Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover Institut für Radioökologie und Strahlenschutz

Physikalische Bestimmung der Aufnahme von Am-241 in Zellen

Masterarbeit

von

Annika Wunnenberg

ErstprüferProf. Dr. Clemens WaltherZweitprüferProf. Dr. Anaclet Ngezahayo

02. Mai2017

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, dass alle Stellen der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus anderen Quellen übernommen wurden, als solche kenntlich gemacht und dass die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Hannover, den 02.05.2017

Annika Wunnenberg

Inhaltsverzeichnis

1.	Einl	eitung		1	
2.	Kenntnisstand			3	
	2.1.	Biolog	ie der Zellmembran	3	
		2.1.1.	Membrantransport	5	
		2.1.2.	Die Oozyten des Xenopus laevis	8	
	2.2.	Actinio	le und Lanthanide	10	
	2.3.	Fluore	szenzspektroskopie	12	
		2.3.1.	$Lumineszenzerscheinungen \ldots \ldots$	12	
		2.3.2.	Fluoreszenzspektroskopie an Eu ³⁺	14	
		2.3.3.	Zeitaufgelöste Laser-Fluoreszenzspektroskopie (TRLFS)	16	
	2.4.	Masser	nspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) \hdots	18	
3.	. Experimentelle Umsetzung			19	
	3.1.	Gewinz	nung und Präparation der Oozyten	19	
	3.2.	Charal	Charakterisierung der Sorptionsspezies an der Zellmembran mittels TRLFS .		
		3.2.1.	Herstellung der Proben und Versuchsdurchführung	23	
	3.3.	Konzer	ntrations bestimmung der Sorption von Eu $^{3+}$ mittels ICP-MS $\ . \ . \ .$	27	
		3.3.1.	Herstellung der Proben und Versuchsdurchführung	27	
4.	Erge	ebnisse	e und Diskussion	31	
	4.1.	TRLF	S-Messungen	31	
		4.1.1.	Messungen bei Raumtemperatur	31	
		4.1.2.	Messungen bei Tieftemperatur	43	
	4.2.	ICP-M	S Messungen	46	
		4.2.1.	Bestimmung der absorbierten und adsorbierten Eu^{3+} -Konzentrationen	46	
		4.2.2.	Aufnahme von Zeitreihen	49	

5. Zusammenfassung und Ausblick	55
Anhang	56
A. Liste der verwendeten Chemikalien	57
Literatur	59
Abbildungsverzeichnis	65
Tabellenverzeichnis	67

KAPITEL 1

Einleitung

Im Jahre 1986 ereignete sich in Tschernobyl einer der folgenschwersten Reaktorunfälle in der Geschichte der zivilen Nutzung der Kernenergie, der seither nicht nur die Wissenschaft vor große Herausforderungen stellt. Die dabei freigesetzten Radionuklide können zu einer Erhöhung der Strahlenexposition des Menschen führen, sodass deren Verhalten in der Umwelt bis heute Gegenstand der Forschung ist. Von großer Bedeutung ist dabei die Aufnahme der im Boden befindlichen Radionuklide in Pflanzen, da sie somit in die menschliche Nahrungskette gelangen könnten.

In Tschernobyl wurden unter anderem große Mengen Plutonium mit einer Gesamtaktivität von 2,6 PBq in die Umwelt freigesetzt. Wegen seiner kurzen Halbwertszeit ($T_{1/2}$) von nur 14,35 Jahren, trug ²⁴¹Pu den größten Teil zu dieser Aktivität bei [1]. Plutonium-241 zerfällt in das langlebigere Actinid ²⁴¹Am ($T_{1/2} = 432,6 a$), welches unter anderem aufgrund seines hohen Dosiskonversionsfaktors in den nächsten Jahrzehnten erheblich zur Gesamtdosis der Actiniden in der Region um Tschernobyl beitragen könnte [2].

Unter Umweltbedingungen bilden sich trivalente Ionenspezies des ²⁴¹Am, die eine höhere Mobilität aufweisen als das tetravalente Plutonium, wodurch die Aufnahme von ²⁴¹Am in Pflanzen begünstigt wird. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher insbesondere die Aufnahme von ²⁴¹Am in (Pflanzen-) Zellen untersucht werden.

Frühere Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass Eu^{3+} in Pflanzen das Ca^{2+} ersetzen kann [3]. Aufgrund der chemischen Ähnlichkeit von Eu^{3+} und Am^{3+} und der ähnlichen Ionenradien von Ca^{2+} , Eu^{3+} und Am^{3+} ist zu vermuten, dass auch Am^{3+} dem Ca^{2+} -Pfad folgen wird, sodass die Ca^{2+} -Ionenkanäle als Transporter für das Am^{3+} in die Zelle fungieren könnten.

Da Pflanzenzellen schwer zu manipulieren, recht klein und vergleichsweise instabil sind und sich die relevanten Transportmechanismen durch Zellmembranen im Allgemeinen nicht unterscheiden, wurden in dieser Arbeit stellvertretend die Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* verwendet. Diese Zellen sind mit einem Durchmesser von ca. 1-1,3 mm recht groß, sodass zum einen die Sorption von Eu^{3+} an der Oberfläche mittels zeitaufgelöster Laserfluoreszenzspektroskopie (TRLFS) beobachtet werden konnte. Zum anderen wurde eine Methode entwickelt, um mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) die Menge des aufgenommenen Eu^{3+} und Am^{3+} in die Oozyten bestimmen zu können.

Nach einer Einführung in die theoretischen Grundlagen der Membrantransportmechanismen und der TRLFS sowie ICP-MS, wird das experimentelle Vorgehen erläutert und die gewonnenen Ergebnisse und Grenzen der verwendeten Methoden vorgestellt und diskutiert. Abschließend erfolgen eine kurze Zusammenfassung und ein Ausblick.

KAPITEL 2

Kenntnisstand

Zu Beginn sollen die relevanten theoretischen Grundlagen für diese Arbeit dargelegt werden. Es erfolgt zunächst eine kurze Einführung in die Biologie der Zellmembran, insbesondere in die für diese Arbeit relevanten Transportmechanismen der Ionen. Des Weiteren wird der Einsatz von Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* als Analogon zur Pflanzenzelle diskutiert. Anschließend werden die Messmethoden der zeitaufgelösten Laser-Fluoreszenzspektroskopie (TRLFS), insbesondere in Bezug auf die Fluoreszenzeigenschaften des Eu³⁺, und der Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) vorgestellt.

2.1. Biologie der Zellmembran

Eine Zelle ist die kleinste lebende Einheit in einem pflanzlichen oder tierischen Lebewesen [4] und stellt ein eigenständiges und selbsterhaltendes System dar. Jede Zelle ist von einer Membran, der Plasmamembran, umgeben, die als selektive Barriere wirkt und es der Zelle ermöglicht, Nährstoffe aus der Umgebung anzureichern und Abfallstoffe auszustoßen. Sie besteht aus Lipidmolekülen und Proteinen, die hauptsächlich durch nichtkovalente Wechselwirkungen zusammengehalten werden (siehe Abbildung 2.1). Die am häufigsten auftretenden Membranlipide sind die Phospholipide, die sich durch eine polare Kopfgruppe und zwei hydrophobe Kohlenwasserstoffschwänze auszeichnen. Aufgrund dieser Eigenschaft bilden sie eine etwa 5 nm dicke, durchgehende Doppelschicht, die sogenannte Lipid-Doppelschicht, die die fluide Grundstruktur der Membran und somit eine für die meisten wasserlöslichen Moleküle undurchlässige Barriere bildet [5].



Grundsätzlich wird zwischen prokariotischen und eukariotischen Zellen, die einen Zellkern besitzen, unterschieden. Zu letzteren zählen neben den tierischen auch die Pflanzenzellen. Abbildung 2.2 zeigt in (a) eine pflanzliche im Vergleich zu einer tierischen Zelle (b).



Abbildung 2.2.: Unterschied zwischen Pflanzenzellen und Tierzellen, aus [6].

Die Pflanzenzelle ist zusätzlich zur Zellmembran von einer äußeren Zellwand umgeben. Sie besteht aus Polymeren, wie Cellulose, Hemicellulose und Pektin, und bietet der Zelle Stabilität und Schutz gegenüber mechanischer Beanspruchung oder Veränderungen des osmotischen Drucks. Die Zellwand ist permeabel, sodass kleine Moleküle und Proteine bis zu einer Größe von 30-60 kDa durch sie hindurch diffundieren können.

Die biologischen Moleküle auf der Zellmembran und in den Zellen bestehen aus Ketten von Kohlenstoffatomen, an denen bestimmte funktionelle Gruppen sitzen, die den Molekülen durch die elektronegativen Atome, wie Stickstoff, Phosphor, Sauerstoff und Schwefel, ihre



Abbildung 2.3.: Häufige funktionelle Gruppen in Zellen, entnommen aus [7].

physikalischen Eigenschaften, ihr chemisches Reaktionsvermögen und ihre Löslichkeit in wässrigem Milieu verleihen. Die am häufigsten vorkommenden Gruppen sind Methyl-, Hydroxyl-, Carboxyl-, Amino-, Phosphat-, Carbonyl- und Sulfhydryl-Gruppen (siehe Abbildung 2.3) [7]. Einige dieser Gruppen können Ionen bilden und dadurch wichtige Nährstoffe, wie beispielsweise Kalium oder Natrium, binden.

Die Nährstoffversorgung findet, wie bereits erwähnt, über die Zellmembran statt und unterliegt dabei für alle Zellen universell geltenden Mechanismen, die im nächsten Abschnitt vorgestellt werden.

2.1.1. Membrantransport

Um für den Stoffwechsel der Zelle wichtige anorganische Ionen und kleine wasserlösliche organische Moleküle durch die Lipid-Doppelschicht transportieren zu können, verwenden Zellen spezialisierte Transmembranproteine. Die beiden Hauptklassen von Membrantransportproteinen sind Transporter (oder Carrier), die das zu transportierende spezifische Solut binden und es durch eine Reihe von Konformationsänderungen durch die Membran schleusen, und Kanäle, die wässrige Poren bilden und nur schwach mit dem zu transportierenden Solut wechselwirken.



Abbildung 2.4.: Weg durch einen Ionenkanal. Entnommen aus [8].

Im Gegensatz zu den Carriern erfolgt der Membrandurchtritt über Kanäle immer passiv, d.h.

die Bewegung des gelösten Stoffs findet in Richtung der niedrigeren Konzentration (entlang ihres Konzentrationsgradienten) statt und für den Transport muss keine zusätzliche Energie aufgebracht werden. Im Fall von Ionen wird der Transport zusätzlich durch den Unterschied des elektrischen Potentials über die Membran, genannt Membranpotential, beeinflusst. Der Konzentrationsgradient und der elektrische Gradient der Zellmembran verbinden sich zum elektrochemischen Gradienten und bilden somit eine treibende Gesamtkraft für den Transport von Ionen durch die Kanäle.

Die Ionenkanäle können schnell geöffnet und geschlossen werden und weisen in geöffnetem Zustand eine Transportleistung von bis zu 10^8 Ionen pro Sekunde auf [5]. Das Öffnen der Kanäle resultiert meist aus der Antwort auf einen bestimmten Reiz, wie z.B. Änderungen des Membranpotentials, mechanische Reize oder die Bindung von Liganden. Dementsprechend wird zwischen spannungssensitiven, mechanosensitiven und ligandenabhängigen Kanälen unterschieden. Hält der Reiz über längere Zeit an, können die meisten Kanäle für diese Dauer in einen inaktivierten oder geschlossenen Zustand übergehen, bevor sie sich in Folge erneuter Stimulation wieder öffnen. Diese Übergänge zwischen dem inaktivierten und geschlossenen Zustand bis hin zur erneuten Öffnung des Kanals können mit einer zeitlichen Auflösung von Mikro- bis Millisekunden beobachtet werden [5, 8].

Trotz der hohen Durchflussraten sind Kanäle sehr spezifisch auf bestimmte Ionen, wie K⁺, Na⁺, Ca²⁺ und Cl⁻, ausgelegt. In Abbildung 2.4 ist exemplarisch ein Schema des K⁺-Kanals dargestellt. Dieser ist von der Öffnung bis hin zur Mitte mit Wasser gefüllt (blau) und zunächst mit etwa 1 nm groß genug, dass das K⁺-Ion gemeinsam mit seiner Hydrathülle eindringen kann. Danach erfolgt eine Verengung auf 0,3 nm (gelb), in der das K⁺-Ion seine umgebenden Wassermoleküle abstreifen und den Selektivitätsfilter passieren muss. Der Selektivitätsfilter besteht aus einer Abfolge von fünf Aminosäuren, die für die Bevorzugung von K⁺-Ionen gegenüber anderen Ionen verantwortlich sind. Dabei ist die Aminosäuresequenz so orientiert, dass die Peptidcarbonylgruppen (rot) in passendem Abstand zur Kanalpore hin liegen und mit den K⁺-Ionen Wechselwirkungen eingehen können [8].

Aufgrund des begrenzten Durchmessers des Kanals, können deutlich größere Ionen diesen nicht passieren. Jedoch ist es auch Ionen mit kleinerem Radius, wie beispielsweise Na⁺, nicht möglich, den K⁺-Kanal zu überwinden, da die Carbonylsauerstoffgruppen im Selektivitätsfilter zu weit vom Na⁺ entfernt liegen. Die für die Dehydration nötige freie Enthalpie, die für Na⁺ größer ist als für K⁺ (siehe Tabelle 2.1), kann demnach nicht durch die Wechselwirkung mit den Carbonylgruppen ausgeglichen werden, sodass das Natrium seine Hydrathülle behalten muss, was den Durchgang durch den Kanal verhindert.

Die hohen Transportgeschwindigkeiten können anhand des in Abbildung 2.5 dargestellten Schemas wie folgt erklärt werden: Im Selektivitätsfilter befinden sich vier Bindungsstellen (grau). Das hydratisierte Ion (grün) dringt in den Kanal ein, streift seine Wasserhülle (blau) ab und bindet an eine dieser Stellen, deren Ionenaffinitäten untereinander vergleichbar sind. Das Ion kann nun zwischen den Bindungsstellen beliebig wechseln, bis ein weiteres in den Kanal eindringt und es zu einer elektrostatischen Abstoßung zwischen den beiden kommt.

······································								
		r [Å]		$\Delta H_{ m hydr}^0$		r [Å]		$\Delta H_{ m hydr}^0$
	Ion	KZ 6	KZ 8	[kJ/mol]	Ion	KZ 6	KZ 8	[kJ/mol]
	Li^+	$0,\!9$	$1,\!06$	-521	Mg^{2+}	0,86	$1,\!03$	-1922
	Na^+	$1,\!16$	1,32	-406	Ca^{2+}	1,14	1,26	-1577
	K^+	$1,\!52$	$1,\!65$	-322	Sr^{2+}	1,32	1,40	-1415
	Rb^+	$1,\!66$	1,75	-301	Ba^{2+}	1,49	$1,\!56$	-1361
	Cs^+	1,81	1,88	-277	Cl-	1,67	-	-384

Tabelle 2.1.: Ionenradien bei verschiedenen Koordinationszahlen (KZ) und Hydrata-
tionsenthalpien bei 25 °C, aus [9–11].



Abbildung 2.5.: Ionentransport durch den Kanal, in Anlehnung an [8]. Nach dem Abstreifen seiner Hydrathülle bindet das Ion an die Bindungsstellen im Kanal. Durch elektrostatische Abstoßung wird es vom nachfolgenden Ion immer weiter durch den Kanal gedrängt und schließlich hinausgeschoben.

Mit jedem weiteren Ion wird es also immer weiter kanalauswärts gedrängt, bis es freigesetzt wird und wieder hydratisiert. So können sowohl hohe Selektivität, als auch hohe Durchflussraten erreicht werden.

Der Ca²⁺-Ionenkanal

In dieser Arbeit ist der Ca^{2+} -Ionenkanal von zentraler Bedeutung. Die Struktur des Ca^{2+} -Kanals ähnelt der des K⁺-Kanals, jedoch wird die Ionenselektivität hier durch einen Glutamatrest im Selektivitätsfilter bestimmt [12].

Studien an spannungskontrollierten Calcium Kanälen haben gezeigt, dass verschiedene Ionenspezies in der Lage sind, die Kanäle zu durchqueren. Für die Bindungsaffinität dieser Ionen in den Poren wurde folgende Reihenfolge ermittelt: $La^{3+} > Cd^{2+} > Co^{2+} > Ca^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+} > Li^+ > Na^+ > K^+ > Cs^+$ [13–17].

Hingegen zeigten Leitfähigkeitsmessungen an den Ca^{2+} -Kanälen ein exakt konträres Verhalten: $La^{3+} < Cd^{2+} < Co^{2+} < Ca^{2+} < Sr^{2+} < Ba^{2+} < Li^+ < Na^+ < K^+ < Cs^+$ [14, 18, 19]. Dieser Gegensatz zwischen Bindungsaffinität und Durchfluss wird mit der *sticky-pore* Hypothese erklärt, die besagt, dass Ionen, die eine größere Bindungsaffinität besitzen, den Kanal langsamer passieren und somit geringere Durchflussraten aufweisen [20]. Beispielsweise ist der Ca²⁺-Ionenfluss geringer als der von Ba²⁺, da Ca²⁺ stärker in der Pore gebunden wird. Aus diesem Grund wird für die Untersuchung von Ca²⁺-Kanälen häufig Ba²⁺ verwendet [21].

