt, sodass Intensitätswerte, die in diesem Spannungsbereich aufgenommen wurden, optimal verglichen werden konnten (s. Abbildung 3.4). Bei starken Fluoreszenzintensitäten durch hohe intrazelluläre Kationenkonzentrationen waren geringere PMT-*voltages*, die außerhalb dieses linearen Bereiches lagen, zur Signaldetektion ausreichend, sodass die daraus resultierenden Fluoreszenzwerte etwas höher waren als berechnet.

4.1.3 Auswirkung der Kationenkonzentration in humanen Gingiva-Fibroblasten auf die Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF

Die Voraussetzung dafür, dass Nickel und Cobalt in Zellen mit Newport Green DCF nachgewiesen werden konnten, war die Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffes in die Zellen. Bei der membranpermeablen Diacetatesterform des Newport Green DCF-Moleküls war dies durch den ungeladenen Charakter gegeben. Die negativ geladene Di-Kaliumsalz-Form des Newport Green DCF-Moleküls konnte die Membran nicht passieren und so erleichterte NP-40 die Aufnahme. Innerhalb der Zellen wurden die Esterbindungen des Newport Green DCF-Moleküls durch unspezifische Esterasen in den Zellen hydrolysiert. Dadurch erhielt das Molekül eine negative Ladung, wodurch es die Membranen nicht mehr passieren konnte und schließlich in der Lage war, die *target*-Ionen Ni^{2+} und Co^{2+} zu binden. Newport Green DCF konnte jedoch nur zweiwertige Kationen binden. Der optische Sensor Newport Green DCF wies eine Grundfluoreszenz ohne die Bindung von *target*-Ionen auf. Durch die Bindung dieser *target*-Ionen wurde die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit des Kations und der Kationenkonzentration verstärkt. Wäre die Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF in Metall-behandelten Zellen kaum von der Grundfluoreszenz von Newport Green DCF in Kontrollzellen zu unterscheiden, ist anzunehmen, dass die Kationenkonzentration und damit die Verstärkung der Fluoreszenzintensität des Sensors zu gering war oder die Ionen in einer nicht bindungsfähigen Form oder Oxidationstufe vorlagen. Unter diesen Umständen würde die Nachweismethode für Ni(II) und Co(II) mit dem CLSM und Farbstoffen unbrauchbar. Angaben von Molecular Probes invitrogen (Haugland, 2002) zufolge resultiert die Zugabe von 100 μM der *target*-Ionen Ni^{2+} und Co^{2+} zu Newport Green DCF in 11- bis 13-facher Fluoreszenzintensität, normalisiert auf die Ausgangsintensität. Andere Kationen wie Zn^{2+} , Cd^{2+} und Hg^{2+} zeigten deutlich schwächere Fluoreszenzerhöhungen bzw. im Fall von Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} und Cu^{2+} kaum messbare Effekte auf die Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF (Haugland, 2002). Newport Green DCF war durch Diskriminierung von Ni^{2+} und Co^{2+} gegenüber anderen zweiwertigen Kationen bestens für die Detektion von Ni^{2+} und Co^{2+} in Zellen geeignet.

Eine Quantifizierung der Ni(II)- oder Co(II)-Konzentration in den Zellen anhand der Auswertung der Fluoreszenzintensitäten einer Zelle war nicht möglich. Die Zugabe einer Metallverbindung ins BME-Medium mit einer Endkonzentration von 100 μM entsprach nicht gleichzeitig einer intrazellulären Konzentration von 100 μM . Des Weiteren war die Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF sowohl von der Ionenkonzentration, die optisch nicht messbar war, als auch von der Farbstoffkonzentration (Ingle *et al.*, 2008) und Enzymaktivität in der Zelle abhängig. Zudem war die Fluoreszenz innerhalb einer Zelle sehr inhomogen und jede Zelle verschieden, was eine genaue Aussage über die Fluoreszenzintensität in einer Zelle erschwerte. Lediglich punktuell könnten Intensitätswerte zur Konzentrationseinschätzung von Ni(II) und Co(II) genutzt werden, falls Ni^{2+} - und Co^{2+} -Konzentrationen bei einer konstanten Newport Green DCF-Konzentration und Fluoreszenzintensität bekannt wären.

4.2 Nachweis von Nickel und Cobalt in humanen Gingiva-Fibroblasten

Nickel und Cobalt treten zumeist in der divalenten Form in chemischen Verbindungen auf. Menschen sind durch unterschiedliche Einflüsse sowohl wasserlöslichen, als auch wasserunlöslichen Verbindungen dieser Metalle ausgesetzt. Ob Nickel und Cobalt mit dem optischen Sensor Newport Green DCF in den humanen Gingiva-Fibroblasten nachgewiesen werden konnte und wie sich die verschiedenen Metallverbindungen auf die intrazelluläre Konzentration der Metalle, deren Lokalisation und Spezies auswirkten, wurde in den folgenden Abschnitten diskutiert.

4.2.1 Einfluss unterschiedlicher Metallkonzentrationen und Inkubationszeiten auf deren Aufnahme in humane Gingiva-Fibroblasten und die Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF

Wasserlösliche Nickelverbindungen NiCl_2 und NiSO_4 :

Sen und Costa (1985) beschäftigten sich mit Chromosomenschäden in CHO-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubation mit verschiedenen Nickelverbindungen. Sie setzten dem Kulturmedium für 2 h und 6 h maximal 1000 μM der wasserlöslichen Nickelverbindung NiCl_2 zu und beobachteten die Chromosomenschäden, wie Brüche oder Schwesterchromatidaustausche, im Vergleich zu denen nach der Zugabe von 5 $\mu\text{g/ml}$ bis 20 $\mu\text{g/ml}$ der wasserunlöslichen Nickelverbindung NiS für 6 h bis 48 h. Sie beschrieben, dass Ni^{2+} -Ionen aus wasserlöslichen Verbindungen minimal und sehr langsam in humane Zellen bzw. Säugerzellen aufgenommen wurden (Sen und Costa, 1985), wenn dem Kulturmedium Nickel-bindende Aminosäuren wie Cystein oder Histidin

zugesetzt wurden. Weitere Experimente von Chen *et al.* (2005), Costa *et al.* (1981a, 2005) und Ke *et al.* (2006) zeigten, dass Ni²⁺-Ionen aus wasserlöslichen Verbindungen durchaus in Zellen aufgenommen wurden, wenn die Expositionszeit lang und die Konzentration hoch genug war. In den Experimenten von Costa *et al.* (2005) und Ke *et al.* (2006, 2007) wurden NiCl₂-Konzentrationen von 500 μM bzw. 1000 μM eingesetzt, nach deren Zugabe zu den Zellen Ni(II) mit einer Newport Green DCF-Konzentration von 7 μM markiert wurde. Ke *et al.* (2006, 2007) zeigten, dass sowohl bei der Inkubation von Zellen mit 500 μM, als auch mit 1000 μM NiCl₂ erst nach 48 h Newport Green DCF und damit Nickel in den Zellkernen nachgewiesen werden konnte. Gleichzeitig enthielt in diesen Zellen das Zytoplasma Nickel, was durch homogene Fluoreszenz im Zytoplasma gezeigt wurde. Es zeigte sich folglich, dass durch hohe NiCl₂-Konzentrationen im Kulturmedium zwar primär zytotoxische Schäden auftraten, aber durchaus Ionen in geringeren Mengen im Zellkern akkumulierten. Dort richteten sie Chromosomenschäden in den Heterochromatinregionen am Centromer an (Sen und Costa, 1985). Nach 24 h konnten Ke *et al.* (2006, 2007) bereits eine diffuse Fluoreszenz im Zytoplasma beobachten.

In der vorliegenden Arbeit konnte bereits nach 16 h Inkubation mit 100 μM bis 300 μM wasserlöslicher Nickelverbindungen eine deutliche Fluoreszenz in den Zellen gezeigt werden, die durch die Bindung des optischen Sensors Newport Green DCF an Nickel bewirkt wurde. In den Zellen waren dabei nach 16 h mit 100 μM NiSO₄ etwas höhere Fluoreszenzintensitäten im Zytoplasma als in NiCl₂-behandelten Zellen messbar. Auch im Zellkern war vereinzelt nach 16 h mit 500 μM NiCl₂ oder NiSO₄ Newport Green DCF-Fluoreszenz nachweisbar. Sowohl die optische Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen, als auch die Messung der Fluoreszenzintensitäten ergab, dass Ni(II) in den Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der Konzentration der wasserlöslichen Nickelverbindung im BME-Medium akkumulierte. Je höher die Nickelkonzentration im BME-Medium war, desto höher war auch die Ni(II)-Konzentration und relative Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF in den Zellen. Vergleichbares war auch in den Zellkernen zu beobachten. Je höher die Konzentration der wasserlöslichen Nickelverbindungen im BME-Medium war, desto stärker war die Fluoreszenz im Zellkern. Gleichzeitig bedeutete dies, dass bereits bei geringeren Konzentrationen, die etwa $\frac{1}{10}$ der genannten Nickelkonzentration, die bei Experimenten von Ke und Kollegen (2007) eingesetzt wurden, betragen, eine Aufnahme von Nickel aus den wasserlöslichen Nickelverbindung NiCl₂ und NiSO₄ in die Zellen und Zellkerne erfolgte. Bedenkt man, dass Ni²⁺ durch Peptide, organische Säuren oder Aminosäuren wie Histidin oder Cystein im Zytosol gebunden wird (Costa und Heck, 1982; Sen und Costa, 1985) und dadurch der Transport freier Nickelionen in den Zellkern minimiert wird, schien Nickel aus wasserlöslichen Verbindungen in ausreichenden Mengen in die Zellen aufgenommen worden zu sein, sodass ein Teil der Ionen in den Zellkern transportiert werden konnte. Das N-Atom im Imidazolring des Histidins wurde in Proteinen, v.a. im humanen Serum Albumin, als Komplexbildner von Ni²⁺ bei physiologischem pH-Wert beschrieben, da unter diesen Bedingungen zwei

deprotonierte N-Atome vorliegen (Glennon und Sarkar, 1982). Beachtete man die Inkubation der Zellen mit Nickelverbindungen in BME-Medium, dem FCS zugesetzt wurde, konnte FCS eine Verringerung der freien Ni^{2+} -Konzentration und damit eine verringerte Aufnahme von Nickel aus wasserlöslichen Verbindungen in die Zellen bewirken. Trotzdem wurde bei den wasserlöslichen Nickelverbindungen eine stetige Aufnahme von Nickel in die Zellen und ein Transport innerhalb des Zytoplasmas aufgezeigt. Dies wurde dadurch bestätigt, dass Fluoreszenz in Zellen, und in einigen Zellen auch in den Zellkernen, bereits nach 16 h Inkubation mit $500 \mu\text{M}$ und in nahezu allen Zellen nach 24 h Inkubation mit $500 \mu\text{M}$ der wasserlöslichen Nickelverbindungen im Vergleich zu Ergebnissen von Costa *et al.* (2005) und Ke *et al.* (2006, 2007) detektiert wurde, die erst nach längeren Inkubationszeiten von 48 h und 72 h bzw. höheren Konzentrationen der wasserlöslichen und wasserunlöslichen Nickelverbindungen deutliche Fluoreszenz im Zytoplasma und Zellkern detektieren konnten.

Für die Aufnahme von Nickelionen aus wasserlöslichen Nickelverbindungen wie dem NiCl_2 oder NiSO_4 sind in unterschiedlichen Organismen Transporter wie der DMT1 verantwortlich, der von Gunshin *et al.* (1997) zunächst als Fe^{2+} -Transporter beschrieben wurde. Chen *et al.* (2005) und Davidson *et al.* (2005) konnten unter anderem anhand von Überexpressionsversuchen mit DMT1 in humanen Adenokarzinomzellen aus Bronchialepithel (A549) zeigen, dass dieser Transporter ebenfalls die Ni^{2+} - und Co^{2+} -Aufnahme übernimmt. Weitere Transporter wie der CDF sind an der Aufnahme von divalenten Kationen in Zellen beteiligt (s. Abschnitt 1.4.1). Diese Ionen konkurrieren durch ähnliche chemische Eigenschaften, wie Atomradius oder Atommasse, um Bindestellen an den Transportern in der Plasmamembran, die für das Gleichgewicht an Ionen in den Zellen verantwortlich sind. Liegen hohe Metallkonzentrationen vor, werden die eigentlichen Substrate der Transporter von den toxischen Ionen, in diesem Fall Ni^{2+} , aber auch Co^{2+} , verdrängt, sodass vorwiegend Ni^{2+} in die Zellen aufgenommen wird. Dadurch, dass NiCl_2 und NiSO_4 ähnlich wasserlöslich sind, wird infolge dessen Ni^{2+} über diese Transporter gleichermaßen aufgenommen. Ein signifikanter Unterschied in der Nickelkonzentration sowohl in Zellen, als auch in den Zellkernen konnte zwischen den Nickelverbindungen NiCl_2 und NiSO_4 nicht beobachtet werden.

Wasserunlösliche Nickelverbindung Ni_3S_2 :

Veröffentlichungen von Costa *et al.* (2005) und Ke *et al.* (2006, 2007) zeigten, dass der optische Sensor Newport Green DCF zur Detektion von Nickel nach Zugabe von $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Ni_3S_2 und $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Ni_3S_2 in Adenocarcinomzellen aus humanem Bronchialepithel (A549) verwendet werden konnte. Eine schnelle Nickelaufnahme in die Zellen und Zellkerne war innerhalb von 8 h bei $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Ni_3S_2 bzw. 24 h bei $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Ni_3S_2 aus den wasserunlöslichen Nickelpartikeln in Zellen möglich, nachgewiesen durch gesteigerte Fluoreszenz von Newport Green DCF im Zytosol

und dem Zellkern. In der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass auch bei geringeren Konzentrationen von etwa $\frac{1}{10}$ der Konzentration, die in Experimenten von Ke *et al.* (2007) eingesetzt wurden, nach 16 h bereits Nickel in den Zellen und in den Zellkernen detektiert werden konnte. Bereits nach Inkubationszeiten von 16 h mit geringen Konzentrationen an Ni_3S_2 ($300 \mu\text{M}$) waren höhere relative Fluoreszenzintensitäten und damit höhere Ni(II)-Konzentrationen als bei wasserlöslichen Nickelverbindungen messbar, die mit steigender Inkubationszeit und Konzentration immer weiter anstiegen. So schien auch die Akkumulation von Nickel in den Zellkernen nach Ni_3S_2 -Zugabe stetig anzusteigen und die Konzentration höher zu sein als in Zellen, die mit wasserlöslichen Nickelverbindungen inkubiert wurden. Da wasserunlösliche Nickelverbindungen nicht durch Kationentransporter in Fibroblasten gelangen, zeigte sich, dass bestimmte wasserunlösliche, kristalline Nickelpartikel wie NiS oder Ni_3S_2 konzentrationsabhängig durch Phagozytose in Zellen aufgenommen wurden (Costa und Mollenhauer, 1980b; Costa *et al.*, 1981b). Dafür verantwortlich war die negative Oberflächenladung von kristallinem Ni_3S_2 oder NiS (Heck und Costa, 1983; Costa *et al.*, 2005). In Zellen wurden diese Partikel in sauren Vakuolen, die sich meist in Zellkernnähe befinden, zu Ni^{2+} -Ionen gelöst (Costa und Mollenhauer, 1980b; Costa *et al.*, 1981a; Abbracchio *et al.*, 1982a; Abbracchio *et al.*, 1982b; Evans *et al.*, 1982), was ein rapides Ansteigen der Ni^{2+} -Konzentration innerhalb einer Zelle und v.a. im Zellkern zur Folge hatte. Durch die Nähe zur Heterochromatinregion hat Nickel bevorzugt an diese Region gebunden, die sich außen im Zellkern in Kernmembrannähe befindet. Das Lösen der Partikel in den Zellen dieser Arbeit schien zumeist schnell vonstatten zu gehen, da nach 16 h Inkubation mit Ni_3S_2 in den meisten Zellen keine größeren Ni_3S_2 -Partikel zu beobachten waren. Bestätigt wurde dieser Befund durch Ke *et al.* (2007), die ebenfalls nach 8 h keine Ni_3S_2 -Partikel beobachteten. In einigen Zellen waren jedoch deutlich Ni_3S_2 -Partikel im Zytoplasma erkennbar, die im Transmissionsmodus des CLSM als solche identifiziert wurden. Newport Green DCF als Ni(II)-Sensor konnte offensichtlich nicht mit dem Ni(II) in diesen Partikeln interagieren und diese dadurch nicht detektieren. Mit steigenden Inkubationszeiten wurden die Ni_3S_2 -Partikel durch den Abbau in dem sauren Milieu der Vakuolen kleiner und waren weniger häufig zu beobachten. Sobald die Partikel in den Vakuolen abgebaut wurden, hatte dies eine detektierbare, starke Fluoreszenz zur Folge.

Die Fluoreszenzintensität nach 16 h war hauptsächlich im Zellkern nach der Zugabe der wasserunlöslichen Nickelverbindung Ni_3S_2 höher als nach der Zugabe wasserlöslicher Nickelverbindungen. Dafür verantwortlich war vorwiegend die bereits erwähnte starke Erhöhung der Ni^{2+} -Konzentration in Zellen durch das Auflösen der Partikel in den Vakuolen, die in Zellkernnähe lokalisiert waren und damit einen schnellen Transport der Kationen in den Zellkern begünstigten (Evans *et al.*, 1982; Costa *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2005). Haber *et al.* (2000) beschrieben, dass es zu einer Verschmelzung der Vakuolenmembran mit der Kernmembran kommen kann, die diesen Anstieg der Nickelkonzentration im Zellkern verursacht. Dadurch, dass es quasi

einen direkten Transport des phagozytierten Nickels von den Vakuolen in den Zellkern geben konnte, konnten die Ionen im Zytosol nicht von zytosolischen Proteinen gebunden werden, die den Transport in den Zellkern verringern würden, was bei Ni^{2+} aus wasserlöslichen Verbindungen der Fall war (Costa und Heck, 1982). Gleichzeitig konnte damit auch die vergleichsweise niedrige Konzentration von Nickel im Zytoplasma erklärt werden. Im Zellkern stieg dafür mit steigenden Konzentrationen und Inkubationszeiten die Fluoreszenzintensität weiter an. Bei vollständiger Auflösung der Ni_3S_2 -Partikel erwartete man eine höhere Nickelkonzentration in den Zellen und Zellkernen, als es in den hier gezeigten Zellen der Fall war. Die Zellen enthielten teilweise immer noch kleine Ni_3S_2 -Partikel, die nicht mit dem optischen Sensor detektiert werden konnten. So zeigte sich erneut, dass die Nickelkonzentration im Zytoplasma von Zellen, die mit wasserlöslichen Nickelverbindungen inkubiert wurden, lediglich geringe Unterschiede zu Zellen nach Inkubation mit wasserunlöslichen Verbindungen aufwiesen, im Gegensatz dazu jedoch die Nickelkonzentration im Zellkern Ni_3S_2 -behandelter Zellen deutlich höher war.

Bei einigen Ni_3S_2 -behandelten Zellen wurden zusätzlich kleine fluoreszierende punktförmige Bereiche detektiert, die über die ganze Zelle verteilt waren, bei denen es sich aufgrund der Größe, Form und Lage wahrscheinlich nicht um Vesikel handelte (s. Abbildung 3.15(b)). Möglicherweise handelte es sich hier um die von Shirali *et al.* (1991) und Hildebrand *et al.* (1990) beschriebenen *minute particles*, die durch Newport Green DCF komplexiert werden und hauptsächlich an der Außenseite der Plasmamembran lokalisiert sind. Die *minute particles* entstehen nach der Aufnahme von Ni_3S_2 in die Zellen durch Phagozytose und den partiellen Abbau der Ni_3S_2 -Partikel. Sie binden vorzugsweise an Zellmembranen, zytoplasmatische Organellen wie das ER, Liposomen oder den Euchromatin-haltigen Teil des Zellkerns (Shirali *et al.*, 1991). EDS (*energy dispersive spectrometry*) Analysen von Shirali und Kollegen (1991) ließen eine Substitution von Schwefel durch Phosphor in diesen Partikeln erkennen, die möglicherweise ein Hinweis auf Nickel-Phosphat-Komplexe mit Phosphatgruppen von Membranen, liposomalen Phospholipiden und dem Euchromatin-haltigen Teil der DNA und RNA sind.

