

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen
Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von
Dipl.-Chem. Nicole Bauer
aus Heppenheim

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2015

**Untersuchung der Wechselwirkung
trivalenter Actinid- und Lanthanidionen mit
humanem Serumtransferrin mittels
zeitaufgelöster
Laserfluoreszenzspektroskopie**

Erster Gutachter: Prof. Dr. Petra J. Panak

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Fanghänel

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von Oktober 2011 bis Februar 2015 am Institut für Nukleare Entsorgung (INE) des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Petra Panak durchgeführt. Mein Dank gilt an erster Stelle Frau Prof. Dr. Petra Panak für die interessante Themenstellung, die wissenschaftliche Betreuung und das große persönliche Engagement. Sie war stets interessiert, hat mich immer motiviert und mit vielen konstruktiven Denkanstößen und zahlreichen fachlichen Diskussionen entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren möchte ich dem Institutsleiter Herr Prof. Dr. Geckeis danken, dass er es mir ermöglicht hat, diese Arbeit am INE durchführen zu können.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Ross MacGillivray und Val Smith für die Bereitstellung des hTf/2N sowie die hilfreichen Tipps für die Aufreinigung. Ich habe mich sehr über das große persönliche Interesse an meiner Arbeit gefreut und bedanke ich mich für die vielen freundlichen Mails und das Engagement bei der Publikation der Ergebnisse.

Ein besonderer Dank gilt Jörg Rothe und Kathy Dardenne für die Unterstützung bei den EXAFS-Messungen sowie Daniel für die Auswertung der Daten.

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe sowie den übrigen Laser-Nutzern für das hervorragende Arbeitsklima, die große Hilfsbereitschaft und die vielen hilfreichen Diskussionen bedanken. Des Weiteren danke ich den Bürokollegen sowie allen Teilnehmern der Kaffeerrunde, die dafür gesorgt haben, dass der Spaß bei der Arbeit nicht zu kurz kommt.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Eltern und der ganzen Familie bedanken, die mich immer unterstützt haben. Ein großes Dankeschön geht auch an meinen Freund Christian, der immer für mich da ist, sowie an seine Familie.

Kurzzusammenfassung

Die vorliegende Dissertation beschreibt die Komplexierung von Cm(III), Eu(III) und Am(III) mit humanem Serumtransferrin. Dieses ist eines der wichtigsten Blutserumproteine, das für den Eisentransport und die Abgabe des Eisens an Zellen verantwortlich ist. Transferrin hat eine komplexe, hochdefinierte dreidimensionale Struktur und ist unterteilt in zwei Lobes, die jeweils eine Bindungsstelle für dreiwertiges Eisen aufweisen. Ziel der Arbeit ist es, die in Lösung vorliegenden An(III)- und Ln(III)-Transferrin-Komplexspezies zu identifizieren und spektroskopisch und thermodynamisch zu charakterisieren sowie die Struktur der entsprechenden Spezies zu analysieren. Von besonderem Interesse sind hierbei Untersuchungen bei physiologisch relevanten Bedingungen ($\text{pH } 7,4$, $T = 310 \text{ K}$, $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 25 \text{ mM}$, $c(\text{NaCl}) = 150 \text{ mM}$). Die Ergebnisse sollen Informationen über den Einfluss von Transferrin auf die Biochemie inkorporierter trivalenter Actiniden in einem Organismus liefern. Neben der zeitaufgelösten Laserfluoreszenzspektroskopie (TRLFS) und der Lumineszenzspektroskopie wurde hierfür die EXAFS-Spektroskopie (*Extended X-Ray Absorption Fine Structure*) eingesetzt.

Mittels TRLFS konnte erstmals die Bildung zweier Cm(III)-Transferrin-Spezies in Abhängigkeit des pH-Werts nachgewiesen werden. Bei der Cm(III)-Transferrin-Spezies I, die im pH-Bereich von 3,5 bis 9,7 gebildet wird, handelt es sich um eine nichtspezifische Komplexspezies, bei der das Metallion an Aminosäurereste auf der Proteinoberfläche bindet. Im Falle der Cm(III)-Transferrin-Spezies II ($\text{pH} \geq 7,0$) komplexiert Cm(III) an der Fe(III)-Bindungsstelle, wobei die erste Koordinationssphäre durch zwei Wassermoleküle, vier Aminosäurereste des Proteins (His, Asp, 2 x Tyr) sowie drei weitere Liganden (vorzugsweise OH^- oder CO_3^{2-}) gebildet wird. Aufgrund der unterschiedlichen Bindungseigenschaften des C- und N-Lobes erfolgt die Komplexierung von Cm(III) unter den experimentellen Bedingungen dabei ausschließlich an der C-terminalen Bindungsstelle.

In Ergänzung zu den Komplexierungsuntersuchungen mit Transferrin wurde die Wechselwirkung von Cm(III) mit dem rekombinanten N-Lobe des humanen Serumtransferrins (hTf/2N), das als Modell für den N-Lobe des Transferrins dient,

untersucht. Im Gegensatz zu Transferrin wird mit hTf/2N keine unspezifische Komplexspezies gebildet. Die Cm(III)-hTf/2N-Spezies hingegen steht in exzellenter Übereinstimmung mit der Cm(III)-Transferrin-Spezies II, wodurch die Ähnlichkeit der Koordinationsumgebung an den Bindungsstellen des C- und N-Lobes des Transferrins bestätigt wird. Sowohl die Komplexbildung von Cm(III) mit hTf/2N als auch an der C-terminalen Bindungsstelle des Transferrins wird durch eine Temperaturerhöhung von Raumtemperatur ($T = 22,0^{\circ}\text{C}$) auf physiologische Temperatur ($T = 37,5^{\circ}\text{C}$) deutlich begünstigt. Die Komplexbildungsreaktion ist für beide Proteine endotherm und wird durch einen großen Entropiegewinn getrieben, was auf den ausgeprägten Chelateffekt des Proteins bei einer Komplexbildung des Metallions an der Fe(III)-Bindungsstelle zurückgeführt werden kann. Die Cm(III)-Komplexe mit Transferrin und hTf/2N unterscheiden sich jedoch deutlich in ihren Stabilitäten. Dies spiegelt sich auch in den Stabilitätskonstanten der Cm(III)-Transferrin-Spezies II und der Cm(III)-hTf/2N-Spezies wider, die sich um ca. zwei Größenordnungen unterscheiden.

Aufgrund der Tatsache, dass Carbonat bei der Komplexbildung von Fe(III) mit Transferrin als synergistisches Anion wirkt, sollte untersucht werden, ob Carbonat auch einen Einfluss auf die Komplexbildung von Cm(III) mit Transferrin hat. Untersuchungen bei verschiedenen Carbonatkonzentrationen ($c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 0 \text{ mM}$, $0,23 \text{ mM}$ und 25 mM (physiologische Carbonatkonzentration)) haben dabei gezeigt, dass eine Erhöhung der Carbonatkonzentration die Bildung der Cm(III)-Transferrin-Spezies II bei deutlich kleineren pH-Werten begünstigt. Folglich hat Carbonat auch einen synergistischen Effekt für die Komplexbildung von Cm(III) an der C-terminalen Bindungsstelle. Allerdings ist die Carbonatkomplexbildung auch eine wichtige Konkurrenzreaktion. Die Bildung der nichtspezifischen Cm(III)-Transferrin-Spezies I wird bei physiologischer Carbonatkonzentration ($c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 25 \text{ mM}$) vollständig unterdrückt und auch die Anteile der Cm(III)-Transferrin-Spezies II sind deutlich kleiner als bei Abwesenheit von Carbonat. Im Gegensatz zu Transferrin konnte kein synergistischer Effekt von Carbonat auf die Komplexbildung von Cm(III) mit hTf/2N nachgewiesen werden. Stattdessen wird die Bildung der Cm(III)-hTf/2N-Spezies aufgrund der konkurrierenden Carbonatkomplexbildung sehr stark zurückgedrängt.

In Ergänzung zu den Komplexbildungsuntersuchungen von Cm(III) mit Transferrin wurde die Wechselwirkung von Eu(III) mit Transferrin mittels Tieftemperatur-

TRLFS untersucht. Während bei $\text{pH} \leq 6,0$ eine unspezifische Eu(III) -Transferrin-Spezies gebildet wird, die der Cm(III) -Transferrin-Spezies I entspricht, erfolgt bei $\text{pH} \geq 7,4$ die Komplexierung von Eu(III) analog zur Komplexierung mit Cm(III) an der Fe(III) -Bindungsstelle des Transferrin. Die spektroskopischen Charakteristika zeigen dabei eine identische Zusammensetzung der Koordinationssphären in beiden Komplexen.

Neben der Identifizierung und Charakterisierung der verschiedenen Cm(III) - und Eu(III) -Transferrin-Spezies war die Strukturaufklärung ein wichtiges Thema. Zu diesem Zweck wurden EXAFS-Untersuchungen mit Eu(III) - und Am(III) -Transferrin durchgeführt. Die Analyse des Am(III) -Transferrin-Spektrums bei $\text{pH} 8,5$ zeigt das Vorliegen von neun Nachbaratomen im mittleren Abstand von $2,38 \text{ \AA}$. Dies entspricht den Abständen, die beim Einbau von Am(III) in Mineralstrukturen auftreten und bestätigt eine starke, multidentate Koordination von Am(III) an der Fe(III) -Bindungsstelle des Transferrinmoleküls. Der Nachweis der unspezifisch gebundenen Transferrinspezies erfolgte anhand von Eu(III) -Transferrin bei $\text{pH} 7,2$, wobei diese Spezies einen wesentlich größeren mittleren Bindungsabstand von $2,41 \text{ \AA}$ aufweist.

Um Aussagen über den potentiellen Transport von Actinidionen im menschlichen Körper treffen zu können, sind die Ergebnisse der Komplexierungsuntersuchungen bei physiologischen Bedingungen ($\text{pH} 7,4$, $T = 310 \text{ K}$, $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 25 \text{ mM}$, $c(\text{NaCl}) = 150 \text{ mM}$) von besonderer Bedeutung. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass unter diesen Bedingungen die Bildung der $\text{Cm(III)}\text{-hTf/2N}$ -Spezies aufgrund der konkurrierenden Carbonatkomplexierung vollständig unterdrückt wird. Unter der Voraussetzung, dass hTf/2N ein geeignetes Modell für den N-Lobe des Transferrins darstellt, ist die Komplexierung von Cm(III) an der N-terminalen Bindungsstelle somit nicht relevant für den Transport von Actinidionen im Körper. Im Gegensatz hierzu werden unter physiologischen Bedingungen mit Transferrin ca. 15% der Cm(III) -Transferrin-Spezies II gebildet. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung für die potentielle Bindung an den Rezeptor sowie die Endocytose in die Zelle. Die vorliegende Arbeit liefert wichtige Informationen über Bindungsmechanismen, Struktur und thermodynamische Daten der Komplexierung trivalenter Actinidionen mit Transferrin. Diese Ergebnisse tragen zu einem besseren Verständnis der relevanten biochemischen Reaktionen trivalenter Actinidionen bei und stellen eine wichtige Grundlage für die Entwicklung potentieller Dekontaminationsstrategien dar.