2.1.2. Die Oozyten des Xenopus laevis

Da jede Art von Zelle über eine Zellmembran verfügt und sich die wesentlichen Transportmechanismen deshalb nicht unterscheiden, werden in dieser Arbeit stellvertretend für Pflanzenzellen die Eizellen (Oozyten) des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* (siehe Abbildung 2.6) verwendet.

Die *Xenopus*-Oozyten haben sich als verlässliches System für die Expression und Charakterisierung von verschiedenen Proteinen, wie Ionenkanälen und Membranrezeptoren, erwiesen. Aufgrund ihrer Größe und Stabilität sind sie vergleichsweise einfach zu handhaben, sodass verschiedene Mo-



Abbildung 2.6.: Xenopus-Weibchen.

leküle, wie natürliche mRNA oder cRNA, oder auch Antikörper injiziert werden können [22]. Mittels verschiedener Methoden kann die Expression der Proteine, kodiert durch die injizierte mRNA oder cRNA, untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird jedoch davon ausgegangen, dass die zu untersuchenden Ca²⁺-Ionenkanäle bereits in ausreichender Anzahl in der Zellmembran der Oozyten vorhanden sind [23–25].

Der etwa achtmonatige Reifungsprozess der Oozyten, genannt Oogenese, ist in sechs Stadien unterteilt und findet asynchron statt (vgl. [28]), sodass zu jedem Zeitpunkt alle Oozytenstadien im Ovar vorliegen. Für die experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit werden



(a) Entwicklungsstadien der Oozyten des *Xenopus laevis*. Modifiziert aus [26].

(b) Schema einer Oozyte [27].

Abbildung 2.7.: In (a) sind die sechs Entwicklungsstadien der Oozyten im Ovar dargestellt. (b) zeigt das Schema einer Oozyte, umgeben von Theka, Follikelepithelzelle und Vitellin-Hülle.

ausschließlich Oozyten in den Stadien V oder VI verwendet. In diesen Stadien sind sie 1-1,3 mm groß und weisen zwei homogen pigmentierte Pole auf (siehe Abbildung 2.7 (a)).

Der Zellkern ist in der dunkel pigmentierten, animalen Hemisphäre angesiedelt, welche auch leichtes mitochondrien- und ribosomenreiches Cytoplasma sowie leichte Liposomen und Protein-Dotter enthält. In der vegetalen Hemisphäre befinden sich kristallin gepackte Dotterproteine, die für die grünliche bis hellgelbe Färbung sorgen.

Die Oozyten sind im Ovar von thekalem Bindegewebe, Follikelepithelzelle und Vitellin-Hülle umgeben (siehe Abbildung 2.7 (b)). Das Follikel-Theka-System wird, wie in Abschnitt 3.1 beschrieben, für die Experimente mechanisch oder enzymatisch entfernt, sodass die Zellen lediglich von der Vitellin-Membran umgeben sind. Dieses Exoskelett besteht aus einem Netzwerk von Glykoproteinen, ist ca. 1 μ m dick und verhindert nach Besamung des Eies das Eindringen eines weiteren Spermiums.

Die Oozyten werden nach der Entnahme aus dem Ovar in modifiziertem BARTH Medium (siehe Tabelle 3.1) inkubiert [29].

Die intraoozytäre Ca²⁺-Konzentration ist mit 3-400 nmol/L sehr gering im Vergleich zu den Na⁺-, K⁺- oder Cl⁻-Konzentrationen, die im Bereich von bis zu mehreren mmol/L liegen [30].

2.2. Actinide und Lanthanide

Die Actiniden und Lanthaniden bilden im Periodensystem der Elemente den sogenannten f-Block, da bei ihnen die 4f- bzw. 5f- Orbitale aufgefüllt werden. Zu den Lanthaniden (auch seltene Erden genannt) zählen laut dieser Definition die Elemente Cer (Z = 58) bis Lutetium (Z = 71) und die Gruppe der Actiniden umfasst die Elemente Thorium (Z = 90) bis Lawrencium (Z = 103). Da ihre namensgebenden Elemente Lanthan und Actinium nicht über Valenzelektronen in der f-Schale verfügen, wird ihre Zugehörigkeit zu der jeweiligen Gruppe von der IUPAC diskutiert.

Ab der zweiten Hälfte des f-Blocks (ab Plutonium) weisen die Actiniden große chemische Ähnlichkeit aufgrund analoger Elektronenkonfiguration zu den Lanthaniden auf, was sich auch anhand der in den Abbildung 2.8 und Abbildung 2.9 gezeigten Oxidationsstufen dieser Elemente widerspiegelt.



Beispielsweise tritt das für diese Arbeit relevante Americium meist in der Oxidationsstufe + III auf und ist damit das schwere Homolog zum dreiwertigen Europium, weshalb Eu³⁺

nicht zuletzt aufgrund seiner in Unterabschnitt 2.3.2 diskutierten Fluoreszenzeigenschaften als inaktives Analogon zu Am^{3+} in biologischen Systemen geeignet ist [31].

Verschiedene Studien haben bereits die Interaktion und Aufnahme von dreiwertigen Lanthaniden und Actiniden, insbesondere von Am^{3+} und Eu^{3+} , in Pflanzen, Bakterien und Algen gezeigt [3, 32–41].

Aufgrund der chemischen Analogie und den ähnlichen Ionenradien (siehe Tabelle 2.2) von Am^{3+} , Eu^{3+} und Ca^{2+} , konnte bereits der Einbau von Eu^{3+} in calciumhaltige Mineralien wie Calcit bzw. das Substituieren von Ca^{2+} in Aragonit und auch in Fuchsschwanz-Gewächsen durch Eu^{3+} gezeigt werden [42–44].

Tabelle 2.2.: Ionenradien bei Koordinationszahl sechs und acht und Hydratationsenthalpien von Ca^{2+} , Am^{3+} und Eu^{3+} bei 25 °C, aus [9–11].

	r [Å]		$\Delta H_{ m hydr}^0$
Ion	KZ 6	KZ 8	[kJ/mol]
Ca^{2+}	1,14	$1,\!26$	-1577
Am^{3+}	1,12	1,21	-3439
Eu^{3+}	1,09	$1,\!23$	-3547

Auf solchen vorangegangenen Untersuchungen basiert die dieser Arbeit zu Grunde liegende Vermutung, dass sowohl Am³⁺ als auch Eu³⁺ durch Ca²⁺-Ionenkanäle in (Pflanzen-)Zellen aufgenommen werden könnten.

2.3. Fluoreszenzspektroskopie

Mittels zeitaufgelöster Laserfluoreszenzspektroskopie (engl. *time-resolved laser fluorescence spectroscopy* (TRLFS)) können Rückschlüsse auf die in der zu untersuchenden Lösung oder im Feststoff vorhandenen Komplexe gezogen werden. Die zugrunde liegenden physikalischen Mechanismen werden im Folgenden erläutert.

2.3.1. Lumineszenzerscheinungen

Befindet sich ein Atom oder Molekül in einem elektromagnetischen Strahlungsfeld, kann es durch Absorption eines Photons in einen höheren energetischen Zustand übergehen. Analog wird beim Übergang in einen niedrigeren energetischen Zustand ein Photon, also Licht, emittiert, was als Lumineszenz bezeichnet wird.

Dabei kann nicht jeder nach der Energieerhaltung

$$\Delta E = h \cdot \nu \tag{2.1}$$

mögliche Übergang im Spektrum beobachtet werden. Ferner müssen auch die Erhaltung des Drehimpulses sowie bestimmte Symmetrieprinzipien beachtet werden. Diese so genannten Auswahlregeln bei elektrischen Dipolübergängen sind in Tabelle 2.3 für die Quantenzahlen für den Bahndrehimpuls l, den Spin S, den Gesamtbahndrehimpuls L und den Gesamtdrehimpuls J = L + S aufgezeigt. Magnetische Dipolübergänge treten auf, wenn sich die Richtung oder

	Beschränkung		
Quantenzahl	elektr. Dipolübergänge	magn. Dipolübergänge	
Δl	±1	0	
ΔL	± 1	0	
ΔS	0	0	
ΔJ	$0, \pm 1 \text{ mit } J = 0 \nrightarrow J = 0$	$0, \pm 1 \text{ mit } J = 0 \nrightarrow J = 0$	

Tabelle 2.3.: Auswahlregeln für elektrische und magnetische Dipolübergänge [45].

der Betrag des magnetischen Dipolmoments eines Atoms ändert, beispielsweise bei Übergängen mit $\Delta m = \pm 1$ zwischen den ZEEMAN-Komponenten eines Atomniveaus.

Lumineszenzerscheinungen werden in Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterteilt, welche in einem JABLONSKI-Diagramm (siehe Abbildung 2.10) dargestellt werden können: Ein Elektron wird durch elektromagnetische Strahlung geeigneter Wellenlänge $h \cdot \nu_{Abs}$ aus dem Singulett-Zustand S₀ in einen schwingungsangeregten Zustand des angeregten S₁-Zustand angehoben (blaue Linien). Nach strahlungsloser Relaxation in den vibronischen Grundzustand des S₁-Zustands, kann es unter Beibehaltung seines Spins und unter Aussendung eines Photons $h \cdot \nu_F$ in eines der vibronischen Niveaus des S₀-Zustands zurückkehren (grüne Linien). Die Übergänge weisen Lebensdauern zwischen $10^{-9} - 10^{-7}$ s auf und werden als Fluoreszenz bezeichnet. Die Fluoreszenzbanden sind gegenüber den Absorptionsbanden zu größeren Wellenlängen hin verschoben (STOKES-Shift).



Abbildung 2.10.: JABLONSKI-Diagramm. Nach Absorption von Photonen (blau) kommt es nach Schwingungsrelaxation zur Emission von Licht. Wird dabei der Spinzustand beibehalten, kommt es zur Fluoreszenz mit kürzeren Lebensdauern (grün), erfolgt der Übergang unter Spinumkehr, so kommt es zur Phosphoreszenz mit deutlich höheren Lebensdauern (orange).

Erfolgt die strahlungslose Deaktivierung unter Spin-Umkehr über das so genannte Intersystem Crossing (schwarz), kann das Elektron unter Emission von Phosphoreszenzstrahlung aus dem angeregten Triplett-Zustand T_1 in den S₀-Zustand relaxieren (orange). Dieser Übergang ist Spin-verboten und weist damit deutlich größere Lebensdauern auf [46].

Die Lebensdauer der Fluoreszenz ist charakteristisch für die jeweilige Spezies und die Abnahme der Intensität unterliegt im Allgemeinen Zeitgesetzen erster Ordnung:

$$N(t) = N_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \tag{2.2}$$

mit N(t): Zahl der Teilchen im angeregten Zustand zur Zeit t, N₀: Zahl der Teilchen im angeregten Zustand zur Zeit t = 0, τ : Lebensdauer des angeregten Zustands [47].

2.3.2. Fluoreszenzspektroskopie an Eu^{3+}

Die Spektren der dreiwertigen Lanthaniden und Actiniden weisen im UV-Bereich breite und intensive Absorptionsbanden auf, die aus den paritätserlaubten f-d-Übergängen resultieren. Im sichtbaren Bereich lassen sich scharfe Banden aus f-f-Übergängen beobachten, deren Verbot durch die Beimischung von Zuständen entgegengesetzter Parität und Verzerrung zu niedrigeren Symmetrien (ohne Inversionszentrum) abgeschwächt wird. Diese erzwungenen elektrischen Dipolübergänge sind dementsprechend weniger intensiv und unterliegen gesonderten Auswahlregeln (siehe Tabelle 2.4) [48].

Die Bandenlagen in den Spektren der Lanthaniden verschieben sich unter Veränderung des

Quantenzahl	Beschränkung
Δl	±1
ΔS	0
ΔL	$\leq 2l$
ΔJ	$\leq 2l$
ΔJ , für $J = 0$	$2, 4, 6, \dots$

Tabelle 2.4.: Auswahlregeln für erzwungene elektrische Dipolübergänge.

Ligandenfelds nur wenig, da die Wechselwirkung aufgrund der starken Abschirmung der nf-Schalen durch die gefüllten (n + 2)s- und p-Schalen nur gering ausgeprägt ist. Allerdings hat die Symmetrie des Ligandenfelds einen starken Einfluss auf die Aufspaltung der einzelnen Banden im Festkörper.

Eu³⁺ wird häufig über den ${}^{7}F_{0} \rightarrow {}^{5}L_{6}$ -Übergang bei einer Wellenlänge von 394 nm angeregt. Die Fluoreszenz erfolgt fast ausschließlich vom ${}^{5}D_{0}$ -Zustand aus in die ${}^{7}F_{J}$ -Niveaus, deren Banden im sichtbaren Bereich liegen. Dieser Vorgang ist in Abbildung 2.11 (a) schematisch dargestellt. Die Übergänge in die ${}^{7}F_{0}$ -, ${}^{7}F_{1}$ - und ${}^{7}F_{2}$ -Niveaus weisen dabei einige spezielle Charakteristika auf, die zur Identifizierung der vorliegenden Europium-Spezies beitragen.

Bei der ${}^{7}F_{0}$ -Bande handelt es sich um einen $(J = 0 \rightarrow J = 0)$ -Übergang, der wegen (2J + 1) = 1 keine Entartung aufweist. Dies hat zur Folge, dass die Bande aufgrund des Paritätsverbots schwach ausgeprägt und nur beobachtbar ist, wenn eine Wechselwirkung mit einem Ligandenfeld vorliegt. Andererseits existiert für diesen Übergang stets nur genau eine Bande pro angeregter Eu³⁺-Spezies und somit ist eine Ermittlung der Anzahl der Spezies möglich. Außerdem lässt sie eine Aussage über die Koordinationssymmetrie zu: Ist diese, wie im Fall des Europium-Aquoions (vgl. Abbildung 2.11 (b)), hoch symmetrisch, ist die Bande schwach ausgeprägt. Mit steigender Asymmetrie steigt auch die Intensität der Bande an [49].



(a) Energieniveaus des Eu³⁺ im sichtbaren Spektralbereich.

Abbildung 2.11.: Veranschaulichung der Fluoreszenz des Eu³⁺. (a) zeigt schematisch die Übergänge in die ⁷ F_J -Niveaus nach der Anregung und in (b) ist das resultierende Emissionsspektrum mit den drei charakteristischen Banden ⁷ F_0 , ⁷ F_1 und ⁷ F_2 gezeigt.

Die ${}^{7}F_{1}$ -Bande ist im Spektrum des Aquoions die intensivste und resultiert aus einem magnetischen Dipolübergang. Sie wird kaum durch die chemische Umgebung beeinflusst und findet daher oft für die Normierung der Intensität Verwendung.

Beim ${}^{5}D_{0} \rightarrow {}^{7}F_{2}$ -Übergang handelt es sich um einen sogenannten hypersensitiven Übergang, dessen Intensität sehr stark mit der Komplexierung des Eu³⁺ verknüpft ist. Daher lässt das Intensitätsverhältnis der ${}^{7}F_{1}$ - und der ${}^{7}F_{2}$ -Bande Rückschlüsse auf das Maß der Komplexierung des Europiums zu [47, 48, 50].

Neben den Intensitätsverhältnissen der Banden, gibt auch die Fluoreszenzlebensdauer Aufschluss über die vorliegenden Europium-Spezies. Erfolgt keine weitere Anregung der Probe, nimmt die Deaktivierung über Emission von Photonen ab, was gemäß Gleichung 2.2 zu einer exponentiellen Abnahme der Fluoreszenzintensität führt und die Berechnung der Lebensdauer τ ermöglicht.

Der Energieübertrag auf geeignete Akzeptoren in der Umgebung des Eu³⁺ stellt einen weiteren bedeutenden Relaxationspfad dar, der in einer schnelleren Abnahme der Fluoreszenzintensität resultiert und somit zu kürzeren Lebensdauern führt. Beispielweise findet beim Europium-Aquoion ein Energietransfer auf die koordinierenden Wassermoleküle statt, welche daraufhin zu Schwingungen angeregt werden. Dieser, in Abbildung 2.12 dargestellte, Quench-Mechanismus ist effizient, da die vierte Oberschwingung der OH-Schwingung des Wassers in einem ähnlichen Energiebereich liegt wie der ⁵D₀-Zustand des Eu³⁺, aus dem die Fluoreszenz erfolgt. Über die HORROCKS-Gleichung

$$n({\rm H}_2{\rm O}) \pm 0.5 = 1.07 \cdot k_{\rm obs} - 0.62$$
 (2.3)

kann mittels der bestimmten Zerfallskonstanten $k_{\rm obs} = \frac{1}{\tau} \,[{\rm ms}^{-1}]$ eine empirische Beziehung zwischen der Lebensdauer und der Anzahl der Wassermoleküle in der ersten Koordinationssphäre aufgestellt werden [51].

Liegen in der zu untersuchenden Probe mehrere Europium-Spezies vor, ist der Intensitätsabfall nicht mehr monoexponentiell und die Lebensdauer muss durch Zeitgesetze höherer Ordnung bestimmt werden, gemäß

$$N(t) = y_0 + N_1 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_1}} + N_2 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_2}} + \dots + N_n \cdot e^{-\frac{t}{\tau_n}}.$$
(2.4)

Somit können die koordinierenden Wassermoleküle über die Lebensdauern anteilig für die jeweilige Spezies errechnet werden. Die Lebensdauer des Aquoions beträgt etwa $110 \,\mu$ s und es wird nach Gleichung 2.3 von 9 Wassermolekülen umgeben [51].