Wasserlösliche Cobaltverbindung CoCl_2 :

Cobalt als essentielles Metall wird aus der wasserlöslichen Verbindung CoCl_2 ebenfalls als divalentes Kation von den genannten Kationentransportern wie dem DMT1 oder einem Homolog sowie weiteren Kationentransportern in Zellen aufgenommen, wobei die Transportaffinität des DMT1 für Co^{2+} mit der für Ni^{2+} vergleichbar ist (Garrick *et al.*, 2006b). Die mikroskopischen Aufnahmen und die Vergleiche der Fluoreszenzintensitäten in kompletten Zellen und Zellkernen nach der Zugabe der getesteten Cobaltverbindung zeigten, dass die Newport Green DCF-Fluoreszenzintensität in Zellen nach CoCl_2 -Zugabe sehr gering war. So beobachtete man im Zytosol geringe Zunahmen der Newport Green DCF-Fluoreszenz im Vergleich zu den Kon-

trollen. Die verschiedenen Inkubationszeiten und Konzentrationen ließen kaum Steigerungen in der Fluoreszenzintensität erkennen. Lediglich in den Zellkernen, im Speziellen in den Nukleoli, war eine Verstärkung der Newport Green DCF-Fluoreszenzintensität detektierbar, die auf eine Akkumulation des Cobalts in den Nukleoli hindeutete. Durch die Variation der Nukleolienzahl innerhalb der Zellkerne der beobachteten Zellen variierten die Fluoreszenzintensitätswerte der Zellkerne stark. Obwohl die Fluoreszenzverstärkung von Newport Green DCF bei geringen Cobaltkonzentrationen schwach war und auch bei Konzentrationen von $100 \mu\text{M}$ nicht so stark war wie bei Nickel, war ein leichter Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF und damit eine Aufnahme von Cobalt in die Zellen und den Zellkern zu beobachten. Eine wesentliche Erhöhung der CoCl_2 -Konzentration im BME-Medium auf $1000 \mu\text{M}$ bzw. längere Inkubationszeiten über 48 h, die eventuell eine Erhöhung der intrazellulären Cobaltkonzentration bewirkt hätte, führten zu einem hohen Anteil apoptotischer und morphologisch veränderter Fibroblasten, die ähnlich zu Beschreibungen von Messer *et al.* (1999) irregulär geformte Zellkerne und verkürzte Zellfortsätze ausbildeten. Dieser Befund erlaubte keine weiteren Analysen, sodass die Inkubationszeit auf 48 h begrenzt war und eine maximale CoCl_2 -Konzentration von $500 \mu\text{M}$ im BME-Medium eingestellt werden konnte. Die Tatsache, dass die humanen Gingiva-Fibroblasten durch die Cobaltbelastung in Apoptose übergingen, war zudem ein weiteres Indiz dafür, dass tatsächlich Cobalt in die Zellen aufgenommen wurde.

Vergleich der Nickel- und Cobaltaufnahme in humane Gingiva-Fibroblasten in Abhängigkeit von der Spezies:

Verglich man die Verstärkung der Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Verbindungen miteinander, wurde die deutlich höhere Verstärkung der Fluoreszenzintensität durch Nickelverbindungen im Vergleich zu CoCl_2 deutlich. Bei kurzen Inkubationszeiten und geringen Metallkonzentrationen war der Unterschied zwischen den verschiedenen Nickelverbindungen in der relativen Fluoreszenzintensität nicht so stark, sodass die Fluoreszenzwerte hier meist ähnlich waren. Mit zunehmender Inkubationsdauer und Metallkonzentration im BME-Medium war die Fluoreszenzintensität nach Ni_3S_2 -Zugabe im Vergleich zu den löslichen Nickelverbindungen deutlich höher. Die Anstiege der relativen Fluoreszenzintensität waren zudem in den kompletten Zellen geringer als in den Zellkernen, sodass dem Weitertransport der Ionen in die Zellkerne eine große Bedeutung zukam. Verglich man die Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF nach CoCl_2 -Zugabe mit der nach Zugabe von Nickelverbindungen, war ein deutlicher Unterschied zu erkennen, da die relative Fluoreszenzintensität nach CoCl_2 -Zugabe nur gering erhöht wurde und mit steigender Inkubationszeit und Metallkonzentration kaum Unterschiede auftraten. Der Effekt, den Co(II) auf die Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF hatte, schien teilweise durch zu geringe Co(II) -Konzentrationen bei den intrazellulären Konzentrationen zu gering zu sein, um detektiert werden zu können und deutliche Änderungen der Fluoreszenzintensität zu bewirken.

Die Entwicklung der relativen Fluoreszenzintensitäten, und damit der Ni(II)- oder Co(II)-Konzentrationen, gab erste Hinweise auf die Aufnahmegeschwindigkeit bzw. Akkumulation der Ionen in den Zellen. Je größer der Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Metallkonzentration im BME-Medium oder der Inkubationszeit war, desto mehr Ni(II) oder Co(II) wurde aufgenommen und akkumuliert, bzw. desto schneller wurden die Kationen in die Zellen aufgenommen. Bei den Nickelverbindungen fiel die starke Steigerung von NiSO₄ und Ni₃S₂, v.a. im Zellkern, auf, was auf eine andauernde Aufnahme und Akkumulation von Ni²⁺-Ionen in den Zellen und v.a. den Zellkernen innerhalb des beobachteten Zeitraums von 48 h hinwies.

Bei wasserlöslichen Nickelverbindungen konnte die intrazelluläre Ni²⁺-Konzentration durch die Komplexierung an zytosolischen, organischen Säuren verringert werden. Dieser Effekt wurde bei Ni₃S₂-behandelten Zellen durch den direkten Transport in den Zellkern verringert. Die Steigerung der Fluoreszenzintensitäten bei Ni₃S₂-behandelten Zellen in den kompletten Zellen war nicht so deutlich wie bei NiSO₄. Diese Tatsache war wiederum darauf zurückzuführen, dass Ni²⁺ direkt aus den Vakuolen in den Zellkern transportiert wurde (Evans *et al.*, 1982; Haber *et al.*, 2000) und kaum im Zytoplasma frei vorlag, um gebunden zu werden. Bei wasserlöslichen Nickelverbindungen und CoCl₂ gelangten die Kationen zunächst in das Zytosol, wo sie von zytosolischen Proteinen oder Aminosäuren gebunden werden konnten, sodass sie im Zytosol nachweisbar waren, aber langsamer oder gar nicht in den Zellkern transportiert wurden. So zeigte sich, dass wasserunlösliche Nickelpartikel schnell in die Zellen aufgenommen wurden und bereits nach weniger als 16 h zum Großteil in den Zellen gelöst waren, was in einem hohen Ni²⁺-Level v.a. im Zellkern resultierte, wodurch sie eine starke Fluoreszenzverstärkung von Newport Green DCF bewirkten und mit dem CLSM detektiert werden konnten.

Berücksichtigte man nun die Angaben von Molecular Probes invitrogen (Haugland, 2002) bezüglich der Fluoreszenzverstärkung von Newport Green DCF in Abhängigkeit unterschiedlicher divalenter Kationen, so erkannte man, dass bei geringen Ni²⁺- oder Co²⁺-Konzentration im Bereich von 1 μM die Verstärkungswerte der Fluoreszenzintensität stark differierten und nicht gleichermaßen die Fluoreszenzintensität beeinflussten. Bei Ni²⁺ wurde eine 8-fache Verstärkung der Newport Green DCF-Fluoreszenz bei 1 μM erreicht und bei Co²⁺ nur eine 2-fache. Man konnte also anhand der gemessenen relativen Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zur Grundfluoreszenz annehmen, dass in etwa vergleichbare intrazelluläre Konzentrationen der Metallionen vorlagen, also eine ähnliche Aufnahme bestand. Genaue Konzentrationsangaben konnten hier nicht beziffert werden, da die Fluoreszenzintensitätsmessung durch inhomogene Fluoreszenz und metabolische Einflüsse in der Zelle ungenau sein konnten, bzw. Nickel und Cobalt zwar in die Zellen aufgenommen wurden, aber aufgrund ihrer Spezies nicht von Newport Green DCF detektiert werden konnten. Die Konzentration von zweiwertigem Nickel und Cobalt in den Zellen,

die detektiert werden konnte, schien durchschnittlich eher im Bereich von 1 μM , als im Bereich eines Vielfachen von 100 μM zu liegen. Dazu beschrieben Kasten *et al.* (1992), dass es in V79 Hamster-Zellen bei der Inkubation mit 400 μM CoCl_2 zu einer exponentiellen Aufnahme der Co^{2+} -Ionen kam, die durch eine mögliche Bindung an Metallothionein um bis zum 11-fachen der extrazellulären Konzentration akkumulierten. Solch hohe Konzentrationen schienen in den untersuchten humanen Gingiva-Fibroblasten nicht zu akkumulieren oder die Ionen lagen in einer Form vor, die Newport Green DCF nicht binden konnte.

Aufnahme von Nickel in humane Gingiva-Fibroblasten nach NiCl_2 -Zugabe bei sehr kurzen Inkubationszeiten:

NiCl_2 bewirkte, abgesehen von CoCl_2 , die geringste Fluoreszenzverstärkung von Newport Green DCF unter den getesteten Verbindungen und genannten Bedingungen in humanen Gingiva-Fibroblasten. So wurde die Ausgangskonzentration von NiCl_2 im BME-Medium weiter verringert, um Informationen über die Minimalkonzentration von NiCl_2 im BME-Medium zu bekommen, die eingesetzt werden konnte, um eine sichtbare Fluoreszenzverstärkung zu erzielen. Die Intensität der Newport Green DCF-Fluoreszenz in den Zellen war nach der Zugabe von 40 μM NiCl_2 geringer als nach der Zugabe von 100 μM oder höherer Konzentrationen. Bei kompletten Zellen ergaben sich Fluoreszenzwerte im Bereich der Intensitäten nach CoCl_2 -Zugabe, sodass optisch der Unterschied zu den Kontrollen gering war. Ein Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF war dennoch zwischen 16 h und 48 h Inkubation messbar, sodass gezeigt wurde, dass Nickel auch bei niedrigen Konzentrationen in die Zellen aufgenommen wurde. In den Zellkernen war, bis auf die Nukleoli, keine Fluoreszenz zu beobachten. Bei geringeren Konzentrationen wurde zu wenig Nickel in die Zellkerne aufgenommen, um es zu detektieren. Wurde Nickel aus wasserlöslichen Verbindungen über Kationentransporter in die Zellen aufgenommen, gelangte es zunächst ins Zytosol, in dem Proteine und Aminosäuren vorhanden waren, die das freie Nickel gebunden haben und damit den Weitertransport in den Zellkern verhindern oder verringerten. War die vorliegende Konzentration im BME-Medium gering, wurde ein Großteil der freien Nickelionen gebunden. Der Nachweis der komplexierten Ionen im Zytosol war dennoch möglich, da Newport Green DCF auch gebundenes Nickel detektieren kann (Thompson *et al.*, 2002).

Durch die Versuche wurde gezeigt, dass bei der Detektion von Ni(II) und Co(II) in humanen Gingiva-Fibroblasten durch den optischen Sensor Newport Green DCF eine Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Konzentration der Metallverbindung im BME-Medium und der Inkubationszeit bestand. Die Erhöhung der Fluoreszenzintensität durch Ni(II) war deutlich höher als durch Co(II) . Ein Nachweis von Ni(II) und Co(II) bei Ausgangskonzentration von 100 μM bis 500 μM in BME-Medium, also geringer als bei Ke *et al.* beschrieben (2007), war in humanen

Gingiva-Fibroblasten möglich. Bei sehr geringen NiCl_2 -Konzentrationen von $40 \mu\text{M}$ im BME-Medium war eine Unterscheidung zu den Kontrollzellen optisch erschwert. Damit wurde deutlich, dass bei extrazellulären Konzentrationen ab etwa $100 \mu\text{M}$ im BME-Medium für 24 h, bzw. $300 \mu\text{M}$ für 16 h, eine Detektion und Lokalisation von Ni(II) und Co(II) durch Newport Green DCF gewährleistet war. Die verschiedenen Spezies waren weiterhin innerhalb der Zellen mit Newport Green DCF nur bedingt zu unterscheiden. Ni_3S_2 -Partikel wurden scheinbar nicht von Newport Green DCF komplexiert. Erst nach der Lösung der Ni^{2+} -Ionen aus den Partikeln oder als *minute particles* war Newport Green DCF in der Lage, Ni(II) zu binden und dessen Lokalisation sichtbar zu machen. Die getesteten Nickelspezies waren somit optisch nicht zu unterscheiden, da die wasserlöslichen Verbindungen alle als Ionen in die Zelle gelangten und auch Partikel innerhalb einer Zelle gelöst wurden und diese dort den gleichen Bindungspartnern ausgesetzt waren.

4.2.2 Nickel- und Cobaltaufnahme in humane Gingiva-Fibroblasten in Abhängigkeit vom pH-Wert des Inkubationsmediums

Das BME-Medium, das für die Anzucht von humanen Gingiva-Fibroblasten genutzt wurde, hatte einen neutralen pH-Wert von 7,2. Wie Fibroblasten unter diesen Bedingungen die getesteten Metallverbindungen aufnahmen, wurde in Abschnitt 3.1.4 gezeigt. Eine Änderung des pH-Wertes im BME-Medium beeinflusste jedoch möglicherweise durch die Änderung der Löslichkeit der Metallverbindungen oder der Eigenschaften der Transporter die Aufnahme und Lokalisation der Metalle in Fibroblasten. Zudem könnte man dadurch Informationen über die Aufnahmewege von divalenten Metallionen in Zellen bekommen. Um Ni(II) und Co(II) in den Fibroblasten zu detektieren, wurde auch hier der Fluoreszenzfarbstoff Newport Green DCF genutzt. Vor der Zugabe des Newport Green DCF wurden die Zellen 24 h mit $500 \mu\text{M}$ der getesteten Metallverbindungen in BME-Medium mit drei unterschiedlichen pH-Werten im sauren, neutralen und basischen Bereich inkubiert und danach zur Detektion von Ni(II) und Co(II) für 60 min mit $7 \mu\text{g/ml}$ Newport Green DCF inkubiert.

Die Fibroblasten zeigten nach der Inkubation mit allen vier Metallverbindungen jeweils bei saurem pH-Wert von ca. 5 eine sehr geringe Newport Green DCF-Fluoreszenz im Zytosol und keine Fluoreszenz im Zellkern. Lediglich die Nukleoli fluoreszierten stark. Sobald sich der pH-Wert im BME-Medium ins neutrale und basische änderte, wurde dagegen deutliche Fluoreszenz im Zytosol und Zellkern Nickel-behandelter Fibroblasten sichtbar, was auf die Aufnahme und Akkumulation der Metalle in diesem Kompartiment hindeutete. Bei CoCl_2 blieb die Fluoreszenz im Zytosol erwartungsgemäß geringer als bei Nickelverbindungen und im Zellkern ebenfalls auf die Nukleoli beschränkt. Zwischen basischem und neutralem pH-Wert konnten keine Unterschiede in

der Newport Green DCF-Lokalisation oder Fluoreszenzintensität Nickel- und Cobalt-behandelter Zellen beobachtet werden. So war, wie zuvor in Abschnitt 4.2.1 beschrieben, Nickel mit steigender Konzentration der Nickelverbindungen im BME-Medium und steigender Inkubationszeit nicht nur im Zytoplasma, sondern auch im Zellkern nachzuweisen. Bei Cobalt-behandelten Zellen war dies lediglich auf das Zytoplasma und die Nukleoli beschränkt, aber bei basischem und neutralem Milieu ebenfalls stärker als bei saurem pH-Wert.

Nickel und Cobalt werden aus wasserlöslichen Metallverbindungen üblicherweise über Transporter oder über Diffusion in Zellen aufgenommen. Im Falle des Ni^{2+} - und Co^{2+} -Transports in eukaryontische Zellen wurden mehrere Transporter wie der Protonen-abhängige Symporter DMT1 und seine Homologe (z.B. Nramp2) (Chen *et al.*, 1999) und andere Transporter für divalente Kationen wie der CDF oder ZIP-Transporter genannt, die ursprünglich als z.B. Mg^{2+} - oder Fe^{2+} -Transporter beschrieben wurden (Gruenheid *et al.*, 1995; Gunshin *et al.*, 1997; Agranoff *et al.*, 1999; Makui *et al.*, 2000; Portnoy *et al.*, 2000; Forbes und Gros, 2001; Goswami *et al.*, 2001; Garrick *et al.*, 2003; Garrick *et al.*, 2006a; Garrick *et al.*, 2006b). Da Nickel für den Menschen nicht essentiell ist, werden hierfür keine Transporter exprimiert, sodass die Nickelaufnahme über die genannten alternativen Transporter geschieht. Berücksichtigt man die Tatsache, dass Ni_3S_2 -Partikel in sauren Vakuolen gelöst werden, wurde Ni_3S_2 in saurem BME-Medium folglich ebenso gelöst. Nickel wurde somit als Ni^{2+} aufgenommen, was eine geringere intrazelluläre Nickelkonzentration zur Folge hatte, wie bereits gezeigt werden konnte (s. Abschnitt 4.2.1). Bei neutralem und basischem pH-Wert im Medium wurden die Ni_3S_2 -Partikel zuerst durch Phagozytose in die Zellen aufgenommen und dann in den sauren Vakuolen zu Ni^{2+} gelöst.

In nahezu allen Kationen-Transportproteinen wie CorA, DMT1, CDF und ZIP, die sowohl H^+ -abhängig als auch H^+ -unabhängig transportieren, wurden extraplasmatische Metallbindemotive ähnlich HXHXH festgestellt, die oft konservierte, negativ geladene, basische Aminosäuren wie Arginin, Lysin und Histidin besitzen (Eng *et al.*, 1998). Bei basischen und neutralen pH-Werten ist Histidin ein idealer Chelator für Ni^{2+} . In saurem Milieu liegen diese Aminosäuren als Kation vor und können die divalenten Kationen nicht mehr binden (Griffith *et al.*, 1992; Cellier *et al.*, 1995; Eide *et al.*, 1996; Zhao und Eide, 1996a; Zhao und Eide, 1996b; Lam-Yuk-Tseung *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004). Möglicherweise war die Protonierung dieser basischen Aminosäuren ein Grund für die geringe Aufnahme der divalenten Kationen Ni^{2+} und Co^{2+} in die Zellen, bei denen ein saurer pH-Wert im BME-Medium vorlag. Zudem sank unter diesen sauren Bedingungen die Stabilitätskonstante des Nickel-Histidinkomplexes und anderer Aminosäuren (Krämer *et al.*, 2000), die an dem Transport der divalenten Kationen in die Zellen beteiligt waren.

Protonen-abhängige Transporter nutzen Protonen- und elektrische Gradienten über eine Membran, um als Symporter oder Antiporter Ionen über eine Membran zu transportieren und in Kompartimenten anzureichern. Bei einem Transporter, der als Symporter arbeitet (Chen *et al.*, 1999), wie dem von Garrick *et al.* (2006b) sowie Forbes und Gros (2001) beschriebenen DMT1 bzw. Nramp2, würde folglich Ni^{2+} oder Co^{2+} zusammen mit H^+ zur Anreicherung der divalenten Metallionen in den Zellen in Richtung des elektrochemischen Gradienten in die Zelle transportiert. Bestand nun im Kulturmedium ein saurer pH-Wert, also eine wesentlich höhere extrazelluläre Protonenkonzentration als im Inneren der Zelle, musste der Transport der divalenten Kationen über die Membran mit Hilfe dieses Transportwegs (Symporter) betrieben werden. Im Falle eines Antiporters, der divalente Kationen im Austausch mit H^+ (mit dem Gradienten) in Zellen transportiert, wäre der Transport minimiert. Da die Ergebnisse der Versuche mit unterschiedlichen pH-Werten im Medium eine minimale Aufnahme trotz saurem BME-Medium zeigten, konnte der Transportweg mittels Symporter im Vergleich zu Gunshins Ergebnissen (Gunshin *et al.*, 1997) nicht der Haupttransportweg für Ni^{2+} und Co^{2+} in humanen Gingiva-Fibroblasten sein und andere eventuell pH-unabhängige Transporter oder Antiporter wären für die Aufnahme verantwortlich. Gunshin und Kollegen (1997) zeigten, dass bei einem niedrigen extrazellulären pH-Wert von 5,5 im Vergleich zum intrazellulären pH-Wert von 7,3 in *Xenopus*-Oozyten ein starker Co^{2+} Einwärtsstrom parallel mit H^+ entstand, der im Fall von Ni^{2+} etwas schwächer war.

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, waren alternative Transportsysteme oder mehrere Transportwege an der Aufnahme von Nickel und Cobalt in humane Gingiva-Fibroblasten beteiligt, die als pH-abhängiger Antiporter oder pH-unabhängig funktionierten bzw. bei saurem pH-Wert im Vergleich zu neutralen oder basischen pH-Werten unterschiedlich arbeiteten. Ähnliches wurde von Tandy *et al.* (1999) für den Zink-Transport in humanen Caco-2 Zellen beschrieben. Der Zink-Transport war hier pH-Wert unabhängig, wobei ein einwärts pH-Gradient sogar einen inhibitorischen Effekt auf den Zn^{2+} -Transport ausübte (Tacnet *et al.*, 1993).

Da bei der Ni^{2+} - und Co^{2+} -Aufnahme in humane Gingiva-Fibroblasten solche Transporter beteiligt waren, bei denen Ni^{2+} und Co^{2+} die Bindestellen für divalente Kationen von physiologischen Kationentransportern zum Transport nutzten, beeinflussten die Eigenschaften der Transportproteine bzw. ihrer Metallbindestellen die Aufnahme von Ni^{2+} und Co^{2+} ebenfalls.