Abstract

In the present work the complexation of Cm(III), Eu(III) and Am(III) with human serum transferrin is studied. Transferrin is an iron carrier protein in the blood. It can bind two Fe(III) ions and transport them to the cells where the transferrin metal ion complex is recognized by the receptor and taken up via endocytosis. The ternary structure of transferrin is characterized by folding into two similar but not identical lobes, each housing a Fe(III) binding site. The aim of this work was the identification and the spectroscopic and thermodynamic characterization of An(III) and Ln(III) transferrin complex species. Studies at physiologically relevant conditions (pH 7.4, $T = 310\text{ K}$, $c(\text{carbonate})_{\text{tot}} = 25\text{ mM}$, $c(\text{NaCl}) = 150\text{ mM}$) are of particular interest. The results should contribute to a better understanding of the influence of transferrin on the biochemistry of incorporated trivalent actinides in the human body. Different speciation methods, such as time-resolved laser fluorescence spectroscopy (TRLFS), luminescence spectroscopy and EXAFS (*Extended X-Ray Absorption Fine Structure*) spectroscopy were applied.

Using TRLFS two unambiguously different Cm(III) transferrin species were identified for the first time. In the pH range from 3.5 to 9.7 the Cm(III) transferrin species I is formed revealing complexation of the metal ion at a nonspecific site of the protein surface. In case of the Cm(III) transferrin species II Cm(III) is bound at the Fe(III) binding site of the protein resulting in a 4-fold coordination via amino acid groups of the protein (His, Asp, 2 x Tyr) and coordination of two water molecules and three additional ligands, e.g. OH^- or CO_3^{2-} . Due to the kinetic and thermodynamic differences of the binding sites of the N- and C-lobe, the experimental conditions ensure exclusive coordination of Cm(III) at the C-terminal binding site.

In addition to the complexation studies of Cm(III) with transferrin, the interaction with the recombinant N-lobe of human serum transferrin (hTf/2N) as a model component for the transferrin N-lobe was investigated. In contrast to transferrin, no unspecific complex species is formed with hTf/2N. However, at $\text{pH} \geq 7.4$ a Cm(III) hTf/2N species with Cm(III) bound at the Fe(III) binding site is formed which is

comparable to the Cm(III) transferrin species II. These results underline the similarity of the coordination environment of the C- and N-terminal binding sites. An increase of the temperature from room temperature ($T = 296 \text{ K}$) to physiological temperature ($T = 310 \text{ K}$) favors the complexation of Cm(III) with both transferrin and hTf/2N. The complexation reaction of Cm(III) with both proteins is endothermic and highly entropy-driven which is in accordance to the strong chelate effect of the protein upon complexation at the binding sites. However, the stability of the Cm(III) complexes with transferrin and hTf/2N differs significantly. This is reflected by the stability constants of the Cm(III) transferrin species II and the Cm(III) hTf/2N species which differ by almost two orders of magnitude.

Since carbonate is required as a synergistic anion for the complexation of Fe(III) with transferrin it is of major importance to study the influence of carbonate on the Cm(III) transferrin interaction. Therefore, the complexation of Cm(III) with transferrin was investigated at three different carbonate concentrations ($c(\text{carbonate})_{\text{tot}} = 0 \text{ mM}$, $0,23 \text{ mM}$ und 25 mM (physiological carbonate concentration)). An increase of the total carbonate concentration favors the formation of the Cm(III) transferrin species II significantly which proves that carbonate acts as synergistic anion for Cm(III) complexation at the C-terminal binding site of transferrin. However, carbonate complexation is also an important competing reaction. The formation of the nonspecific Cm(III) transferrin species I is completely suppressed at physiological carbonate concentration. Furthermore, the fractions of the Cm(III) transferrin species II decrease at $\text{pH} \geq 7.4$. In contrast to the measurements with transferrin, no synergistic effect of carbonate on the complexation of Cm(III) with hTf/2N was observed. Instead, an increase of the total carbonate concentration represses the formation of the Cm(III) hTf/2N species significantly.

In addition to the complexation studies of Cm(III) with transferrin, the interaction of Eu(III) with transferrin was investigated using low temperature TRLFS ($T \leq 20 \text{ K}$). At $\text{pH} \leq 6,0$ an unspecifically bound Eu(III) transferrin species is formed which corresponds to the Cm(III) transferrin species I. At $\text{pH} \geq 7,4$ complexation of Eu(III) occurs at the Fe(III) binding site of transferrin. The spectroscopic characteristics of the Eu(III) and Cm(III) transferrin complexes indicate an identical coordination environment in both complexes.

Besides the identification and characterization of the Cm(III) and Eu(III) transferrin complexes structural investigations using EXAFS were performed. The EXAFS spectrum of Am(III) transferrin at pH 8.5 reveals nine nearest neighbors present in the first coordination sphere at an average distance of 2.38 Å. Such short distances have been solely observed for Am(III) incorporated into mineral structures and confirms the strong multidentate coordination of Am(III) at the transferrin binding cleft. The formation of the unspecific transferrin species was observed for Eu(III) transferrin at pH 7.2. In comparison to Am(III) transferrin at pH 8.5, the average distance of this species is significantly higher (2.41 Å).

Regarding the potential transport of actinides in the human body, the complexation of Cm(III) with hTf/2N (N-lobe) and transferrin (C-lobe) at physiological conditions (pH 7.4, $T = 310\text{ K}$, $c(\text{carbonate})_{\text{tot}} = 25\text{ mM}$, $c(\text{NaCl}) = 150\text{ mM}$) is of particular interest. In case of hTf/2N, only Cm(III) carbonate species are formed at physiological conditions whereas the formation of the Cm(III) hTf/2N species is completely suppressed. In contrast, about 15 % of the Cm(III) transferrin species II with Cm(III) bound at the C-terminal binding site are formed which is an important requirement for the recognition of the Cm(III) transferrin complex by the receptor followed by endocytosis. Therefore, the present work provides important information on binding mechanism, structure and thermodynamic data of the complexation of trivalent actinides with transferrin. These results contribute to a better understanding of relevant biochemical reactions of actinides upon incorporation and are of major importance for the future development of potential decontamination therapies.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Kenntnisstand	4
2.1. Transferrin.....	4
2.1.1. Klassen der Transferrine	4
2.1.2. Humanes Serumtransferrin	5
2.1.2.1. Struktur von Transferrin	6
2.1.2.2. Endocytose von holo-Transferrin	9
2.1.3. Metallionen-Transferrin-Komplexe	11
2.2. Lanthaniden und Actiniden	14
2.2.1. Elektronenkonfiguration und Oxidationsstufen	15
2.2.2. Koordinationschemie der dreiwertigen Lanthanid- und Actinidionen ..	18
2.2.3. Lumineszenzspektroskopie von Lanthanid- und Actinidionen	20
2.2.3.1. Fluoreszenzeigenschaften von Eu(III).....	21
2.2.3.2. Fluoreszenzeigenschaften von Cm(III)	25
2.2.3.3. Zeitaufgelöste Laserfluoreszenzspektroskopie	29
2.2.3.1. Hydrolyse von Cm(III)	31
2.2.3.2. Carbonatkomplexierung von Cm(III)	33
2.3. EXAFS-Spektroskopie.....	35
3. Experimenteller Teil	40
3.1. Chemikalien	40
3.2. Herstellung der Proteinlösungen.....	41
3.3. Probenpräparation	42
3.3.1. Präparation der Cm(III)-Transferrin- und Cm(III)-hTf/2N-Proben	42
3.3.2. Präparation der Eu(III)-Transferrin-Proben	43
3.3.3. Präparation der EXAFS-Proben	44

3.4. Zeitaufgelöste Laserfluoreszenzspektroskopie	44
3.4.1. TRLFS-System I.....	44
3.4.2. TRLFS-System II	46
3.5. EXAFS-Spektroskopie.....	47
3.6. Fluorimetrie.....	47
4. Ergebnisse und Diskussion.....	49
4.1. Komplexierung von Cm(III) mit Transferrin	49
4.1.1. Komplexierung von Cm(III) mit Transferrin bei Raumtemperatur	50
4.1.1.1. Emissionsspektren von Cm(III) mit Transferrin.....	50
4.1.1.2. f_i -Faktoren und Speziation	53
4.1.1.3. Fluoreszenzlebensdauern der Cm(III)-Transferrin-Spezies.....	58
4.1.1.4. Kinetikuntersuchungen von Cm(III) mit Transferrin.....	61
4.1.1.5. Bestimmung der Stabilitätskonstanten der Cm(III)-Transferrin-Spezies II.....	62
4.1.2. Komplexierung von Cm(III) mit Transferrin bei physiologischer Temperatur.....	65
4.1.3. Einfluss von Carbonat auf die Cm(III)-Transferrin-Komplexierung.....	67
4.1.3.1. Bestimmung der Ionenstärke der Transferrinlösungen	67
4.1.3.2. Berechnung der Carbonatkonzentration	69
4.1.3.3. Komplexierung von Cm(III) mit Transferrin in Abwesenheit von Carbonat	72
4.1.3.4. Komplexierung von Cm(III) mit Transferrin bei physiologischer Carbonatkonzentration	73
4.1.4. Bestimmung der thermodynamischen Daten der Komplexierungsreaktion von Cm(III) mit Transferrin	78
4.2. Komplexierung von Cm(III) mit hTf/2N	82
4.2.1. Komplexierung von Cm(III) mit hTf/2N bei Raumtemperatur.....	84
4.2.1.1. Emissionsspektren und Speziation.....	84
4.2.1.2. Kinetikuntersuchungen von Cm(III) mit hTf/2N und Stabilität des Cm(III)-hTf/2N-Komplexes	86

4.2.2. Komplexierung von Cm(III) mit hTf/2N bei physiologischer Temperatur	88
4.2.3. Komplexierung von Cm(III) mit hTf/2N bei physiologischer Carbonatkonzentration.....	89
4.2.4. Bestimmung der thermodynamischen Daten der Komplexierungsreaktion von Cm(III) mit hTf/2N	92
4.3. Komplexierung von Eu(III) mit Transferrin.....	96
4.3.1. Komplexierung von Eu(III) mit Transferrin bei Raumtemperatur	96
4.3.2. Komplexierung von Eu(III) mit Transferrin bei $T < 20$ K	99
4.3.2.1. Excitations- und Emissionsspektren	99
4.3.2.2. Vibronische Seitenbanden	102
4.3.1. Fluorimetrie.....	104
4.3.1.1. Quenchprozesse	104
4.3.1.2. Fluorimetrie von Eu(III)-Transferrin.....	105
4.4. EXAFS-Spektroskopie von Am(III)-, Eu(III)- und Np(V)-Transferrin	107
5. Zusammenfassung und Ausblick	113
Literaturverzeichnis	118
Übersicht über Veröffentlichungen	133
Publikationen	133
Vorträge	133
Posterbeiträge.....	134

Abkürzungsverzeichnis

Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
BHK cells	<i>baby hamster kidney cells</i> (Babyhamsternierenzellen)
Bq	Becquerel
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
e	Eulersche Zahl
EDTA	Ethylendiammintetraacetat
EXAFS	<i>Extended X-Ray Absorption Fine Structure</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
His	Histidin
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
hTf	Humanes Serumtransferrin
hTf/2N	Rekombinanter N-Lobe des humanen Serumtransferrins
I	Intensität
ICP-MS	<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> (Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma)
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
K	Kelvin
k	Boltzmann-Konstante
Lys	Lysin
λ	Wellenlänge
m	Molal (mol/kg)
M	Molar (mol/l)
NEXAFS	<i>Near-Edge X-Ray Absorption Fine Structure</i>
NIR	nahes Infrarot
NTA	Nitrolotriessigsäure
OPO	Optischer Parametrischer Oszillator (<i>Optic Parametric Oscillator</i>)
OTf	Ovotransferrin
X	

PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PDB	<i>Protein Database</i>
PRDF	<i>Pseudo Radial Distribution Function</i>
rpm	<i>Rounds Per Minute</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>
T	Temperatur
τ	Fluoreszenzlebensdauer
Tf	Transferrin
TfR	Transferrinrezeptor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRLFS	<i>Time Resolved Laser Fluorescence Spectroscopy</i> (zeitaufgelöste Laserfluoreszenzspektroskopie)
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolett
XANES	<i>X-Ray Absorption Near-Edge Structure</i>
YAG	Yttrium-Aluminium-Granat

1. Einleitung

In der heutigen Zeit kommen Radionuklide und insbesondere die Actiniden in Forschung, Medizin und Technik auf vielfältige Weise zum Einsatz. Beispielsweise werden ^{235}U und ^{239}Pu zur Energiegewinnung in Kernkraftwerken eingesetzt.^{1, 2} ^{238}Pu , das in Kernreaktoren aus ^{237}Np erbrütet wird, findet in Radionuklidbatterien Anwendung. Solche kleinen, langlebigen und weitgehend wartungsfreien Stromquellen werden vor allem in der Raumfahrt und Meerestechnik eingesetzt.¹ Einige Radionuklide werden in der Nuklearmedizin zu diagnostischen und therapeutischen Zwecken verwendet. Beispielsweise finden ^{18}F und ^{11}C Anwendung für die *Positronen-Emissions-Tomographie* (PET) und $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In oder ^{123}I werden für Szintigraphieuntersuchungen wie SPECT (*Single Photon Emission Computed Tomography*) verwendet. Außerdem werden Radionuklide wie ^{60}Co auch zur Sterilisation von Medizin- und Hygieneprodukten sowie Nahrungsmitteln eingesetzt.

Neben den Quellen für die natürliche Strahlung besteht bei allen Anwendungen von Radionukliden immer das Risiko einer Freisetzung von radioaktivem Material in die Umwelt. Beispiele hierfür sind Reaktorkatastrophen wie in Tschernobyl 1986 oder in Fukushima 2011, wo in erster Linie ^{137}Cs , ^{131}I und ^{90}Sr freigesetzt wurden. Auch durch Kernwaffentests in den 1950er und 1960er Jahren wurden Radionuklide (vor allem ^{137}Cs und ^{90}Sr) in die Erdoberfläche und die Ozeane eingebracht.^{3, 4} Eine weitere mögliche Umweltbelastung entsteht durch Abfallprodukte, die bei der Herstellung von Kernbrennstoffen (Bergbau, Erzaufbereitung, Urananreicherung, Brennelementefertigung und Wiederaufarbeitung) sowie dem Betrieb von Kernreaktoren anfallen.⁵

Die in die Umwelt gelangten Radionuklide können potentiell auch vom Menschen aufgenommen werden. Hierbei bergen die Actiniden aufgrund ihrer langen Halbwertszeiten ein besonders hohes Gefahrenpotential. Die Bioverfügbarkeit und die Toxizität hängen bei diesen Elementen nicht nur von der Konzentration, sondern im Wesentlichen von der Speziation, d.h. der chemischen Form und der

1. Einleitung

Oxidationsstufe ab.⁶ Soweit bisher bekannt, sind generell alle Elemente mit Ordnungszahlen größer als der von Iod (53) nicht essentiell für den Menschen.² Auch die Actiniden besitzen im Gegensatz zu vielen anderen Metallionen keine bekannte essentielle Funktion in der Biochemie von Mensch, Tier und Pflanze. Ihre giftige Wirkung beruht neben der chemischen auf einer radiologischen Toxizität, die vor allem bei den kurzlebigen Nukliden das weitaus höhere Gefahrenpotential darstellt.

Während für eine Vielzahl von anderen Metallionen wie Quecksilber oder Chrom die bioanorganische Chemie im menschlichen Organismus hinreichend untersucht wurde, existiert nur ein unzureichendes Wissen über Metabolismus, Transport, Anreicherung und Ausscheidung der Actiniden im Körper. Diese Kenntnisse sind im Hinblick auf eine effektive Therapiemöglichkeit im Falle einer Inkorporation jedoch unerlässlich. Nur wenn ausreichend Informationen über das Verhalten von Radionukliden im menschlichen Körper vorliegen, können zuverlässige Dekontaminationsstrategien entwickelt werden.

Die Actinidionen zeigen im physiologisch relevanten pH-Bereich (pH ~ 7,4) eine starke Tendenz zur Hydrolyse. Allerdings enthalten biologische Flüssigkeiten wie Speichel, Blut oder Gallenflüssigkeit eine Vielzahl verschiedener Komponenten und somit potentieller Liganden. Hierzu zählen mineralische Bestandteile wie Carbonat, Fluorid oder Phosphat, Proteine und Aminosäuren sowie weitere organische Bestandteile wie Citrat oder Glucose (Tabelle 1.1).⁷ All diese anorganischen und organischen Komponenten können prinzipiell als Liganden für inkorporierte Radionuklide fungieren und mit der Hydrolyse in Konkurrenz treten, wobei sich ein sehr komplexes Gleichgewicht der verschiedenen Spezies einstellt.

Die Wechselwirkung mit den Blutbestandteilen ist von besonderem Interesse, da Actiniden auf diesem Weg im Körper verteilt werden können. Von den meisten Actinidionen wie Pu(IV), Am(III), Cm(III) oder Cf(III) ist bekannt, dass sie in erster Linie Komplexe mit den Blutserumproteinen bilden, nur wenige Actiniden wie beispielweise U(VI) und Th(IV) wechselwirken auch mit den zellulären Bestandteilen des Bluts (Blutplättchen und Blutkörperchen).⁸⁻¹⁰ Transferrin ist eines der wichtigsten Blutserumproteine, das für den Eisentransport und die Abgabe des Eisens an Zellen verantwortlich ist. Da es *in vivo* jedoch nur zu rund 30% mit Eisen beladen ist, können auch andere Metallionen an Transferrin komplexieren. Tatsächlich ist

bekannt, dass Transferrin mit rund 30 verschiedenen Metallionen (darunter auch Actinidionen wie Pu(IV), Th(IV), Pa(IV), U(VI), Np(IV), Am(III) und Cm(III)) Komplexe bildet. Auf diese Weise kann Transferrin die Bioverfügbarkeit der Metallionen in einem Organismus entscheidend beeinflussen und somit auch eine wesentliche Rolle für die Biochemie inkorporierter Actinidionen spielen.

Tabelle 1.1 Übersicht über die Hauptbestandteile des Blutserums.⁷

Komponenten	Konzentration [mol/l]
Mineralische Bestandteile	
Carbonat	$2,5 \cdot 10^{-2}$
Phosphat	$1,1 \cdot 10^{-3}$
SO ₄ ²⁻	$3,3 \cdot 10^{-4}$
Cl ⁻	$9,0 \cdot 10^{-2}$
Organische Bestandteile	
Citrat	$1,6 \cdot 10^{-4}$
Lactat	$1,5 \cdot 10^{-3}$
Oxalat	$9,2 \cdot 10^{-6}$
Proteine und Aminosäuren	10^{-4} bis 10^{-5}
Albumin	$6,3 \cdot 10^{-4}$
Transferrin	$3,7 \cdot 10^{-5}$
Metallionen	
Ca ²⁺	$1,4 \cdot 10^{-3}$
Mg ²⁺	$5,6 \cdot 10^{-4}$
Na ⁺	$9,0 \cdot 10^{-2}$
K ⁺	$4,9 \cdot 10^{-4}$
Fe ²⁺	$3,0 \cdot 10^{-5}$

2. Kenntnisstand

2.1. Transferrin

2.1.1. Klassen der Transferrine

Bei den Transferrinen handelt es sich um eine Gruppe von einkettigen, eisenbindenden Glycoproteinen mit einer Masse von rund 80 kDa, die aus ca. 700 Aminosäuren bestehen. Tabelle 2.1 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Transferrinklassen.

Tabelle 2.1 Klassifizierung verschiedener Transferrine.¹¹

	Mr [Da]	Anzahl AS	Vorkommen
Serumtransferrin	79570	679	Blutserum
Ovotransferrin	77770	686	Eiweiß
Lactoferrin	82400	703	Milch, Speichel, Tränen
Melanotransferrin	97000	719	Melanome
Eisen(III) bindendes Protein (FBP)	34000	309	gram-negative Bakterien

Das Serumtransferrin kommt in allen Wirbeltieren, Krabben und Insekten vor und ist für den Transport von dreiwertigem Eisen im Blut verantwortlich.¹² Ovotransferrin, auch Conalbumin genannt, ist Bestandteil von Eiweiß, während Lactoferrin in einer Vielzahl von Sekretflüssigkeiten wie Milch, Tränen, Speichel oder Gallen- und Bauchspeicheldrüsenflüssigkeit vorkommt. Sowohl Ovo- als auch Lactoferrin wirken antimikrobiell, da sie Eisen komplexieren und dieses somit nicht mehr für das Wachstum von Bakterien zur Verfügung steht.^{11, 13} Bei Melanotransferrin handelt es sich um ein membrangebundenes Protein. Es kommt in großer Zahl auf der Oberfläche von Melanomzellen sowie vereinzelt auch auf der Oberfläche jeder anderen Zelle vor.¹⁴ Es kann nur ein Fe(III) binden und ist vermutlich nicht am

Eisenmetabolismus beteiligt.¹⁵ Das Fe(III) bindende Protein (FBP), das in einigen gram-negativen Bakterien vorkommt, besteht im Gegensatz zu den anderen Transferrinen aus nur einem Lobe und kann daher ebenfalls nur ein Fe(III) pro Molekül binden, weshalb es vermutlich einen anderen evolutionären Ursprung hat. Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit des Proteins wird es jedoch trotzdem zur Klasse der Transferrine gezählt.¹⁶⁻¹⁹

Alle Transferrine weisen große strukturelle Ähnlichkeiten auf. Beispielsweise stimmt die Aminosäuresequenz des Serumtransferrins zu rund 60% mit der des Lactoferrins überein.^{11, 20, 21} Dies ist die Ursache für die vergleichbare Tertiärstruktur der Transferrine, die durch die Faltung des Proteins in zwei fast identische Hälften (Lobes) mit je einer Fe(III)-Bindungsstelle charakterisiert ist.

2.1.2. Humanes Serumtransferrin

Menschliches Blut besteht aus festen und flüssigen Komponenten. Durch Zentrifugation können die festen Bestandteile (rote und weiße Blutkörperchen sowie Blutplättchen), die 45% des Gesamtblutvolumens ausmachen, vom Blutplasma getrennt werden.²² Das gelblich gefärbte Blutserum wird erhalten, wenn zusätzlich noch die Gerinnungsfaktoren aus dem Blutplasma entfernt werden.