Abbildung 2.12.: Beim Quenching kommt es zu einem Energieübertrag (roter Pfeil) auf die Wassermoleküle, die zu Schwingungen angeregt werden, wodurch sich die Fluoreszenzlebensdauer τ des Europium-Ions verkürzt.

2.3.3. Zeitaufgelöste Laser-Fluoreszenzspektroskopie (TRLFS)

Die im vorangegangenen Abschnitt vorgestellten spektroskopischen Eigenschaften des Europiums können mittels zeitaufgelöster Laser-Fluoreszenzspektroskopie (TRLFS, engl. *timeresolved laser fluorescence spectroscopy*) untersucht werden. Die TRLFS ist eine vielseitige Speziationsmethode mit einer Untergrenze für die Speziation für Eu³⁺ in HClO₄ von ca. 10^{-7} mol/L [52].

Je nach Arbeitstechnik können bis zu drei verschiedene Aufnahmemodi unterschieden werden.

Das klassische Emissionsspektrum, wie es in Abbildung 2.11 (b) dargestellt ist, wird durch spektrale Zerlegung bei konstanter Anregungswellenlänge innerhalb eines konstanten Zeitfensters aufgenommen. Somit können anhand von relativen Verschiebungen, Intensitätsänderungen, Aufspaltungen und Linienbreiten der Emissionsbanden Rückschlüsse auf die chemische Umgebung des Ions gezogen werden.

Die Fluoreszenzlebensdauern können mittels eines Delay-Generators, der die Zeit zwischen Laserpuls und Öffnung des Kamerashutters schrittweise erhöht, gemessen werden. Wird über die Signalintensität integriert und diese gegen die Delayzeit aufgetragen, kann aus dem so erhaltenen Abklingprofil mittels exponentieller Anpassung nach Gleichung 2.2 oder Gleichung 2.4 die Lebensdauer der Fluoreszenz und daraus gemäß Gleichung 2.3 die Anzahl der quenchenden Wassermoleküle bestimmt werden.

Exzitationsspektren entsprechen in ihrer Struktur den Absorptionsspektren und werden für die Methode der bindungsstellenselektiven Direktanregung (auch *site*-selektiv genannt) benötigt. Bei dieser Technik wird das emittierende Energieniveau bei tiefen Temperaturen (T < 20 K) direkt angeregt, was im Fall des Eu³⁺ dem ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_0$ -Übergang entspricht. Dadurch, dass die strahlungslose Relaxation umgangen wird, können in Systemen mit mehreren simultan auftretenden Spezies Informationen zu jedem einzelnen vorliegenden Komplex erhalten werden. Die niedrigen Temperaturen führen zu einer Verringerung der Linienbreiten und können so ein Überlappen der verschiedenen Spezies verhindern. In Abbildung 2.13 ist dies anhand der 7F_0 -Bande von Eu³⁺-dotiertem Calcit (schwarz) im Vergleich zur UV-Anregung bei Raumtemperatur (rot) dargestellt. Es ist deutlich erkennbar, dass die 7F_0 -Bande unter 8 K und Direktanregung in drei Peaks, die jeweils einer Eu³⁺-Spezies entsprechen, aufspaltet, während unter UV-Anregung bei Raumtemperatur lediglich eine sehr breite Bande sichtbar ist.

Für die Aufnahme von Exzitationsspektren wird die Anregungswellenlänge variiert, im Fall des Eu³⁺ im Bereich von 572-585 nm, und die gesamte Fluoreszenzemission in einem festgelegten Wellenlängen- und Zeitfenster gegen diese aufgetragen. Die Auflösung wird dadurch von der Durchstimmbarkeit des Lasers und nicht von der spektralen Auflösung der Kamera limitiert.

Werden *site*-selektive TRLFS-Messungen durchgeführt, können zunächst über das Exzitationsspektrum die im zu untersuchenden System vorliegenden Spezies und ihre spezifischen Anregungswellenlängen identifiziert werden. Anschließend werden die jeweiligen Emissionsspektren aufgenommen und die Lebensdauer-Messungen durchgeführt.



Abbildung 2.13.: Exzitationsspektrum der ${}^{7}F_{0}$ -Bande von Eu³⁺ nach Direktanregung bei 8 K (schwarz) und unter UV-Anregung bei Raumtemperatur (rot), entnommen aus [53].

2.4. Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS)

Die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppelten Plasma (ICP-MS, engl. *inductively coupled plasma mass spectrometry*) ist eine hochempfindliche massenspektrometrische Analysemethode in der anorganischen Elementaranalytik. Dabei wird die Probenlösung mit Argongas zerstäubt. Im gezündeten Hochfrequenzargonplasma entstehen über thermische Anregung (6.000-10.000 K) Ionen, die durch ein elektrisches Feld in Richtung des Analysators des Massenspektrometers beschleunigt werden, wo die zu untersuchenden Elemente, bzw. deren Isotope, erfasst werden [54].

Die Nachweisgrenzen der ICP-MS liegen im *parts-per-trillion*-Bereich (1 ppt = 1 ng/L) [55].

KAPITEL 3

Experimentelle Umsetzung

Der experimentelle Teil dieser Arbeit gliedert sich in drei Abschnitte. Zunächst werden die einzelnen Schritte von der Gewinnung der Oozyten, über deren Aufbereitung bis hin zur Lagerung beschrieben. Anschließend wird die Probenherstellung für die beiden Messmethoden der TRLFS und ICP-MS, sowie deren Versuchsaufbau und -durchführung vorgestellt. Eine vollständige Liste der verwendeten Chemikalien befindet sich im Anhang.

3.1. Gewinnung und Präparation der Oozyten

Die Gewinnung der Oozyten erfolgt über eine partielle Entnahme des Ovars. Dies hat den Vorteil, dass das *Xenopus laevis* Weibchen lediglich für die Dauer des Eingriffs betäubt werden muss und nach einem halben Jahr Regenerationszeit erneut für die Entnahme von Oozyten zur Verfügung steht. Der zu operierende Frosch wird laut OP-Liste ausgewählt und erhält am Tag des Eingriffs kein Futter.

Für die OP und Aufbereitung werden folgende Materialien und Lösungen benötigt:

- 1. Autoklaviertes OP-Besteck (spitze Schere, Klemme, Pinzette)
- 2. Kanülen für den Einstich (Braun; Sterican $0.6 \times 25 \,\mathrm{mm}$ Größe 16; Roth C 719.1)
- 3. Nahtmaterial, innere Naht (Srag Wiessner; Serafit; PGA; USP5/0; DS-15)
- 4. Nahtmaterial, Haut (Serag Wiessner; Seraflex; Seide schwarz; USP 5/5; DSS-13)
- 5. Betäubungsmittel Ethyl-3-aminobenzoate methasulfonate salt (Tricaine)

- 6. Penicillin/ Streptomycin (Sigma)
- 7. Collagenase Type 2
- 8. Petrischalen, 60 mm und 94 mm Durchmesser (Sarstedt)
- 9. Modifiziertes BARTH Medium (siehe Tabelle 3.1)
- 10. Modifiziertes BARTH Medium (siehe Tabelle 3.1) ohne Calcium

Tabelle 3.1.: Modifiziertes BARTH Medium für die Oozytenbehandlung.

NaCl	$88\mathrm{mmol/L}$
KCl	$1\mathrm{mmol/L}$
$MgCl_2$	$0,82\mathrm{mmol/L}$
NaHCO ₃	$2,4\mathrm{mmol/L}$
$CaCl_2$	$2\mathrm{mmol/L}$
HEPES	$10\mathrm{mmol/L}$
рН 7,4	

Der *Xenopus laevis* wird für die Narkose in 1,5 L mit 1,5 g Tricaine und etwas Eis versetztes Leitungswasser gesetzt. Nach etwa 15 Minuten sollte der *Xenopus* vollständig betäubt sein, was durch das Fehlen des Zwischenzehenreflexes überprüft wird.

Der Frosch wird für die Dauer der OP in Rückenlage auf mit in Narkosemittel getränkten Tüchern bedecktes Eis gelegt und mit in Narkosemittel getränkten Tüchern so bedeckt, dass die abdominale Region frei bleibt. Um einen geraden Schnitt setzen zu können, wird mit der Kanüle ein kleines Loch in die Haut gestochen. Von diesem Loch aus wird mit einer kleinen spitzen Schere ein etwa 1-1,3 cm langer Schnitt in die Haut ausgeführt und anschließend das Peritoneum parietale (äußeres Blatt des Bauchfells) mit einer Pinzette angehoben und mit einem kleinen Schnitt ebenfalls durchtrennt. Das Ovar liegt nun frei und es kann die benötigte Anzahl an Oozyten, in der Regel 5-8 mL, mit einer Pinzette entnommen (siehe Abbildung 3.1 (a)) und in Barth Medium überführt werden.

Nach Abschluss dieser Prozedur werden das Peritoneum und die Haut verschlossen, der Frosch mit klarem Wasser abgespült und zum Aufwachen in ein separates Becken auf ein Kissen gesetzt, sodass die Nasenöffnungen frei liegen, die Haut aber möglichst wenig austrocknet. Die Narkose ist nach etwa 1,5 Stunden abgeklungen und der *Xenopus* kann in sein Aquarium

zurück gesetzt werden.



(a) Entnahme der Oozyten.



(b) Vereinzelte Oozyten nach der Collagenase-Behandlung.



(c) Aufbewahrung der sortierten Oozyten.

Abbildung 3.1.: Nach erfolgreicher Entnahme der Oozyten (a), werden diese zunächst vereinzelt (b) und gewaschen und unter Zugabe von Collagenase wird die extrazelluläre Matrix verdaut. Nach wiederholtem Waschen erfolgt das Sortieren vitaler Oozyten. Gelagert werden sie in Petrischalen in Modified Barth Medium bei 16 °C (c).

Die gewonnenen Oozyten werden einige Male in BARTH Lösung gespült und in eine Petrischale mit 94 mm Durchmesser überführt. Mit Uhrmacher-Pinzetten (Dumont) oder einem Skalpell werden sie vereinzelt, sodass 5-7 Oozyten an einem Strang verbleiben und zehnmal in calciumfreiem BARTH Medium gespült.

Für die Defollikulierung werden 6-8 mg Collagenase in eine mittlere Petrischale (60 mm Durchmesser) eingewogen und die Oozyten mit ca. 15 mL calciumfreiem BARTH Medium hinzugegeben. Auf einem Schüttler werden sie bei etwa 100 rpm und Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert und nach Ablauf dieser Zeit erneut zehnmal, mit Ca²⁺-haltigem BARTH Medium gewaschen. In Abbildung 3.1 (b) sind die vereinzelten Oozyten nach der Collagenase-Behandlung abgebildet.

Anschließend erfolgt das Sortieren nach Stadien und Qualität der Oozyten, wobei, wie in Unterabschnitt 2.1.2 beschrieben, nur Oozyten in den Stadien V bis VI benötigt werden. Zur Begutachtung der Zellen wird ein Biokular-Mikroskop (LEICA GZ 4, Lichtquelle OLYMPUS) verwendet. In Abbildung 3.2 ist gezeigt, wie sie qualitativ unterschieden werden können. Die Oozyten in (a) erscheinen aufgrund ihrer gleichmäßigen Zweifärbung und Kugelform gesund und damit für Experimente geeignet, wohingegen die Oozyten in (b) nicht gleichmäßig gefärbt sind, was auf mangelnde Vitalität zurückzuführen ist. Diese Oozyten werden nicht weiter genutzt.



Abbildung 3.2.: Abgebildet sind Oozyten der Stadien V-VI. (a) zeigt qualitativ hochwertige Oozyten, die für Experimente eingesetzt werden können. Die Oozyten in (b) weisen optische Mängel auf, weshalb diese nicht verwendet wurden. Entnommen aus [27].

Die verwendbaren Oozyten werden zu jeweils ca. 50 Stück in BARTH Lösung in Petrischalen mit 60 mm Durchmesser im Klimaschrank bei 16 °C gelagert und stehen nun für Experimente zur Verfügung, siehe Abbildung 3.1 (c).

3.2. Charakterisierung der Sorptionsspezies an der Zellmembran mittels TRLFS

Mittels der in Unterabschnitt 2.3.3 beschriebenen Methode der zeitaufgelösten Laser-Fluoreszenzspektroskopie sollen die an der Oberfläche der Oozyten gebildeten Europium-Spezies charakterisiert werden. Dazu werden im Folgenden die Herstellung der Proben sowie die verwendeten Lasersysteme beschrieben.

3.2.1. Herstellung der Proben und Versuchsdurchführung

Für die TRLFS Messungen wurde zunächst eine geeignete Europium-Lösung hergestellt. Dazu wurde Europium (EuCl₃ · 6H₂O) in calciumfreiem BARTH Medium gelöst. TRLFS-Emissionsspektren dieser Lösung zeigten aufgrund einer stark ausgeprägten ⁷F₂-Bande jedoch schnell, dass der pH-Wert von 7 nicht geeignet war, sodass dieser auf 5,5 eingestellt wurde. Dies erforderte die Verwendung eines anderen Puffers, sodass aufgrund des geeigneteren Pufferbereichs von pH 5,8-6,5 im Folgenden MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure) eingesetzt wurde, welche unter diesen Bedingungen keine Komplexe mit Eu³⁺ eingeht. Die Überwachung des pH Werts erfolgte mit einem Orion DUAL STAR pH Meter (Thermo Scientific) mit einer PerpHecT ROSS Elektrode (Thermo Scientific). Weiterhin wurde das Medium ohne Calcium angesetzt. Die genaue Zusammensetzung ist in Tabelle 3.2 gezeigt.

Tabelle 3.2.: Modifiziertes BARTH Medium für die Oozytenbehandlung mit Eu³⁺.

NaCl	$125\mathrm{mmol/L}$
KCl	$1\mathrm{mmol/L}$
$MgCl_2$	$0,82\mathrm{mmol/L}$
MES	$10\mathrm{mmol/L}$
EuCl ₃	variierend

pH 5,5

Diesem veränderten BARTH Medium kann EuCl₃ gewünschter Konzentration hinzugefügt werden und es wird damit im Folgenden als (Eu-)Stammlösung bezeichnet.

Abbildung 3.3 zeigt das TRLFS Spektrum der von nun an verwendeten Europium-Stammlösung mit c(Eu) = 1 mmol/L. Die zugehörige Lebensdauer dieser Messung beträgt $117 \,\mu\text{s}$, sodass



Abbildung 3.3.: Stamm-Lösung für die TRLFS-Messungen mit modifiziertem BARTH Medium bei pH 5,5. Die Eu-Konzentration beträgt 1 mmol/L.

hier von einem Vorliegen des reinen Aquoions ausgegangen werden kann.

Um ein Konkurrieren von Ca^{2+} und Eu^{3+} auszuschließen, wurde für die gesamte Aufbereitung der Oozyten ausschließlich Ca^{2+} -freies BARTH Medium verwendet. Zudem stellte sich heraus, dass die Zellen nach Inkubation über einige Tage bei pH 7 vitaler waren, als bei einem pH-Wert von 5,5, sodass sie bis zum Beginn der Messvorbereitungen in Ca^{2+} -freiem BARTH Medium nach Tabelle 3.1 bei pH 7 gelagert wurden.

Wie bereits im Unterabschnitt 2.1.1 beschrieben, ist Ba²⁺ in der Lage, den Ca²⁺-Ionenkanal zu passieren. Da Ba²⁺ im Gegensatz zu Ca²⁺ nicht endogen in den Oozyten vorhanden ist, sollte es als Kontrollmessung für das Aufnahmeverhalten in die Oozyten, besonders in Hinblick auf die in Unterabschnitt 3.3.1 beschriebenen ICP-MS-Messungen, dienen. Da jedoch eine Adsorption von Barium auf der Oberfläche der Zellen nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde ebenfalls eine TRLFS-Versuchsreihe mit bariumhaltiger Eu-Stammlösung durchgeführt, um einen möglichen Einfluss auf die Adsorption des Europiums beobachten zu können. Die Stammlösung wurde dazu mit 0,1 mmol/L Barium versetzt.

Für die TRLFS-Messungen wurden 0,1 mmol/L und 1 mmol/L Eu-Stammlösungen verwendet und die Oozyten vor der Messung für die gewünschte Dauer darin überführt. Bei den ersten Versuchsreihen fand unmittelbar vor den Messungen ein zehnmaliges Waschen mit dem pH 5,5 BARTH Medium statt. Da die Zellen nach unterschiedlicher Inkubationszeit vermessen werden sollten, mussten für diese Methode zu jedem Zeitpunkt neue Oozyten verwendet werden. Dadurch kam es aufgrund von minimalen Veränderungen der Geometrie des Versuchsaufbaus zu einer Beeinträchtigung der Vergleichbarkeit der Messungen, wie im nächsten Kapitel gezeigt wird.

Um diese Problematik zu umgehen, wurde auf das Waschen der Oozyten verzichtet, sodass diese mit der Eu-Stammlösung in die Küvette für die Messungen bei Raumtemperatur, siehe Abbildung 3.4 (b), gegeben wurden. So fand keinerlei Veränderung am Versuchsaufbau statt und es konnten zu jedem Zeitpunkt die gleichen Oozyten vermessen werden.

Für die Messungen mit Barium wurden die Oozyten für etwa 30 Minuten in bariumhaltiges BARTH Medium (pH 5,5) gegeben, bevor die Inkubation für die vorgesehenen Zeitintervalle in der Eu-Ba-Lösung stattfand. Auch hier wurde auf das Waschen der Zellen verzichtet und die Messungen direkt im Medium durchgeführt.