4.2.3 Lokalisation von Nickel und Cobalt in verschiedenen Kompartimenten humaner Gingiva-Fibroblasten und deren Auswirkung auf die Zellen

Obwohl es unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten von Newport Green DCF in den Nickel-behandelten Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der Metallkonzentration im

BME-Medium gab, war in allen Zellen der Ort der Nickelakkumulation deutlich das Zytoplasma und mit zunehmender Konzentration und Inkubationszeit der Zellkern anzunehmen. Nach 16 h Inkubation mit den Nickelverbindungen war im Zytoplasma bereits Fluoreszenz detektierbar. Der Zellkern fluoreszierte überwiegend erst nach 24 h Inkubation mit 500 μM wasserlöslicher Nickelverbindungen (s. Abschnitt 3.1.4). Etwas früher konnte bei wasserunlöslichen Verbindungen Fluoreszenz im Zellkern detektiert werden. Nach CoCl_2 -Zugabe war die Detektion von Co(II) durch die geringere Fluoreszenzverstärkung des Newport Green DCF schwieriger. Sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma war die Fluoreszenz minimal und geringer als in Nickel-behandelten Zellen. Neben dem Zytoplasma und dem Zellkern konnten weitere Kompartimente mit Fluoreszenz beobachtet werden. Um die Akkumulation von Ni(II) und Co(II) genauer zu lokalisieren, wurden Versuche zur parallelen Markierung der Metalle und Zellkompartimente durchgeführt.

Nickel und Cobalt im Zytosol humaner Gingiva-Fibroblasten:

Das Zytosol als größtes Organell der humanen Gingiva-Fibroblasten war von der Zytoplasmamembran umgeben. Durch Transporter in der Membran oder Phagozytose gelangten Nickel und Cobalt in Abhängigkeit ihrer Spezies in die Zellen und damit zunächst in das Zytosol. Dort waren Proteine, metabolische Zwischenprodukte, Aminosäuren und organische Säuren enthalten, die als Bindungspartner von Nickel und Cobalt beschrieben wurden (Krämer *et al.*, 1996; von Wirén *et al.*, 1999). Durch die große Anzahl an potenziellen Bindungspartnern wurden Nickel und Cobalt aus wasserlöslichen Verbindungen schnell komplexiert und akkumulierten im Zytosol. Die Detektion dieser Metalle durch eine Fluoreszenzverstärkung des optischen Sensors Newport Green DCF sowohl bei freiem, als auch bei gebundenem Ni(II) und Co(II) im Zytosol war möglich, da Newport Green DCF mit komplexiertem Ni(II) und Co(II) dennoch interagieren konnte (Thompson *et al.*, 2002; Thierse *et al.*, 2007). Eine Unterscheidung zwischen freien und gebundenen Nickelionen sowie weiterführend die Unterscheidung der Nickelkomplexe, war durch die Detektion der Newport Green DCF-Fluoreszenz mit dem CLSM nicht möglich. Waren Nickel oder Cobalt in sehr hoher Konzentration vorhanden, konkurrierten sie bereits um die Bindestellen an den unspezifischen Transportern für divalente Kationen, sodass essentielle divalente Kationen wie Fe^{2+} oder Mg^{2+} nicht in ausreichender Konzentration in die Zellen aufgenommen wurden (Chen *et al.*, 2005; Davidson *et al.*, 2005). In der Zelle konkurrierten sie ebenfalls mit essentiellen divalenten Kationen an Proteinen und Enzymen, die diese dann inaktivieren oder hemmen konnten.

Nickel und Cobalt im Zellkern humaner Gingiva-Fibroblasten:

Bei wasserunlöslichen Nickelverbindungen wie dem Ni_3S_2 wurden Ni_3S_2 -Partikel über Phagozytose in die Zellen aufgenommen, in sauren Vakuolen im Zytosol gelöst und direkt zum Zellkern transportiert, wo sie letztendlich über Transporter aufgenommen wurden oder sogar

durch Membranverschmelzung der Vakuole mit der Kernmembran in den Zellkern gelangten. Nickel und Cobalt aus wasserlöslichen Verbindungen wurden ausschließlich über Membrankanäle in den Zellkern transportiert.

Durch die Nähe der Heterochromatinregionen und der Nukleoli zu der Kernmembran wurde Nickel überwiegend in diesen Regionen gebunden. Diese Regionen im Zellkern waren RNA- und Protein-reich, wodurch sie Bindestellen für Nickel und Cobalt boten. Bei geringen Metallkonzentrationen schien Nickel und Cobalt zunächst die Strukturen der Nukleoli zu binden. Erst bei höheren Metallkonzentrationen im Zellkern wurden weitere Bindestellen besetzt.

Das Auftreten der Nukleoli in Zellen war generell abhängig von der Phase der DNA-Replikation. Die Nukleoli-Anzahl variiert von Zelle zu Zelle, sodass ein nicht Vorhandensein kein Indiz für eine veränderte Lokalisation der *target*-Ionen bedeutete. Während der Mitose waren sie nicht zu sehen. Die Nukleoli wiesen keine Fluoreszenz nach Anregung mit dem Argonlaser (488 nm) ohne Zugabe von Metallverbindungen und Newport Green DCF auf. Nach der Zugabe von Newport Green DCF in unbehandelte Zellen und der anschließenden Anregung der Fluoreszenz mit einem Argonlaser (488 nm) war schwache und diffuse Fluoreszenz zu beobachten. Die Bindung von physiologischen, divalenten Metallionen wie Zn^{2+} , die sich im Zellkern befanden und dort die Stabilisierung der DNA regulierten oder als Bestandteil von Proteinen dienen, verstärkten in geringem Maß die Newport Green DCF-Fluoreszenz. Generell war die Verstärkung der Fluoreszenz durch die physiologischen Kationen jedoch gering, sodass deutliche Unterschiede zwischen der Kontrolle und den Ergebnissen nach der Nickel- und Cobaltzugabe durch Newport Green DCF zu beobachten waren und die starke Fluoreszenz in den Zellkernen und den Nukleoli auf die Bindung von Ni(II) und Co(II) zurückgeführt werden konnte.

Zellkerne enthalten hauptsächlich die DNA und Proteine. Die Histonproteine falten die DNA und bilden mit ihr die Nukleosome. Die Phosphatreste des Ribose-Phosphat-Rückgrates der DNA und die Elektronen-Donor-Gruppen der Nukleinsäurebasen bildeten im Zellkern ein *target* für die Ni^{2+} - und Co^{2+} -Bindung, wobei diese Kationen eine stärkere Affinität für DNA-Phosphat-Gruppen im Vergleich zu DNA-Basen zeigten (Eichhorn und Shin, 1968; Lee *et al.*, 1982). Da DNA unter physiologischen Mg^{2+} -Konzentrationen nur schwach Ni^{2+} bindet, waren Proteine bzw. bestimmte Aminosäuren im Zellkern ein weiteres mögliches *target* für die Ni^{2+} - und Co^{2+} -Bindung.

Nach ersten Hinweisen von Lee *et al.* (1982) auf eine Interaktion von Ni^{2+} mit der Imidazol-Gruppe des Histidinrestes beschrieb Zoroddu *et al.* (2000, 2002), dass Ni^{2+} an die Aminosäure Histidin am N-terminalen Ende des Histons H4 bindet. Die Histone besitzen Nickelbindemotive, die neben den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin konservierte Histidinreste zeigten. Der Imidazolring des Histidins diente dabei als Bindungspartner. Sehr deutlich wurde dies im

Nickelbindemotiv TESHKAKGK des Histons H2A (Bal *et al.*, 1998) und CAIH von Histon H3 (Bal *et al.*, 1996), sowie in Histon H4 (AKRHRK) (Zoroddu *et al.*, 2000; Zoroddu *et al.*, 2002). Der Austausch von Mg^{2+} durch Ni^{2+} verursachte die Histonacetylierung und Hypermethylierung, infolge derer es zu einer verstärkten Chromatinkondensation kam, die letztendlich im *genesilencing* von Tumorsuppressorgenen resultieren konnte (Sen und Costa, 1985; Klein *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1995; Broday *et al.*, 1999; Broday *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2005).

Einige Metalle wie Mg^{2+} oder Zn^{2+} dienen der Stabilisierung von DNA-Protein-Verbindungen oder Protein-Protein-Interaktionen (Sissoeff *et al.*, 1976; Mackay und Crossley, 1998; Hartwig und Schwerdtle, 2002), sodass hohe Ni^{2+} -Konzentrationen Mg^{2+} oder Zn^{2+} an ihren Bindungsstellen ersetzen und damit die DNA-Protein-Interaktion verringern können (Coogan *et al.*, 1989a). Durch den Austausch von z.B. Zn^{2+} in Zink-Finger-Proteinen oder Mg^{2+} in der DNA-Polymerase kommt es zur Destabilisierung der DNA-Protein-Bindung, die für die Transkription nötig ist.

Strukturell detaillierte Informationen, die über Nukleoli bzw. Proteine im Chromatin hinaus hinwiesen, in denen Ni^{2+} gebunden wurde, ließen sich anhand der Fluoreszenzbilder nicht erhalten.

Nickel und Cobalt im Endoplasmatischen Retikulum humaner Gingiva-Fibroblasten:

Neben der deutlichen Fluoreszenz im Zellkern, die unter anderem Ke *et al.* (2006) (2007) beschrieben, war in allen Zellen zusätzlich eine fluoreszierende retikuläre Struktur um den Zellkern dominant, die sich unterschiedlich stark im Zytosol ausbreitete und oft mit einer starken Fluoreszenz der Kernmembran einher ging.

Der Farbstoff ER-Tracker red markierte das ER selektiv (s. Abbildung 3.28 und 3.27(b)) und gab Hinweise, dass es sich bei diesen Strukturen um das Membrangeflecht des ER handelte. Eine totale Colokalisation zwischen den Farbstoffen wurde nicht erreicht, sodass weitere tubuläre Strukturen wie z.B. die Mitochondrien in diesem Bereich Nickel enthalten konnten.

Bei Zellen, die keinen Metallverbindungen ausgesetzt waren, war die Fluoreszenz nach Newport Green DCF-Zugabe sehr schwach und diffus. Da hier viele physiologische Kationen wie Zn^{2+} oder Ca^{2+} vorkamen, die im ER generell konzentriert vorlagen, konnte das die Hintergrundfluoreszenz des optischen Sensors Newport Green DCF bewirken. Dabei beschränkte sich die Verstärkung der Fluoreszenz auf den Einfluss von Zn^{2+} , da Newport Green DCF insensitive gegenüber physiologischen Konzentrationen von Ca^{2+} war. Das ER konnte in Zellen in Abhängigkeit des Zellzyklus unterschiedlich stark ausgeprägt sein, doch fiel auf, dass mit zunehmender Metallkonzentration und Inkubationszeit dieses mehr und mehr reduziert war und im Gegensatz dazu die Fluoreszenz im Zellkern anstieg. So wurde oft bei Zellen mit einem stark ausgeprägten ER keine Fluoreszenz

im Zellkern beobachtet und in Zellen mit einem stark fluoreszierenden Zellkern ein minimal ausgeprägtes ER beobachtet. Messer *et al.* (1999), sowie Messer und Lucas (1999) erklärten dieses Phänomen durch reduzierte DNA-, RNA- und Proteinsyntheseaktivität in Folge von Nickelzytotoxizität, die zu einer Verringerung des ER-Geflechts führte. Damit schien ein Zusammenhang zwischen der Ausprägung des ER und der Nickelkonzentration im Zellkern zu bestehen, der mit dem CLSM detektiert werden konnte. Durch Versuche mit dem Kationentransporter CDF Homolog Zhf in *Schizosaccharomyces pombe* war bekannt, dass dieser Transporter primär für den Zn^{2+} -Transport ins ER zuständig ist, da viele Proteine im ER Zn^{2+} -abhängig funktionieren. Der CDF wurde bereits als konstitutiv exprimierter Transporter in Bakterien, Hefen und Säugern beschrieben (Paulsen und Saier Jr., 1997). Wurden die Zn^{2+} -Ionen durch hohe Ni^{2+} - oder Co^{2+} -Konzentrationen im Zytosol verdrängt, konnte die Aktivität der Proteine im ER gestört werden. Der DCF wurde sowohl in der ER-Membran, als auch in der Kernhülle lokalisiert (Clemens *et al.*, 2002), sodass die teilweise auftretende Fluoreszenz im Bereich der Kernhülle damit in Zusammenhang stehen konnte. Des Weiteren kamen Ca^{2+} -Kanäle im ER als Transportweg für die Nickelaufnahme in Betracht (Brommundt und Kavalier, 1987). Das ER ist ein Ca^{2+} -Speicher, der über Ca^{2+} -Kanäle mit den divalenten Kationen angereichert wird. Durch hohe Konzentration von Ni^{2+} im Zytosol konnte auch hier wieder Ni^{2+} um die Bindestellen des Ca^{2+} -Transporter für Ca^{2+} konkurrieren und die Ca^{2+} -Aufnahme verringern, was in einer erhöhten Ni^{2+} -Aufnahme in das ER resultierte. Ob Nickel oder Cobalt nun tatsächlich im ER-Lumen oder an der ER-Membran detektiert wurde, konnte durch den optischen Sensor Newport Green DCF und die CLSM-Aufnahmen nicht geklärt werden. Selbst die parallele Markierung von Ni(II) mit Newport Green DCF und des ERs mit ER-Tracker red gab dabei keine genügenden Informationen.

Abgesehen von der tubulären und retikulären Struktur des ER, sind auch die bereits erwähnten Mitochondrien tubulär oder als Netzwerk organisiert, wenn die Zelle vital ist. Geht die Zelle in das Stadium der Apoptose über, was durch toxische Konzentrationen von Nickel oder Cobalt verursacht werden kann, ändern die Mitochondrien ihre Struktur, sodass diese eine fragmentäre oder punktförmige Gestalt annehmen (Frank *et al.*, 2001). Der Einfluss von Ni^{2+} auf die Morphologie der Mitochondrien wurde später von Tuszynska (2006) für *Paxillus involutus* beschrieben und zeigte eine Spezies-unabhängige Beeinflussung durch Ni^{2+} und weitere divalente Metallionen wie auch Zn^{2+} (Tuszynska *et al.*, 2006), sodass die Mitochondrien ebenfalls ein *target* für die Nickel- und Cobaltbindung waren. Besonders bei $CoCl_2$ -behandelten Zellen konnten fragmentäre oder punktförmig fluoreszierende Strukturen beobachtet werden, die auf eine Akkumulation von Nickel und Cobalt in den Mitochondrien hinwiesen. Gleichzeitig war bei $CoCl_2$ -behandelten Zellen die Rate an apoptotischen Fibroblasten höher als bei $NiCl_2$ -behandelten Fibroblasten, was ebenfalls auf eine Bindung des Cobalts an Strukturen der Mitochondrien wie der mitochondrialen DNA hinwies.

Nickel und Cobalt im Golgi-Apparat humaner Gingiva-Fibroblasten:

In der Nähe des Zellkerns befand sich der Golgi-Apparat, der, wie das ER, dynamisch in seiner Größe war. Seine Colokalisation mit dem Farbstoff Newport Green DCF wurde durch den spezifischen Golgi-Apparat-Farbstoff Bodipy TR nahezu ausgeschlossen. Die Fluoreszenzsignale der beiden Farbstoffe konnten nicht an übereinstimmenden Orten in den Nickel-behandelten Zellen detektiert werden, sodass der Golgi-Apparat trotz seiner Aufgabe als Modifikationsort für Proteine kein primäres *target* für die Bindung oder Verarbeitung von Nickel oder Cobalt zu sein schien.

Fluoreszierende und nicht fluoreszierende Vesikel in humanen Gingiva-Fibroblasten:

Fluoreszierende Vesikel wurden selten, aber dennoch wiederholt v.a. in CoCl_2 -behandelten Zellen beobachtet. Möglicherweise befanden sich darunter Peroxisomen oder Lysosomen, die im Metabolismus eine Art enzymatische Entsorgungsfunktion für organische Moleküle übernahmen.

Des Weiteren konnten nach der Zugabe der vier getesteten Metallverbindungen jeweils Zellen beobachtet werden, die nicht fluoreszierende Vesikel-ähnliche Gebilde im Zytoplasma aufwiesen und die Zellen granulär erschienen lassen. Dabei handelte es sich möglicherweise um Lipidtröpfchen, die durch eine verstärkte Lipidsynthese nach Nickelexposition entstanden. Ni^{2+} verstärkte die Aktivität von Metalloenzymen, die wiederum an der Lipidsynthese beteiligt waren und diese vorantrieben (Cloez *et al.*, 1987; Messer *et al.*, 1999).

Minute particles in der Zelle:

Eine Besonderheit in der Lokalisation von Ni(II) trat bei Ni_3S_2 -behandelten Zellen auf. Bei diesen punktförmig fluoreszierenden Bereichen, die im Transmissionsmodus keine Auffälligkeiten zeigten, handelte es sich möglicherweise um sog. *minutes particles*, die beim Abbau von Ni_3S_2 -Partikeln entstanden. Diese sehr kleinen Ni_3S_2 -Partikel mit einer Größe von durchschnittlich 10 nm (Hildebrand *et al.*, 1990) konnte man im Gegensatz zu den größeren Ni_3S_2 -Partikeln (s. Abbildung 3.14) im Transmissionsmodus nicht beobachten, wohl aber mit Newport Green DCF detektieren (Hildebrand *et al.*, 1990; Shirali *et al.*, 1991). Sie waren zumeist kleiner und an Zellmembranen, zytoplasmatischen Organellen wie das ER, Mitochondrien, Peroxisomen oder Liposomen, sowie an das Euchromatin im Zellkern gebunden (Shirali *et al.*, 1991).

Entsprechend der bekannten Literatur wurde das Zytosol und der Zellkern allgemein als *target* der Nickel- und Cobaltakkumulation in humanen Gingiva-Fibroblasten mit Hilfe optischer Methoden bestätigt. Ergänzend dazu wurden im Speziellen Nukleoli, das ER und teilweise Peroxisomen und Mitochondrien als weitere mögliche Orte der Nickelbindung hinzugefügt. Ob Nickel und Cobalt als divalente Kationen frei vorlagen oder an Moleküle oder Zellstrukturen gebunden

waren, konnte nicht differenziert werden. Dass in beiden Fällen eine Detektion mit dem Farbstoff Newport Green DCF erfolgen konnte, beschrieben Thompson und Kollegen (2002) sowie Thierse und Kollegen (2007) und wurde in dieser Arbeit durch die hier gezeigten Versuche bestätigt.

4.2.4 Speziation von Nickel- und Cobaltverbindungen durch Newport Green DCF-Spektren ausgewählter ROIs in Fibroblasten

Die Toxizität eines Metalls ist oft von seiner Spezies abhängig, d.h. von seiner Verbindung und der davon abhängenden Oxidationsstufe. Da eine Unterscheidung verschiedener Nickel- und Cobaltspezies anhand der CLSM-Aufnahmen und Newport Green DCF-Detektion nur bedingt möglich war, wurden Spektren von Newport Green DCF in ROIs Nickel- und Cobalt-behandelter Zellen aufgenommen. Es sollte die Frage geklärt werden, ob bestimmte Bindungspartner oder Komplexe von Ni(II) und Co(II) in den humanen Gingiva-Fibroblasten die Newport Green DCF-Spektren charakteristisch beeinflussen. Die ROIs zeichneten sich durch starke Fluoreszenz in den Zellen aus und wurden auf eine geringe Anzahl an Pixeln beschränkt, um sie bestimmten Kompartimenten zuordnen zu können. Aus der Summe der Fluoreszenzinformationen der einzelnen Pixel einer ROI wurde ein Spektrum erstellt und dieses mit den Spektren anderer ROIs und anderer Zellen der verschiedenen Verbindungen verglichen und gegenübergestellt.

Die Eigenfluoreszenz der Fibroblasten nach Anregung mit dem 488 nm Argonlaser war sehr schwach und ergab ein unklares Spektrum mit sehr geringer Intensität, sodass die Eigenfluoreszenz der humanen Gingiva-Fibroblasten die Newport Green DCF-Intensität kaum beeinflusste. Auch das BME-Medium, in dem die humanen Gingiva-Fibroblasten inkubiert wurden, zeigte keine Eigenfluoreszenz, die die Detektion der Spektren störte. Die Aufnahme von Fluoreszenzspektren nach Zugabe von Newport Green DCF in BME-Medium ohne Metallverbindungen ergab klare Spektren mit einem deutlichen Emissionsmaximum bei 533 nm. Nach der Zugabe der vier getesteten Metallverbindungen und Newport Green DCF ins BME-Medium änderte sich die Lage der Maxima minimal auf 532 nm. Die Spektren wurden mit dem LOESS-Verfahren geglättet, woraufhin es durch die Existenz von kleinen Schultern oder Wellen zu einer minimalen Verschiebung der Maxima auf 534 nm kam. Der geringe Unterschied in der Lage der Maxima war hier deshalb nicht aussagekräftig.

