

Inhaltsverzeichnis

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

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

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

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

3.1.8.1	Fluoreszenzspektren von Newport Green DCF nach NiCl_2 - Inkubation	104
3.1.8.2	Fluoreszenzspektren von Newport Green DCF nach NiSO_4 - Inkubation	107
3.1.8.3	Fluoreszenzspektren von Newport Green DCF nach Ni_3S_2 - Inkubation	109
3.1.8.4	Fluoreszenzspektren von Newport Green DCF nach CoCl_2 - Inkubation	110
3.2	Nickel- und Cobaltdetektion in Pflanzenzellen von <i>Catharanthus roseus</i>	112
3.2.1	Eigenfluoreszenz der Pflanzenzellen von <i>Catharanthus roseus</i>	113
3.2.2	Einfluss unterschiedlicher Inkubationszeiten von Nickel- und Cobaltver- bindungen auf die Fluoreszenzintensität von Newport Green DCF und dessen Lokalisation	114
3.2.2.1	Aufnahme von Nickel in Pflanzenzellen von <i>Catharanthus ro-</i> <i>seus</i> während NiCl_2 -Exposition	115
3.2.2.2	Aufnahme von Nickel in Pflanzenzellen von <i>Catharanthus ro-</i> <i>seus</i> während NiSO_4 -Exposition	117
3.2.2.3	Aufnahme von Nickel in Pflanzenzellen von <i>Catharanthus ro-</i> <i>seus</i> während Ni_3S_2 -Exposition	119
3.2.2.4	Aufnahme von Cobalt in Pflanzenzellen von <i>Catharanthus ro-</i> <i>seus</i> während CoCl_2 -Exposition	120
3.2.2.5	Aufnahme von Nickel in Pflanzenzellen von <i>Catharanthus ro-</i> <i>seus</i> während kurzer Inkubationszeiten mit NiCl_2	123
3.2.3	Zuordnung der Nickel- und Cobaltlokalisation durch Newport Green DCF zu ausgewählten Zellkompartimenten	124
4	Diskussion	127
4.1	Auswahl der Methode zur optimalen Detektion von Nickel und Cobalt in einzelnen lebenden Zellen	128

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

Inhaltsverzeichnis	xi
Literaturverzeichnis	164
Poster und Vorträge	187
Eidesstattliche Versicherung	189
Lebenslauf	190