Die im Folgenden beschriebenen TRLFS-Messungen wurden am Institut für Ressourcenökologie (IRE) des Helmholtz-Zentrums Dresden-Rossendorf (HZDR) durchgeführt.

Messungen bei Raumtemperatur

Die Oozyten wurden für die Messungen in eine Küvette mit Fenster (siehe Abbildung 3.4 (b)) überführt. Für die Messungen bei Raumtemperatur wurde ein gepulstes Nd:YAG-OPO-Lasersystem (Powerlite Precision II 9020 Laser in Kombination mit einem Green PANTHER EX OPO, Continuum, USA) verwendet. Die Pulsenergie betrug 1-2 mJ und wurde mittels einer Photodiode überwacht. Die Fluoreszenz wurde in einem Winkel von 90° mittels eines optischen Multi-Channel-Analyzer-Systems (MCA), bestehend aus einem Monochromator (Oriel MS 257), einem Spektrographen mit 300 oder 1200 Linien/mm Gitter und einer Andor ICCD-Kamera, auf -20 °C gekühlt, (Lot-Oriel, Deutschland) detektiert.

Die Emissionsspektren wurden im Wellenlängenbereich von 440-780 nm (300 Linien/mm)Gitter und die Lebensdauermessungen im Bereich von 570-650 nm (1200 Linien/mm) aufgenommen. Zur Aufnahme der Lebensdauern wurde das Delay der Kamera schrittweise auf bis zu einigen Millisekunden erhöht, bis die Fluoreszenzintensität auf ein Minimum von 1/egesunken war. Die Anregungswellenlänge betrug 394 nm. Der gesamte Versuchsaufbau ist schematisch in Abbildung 3.4 (a) dargestellt.



Abbildung 3.4.: (a) Versuchsaufbau für TRLFS-Messungen. Die zu untersuchende Probe wird in den gepulsten Laser gestellt und das Fluoreszenzlicht im Winkel von 90° mitels eines Spektrographen und einer CCD-Kamera detektiert. (b) zeigt eine schematische Darstellung der für die Messungen bei Raumtemperatur verwendeten Küvette mit Fenster und in (c) ist der Feststoffprobenträger für die Tieftemperaturmessungen zu sehen.

Messungen bei Tieftemperatur

Für die *site*-selektiven TRLFS-Messungen wurden die Oozyten in den in Abbildung 3.4 (c) gezeigten Feststoffprobenträger überführt und in einem Kryostaten mit Ultrahoch-Vakuum $(10^{-6} - 10^{-7} \text{ mbar})$ auf < 10 K gekühlt. Bei dem verwendeten Laser-System handelte es sich um einen Nd:YAG (Continuum SL I-20, Continuum, San Jose, USA) gepumpten Farbstoff-Laser (NarrowScan K, Radiant Dyes Laser & Accesories GmbH, Wermelskirchen, Deutschland) mit dem Farbstoff Coumarin 153 als Lasermedium.

Für die Aufnahme der Exzitationsspektren wurde die Emissionswellenlänge des Lasers im Spektralbereich des ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_5$ -Übergangs (575-582 nm) in 0,2-0,1 nm-Schritten variiert und für jeden Schritt die Fluoreszenzintensität aufgenommen. Die somit identifizierten Eu³⁺-Spezies wurden direkt angeregt, sodass Einzelspeziesemissionsspektren und -lebensdauern aufgenommen werden konnten.

Für die Detektion der Lumineszenz wurde ein Spektrograph (Shamrock 303i, Andor Technology Ltd. Belfast, UK) mit polychromatischen Gittern (300, 600, 1200 Linien/mm) und CCD-Kamera (Andor iStar 743, auf -20 °C gekühlt) verwendet. Zur Aufnahme der Lebensdauern wurde das Delay der Kamera schrittweise auf bis zu einigen Millisekunden erhöht, bis die Fluoreszenzintensität auf ein Minimum von 1/e gesunken war.

3.3. Konzentrationsbestimmung der Absorption und Adsorption von Eu³⁺ mittels ICP-MS

Um die intrazelluläre Eu³⁺-Konzentration und die Menge des auf der Oberfläche sorbierten Europiums quantifizieren zu können, wurden die Oozyten auf zwei unterschiedliche Weisen präpariert und die so entstandenen Proben mittels ICP-MS gemessen.

3.3.1. Herstellung der Proben und Versuchsdurchführung

Zur Bestimmung des in die Oozyten transportierten Europiums waren zwei Methoden denkbar; zum einen das vollständige Entfernen der Zellmembran und zum anderen das Heraussaugen von intrazellulären Komponenten. Letzteres konnte mit einem Mikroinjektor (WPI) am Institut für Biophysik der Leibniz Universität Hannover durchgeführt werden. Dazu wurden Glaskapillaren (WPI, Glass Replacement 3,5 nL) gezogen (NARISHIGE, Japan, Modell PP-830) und unter einem Mikroskop (ZEISS) so gebrochen, dass sie eine Öffnung von wenigen Mikrometern aufwiesen. Anschließend wurden sie mit Mineralöl befüllt und auf die Spitze des Injektors gesteckt.

Die Oozyten wurden nach gewünschter Inkubationszeit in der Eu-Stammlösung zehnmal in BARTH Medium (pH 5,5) gewaschen und in einem speziell angefertigten Probenträger platziert. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 3.5 (a) von außen und in (b) mit Blick durch das angeschlossene Mikroskop (LEICA GZ 4, Lichtquelle OLYMPUS) gezeigt.

Aus einer einzelnen Oozyte konnten somit wenige Nanoliter Cytoplasma entnommen werden. Da das auf diese Weise gewonnene Volumen pro Oozyte nicht exakt definierbar war und starken Schwankungen unterlag, wurden nacheinander mehrere Zellen (ca. 60-80 Stück) ausgesogen, bis ein Volumen von $10 \,\mu$ L erreicht wurde. Die Schwierigkeit dieser Methode bestand darin, keine Membranbestandteile mit einzusaugen, was durch genaustes Beobachten und sehr sorgfältiges und vorsichtiges Vorgehen gewährleistet werden sollte.

Vor der Messung mit dem ICP-MS fand eine weitere Verdünnung der gewonnenen $10 \,\mu\text{L}$ um den Faktor 1 : 1.000 bis 1 : 10.000 mit 2 %-iger Salpetersäure (aus 69 % HNO₃) statt.

Die Quantifizierung des an der Zellmembran sorbierten Europiums wurde unter der Annahme, dass sich an der Membran mehr Europium befindet als durch die Kanäle aufgenommen wurde, an ganzen Oozyten durchgeführt.



(a) Außenansicht. (b) Blick durch das Mikroskop.

Abbildung 3.5.: Aussaugen der Oozyten mittels des Injektors.

Diese wurden dazu wieder in der Eu-Stammlösung (Tabelle 3.2) inkubiert und zehnmal gewaschen. Anschließend wurden die Eizellen zu je fünf Stück in 2%-ige Salpetersäure überführt und mechanisch zerstört und weiter verdünnt auf 10 mL.

Um mittels dieser Methode weitere Aussagen über die Aufnahme von Europium in die Zellen treffen zu können, wurden Zeitreihen-Messungen über kürzere Intervalle durchgeführt. Dazu wurden zu jedem Zeitpunkt fünf Oozyten einzeln aus der Eu-Stammlösung entnommen, gewaschen, zerstört und wieder auf 10 mL in 2%-iger Salpetersäure (Faktor ca. 1 : 20.000) verdünnt.

Wie auch bei den TRLFS-Messungen, wurde eine weitere Versuchsreihe mit zusätzlich 0,1 mmol/L Barium durchgeführt. Die Oozyten wurden dazu für etwa 30 Minuten in bariumhaltiges BARTH Medium (pH 5,5) gegeben, bevor die Inkubation für die vorgesehenen Zeitintervalle in der Eu-Ba-Lösung stattfand. Es wurden zu jedem Zeitpunkt sechs Oozyten einzeln entnommen, gewaschen, zerstört und in 2%-iger Salpetersäure auf 10 ml verdünnt.

Für die ICP-MS Messungen wurde eine Europium-Standard-Reihe im Bereich 0,01-6 ppb hergestellt aus einem 1000 ppm Europium-Plasma Standard ((Eu₂O₃)₃, in 5 % HNO₃) und 2 %-iger Salpetersäure.

Ebenfalls wurde für die späteren Experimente mit Barium eine Barium-Standard-Reihe im Bereich 0,01-5 ppb hergestellt aus einem 1000 ppm Barium ICP Standard (Ba(NO₃)₂, in 2% HNO₃) und 2%-iger Salpetersäure.

Alle Messungen wurden an dem ICP-MS iCAP Q von Thermo Fisher durchgeführt. Das Massenspektrometer besitzt einen automatischen Probengeber (Cetac ASX-520), mit dem die wässrigen Proben injiziert wurden.
KAPITEL 4

Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse vorgestellt und diskutiert. Dabei erfolgt, sofern möglich, ein Vergleich mit vorangegangenen Arbeiten. Zudem werden die angewendeten Messmethoden kritisch hinterfragt und zukünftige Weiterentwicklungsmöglichkeiten erörtert.

4.1. TRLFS-Messungen

Die im Folgenden gezeigten Spektren der TRLFS-Messungen wurden in OriginPro 2017 auf die ${}^{7}F_{1}$ -Bande normiert und die normierte Intensität gegen die Wellenlänge aufgetragen. Die Bestimmung der Lebensdauern erfolgte über eine Fortran-Auswerteroutine in Physica.

4.1.1. Messungen bei Raumtemperatur

Um Abschätzungen über die Dynamik des Systems treffen zu können, wurden die Oozyten, wie bereits in Abschnitt 3.2 beschrieben, nach unterschiedlichen Inkubationszeiten der Eu-Stammlösung entnommen und nach zehnmaligem Waschen in die Küvette überführt. Dies erfolgte mit Europium-Konzentrationen von 1 mmol/L und 0,1 mmol/L. Die zugehörigen Spektren sind in Abbildung 4.1 dargestellt. Die einzelnen Banden ähneln sich in ihrer Struktur sehr, sodass die ${}^{7}F_{0}$ - und ${}^{7}F_{1}$ -Banden bei 579 nm bzw. 591 - 592 nm recht gut übereinander liegen. Die ${}^{7}F_{2}$ -Banden weisen immer einen steilen Anstieg bis zu ihrem Maximum bei etwa 614 nm auf und fallen etwas flacher unter Ausprägung einer leichten Schulter auf der rechten Seite ab. Hingegen sind in der Fluoreszenzintensität einige Unterschiede zu beobachten.



Abbildung 4.1.: Auf die ⁷ F_1 -Bande normierte Eu-Emissionsspektren von Oozyten nach verschiedenen Inkubationszeiten in einer Eu-Lösung bei verschiedenen Konzentrationen (c (Eu) = 1 mmol/L (a) und c (Eu) = 0,1 mmol/L (b)) zur Bestimmung der Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Sorption von Europium an der Zelloberfläche. In (c) sind drei Emissionsspektren nach 24 h in der Eu-Lösung bei verschiedenen Konzentrationen gezeigt.

In (a) (c(Eu) = 1 mmol/L) ist ein Anwachsen der ⁷F₂-Bande im Verlauf der Inkubationszeit von einer (grün) auf 45 Stunden (orange) deutlich zu erkennen. Jedoch unterscheiden sich die Spektren nach zwei (blau), drei (magenta), und 22 Stunden (braun) nur wenig. Dieser Trend setzt sich allerdings nicht bei der Europium-Konzentration von 0,1 mmol/L (b) fort: Hier ist die ⁷F₂-Bande nach 20 Stunden (braun) am intensivsten, nach 44 Stunden (orange) jedoch am schwächsten ausgeprägt. Die Messungen nach ein (grün), zwei (blau), und drei Stunden (magenta) liegen dazwischen und sind kaum voneinander zu unterscheiden. Die Gesamtintensität der Fluoreszenz verringert sich jedoch erwartungsgemäß bei niedrigerer Konzentration, was aufgrund der Normierung nur an dem zunehmenden Rauschen in den Spektren erkennbar ist. In (c) sind die Spektren nach ca. 24 Stunden in Abhängigkeit der Eu-Konzentration dargestellt, wobei hier eine weitere Messung mit c(Eu) = 0,01 mmol/Lstattfand. Das zugehörige Spektrum (rot) weist ein schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis auf, jedoch ist die ⁷F₂-Bande intensiver ausgeprägt. Generell lässt sich bei diesem Vergleich ein Anwachsen der ⁷F₂-Bande bei sinkender Eu-Konzentration von c(Eu) = 1 mmol/L (blau) auf c(Eu) = 0,01 mmol/L (rot) beobachten.

In Unterabschnitt 2.3.2 wurde bereits erläutert, dass das Intensitätsverhältnis der ${}^{7}F_{1}$ - zur ${}^{7}F_{2}$ -Bande als Maß für die Komplexierung des Eu $^{3+}$ herangezogen werden kann. Der in den Spektren beobachtete relative Anstieg der ${}^{7}F_{2}$ -Bande deutet somit auf eine Zunahme der Komplexierung des Europiums im zeitlichen Verlauf hin.

Die den gezeigten Spektren zugehörigen Lebensdauern wurden über einen biexponentiellen Fit ermittelt und sind mit der nach Gleichung 2.3 berechneten Anzahl der Wassermoleküle und den Verhältnissen der Lebensdauern der verschiedenen Spezies in Tabelle 4.1 gezeigt. Bei einer Europium-Konzentration von 1 mmol/L liegen die Lebensdauern τ_1 mit 181 - 199 μ s zwischen einer und 22 Stunden recht nah beieinander. Gemäß der HORROCKS-Gleichung entspricht dies etwa fünf das Eu³⁺-Ion umgebenden Wassermolekülen. Die Messung nach 45 Stunden ergab eine längere Lebensdauer $\tau_1 = 274 \,\mu$ s, äquivalent zu drei koordinierenden Wassermolekülen. Die längeren Lebensdauern τ_2 liegen in einem Bereich von 484 - 539 μ s (ca. 1,5 Wassermoleküle). Die Intensitätsverhältnisse der den beiden Lebensdauern zugeordneten Emissionen (τ_1/τ_2) betragen etwa 50/50 - 60/40 %, mit Ausnahme der Messung nach drei Stunden (35/65 %).

Die Lebensdauern τ_1 der Messungen bei c(Eu) = 0,1 mmol/L streuen mit 193 - 256 μ s (3,6 - 4,9 Wassermoleküle) nach ein, zwei, drei und 44 Stunden deutlich mehr, was auch bei den zweiten Lebensdauern $\tau_2 = 442 - 539 \,\mu$ s (1,4 - 1,8 Wasser) zu beobachten ist. Die Messung nach 20 Stunden weist bei dieser Konzentration deutlich größere Lebensdauern ($\tau_1 = 334 \,\mu$ s und

Tabelle 4.1.: Lebe	ensdauern	zu den S	Spektren au	s Abbild	ung 4.1 bei	unterschiedli-
chen Europium-Konzentrationen. Zusätzlich wurde die Anzahl der koordinierenden						
Wassermoleküle $n(H_2O)$ und die Intensitätsverhältnisse der den beiden Lebensdauern						
zugeordneten Emissionen (τ_1/τ_2) ermittelt.						
c(Eu) [mmol/L]	$\operatorname{Zeit}\left[h\right]$	$ au_1 [\mu s]$	$n_1(H_2O)$	$ au_2 \left[\mu \mathrm{s} \right]$	$n_2(H_2O)$	$\tau_1/\tau_2[\%]$
		101	Z 0	200		00/10

	= 0.10 []	· 1 [[~~]	···1(···20)	· 2 [P~~]	···2(···20)	17.2[70]
1	1	181	$5,\!3$	506	$1,\!5$	60/40
1	2	185	5,2	492	1,6	52/48
1	3	192	$4,\!9$	484	$1,\!6$	35/65
1	22	199	4,8	488	1,6	49/51
1	45	274	3,3	539	1,4	61/39
0,1	1	193	4,9	472	1,6	46/54
0,1	2	218	$4,\!3$	442	$1,\!8$	33/67
0,1	3	256	$3,\!6$	533	$1,\!4$	60/40
0,1	20	334	2,6	635	1,1	65/35
0,1	44	221	4,2	539	$1,\!4$	45/55
0,01	22	106	9,4	453	1,7	25/75

 $\tau_2 = 635 \,\mu$ s) und somit eine geringe Anzahl an koordinierenden Wassermolekülen (3,3 bzw. 1,1) auf. Die relativen Anteile der Spezies mit diesen Lebensdauern liegen zwischen 33/67 % nach 2 h und 65/35 % nach 20 h.

Die Messung nach 22 Stunden bei c(Eu) = 0.01 mmol/L ergab Lebensdauern von $\tau_1 = 106 \,\mu\text{s}$ und neun Wassermolekülen (Aquoion) und $\tau_2 = 453 \,\mu\text{s}$ (1,7 Wasser) im Verhältnis 25/75 %.

Die Spektren der Messungen bei c(Eu) = 1 mmol/L lassen aufgrund des wachsenden ${}^{7}F_{2} / {}^{7}F_{1}$ -Verhältnisses den Schluss zu, dass das Europium-Ion mit zunehmender Inkubationszeit stärker komplexiert. Jedoch weisen die ähnlichen Lebensdauern mit Ausnahme der 45 Stunden Messung nicht auf eine Veränderung der im System vorliegenden Spezies hin.