Blutplasma besteht zu 90% aus Wasser und zu 10% aus gelösten Stoffen, wobei die Proteine mit ca. 2/3 den Hauptanteil ausmachen.²³ Die Proteinkonzentration im Blutplasma beträgt 65 – 80 g/l.²⁴ Aufgrund ihrer Wanderungseigenschaften bei der Elektrophorese können die Proteine in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Mit 59,2% machen Albumine den Hauptanteil aus, bei den restlichen Proteinen handelt es sich um Globuline, zu denen auch Transferrin zählt. Es ist das vierthäufigste Protein im Blutplasma, die Konzentration beträgt 2 – 4 g/l.^{22, 23}

Humanes Serumtransferrin (hTf) wurde erstmals 1946 von A. L. Schade und L. Caroline isoliert und seine antimikrobiellen Eigenschaften untersucht.²⁵ Der Name *Transferrin* stammt von Holmberg und Laurell.²⁶ Es ist eines der wichtigsten Blutserumproteine, das im menschlichen Körper für den Eisentransport im Blut verantwortlich ist. Die Proteinbiosynthese von Transferrin erfolgt in der Leber, geringe Mengen werden jedoch auch in den Hoden, im Gehirn, der Milz und den

Nieren produziert.²⁷ Von dort gelangt es in den Blutkreislauf, wo es dreiwertiges Eisen komplexiert und zu den Zellen transportiert. Der Fe(III)-Transferrin-Komplex bindet an den Transferrinrezeptor (TfR) an der Zellmembran und wird in die Zelle eingeschleust, wo die Abgabe des Fe(III) erfolgt. Ein Großteil des durch Transferrin transportierten Eisens wird zur Hämoglobinsynthese in jungen roten Blutkörperchen (Retikulozyten) benötigt.

Die Halbwertszeit des Transferrins im menschlichen Körper beträgt 7,6 Tage.^{28, 29} Während seiner Lebensdauer durchläuft ein Transferrinmolekül 100 bis 200 Zyklen aus Eisenaufnahme, Transport und Eisenabgabe an die Zelle. Die Halbwertszeit des Fe(III)-Transferrin-Komplexes beträgt hierbei 1,7 Stunden.²⁹ Obwohl nur rund 0,1% (0,3 g) der gesamten Eisenmenge im Körper durch Transferrin komplexiert wird, ist es eines der wichtigsten Proteine für den Eisenmetabolismus mit einem Gesamtumsatz von 30 mg Fe(III)/24 h.³⁰

2.1.2.1. Struktur von Transferrin

Transferrin ist ein einsträngiges Glycoprotein mit einer Molekülmasse von 79 570 Da, das aus 679 Aminosäuren besteht.^{11, 21, 31} Es hat eine komplexe, hochdefinierte dreidimensionale Struktur mit zwei Bindungsstellen für dreiwertiges Eisen (Abbildung 2.1). Sind beide Bindungsstellen besetzt, bezeichnet man es als holo-Transferrin, Fe(III)-freies Transferrin wird apo-Transferrin genannt.



Abbildung 2.1 Dreidimensionale Struktur des humanen apo-Transferrins. (C-Lobe (rot), N-Lobe (grün), verbindende Proteinkette (gelb)) (PDB: 2HAU).³²

Die Proteinkette ist in zwei globuläre Hälften (Lobes) gefaltet, die durch eine kurze, spiralförmige Peptidkette verbunden sind. Beide Lobes bestehen jeweils aus ca. 330 Aminosäuren (~ 40 kDa) und weisen eine große strukturelle Ähnlichkeit auf.³² Sie werden entsprechend dem N- bzw. C-Terminus der Proteinkette als N- und C-Lobe bezeichnet. Die beiden Lobes wiederum sind jeweils in zwei ähnlich große Bereiche, sogenannte Domänen, unterteilt, die aus einer alternierenden Abfolge von α -Helices und β -Faltblattstrukturen bestehen. Dies ist charakteristisch für Proteine aus der „Venus fly-trap“-Familie, zu denen auch Transferrin zählt.³³ Die Domänen sind durch eine Spalte getrennt, in der sich die Koordinationsstelle für Fe(III) befindet.

Fe(III) wird an dieser Bindungsstelle von zwei Tyrosinresten, einem Aspartat- und einem Histidinrest aus der Proteinkette komplexiert.³⁴ Im Falle des N-Lobes handelt es sich hierbei um Tyr-95, Tyr-188, Asp-63 und His-249. Die Faltung des Proteins bedingt, dass die N-Termini vieler α -Helices (NH₂-Gruppen) auf die Bindungsstelle gerichtet sind. Unter physiologischen Bedingungen sind sie in der Regel protoniert und tragen eine positive Partialladung. Hierdurch wird die Koordination ebenfalls positiv geladener Metallionen erschwert. Allerdings wird durch die positiven Partialladungen die Koordination eines zusätzlichen, sogenannten synergistischen Anions erleichtert, das über Wasserstoffbrücken mit dem Protein verankert ist. Dieses koordiniert bidentat an das Metallion und vervollständigt so dessen Koordinationssphäre.³⁵ Somit wird Fe(III) an der Bindungsstelle verzerrt oktaedrisch von den vier Aminosäureresten sowie dem synergistischen Anion komplexiert (Abbildung 2.2).³⁴ Durch das Anion wird der positive Ladungsüberschuss an der Bindungsstelle kompensiert und das Metallion nach außen hin abgeschirmt. Im lebenden Organismus übernimmt Carbonat die Rolle des synergistischen Anions. Steht dieses nicht zur Verfügung, können auch andere Anionen wie Glycolat, Lactat, Oxalat oder Malonat diese Funktion übernehmen.^{36, 37} Diese ternären Metallion-Transferrin-Anionen-Komplexe zeichnen sich im Vergleich zu dem entsprechenden Komplex mit Carbonat allerdings durch eine deutlich geringere Stabilität aus und werden in der Regel nur unter carbonatfreien Bedingungen gebildet.^{36, 37} Das strukturelle Hauptmerkmal der weiteren möglichen synergistischen Anionen ist eine Carboxylatgruppe sowie eine proximale funktionelle Gruppe in einer „Carbonat-ähnlichen“ Konformation, wobei die funktionelle Gruppe nicht weiter als 6,3 Å von der COO-Gruppe entfernt sein darf.³⁷

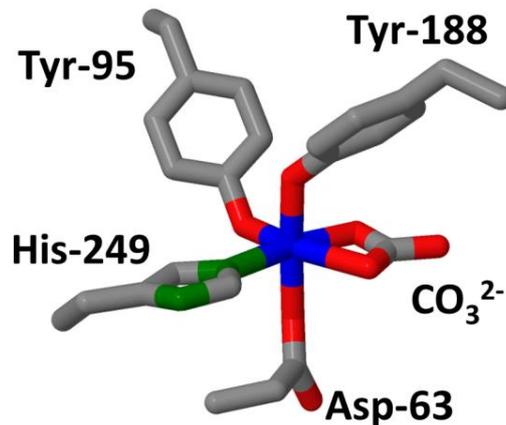


Abbildung 2.2 Darstellung der Koordinationsumgebung von Fe(III) im N-Lobe des Transferrins (nach PDB: 1A8F).²⁸

Lange Zeit wurde angenommen, dass die Bindung von Metallion und Anion vollständig kooperativ ist, das heißt, dass weder das Metallion noch das Anion in Abwesenheit des jeweils anderen an der Bindungsstelle koordinieren können.^{38, 39} Allerdings stellten *Azari et al.* bereits 1970 fest, dass einige Anionen auch in Abwesenheit eines Metallions an Transferrin binden können.⁴⁰ Auch für Carbonat ist dies der Fall.^{41, 42} Trotzdem kann die Bindung von Metallion und Anion an der Bindungsstelle nicht als unabhängig voneinander betrachtet werden. Es besteht eine eingeschränkte Kooperativität, d.h. weder das Metallion noch das Anion wird in Abwesenheit des anderen so stark gebunden wie bei dessen Anwesenheit (Ausnahme: VO^{2+}).⁴³⁻⁴⁵ Daher wird das Anion auch als *synergistisches Anion* bezeichnet. Durch die Bildung eines ternären Komplexes wird dieses fest im Komplex verankert.

Die Aminosäuren, die das Metallion an der Bindungsstelle komplexieren, stammen aus unterschiedlichen Bereichen des Proteinstranges. Im N-Lobe beispielsweise sind die Aminosäurereste Asp-63 und Tyr-188 auf einer der beiden Domänen des Lobes lokalisiert, während die Aminosäuren Tyr-95 und His-249 zwei Proteinsträngen zugeordnet werden können, die an der Rückseite der Fe(III)-Bindungsstelle zwischen den beiden Domänen verlaufen.³⁴ Im unkomplexierten Zustand weist jeder Lobe eine offene Konformation auf.⁴⁶ Werden Fe(III) und Carbonat komplexiert, bewegen sich die beiden Lobes aufeinander zu und es tritt eine Konformationsänderung in eine geschlossene Konformation auf (Abbildung 2.3). Auf diese Weise wird das gebundene Fe(III) nach außen hin abgeschirmt und die Stabilität des Metallion-Transferrin-

Komplexes erhöht. Zudem ist die Konformationsänderung ein Schlüsselschritt für die Bindung des Eisen-Transferrinkomplexes an den Transferrinrezeptor (TfR) sowie für die Abgabe des Eisens an die Zelle. Nur komplett mit Eisen beladenes Transferrin mit einer kompakten Struktur wird an den Rezeptor gebunden. Ist nur eine oder keine Koordinationsstelle besetzt, hat das Protein eine offene Struktur. Es wird nur sehr schwach an den Rezeptor gebunden, weswegen es nicht in die Zelle eingeschleust und stattdessen wieder ins Plasma abgegeben wird.

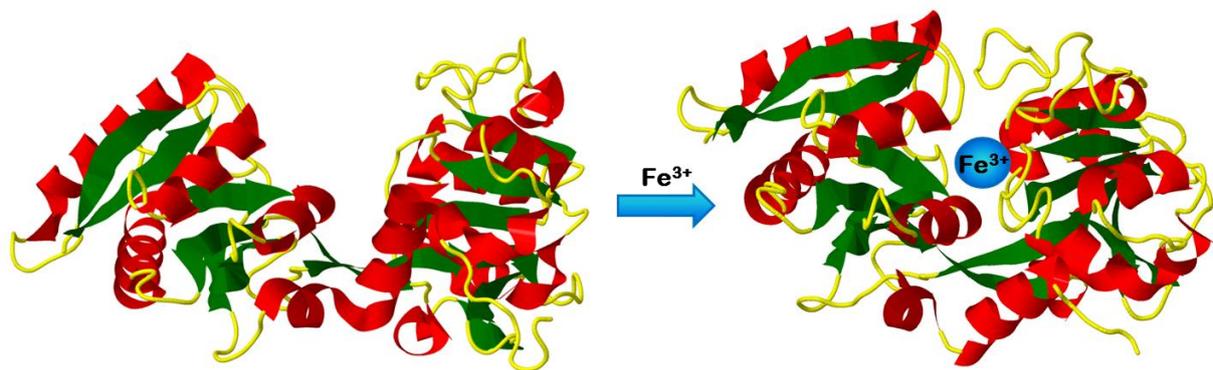


Abbildung 2.3 N-Lobe des Transferrins in offener (unkompleziert, links) und geschlossener (kompleziert, rechts) Konformation (PDB: 1BP5 (links), 1A8E (rechts)).^{34, 47}