Einzig durch die Bindung der *target*-Ionen im BME-Medium veränderte sich das Spektrum nicht in seiner Form, was die Kontrollspektren und auch die Spektren von Ingle *et al.* (2008) bestätigen. Ingle *et al.* zeigten 2008, dass sich die Form der Newport Green DCF-Spektren, die durch einen Lumineszenz-Spektrometer aufgenommen wurden, in Anwesenheit von verschiedenen NiSO₄-Konzentrationen zwischen 0 μ M bis 30 μ M in MOPS-Puffer konzentrationsabhängig

nicht änderte, wobei eine konstante Newport Green DCF-Konzentration von $30 \mu\text{M}$ vorlag. Mit steigender Newport Green DCF-Konzentration stieg allerdings auch die Fluoreszenzintensität. Die Änderungen der Intensitäten bewegten sich in etwa im Rahmen der hier gemessenen Intensitätswerte und den Intensitätsangaben von Molecular Probes nach der Zugabe von $100 \mu\text{M Ni}^{2+}$, wobei bei Ingle und Kollegen (2008) zu beobachten war, dass die Fluoreszenzverstärkung mit zunehmender NiSO_4 -Konzentration immer geringer wurde. Die Spektren zeigten eine maximale Fluoreszenzintensität im Bereich bei 530 nm , wobei kein eindeutiges Maximum bestimmt werden konnte. Bei einigen Spektren in dieser Arbeit war ebenfalls kein eindeutiges Maximum vor der Glättung zu erkennen. Der Anstieg der Fluoreszenzintensitäten von Newport Green DCF in BME-Medium erfolgte später als bei den Newport Green DCF-Spektren in BME-Medium mit Metallverbindungen. Im Bereich größerer Wellenlänge als der des Maximums war der Verlauf gleich. So konnte unter unterschiedlichen Bedingungen ein konstantes Fluoreszenzspektrum von Newport Green DCF aufgenommen werden. Würden die *target*-Ionen in den Zellen einen Einfluss auf den Verlauf der Spektren und die Fluoreszenzintensität ausüben, wäre dies detektierbar gewesen. Durch die Hydrolyse der Esterbindungen des Newport Green DCF-Moleküls in den Fibroblasten und die physiologischen divalenten Kationen in den unbehandelten Fibroblasten war die spektrale Eigenschaft des Newport Green DCF-Moleküls unverändert und die Fluoreszenzintensität nur geringfügig zur Kontrolle in BME-Medium mit Metallverbindungen erhöht. Die Kontrollspektren von Newport Green DCF aus den verschiedenen Kompartimenten in Fibroblasten ohne Metallverbindungen zeigten leichte Variationen in der Lage der Maxima von Kompartiment zu Kompartiment, die vernachlässigbar waren.

Verglich man nun die Newport Green DCF-Spektren aus Fibroblasten, denen Metallverbindungen zugesetzt wurden, untereinander sowie diese mit den zuvor beschriebenen Newport Green DCF-Spektren in BME-Medium und unbehandelten Fibroblasten, fiel auf, dass einige Spektren in den mit Metallverbindungen behandelten Fibroblasten im Verlauf und der Lage der Maxima den Kontrollspektren ähnlich waren. Dabei waren keine charakteristischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Metallverbindungen oder den Kompartimenten zu beobachten. Andere Spektren zeigten jedoch im Vergleich zu Spektren der selben Metallverbindung oder dem selben Kompartiment einen leicht veränderten Verlauf mit unterschiedlichen Maxima und Schultern im größeren Wellenlängenbereich. Abweichend zu den Spektren, die von Ingle und Kollegen (2008) aufgenommen wurden, waren in dieser Arbeit bei den Spektren im längerwelligen Bereich von 570 nm Schultern zu beobachten, die unterschiedlich stark ausgeprägt waren. Geringe Veränderungen im Verlauf der Spektren konnten durch den Einfluss der Schultern und Schwankungen in der Intensität der Spektren beim Glätten entstanden sein. Die Eigenfluoreszenz von Molekülen in den Zellen, die zwar wie beschrieben sehr schwach war, konnte ebenfalls bei geringer Fluoreszenzintensität des Fluorophors Einfluss auf das Spektrum nehmen. Hinweise auf eine charakteristische Beeinflussung der Newport Green DCF-Spektren in den Fibroblasten durch die Bindung von

Ni(II) und Co(II) oder ihrer Verbindung mit zellulären *targets*, die damit eine Identifizierung ermöglicht hätte, wurden nicht gewonnen. Die Spektren in den ROIs zeigten keine deutlichen, charakteristischen und konstanten Veränderungen bei bestimmten Kationen oder Zellarealen, die wiederholt unter den selben Bedingungen detektiert wurden.

Eine Abhängigkeit zwischen den Strukturen der Zellen, den Metallverbindungen und den Spektren war nicht nachweisbar. Stärker abweichende Spektren im Vergleich zu Kontrollspektren zeigten außer meist starker Fluoreszenz in den Kompartiment-spezifischen Strukturen keine Besonderheit in der Zelle. Eine Ausnahme bildete dabei eine Zelle, die mit NiSO₄ inkubiert wurde. Das Spektrum mit einem Maximum im kürzeren Wellenlängenbereich bei 528 nm wurde in einem Pseudopodium aufgenommen, das abweichend zum umgebenden, fluoreszierenden Zytosol stärkere Fluoreszenz aufwies, aber im Transmissionsmodus keine besonderen Strukturen erkennen ließ. Diese verstärkte Fluoreszenz in den Pseudopodien trat in den Zellen in dieser Aufnahme häufiger auf. Weitere Spektren aus NiSO₄-behandelten Zellen bildeten ebenfalls ein Maximum im kürzeren Wellenlängenbereich bei 525 nm und 526 nm aus, ein struktureller Zusammenhang konnte jedoch auch hier nicht beschrieben werden. Es handelte sich bei den ROIs um Nukleoli und Bereiche des ER in Zellkernnähe. Die abweichenden Maxima und Verläufe der Spektren in den ROIs zu den Kontrollspektren entstanden durch Einflüsse wie Eigenfluoreszenz anderer zellulärer Moleküle, die in der ROI lokalisiert waren. Prinzipiell wurde zwar beschrieben, dass die geringe Eigenfluoreszenz und die schwache Fluoreszenzintensität der Kontrollzellen mit Newport Green DCF die Detektion von Ni(II) und Co(II) in den Zellen nicht wesentlich beeinflusst wurde, doch konnten die geringen Eigenfluoreszenzen Auswirkungen auf das Spektrum haben und die zusätzlichen Schultern oder abweichenden Formen verursachen. Je geringer die Fluoreszenzintensität eines Spektrums war, desto größere Auswirkungen hatte die Hintergrundfluoreszenz auf das Spektrum. Grenzte man die Pixelanzahl einer ROI ein um dieses zu vermeiden, stieg gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit, einen zufälligen, nicht aussagekräftigen Bereich zu detektieren. Eine Einschätzung, welche der Spektren aussagekräftig waren, war ebenfalls nicht möglich.

4.3 Nachweis von Nickel und Cobalt in Pflanzenzellen von *Catharanthus roseus*

Obgleich es sich um humane Zellen oder Pflanzenzellen handelt, bestimmte Metallionen sind essentiell für den Stoffwechsel einer Zelle und somit für einen funktionierenden Organismus. Gerät das Gleichgewicht an Metallionen in Zellen ins Schwanken oder werden toxische Ionen in Zellen akkumuliert, kann der Stoffwechsel gestört werden. Wie zuvor bei den humanen Gingiva-Fibroblasten wurden deshalb Nickel- und Cobaltverbindungen den Pflanzenzellen zugegeben. Mit Hilfe des optischen Sensors Newport Green DCF wurde die Aufnahme, Lokalisation und Speziation der Ionen untersucht.

Wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben, konnte keine Eigenfluoreszenz der getesteten Metallverbindungen unter den gegebenen Versuchsbedingungen festgestellt werden, sodass auch bei den Pflanzenzellen der optische Sensor Newport Green DCF zur Detektion von Ni(II) und Co(II) eingesetzt wurde. Auch bei den Pflanzenzellen wurde die Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF von der Ionenkonzentration und des jeweiligen divalenten Kations beeinflusst. So zeigte sich bei unbehandelten Zellen nach Newport Green DCF-Zugabe eine schwache Fluoreszenz, die über die komplette Zelle verbreitet war. Die Hintergrundfluoreszenz von Newport Green DCF war in den Pflanzenzellen etwas höher bzw. homogener als bei Fibroblasten, was durch den Co^{2+} - und Zn^{2+} -Gehalt im LS-Medium begründet sein könnte. Das Medium enthielt als essentielle Spurenelemente für Pflanzenzellen CoCl_2 und ZnSO_4 , die *target*-Ionen von Newport Green DCF waren und eine Verstärkung seiner Fluoreszenzintensität verursachen konnten (Haugland, 2002). Eine Beeinflussung bei der Detektion von Kationen mit Hilfe von Newport Green DCF durch Eigenfluoreszenz der Zellen fand dennoch kaum statt, da in einem Wellenlängenbereich, der den Detektionsbereich der Newport Green DCF-Fluoreszenz beinhaltet, selbst bei höheren PMT-voltages lediglich geringe Fluoreszenz detektiert wurde. Durch die eher kugelförmige Gestalt von Pflanzenzellen war es schwieriger, konfokal einen Überblick über Fluoreszenzen in der Zelle zu bekommen, weshalb das *Pinhole* auf 2,24 Airy eingestellt wurde, was zu einer höheren Lichtstärke führte und wodurch die Fluoreszenzintensitäten zwischen den Fibroblasten und den Pflanzenzellen nur bedingt verglichen werden konnten.

4.3.1 Einfluss unterschiedlicher Inkubationszeiten von Nickel- und Cobaltverbindungen auf die Fluoreszenz von Newport Green DCF in Pflanzenzellen von *Catharanthus roseus*

Pflanzen sind darauf angewiesen Nährstoffe aus dem Boden aufzunehmen, die sie nicht selbst produzieren können. Dazu zählen Spurenelemente wie Zn^{2+} oder Mg^{2+} , aber auch Ni^{2+} und

Co^{2+} . Um dieses zu gewährleisten besitzen Pflanzenzellen bestimmte Transporter in der Plasmamembran, die die Aufnahme regulieren. Teilweise sind dies Homologe zu Transportern in Fibroblasten oder anderer Organismen, die alle nach dem gleichen Prinzip funktionieren. Schaaf *et al.* beschrieben 2006 in *Arabidopsis thaliana* den Mg^{2+} -Transporter AtMGT1 sowie die Fe^{2+} -Transporter AtIRT1 und AtIREG2. AtMGT1 ist ein Homolog des bakteriellen CorA, der ebenfalls Mg^{2+} und Ni^{2+} transportieren kann, ohne ein physiologischer Ni^{2+} -Transporter zu sein (Kehres *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2001). Weitere Transporter, die der Familie der *Cation Diffusion Facilitator* (CDF) (Paulsen und Saier Jr., 1997) oder der Nramp-Transporter (Gruenheid *et al.*, 1995) angehören, wurden in zahlreichen Organismen u.a. auch in Pflanzen beschrieben. Steigt die Konzentration von divalenten Kationen wie Ni^{2+} oder Co^{2+} im Boden auf unnatürliche Konzentrationen an, konkurrieren die Ni^{2+} - und Co^{2+} -Ionen mit den divalenten Kationen am Transporter und reichern sich in hohen Konzentrationen in den Zellen an. So gelangten über die mannigfaltigen Transportwege auch die Ionen aus den getesteten Verbindungen in die Pflanzenzellen und damit zunächst in das Zytoplasma von *Catharanthus roseus*. Im Tonoplast sind zudem weitere Transporter lokalisiert, die meist im Austausch mit H^+ andere divalente Kationen wie Mg^{2+} in die Vakuole transportieren (Barkla *et al.*, 1995; Nishimura *et al.*, 1998; Shaul *et al.*, 1999; Martinoia *et al.*, 2000; Saito *et al.*, 2005; Schaaf *et al.*, 2006; Martinoia *et al.*, 2007). Auch Transporter, die Komplexe aus divalenten Kationen mit organischen Säuren wie Malat oder Citrat, sowie der Aminosäure Histidin oder Nicotinamin (NA) ($\text{Fe}^+/\text{Ni}^{2+}$ -NA Influx) (Küpper *et al.*, 2001; Gendre *et al.*, 2006) über Membranen transportieren, wurden beschrieben (Kerkeb und Krämer, 2003). Histidin ist in Pflanzen ein sehr häufiger Komplexpartner für Ni^{2+} und Co^{2+} , der besonders für den Transport von Ni^{2+} in Hyperakkumulatoren beschrieben wurde (Krämer *et al.*, 1996; Verret *et al.*, 2005).

Die Aufnahme der Co^{2+} - und Ni^{2+} -Ionen in die Pflanzenzellen von *Catharanthus roseus* nach der Zugabe der Metallverbindungen ins LS-Medium ließ kaum Unterschiede zwischen den Spezies in Bezug auf die Fluoreszenzintensität und Lokalisation erkennen. Bei allen Metallverbindungen konnte bereits nach 24 h Inkubation deutliche Fluoreszenz von Newport Green DCF und damit divalente Kationen in den Zellen detektiert werden.

Mit zunehmender Inkubationszeit der Pflanzenzellen mit den Metallverbindungen waren leichte Erhöhungen der Newport Green DCF-Fluoreszenzintensität zu beobachten. Dabei machte es kaum einen Unterschied, ob eine wasserlösliche oder wasserunlösliche Nickelverbindung oder das wasserlösliche CoCl_2 zugegeben wurde. Eine geringfügig geringere Fluoreszenzintensität konnte in Ni_3S_2 -behandelten Zellen beobachtet werden. Etwas höhere Intensitäten konnte man bei CoCl_2 -behandelten Zellen detektieren, die jedoch durch die Blendenöffnung von 4,48 Airy erhöht waren und damit nicht mit anderen Intensitäten verglichen werden konnten. Signifikante Unterschiede in der Fluoreszenzintensität der Verbindungen bzw. bei verschiedenen Inkubationszeiten

waren nicht detektierbar. Es ist jedoch zu betonen, dass bereits nach 24 h die Konzentration von Nickel und Cobalt in den Zellen hoch genug war, um eine starke Fluoreszenzverstärkung des Sensors zu bewirken. Ni(II) und Co(II) konnten demnach auch in Pflanzenzellen durch Newport Green DCF detektiert werden.

Die Aufnahme von Ni²⁺ und Co²⁺ in Zellen ist über die Transporter kontrolliert. Nicht-Hyperakkumulatoren wie *Catharanthus roseus* nahmen bei gleicher Metallkonzentration im LS-Medium oder Boden Ni²⁺ und Co²⁺ aus wasserlöslichen Metallverbindungen nicht in dem Maße auf wie Hyperakkumulatoren. Stieg die extrazelluläre Metallkonzentration zu stark an, konnte die Aufnahme nicht mehr kontrolliert werden und die Zellen reichern toxische Konzentrationen an. Ni₃S₂ wurde nicht über Phagozytose in die Pflanzenzellen aufgenommen. Im sauren LS-Medium wurde zunächst Ni₃S₂ gelöst und somit konnte Nickel ebenfalls als Ni²⁺ in die Zellen aufgenommen werden.

Innerhalb der Pflanzenzellen wurde Newport Green DCF-Fluoreszenz unabhängig von der Metallverbindung hauptsächlich im Zytoplasma und den Vakuolen detektiert, was auf einen Weitertransport eines Teils der Ionen innerhalb der Zellen hinwies. Kleinere Vakuolen wie in Abbildung 3.40(c) zeigten sehr deutlich, dass die Vakuolen an der Speicherung von Ni²⁺ und Co²⁺ in den Pflanzenzellen beteiligt waren. Analyisierte man die Zellkerne, stellte man fest, dass bei allen Verbindungen Fluoreszenz im Zellkern detektierbar war und die Kationen über die Kernmembran transportiert worden sein mussten. Bei einem Teil der Zellen, v.a. nach CoCl₂-Inkubation, war im Zytoplasma kaum Fluoreszenz zu beobachten, wobei die Zellwand dafür meist eine umso stärkere Fluoreszenz aufwies. Bei diesen Zellen schienen die Ionen an die Zellwand gebunden zu sein oder diese nur langsam oder gar nicht zu überwinden. Auf die Lokalisation der Ionen an der Zellwand wurde im folgenden Abschnitt 4.3.2 näher eingegangen.

Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder der Zellen konnten keine genauen Hinweise über die Art der Aufnahme bzw. bestimmte Transportwege geben. Der geringe pH-Wert von 5,5 im BME-Medium schien hier die Aufnahme der Ionen nicht zu beeinflussen. Dadurch, dass die Pflanzenzellen bessere Mechanismen zur Detoxifizierung besaßen und somit länger vital waren, konnte eine Beobachtung über den Zeitraum von 120 h durchgeführt werden.

Die Inkubation der Pflanzenzellen von *Catharanthus roseus* mit 100 µM NiCl₂ für kurze Inkubationszeiten von 1 h und 8 h sollte zeigen, ob nach diesen kurzen Inkubationszeiten bereits Nickel mit dem optischen Sensor Newport Green DCF in den Pflanzenzellen nachgewiesen werden kann und in welchen Kompartimenten in der Zelle dieser Farbstoff detektiert wird. Es stellte sich heraus, dass nach 1 h und 8 h bereits deutliche Fluoreszenz detektierbar war, die auf eine Nickelanreicherung in der Zelle hindeutete. Im Vergleich zu längeren Inkubationszeiten waren diese jedoch nicht so stark und v.a. auf das ER oder die Mitochondrien und die Zellkerne

konzentriert. Die Vakuolen schienen hier nur gering Nickel aufgenommen zu haben, da ihre Fluoreszenzintensität schwach war. Nach 8 h konnte eine leichte Steigerung der Fluoreszenzintensität beobachtet werden, die zeigte, dass Nickel und Cobalt in Pflanzenzellen an Strukturen im Zytoplasma gebunden haben, bevor sie in Vakuolen gespeichert wurden.

4.3.2 Lokalisation von Nickel und Cobalt in Pflanzenzellen von *Catharanthus roseus*

Eine detaillierte Lokalisation von Nickel und Cobalt durch Newport Green DCF war in Pflanzenzellen schwieriger als in Fibroblasten. Oft verringerten die gefüllten Vakuolen das Volumen des Zytosols und die Organellen wurden an den Rand der Zelle gedrückt, die dadurch oft nur als fluoreszierende, amorphe Strukturen in der Nähe der Zellwand zu sehen waren. Hierbei konnte es sich ebenfalls um das ER oder Mitochondrien handeln. Deutlich zu sehen und zu identifizieren waren dagegen die Zellkerne, die ebenfalls durch ihre Lage im Zytosol und die gefüllten Vakuolen am Zellrand lokalisiert waren und teilweise einen stark fluoreszierenden Bereich - den Nukleolus - enthielten. Je nach Fokalebene war der Zellkern besser oder schlechter zu sehen. Die Zellkerne waren unabhängig von der Inkubationszeit nach der CoCl_2 -Zugabe ebenso fluoreszent, wie es bei den Nickel-behandelten Zellen der Fall war, wenngleich eine geringere Anzahl an fluoreszierenden Zellkernen bei CoCl_2 -behandelten Zellen beobachtet wurde.

Wie in Fibroblasten gelangte Ni^{2+} und Co^{2+} durch divalente Kationentransporter über die Kernmembran in den Zellkern und schienen auch hier aufgrund der hohen Konzentrationen an Metallbindestellen zu akkumulieren. Darunter befanden sich Zellkernproteine bzw. deren Aminosäuren wie z.B. Histidin. Ebenso waren DNA-Basen bzw. das Ribose-Phosphat-Rückgrat *target* für die Nickel- und Cobaltbindung. Die Auswirkungen der Nickel- und Cobaltakkumulation in der Zelle und den Zellkernen waren vergleichbar mit denen in Fibroblasten (s. Abschnitt 4.2.3). Da in den Zellkernen der CoCl_2 -behandelten Pflanzenzellen Fluoreszenz detektiert werden konnte, schienen höhere Cobaltkonzentrationen im Zellkern der Pflanzenzellen als in denen der Fibroblasten vorzuliegen. Höhere Cobaltkonzentrationen bewirkten eine deutliche Verstärkung der Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF, wohingegen sehr geringe Cobaltkonzentrationen kaum sichtbare Veränderungen der Fluoreszenzintensität bewirkten.

Im Bereich der Zellwand und Plasmamembran wurde eine fluoreszierende Linie beobachtet, die auf eine Bindung der divalenten Kationen an Strukturen der Membran bzw. der Zellwand schließen ließ. Zellwände von Pflanzen bestehen zu etwa 25-30 % aus Zellulose, 15-20 % Hemizellulose, 35 % Pektin und 5-10 % Glycoproteinen (Wang und Evangelou, 1995; Macfie und Welbourn, 2000). Die anionischen Carboxylatgruppen der Pektine und Glycoproteine besitzen eine starke Bindungsaffinität für Metallionen (Christ *et al.*, 1994) und sind somit für den Kationenaustausch

verantwortlich (Haynes, 1980). Im basischen und neutralen Milieu sind dadurch Ca^{2+} und Mg^{2+} an die Amine gebunden, die im sauren von H^+ verdrängt werden. Krämer *et al.* (2000) und Robinson *et al.* (2003) beschrieben für Hyperakkumulatoren, dass etwa 70 % des Ni^{2+} an der Zellwand bzw. im Apoplast gebunden sind, was v.a. in kompletten Blättern zu beobachten ist. Die Ionen ersetzen dort extrazellulär gebundenes Ca^{2+} und schützen so den Zellmetabolismus vor zu hohen intrazellulären Nickelkonzentrationen (Salt und Wagner, 1993; Neumann *et al.*, 1995). Auch bei der Gerste oder Grünalgen wurde die Bindung von Nickel (Antunes und Kreager, 2009) und Cobalt (Macfie und Welbourn, 2000) an die Zellwand bei starker Exposition beschrieben (Brune *et al.*, 1995). Der hier verwendete *Catharanthus roseus* war wie diese Pflanzen kein Hyperakkumulator. Doch auch die *Catharanthus roseus*-Zellen besaßen Pektine und damit Metallbindestellen, die Ni^{2+} und Co^{2+} bei starker Exposition im Austausch mit Ca^{2+} binden konnten. Folglich konnte dies ein Mechanismus von *Catharanthus roseus* und weiteren Nicht-Hyperakkumulatoren sein, die Nickel- und Cobalthomöostase aufrecht zu erhalten. Membranen oder Strukturen in Membranen wie das anionische Glycosaminoglycan wurden bereits von Templeton (1987) als *target* für die Nickelbindung beschrieben. Bei den detektierten fluoreszierenden Bereichen, die sich in Form einer Linie am Zellrand befanden, konnte es sich um Nickel an Strukturen von Membranen handeln.