Die Beobachtung in Abbildung 4.1 (c), dass die ${}^{7}F_{2}$ -Bande mit sinkender Eu-Konzentration ansteigt, kann mit den ermittelten Verhältnissen der Spezies und deren Lebensdauern erklärt werden: Die Messung bei 0,01 mmol/L weist einen Anteil von 75 % der Spezies mit langer Lebensdauer ($\tau_{2} = 453 \,\mu$ s) auf, sodass die ${}^{7}F_{2}$ -Bande aufgrund der starken Komplexierung im Verhältnis sehr stark ausgeprägt ist. Die längere Lebensdauer τ_{2} der Messung bei 1 mmol/L ist mit 488 μ s zwar ähnlich, jedoch liegt sie im Verhältnis 49/51 % zur kürzeren Lebensdauer ($\tau_{1} = 199 \,\mu$ s) vor, was die Intensität der ${}^{7}F_{2}$ - im Verhältnis zur ${}^{7}F_{1}$ -Bande abschwächt. Die Lebensdauern der Messung bei $c(Eu) = 0,1 \,\mathrm{mmol/L}$ sind insgesamt länger, hier dominiert aber die Europium-Spezies mit kürzerer Lebensdauer $\tau_1 = 334 \,\mu$ s, sodass die relative Intensität dieser ⁷F₂-Bande zwischen den beiden anderen liegt. Dieses Verhalten deutet darauf hin, dass bei geringer Eu-Konzentration zunächst die Bindungsplätze an der Zellmembran belegt werden, die starke Komplexe mit dem Eu³⁺ eingehen, was zu längeren Lebensdauern führt und es bei höheren Konzentrationen vermehrt zu Mischungen mit weniger stark komplexierenden Stellen kommt.

Die stärker variierenden Lebensdauern bei c(Eu) = 0,1 mmol/L und die Inkonsistenz beim relativen Anstieg der ⁷F₂-Bande, insbesondere aber auch die variierenden Verhältnisse der verschiedenen Spezies führten zu der Vermutung, dass die durch die stetige Verwendung neuer Oozyten bedingte Veränderung der Versuchsgeometrie die Messungen maßgeblich beeinflusst. Beispielsweise konnte nicht festgestellt werden, ob sich die Fluoreszenzeigenschaften verändern, wenn der Laser auf die dunkle oder die helle Seite der Oozyten trifft. Außerdem konnte nicht gewährleistet werden, dass die Oozyten immer in gleicher Position in der Küvette platziert waren und der Laser auf nur eine Oozyte gerichtet war, sodass dieser (wie in Abbildung 4.2 gezeigt) teilweise auch auf mehrere Oozyten gleichzeitig traf.



Abbildung 4.2.: Schematische Darstellung des Sichtfensters in der Küvette. Der Durchmesser des Laserstrahls (violett) ist etwas größer als die Oozyten, sodass bei einer Messung mehrere Zellen gleichzeitig getroffen wurden.

Um die Geometrie des Aufbaus nicht zu verändern und immer die gleichen Oozyten im zeitlichen Verlauf vermessen zu können, wurde im Folgenden dazu übergegangen, die Oozyten mit der Eu-Stammlösung zusammen in die Küvette zu geben. Zudem sollten die ersten Stunden nach dem Erstkontakt mit der Europium-Lösung feinschrittiger untersucht werden, sodass zunächst im Viertelstundentakt und ab zwei Stunden stündlich bis etwa fünf Stunden Spektren und Lebensdauern aufgenommen wurden. Außerdem wurde aus Gründen der höheren Fluoreszenzintensität eine Eu-Konzentration von 1 mmol/L gewählt.



(a) Emissionsspektren bis 5 h, c(Eu) = 1 mmol/L.



(b) Emissionsspektren bis 20 h, c(Eu) = 1 mmol/L. (c) Emissionsspektren bis 20 h, c(Eu) = 1 mmol/L, c(Ba) = 0.1 mmol/L.

Abbildung 4.3.: Auf die ⁷ F_1 -Bande normierte Eu-Emissionsspektren von Oozyten nach verschiedenen Inkubationszeiten in einer Eu-Lösung bei konstanter Konzentration (c (Eu) = 1 mmol/L) zur Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Sorption von Europium an der Zelloberfläche. In (c) wurden zusätzlich 0,1 mmol/L Barium hinzugefügt, um mögliche Veränderungen im Sorptionsverhalten beobachten zu können.



Abbildung 4.4.: Eu-Emissionsspektren von Oozyten nach fünf Minuten in einer Eu-Lösung bei konstanter Eu-Konzentration (c (Eu) = 1 mmol/L). Zu sehen ist eine Änderung des Intensitätsverhältnisses der ${}^{7}F_{1}$ - und ${}^{7}F_{2}$ -Bande als Funktion des Delays.

In den Spektren lässt sich ein stetiger Anstieg der ${}^{7}F_{2}$ -Bande mit der Inkubationszeit erkennen, wobei die größten Sprünge im Bereich bis zu 57 Minuten (magenta) auftreten (siehe Abbildung 4.3 (a)). Während der ersten Lebensdauermessung (nach fünf Minuten) zeigte sich eine starke Dynamik in den Intensitätsverhältnissen von ${}^{7}F_{1}$ - zu ${}^{7}F_{2}$ -Bande (siehe Abbildung 4.4). Daher wurden in einer zweiten Messreihe (Abbildung 4.3 (b)) lediglich Spektren aufgenommen, um das Sorptionsverhalten von Eu³⁺ in der ersten Stunde so feinschrittig wie möglich (in der ersten halben Stunde alle zwei, danach alle fünf Minuten) aufzulösen.

Auch hier lässt sich ein stetiger Anstieg im ${}^{7}F_{2} / {}^{7}F_{1}$ -Verhältnis mit der Zeit erkennen. Lebensdauermessungen erfolgten hierbei nur nach einer und 20 Stunden.

Die berechneten Lebensdauern zu den in Abbildung 4.3 (a) und (b) gezeigten Spektren sind in Tabelle 4.2 dargestellt.

Die langlebigere Eu-Spezies variiert in diesen Zeitreihen-Messungen kaum. Die Lebensdauer liegt bei $\tau_2 = 430 - 481 \,\mu$ s, was 1,6 bis 1,8 koordinierenden Wassermolekülen entspricht und dominiert das System mit 60-80%. Für die kürzere Lebensdauer τ_1 ergeben sich deutlich

vielfältigere Werte von 122-262 μ s, wobei kein Anstieg der Lebensdauer mit der Zeit bzw. der Komplexierung anhand der ⁷F₂-Bande zu erkennen ist. Dieser Umstand könnte darauf hindeuten, dass im vorliegenden System mehrere kurzlebige Spezies nebeneinander liegen.

Tabelle 4.2.: Lebensdauern zu den Spektren aus Abbildung 4.3 (a)-(c) bei konstanter Europium-Konzentration von 1 mmol/L. Zusätzlich wurde die Anzahl der koordinierenden Wassermoleküle $n(H_2O)$ und die Intensitätsverhältnisse der den beiden Lebensdauern zugeordneten Emissionen (τ_1/τ_2) ermittelt.

Zeit [min]	$\tau_1 [\mu s]$	$n_1(H_2O)$	$ au_2 \left[\mu s \right]$	$n_2(H_2O)$	$\tau_1/\tau_2[\%]$
21	144	6,8	481	1,6	31/69
34	159	6,1	430	1,9	21/79
48	122	8,2	438	$1,\!8$	18/82
62	182	$5,\!3$	437	$1,\!8$	20/80
79	144	6,8	426	$1,\!9$	20/80
97	241	3,8	451	1,8	38/62
114	233	4,0	439	$1,\!8$	31/69
132	218	4,3	436	1,8	31/69
206	158	6,1	444	$1,\!8$	39/61
258	262	3,5	453	1,7	44/56
315	223	4,2	436	1,8	33/67
65	176	5,5	440	1,8	36/64
1200	180	5,3	483	1,6	30/70

Wie bereits in Unterabschnitt 3.2.1 erläutert, wurde eine weitere Zeitreihenmessung mit 1 mmol/L Europium und 0,1 mmol/L Barium durchgeführt. Zunächst wurden alle zwei Minuten Spektren aufgezeichnet und erst nach einer halben Stunde Lebensdauermessungen durchgeführt und der zeitliche Abstand zwischen den Messungen vergrößert. Die Spektren sind in Abbildung 4.3 (c) gezeigt. Auch hier lässt sich klar ein Anstieg des ${}^{7}F_{2} / {}^{7}F_{1}$ -Verhältnisses im zeitlichen Verlauf erkennen. Lediglich die Messung nach 24 Stunden (rot) zeigt kein weiteres Wachstum und ist ähnlich zu der nach 58 Minuten (dunkelgrau). Die berechneten Lebensdauern sind in Tabelle 4.3 aufgeführt. Analog zu der vorherigen Messreihe ohne Barium dominiert hier wieder die längere Lebensdauer τ_{2} mit 70-80 % und liegt im Bereich von 443-501 μ s mit 1,5-1,8 umgebenden Wassermolekülen.

Labene 4.3.: Lebensdauern zu den Spektren aus Abbildung 4.3 (c) bei konstanter
Europium-Konzentration von 1 mmol/L und Barium-Konzentration von 0,1 mmol/L
Zusätzlich wurde die Anzahl der koordinierenden Wassermoleküle $n(H_2O)$ und die
Intensitätsverhältnisse der den beiden Lebensdauern zugeordneten Emissionen (τ_1/τ_2)
ermittelt.

-1-4----- Al-1-:1-1-----

$\operatorname{Zeit}\left[\min\right]$	$\tau_1 [\mu s]$	$n_1(H_2O)$	$ au_2 \left[\mu s \right]$	$n_2(H_2O)$	$\tau_1/\tau_2[\%]$
29	145	6,8	451	1,8	18/82
61	175	5,5	459	1,7	25/75
76	246	3,7	464	1,7	29/71
91	194	4,9	447	1,8	21/79
106	179	5,4	448	1,8	25/75
122	156	6,2	444	1,8	22/78
183	180	5,3	443	1,8	24/76
243	211	4,4	448	1,8	27/73
316	192	4,9	448	1,8	27/73
1440	267	3,4	501	$1,\!5$	31/69

Auch die kürzere Lebensdauer τ_1 unterliegt wieder starken Schwankungen von 145-267 μ s (3,4-6,8 Wassermoleküle), die keiner offensichtlichen Systematik zu folgen scheinen.

Aufgrund der Ähnlichkeit der beiden Messreihen ohne und mit Barium ist anzunehmen, dass dieses keinen Einfluss auf die Sorptionseigenschaften von Europium auf der Membran der Oozyten ausübt. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Sorptionsexperimenten von Lanthaniden auf gramnegativen Bakterien *Pseudomonas aeruginosa* bei denen festgestellt wurde, dass auch Calcium, Natrium und Kalium keinen Einfluss auf die Biosorption von Eu³⁺ nehmen [56]. Dennoch sollen diese und die beiden vorherigen Zeitreihenmessungen (siehe Abbildung 4.3, Tabelle 4.2 und Tabelle 4.3) aufgrund der gut vergleichbaren Lebensdauern und Spektren für die Charakterisierung der möglichen Sorptionsspezies dienen.

In Abbildung 2.3 wurde bereits gezeigt, dass sich an biologischen Molekülen diverse funktionelle Gruppen befinden, von denen besonders Phosphat-, Hydroxyl-, Carboxyl- und Carbonyl-Gruppen Bindungen mit dem Europium-Ion eingehen könnten. Da die gesamte Zellmembran aus Phospholipiden aufgebaut ist, könnten sich dort vornehmlich Europium-Phosphate bilden. In Unterabschnitt 2.1.1 wurde gezeigt, dass im Ionenkanal die Carbonylsauerstoffgruppen durch Bindung an die Ionen die Selektivität des Kanals steuern, sodass es auch hier zu Europium-Carbonyl-Komplexen kommen kann.



Abbildung 4.5.: Schematische Darstellung von möglichen Bindungsplätzen für Eu³⁺ an der Zellmembran. Das Eu³⁺-Ion könnte mit den Phosphat-Gruppen der Phospholipide (rot), mit Carbonyl-Gruppen im Ionenkanal (orange) oder mit Carboxyl- oder Hydroxyl-Gruppen von anderen Proteinen (grün) Komplexe eingehen. Dies führt zu mehreren Europium-Spezies mit unterschiedlichen Lebensdauern.

Des Weiteren befinden sich in der Zellmembran verschiedenste Proteine, die mit ihren funktionellen Gruppen zu einem Einbau des Europiums in die Zellmembran beitragen können (siehe Abbildung 4.5). Wird nun mittels TRLFS die Membran der Oozyten gescannt, fließen die Fluoreszenzeigenschaften aller dieser Spezies in Messungen ein und beeinflussen die Spektren und Lebensdauermessungen. Das Auffinden einzelner Spezies ist damit erheblich beeinträchtigt, sodass nur die möglicherweise dominierenden Spezies bestimmt werden können. Daher ist es möglich, dass für die kürzeren Lebensdauern zwischen 120 μ s und 267 μ s mindestens zwei weitere Europium-Spezies verantwortlich sind, die aufgrund ihrer geringeren Anteile kaum voneinander zu unterscheiden sind.

Weiterhin wird davon ausgegangen, dass es sich bei den ermittelten τ_2 um eine Eu-Spezies mit einer Lebensdauer von etwa 445-455 μ s handelt. Dieser Bereich ergibt sich im Mittel über alle Messungen.

In vorangegangenen TRLFS-Untersuchungen und Sorptionsexperimenten zur Wechselwirkung von Europium und anderen Lanthaniden mit Bakterien wurden vornehmlich Carboxylund Phosphatgruppen als potentielle Bindungspartner identifiziert [57][58]. Texier *et al.* setzten dazu Modellproben aus $Eu(OH)_3$ - und $Eu(PO)_4$ -Ausfällungen für Hydroxyl- und Phosphatgruppen sowie Eu-Oxalat-Ausfällungen und einem Eu-Asparagin-Komplex, die Carboxyl-Gruppen enthalten, an. Die Spektren und Lebensdauern sind in Abbildung 4.6 bzw. Tabelle 4.4 gezeigt.

	0	LJ		
Probe	$\tau_1 [\mu s]$	$n_1(\mathrm{H_2O})$	$ au_2 \left[\mu s \right]$	$n_2(H_2O)$
$Eu(NO_3)_3$	187	5,1		
$Eu(NO_3)_3/P. \ aeruginosa$	254	3,6	677	$0,\!96$
$Eu(OH)_3$	144	6,8		
Eu-Asparagin	239	$_{3,9}$		
Eu-Oxalat	269	3,4		
$Eu(PO_4)$	745	$0,\!8$		

Tabelle 4.4.: TRLFS-Lebensdauern von Eu^{3+} mit *Pseudomonas aeruginosa* und Eu^{3+} -Modellkomponenten (hergestellt aus $Eu(NO_3)_3$ bei pH 5) zu den Spektren aus Abbildung 4.6 [57].

Die Lebensdauern der Eu-Hydroxid-Spezies ($\tau = 144 \,\mu$ s) und der Eu-Asparagin- ($\tau = 239 \,\mu$ s) bzw. Eu-Oxalat-Spezies $\tau = 269 \,\mu$ s weisen starke Ähnlichkeit zu den kurzen Eu-Lebensdauern an den Oozyten auf, sodass sich an der Membran der Eizellen Eu-Hydroxylund Eu-Carboxyl-Spezies gebildet haben könnten. Insbesondere ab einem pH-Wert von 6,82 kommt es zu einem Ausfallen von Eu-Hydroxyl-Spezies [59]. Da nicht auszuschließen ist, dass der pH-Wert der Oozyten höher als der der Eu-Stammlösung ist, könnten auf der Zellmembran Eu-Hydroxyl-Spezies ausgefallen sein. Die Spektren der einzelnen Spezies sind nur bedingt mit denen der Oozyten vergleichbar, was ein Indiz dafür ist, dass Mischformen vorliegen. Die Eu-Phosphat-Spezies mit $\tau = 745 \,\mu$ s kann jedoch nicht mit der längeren Lebensdauer des Eu-Oozyten-Systems mit ca. 450 μ s verglichen werden.

Auch Markai *et al.* identifizierten bei ihren Untersuchungen zur Wechselwirkung von Eu^{3+} mit *Bacillus subtilis* einen 1:1 Eu-Carboxylat- und einen 1:1 Eu-Phosphat-Komplex auf der Oberfläche der Bakterien mit ähnlichen Lebensdauern wie Texier *et al.* [58].

Bei Untersuchungen der Komplexierung von Europium mit Phosphorsäure kam es ab einem pH ≥ 3 zum Quenchen des Signals, was vermutlich durch Kolloidbildung verursacht wurde. Die Lebensdauer dieser Eu-Phosphat-Kolloidspezies beträgt etwa 400 μ s [60]. Möglicherweise handelt es sich bei der längeren Lebensdauer im Eu-Oozyten-System ebenfalls um eine kolloidale Eu-Phosphat-Spezies, welche sich an der Oberfläche gebildet haben könnten.