2.1.2.2. Endocytose von holo-Transferrin

Die Aufnahme des holo-Transferrins in die Zelle mit Hilfe des Transferrinrezeptors wird als Endocytose bezeichnet. Bei dem Rezeptor handelt es sich um ein Disulfidverbrücktes Dimer, das aus zwei identischen Monomeren (je 95 kDa) zusammengesetzt ist.⁴⁸ Jedes Rezeptormonomer kann ein Transferrinmolekül binden. Dabei ist die Assoziationskonstante von holo-Transferrin 30-fach größer als die von eisenfreiem Transferrin.⁴⁹ Zuerst bindet das mit Fe(III) beladene Transferrin an den Rezeptor auf der Zelloberfläche. Daraufhin stülpt sich ein Teil der Membran über den Komplex aus Rezeptor und holo-Transferrin und schnürt ihn als Vesikel, auch Endosom genannt, ins Innere der Zelle ab. Unter ATP-Verbrauch werden Protonen ins Innere des Endosoms geleitet, wo sie den pH-Wert von 7,4 auf 5,5 senken.⁵⁰⁻⁵² Aufgrund dieser pH-Wert-Änderung öffnen sich die beiden Lobes des Transferrins und Fe(III) wird freigesetzt. Dieses kann nun das Endosom verlassen und wird den Mitochondrien zur Häm-Synthese zugeführt oder durch das Eisen-Speicherprotein

Ferritin gebunden. Das apo-Transferrin hat bei diesem pH-Wert eine deutlich höhere Affinität zum Rezeptor als holo-Transferrin und verbleibt an diesen gebunden im Vesikelinneren. Die Vesikel werden zur Zellmembran zurücktransportiert und das apo-Transferrin bei dem extrazellulären pH-Wert von 7,4 aufgrund der geringen Affinität zum Rezeptor wieder ins Plasma abgegeben. Der Transfer des Fe(III) durch Transferrin in die Zelle dauert maximal 2 bis 3 Minuten.⁵³ Der gesamte Zyklus ist in Abbildung 2.4 dargestellt.

Die Abgabe des Eisens in der Zelle ist stark pH-Wert-abhängig. Eine mögliche Ursache hierfür ist als sogenannter „Dilysin-Trigger“ bekannt.^{11, 28} Hierbei handelt es sich um die beiden Lysinreste Lys-206 und Lys-296, die zu den unterschiedlichen Domänen des Lobes (in diesem Falle des N-Lobes) gehören. Bei geschlossener Konformation kommen sie sich räumlich nahe, was im neutralen Milieu unproblematisch ist. Bei einem intrazellulären pH-Wert von 5,5 werden sie jedoch protoniert und stoßen sich daher ab, was zum Auseinanderklappen der beiden Domänen beitragen könnte.

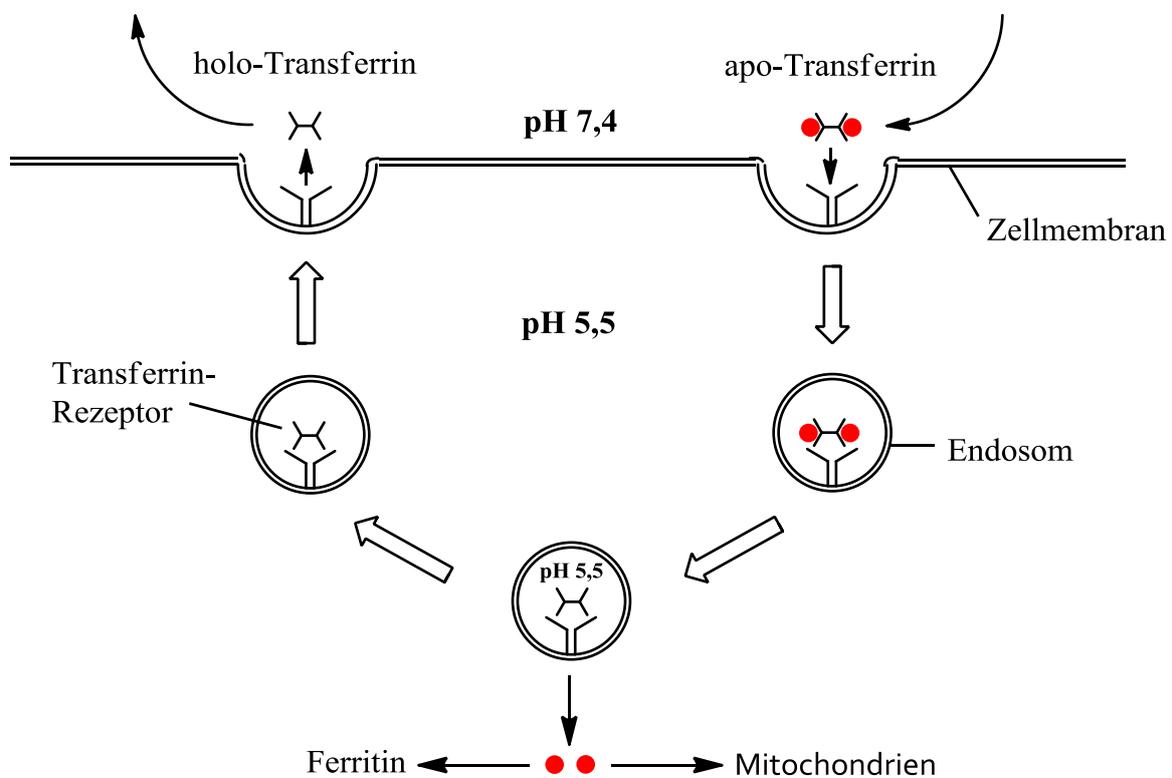


Abbildung 2.4 Endocytose des Fe(III)-Transferrin-Komplexes.⁵⁴

Eine weitere mögliche Ursache für diese pH-Abhängigkeit besteht in einer Protonierung des synergistischen Anions Carbonat bei Erniedrigung des pH-Wertes.¹¹ Dies führt zu einer Reduzierung der negativen Ladung des Anions, was wiederum in einer Bewegung des Hydrogencarbonats weg vom aktiven Zentrum resultieren könnte. Dies würde ebenfalls ein Auseinanderklappen der beiden Domänen begünstigen.

2.1.3. Metallionen-Transferrin-Komplexe

Die Aufgabe von Transferrin im menschlichen Körper ist der Fe(III)-Transport. Im Blutserum sind allerdings nur rund 30% der Bindungsstellen des Transferrins mit Fe(III) beladen, wobei die Verteilung der verschiedenen Spezies 27% Fe₂Tf, 23% Fe_NTf, 10% Fe_CTf und 40% apoTf beträgt.^{11, 55, 56} Daher besteht eine hohe Kapazität für die Bindung anderer Metallionen. Tatsächlich sind Transferrinkomplexe mit mehr als 30 verschiedenen Metallionen sowie unterschiedlichen synergistischen Anionen bekannt. Hierzu zählen Hauptgruppenmetallionen wie Bi(III)⁵⁷, Ga(III)⁵⁸ und Al(III)⁵⁹, Übergangsmetallionen wie Mn(II)⁶⁰, Cu(II)⁶¹ und Ni(II)⁶² sowie Lanthanidionen wie Nd(III)⁶³, Sm(III)⁶³ und Gd(III)^{64, 65}. Darüber hinaus wurden die Transferrinkomplexe der Radionuklide ⁶⁷Ga(III) und ¹¹¹In(III) bezüglich einer radiodiagnostischen Verwendung untersucht.^{58, 66-68} Ähnliche Studien beschäftigen sich mit einer potentiellen Antitumorwirkung der Transferrinkomplexe der therapeutisch wirksamen Metallionen Ru(III), Ti(IV) und Pt(II).⁶⁹⁻⁷³ Auch für toxische Metallionen wie Al(III), dessen Neurotoxizität vermutlich im Zusammenhang mit der Alzheimer'schen Krankheit steht, ist eine Komplexbildung mit Transferrin interessant, da auf diese Weise die bioanorganischen Eigenschaften entscheidend beeinflusst werden können.^{74, 75}

Die Metallion-Transferrin-Bindung wird durch verschiedene Faktoren wie den pH-Wert, die Salzkonzentration sowie das synergistische Anion beeinflusst. Zudem unterscheiden sich die beiden Koordinationsstellen im N- und C-Lobe des Transferrins bezüglich ihres Bindungsvermögens für Metallionen. Sie besitzen zwar gleiche Donorfunktionen (2 Tyr, 1 Asp, 1 His), weisen jedoch über die erste Koordinationssphäre hinausgehend eine unterschiedliche chemische Umgebung auf. *Aisen et al.* konnten beispielsweise zeigen, dass das aktive Zentrum im C-Lobe Fe(III) bei einem pH-Wert von 7,4 rund 20-fach stärker bindet als das des N-Lobes

($c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 0,23 \text{ mM}$).⁷⁶ *In vivo* spiegelt das unterschiedliche Verhalten der beiden Lobes bei der Freisetzung des Fe(III) diese Unterschiede wider. Die Abgabe von Fe(III) aus dem N-Lobe erfolgt bereits bei einer Erniedrigung des pH-Wertes auf 5,7, während Fe(III) bis zu einem pH-Wert von 4,8 an der C-terminalen Bindungsstelle gebunden bleibt.⁷⁷⁻⁷⁹ Auch für andere Metallionen konnte eine Präferenz der C-terminalen Bindungsstelle beobachtet werden. Daher sind in Tabelle 2.2 jeweils zwei Stabilitätskonstanten für die Komplexierung der Metallionen sowohl an der C- als auch der N-terminalen Bindungsstelle des Transferrins angegeben.

Actiniden haben keine essentielle Funktion in der Biochemie des menschlichen Körpers. Im Falle einer Inkorporation kann neben Hydrolysereaktionen auch eine Komplexierung durch Biomoleküle oder anorganische Liganden wie beispielsweise Carbonat erfolgen. Eine Möglichkeit für den Transport von Actiniden im Körper ist die Komplexbildung mit Transferrin. Tatsächlich ist von vielen Actinidionen wie Pu(IV), Th(IV), Pa(IV), U(VI), Np(IV), Am(III), Cm(III) und Cf(III) bekannt, dass sie die Koordinationsstellen von Fe(III) im Transferrin besetzen können.⁸⁰ Während Pu(IV), Th(IV) und Np(IV) nahezu quantitativ (> 90%) an Transferrin binden, liegt U(VI) nur zu maximal 50% als Transferrin-Komplex vor.^{7, 9, 81} Es bindet außerdem noch an Hämoglobin sowie rote Blutkörperchen, die besonders reich an Carbonat/Bicarbonat sind. Die Bindung von Am(III) und Np(V) an Transferrin ist verhältnismäßig schwach, nur rund 30% liegen als Transferrinkomplex vor.^{7, 9, 81} Der Hauptteil dieser Actinidionen wird entweder durch andere Proteine wie Albumin oder anorganische Liganden wie Carbonat komplexiert.

Die meisten Arbeiten zur Komplexierung von Actiniden mit Transferrin wurden mit Methoden wie UV/Vis- oder EXAFS-Spektroskopie durchgeführt und sind rein qualitativer Natur. Nur wenige Komplexierungskonstanten wurden experimentell bestimmt (Tabelle 2.2). Insbesondere für die dreiwertigen Actiniden ist nur sehr wenig über die Komplexierung mit Transferrin bekannt. Für einige Actinidionen, darunter auch Am(III) und Cm(III), wurden die Komplexierungskonstanten mit Transferrin anhand der ersten Hydrolysekonstante der jeweiligen Metallionen berechnet.⁷ Allerdings weichen diese Werte, beispielsweise für U(VI), Pu(IV) oder Cm(III), um ein bis zwei Größenordnungen von den experimentell ermittelten Stabilitätskonstanten ab, weshalb sie nur für eine Abschätzung der Stabilitäten der entsprechenden Transferrinkomplexe verwendet werden können.