Die Funktion, den Metabolismus vor toxischen Nickel- oder Cobaltkonzentrationen zu schützen, erfüllen in Pflanzenzellen hauptsächlich Vakuolen. Toxische divalente Kationen werden durch die Bindung an S, N oder O in organischen Säuren im Zytosol wie Citrat (Jaffre *et al.*, 1976; Lee *et al.*, 1978; Homer *et al.*, 1991; Sagner *et al.*, 1998; Krämer *et al.*, 2000), Malat, Malonat (Brooks *et al.*, 1981) oder auch Histidin (Krämer *et al.*, 1996; Küpper *et al.*, 2001) und den anschließenden Transport der Komplexe in die Vakuolen für den Metabolismus unzugänglich. Transporter im Tonoplast ermöglichen die schnelle Reaktion auf Veränderungen der Ionenkonzentration in der Umgebung und gewährleisten durch die Speicherung der toxischen Stoffe verschiedenster Art optimale Bedingungen für den Metabolismus im Zytosol. War die Vakuole in den beobachteten *Catharanthus roseus*-Zellen gering gefüllt und nahm dadurch nicht den größten Volumenanteil der Zelle ein, sah man die Vakuole deutlich als rundes Kompartiment mit starker Fluoreszenz umgeben von schwacher Fluoreszenz im Zytosol. Gleichzeitig wurden in diesen Zellen die sonst an den Rand gedrängten Organellen sichtbar, die ebenfalls Fluoreszenz zeigten und damit eine Nickel- und Cobaltbindung an diesen Strukturen aufwiesen. Die Lagerung Nickel- und Cobalthaliger Komplexe in Vakuolen war durch Newport Green DCF-Fluoreszenz in den CLSM-Aufnahmen gut zu beobachten, da die Fluoreszenz in den Vakuolen nach der Inkubation der Zellen in LS-Medium mit Nickel- und Cobaltverbindungen verstärkt wurde. Untersuchungen von Krämer *et al.* (2000) an Nicht-Hyperakkumulatoren ergaben, dass etwa 25 % des Ni^{2+} im Protoplasten in Vakuolen enthalten war. Die Lokalisation von Nickel und Cobalt in Chloroplasten wurde nicht beobachtet.

Mehrere Bereiche in Pflanzenzellen von *Catharanthus roseus* wie die Vakuolen, das ER oder Mitochondrien, aber auch die Zellwand, der bisher nur in Hyperakkumulatoren eine Beteiligung in der Nickelkomplexierung zugesprochen wurde (Krämer *et al.*, 2000), schienen Nickel und Cobalt zu binden und möglicherweise auch in Detoxifizierungsprozessen involviert zu sein. An welche Moleküle Nickel und Cobalt im Zytosol oder der Vakuole binden, wurde durch die Detektion mit Newport Green DCF nicht ersichtlich. Die Informationen über Bindungspartner, Bindemoleküle bzw. Chelatoren von Ni(II) und Co(II) in Pflanzenzellen oder bestimmten Organellen wurden von Krämer *et al.* (2000) anhand von XAS (*X-ray absorption spectroscopy*) oder Fraktionierung mit anschließender ICP-MS bzw. ⁶³Ni-Szintillation gewonnen. Diese Methoden zeigten, dass für die Nickelaufnahme in Hyperakkumulatoren N-haltige Liganden nötig war, durch die Ni²⁺ und Co²⁺ mit einer deutlichen Selektivität für Ni²⁺ (7:1) in Zellen aufgenommen und in Blättern gespeichert wurde (Still und Williams, 1980). Die Mechanismen der Lagerung und Detoxifizierung waren zudem von der Pflanzenart, bei kompletten Pflanzen vom Ort im Habitus, aber auch von der Metallverbindung abhängig (Vögeli-Lange und Wagner, 1989; Brune *et al.*, 1994; Brune *et al.*, 1995; Gries und Wagner, 1998; Asemaneh *et al.*, 2006).

Die Detektion von Ni(II) u.a. an der Zellwand bestätigte, dass Newport Green DCF komplexiertes Ni(II) detektieren konnte (Thompson *et al.*, 2002). Eine prozentuale Verteilung auf die verschiedenen Kompartimente und Zellareale war durch optische Methoden sehr schwierig, da nicht das gesamte Volumen der Zellen auf seine Fluoreszenzintensität differenziert untersucht werden konnte. Deshalb konnte lediglich die Zellwand, die Vakuolen, das ER oder Mitochondrien als *target* für Ni(II) und Co(II) in Pflanzenzellen beschrieben werden. Eine Quantifizierung der Nickel- und Cobaltionen in Pflanzenzellen durch optische Detektionsmethoden wie dem CLSM war ebenfalls nicht möglich, aber eine Einschätzung, dass ein Großteil des detektierten Nickels in Vakuolen lokalisiert war.

4.4 Vergleich der Nickel- und Cobaltaufnahme und deren Lokalisation zwischen humanen Gingiva-Fibroblasten und *Catharanthus roseus*-Zellen

Ein Vergleich der Nickel- und Cobaltaufnahme in die humanen Gingiva-Fibroblasten mit der Aufnahme in die *Catharanthus roseus*-Zellen zeigte, dass die Fluoreszenzintensitäten in den Fibroblasten mit zunehmender Inkubationszeit mit den Metallverbindungen bei den verschiedenen Metallkonzentrationen anstiegen. Dieser Trend war in den Pflanzenzellen nicht so deutlich zu beobachten, da bereits nach 24 h hohe Fluoreszenzintensitäten in den *Catharanthus roseus*-Zellen beobachtet wurden. Am auffälligsten war, dass in den Pflanzenzellen unabhängig von der Inkubationszeit und der geringen Konzentration aller Metallverbindungen Fluoreszenz im Zell-

kern detektiert wurde. Nach 24 h war bei allen vier Verbindungen, aber auch schon früher bei 1 h oder 8 h Inkubation mit NiCl_2 , Fluoreszenz im Zellkern der Pflanzenzellen zu sehen. Bei den Fibroblasten wurde selbst nach 48 h Inkubation mit $500 \mu\text{M}$ CoCl_2 kaum Fluoreszenz im Zellkern, abgesehen von den Nukleoli, nachgewiesen. Bei Nickelverbindungen war eine Konzentration von $500 \mu\text{M}$ für 24 h notwendig, um Nickel im Zellkern konstant nachzuweisen.

Die Pflanzenzellen besaßen im Vergleich zu Fibroblasten Vakuolen, in denen sie toxische Stoffe lagern und dem Metabolismus unzugänglich machen konnte. Dadurch war in Pflanzenzellen ein Großteil des Nickels und Cobalts und damit der Fluoreszenz in den Vakuolen lokalisiert. Trotzdem schien genügend Nickel und Cobalt in die Zellen aufgenommen worden zu sein, dass nicht alle Nickel- und Cobaltionen in Vakuolen komplexiert gespeichert wurden und Nickel und Cobalt an weitere Strukturen des Zytoplasmas wie dem Zellkern, dem ER oder Mitochondrien binden konnte. In Fibroblasten existierten keine Vakuolen wie sie in den Pflanzen vorhanden waren, sodass Nickel und Cobalt an Moleküle im Zytoplasma gebunden haben, darunter auch Proteine oder Enzyme. Dies konnte die höhere Fluoreszenzintensität im Zytosol von Fibroblasten erklären.

Dadurch, dass Fibroblasten adhärente und flache Zellen waren, war eine mikroskopische Beobachtung der Zellen leichter als bei den Pflanzenzellen, die eine kugelige Form besaßen. Durch die Erweiterung der Blendenöffnung bei der Beobachtung der Pflanzenzellen, die einen Überblick über einen großen Teil der Zelle ermöglichte, wurden Fluoreszenzsignale aus Ebenen unter und über der Fokalebene detektiert, wodurch mehr Informationen gewonnen wurden, die Signale lichtstärker waren, aber die Auflösung geringer wurde. Dennoch konnte gezeigt werden, dass Nickel und Cobalt in beide Zelltypen aufgenommen wurde und detektierbar war. Die Lokalisation von Nickel und Cobalt an bestimmten Strukturen stimmten bei Fibroblasten und Pflanzenzellen weitestgehend überein. Nähere Informationen über Komplexpartner oder Bindestellen wurden anhand dieser optischen Detektionsmethode alleine nicht erreicht. Die gewählten Zelllinien stellten genetisch unveränderte und gesunde Zellen dar und wiesen dadurch einen normalen Metabolismus auf, wodurch die Resultate realitätsnäher waren als die von Tumorzellen.

Zur Detektion von Ni(II) und Co(II) in Pflanzenzellen reichte eine Konzentration von $1 \mu\text{g/ml}$ des optischen Sensors Newport Green DCF aus, um bereits nach kurzer Inkubationszeit Ni(II) und Co(II) in den Pflanzenzellen zu detektieren. Die Detektion von Ni(II) und Co(II) in Fibroblasten zeigte gute Ergebnisse bei einer Konzentration von $7 \mu\text{g/ml}$, die ebenfalls von Ke *et al.* (2006, 2007) beschrieben wurde. Es wurde deshalb vermutet, dass eine höhere Ni(II) - und Co(II) -Konzentration in den Pflanzenzellen im Vergleich zu Fibroblasten bestand, da Nickel und Cobalt für Pflanzenzellen essentiell waren (Nielsen und Sandstead, 1974; Eskew *et al.*, 1983; Brown *et al.*, 1987; Uthus und Seaborn, 1996; Gerendás *et al.*, 1999).

4.5 Vor- und Nachteile des optischen Sensors Newport Green DCF und der CLSM bei der Detektion von Metallspezies in einzelnen lebenden Zellen

Jede Methode zur Speziation besitzt bestimmte Vorteile gegenüber alternativen Methoden wie z.B. eine besonders sensitive Bestimmung von bestimmten Verbindungen oder eine exakte Quantifizierung, aber ebenso Nachteile wie die Einschränkung der Lokalisation einer Spezies in Zellen durch Analysen an *bulk*-Material. Oft gelangt man erst durch Zellfragmentierung oder Zerstörung der Zellen an Informationen, die durch die zusätzlichen Präparationsschritte wiederum Ursache für Artefakte sein können. Der Nachweis und die Lokalisation der toxischen und kanzerogenen Übergangsmetalle Nickel und Cobalt sowie ihrer Spezies in einzelnen lebenden Zellen sollte deshalb anhand der für Speziation unüblichen Methode, der CLSM, durchgeführt werden. Dabei war die Möglichkeit der Beobachtung einzelner lebender Zellen ohne Fixierung ein Vorteil gegenüber Methoden, die *bulk*-Material oder fixierte Zellen analysierten. Zum einen wurde die Erzeugung von Artefakten bei der Beobachtung lebender Zellen verringert, zum anderen wurden detailliertere und weiterführende Informationen über die Zellen oder bestimmte Zellareale gleichzeitig detektiert, wie z.B. die Form der Zellen oder die Lokalisation in bestimmten Organellen. Durch die Nutzung eines Auflichtmikroskops konnten Eintauchobjektive genutzt werden, um die Zellen lebend über einen begrenzten Zeitraum zu beobachten. Eine kontinuierliche Beobachtung über mehrere Tage könnte in sterilen Kammern in Medium mit CO₂- und Temperaturregelung erfolgen und dabei den Weg einer Spezies in einer Zelle verfolgen, wobei dafür inverse Systeme nötig wären. Die Nutzung von adhärennten Zellen wie den Fibroblasten, wäre dabei von Vorteil, weil sie mit inversen Systemen beobachtet werden könnten, sich ihre Position im Kulturgefäß kaum ändern würde und sie von ihrer Struktur und Größe gut zu beobachten wären. Bei Pflanzenzellen wäre die Beobachtung etwas schwieriger, da die Zellen nicht adhärennt sind und sich im Medium bewegen. Ihre Anzucht war in kleinen Kammern nicht möglich und so musste zur mikroskopischen Beobachtung ein Aliquot der Kultur entnommen werden, wodurch sie nicht mehr sterilen Bedingungen ausgesetzt waren und nicht mehr weiter kultiviert werden konnten. Oft hingen die Zellen als *Cluster* zusammen und die Aufnahme von Einzelzellen war erschwert.

Die CLSM ermöglichte die gleichzeitige Anregung fluoreszierender Moleküle in einer Probe mit unterschiedlichen Laserlinien, aber auch die gleichzeitige Detektion mehrerer Emissionsbereiche. Dabei war die Trennung der Signale am besten, wenn keine Überlagerung der Emissionsspektren vorlag. Um Verbindungen mit dem CLSM in lebenden Zellen zu detektieren und zu lokalisieren, mussten diese Fluoreszenz aufweisen, die mit Laserenergie angeregt werden konnte ohne die Zellen zu zerstören. Oft war dies wie im Fall von U(VI), Eu(III) und Cm(III) nicht der Fall (Tits *et al.*, 2003; Baumann *et al.*, 2005; Arnold *et al.*, 2006) und somit wurden Metall-spezifische

optische Sensoren wie das verwendete Newport Green DCF benötigt. Für einige Metalle, v.a. Zn^{2+} , existierte eine große Zahl verschiedener Farbstoffe. Diese waren meist spezifisch für einen Oxidationszustand und nur für einige Ionen vorhanden, aber im Falle von Newport Green DCF nicht absolut spezifisch für nur ein Metall. Newport Green DCF war zwar selektiv für Zn^{2+} , Co^{2+} und Ni^{2+} gegenüber Ca^{2+} und Mg^{2+} und zeigte bei Co^{2+} und Ni^{2+} deutlich die stärkste Fluoreszenzverstärkung, doch eine eindeutige Bestimmung bei unbekanntem Metallverbindungen war dadurch nicht möglich. Man erhielt Information über den Oxidationszustand eines detektierten Ions, aber bestand ein anderer Oxidationszustand, konnte das Metall nicht detektiert werden. Herrschten geringe Metallkonzentrationen vor, wurde die Fluoreszenzintensität minimal verstärkt und eine Unterscheidung von geringer Fluoreszenzintensität zur Hintergrundfluoreszenz durch ungebundene Sensoren war kaum möglich. Das Ergebnis konnte falsch interpretiert werden. Durch die Detektion der Emission und die Aufnahme von Fluoreszenzspektren der optischen Sensoren, sowie der Zell-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffe oder Transmissionsaufnahmen konnten diese in der Zelle lokalisiert und eine Zuordnung zu Zellkompartimenten gezeigt werden. Da Fluoreszenzfarbstoffe bei Belichtung zumeist ausbleichen, sind Fluoreszenzfarbstoffe für eine dauerhafte Beobachtung nur eingeschränkt nutzbar. Ebenso könnte die Komplexbildung der Metalle mit dem optischen Sensor die Mobilität des Nickels und Cobalts einschränken oder verändern und damit Ergebnisse verfälschen. Eine Langzeitbeobachtung des Nickel- und Cobalttransports innerhalb der Zellen war deshalb nicht möglich.

Durch die Nutzung von Laserlicht war die laterale Auflösung durch die Wellenlänge eingeschränkt. Dafür ermöglichte der konfokale Aufbau eine detaillierte Beobachtung einzelner Schichten einer Probe und verringerte die Hintergrundfluoreszenz durch das Ausschalten der Ebenen außerhalb der Fokalebene. Bei transluzenten Zellen war dies nicht so entscheidend, da man durch die Vergrößerung des Blendendurchmessers Informationen nahezu aus allen Ebenen einer Zelle erhalten konnte und bei flachen Zellen ein Großteil der Information mit einer Aufnahme gewonnen wurden. Da die Lichtstärke im Vergleich zu einem normalen Fluoreszenzmikroskop bei einem Blendendurchmesser von 1 Airy minimiert war und nur die Fokalebene sichtbar wurde, konnte dies sogar nachteilig sein. Vergrößerte man den Blendendurchmesser, wurde das Bild lichtstärker, aber die Konfokalität und damit die Schärfe der Aufnahme verringerte sich. Die Fibroblasten waren adhärenz, flache Zellen, die mit dem CLSM so beobachtet werden konnten, dass der Blendendurchmesser bei 1 Airy und die Lichtstärke gute Aufnahmen lieferten. Da die Pflanzenzellen eher rund waren und ein großes Volumen einnahmen, erlangte man erst bei größeren Blendendurchmessern die Informationen über die ganze Zelle, wenn man keine Schnittaufnahmen machen wollte. Durch die Blendenöffnung erschienen die Zellen oft lichtstärker, da gleichzeitig Fluoreszenz einer anderen Zelle darunter detektiert wurde.

4.6 Lokalisation von Metallen in lebenden Zellen durch alternative Methoden

Die voran stehenden Abschnitte machten deutlich, dass die CLSM zur Darstellung einzelner lebender Zellen mit hoher lateraler Auflösung geeignet war. Des Weiteren konnte diese Technik genutzt werden, spezifische Fluoreszenzfarbstoffe in Zellen parallel zu detektieren, sodass Hinweise über die Lokalisation von Nickel und Cobalt in Zellen gewonnen werden konnten. Dies ist auch für andere Metalle möglich, für die Fluoreszenzfarbstoffe zur Verfügung stehen oder die Fluoreszenz unter physiologischen Bedingungen nach Anregung mit Laserlicht zeigen. Wie bereits erwähnt, war der Auflösung durch die Wellenlänge des emittierten Lichts Grenzen gesetzt. Eine ebenfalls optische Methode, die diese Grenzen überschreiten kann, ist die *Scanning Near-Field Optical Microscopy* (SNOM). Diese Technik erreicht eine Auflösung von bis zu 50 nm, wodurch Strukturen, die mit dem CLSM nicht aufgelöst dargestellt werden können, sichtbar werden (Betzig *et al.*, 1992). Die SNOM erlaubt eine detailliertere Darstellung einer Zelle oder eines Ausschnittes mit Informationen sowohl über die Topographie, als auch über die Fluoreszenz (Enderle *et al.*, 1998; Dunn, 1999). Die SNOM nutzt dabei eine sehr feine Metallspitze, die zunächst durch AFM (*atomic force microscope*) ein Bild der Zelle oder eines Ausschnittes darstellt, aber durch eine optische Faser ergänzt die Zellen belichten und das reflektierte oder emittierte Licht aufnehmen kann. Der geringe Amplitudenumfang in z-Richtung von 1 μm erschwert das *Scannen* von dickeren Objekten. Diese Art der Mikroskopie nutzt den Nahfeld-Effekte aus, um die hohe Auflösung zu erreichen. Die SNOM ermöglicht damit zwar eine bis zu dreimal so hohe Auflösung wie die CLSM, jedoch ist die Detektion nahezu auf die Oberfläche einer Zelle beschränkt, was eine Detektion von Organellen oder bestimmten Proteinen innerhalb einer Zelle ausschließt. Anforderungen an Zellen für deren Detektion mit dem SNOM sind zunächst die Adhäsion an eine Oberfläche. U.a. ist eine Fixierung der adhären Zellen nötig. Eine Beobachtung von Strukturen in Lösungen oder sogar lebenden Zellen in wässriger Lösung gelang jedoch 1998 Ben-Ami *et al.*, sowie Höppener *et al.* (2003) und Longo *et al.* (2008). Geht man noch weiter ins Detail, wäre eine Beobachtung einzelner Moleküle ein großer Fortschritt. So beschrieben Betzig und Chichester (1993) die Detektion einzelner Chromophore mit dem SNOM. Ließe sich ein einzelnes Molekül in einer lebenden Zelle in Lösung nachweisen, wäre die Detektion von metallspezifischen Farbstoffen weiterhin auf die Oberfläche der Zelle beschränkt.

Eine Eingrenzung der Lokalisation eines Farbstoffes oder der Eigenfluoreszenz eines Metalls auf das Zytosol oder die Außenseite einer Zelle, sei es die Membran oder Zellwand, kann zudem mit der FACS (*fluorescence activated cell sorting*)-Methode analysiert und gleichzeitig quantifiziert werden. Bei der FACS-Methode wird die Fluoreszenz jeder einzelnen Zelle gemessen.

Um das Zytoplasma von der Zellwand oder Außenseite der Zelle zu differenzieren, müssen Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden, die entweder in der Zelle fluoreszieren oder nur außen binden und die Membran nicht passieren. Weitere Zuordnungen auf Zellareale können nicht erfolgen.