Aufgrund der Vermutungen über die dominierenden Spezies und anhand des Vergleichs der Lebensdauern mit der Literatur ist anzunehmen, dass sich auf der Zellmembran der Oozyten vornehmlich drei verschiedene Spezies gebildet haben. Mit geringem Anteil und kürzerer Lebensdauern sind dies vermutlich Eu-Hydroxyl- und Eu-Carboxyl-Komplexe.



Die längere Lebensdauer könnte auf das Vorliegen einer kolloidalen Eu-Phosphat-Spezies hindeuten.

Abbildung 4.6.: TRLFS-Spektren von Eu^{3+} mit *Pseudomonas aeruginosa* und Eu^{3+} -Modellkomponenten, hergestellt aus $Eu(NO_3)_3$ bei pH 5. Die Proben waren zum Zeitpunkt der Messung pulverisiert. Entnommen aus [57]

Der Speziation mittels TRLFS bei Raumtemperatur sind hier demnach Grenzen gesetzt. Im Folgenden wurde mittels Direktanregung bei tiefen Temperaturen versucht, die einzelnen Eu-Spezies weiter zu charakterisieren.

4.1.2. Messungen bei Tieftemperatur

Da die *site*-selektiven TRLFS-Messungen durch den Kühlprozess und das Aufnehmen der Exzitationsspektren sehr zeitaufwendig sind, konnten keine Zeitreihenmessungen durchgeführt werden. Dennoch sollten zumindest Messungen zu zwei verschieden Zeiten, nach einer und 24 Stunden in der Eu-Lösung mit c(Eu) = 1 mmol/L, aufgenommen werden. Die weniger effiziente Anregung in diesem Wellenlängenbereich führte allerdings dazu, dass das Exzitationsspektrum nach einer Stunde sehr verrauscht ist (siehe Abbildung 4.7 (a)) und sich die Probe leider nicht für weitere Messungen eignete. Im Exzitationsspektrum nach 24 Stunden (b) ist ein breiter Peak mit einem Maximum bei 579,43 nm zu erkennen. Für die Aufnahme der Emissionsspektren und der Lebensdauern wurden neben diesem Maximum (grün) noch zwei weitere Anregungswellenlängen, links bei 578,85 nm (rot) und rechts bei 579,83 nm (blau), ausgewählt.



(a) 1 h in Eu-Lösung (c(Eu) = 1 mmol/L).

(b) 24 h in Eu-Lösung (c(Eu) = 1 mmol/L).

Abbildung 4.7.: Exzitationsspektren der Oozyten nach 1 h (a) und 24 h (b) in der Eu-Lösung mit c(Eu) = 1 mmol/L. Die in (b) markierten Wellenlängen wurden für die Direktanregung der Probe verwendet.

Aufgrund des starken Rauschens in den Emissionsspektren siehe(Abbildung 4.8), sind jedoch kaum Aussagen über die Struktur der Banden möglich.

Die zu den Spektren gehörigen Lebensdauern wurden über einen monoexponentiellen Fit ermittelt und sind in Tabelle 4.5 dargestellt. Die Lebensdauern der ersten beiden Messungen bei $\lambda_{\text{exc}} = 578,85 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{exc}} = 579,43 \text{ nm}$ sind sich mit 575 µs bzw. 564 µs sehr ähnlich; die dritte bei $\lambda_{\text{exc}} = 579,83 \text{ nm}$ liegt mit 471 µs recht deutlich darunter und ist eher mit den



Abbildung 4.8.: Emissionsspektren der Oozyten nach 24 h in der Eu-Lösung c(Eu) = 1 mmol/L bei Tieftemperatur.

Tabelle4.5.: Lebensdauern zu den Spektren aus Abbildung4.8 bei konstanterEuropium-Konzentration von 1 mmol/L nach Direktanregung.

$\lambda_{ m exc} [m nm]$	$\tau [\mu \mathrm{s}]$	$n(H_2O)$
$578,\!85$	575	1,2
$579,\!43$	564	1,3
$579,\!83$	471	1,7

Lebensdauern der vorangegangenen Messungen bei Raumtemperatur vergleichbar. Ausschlaggebend für die sich deutlich unterscheidenden Lebensdauern könnte der Umstand sein, dass sich die Auswertung der drei Lebensdauermessungen aufgrund des starken Rauschens, bedingt durch die niedrige Fluoreszenzintensität, recht schwierig gestaltete. Die exponentiellen Anpassungen in Abbildung 4.9 unterliegen daher großen Unsicherheiten. Insbesondere aus dem in (a) gezeigten Fit bei $\lambda_{exc} = 578,85$ nm geht hervor, dass die Lebensdauer aufgrund der stark streuenden Datenpunkte kaum belastbar ist.

Die breite Bande im Exzitationsspektrum der 24 Stunden Messung (Abbildung 4.7 (b)) könnte auf zwei Ursachen zurückzuführen sein. Möglich wäre, dass es sich um eine Überlagerung aus mehreren schmaleren Banden handelt, die in einem sehr ähnlichen Wellenlängenbereich liegen. Mit dieser Vermutung könnten die beiden sehr verschiedenen Lebensdauern bei $\lambda_{\text{exc}} = 579,43 \text{ nm}$ ($\tau = 564 \,\mu\text{s}$) und $\lambda_{\text{exc}} = 579,83 \,\text{nm}$ ($\tau = 471 \,\mu\text{s}$) erklärt werden.

Eine weitere Hypothese besteht darin, dass die Oozyten möglicherweise aufgrund zu geringer Wärmeleitfähigkeit nicht ausreichend kalt waren, sodass zum Zeitpunkt der Messung der Probenträger eine Temperatur von < 10 K aufwies, die Probe jedoch noch deutlich wärmer war.



(a) $\lambda_{\text{exc}} = 578,85 \,\text{nm}, \tau = 575 \,\mu\text{s}$ (b) $\lambda_{\text{exc}} = 579,43 \,\text{nm}, \tau = 564 \,\mu\text{s}$ (c) $\lambda_{\text{exc}} = 579,83 \,\text{nm}, \tau = 471 \,\mu\text{s}$

Abbildung 4.9.: Monoexponentielle Fits der Lebensdauermessungen von Oozyten nach 24 h in der Eu-Lösung (c(Eu) = 1 mmol/L) bei Tieftemperatur.

Dadurch lässt sich zwar gegenüber den Messungen bei Raumtemperatur eine deutlich schmalere ${}^{7}F_{0}$ -Bande erkennen, allerdings keine Aufspaltung in separate ${}^{7}F_{0}$ -Banden für die einzelnen Spezies wie in Abbildung 2.13.

Aufgrund dieser Überlegungen ist eine Interpretation der aufgenommenen Spektren und Lebensdauern in Bezug auf die hier vorliegenden Europium-Spezies kaum möglich. Die ermittelten Lebensdauern weisen mit 471-575 μ s auf eine langlebigere Spezies hin. Der exponentielle Fit in Abbildung 4.9 (c) mit einer Lebensdauer von 471 μ s könnte darauf hindeuten, dass es sich um die gleiche langlebige Spezies wie bei den Messungen unter UV-Anregung und Raumtemperatur handelt.

4.2. ICP-MS Messungen

Die Daten der ICP-MS Messungen wurden in Excel ausgewertet. Die Bestimmung der Ionen-Konzentrationen erfolgte nach einer Driftkorrektur über die gemessenen Kalibrationsreihen. Die Unsicherheiten der Messungen wurden gemäß DIN 11929 bestimmt.

4.2.1. Bestimmung der absorbierten und adsorbierten Eu³⁺-Konzentrationen

Die Bestimmung des in die Oozyten aufgenommenen Europiums sollte mittels Heraussaugen des Cytoplasmas erfolgen. Zur Einordnung dieser Werte sollte die Menge des an der Zellmembran sorbierten Eu^{3+} durch Messung von ganzen Oozyten erfolgen. Dazu wurden Eu-Stammlösungen verschiedener Konzentration verwendet und die Messungen nach verschiedenen Inkubationszeiten durchgeführt. Die Daten sind in Tabelle 4.6 gezeigt, wobei jeweils die Messungen der Oozyten eines *Xenopus*-Weibchens gebündelt dargestellt sind.

Die erste Messung (1.1) ergab eine intrazelluläre Eu-Konzentrationen von $3,13 \,\mu$ mol/L in den Oozyten bei einer extrazellulären Konzentration von $2 \,\text{mmol/L}$. Für die nächste Messreihe (2.2-2.3) wurden zwei verschiedene Eu-Lösungen verwendet, um einen Einfluss der extrazellulären Eu-Konzentration auf das Aufnahme- und auch das Sorptionsverhalten von Europium beobachten zu können. Die gemessenen Werte der ganzen Oozyten liegen im mmol/L-Bereich, unabhängig von der extrazellulären Eu-Konzentration. Intrazellulär wurden wieder wenige Mikromol pro Liter gemessen, sodass auch hier die Eu-Konzentration im Medium im Vergleich zu 1.1 keinen Einfluss auszuüben scheint.

Bei den Messungen 3.1-3.3 von ganzen Oozyten mit c(Eu) = 0,1 mmol/L ergaben sich abweichende Werte zwischen 64 und 161 μ mol/L. Die Konzentration der intrazellulären Matrix liegt unterhalb der Bestimmungsgrenze im Nanomolar-Bereich.

Für die nachfolgenden Messungen wurde daher die extrazelluläre Eu^{3+} -Konzentration konstant bei 1 mmol/L gehalten. In den Messungen der intrazellulären Matrix (4.1-4.3, 5.1-5.3 und 6.1-6.5) zeigten sich wieder deutliche Unterschiede in den gemessenen Eu^{3+} -Konzentrationen von bis zu drei Größenordnungen, insbesondere zwischen den Oozyten verschiedener *Xenopus*-Weibchen.

Möglicherweise liegen hier qualitative Unterschiede zwischen den Oozyten verschiedener Weibchen vor, sodass die Vergleichbarkeit der Messungen dadurch beeinträchtigt wird. Da sich in 6.1-6.5 jedoch zeigt, dass auch bei der Verwendung der Oozyten eines einzigen *Xenopus*-Weibchens starke Schwankungen auftreten, kommen weitere Kriterien in Betracht.

Nr.	Eu-Lösung	Zeit	Art der Probe	Eu-Konz. Probe	abs. Unsicherheit
	[mmol/L]	[h]		[mol/L]	[mol/L]
1.1	2	24	intrazellulär	$3,\!64\cdot 10^{-6}$	$7,00 \cdot 10^{-7}$
2.1	2	24	5 Oozyten	$9,35 \cdot 10^{-3}$	$9,13 \cdot 10^{-5}$
2.2	0,1	24	5 Oozyten	$7,05 \cdot 10^{-3}$	$4,65 \cdot 10^{-5}$
2.3	0,1	24	intrazellulär	$5,20 \cdot 10^{-6}$	$7,78 \cdot 10^{-8}$
3.1	0,1	24	5 Oozyten	$7,27 \cdot 10^{-5}$	$3,44 \cdot 10^{-5}$
3.2	0,1	24	5 Oozyten	$1,16 \cdot 10^{-4}$	$3,45 \cdot 10^{-5}$
3.3	0,1	24	5 Oozyten	$6,35 \cdot 10^{-5}$	$3,44 \cdot 10^{-5}$
3.4 - 3.6	0,1	24	intrazellulär	$< 10^{-6}$	_
4.1	1	24	intrazellulär	$1,18 \cdot 10^{-3}$	$1,87 \cdot 10^{-5}$
4.2	1	24	intrazellulär	$1,11 \cdot 10^{-3}$	$2,13 \cdot 10^{-5}$
4.3	1	24	intrazellulär	$1,19 \cdot 10^{-3}$	$1,98 \cdot 10^{-5}$
5.1	1	24	intrazellulär	$5,28 \cdot 10^{-4}$	$2,11 \cdot 10^{-5}$
5.2	1	24	intrazellulär	$5,03 \cdot 10^{-4}$	$2,10 \cdot 10^{-5}$
5.3	1	24	intrazellulär	$5,11 \cdot 10^{-4}$	$2,11 \cdot 10^{-5}$
5.4	1	24	5 Oozyten	$8,00 \cdot 10^{-3}$	$1,32 \cdot 10^{-4}$
5.5	1	24	5 Oozyten	$8,06 \cdot 10^{-3}$	$1,12 \cdot 10^{-4}$
6.1	1	3	intrazellulär	$7,73 \cdot 10^{-6}$	$4,52 \cdot 10^{-7}$
6.2	1	3	intrazellulär	$3,70 \cdot 10^{-6}$	$4,72 \cdot 10^{-7}$
6.3	1	3	intrazellulär	$1,55 \cdot 10^{-5}$	$4,58 \cdot 10^{-7}$
6.4	1	3	intrazellulär	$4,60 \cdot 10^{-5}$	$9,30 \cdot 10^{-7}$
6.5	1	3	intrazellulär	$1,60 \cdot 10^{-4}$	$1,32 \cdot 10^{-6}$
6.6	1	3	5 Oozyten	$3,31 \cdot 10^{-4}$	$1,52 \cdot 10^{-5}$
6.7	1	3	5 Oozyten	$1,44 \cdot 10^{-4}$	$1,09 \cdot 10^{-5}$
6.8	1	3	5 Oozyten	$1,77 \cdot 10^{-4}$	$9,73 \cdot 10^{-6}$
6.9	1	3	5 Oozyten	$9,\!22\cdot10^{-5}$	$9,40 \cdot 10^{-6}$

Tabelle 4.6.: Übersicht über die gemessenen Eu³⁺-Konzentrationen in den Oozyten (intrazellulär) und von ganzen Zellen zu verschiedenen Inkubationszeiten in der Eu-Stammlösung bei verschiedenen Konzentrationen.

Beim Aussaugen der intrazellulären Matrix mit dem Mikroinjektor kann es schnell passieren, dass versehentlich Membranbestandteile aufgenommen werden, die mutmaßlich eine höhere Eu³⁺-Konzentration aufweisen und somit zu einer Erhöhung der Konzentration in der gemessenen Probe beitragen. Umgekehrt kann es auch vorkommen, dass mit der spitzen Kapillare durch die Oozyte hindurch gestochen wird und es zu einer Aufnahme des Barth-Mediums kommt, wodurch die Probe weiter verdünnt wird. Beide Szenarien konnten selbst durch sorgfältigstes Vorgehen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Ersteres wird als wahrscheinlicher betrachtet, sodass die gemessenen intrazellulären Eu-Konzentrationen eher überschätzt werden.

Weiterhin wurde die Qualität der Oozyten zwar optisch überprüft, jedoch lassen die optischen Kriterien nicht zwangsläufig auf die Vitalität der Oozyten schließen. So könnten einige der 60-80 Oozyten, aus denen das intrazelluläre Gesamtvolumen von $10 \,\mu$ L gewonnen wurde, bereits zuvor beschädigt gewesen sein, sodass sie deutlich mehr Europium akkumuliert haben als die vitalen Zellen. Das könnte zudem auch die unterschiedlichen Konzentrationen der ganzen Oozyten aus 5.4, 5.5 und 6.6-6.9 erklären, da auch hier über fünf Zellen gemittelt wird. Beschädigte Zellmembranen einiger Oozyten könnten daher zu einer erhöhten Aufnahme von Europium in die Zelle geführt haben.

Aufgrund der zahlreichen Unsicherheitsfaktoren beim Aussaugen der Oozyten, wurde diese Methode nicht weiter verwendet. Um möglicherweise fehlerhafte Zellen identifizieren zu können, wurde im Folgenden dazu übergegangen, die Oozyten einzeln zu messen.

4.2.2. Aufnahme von Zeitreihen

Ein weiterer Ansatz, die Sorption des Europiums an den Oozyten zu bestimmen und weitere Informationen über die Aufnahme in die Zellen gewinnen zu können, bestand darin, einzelne Zellen im Ganzen zu messen. Dazu wurden diese in die Eu-Stammlösung (c(Eu) = 1 mmol/L) gegeben und nach bestimmten Zeitintervallen einzeln entnommen und gewaschen. Dieses Experiment wurde insgesamt drei Mal durchgeführt, beim dritten Mal wurde zusätzlich Barium in das Medium gegeben (c(Ba) = 0,1 mmol/L). In Abbildung 4.10 sind zunächst die Eu-Konzentrationen gegen die Zeit aufgetragen. Die Unsicherheiten der Messreihen sind kleiner als die Datenpunkte und daher nicht eingezeichnet.



Abbildung 4.10.: Vergleich der drei gemessenen Zeitreihen von einzelnen Oozyten ohne (rot und grün) und mit Barium (blau) über verschiedene Inkubationszeiten in der Eu-Lösung (c(Eu) = 1 mmol/L) bis zu 24 h.

Im zeitlichen Verlauf ist ein deutlicher Anstieg der Eu-Konzentration auf bis zu 4 mmol/L in den Oozyten zu erkennen. Des Weiteren streuen die Werte der einzelnen Oozyten mit zunehmender Inkubationszeit in der Eu-Lösung erheblich, sodass darin die in Tabelle 4.6 gezeigten schwankenden Mittelwerte über fünf ganze Oozyten begründet sein könnten.

Um die Kinetik des Systems weiter aufschlüsseln zu können sind in Abbildung 4.11 die Werte noch einmal bis fünf (a) und einer Stunde (b) Inkubationszeit dargestellt. In (a) zeigt sich deutlich ein Anstieg der Eu-Konzentration im zeitlichen Verlauf von wenigen Mikromol pro Liter nach fünf Minuten auf bis zu ein Millimol pro Liter nach fünf Stunden. Zudem ist auch hier wieder eine stärkere Streuung der Werte mit zunehmender Inkubationszeit zu beobachten. Besonders innerhalb der ersten Stunde scheinen die Werte sehr dicht beieinander zu liegen, bis auf einzelne Ausreißer, die sich darüber befinden. Diese könnten auf bereits defekte Oozyten hindeuten, die neben der Sorption an der Membran auch sehr schnell erhebliche Mengen Eu^{3+} intrazellulär anreichern.