Tabelle 2.2 Übersicht über die Komplexierungskonstanten verschiedener Lanthaniden- und Actiniden-Transferrin-Komplexe.

Metallion	logK _C	logK _N	pH-Wert	Referenz
Fe(III)	21,4	20,3	7,4	76
Nd(III)	6,1	5,4	7,4	63
Sm(III)	7,1	5,4	7,4	63
Gd(III)	6,8	-	7,4	64
Yb(III)	18,5	4,2	7,4	82
Th(IV)	19,4*	18,2*	-	7
U(IV)	23,1*	21,9*	-	7
U(VI)	16	-	7,4	83
	14,1*	12,6*	-	7
Np(IV)	23,4*	22,3*	-	7
Np(VI)	2,5*	0,6*	-	7
Pu(IV)	21,3	-	-	84
	23,2*	21,3*	-	7
Am(III)	10,1*	8,5*	-	7
Cm(III)	8,8	7,0	8,6	85
	10,3*	8,7*	-	7

* Anhand der ersten Hydrolysekonstante theoretisch bestimmte logK-Werte mit Carbonat als synergistischem Anion.

Experimentell wurden Stabilitätskonstanten für die Komplexierung von Actinidionen mit Transferrin lediglich für U(VI), Pu(IV) und Cm(III) bestimmt. Während die logK-Werte für U(VI) und Cm(III) um mehrere Größenordnungen kleiner sind als der entsprechende Wert für Fe(III), sind die Stabilitätskonstanten für Pu(IV) und Fe(III) annähernd gleich.⁸⁴ Pu(IV) kann prinzipiell sowohl an der C- als auch an der N-terminalen Bindungsstelle des Transferrins komplexieren, allerdings tritt nur beim C-Lobe eine Strukturänderung in die geschlossene Konformation ein,

während der N-Lobe in der offenen Konformation bleibt.⁸⁶ Aus diesem Grund kann nur die $\text{Pu}_2\text{Cf}_2\text{Tf}$ -Spezies, bei der beide Lobes geschlossen sind, fest an den Transferrin-Rezeptor binden und mittels Endocytose in die Zelle eingeschleust werden. Die Affinität des Rezeptors zu den $\text{Fe}_2\text{Pu}_2\text{Tf}$ - und Pu_2Tf -Spezies hingegen ist deutlich geringer.⁸⁶ Dies zeigt, dass eine hohe Stabilitätskonstante nicht unbedingt bedeutet, dass der entsprechende Transferrinkomplex auch tatsächlich in die Zelle eingeschleust werden kann. Stattdessen muss die Komplexbildung der Metallionen sowohl an der C- als auch der N-terminalen Bindungsstelle unter besonderer Berücksichtigung der Struktur (offene/geschlossene Konformation) untersucht werden.

Eine erste Studie zur Komplexbildung von Cm(III) mit Transferrin von *Sturzbecher-Hoehne et al.* zeigt, dass Cm(III) bei pH 8,6 sowohl an der N- als auch der C-terminalen Bindungsstelle des Transferrins komplexiert.⁸⁵ Mittels Fluoreszenzspektroskopie wurden die Emissionsspektren von Cm_2Tf und $\text{Cm}_\text{C}\text{Tf}$ bei pH 8,6 gemessen. Zudem wurden die Komplexbildungskonstanten $\log K_\text{C} = 8,8 \pm 0,3$ und $\log K_\text{N} = 7,0 \pm 0,1$ (pH 8,6) anhand direkter Titrations von apo-Transferrin und Fe_2Tf mit CmCl_3 sowie durch Titration von Cm_2Tf mit dem Konkurrenzliganden NTA experimentell bestimmt.⁸⁵ Dies zeigt, dass die beiden Bindungsstellen des Transferrins nicht äquivalent bezüglich der Bindung von Cm(III) sind. Stattdessen wird Cm(III) (genau wie Fe(III)) bevorzugt an der C-terminalen Bindungsstelle komplexiert.

2.2. Lanthaniden und Actiniden

Unter dem Begriff Lanthaniden werden die 14 auf das Lanthan folgenden Elemente mit Ordnungszahlen von 58 (Cer) bis 71 (Lutetium) zusammengefasst. Als Actiniden werden die Elemente Thorium bis Lawrencium (Ordnungszahl 90 bis 103) bezeichnet, die im Periodensystem auf das Actinium (Ordnungszahl 89) folgen. Da die Lanthaniden und Actiniden im Grundzustand eine teilweise oder vollständig gefüllte 4f- bzw. 5f-Schale aufweisen, werden sie zum sogenannten f-Block zusammengefasst. Die Lanthaniden gehören neben Scandium, Yttrium und Lanthan zu den seltenen Erden. Allerdings ist diese Bezeichnung irreführend, da mit Ausnahme des instabilen Promethiums alle Lanthaniden in verhältnismäßig großen Mengen natürlich vorkommen. Beispielsweise entspricht die Konzentration von Cer in der Erdkruste ungefähr der von Nickel und Kupfer und sogar Thulium und

Lutetium sind häufiger als Bismut, Silber oder Platin.⁸⁷ Von den Actiniden kommen nur Uran und Thorium in Form von Pechblende und Monazit in signifikanten Mengen in der Natur vor.² Außerdem kommen natürlich noch sehr kleine Mengen Actinium und Protactinium vor, die Zerfallsprodukte von ^{235}U und ^{238}U sind.⁸⁷ Alle anderen Elementen, die in der Reihe der Actiniden auf Uran folgen, sind im Wesentlichen durch Kernreaktionen künstlich hergestellte Elemente.

2.2.1. Elektronenkonfiguration und Oxidationsstufen

Die Lanthaniden liegen fast ausschließlich in der Oxidationsstufe +3 vor. Ausnahmen wie bei Ce(IV) und Eu(II) treten nur dann auf, wenn hierdurch eine leere, halb- oder vollbesetzte 4f-Schale erreicht wird (f^0 -Konfiguration bei Ce(IV) und f^7 -Konfiguration bei Eu(II)).^{87, 88} Im Gegensatz hierzu können vor allem die leichten Actiniden in verschiedenen Oxidationsstufen auftreten, während bei den schwereren Actiniden ab Curium die dreiwertige Form dominiert. Die einzige Ausnahme ist hierbei No(II), wobei die stabile Oxidationsstufe +2 wiederum auf die Stabilität der vollbesetzten 5f-Schale zurückgeführt werden kann. Tabelle 2.3 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen Oxidationsstufen der Lanthaniden (oben) und Actiniden (unten). Die stabilsten Oxidationszustände sind in rot hervorgehoben, Werte in Klammern symbolisieren Oxidationsstufen, die nur im Festkörper oder Komplex auftreten.^{1, 88, 89}

Die Unterschiede in den Oxidationszuständen der Lanthaniden und Actiniden können durch die unterschiedliche räumliche Ausdehnung der 4f- und 5f-Orbitale erklärt werden. Diese ist in Abbildung 2.5 anhand der Radialverteilungen der Elektronen von Nd(III) (links) und U(III) (rechts) gezeigt. Bei den Actiniden sind die 5f-Elektronen weniger stark durch die s- und p-Elektronen der nächsthöheren Schale abgeschirmt als bei den Lanthaniden.^{87, 90} Daher sind die 5f-Orbitale insbesondere bei den leichteren Actiniden stärker ausgedehnt und die entsprechenden 5f-Elektronen können bei einer Ionisierung mit verhältnismäßig geringem Energieaufwand aus dem Atom entfernt werden. Aus diesem Grund treten vor allem die leichten Actiniden in bis zu sechs verschiedenen Oxidationsstufen auf. Mit zunehmender Kernladungszahl nimmt die räumliche Ausdehnung der 5f-Orbitale stetig ab. Bei den schwereren Actiniden ab Curium werden hohe Oxidationsstufen nicht mehr beobachtet, es dominiert wie bei den Lanthaniden die dreiwertige Oxidationsstufe.

2. Kenntnisstand

Tabelle 2.3 Oxidationsstufen der Lanthaniden (oben) und Actiniden (unten); die stabilste Oxidationsstufe ist in rot hervorgehoben; die Werte in Klammern symbolisieren Oxidationsstufen, die nur im Festkörper bzw. Komplex oder als MX_2 in Erdalkalihalogeniden auftreten.^{1, 88, 89}

	4	(4)	(4)					(4)	(4)						
	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	(2)	(2)	(2)	(2)	(2)	2		(2)	(2)	(2)	(2)	(2)	(2)	(2)	
La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu	
				(7)	(7)										
			6	6	6	6									
		5	5	5	5	5									
	4	4	4	4	4	4	(4)	4	(4)						
	3	(3)	(3)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
			(2)					(2)	(2)	(2)	2	2			
Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr	

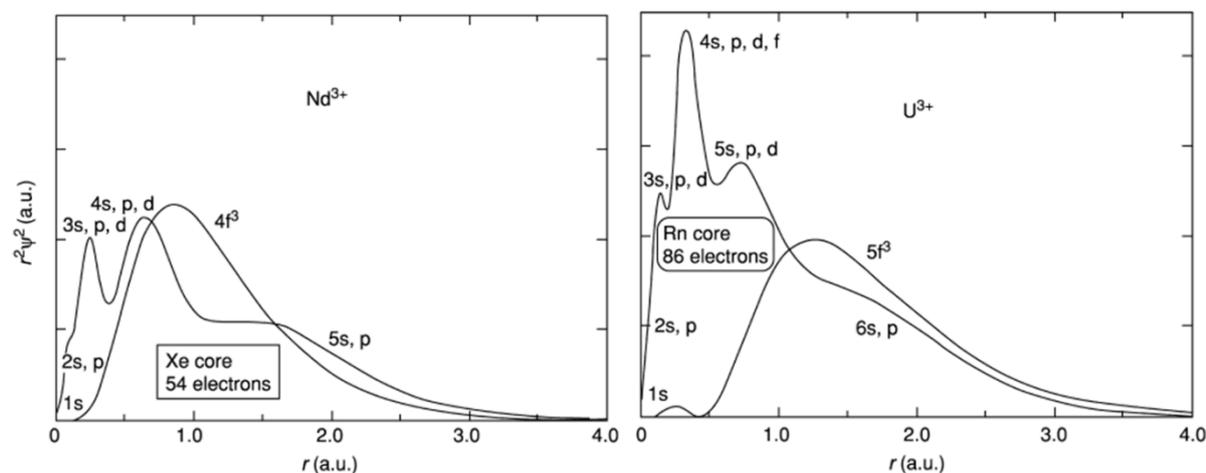


Abbildung 2.5 Vergleich der Radialverteilungen der Elektronen eines 4f- (Nd^{3+} , links) und 5f-Elements (U^{3+} , rechts).⁹⁰

Aufgrund der unterschiedlichen räumlichen Ausdehnung der 4f- und 5f-Orbitale unterscheiden sich die Lanthaniden und Actiniden auch in ihren Wechselwirkungen mit dem Umfeld. Da die 4f-Orbitale aufgrund der Kernnähe durch die 5s- und 5p-Orbitale abgeschirmt werden,⁸⁷ sind sie nicht an der Ausbildung von Bindungen beteiligt und werden auch kaum durch Ligandenfelder beeinflusst. Im Gegensatz hierzu ist die Abschirmung der 5f-Orbitale durch die 6s- und 6p-Orbitale aufgrund der größeren räumlichen Ausdehnung deutlich geringer. Dies führt dazu, dass die 5f-Orbitale insbesondere bei den leichteren Actiniden an der Ausbildung von chemischen Bindungen beteiligt sind.