Für die Detektion von Metallen in einzelnen lebenden Zellen eignet sich beschriebenermaßen nur die konventionelle oder die konfokale Fluoreszenzmikroskopie. Eine höhere Auflösung und gleichzeitig ein Elementmapping kann mit der EDX (*energy dispersive X-ray spectroscopy*) erreicht werden, aber dazu ist wieder eine Fixierung der Zellen nötig, die Artefakte mit sich bringt und keine Analyse von lebenden Zellen und damit keine Langzeitanalyse erlaubt. Allerdings greift die Aufnahme von Spektren nicht in den Metabolismus ein, wie es bei Fluoreszenzfarbstoffen der Fall ist.

4.7 Fazit und Ausblick

Der Nachweis von Metallen, im Speziellen Ni(II) und Co(II) aufgrund ihrer essentiellen und gleichzeitig toxischen und kanzerogenen Eigenschaften für Organismen, durch optische Methoden wie der CLSM, wurde als Alternative zu etablierten analytischen Methoden auf ihre Anwendbarkeit untersucht. Dabei war die laterale Auflösung der Detektion und der Nachweis der Metalle in einzelnen lebenden Zellen ein bedeutendes Ziel. Es sollte ein Weg aufgezeigt werden, metabolische Prozesse oder Transportwege unterschiedlicher Ionen oder Verbindungen nachzuvollziehen, die auf unterschiedlichste Weise in einen Organismus gelangen, und Spezies zu unterscheiden.

Die verschiedenen chemischen Eigenschaften erlaubten es nicht allen Elementen, Eigenfluoreszenz unter biologisch kompatiblen Bedingungen nach Anregung mit Licht aufzuweisen, sodass eine direkte Detektion mit dem CLSM nicht möglich war und optische Sensoren eingesetzt werden mussten. Dies schränkte den Nachweis an zu untersuchenden Metallionen ein, wobei die Forschung fortlaufend neue optische Sensoren entwickelt. Quantifizierungen von Ionenkonzentrationen waren dabei lediglich vergleichend möglich, da die Fluoreszenz der Zellen, die Basisfluoreszenz der Chromophore und Enzymaktivität zusätzlich zur Beeinflussung durch die *target*-Ionen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität des optischen Sensors nahmen. Ein Anhaltspunkt hierfür waren auch Angaben der Fluoreszenzverstärkung durch Ionenbindung der Hersteller.

Nickel und Cobalt zeigten nach Anregung mit Laserlicht keine Eigenfluoreszenz, sodass der Einsatz eines optischen Sensors zur Detektion geprüft wurde. Es zeigte sich, dass die CLSM in der Lage war, die Aufnahme von Nickel und Cobalt nach Exposition mit 100 μM bis 500 μM verschiedener Verbindungen in humanen Gingiva-Fibroblasten und nach Zugaben von 100 μM der gleichen Verbindungen in Pflanzenzellen mittels optischem Sensor Newport Green DCF zu detektieren und deren Unterschiede in der Aufnahme, Konzentration und Lokalisation bedingt

aufzuzeigen. Die Unterschiede waren jedoch gering, da Nickel aus wasserlöslichen Verbindungen unabhängig von der Spezies als divalentes Kation in die Zellen aufgenommen wurde. Wasserunlösliche Nickelpartikel wurden zwar phagozytiert, doch innerhalb der sauren Vakuolen in den Zellen gelöst, sodass Nickel ebenfalls als divalentes Kation vorlag und dadurch an die gleichen Stellen binden konnte wie Nickel aus wasserlöslichen Verbindungen. Die Ni_3S_2 -Partikel selbst konnten nicht detektiert werden. Mit Hilfe weiterer spezifischer Fluoreszenzfarbstoffe für Zellstrukturen wie den Zellkern, das Zytosol, das ER, Vakuolen und bedingt Mitochondrien und Lysosomen konnte die Lokalisation auf diese Kompartimente eingrenzt werden. Man muss bedenken, dass die Ergebnisse aus *in vitro* Versuchen nicht immer 100 % auf einen Organismus übertragen werden können, da die Aufenthaltsdauer von löslichen Metallverbindungen, die z.B. durch die Atmung in Zellen aufgenommen werden, durch metabolische *clearance*-Effekte der Lunge *in vivo* verkürzt ist (Coogan *et al.*, 1989a).

Genaue Aussagen über bestimmte Spezies, Verbindungen oder Bindungsstellen in den Zellen konnten anhand der CLSM mit optischen Sensoren nur schwer getroffen werden. So ließ sich zwar durch die hohe Selektivität der Farbstoffe für bestimmte divalente Kationen und Oxidationszustände die Oxidationszahl bestimmen, aber welche Verbindungen oder Komplexe in den Zellen vorlagen, war selbst mit Aufnahmen von Fluoreszenzspektren nicht zu bestimmen. Dazu waren ergänzende Methoden nötig.

Fluoreszenzfarbstoffe unterliegen meist *Bleaching*-Effekten, sodass kontinuierliche Beobachtungen selbst mit CO_2 -Zufuhr und optimaler Temperierung unter sterilen Bedingungen zeitlich eingeschränkt sind. Eine Beeinflussung der Mobilität der Ionen durch Farbstoffe kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Gelingt es, Metallionen oder andere toxischen Ionen ohne Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen *live-on-stage* zu detektieren, könnte ihr Weg in die Zellen und innerhalb der Zellen lückenlos nachverfolgt werden und man würde bedeutende Informationen über die Wirkung dieser Ionen oder bisher weniger erforschten Ionen in Zellen und damit ihre Auswirkungen auf Zellen erhalten. Durch den Einsatz von Newport Green DCF konnte bereits 2010 die Aufnahme von Titan in Osteoklasten nach deren Kultivierung auf Titanoberflächen nachgewiesen werden (Cadosch *et al.*, 2009; Cadosch *et al.*, 2010). Das gesundheitsgefährdende Potenzial durch die Aufnahme von Partikeln oder Ionen aus medizinischen Werkstoffen oder chirurgischen oder dentalen Implantaten wie Titan, Platin oder Gold, aber auch Nickel und Cobalt und anderer Elemente, kann untersucht und für den Organismus bestimmt werden. Damit kann die Beschaffenheit und Anwendung weiter verbessert werden und das Risiko von Allergien oder gesundheitlichen Problemen verringert werden. 1989 fasste Coogan *et al.* toxische und kanzerogene Effekte durch Nickel-haltige Dentalprothesen und Schmuck in einem Review zusammen (Coogan *et al.*, 1989b). Ebenso kann die Methode verwendet werden, Einflüsse von toxischen Ionen auf andere Organismen wie Pflanzen zu beobachten, die eventuell Einfluss auf weitere

Organismen ausüben. Wachsen Pflanzen auf verunreinigtem Boden, so kann die Aufnahme, Lokalisation und der Oxidationszustand der potenziell toxischen Ionen in der Zelle beobachtet und ihr gesundheitsgefährdendes Potenzial bewertet werden.

Literaturverzeichnis

Abbracchio, M. P., Heck, J. D., and Costa, M. (1982a). The phagocytosis and transforming activity of crystalline metal sulfide particles are related to their negative surface charge. *Carcinogenesis*, 3(2):175–180.

Abbracchio, M. P., Simmons-Hansen, J., and Costa, M. (1982b). Cytoplasmic dissolution of phagocytized crystalline nickel sulfide particles: a prerequisite for nuclear uptake of nickel. *Journal of toxicology and environmental health*, 9(4):663–676.

Abercrombie, M. (1978). Fibroblasts. *Journal of Clinical Pathology. Supplement (Royal College of Pathologists)*, 12:1–6.

Agranoff, D., Monahan, I., Mangan, J. A., Butcher, P. D., and Krishna, S. (1999). *Mycobacterium tuberculosis* expresses a novel pH-dependent divalent cation transporter belonging to the Nramp family. *Journal of Experimental Medicine*, 190(5):717–724.

Andrews, N. C. (1999). The iron transporter DMT1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31:991–994.

Antunes, P. M. and Kreager, N. J. (2009). Development of the terrestrial biotic ligand model for predicting nickel toxicity to barley (*Hordeum vulgare*): ion effects at low pH. *Environmental toxicology and chemistry*, 28(8):1704–1710.

Arnold, T., Utsunomiya, S., Geipel, G., Ewing, R. C., Baumann, N., and Brendler, V. (2006). Adsorbed U(VI) surface species on Muscovite identified by laser fluorescence spectroscopy and transmission electron microscopy. *Environmental Science & Technology*, 40(15):4646–4652.

Asemaneh, T., Ghaderian, S. M., Crawford, S. A., Marshall, A. T., and Baker, A. J. M. (2006). Cellular and subcellular compartmentation of Ni in the Eurasian serpentine plants *Alyssum bracteatum*, *Alyssum murale* (Brassicaceae) and *Cleome heratensis* (Capparaceae). *Planta*, 225:193–202.

Astrom, M. and Björklund, A. (1996). Hydrogeochemistry of a stream draining sulfide-bearing postglacial sediments in finland. *Water, Air, and Soil Pollution*, 89:233–246.

- Babich, H. and Stotzky, B. (1982). Toxicity of nickel in microorganisms in soil: influence of some physicochemical characteristics. *Environmental Pollution*, 29:303–315.
- Bal, W., Lukszo, J., and Kasprzak, K. S. (1996). Interactions of nickel(II) with histones: enhancement of 2'-deoxyguanosine oxidation by Ni(II) complexes with CH₃CO-Cys-Ala-Ile-His-NH₂, a putative metal binding sequence of histone H3. *Chemical Research in Toxicology*, 9(2):535–540.
- Bal, W., Lukszo, J., and Kasprzak, K. S. (1998). Interactions of nickel(II) with histones: interactions of nickel(II) with CH₃Co-Thr-Glu-Ser-His-His-Lys-NH₂, a peptide modeling the potential metal binding site in the „C-tail“ region of histone H2A. *Chemical Research in Toxicology*, 11(9):1014–1023.
- Barceloux, D. G. (1999a). Cobalt. *Clinical Toxicology*, 37(2):201–216.
- Barceloux, D. G. (1999b). Nickel. *Clinical Toxicology*, 37(2):239–258.
- Barkla, B. J., Zingarelli, L., Blumwald, E., and Smith, J. A. (1995). Tonoplast Na⁺/H⁺ antiport activity and its energization by the vacuolar H⁺-ATPase in the halophytic plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Physiology*, 109:549–556.
- Basketter, D. A., Briatico-Vangosa, G., Kaestner, W., Lally, C., and Bontinck, W. J. (1993). Nickel, cobalt and chromium in consumer products: a role in allergic contact dermatitis? *Contact Dermatitis*, 28:15–25.
- Bast, E. (1988). Nickel requirement for the formation of active urease in purple sulfur bacteria (Chromatiaceae). *Archives of Microbiology*, 150:6–10.
- Battersby, A. R. (1993). Biosynthesis of Vitamin B₁₂. *Accounts of Chemical Research*, 26:15–21.
- Baumann, N., Brendler, V., Arnold, T., Geipel, G., and Bernhard, G. (2005). Uranyl sorption onto gibbsite studied by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS). *Journal of Colloid and Interface Science*, 290:318–324.
- Ben-Ami, N., Radko, A., Ben-Ami, U., Lieberman, K., Rothman, Z., Rabin, I., and Lewis, A. (1998). Near-field optical imaging of unstained bacteria: comparison with normal atomic force and far-field optical microscopy in air and aqueous media. *Ultramicroscopy*, 71:321–325.
- Betzig, E. and Chichester, R. J. (1993). Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy. *Science*, 262:1422–1425.
- Betzig, E., Finn, P. L., and Weiner, J. S. (1992). Combined shear force and near-field scanning optical microscopy. *Applied Physics Letters*, 60(20):2484–2486.

- Beyersmann, D. and Hartwig, A. (1992). The genetic toxicology of cobalt. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 115:137–145.
- Borochoy, N., Ausio, J., and Eisenberg, H. (1984). Interaction and conformational changes of chromatin with divalent ions. *Nucleic Acid Research*, 12(7):3089–3096.
- Briat, J.-F. and Lebrun, M. (1999). Plant responses to metal toxicity. *Plant biology and pathology*, 322:43–54.
- Broday, L., Cai, J., and Costa, M. (1999). Nickel enhances telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research*, 440:121–130.
- Broday, L., Peng, W., Kuo, M.-H., Salnikow, K., Zoroddu, M., and Costa, M. (2000). Nickel compounds are novel inhibitors of histone H4 acetylation. *Cancer Research*, 60:238–241.
- Brommundt, G. and Kavalier, F. (1987). La^{3+} , Mn^{2+} , and Ni^{2+} effects on Ca^{2+} pump and on $\text{N}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ exchange in bullfrog ventricle. *The American Physiological Society*, 1:C45–C51.
- Brooks, R. R., Lee, J., Reeves, R. D., and Jaffre, T. (1977). Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. *Journal of Geochemical Exploration*, 7:49–57.
- Brooks, R. R., Shaw, S., and Marfil, A. A. (1981). The chemical form and physiological function of nickel in some Iberian *Alyssum* species. *Physiologia Plantarum*, 41:2868–2876.
- Brown, P. H., Welch, R. M., and Cary, E. E. (1987). Nickel: a micronutrient essential for higher plants. *Plant Physiology*, 85:801–803.
- Brune, A., Urbach, W., and Dietz, K.-J. (1994). Compartmentation and transport of zinc in barley primary leaves as basic mechanisms involved in zinc tolerance. *Plant, Cell and Environment*, 17:153–162.
- Brune, A., Urbach, W., and Dietz, K.-J. (1995). Differential toxicity of heavy metals is partly related to a loss of preferential extraplasmic compartmentation: a comparison of Cd-, Mo-, Ni- and Zn-stress. *New Phytologist*, 129:403–409.
- Burdette, S. C., Walkup, G. K., Spingler, B., Tsien, R. Y., and Lippard, S. J. (2001). Fluorescent sensors for Zn^{2+} based on a fluorescein platform: synthesis, properties and intracellular distribution. *Journal of the American Chemical Society*, 123(32):7831–7841.
- Burrows, D. D. (1997). Metals. *Clinics in Dermatology*, 15:505–509.

- Cadosch, D., Al-Mushaiqri, M. S., Gautschi, O. P., Meagher, J., Simmen, H.-P., and Filgueira, L. (2010). Biocorrosion and uptake of titanium by human osteoclasts. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 95A:1004–1010.
- Cadosch, D., Meagher, J., Gautschi, O. P., and Filgueira, L. (2009). Uptake and intracellular distribution of various metal ions in human monocyte-derived dendritic cells detected by Newport Green™ DCF diacetate ester. *Journal of Neuroscience Methods*, 178:182–187.
- Carter, E. L., Flugga, N., Boer, J. L., Mulrooney, S. B., and Hausinger, R. P. (2009). Interplay of metal ions and urease. *Metallomics*, 1(3):207–221.
- Cellier, M., Privé, G., Belouchi, A., Kwan, T., Rodrigues, V., Chia, W., and Gros, P. (1995). Nramp defines a family of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 92:10089–10093.
- Chen, B., Yu, Y., Zhou, Z., and Zhong, P. (2004). Synthesis of novel nanocrystals as fluorescent sensors for Hg²⁺ ions. *Chemistry Letters*, 33(12):1608–1609.
- Chen, H., Davidson, T., Singleton, S., Garrick, M. D., and Costa, M. (2005). Nickel decreases cellular iron level and converts cytosolic aconitase to iron-regulatory protein 1 in A549 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 206:275–287.
- Chen, X.-Z., Peng, J.-B., Cohen, A., Nelson, H., Nelson, N., and Hediger, M. A. (1999). Yeast SMF1 mediates H⁺-coupled iron uptake with concomitant uncoupled cation currents. *Environmental Health Perspectives*, 274(49):69–79.
- Christ, D. R., Christ, R. H., Martin, J. R., and Watson, J. R. (1994). Ion exchange systems in proton-metal reactions with algal cell walls. *FEMS Microbiology Reviews*, 14:309–314.
- Clemens, S. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis (Review). *Planta*, 212:475–486.
- Clemens, S., Bloss, T., Vess, C., Neumann, D., Nies, D. H., and zur Nieden, U. (2002). A transporter in the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe* cells mediates zinc storage and differentially affects transition metal tolerance. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(20):18215–18221.
- Cloez, I., Dumont, O., Piciotti, M., and Bourre, J. M. (1987). Alterations of lipid synthesis in the normal and dysmyelinating trembler mouse sciatic nerve by heavy metals (Hg, Pb, Mn, Cu, Ni). *Toxicology*, 46:65–71.
- Coogan, T. P., Latta, D. M., Imbra, R. J., and Costa, M. (1989a). Effect of Nickel(II) on DNA-protein interactions. *Biological Trace Element Research*, 21:13–21.

- Coogan, T. P., Latta, D. M., Snow, E. T., and Costa, M. (1989b). Toxicity and carcinogenicity of nickel compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, 19:341–384.
- Costa, M. (1995). Model for the epigenetic mechanism of action of nongenotoxic carcinogens. *American Journal of Clinical Nutrition*, 61(3):666S–669S.
- Costa, M., Abbracchio, M. P., and Simmons-Hansen, J. (1981a). Factors influencing the phagocytosis, neoplastic transformation, and cytotoxicity of particulate nickel compounds in tissue culture systems. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 60:313–323.
- Costa, M., Davidson, T. L., Chen, H., Ke, Q., Zhang, P., Yan, Y., Huang, C., and Kluz, T. (2005). Nickel carcinogenesis: Epigenetics and hypoxia signaling. *Mutation Research*, 592:79–88.
- Costa, M. and Heck, J. D. (1982). Specific nickel compounds as carcinogens. *Trends in Pharmacological Sciences*, 3:408–410.
- Costa, M. and Mollenhauer, H. H. (1980a). Carcinogenic activity of particulate nickel compounds is proportional to their cellular uptake. *Science*, 209:515–517.
- Costa, M. and Mollenhauer, H. H. (1980b). Phagocytosis of nickel subsulfide particles during the early stages of neoplastic transformation in tissue culture. *Cancer Research*, 40:2688–2694.
- Costa, M., Simmons-Hansen, J., Bedrossian, C. W. M., Bonura, J., and Caprioli, R. M. (1981b). Phagocytosis, cellular distribution, and carcinogenic activity of particulate nickel compounds in tissue culture. *Cancer Research*, 41:2868–2876.
- Costa, M., Sutherland, J. E., Peng, W., Salnikow, K., Broday, L., and Kluz, T. (2001). Molecular biology of nickel carcinogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 222:205–211.
- Costa, M., Yan, Y., Zhao, D., and Salnikow, K. (2003). Molecular mechanism of nickel carcinogenesis: gene silencing by nickel delivery to the nucleus and gene activation/inactivation by nickel-induced cell signaling. *Journal of Environmental Monitoring*, 5:222–223.
- Crooke, W. M. (1955). Further aspects of the relationship between nickel toxicity and iron supply. *Annals of Applied Biology*, 43(3):465–476.
- Crooke, W. M. (1956). Effect of soil reaction on uptake of nickel from a serpentine soil. *Soil Science*, 81:269–276.
- Crooke, W. M., Hunter, J. G., and Vergnano, O. (1955). The relationship between nickel toxicity and iron supply. *Annals of Applied Biology*, 41(2):311–324.

- Davidson, T., Chen, H., Garrick, M. D., D'Angelo, G., and Costa, M. (2005). Soluble nickel interferes with cellular iron homeostasis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 279:157–162.
- Denkhaus, E. and Salnikow, K. (2002). Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 42:35–56.
- Dennis, M. and Kolattukudy, P. E. (1992). A cobalt-porphyrin enzyme converts a fatty aldehyde to a hydrocarbon and CO. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 89:5306–5310.
- Devinney II, M. J., Reynolds, I. J., and Dineley, K. E. (2005). Simultaneous detection of intracellular free calcium and zinc using fura-2EF and FluoZin-3. *Cell Calcium*, 37:225–232.
- Dineley, K. E., Malaiyandi, L. M., and Reynolds, I. J. (2002). A reevaluation of neuronal zinc measurements: artifacts associated with high intracellular dye concentration. *Molecular Pharmacology*, 62(3):618–627.
- Dixon, N. E., Gazzola, C., Blakeley, R. L., and Zerner, B. (1975). Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? *Journal of the American Chemical Society*, 97(14):4131–4133.
- Dixon, N. E., Riddles, P. W., Gazzola, C., Blakeley, R. L., and Zerner, B. (1980). Jack bean urease (EC 3.5.1.5). V. On the mechanism of action of urease on urea, formamide, acetamide, N-methylurea, and related compounds. *Canadian Journal of Biochemistry*, 58(12):1335–1344.
- Doll, R. (1958). Cancer of the lung and nose in nickel workers. *British Journal of Industrial Medicine*, 15(4):217–223.
- Doll, R., Morgan, L. G., and Speizer, F. E. (1970). Cancer of the lung and nasal sinuses in nickel workers. *British Journal of Cancer*, 24(4):623–632.
- Domaille, D. W., Que, E. L., and Chang, C. J. (2008). Synthetic fluorescent sensors for studying the cell biology of metals. *Nature Chemical Biology*, 4(3):168–175.
- Dunn, R. C. (1999). Near-field scanning optical microscopy. *Chemical Reviews*, 99:2891–2927.
- Dunnick, J. K., Elwell, M. R., Radovsky, A. E., Benson, J. M., Hahn, F. F., Nikula, K. J., Barr, E. B., and Hobbs, C. H. (1995). Comparative carcinogenic effects of nickel subsulfide, nickel oxide, or nickel sulfate hexahydrate chronic exposures in the lung. *Cancer Research*, 55:5251–5256.
- Durham, T. R. and Snow, E. T. (2006). Metal ions and carcinogenesis. *Cancer: Cell Structures, Carcinogens and Genomic Instability*, 96:97–130.