Diese Ausreißer sind in (b) der Übersichtlichkeit halber entfernt worden. Auch innerhalb dieser ersten Stunde setzt sich der Trend stärkerer Streuung bei längerer Inkubationszeit fort. Die Eu-Konzentration steigt innerhalb dieser Zeitspanne nur wenig von minimal vier auf maximal 50 Mikromol pro Liter.



Abbildung 4.11.: Vergleich der drei gemessenen Zeitreihen von einzelnen Oozyten ohne (rot und grün) und mit Barium (blau) über 5 h (a) und 1 h (b) Inkubationszeit in der Eu-Lösung (c(Eu) = 1 mmol/L). In (b) wurden die Ausreißer mit höherer Eu-Konzentration aus Gründen der Übersichtlichkeit entfernt.

Die Zugabe von Barium in Zeitreihe 3 (blau) scheint, wie bereits in den TRLFS-Messungen beobachtet, keinen Einfluss auf die Eu-Konzentration zu haben.

Die Frage, ob sich in dieser Kinetik nur die Sorption an der Membran oder auch die Aufnahme von Eu^{3+} in die Zellen erkennen lässt, ist insbesondere aufgrund der starken Schwankungen zwischen den einzelnen Oozyten nicht eindeutig zu beantworten.

Die stark streuenden Eu-Konzentrationen im Zeitverlauf könnten darauf hindeuten, dass die Oozyten, möglicherweise bedingt durch die Toxizität des Europiums, absterben. Die Membran könnte somit für die Ionen durchlässig werden, sodass sich große Mengen des Europiums im Inneren der Zellen anreichern könnten. Dieser Effekt könnte insbesondere bei den Messungen nach 16 bzw. 24 Stunden zu den teilweise sehr hohen Eu-Konzentrationen von bis zu 4 mmol/L beigetragen haben. Bei den vermessenen Oozyten waren jedoch keine optischen Auffälligkeiten erkennbar, sodass diese These nicht bestätigt werden kann.

Aufgrund vorangegangener Untersuchungen zur Aufnahme von Eu^{3+} in den Wurzeln von Avena sativa [3] und anhand der gemessenen Daten ist es jedoch wahrscheinlich, dass Europium in die Oozyten aufgenommen wurde. Der Sorptionsprozess an der Oberfläche der Membran ist mutmaßlich nach wenigen Minuten abgeschlossen. Ein Indiz dafür könnten die sehr ähnlichen gemessenen Eu-Konzentrationen der Zeitreihen (Abbildung 4.11) in den ersten 20 Minuten sein. Erst danach steigt die gemessene Eu-Konzentration und auch die Streuung der Daten an. Hier könnte tatsächlich eine Aufnahme des Europiums in die Zellen stattgefunden haben. Diese Absorption könnte, wie bereits oben geschlussfolgert, zum Tod der Zellen und damit zu der ansteigenden Streuung der Daten geführt haben.

Abschätzungen über die Größenordnung der intrazellulären Eu-Konzentration können anhand der vorliegenden Daten nur schwer getroffen werden. Die Konzentrationsbestimmungen der intrazellären Matrix (Tabelle 4.6) deuten darauf hin, dass diese etwa im Bereich von wenigen Mikromol pro Liter liegen könnte.

Um auszuschließen, dass die Oozyten bereits vor der Messung beschädigt waren, könnte in zukünftigen Messungen eine Art Qualitätskontrolle durchgeführt werden, die die optischen Kriterien ergänzt. Hier wäre denkbar, die Osmolarität des Mediums so zu verändern, dass mangelhafte Oozyten in hypertonem Milieu zum Platzen gebracht werden, die vitalen jedoch dieser Veränderung standhalten und für weitere Messungen verwendet werden können.

Anhand der in Unterabschnitt 2.1.1 vorgestellten Mechanismen der Ionenkanäle können weitere Hypothesen zu der Aufnahme von Eu^{3+} in die Zellen aufgestellt werden.

Das Passieren des Selektivitätsfilters im Ionenkanal hängt neben dem Ionenradius maß-

geblich von der Hydratationsenthalpie der Ionen ab. Die bereits vorgestellten Leitfähigkeitsmessungen ergaben, dass Ionen mit hoher Hydratationsenthalpie, wie beispielsweise Lanthan ($\Delta H_{\rm hydr}^0 = -3238 \, {\rm kJ/mol}$), stark im Selektivitätsfilter gebunden werden und den Ca²⁺-Ionenkanal langsamer passieren als die Ca²⁺-Ionen selbst. Aufgrund dieser starken Bindung wäre demnach Lanthan in der Lage, den Ca²⁺-Ionenfluss im Ca²⁺-Kanal zu blockieren. Das dreiwertige Eu-Kation weist ebenfalls eine hohe Hydratationsenthalpie von $\Delta H_{\rm hydr}^0 = -3547 \, {\rm kJ/mol}$ (siehe Tabelle 2.2) auf, sodass es, ähnlich wie Lanthan, stark im Selektivitätsfilter gebunden würde. Es könnte dadurch den Ca²⁺-Kanal nur langsam passieren und auch den Ca²⁺-Ionenfluss blockieren.

Diese Vermutung sollte mit der Zugabe von Barium als Calcium-Ersatz (c(Ba) = 0,1 mmol/L) in das Barth Medium überprüft werden. Um gewährleisten zu können, dass das die Ba²⁺-Ionen den Ca²⁺-Kanal passieren können, wurden die Oozyten 30 Minuten vor dem Erstkontakt mit der Eu-Ba-Lösung in eine Ba-Lösung gegeben. Mittels ICP-MS wurden die Eu- und die Ba-Konzentration in den einzelnen Oozyten ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.12 dargestellt. Einzelne Messwerte der Barium-Reihe konnten nicht quantifiziert werden und sind deshalb nicht aufgeführt. Die Unsicherheiten der beiden Messungen sind kleiner als die Datenpunkte und daher nicht eingezeichnet. Im zeitlichen Verlauf bis 24 Stunden (a) ist erkennbar, dass die Ba-Konzentration (orange) eine sinkende und die Eu-Konzentration (blau) eine steigende Tendenz aufweist.



Abbildung 4.12.: Zeitreihe 3 von einzelnen Oozyten mit Europium (blau, c(Eu) = 1 mmol/L) und Barium (orange, c(Ba) = 0.1 mmol/L) über verschiedene Inkubationszeiträume.

Besonders deutlich wird dies in (b) bei der Betrachtung der ersten fünf Stunden in der Eu-Lösung. In der ersten Stunde dominiert Barium das System mit bis zu 0,56 mmol/L, die Eu-Konzentration liegt hier nur bei wenigen Mikromol pro Liter. Nach fünf Stunden hat sich dieses Verhältnis umgekehrt, sodass die Eu-Konzentration bei bis zu 0,7 mmol/L und die Ba-Konzentration bei maximal 0,35 mmol/L liegt.

Die im Mittel sinkende Ba-Konzentration könnte darauf hindeuten, dass die Oozyten Ba²⁺-Ionen aufgenommen haben und zusätzlich Sorption von Ba²⁺ an der Zellmembran stattfand. Das später hinzugegebene Europium könnte das Barium von den Bindungsplätzen an der Zellmembran verdrängt haben, sodass die gemessene Ba²⁺-Konzentration im zeitlichen Verlauf abnahm und möglicherweise nur noch intrazellulär vorhanden war. Ob das Eu³⁺ die Ca²⁺-Kanäle für die Ba²⁺-Ionen blockiert hat, kann anhand dieser Messreihe nur vermutet werden.

In weiteren Untersuchungen könnte die Ba^{2+} -Konzentration in direkter Konkurrenz zu Eu^{3+} auf ebenfalls 1 mmol/L angehoben werden. Außerdem könnten weitere Zeitreihen nur mit Barium durchgeführt werden, um die Sorptionskinetik weiter aufschlüsseln und gegebenenfalls Aussagen über die Aufnahme in die Zellen treffen zu können. Eine solche Versuchsreihe könnten mit den bereits durchgeführten Eu-Zeitreihen-Messungen verglichen werden, um die angestellten Vermutungen über das Adsorptions- und Absorptionsverhalten von Eu^{3+} überprüfen zu können.

Zudem ist es bei der Untersuchung von biologischen Systemen sinnvoll, die Anzahl der Proben zu erhöhen, um die Statistik zu verbessern. Bei der hier vorgestellten Methode der Zeitreihenmessungen ist der Prozess des Waschens der Oozyten ein limitierender Faktor in Bezug auf die Anzahl der Proben pro Zeitintervall, sodass hier ein Kompromiss zwischen den zeitlichen Abständen und Anzahl der Proben gefunden werden müsste.

Ein direkter Nachweis der Aufnahme von Eu³⁺ über die Ca²⁺-Kanäle konnte mit den verwendeten Methoden nicht erbracht werden. Aufgrund dessen wurde auch auf eine Durchführung dieser Versuchsreihen mit ²⁴¹Am verzichtet. Zudem wären sowohl ²⁴¹Am- als auch ²⁴³Am-Lösungen nur in deutlich niedrigerer Konzentration vorhanden, sodass die Sorptionsexperiemente zunächst mit daran angepassten Eu³⁺-Konzentrationen durchgeführt werden sollten.

Für weiterführende Untersuchungen zu der Fragestellung dieser Arbeit könnte auch der Einsatz von elektrophysiologischen Messmethoden, wie dem *Patch-Clamp*-Verfahren, sinnvoll sein. Mit dieser Methode können mittels kleiner Elektroden die Ströme der Ionen durch

die Kanäle in der Membran der Oozyten gemessen werden [61]. Da hier die Oozyte selbst als interne Kontrolle verwendet werden kann, könnte auf die Qualitätskontrolle über die Veränderung der Osmolarität verzichtet werden.

KAPITEL 5

Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit sollte die Aufnahme von ²⁴¹Am in (Pflanzen-)Zellen untersucht werden. Die Grundlage dafür stellte die Vermutung, dass aufgrund ähnlicher Ionenradien und vorangegangener Studien ²⁴¹Am dem Ca²⁺-Pfad folgen würde [3]. Aus Gründen der einfachen Handhabung und in Hinblick auf weiterführende, eventuell elektrophysiologische, Untersuchungen wurden dafür die Oozyten des *Xenopus laevis* als Analogon zur Pflanzenzelle verwendet [62].

In Vorversuchen mittels zeitaufgelöster Laser-Fluoreszenzspektroskopie (TRLFS) sollte das Adsorptionsverhalten von Eu³⁺ als inaktives chemisches Homolog zu Am³⁺ an der Zellmembran der Oozyten untersucht werden. Die aufgenommenen Spektren von Zeitreihen bei Raumtemperatur ergaben, dass die Komplexierung des Europiums im Zeitverlauf zunimmt. In den Lebensdauermessungen zeigte sich, dass mindestens drei verschiedene Eu-Spezies auf der Zellmembran vorhanden sind, von denen die mit längerer Lebensdauer von etwa $\tau = 450 \,\mu$ s mit bis zu 80 % das System dominiert. Im Vergleich mit anderen Arbeiten konnte diese Lebensdauer nicht eindeutig einer Spezies zugeordnet werden. Vermutet wird, dass es sich hierbei um einen Eu-Phosphat-Komplex handelt [60]. Die kurzen Lebensdauern von $\tau = 144 \,\mu$ s weisen auf einen Eu-Hydroxyl-Komplex hin, der auf der Zellmembran ausgefallen ist und bei den Lebensdauern zwischen $\tau = 239 \,\mu$ s und $\tau = 269 \,\mu$ s könnte es sich um Eu-Carboxyl-Komplexe handeln [57][58].

Die TRLFS-Messungen bei Direktanregung und Tieftemperatur lieferten keine weiteren Erkenntnisse zur Charakterisierung der Sorptionsspezies.

Zur Bestimmung der Absorption des Eu^{3+} in die Oozyten wurde nach verschiedenen Inkubationszeiten das Cytoplasma herausgesogen. Die so gewonnenen Proben wurden verdünnt und mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) die intrazelluläre Eu^{3+} -Konzentration bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen unterlagen aufgrund mehrerer möglicher Fehlerquellen starken Schwankungen, sodass nur vermutet werden kann, dass Eu^{3+} im Mikromolar-Bereich von den Zellen absorbiert wurde.

Die Sorptionskinetik sollte anhand von ICP-MS-Messungen mit ganzen Oozyten näher bestimmt werden. Dabei zeigte sich im Zeitverlauf eine stärkere Streuung der gemessenen Konzentrationen, die auf ein vermehrtes Absterben der Oozyten hindeuten könnte. Das Adsorptions- und Absorptionsverhalten konnten in diesen Messreihen nicht eindeutig aufgeschlüsselt werden. Es wird jedoch vermutet, dass die Adsorption bereits nach wenigen Minuten abgeschlossen ist und es, bedingt durch die Absorption des toxischen Eu³⁺, zum Absterben der Zellen kommt. Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass einzelne Zellen von Beginn an beschädigt waren und es deshalb zu einer Aufnahme von Eu³⁺ kam. In zukünftigen Messungen sollte daher die Vitalität der Oozyten über die optischen Kriterien hinaus mittels Veränderungen des osmotischen Drucks überprüft werden.

Ob der Ca²⁺-Ionenkanal einen möglichen Pfad für die Absorption von Eu³⁺ darstellt, sollte mit der Zugabe von Ba²⁺ überprüft werden, da Ba²⁺ bereits zur Untersuchung der Ca²⁺-Kanäle verwendet wurde [21]. In den Sorptionsexperimenten zeigte sich, dass nach der Inkubation in der Eu-Lösung, die gemessene Ba²⁺-Konzentration sank. Dies spricht für eine Desorption des Bariums von der Zellmembran und auch dafür, dass Eu³⁺ den Ca²⁺-Ionenkanal für die Ba²⁺-Ionen blockiert haben könnte. An dieser Stelle könnte das Durchführen weiterer Sorptionsreihen mit Ba²⁺ verschiedener Konzentrationen als Konkurrenz zu Eu³⁺ sinnvoll sein.

Da zu diesem Zeitpunkt nicht vollständig geklärt ist, ob Eu^{3+} in die Oozyten aufgenommen wurde und dabei dem Ca²⁺-Pfad gefolgt ist, wurde auf eine Durchführung dieser Experimente mit ²⁴¹Am verzichtet.

Als Ergänzung zu den Sorptionsexperimenten könnten zudem elektrophysiologische Untersuchungen der Ionenkanäle Aufschluss über die Absorptionsmechanismen von Eu^{3+} und weiterführend von Am^{3+} in die Zelle geben.

ANHANG A

Liste der verwendeten Chemikalien

- $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ (p.a., 99%, Merck)
- Ba(NO₃)₂ ICP Standard (1000 ppm, in 2-3 % HNO₃, Certipur, Merck)
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (99%, Sigma)
- Collagenase Type 2 (360 u/mg, Worthington)
- $EuCl_3 \cdot 6H_2O$ (99,9%, Sigma)
- Eu₂O₃ Plasma Standard (1000 ppm, in 5 % HNO₃, Specpure, Alfa Aesar)
- HEPES Pufferan ($C_8H_{18}N_2O_4S M$, cellpure, $\geq 99,5\%$, ROTH)
- HNO₃ 2% (aus 69% HNO3, p.a., EMSURE ISO)
- KCl (p.a., Merck)
- MES Pufferan (C₆H₁₃NO₄S M, \geq 99%, ROTH)
- $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (p.a., $\geq 99\%$, ROTH)
- Mineralöl (weiß, zähflüssig, Sigma)
- NaCl (cellpure, $\geq 99.8\%$, ROTH)
- NaHCO₃ (cellpure, $\geq 99.8 \%$, ROTH)
- Tricaine (Ethyl-3-aminobenzoate methasulfonate salt, Sigma)

Literatur

- United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. "UNSCEAR 2008 Report Vol. II, Sources and effects of ionizing radiation: Annex D Health effects due to radiation from the Chernobyl accident." In: United Nations (2008).
- S. Hippler. "Strahlenexposition durch antropogene Actinoide in der nördlichen Ukraine".
 Dissertation. Hannover: Gottfried Wilhelm Leibniz Universität, 2006.
- R. J. Fellows, Z. Wang und C. C. Ainsworth. "Europium uptake and partitioning in oat (avena sativa) roots as studied by laser-induced fluorescence spectroscopy and confocal microscopy profiling technique". In: *Environmental Science & Technology* 37.22 (2003), S. 5247–5253.
- [4] Dunden online. Stichwort: Zelle, http://www.duden.de/rechtschreibung/Zelle. 2017.
- [5] B. Alberts, U. Schäfer und B. Häcker. *Molekularbiologie der Zelle*. 5. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH, 2011.
- [6] Planet Wissen. Die verschiedenen Zelltypen, http://www.planet-wissen.de/natur/mikroorganismen/bakterien_urkeime_helfer_erreger/pwiedieverschiedenenzelltypen100.html. 2017.
- [7] G. Karp und K. Beginnen. *Molekulare Zellbiologie*. 1., dt. Auflage. Springer-Lehrbuch. Berlin: Springer, 2005.
- [8] J. M. Berg u. a. *Biochemie*. 7. Auflage. Berlin: Springer Spektrum, 2013.
- [9] A. F. Holleman, E. Wiberg und N. Wiberg. Lehrbuch der anorganischen Chemie. 101., verb. und stark erw. Aufl. Berlin: de Gruyter, 1995.
- [10] R. D. Shannon und C. T. Prewitt. "Effective ionic radii in oxides and fluorides". In: Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry 25.5 (1969), S. 925–946.