Die Kontraktion der 4f- und 5f-Orbitale bei zunehmender Kernladungszahl hat auch einen Einfluss auf die Elektronenkonfigurationen der Lanthaniden und Actiniden. Bei Lanthan liegen die 5d-Orbitale energetisch deutlich unter den 4f-Orbitalen, es hat die Elektronenkonfiguration $[\text{Xe}]5d^16s^2$ (Tabelle 2.4). Bei zunehmender Protonenzahl im Kern wird die Energie der 4f-Orbitale abgesenkt, weshalb ab Cer bevorzugt die 4f-Orbitale besetzt werden.⁸⁷ Ausnahmen hierbei sind Gadolinium und Lutetium, bei denen durch die abweichende Elektronenkonfiguration eine halb- bzw. vollbesetzte Schale erreicht wird. Der Energieunterschied zwischen den 5f- und 6d-Orbitalen der Actiniden ist deutlich geringer, als dies bei den 4f- und 5d-Orbitalen der Lanthaniden der Fall ist.⁹¹ Bei Thorium bis Neptunium liegen die 6d-Orbitale energetisch niedriger als die 5f-Orbitale, weshalb die $5f^{n-1}6d7s^2$ - gegenüber der $5f^n7s^2$ -Konfiguration bevorzugt wird (Tabelle 2.4).² Mit zunehmender Kernladungszahl nimmt die Lokalisation der 5f-Orbitale zu und damit auch die Energie im Vergleich zu den 6d-Orbitalen ab.⁹¹ Dies führt zu einer Bevorzugung der $5f^n7s^2$ -Konfiguration.

Tabelle 2.4 Elektronenkonfiguration der Lanthaniden und Actiniden.^{2, 89}

Lanthaniden		Actiniden	
La	[Xe] 5d ¹ 6s ²	Ac	[Rn] 6d ¹ 7s ²
Ce	[Xe] 4f ¹ 5d ¹ 6s ²	Th	[Rn] 6d ² 7s ²
Pr	[Xe] 4f ³ 6s ²	Pa	[Rn] 5f ² 6d ¹ 7s ²
Nd	[Xe] 4f ⁴ 6s ²	U	[Rn] 5f ³ 6d ¹ 7s ²
Pm	[Xe] 4f ⁵ 6s ²	Np	[Rn] 5f ⁴ 6d ¹ 7s ²
Sm	[Xe] 4f ⁶ 6s ²	Pu	[Rn] 5f ⁶ 7s ²
Eu	[Xe] 4f ⁷ 6s ²	Am	[Rn] 5f ⁷ 7s ²
Gd	[Xe] 4f ⁷ 5d ¹ 6s ²	Cm	[Rn] 5f ⁷ 6d ¹ 7s ²
Tb	[Xe] 4f ⁹ 6s ²	Bk	[Rn] 5f ⁹ 7s ²
Dy	[Xe] 4f ¹⁰ 6s ²	Cf	[Rn] 5f ¹⁰ 7s ²
Ho	[Xe] 4f ¹¹ 6s ²	Es	[Rn] 5f ¹¹ 7s ²
Er	[Xe] 4f ¹² 6s ²	Fm	[Rn] 5f ¹² 7s ²
Tm	[Xe] 4f ¹³ 6s ²	Md	[Rn] 5f ¹³ 7s ²
Yb	[Xe] 4f ¹⁴ 6s ²	No	[Rn] 5f ¹⁴ 7s ²
Lu	[Xe] 4f ¹⁴ 5d ¹ 6s ²	Lr	[Rn] 5f ¹⁴ 6d ¹ 7s ²

2.2.2. Koordinationschemie der dreiwertigen Lanthanid- und Actinidionen

In sauren wässrigen Lösungen liegen die dreiwertigen Lanthanid- und Actinidionen als Aquoionen vor. Die Koordinationszahl wird hierbei von der Lanthaniden- bzw. Actinidenkontraktion, d.h. der Abnahme der Ionenradien bei zunehmender Kernladungszahl, bestimmt.^{2, 92} Bei den leichten Lanthaniden und Actiniden bis Neodym bzw. Americium dominiert die Koordinationszahl neun, während die

schweren Lanthaniden und Actiniden ab Dysprosium bzw. Einsteinium bevorzugt in der Koordinationszahl acht vorliegen. Bei den mittleren Lanthaniden und Actiniden liegen Aquoionen mit beiden Koordinationszahlen im Gleichgewicht vor.^{2, 93}

Viele organische und anorganische Liganden können ein oder mehrere Wassermoleküle aus der ersten Koordinationssphäre der Ln(III)- und An(III)-Ionen verdrängen. Bei der Beurteilung der Bindungsstärke ist die Einteilung der Metallionen sowie der komplexierenden Liganden nach dem HSAB-Prinzip (engl. *Hard and Soft Acids and Bases*) von R. G. Pearson von besonderem Interesse.^{94, 95} Die dreiwertigen Lanthanid- und Actinidionen sind kleine, hochgeladene und schwer polarisierbare Ionen und werden entsprechend dem HSAB-Prinzip als harte Säuren bezeichnet. Sie gehen bevorzugt Verbindungen mit ebenfalls harten Basen ein. Hierzu zählen vor allem Fluorid oder Liganden mit O-Donoratomen wie zum Beispiel Carbonat oder Hydroxid, wobei die Bindung vorwiegend ionischer Natur ist.⁹⁶ Bei einigen Verbindungen konnten jedoch auch kovalente Bindungsanteile nachgewiesen werden.⁹⁷

Ab einer Oxidationsstufe von +V liegen die Actiniden als lineare Actinylionen mit zwei axialen Oxoliganden vor.⁹⁸ In An(V)- und An(VI)-Komplexen koordinieren die Liganden daher in der äquatorialen Ebene senkrecht zur Achse der Sauerstoffatome. Durch die hohe Elektronegativität der Oxoliganden wird die effektive Ladung am Metallzentrum im Vergleich zu der nominalen Ladung der Actinylionen von +1 bzw. +2 auf 2,3 bzw. 3,3 erhöht.⁹⁸ Da die Bindung zwischen Metallion und Liganden vorwiegend ionischer Natur ist⁹⁷, besteht ein Zusammenhang zwischen der effektiven Ladung am Metallion und der Komplexierungsstärke. Für homologe Komplexe von Actinidionen in verschiedenen Oxidationsstufen nimmt die Stabilität in folgender Reihenfolge zu:

	AnO ₂ ⁺	<	An ³⁺	<	AnO ₂ ²⁺	<	An ⁴⁺
Oxidationsstufe	+V		+III		+VI		+IV
Effektive Ladung	+2,3		+3,0		+3,3		+4,0

2.2.3. Lumineszenzspektroskopie von Lanthanid- und Actinidionen

Alle trivalenten Lanthaniden mit Ausnahme von La(III) und Lu(III) besitzen Lumineszenzeigenschaften. Aufgrund des großen Energieunterschieds zwischen dem Grundzustand und den emittierenden Niveaus weisen vor allem Eu(III), Gd(III) und Tb(III) hohe Quantenausbeuten für den Fluoreszenzprozess auf, weshalb sie für spektroskopische Anwendungen von besonderem Interesse sind. Die Wellenlänge der Fluoreszenzemission variiert bei den Lanthaniden vom UV-Bereich (Gd(III)) über den sichtbaren Bereich (Pr(III), Sm(III), Eu(III), Tb(III), Dy(III), Tm(III)) bis hin zum Nah-Infrarotbereich (Nd(III), Ho(III), Er(III), Yb(III)) des elektromagnetischen Spektrums.⁹⁹

Bei den Lanthaniden werden die spektroskopischen Eigenschaften durch Übergänge innerhalb der teilweise besetzten 4f-Schale bestimmt. Da es sich um Übergänge zwischen Orbitalen gleicher Parität handelt, unterliegen sie dem Laporte-Verbot, weshalb sie geringe Übergangswahrscheinlichkeiten besitzen. Dies hat zur Folge, dass die entsprechenden Banden von geringer Intensität sind und die angeregten Zustände verhältnismäßig hohe Lebensdauern besitzen, die im Bereich von 0,1 bis 1,0 ms liegen.^{90, 99, 100} Die Intensität der 4f-Übergänge ist sowohl bezüglich Absorption als auch Emission gering, weshalb die molaren Absorptionskoeffizienten in der Regel im Bereich von 1 - 10 M⁻¹cm⁻¹ liegen.¹⁰⁰ Das Laporte-Verbot kann durch Beimischung von Zuständen anderer Parität abgeschwächt werden. Hierzu zählen permanente Effekte wie eine Änderung der Symmetrie des Ligandenfelds sowie asymmetrische Molekülschwingungen, die kurzzeitig die Symmetrie herabsetzen (vibronische Kopplung).⁸⁷ Aufgrund der Abschwächung des Paritätsverbots können 4f-Übergänge trotz geringer Intensität beobachtet werden. Charakteristisch für die Emissionsbanden der Lanthanidionen ist eine geringe Halbwertsbreite. Dies kann auf die Abschirmung der 4f-Orbitale durch die 5s²5p⁶-Unterschalen zurückgeführt werden.¹⁰⁰ Die 4f-Orbitale sind daher kaum an der Ausbildung von Bindungen beteiligt, weshalb die Anregung eines 4f-Elektrons in ein energetisch höheres Niveau nicht zu einer signifikanten Zunahme der Bindungsabstände führt. Daher sind die Stokes-Verschiebungen klein und die Emissionsbanden sehr schmal.¹⁰¹

Im Gegensatz zu den Lanthaniden zeigen nur einzelne Actiniden in bestimmten Oxidationsstufen Fluoreszenzerscheinungen. Hierzu zählen U(VI)¹⁰², Am(III)¹⁰³, Cm(III)¹⁰⁴, Cm(IV)¹⁰⁵, Pa(IV)^{106, 107}, Bk(III)¹⁰⁸ und Cf(III)¹⁰⁹. Prinzipiell sind die Fluoreszenzprozesse der Actiniden, bei denen die spektroskopischen Eigenschaften durch Übergänge in der teilweise gefüllten 5f-Schale bestimmt werden, mit denen der homologen Lanthaniden vergleichbar. Allerdings ist die Spin-Bahn-Wechselwirkung vor allem bei den schweren Actiniden deutlich stärker ausgeprägt als bei den Lanthaniden.⁹⁰ Des Weiteren werden die 5f-Orbitale bei den Actiniden weniger stark durch die s- und p-Orbitale der nächsthöheren Schale abgeschirmt als dies bei den 4f-Orbitalen der Lanthaniden der Fall ist.⁹⁰ Sie sind räumlich ausgedehnter und wechselwirken daher stärker mit dem Ligandenfeld (vergleiche Kapitel 2.2.2 und Abbildung 2.5). Bei einer Veränderung in der ersten Koordinationssphäre wird daher aufgrund des stärkeren Ligandenfeldeffekts auch die Lage der Energieniveaus beeinflusst, weshalb es zu einer deutlichen Rotverschiebung der Banden in den Emissionsspektren kommt.