- Eagle, H. (1955a). Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*, 122(3168):501–514.
- Eagle, H. (1955b). The specific amino acid requirements of a mammalian cell (strain L) in tissue culture. *The Journal of Biological Chemistry*, 214(2):839–852.
- Eichhorn, G. L. and Shin, Y. A. (1968). Interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds. XII. The relative effect of various metal ions on DNA helicity. *Journal of the American Chemical Society*, 90(26):7323–7328.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J., and Guerinot, M. L. (1996). A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci*, 93:5624–5628.
- Eitinger, T., Suhr, J., Moore, L., and Smith, J. A. C. (2005). Secondary transporters for nickel and cobalt ions: theme and variations. *BioMetals*, 18:399–405.
- Enderle, T., Ha, T., Chemla, D. S., and Weiss, S. (1998). Near-field fluorescence microscopy of cells. *Ultramicroscopy*, 71:303–309.
- Eng, B. H., Guerinot, M. L., Eide, D., and Jr., M. H. S. (1998). Sequence analyses and phylogenetic characterization of the ZIP family of metal ion transport proteins. *The Journal of Membrane Biology*, 166:1–7.
- Eskew, D. L., Welch, R. M., and Cary, E. E. (1983). Nickel: An essential micronutrient for legumes and possibly all higher plants. *Science*, 222(11):621–623.
- Eskew, D. L., Welch, R. M., and Norvell, W. A. (1984). Nickel in higher plants. *Plant Physiology*, 76:691–693.
- Evans, R. M., Davies, P. J. A., and Costa, M. (1982). Video time-lapse microscopy of phagocytosis and intracellular fate of crystalline nickel sulfide particles in cultured mammalian cells. *Cancer Research*, 42:2729–2735.
- Fischer, R. G., Rapsomanikis, S., and Andreae, M. O. (1995). Bioaccumulation of methylmercury and transformation of inorganic mercury by macrofungi. *Environmental Science and Technology*, 29(4):993–999.
- Fischer, T. and Rystedt, I. (1983). Cobalt allergy in hard metal workers. *Contact Dermatitis*, 9:115–121.
- Fletcher, G. G., Rossetto, F. E., Turnbull, J. D., and Nieboer, E. (1994). Toxicity, uptake and mutagenicity of particulate and soluble nickel compounds. *Environmental Health Perspectives*, 102:69–79.

- Forbes, J. R. and Gros, P. (2001). Review: Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. *TRENDS in Microbiology*, 9(8):397–403.
- Forbes, J. R. and Gros, P. (2003). Iron, manganese, and cobalt transport by Nramp1 (Slc11a1) and Nramp2 (Slc11a2) expressed at the plasma membrane. *BLOOD*, 102(5):1884–1892.
- Fox, T. C. and Guerinot, M. L. (1998). Molecular biology of cation transport in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49:669–696.
- Frank, S., Gaume, B., E. S. Bergmann-Leitner, W. W. L., Robert, E. G., Catez, F., Smith, C. L., and Youle, R. J. (2001). The role of dynamin-related protein 1a, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Developmental Cell*, 1:515–525.
- Freeman, J. L., Persans, M. W., Nieman, K., Albrecht, C., Peer, W., Pickering, I. J., and Salt, D. E. (2004). Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. *The Plant Cell*, 16:2176–2191.
- Gajewska, E., Wielanek, M., Bergier, K., and Sklodowska, M. (2009). Nickel-induced depression of nitrogen assimilation in wheat roots. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31:1291–1300.
- Garner, L. A. (2004). Contact dermatitis to metals. *Dermatologic Therapy*, 17:321–327.
- Garrick, M. D., Dolan, K. G., Horbinski, C., Ghio, A. J., Higgins, D., Porubcin, M., Moore, E. G., Hainsworth, L. N., Umbreit, J. N., Conrad, M. E., Feng, L., Lis, A., Roth, J. A., Singleton, S., and Garrick, L. M. (2003). DMT1: A mammalian transporter for multiple metals. *BioMetals*, 16:41–54.
- Garrick, M. D., Kuo, H.-C., Vargas, F., Singleton, S., Zhao, L., Smith, J. J., Paradkar, P., Roth, J. A., and Garrick, L. M. (2006a). Comparison of mammalian cell lines expressing distinct isoforms of divalent metal transporter 1 in a tetracycline-regulated fashion. *Biochemical Journal*, 398:539–546.
- Garrick, M. D., Singleton, S. T., Vargas, F., Kuo, H.-C., Zhao, L., Knöpfel, M., Davidson, T., Costa, M., Paradkar, P., Roth, J. A., and Garrick, L. M. (2006b). DMT1: Which metals does it transport? *Biological Research*, 39(1):79–85.
- Gaxiola, R. A., Fink, G. R., and d. Hirschi, K. (2002). Genetic manipulation of vacuolar proton pumps and transporters. *Plant Physiology*, 129:967–973.
- Gee, K. R., Zhou, Z.-L., Ton-That, D., Sensi, S. L., and Weiss, J. H. (2002). Measuring zinc in living cells. A new generation of sensitive and selective fluorescent probes. *Cell Calcium*, 31(5):245–251.

- Gendre, D., Czernic, P., Conejero, G., Pianelli, K., Briat, J.-F., Lebrun, M., and Mari, S. (2006). *TcYSL3*, a member of the *YSL* gene family from the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, encodes a nicotinamine-Ni/Fe transporter. *The Plant Journal*, 49:1–15.
- Gerendás, J., Polacco, J. C., Freyermuth, S. K., and Sattelmacher, B. (1999). Significance of nickel for plant growth and metabolism. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 162:241–256.
- Glennon, J. D. and Sarkar, B. (1982). Nickel(II) transport in human blood serum. *Biochemical Journal*, 203:15–23.
- Goswami, T., Bhattacharjee, A., Babal, P., Searle, S., Moore, E., Li, M., and Blackwell, J. M. (2001). Natural-resistance-associated macrophage protein 1 is an H⁺/bivalent cation antiporter. *Biochemical Journal*, 354:511–519.
- Green, H., Goldberg, B., and Todaro, G. J. (1966). Differentiated cell types and the regulation of collagen synthesis. *Nature*, 212:631–633.
- Gries, G. E. and Wagner, G. J. (1998). Association of nickel versus transport of cadmium and calcium in tonoplast vesicles of oat roots. *Planta*, 204:390–396.
- Griffith, J. K., Baker, M. E., Rouche, D. A., Page, M. G., Skurray, R. A., Paulsen, I. T., Chater, K. F., Baldwin, S. A., and Henderson, P. J. (1992). Membrane transport proteins: implications of sequence comparison. *Current Opinion in Cell Biology*, 4:684–695.
- Gruenheid, A., Cellier, M., Vidal, S., and Gros, P. (1995). Identification and characterization of a second mouse *Nramp* gene. *Genomics*, 25:514–525.
- Gruenheid, S., Canonne-Hergaux, F., Gauthier, Hackam, D. J., Grinstein, S., and Gros, P. (2001). The iron transport proteine NRAMP2 is an integral membrane glycoprotein that colocalizes with transferrin in recycling endosomes. *Developmental Cell*, 1:515–525.
- Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, 389:349–352.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F., Nussberger, S., Gollan, J. L., and Hediger, M. A. (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 388:482–488.
- Haber, L. T., Erdreicht, L., Diamond, G. L., Maier, A. M., Ratney, R., Zhao, Q., and Dourson, M. L. (2000). Hazard identification and dose response of inhaled nickel-soluble salts. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 31:210–230.

- Hall, J. L. (2002). Review: Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53(366):1–11.
- Halstead, R. L., Finn, B. J., and MacLean, A. J. (1969). Extractability of nickel added to soils and its concentration in plants. *Canadian Journal of Soil Science*, 49:335–342.
- Hambrock, A., Löffler-Walz, C., and Quast, U. (2002). Glibenclamide binding to sulphonylurea receptor subtypes: dependence on adenine nucleotides. *British Journal of Pharmacology*, 136:995–1004.
- Hamilton, E. I. (1994). The geobiochemistry of cobalt. *The Science of the Total Environment*, 150:7–39.
- Hartwig, A., Mullenders, L. H. F., Schlepegrell, R., Kasten, U., and Beyersmann, D. (1994). Nickel(II) interferes with the incision step in nucleotide excision repair in mammalian cells. *Cancer Research*, 54:4045–4051.
- Hartwig, A. and Schwerdtle, T. (2002). Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicology Letters*, 127:47–54.
- Haugland, R. P. (2002). *Handbook of fluorescent probes and research products*. Molecular Probes, 9 edition.
- Haynes, R. J. (1980). Ion exchange properties of roots and ionic interactions within the root apoplasm: their role in ion accumulation by plants. *Botanical Review*, 46(1):75–99.
- Heck, J. D. and Costa, M. (1983). Influence of surface charge and dissolution on the selective phygozytosis of potentially carcinogenic particulate metal compounds. *Cancer Research*, 43:5852–5856.
- Heredia, A., Jiménez, A., and Guillén, R. (1995). Composition of plant cell walls. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 200:24–31.
- Hildebrand, H. F., D'Hooghe, M. C., Shirali, P., Bailly, C., and Kerckaert, J. P. (1990). Uptake and biological transformation of βNiS and $\alpha\text{Ni}_3\text{S}_2$ by human embryonic pulmonary epithelial cells (L132) in culture. *Carcinogenesis*, 11(11):1943–1950.
- Hinkle, P. M., II, E. D. S., and Nelson, E. J. (1992). Measurement of intracellular cadmium with fluorescent dyes. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(35):25553–25559.
- Hirschi, K. (2001). Vacuolar $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ transport: who's directing the traffic. *TRENDS in Plant Science*, 6(3):100–104.

- Homer, F. A., Morrison, R. S., Brooks, R. R., Clemens, J., and Reeves, R. D. (1991). Comparative studies of nickel, cobalt, and copper uptake by some nickel hyperaccumulators of the genus *Alyssum*. *Plant and Soil*, 138:195–205.
- Hon, D. N.-S. (1994). Cellulose: a random walk along its historical path. *Cellulose*, 1:1–25.
- Houk, R. S., Fassel, V. A., Flesch, G. D., Svec, H. J., Gray, A. L., and Taylor, C. E. (1980). Inductively coupled argon plasma as an ion source for mass spectrometric determination of trace elements. *Analytical Chemistry*, 52(14):2283–2289.
- Höppener, C., Molenda, D., Fuchs, H., and Naber, A. (2003). Scanning near-field optical microscopy of a cell membrane in liquid. *Journal of Microscopy*, 210:288–293.
- Hughes, B. P. and Barritt, G. J. (1989). Inhibition of the liver cell receptor-activated Ca^{2+} inflow system by metal ion inhibitors of voltage-operated Ca^{2+} channels but not by other inhibitors of Ca^{2+} inflow. *Biochimica et Biophysica Acta*, 13(3):197–205.
- Ingle, R. A., Fricker, M. D., and Smith, J. A. C. (2008). Evidence for nickel/proton antiport activity at the tonoplast of the hyperaccumulator plant *Alyssum lesbiacum*. *Plant Biology*, 10:746–753.
- Ingle, R. A., Mugford, S. T., Rees, J. D., Campbell, M. M., and Smith, J. A. C. (2005). Constitutively high expression of the histidine biosynthetic pathway contributes to nickel tolerance in hyperaccumulator plants. *The Plant Cell*, 17:2089–2106.
- Jabri, E., Carr, M. B., Hausinger, R. P., and Karplus, P. A. (1995). The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*. *Science*, 268:998–1004.
- Jaffre, T., Brooks, R. R., Lee, J., and Reeves, R. D. (1976). *Sebertia acuminata*: a hyperaccumulator of nickel from New Caledonia. *Science*, 15:579–580.
- Jaffre, T., Kerstens, W., R. R. B., and Reeves, R. D. (1979). Nickel uptake by Flacourtiaceae of New Caledonia. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 205(1160):385–394.
- Jensen, S. and Jernelöv, A. (1969). Biological methylation of mercury in aquatic organisms. *Nature*, 223:753–754.
- Kampfenkel, K., Kushnir, S., Bablychuk, E., Inzé, D., and Montagu, M. V. (1995). Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(47):28479–28486.
- Kasprzak, K. S., Sunderman Jr., F. W., and Salnikow, K. (2003). Review: Nickel carcinogenesis. *Mutation Research*, 533:67–97.

- Kasten, U., Hartwig, A., and Beyersmann, D. (1992). Mechanisms of cobalt(II) uptake into V79 Chinese hamster cells. *Arch Toxicol*, 66:592–597.
- Kasten, U., Mullenders, L. H. F., and Hartwig, A. (1997). Cobalt(II) inhibits the incision and the polymerization step of nucleotide excision repair in human fibroblasts. *Mutation Research*, 383:81–89.
- Kato, Y., Meinrath, G., Kimura, T., and Yoshida, Z. (1994). A study of U(VI) hydrolysis and carbonate complexation by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS). *Radiochimica Acta*, 64:107–111.
- Ke, Q., Davidson, T., Chen, H., Kluz, T., and Costa, M. (2006). Alterations of histone modifications and transgene silencing by nickel chloride. *Carcinogenesis*, 27(7):1481–1488.
- Ke, Q., Davidson, T., Kluz, T., Oller, A., and Costa, M. (2007). Fluorescent tracking of nickel ions in human cultured cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 219(1):18–23.
- Kehres, D. G., Lawyer, C. H., and Maguire, M. E. (1998). The CorA magnesium transporter gene family. *Microbial and Comparative Genomics*, 3(3):151–169.
- Kerkeb, L. and Krämer, U. (2003). The role of free histidine in xylem loading of nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea*. *Plant Physiology*, 131:716–724.
- Kim, D., Gustin, J. L., Lahner, B., Persans, M. W., Baek, D., Yun, D.-J., and Salt, D. E. (2004). The plant CDF family from the Ni/Zn hyperaccumulator *Thlaspi goesingense* acts to enhance efflux of Zn at the plasma membrane when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Plant Journal*, 39:237–251.
- Klein, C. B., Conway, K., Wang, X. W., Bhamra, R. K., Lin, X., Cohen, M. D., Annab, L., Barrett, J. C., and Costa, M. (1991). Senescence of nickel-transformed cells by an X chromosome: possible epigenetic control. *Science*, 251:796–799.
- Komeda, H., Kobayashi, M., and Shimizu, S. (1997). A novel transporter involved in cobalt uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94:36–41.
- Kondo, K., Ozaki, T., Nakamura, Y., and Sakiyama, S. (1995). DAN gene product has an affinity for Ni²⁺. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1(1):209–215.
- Korshunova, Y. O., Eide, D., Clark, W. G., Guerinot, M. L., and Pakrasi, H. B. (1999). The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Molecular Biology*, 40(1):37–44.

- Kozlov, M. V. (2005). Pollution resistance of mountain birch, *Betula pubescens* subsp. *czerepanovii*, near the copper-nickel smelter: natural selection or phenotypic acclimation? *Chemosphere*, 59:189–197.
- Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F.-J., Wieshammer, G., and McGrath, S. P. (2001). Cellular compartmentation of nickel in the hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense*. *Journal of Experimental Botany*, 52(365):2291–2300.
- Küpper, H. P. M. H. K. (2007). *Metal ions in life sciences. Nickel in the environment and its role in the metabolism of plants and cyanobacteria*. Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R. K. O., Eds.; John Wiley: New York, 1 edition.
- Krämer, R. (1998). Fluoreszenz-Chemosensoren für Cu²⁺-Ionen: schnell, selektiv und hochempfindlich. *Angewandte Chemie*, 110(6):804–806.
- Krämer, U., Cotter-Howells, J. D., Charnock, J. M., Baker, A. J. M., and Smith, J. A. C. (1996). Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature*, 379(2):635–638.
- Krämer, U., Pickering, I. J., Prince, R. C., Raskin, I., and Salt, D. E. (2000). Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. *Plant Physiology*, 122:1343–1353.
- Kräutler, B. (2005). Vitamin B₁₂: chemistry and biochemistry. *Biochemical Society Transactions*, 33(4):806–810.
- Kuswandi, B. (2000). Optical chemical sensors for the determination of heavy metal ions: a mini review. *Jurnal ILMU DASAR*, 1(2):18–29.
- Lam-Yuk-Tseung, S., Govoni, G., Forbes, J., and Gros, P. (2003). Iron transport by *Nramp2*/DMT1: pH regulation of transport by 2 histidines in transmembrane domain 6. *Blood*, 101(9):3699–3707.
- Lee, J., Reeves, R. D., Brooks, R. R., and Jaffre, T. (1978). The relation between nickel and citric acid in some nickel-accumulating plants. *Phytochemistry*, 17:1033–1035.
- Lee, J. E., Ciccarelli, R. B., and Jennette, K. W. (1982). Solubilization of the carcinogen nickel subsulfide and its interaction with deoxyribonucleic acid and protein. *Biochemistry*, 21:771–778.
- Lee, Y.-W., Klein, C. B., Kargacin, B., Salnikow, K., Kitahara, J., Dowjat, K., Zhitkovich, A., Christie, N. T., and Costa, M. (1995). Carcinogenic nickel silences gene expression by chromatin condensation and DNA methylation: a new model for epigenetic carcinogens. *Molecular and Cellular Biology*, 15(5):2547–2557.

- Li, L., Tutone, A. F., Drummond, R. S. M., Gardner, R. C., and Luan, S. (2001). A novel family of magnesium transport genes in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 13:2761–2775.
- Li, Q., Ke, Q., and Costa, M. (2009). Alterations of histone modifications by cobalt compounds. *Carcinogenesis*, 30(7):1243–1251.
- Lindl, T. (2002). *Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*. Spektrum, Akademischer Verlag, 5 edition.
- Linsmaier, E. M. and Skoog, F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 18:100–127.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., and Darnell, J. (1996). *Molekulare Zellbiologie*. de Gruyter, 2 edition.
- Longo, G., Girasole, M., and Cricenti, A. (2008). Implementation of a biomorph-based aperture tapping-SNOM with an incubator to study the evolution of cultured living cells. *Journal of Microscopy*, 229:443–439.
- Macfie, S. M. and Welbourn, P. M. (2000). The cell wall as a barrier to uptake of metal ions in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39:413–419.
- Mackay, J. P. and Crossley, M. (1998). Zinc fingers are sticking together. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(1):1–4.
- Madhava Rao, K. V. and Sresty, T. V. S. (2000). Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*cajanus cajan* (L.) millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Science*, 157:113–128.
- Maeshima, M. (2001). Tonoplast transporters: organization and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52:469–497.
- Makui, H., Roig, E., Cole, S. T., Helmann, J. D., Gros, P., and Cellier, M. F. M. (2000). Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. *Molecular Microbiology*, 35(5):1065–1078.
- Martinoia, E., Maeshima, M., and Neuhaus, H. E. (2007). Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 58(1):83–102.
- Martinoia, E., Massonneau, A., and Frangne, N. (2000). Transport processes of solutes across the vacuolar membrane of higher plants. *Plant and Cell Physiology*, 41(11):1175–1186.

- McIlveen, W. D. and Negusanti, J. J. (1994). Nickel in the terrestrial environment. *The Science of the Total Environment*, 148:109–138.
- Meinrath, G. (1997). Uranium(VI) speciation by spectroscopy. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 224(1-2):119–126.
- Merrit, K., Brown, P. D., Brown, S., and Eng, D. (1981). Metal sensitivity reactions to orthopedic implants. *International Journal of Dermatology*, 20:89–94.
- Messer, R. L. W., Bishop, S., and Lucas, L. C. (1999). Effects of metallic ion toxicity on human gingival fibroblasts morphology. *Biomaterials*, 20:1647–1657.
- Messer, R. L. W. and Lucas, L. C. (1999). Evaluations of metabolic activities as biocompatibility tools: a study of individual ions' effects on fibroblasts. *Dental Materials*, 15:1–6.
- Messer, R. L. W. and Lucas, L. C. (2000). Cytotoxicity of nickel-chromium alloys: bulk alloys compared to multiple ion salt solutions. *Dental Materials*, 16:207–212.
- Mishra, D. and Kar, M. (1974). Nickel in plant growth and metabolism. *The Botanical Review*, 40(4):395–452.
- Mitchell, R. L. (1945). Cobalt and nickel in soils and plants. *Soil Science*, 60(1):63–70.
- Mobley, H. L. T. and Hausinger, R. P. (1989). Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiological Reviews*, 53(1):85–108.
- Molas, J. (2002). Changes in chloroplast ultrastructure and total chlorophyll concentration in cabbage leaves caused by excess of organic Ni(II) complexes. *Environmental and Experimental Botany*, 47:115–126.
- Muyllé, F. A. R., Adriaensen, D., Coen, W. D., Timmermans, J.-P., and Blust, R. (2006). Tracing of labile zinc in live fish hepatocytes using FluoZin-3. *BioMetals*, 19:437–450.
- Nelson, N. (1999). Metal ion transporters and homeostasis. *The EMBO Journal*, 18(16):4361–4371.
- Neumann, D., Nieden, U. Z., Lichtenberger, O., and Leopold, I. (1995). How does *Armeria maritima* tolerate high heavy metal concentrations? *Journal of Plant Physiology*, 146(5-6):704–717.
- Nielsen, F. H. (1996). How should dietary guidance be given for mineral elements with beneficial actions or suspected of being essential? *The Journal of Nutrition*, 126:2377S–2385S.