- [11] R. D. Shannon. "Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides". In: Acta Crystallographica Section A 32.5 (1976), S. 751–767.
- [12] S. H. Heinemann u. a. "Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations". In: *Nature* 356.6368 (1992), S. 441–443.
- [13] E. M. Fenwick, A. Marty und E. Neher. "Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells". In: *The Journal of Physiology* 331 (1982), S. 599–635.
- [14] P. Hess. "Calcium channel selectivity for divalent and monovalent cations. Voltage and concentration dependence of single channel current in ventricular heart cells". In: *The Journal of General Physiology* 88.3 (1986), S. 293–319.
- [15] K. S. Lee und R. W. Tsien. "High selectivity of calcium channels in single dialysed heart cells of the guinea-pig". In: *The Journal of Physiology* 354.1 (1984), S. 253–272.
- [16] H. Reuter und H. Scholz. "A study of the ion selectivity and the kinetic properties of the calcium dependent slow inward current in mammalian cardiac muscle". In: *The Journal of Physiology* 264.1 (1977), S. 17–47.
- [17] W. R. Taylor. "Permeation of barium and cadmium through slowly inactivating calcium channels in cat sensory neurones". In: *The Journal of Physiology* 407.1 (1988), S. 433– 452.
- [18] C. C. Kuo und P. Hess. "Ion permeation through the Ltype Ca2+ channel in rat phaeochromocytoma cells: two sets of ion binding sites in the pore." In: *The Journal of Physiology* 466 (1993), S. 629–655.
- [19] C. C. Kuo und P. Hess. "Characterization of the high-affinity Ca2+ binding sites in the L-type Ca2+ channel pore in rat phaeochromocytoma cells". In: *The Journal of Physiology* 466.2 (1993), S. 657–682.
- [20] F. Bezanilla und C. M. Armstrong. "Negative conductance caused by entry of sodium and caesium ions into the potassium channels of squid axons". In: *The Journal of General Physiology* 60.5 (1972), S. 588–608.
- [21] W.-M. Weber. "Ion currents of Xenopus laevis oocytes: State of the art". In: Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1421.2 (1999), S. 213–233.
- [22] M. S. Fabbrini u. a. "Cytosolic immunization allows the expression of preATF-saporin chimeric toxin in eukaryotic cells". In: FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 14.2 (2000), S. 391–398.

- [23] N. Dascal u. a. "Expression and modulation of voltage-gated calcium channels after RNA injection in Xenopus oocytes". In: *Science* 231.4742 (1986), S. 1147–1150.
- [24] J. P. Leonard u. a. "Ca channels induced in Xenopus oocytes by rat brain mRNA". In: The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 7.3 (1987), S. 875–881.
- [25] J. R. Moorman u. a. "Expression of single calcium channels in Xenopus oocytes after injection of mRNA from rat heart". In: American Journal of Physiology 253.4 Pt 2 (1987), H985–91.
- [26] L. D. Smith, W. Xu und R. L. Varnold. "Chapter 4 Oogenesis and Oocyte Isolation". In: *Methods in cell biology*. Bd. 36, S. 45–60.
- [27] G. Grandi. "In vitro transcription and translation protocols: Chapter 6 Exogenous Protein Expression in Xenopus Oocytes". In: *Methods in molecular biology*. Bd. 375, S. 107–131.
- [28] J. N. Dumont. "Oogenesis in Xenopus laevis (Daudin): I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals". In: J. Morphol. 136 (1972), S. 153–180.
- [29] L. G. Barth und L. J. Barth. "Differentiation of cells of the Rana pipiens gastrula in unconditioned medium". In: *Journal of embryology and experimental morphology* 7 (1959), S. 210–222.
- [30] K. Sobczak u. a. "Endogenous transport systems in the Xenopus laevis oocyte plasma membrane". In: *Methods (San Diego, Calif.)* 51.1 (2010), S. 183–189.
- [31] P. W. Durbin. "Metabolism and Biological Effects of the Transplutonium Elements".
 In: Uranium · Plutonium Transplutonic Elements. Hrsg. von Harold C. Hodge, J. N. Stannard und J. B. Hursh. Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin: Springer Berlin, 2013, S. 739–896.
- [32] C. Kelley u. a. "Adsorption of Eu(III) onto Roots of Water Hyacinth". In: Environmental Science & Technology 33.9 (1999), S. 1439–1443.
- [33] C. Kelley u. a. "Spectroscopic Studies of the Interaction of Eu(III) with the Roots of Water Hyacinth". In: Water, Air, and Soil Pollution 119.1 (2000), S. 171–176.
- [34] J. Liao u. a. "Preliminary investigation on biosorption mechanism of 241Am by Rhizopus arrhizus". In: Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 277.2 (2008), S. 329– 336.

- [35] N. Liu u. a. "Biosorption of 241Am by Saccharomyces cerevisiae: Preliminary investigation on mechanism". In: Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 275.1 (2007), S. 173–180.
- [36] B. T. Ngwenya u. a. "Macroscopic and spectroscopic analysis of lanthanide adsorption to bacterial cells". In: *Geochimica et Cosmochimica Acta* 73.11 (2009), S. 3134–3147.
- [37] T. Ozaki u. a. "Association mechanisms of Europium(III) and Curium(III) with Chlorella vulgaris". In: *Environmental Toxicology and Chemistry* 22.11 (2003), S. 2800–2805.
- [38] T. Ozaki u. a. "Associations of Eu(III) with Gram-Negative Bacteria, Alcaligenes faecalis, Shewanella putrefaciens, and Paracoccus denitrificans". In: J. Nucl. Radiochem. Sci. 6.1 (2005), S. 73–76.
- [39] T. Ozaki u. a. "Interactions of rare earth elements with bacteria and organic ligands". In: Journal of Alloys and Compounds 408 (2006), S. 1334–1338.
- [40] I. Shtangeeva und S. Ayrault. "Effects of Eu and Ca on yield and mineral nutrition of wheat (Triticum aestivum) seedlings". In: *Environmental and Experimental Botany* 59.1 (2007), S. 49–58.
- [41] I. Shtangeeva. "Europium and Cerium Accumulation in Wheat and Rye Seedlings". In: Water, Air, & Soil Pollution 225.6 (2014), S. 1–13.
- [42] M. Marques Fernandes u. a. "Site-selective time-resolved laser fluorescence spectroscopy of Eu3+ in calcite". In: Journal of Colloid and Interface Science 321.2 (2008), S. 323– 331.
- [43] M. Schmidt u. a. "Incorporation versus adsorption: Substitution of Ca2+ by Eu3+ and Cm3+ in aragonite and gypsum". In: *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)* 33 (2009), S. 6645–6650.
- [44] F. L. Zeng u.a. "Effect of rare earth element europium on amaranthin synthesis in Amarathus caudatus seedlings". In: *Biological Trace Element Research* 93.1-3 (2003), S. 271–282.
- [45] W. Demtröder. Experimentalphysik 3: Atome, Moleküle und Festkörper. 5., überarb. u. akt. Aufl. 2013. Springer-Lehrbuch. Springer, 2016.
- [46] P. W. Atkins, J. de Paula und M. Bär. *Physikalische Chemie*. 5. Aufl. Wiley VCH Lehrbuchkollektion 1. Weinheim: Wiley-VCH Verl., 2013.

- [47] W. T. Carnall. "Chapter 24 The absorption and fluorescence spectra of rare earth ions in solution". In: *Handbook on the physics and chemistry of rare earths*. Hrsg. von K. A. Gschneidner, L. Eyring und M. B. Maple. Bd. 3. Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths. Amsterdam: North-Holland Publ, 1979, S. 171–208.
- [48] W. T. Carnall u. a. "A systematic analysis of the spectra of the lanthanides doped into single crystal LaF 3". In: *The Journal of Chemical Physics* 90.7 (1989), S. 3443–3457.
- [49] C. Görller-Walrand und K. Binnemans. "Chapter 155 Rationalization of crystal-field parametrization". In: *Handbook on the physics and chemistry of rare earths*. Hrsg. von K. A. Gschneidner, L. Eyring und M. B. Maple. Bd. 23. Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths. Amsterdam: North-Holland Publ, 1996, S. 121–283.
- [50] J.-C. G. Bünzli und Gregory R. Choppin. Lanthanide probes in life, chemical and earth sciences. Elsevier, 1989.
- [51] W. DeW. Horrocks und D. R. Sudnick. "Lanthanide ion probes of structure in biology. Laser-induced luminescence decay constants provide a direct measure of the number of metal-coordinated water molecules". In: *Journal of the American Chemical Society* 101.2 (1979), S. 334–340.
- [52] M. Marques Fernandes. "Spektroskopische Untersuchungen (TRLFS und XAFS) zur Wechselwirkung von dreiwertigen Lanthaniden und Actiniden mit der Mineralphase Calcit". Dissertation. 2006.
- [53] M. Schmidt. "Untersuchungen zum Einbaumechanismus von Actiniden und Lanthaniden in Calcium-haltige Sekundärphasen". Dissertation. Heidelberg: Ruprecht-Karls-Universität, 2009.
- [54] K. Cammann. Instrumentelle analytische Chemie: Verfahren, Anwendungen und Qualitätssicherung. Nachdruck der 1. Aufl. 2001. Spektrum Lehrbuch. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2011.
- [55] D. C. Harris, G. Werner und T. Werner, Hrsg. Lehrbuch der Quantitativen Analyse. 8., vollst. überarb. erw. Aufl. 2014. Berlin: Springer Spektrum, 2014.
- [56] A.-C. Texier, Y. Andrès und P. Le Cloirec. "Selective Biosorption of Lanthanide (La, Eu, Yb) Ions by Pseudomonas aeruginosa". In: *Environmental Science & Technology* 33.3 (1999), S. 489–495.

- [57] A.-C. Texier u. a. "Characterization of lanthanide ions binding sites in the cell wall of Pseudomonas aeruginosa". In: *Environmental Science & Technology* 34.4 (2000), S. 610–615.
- [58] S. Markai u. a. "Study of the interaction between europium (III) and Bacillus subtilis: fixation sites, biosorption modeling and reversibility". In: J. Colloid. Interf. Sci. 262.2 (2003), S. 351–361.
- [59] R. C. Vickery. *Chemistry of the lanthanons*. London: Butterworth, 1953.
- [60] H. Lösch. Komplexierung von Europium mit Phosphorsäure. Private Kommunikation, 2016.
- [61] B. Sakmann. "Patch Clamp Techniques for Studying Ionic Channels in Excitable Membranes". In: Annual Review of Physiology 46.1 (1984), S. 455–472.
- [62] A.J Miller und J.J Zhou. "Xenopus oocytes as an expression system for plant transporters". In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes* 1465.1-2 (2000), S. 343–358.

Abbildungsverzeichnis

2.1.	Schematische Darstellung einer Zellmembran.	4
2.2.	Unterschied zwischen Pflanzenzellen und Tierzellen	4
2.3.	Häufige funktionelle Gruppen in Zellen	5
2.4.	Weg durch einen Ionenkanal	5
2.5.	Ionentransport durch den Kanal	7
2.6.	Xenopus-Weibchen.	8
2.7.	Entwicklungsstadien und Schema einer Oozyte.	9
2.8.	Stabile Oxidationsstufen der Lanthanide	0
2.9.	Stabile Oxidationsstufen der Actinide	0
2.10.	JABLONSKI-Diagramm	3
2.11.	Fluoreszenzschema des Eu $^{3+}$ und TRLFS-Emissionsspektrum 1	15
2.12.	Quenching. $\ldots \ldots \ldots$	6
2.13.	TRLFS Exzitationsspektren bei Tief- und Raumtemperatur	.8
3.1.	Aufbereitung der Oozyten	21
3.2.	Qualitätive Unterschiede der Oozyten	22
3.3.	TRLFS Spektrum der Eu-Stammlösung	24
3.4.	TRLFS Versuchsaufbau und Probenträger	26
3.5.	Aussaugen der Oozyten mittels des Injektors	28
4.1.	Eu-Emissionsspektren von Oozyten nach verschiedenen Inkubationszeiten und	
	verschiedenen Eu-Konzentrationen	32
4.2.	Schematische Darstellung des Sichtfensters in der Küvette	35
4.3.	Eu-Emissionsspektren nach verschiedenen Inkubationszeiten und konstanter	
	Eu-Konzentration	36
4.4.	Änderung des Intensitätsverhältnisses der 7F_1 - und 7F_2 -Banden als Funktion	
	des Delays	37

4.3.	Schematische Darstenung von möglichen Dindungsplatzen für Euter an der	
	Zellmembran.	40
4.6.	TRLFS-Spektren von Eu^{3+} mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i> und Eu^{3+} -Modell-	
	komponenten	42
4.7.	Exzitationsspektren der Oozyten nach 1h und 24h in der Eu-Lösung mit	
	$c(\mathrm{Eu}) = 1 \mathrm{mmol/L.} \ldots \ldots$	43
4.8.	Emissionsspektren der Oozyten nach 24 h in der Eu-Lösung $c(Eu) = 1 \text{ mmol/L}$	
	bei Tieftemperatur.	44
4.9.	Monoexponentielle Fits der Lebensdauermessungen von Oozyten nach 24 h in	
	der Eu-Lösung ($c(Eu) = 1 \text{ mmol/L}$) bei Tieftemperatur.	45
4.10.	Vergleich der drei gemessenen Zeitreihen von einzelnen Oozyten ohne und mit	
	Barium über verschiedene Inkubationszeiten in der Eu-Lösung	49
4.11.	Vergleich der drei gemessenen Zeitreihen von einzelnen Oozyten ohne und mit	
	Barium über 5 h und 1 h Inkubationszeit in der Eu-Lösung	50
4.12.	Zeitreihe 3 von einzelnen Oozyten mit Europium und Barium über verschiedene	
	Inkubationszeiträume.	52
Tabellenverzeichnis

2.1.	Ionenradien bei verschiedenen Koordinationszahlen (KZ) und Hydratations-	
	enthalpien	7
2.2.	Ionenradien bei Koordinationszahl sechs und acht und Hydratationsenthalpien	
	von Ca^{2+} , Am^{3+} und Eu^{3+} .	11
2.3.	Auswahlregeln für elektrische und magnetische Dipolübergänge	12
2.4.	Auswahlregeln für erzwungene elektrische Dipolübergänge	14
3.1.	Modifiziertes BARTH Medium für die Oozytenbehandlung.	20
3.2.	Modifiziertes BARTH Medium für die Oozytenbehandlung mit Eu $^{3+}$	23
4.1.	Lebensdauern zu Eu-Emissionsspektren nach verschiedenen Inkubationszeiten	
	und verschiedenen Eu-Konzentrationen.	34
4.2.	Lebensdauern zu den Eu-Spektren nach verschiedener Inkubationszeit und	
	konstanter Eu-Konzentration.	38
4.3.	Lebensdauern zu den Eu-Spektren nach verschiedener Inkubationszeit und	
	konstanter Eu-Konzentration mit Zusatz von Barium.	39
4.4.	TRLFS-Lebensdauern von Eu^{3+} mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i> und Eu^{3+} -	
	Modellkomponenten.	41
4.5.	Lebensdauern zu den Spektren aus Abbildung 4.8 bei konstanter Europium-	
	Konzentration von 1 mmol/L nach Direktanregung	44
4.6.	Übersicht über die gemessenen Eu ³⁺ -Konzentrationen in den Oozyten (intra-	
	zellulär) und von ganzen Zellen zu verschiedenen Inkubationszeiten in der	
	Eu-Stammlösung bei verschiedenen Konzentrationen.	47

Danksagung

Großer Dank gilt Prof. Dr. Clemens Walther für die Möglichkeit, meine Arbeit am IRS zu diesem spannenden Forschungsgebiet anfertigen zu können und auch Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo für die freundliche Zusammenarbeit mit der Biophysik.

Usche, dir danke ich für die prima Betreuung, dein Verständnis sowie dein offenes Ohr für jede Art von Problemen.

Vielen Dank auch an Patrik für die Hilfe mit den Oozyten, die vielen guten Ratschläge und das Korrekturlesen.

Alex danke ich für die Unterstützung bei den vielzähligen ICP-MS-Messungen. Vielen Dank auch an Astrid, Moritz und Nina für die Unterstützung bei den Messungen in Dresden.

Rebecca, vielen Dank für deine Hilfe bei chemischen Fragestellungen, das Korrekturlesen und die ein oder andere "Therapiestunde".

Bei Elena, Linda und Steffi bedanke ich mich für die vielen lustigen Mittagspausen und eure moralische Unterstützung.

Lieben Dank auch an alle anderen Mitarbeiter des IRS und der Biophysik für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre!

Vielen Dank an meine lieben Kommilitonen für die schöne Studienzeit, ohne euch hätte es nicht halb so viel Spaß gemacht!

Ingmar danke ich für die großartige Hilfe beim Kampf mit dem Biber.

Danke Mama und Papa, dass ihr mir das alles ermöglicht habt! Und Viktor, danke dass du immer an meiner Seite stehst und mich unterstützt!