- Nielsen, F. H. and Sandstead, H. H. (1974). Are nickel, vanadium, silicon, fluorine and tin essential for man? A review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 27:515–520.
- Nishimura, K., Igarashi, K., and Kakinuma, Y. (1998). Proton gradient-driven nickel uptake by vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 180(7):1962–1964.
- Nolan, E. M. and Lippard, S. J. (2001). The Zinspy family of fluorescent zinc sensors: synthesis and spectroscopic investigations. *Inorganic Chemistry*, 43(26):8310–8317.
- Ostapczuk, P., Valenta, P., Stoepler, M., and Nürnberg, H. W. (1983). Voltammetric determination of nickel and cobalt in body fluids and other biological materials. *Chemical Toxicology and Clinical Chemistry of Metals*, pages 61–64.
- Palmiter, R. D. and Findley, S. D. (1995). Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *The EMBO Journal*, 14(4):639–649.
- Paulsen, I. T. and Saier Jr., M. H. (1997). A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *Journal of Membrane Biology*, 156:99–103.
- Pearson, M. A., Schaller, R. A., Michel, L. O., Karplus, P. A., and Hausinger, R. P. (1998). Chemical rescue of *Klebsiella aerogenes* urease variants lacking the carbamylated-lysine nickel ligand. *Biochemistry*, 37(17):6214–6220.
- Peterson, C. L. and Laniel, M.-A. (2004). Histones and histone modifications. *Current Biology*, 14(14):546–551.
- Petrat, F., Groot, H. D., and Rauen, U. (2001). Subcellular distribution of chelatable iron: a laser scanning microscopy study in isolated hepatocytes and liver endothelial cells. *Biochem. J.*, 356:61–69.
- Polacco, J. C. (1977). Nitrogen metabolism in soybean tissue culture. *Plant Physiology*, 59:827–830.
- Portnoy, M. E., Liu, X. F., and Culotta, V. C. (2000). *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the Nramp family of metal transporters. *Molecular and Cellular Biology*, 20(21):7893–7902.
- Portugal, J. and Waring, M. J. (1988). Assignment of DNA binding sites for 4'6-diamidine-2-phenylindole and bisbenzimidazole (Hoechst 33258). a comparative footprinting study. *Biochimica et Biophysica Acta*, 949:158–168.
- Poulik, Z. (1997). The danger of cumulation of nickel in cereals on contaminated soil. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 63:25–29.

- Punsar, S., Erametsa, O., Karvonen, M. J., Ryhänen, A., Hilska, P., and Vornamo, H. (1975). Coronary heart disease and drinking water: A search in two finnish male cohorts for epidemiologic evidence of a water factor. *Journal of Chronic Diseases*, 28:259–287.
- Rausser, W. E. (1999). Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biochemistry and Biophysiccs*, 31:19–48.
- Reisenauer, H. M. (1960). Cobalt in nitrogen fixation by a legume. *Nature*, 186:375–376.
- Robinson, B. H., Lombi, E., Zhao, F. J., and McGrath, S. P. (2003). Uptake and distribution of nickel and other metals in the hyperaccumulator *Berkheya coddii*. *New Phytologist*, 158:279–285.
- Roesems, G., Hoet, P. H. M., Dinsdale, D., Demedts, M., and Nemery, B. (2000). *In Vitro* cytotoxicity of various forms of cobalt for rat alveolar macrophages and type II pneumocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 162:2–9.
- Ross, S. A. and Burrows, C. J. (1998). Nickel complexes of cystein- and cystine-containing peptides: spontaneous formation of disulfide-bridges dimers at neutral pH. *Inorganic Chemistry*, 37(20):5358–5363.
- Sagner, S., Kneer, R., Wanner, G., Cosson, J.-P., Deus-Neumann, B., and Zenk, M. H. (1998). Hyperaccumulation, complexation and ditribution of nickel in *Sebertia acuminata*. *Phytochemistry*, 47(3):339–347.
- Saier Jr., M. H. (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiology ans Molecular Biology Reviews*, 64(2):354–411.
- Saito, A., Higuchi, K., Hirai, M., Nakane, R., Yoshiba, M., and Tadano, T. (2005). Selection and characterization of a nickel-tolerant cell line from tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. bright yellow-2) suspension culture. *Physiologia Plantarum*, 125:441–453.
- Salt, D. E. and Wagner, G. J. (1993). Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots: Evidence for a $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiport activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(15):12297–12302.
- Sandell, E. B. and Goldich, S. S. (1943). The rarer metallic constituents of some American igneous rocks. II. *The Journal of Geology*, 51(3):167–189.
- Schaaf, G., Honsbein, A., Meda, A. R., Kirchner, S., Wipf, D., and von Wiren, N. (2006). *AtIREG2* encodes a tonoplast transport protein involved in iron-dependent nickel detoxification in *Arabidopsis thaliana* roots. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(35):25532–25540.

- Scharrer, K. (1935). Die wirkung der mikroelemente auf das pflanzenwachstum. *Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde*, 44:223–247.
- Scharrer, K. and Schropp, W. (1933). Sand- und Wasserkulturversuche mit Nickel und Kobalt. *Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung und Bodenkunde*, A31:94–113.
- Schröder, H. A. and Mitchener, M. (1975). Life-term effects of mercury, methyl mercura and nine other trace metals on mice. *The Journal of Nutrition*, pages 452–458.
- Semwogerere, D. and Weeks, E. R. (2005). Confocal microscopy. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, pages 1–10.
- Sen, P. and Costa, M. (1985). Induction of chromosomal damage in Chinese Hamster Ovary cells by soluble and particulate nickel compounds: preferential fragmentation of the heterochromatic long arm of the X-chromosome by carcinogenic crystalline NiS particles. *Cancer Research*, 45:2320–2325.
- Seregin, I. V. and Kozhevnikova, A. D. (2006). Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(2):257–277.
- Shaul, O., Hilgemann, D. W., de Almeida-Engler, J., Montagu, M. V., Inzé, D., and Galili, G. (1999). Cloning and characterization of a novel Mg^{2+}/H^{+} exchanger. *The EMBO Journal*, 18(14):3973–3980.
- Shirali, P., Decaestecker, A. M., Marez, T., Hildebrand, H. F., Bailly, C., and Martinez, R. (1991). Ni_3S_2 uptake by lung cells and its interaction with plasma membranes. *Journal of Applied Toxicology*, 11(4):279–288.
- Showalter, A. M. (1993). Structure and function of plant cell wall proteins. *The Plant Cell*, 5:9–23.
- Shults, M. D., Pearce, D. A., and Imperiali, B. (2003). Modular and tunable chemosensors scaffold for divalent zinc. *Journal of the American Chemical Society*, 125(35):10591–10597.
- Silver, S. and Walderhaug, M. (1992). Gene regulation of plasmid- and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiological Reviews*, 56(1):195–228.
- Sinclair, S. A., Sherson, S. M., Jarvis, R., Camakaris, J., and Cobbett, C. S. (2007). The use of the zinc-fluorophore, Zinpyr-1, in the study of zinc homeostasis in *Arabidopsis* roots. *New Phytologist*, 174:39–45.
- Sirover, M. A. and Loeb, L. (1977). On the fidelity of DNA replication: effects of metal activators during synthesis with avian myeloblastosis virus DNA polymerase. *The Journal of Biological Chemistry*, 252(11):3605–3610.

- Sirover, M. A. and Loeb, L.-A. (1976). Metal activation of DNA synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 70(3):812–817.
- Sissoeff, I., Grisvard, J., and Guillé, E. (1976). Studies on metal ions-DNA interaction: specific behaviour of reiterative DNA sequences. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 31:165–199.
- Skook, D. and Leary, J. J. (1996). *Instrumentelle Analytik: Grundlagen, Geräte, Anwendungen*. Springer Verlag, 4 edition.
- Smith, R. L., Banks, J. L., Snavely, M. D., and Maguire, M. E. (1993). Sequence and topology of the CorA magnesium transport systems of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(19):14071–14080.
- Smith, R. L., Szegedy, M. A., Kucharski, L. M., Walker, C., Wiet, R. M., Redpath, A., Kaczmarek, M. T., and Maguire, M. E. (1998). The CorA Mg²⁺ transport protein of *Salmonella typhimurium*. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(44):28663–28669.
- Soon, Y. K. and Bates, T. E. (1982). Chemical pools of cadmium, nickel and zinc in polluted soils and some preliminary indications of their availability to plants. *Journal of Soil Science*, 33:477–488.
- Steffens, J. C. (1990). The heavy metal binding properties of plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41:553–575.
- Stewart, S. G. (1933). Inherent sensitivity of the skin to nickel and cobalt (allied elements in group VIII, periodic system). *Archives of Internal Medicine*, 51(3):427–434.
- Still, E. R. and Williams, R. J. P. (1980). Potential methods for selective accumulation of nickel(II) ions by plants. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 13:35–40.
- Stokes, G. G. (1852). On the change of refrangibility of light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 142:463–562.
- Stokes, G. G. (1853). On the change of refrangibility of light, No. II. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 143:385–396.
- Stumpf, T., Bauer, A., Coppin, F., and Kim, J. I. (2001). Time-resolved laser fluorescence spectroscopy study of the sorption of Cm(III) onto smectite and kaolinite. *Environmental Science & Technology*, 35(18):3691–3694.
- Sundermann Jr., F. W. (2001). Review: Nasal toxicity, carcinogenicity and olfactory uptake of metals. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 31(1):3–24.

- Sutherland, J. E. and Costa, M. (2003). Epigenetics and the environment. *Annals of the New York Academy of Science*, 983:151–160.
- Tabor, E. C. and Warren, W. V. (1958). Distribution of certain metals in the atmosphere of some American cities. *A.M.A. Archives of Industrial Health*, 17:145–151.
- Tacnet, F., Lauthier, F., and Ripoche, P. (1993). Mechanisms of zinc transport into pig small intestine brush-border membrane vesicles. *Journal of Physiology*, 465:57–72.
- Tandy, S., Williams, M., Leggett, A., Lopez-Jimenez, M., Dedes, M., Ramesh, B., Srai, S. K., and Sharp, P. (1999). Nramp2 expression is associated with pH-dependent iron uptake across the apical membrane of human intestinal Caco-2 cells. *Environmental Health Perspectives*, 274(49):69–79.
- Templeton, D. M. (1987). Interaction of toxic cations with the glomerulus: binding of ni to purified glomerular basement membrane. *Toxicology*, 43:1–15.
- Thauer, R. K. (1998). Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology*, 144:2377–2406.
- Thierse, H.-J., Helm, S., Pink, M., and Weltzien, H. U. (2007). Novel fluorescence assay for tracking molecular and cellular allergen-protein interactions. *Journal of Immunological Methods*, 328:14–20.
- Thomas, F., Serratrice, G., Béguin, C., Aman, E. S., Pierre, J. L., Fontecave, M., and Laulhère, J. P. (1999). Calcein as a fluorescent probe for ferric iron. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(19):13375–13383.
- Thompson, R. B., Peterson, D., Mahoney, W., Cramer, M., Maliwal, B. P., Suh, S. W., Frederickson, C., Fierke, C., and Herman, P. (2002). Fluorescent zinc indicators for neurobiology. *Journal of Neuroscience Methods*, 118:63–75.
- Thyssen, J. P. and Menné, T. (2010). Metal allergy – a review on exposures, penetration, genetics, prevalence, and clinical implications. *Chemical Research in Toxicology*, 23(2):309–318.
- Tits, J., Stumpf, T., Rabung, T., Wieland, E., and Fanghänel, T. (2003). Uptake of Cm(III) and Eu(III) by calcium silicate hydrates: a solution chemistry and time-resolved laser fluorescence spectroscopy study. *Environmental Science & Technology*, 37(16):3568–3573.
- Tuszynska, S. (2006). Ni²⁺ induces changes in the morphology of vacuoles, mitochondria and microtubules in *Paxillus involutus* cells. *New Phytologist*, 169:819–828.

- Tuszynska, S., Davies, D., Turnau, K., and Ashford, A. E. (2006). Changes in the vacuolar and mitochondrial motility and tubularity in response to zinc in a *Paxillus involutus* isolate from zinc-rich soil. *Fungal Genetics and Biology*, 43:155–163.
- Uthus, E. O. and Seaborn, C. D. (1996). Deliberations and evaluations of the approaches, endpoints and paradigms for dietary recommendations of the other trace elements. *The Journal of Nutrition*, 126:2452S–2459S.
- Vacchina, V., Mari, S., Czernic, P., Marques, L., Pianelli, K., Schaumlöffel, D., Lebrun, M., and Lobinski, R. (2003). Speciation of nickel in a hyperaccumulating plant by High-Performance Liquid Chromatography–Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry and Electrospray MS/MS assisted by cloning using yeast complementation. *Analytical Chemistry*, 75(11):2740–2745.
- Valeur, B. and Leray, I. (2000). Design principles of fluorescent molecular sensors for cation recognition. *Coordination Chemistry Reviews*, 205:3–40.
- Van Assche, F. and Clijsters, H. (1990). Effects of metal on enzyme activity in plants (Review). *Plant, Cell and Environment*, 13:195–206.
- Vergnano, O. and Hunter, J. G. (1953). Nickel and cobalt toxicities in oat plants. *Annals of Botany*, 17(66):317–328.
- Verret, F., Gravot, A., Auroy, P., Preveral, S., Forestier, C., Vavasseur, A., and Richaud, P. (2005). Heavy metal transport by AtHMA4 involves the N-terminal degenerated metal binding domain and the C-terminal stretch. *Federation of European Biochemical Society*, 579:1515–1522.
- Vögeli-Lange, R. and Wagner, G. J. (1989). Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. *Plant Physiology*, 92:1086–1093.
- von Wirén, N., Klair, S., Bansal, S., Briat, J.-F., Khodr, H., Shioiri, T., Leigh, R. A., and Hider, R. C. (1999). Nicotinamine chelates both Fe^{III} and Fe^{II}. Implications for metal transport in plants. *Plant Physiology*, 119(3):1107–1114.
- Walkup, G. K., Burdette, S. C., Lippard, S. J., and Tsien, R. Y. (2000). A new cell-permeable fluorescent probe for Zn²⁺. *Journal of the American Chemical Society*, 122(23):5644–5645.
- Walsh, C. T. and Orme-Johnson, W. H. (1987). Nickel enzymes. *Biochemistry*, 26(16):4901–4906.

- Wang, J. and Evangelou, V. P. (1995). *Metal tolerance aspects of plant cell wall and vacuole*. In: Pessaraki M. (ed) *Handbook of plant and crop physiology*. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1 edition.
- Wang, L., Zhu, X.-J., Wong, W.-Y., Guo, J.-P., Wong, W.-K., and Li, Z.-Y. (2005a). Dipyrroloquinoxaline-bridged schiff bases: a new class of fluorescent sensors for mercury(II). *Dalton Transactions*, 19:3235–3240.
- Wang, Z., Zachara, J. M., Gassman, P. L., Liu, C., Qafoku, O., Yantasee, W., and Catalano, J. G. (2005b). Fluorescence spectroscopy of U(VI)-silicates and U(VI)-contaminated Hanford sediment. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69(6):1391–1403.
- Wang, Z., Zachara, J. M., Gassmann, P. L., Liu, C., Qafoku, O., Yantasee, W., and Catalano, J. G. (2005c). Fluorescence spectroscopy of U(VI)-silicates and U(VI)-contaminated Hanford sediment. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69(6):1391–1403.
- Wang, Z., Zachara, J. M., McKinley, J. P., and Smith, S. C. (2005d). Cryogenic laser induced U(VI) fluorescence studies of U(VI) substituted natural calcite: implications to U(VI) speciation in contaminated Hanford sediments. *Environmental Science & Technology*, 39(8):2651–2659.
- Wang, Z., Zachara, J. M., Yantasee, W., Gassmann, P. L., Liu, C., and Joly, A. G. (2004). Cryogenic laser induced fluorescence characterization of U(VI) in Hanford vadose zone pore waters. *Environmental Science & Technology*, 38(21):5591–5597.
- White, J. G., Amos, W. B., and Fordham, M. (1987). An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 105:41–48.
- Wolfram, L., Friedrich, B., and Eitinger, T. (1995). The *Alcaligenes eutrophus* protein HoxN mediates nickel transport in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 177(7):1840–1843.
- Woodrooffe, C. C., Masalha, R., Barnes, K. R., Frederickson, C. J., and Lippard, S. J. (2004). Membrane-permeable and -impermeable sensors of the Zinpyr family and their application to imaging of hippocampal zinc in vivo. *Chemistry & Biology*, 11:1659–1666.
- Zenk, M. H. (1996). Heavy metal detoxification in higher plants – a review. *Gene*, 179:21–30.
- Zhang, Y. and Gladyshev, D. N. (2009). Comparative genomics of trace elements: emerging dynamic view of trace element utilization and function. *Chemical Reviews*, 109(10):4828–4861.
- Zhang, Y., Rodionov, D. A., Gelfand, M. S., and Gladyshev, V. N. (2009). Comparative genomic analyses of nickel, cobalt and vitamin B₁₂ utilization. *BMC Genomics*, 10(78):1–26.

- Zhao, H. and Eide, D. (1996a). The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Biochemistry*, 93:2454–2458.
- Zhao, H. and Eide, D. (1996b). The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyce cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(38).
- Zhao, J., Bertoglio, B. A., Devinney Jr., M. J., Dineley, K. E., and Kay, A. R. (2009). The interaction of biological and noxious transition metals with the zinc probes FluoZin-3 and Newport Green. *Analytical Biochemistry*, 384:34–41.
- Zhao, J., Bertoglio, B. A., Gee, K. R., and Kay, A. R. (2008). The zinc indicator FluoZin-3 is not perturbed significantly by physiological levels of calcium or magnesium. *Cell Calcium*, 44:422–426.
- Zoroddu, M. A., Kowalik-Jankowska, T., Kozlowski, H., Molinari, H., Salnikow, K., Broday, L., and Costa, M. (2000). Interaction of Ni(II) and Cu(II) with a metal binding sequence of histone H4: AKRHRK, a model of the H4 tail. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1475:163–168.
- Zoroddu, M. A., Schinocca, L., Kowalik-Jankowska, T., Kozlowski, H., Salnikow, K., and Costa, M. (2002). Molecular mechanism in nickel carcinogenesis: modeling Ni(II) binding site in histone H4. *Environmental Health Perspectives*, 110:719–723.

Poster und Vorträge

Yvonne Scheller. 2009. Detection of Ni(II) and Co(II) in fibroblasts using CLSM. Jahresseminar des Graduiertenkollegs 826 „Spurenanalytik von Elementspezies: Methodenentwicklungen und Anwendungen“. Bad Münster am Stein-Eberburg (oral presentation)

Yvonne Scheller, Heinz Duschner. 2009. Detection of Ni(II) and Co(II) in fibroblasts using CLSM. 12th Workshop on Progress in Analytical Methodologies for Trace Metal Speciation. Mainz (poster presentation)

Yvonne Scheller. 2008. Metal detection and localization in living fibroblast – Fluorescent probes and Confocal Laser Scanning Microscopy. Jahresseminar des Graduiertenkollegs 826 „Spurenanalytik von Elementspezies: Methodenentwicklungen und Anwendungen“. Bad Münster am Stein-Eberburg (oral presentation)

Yvonne Scheller, Heinz Duschner. 2008. Detection of Ni(II) Species in single living cells with high lateral resolution. 4th International Conference on Trace Element Speciation in Biomedical, Nutritional and Environmental Sciences. München (oral presentation)

Yvonne Scheller. 2007. Detection of Ni-Species in single living plant cells. Jahresseminar des Graduiertenkollegs 826 „Spurenanalytik von Elementspezies: Methodenentwicklungen und Anwendungen“. Bad Münster am Stein-Eberburg (oral presentation)

Yvonne Scheller, Heinz Duschner. 2007. Detection of Ni-Species and Co-Species in single living plant cells with high lateral resolution. 11th Workshop on Progress in Analytical Methodologies for Trace Metal Speciation. Münster (poster presentation; Roland A. Frei Poster Award)

Yvonne Scheller, Heinz Duschner. 2007. Detection of Ni-Species and Co-Species in single living plant cells with high lateral resolution. Gordon Research Conference – Cell Biology Of Metals; Newport, RI, USA (poster presentation)

Yvonne Scheller. 2006. Detection of heavy-metal species in single cells – First steps. Jahresseminar des Graduiertenkollegs 826 „Spurenanalytik von Elementspezies: Methodenentwicklungen und Anwendungen“. Bad Münster am Stein-Ebernburg (oral presentation)

Yvonne Scheller. 2006. Detection of Heavy Metal Species in Single Living Cells - First Steps. Graduiertenkolleg-Evaluation; Mainz (poster presentation)

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen oder anderen Quellen entnommen sind, sind als solche eindeutig kenntlich gemacht. Die Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form noch nicht veröffentlicht und noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt worden.

Yvonne Scheller
Mainz, Oktober 2012