Unter dem Begriff *Fluoreszenz* versteht man die spontane Emission von Photonen, wobei der Gesamtspin erhalten bleibt. Da sich die beteiligten Energieniveaus bei den hier beschriebenen Lumineszenzprozessen der Lanthanid- und Actinidionen im Spin unterscheiden und die Lebensdauern der angeregten Zustände zudem im Bereich von Mikro- bis Millisekunden liegen^{90, 93}, handelt es sich bei diesem Prozess strenggenommen nicht um eine Fluoreszenzemission. Trotzdem wird die Lumineszenz der 4f- und 5f-Elementionen in der Literatur meist als Fluoreszenz bezeichnet. Diese Konvention wird auch in der vorliegenden Arbeit weitergeführt.

2.2.3.1. Fluoreszenzeigenschaften von Eu(III)

Im Grundzustand besitzt Eu(III) die Elektronenkonfiguration [Xe]4f⁶. Bei den Lanthaniden wird in der Regel die Russel-Saunders-Kopplung angewendet, um die Wechselwirkung des Bahndrehimpulses mit dem Eigendrehimpuls (Spin) der Elektronen zu beschreiben. Hierbei koppeln die Elektronenspins \vec{s}_i zum Gesamtelektronenspin \vec{S} und die Bahndrehimpulse \vec{l}_i zum Gesamtbahndrehimpuls \vec{L} . Dies führt zur Aufspaltung der 4f⁶-Konfiguration in $(2S + 1)(2L + 1)$ entartete Zustände (Abbildung 2.6, links). Berücksichtigt man außerdem die Spin-Bahn-Kopplung zum

2. Kenntnisstand

Gesamtdrehimpuls \vec{J} ($\vec{J} = \vec{S} + \vec{L}$), spaltet jeder dieser Zustände in $2J + 1$ Mikrozustände auf. Unter Anwendung der Hund'schen Regeln ergibt sich für den Grundzustand von Eu(III) ein 7F_0 -Term. Die Anregung des Eu(III)-Ions erfolgt in der Regel bei $\lambda = 394 \text{ nm}$ in das 5L_6 -Niveau (Abbildung 2.6, rechts), da dieser Zustand den größten Extinktionskoeffizienten im UV-Bereich aufweist.¹¹⁰ Durch anschließende strahlungslose Relaxation werden die 5D_J -Niveaus besetzt. Bei Raumtemperatur ist hauptsächlich das 5D_0 -Niveau populiert. Allerdings können auch sogenannte heiße Banden auftreten, wenn energetisch höherliegende 5D_J -Niveaus entsprechend der Boltzmann-Verteilung besetzt werden und die Fluoreszenzemission aus einem dieser Niveaus erfolgt. Heiße Banden weisen jedoch in Lösung meist nur geringe Intensitäten auf und sind deshalb oft nur schwach oder überhaupt nicht sichtbar. Die Fluoreszenz erfolgt aus dem 5D_0 -Zustand in die Niveaus des 7F_J -Grundzustands. Da die 7F_5 - und 7F_6 -Emissionsbanden sehr geringe Intensitäten aufweisen, werden in der Praxis bei der Eu(III)-Emissionsspektroskopie ausschließlich die ${}^7F_{0-4}$ -Banden beobachtet. Die Energieniveaus können je nach Symmetrie des Ligandenfelds in bis zu $(2J + 1)$ Sub-Energieniveaus aufgespalten sein (Stark-Aufspaltung).¹¹¹ Je geringer hierbei die Symmetrie in der ersten Koordinationssphäre des Eu(III)-Ions ist, umso größer ist die Aufspaltung. Allerdings liegen die Sub-Energieniveaus energetisch sehr nahe beieinander ($\Delta E < 10^2 \text{ cm}^{-1}$), weshalb die Aufspaltung bei Messungen in Lösung bei Raumtemperatur oft nicht aufgelöst werden kann.⁸⁷

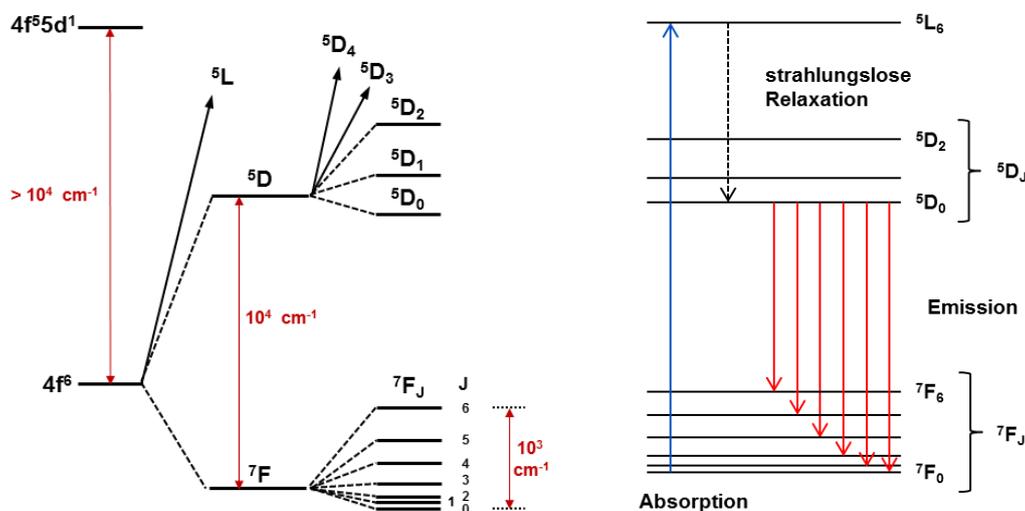


Abbildung 2.6 Energieniveauschema (links)¹¹² und Darstellung des Fluoreszenzprozesses (rechts) von Eu(III).

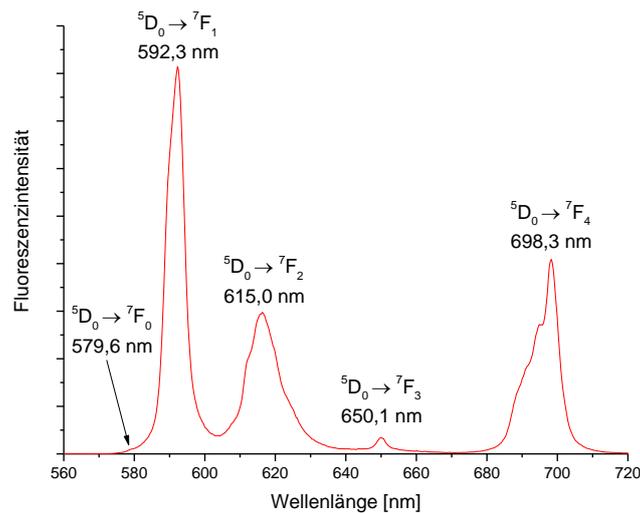


Abbildung 2.7 Emissionsspektrum von Eu(III) in 0,01 M HClO₄, c(Eu) = 2·10⁻⁵ M.

Abbildung 2.7 zeigt ein typisches Emissionsspektrum von Eu(III) in 0,01 M HClO₄ mit den ⁷F₀₋₄-Emissionsbanden. Aufgrund der starken Abschirmung der 4f-Elektronen durch die s- und p-Elektronen der nächsthöheren Schale wechselwirken diese nur sehr schwach mit dem Ligandenfeld. Dieser schwache Ligandenfeldeffekt zeigt sich darin, dass sich die Lage der Emissionsbanden bei Änderungen in der ersten Koordinationssphäre von Eu(III) kaum verändert. Stattdessen sind die Fluoreszenzintensität sowie die Form der verschiedenen Emissionsbanden für die Identifizierung und Charakterisierung unterschiedlicher Eu(III)-Komplexspezies von besonderem Interesse.

In Tabelle 2.5 sind der jeweilige Wellenlängenbereich sowie einige charakteristische Eigenschaften der ⁵D₀→⁷F_J-Übergänge (J = 0 - 4) von Eu(III) in Lösung zusammengefasst. Der elektrische Dipolübergang ⁵D₀→⁷F₀ ist besonders interessant, da sowohl der Grund- als auch der angeregte Zustand mit J = 0 keine weitere Aufspaltung in Sub-Energieniveaus aufweisen.^{87, 100} Daher erhält man für jede Eu(III)-Spezies, die im System vorliegt, genau eine Emissionsbande.¹¹³ Somit kann bei hinreichender Auflösung und Intensität die Anzahl der Eu(III)-Spezies direkt aus der Anzahl der ⁵D₀→⁷F₀-Emissionsbanden bestimmt werden. Prinzipiell weisen elektrische Dipolübergänge wie auch der ⁵D₀→⁷F₀-Übergang nur geringe Intensitäten auf. Zusätzlich ist der Übergang in Systemen hoher Symmetrie mit einem Inversionszentrum symmetrieverboten und daher äußerst schwach.¹⁰⁰ Dieses Verbot kann bei einer Symmetrierniedrigung aufgeweicht werden, was zu einem Ansteigen der Emissionsintensität führt. Daher ist die Intensität der ⁵D₀→⁷F₀-Emissionsbande

2. Kenntnisstand

ein Indikator für die Komplexsymmetrie. Die Energie des ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ -Übergangs und somit die Lage der entsprechenden Emissionsbande wird durch zwei gegenläufige Effekte beeinflusst. Der nephelauxetische Effekt, der ein Maß für die Kovalenz der Bindung zwischen Eu(III) und Ligand ist, führt zu einer Energieerniedrigung.¹¹¹ Ursache hierfür ist, dass mit zunehmender Kovalenz der Bindung die Elektron-Elektron-Abstoßung, die verantwortlich für die Aufspaltung der $4f^6$ -Elektronen in die 7F - und 5D -Terme ist, verringert wird.^{111, 113-115} Dies führt zu einer Verkleinerung der Energiedifferenz zwischen den 5D_0 - und 7F_0 -Niveaus und einer Rotverschiebung der Emissionsbande. Eine Energieerhöhung des ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ -Übergangs und somit eine Blauverschiebung der Emissionsbande tritt auf, wenn die Stark-Aufspaltung des 7F_1 -Niveaus zunimmt und dabei die Energie des 7F_0 -Niveaus abgesenkt wird.¹¹¹ Allerdings wurde dieser Effekt bisher nur bei Eu(III) in einer Glasmatrix beobachtet¹¹⁶⁻¹¹⁸ und wird zudem meist von dem nephelauxetischen Effekt überlagert.

Tabelle 2.5 Wellenlängenbereich und charakteristische Eigenschaften der ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_J$ -Übergänge von Eu(III) in Lösung.^{87, 93}

J	Wellenlängenbereich [nm]	Intensität	Dipolübergang	Eigenschaften
0	577 - 581	vw	ED	Verbotener Übergang, fehlt bei hoher Punktsymmetrie
1	585 - 600	s	MD	Intensität weitestgehend unabhängig von der Koordinationsumgebung
2	610 - 625	s - vs	ED	Hypersensitiver Übergang, fehlt bei hoher Punktsymmetrie
3	640 - 655	vw	ED	Verbotener Übergang
4	680 - 710	m - s	ED	Sensitiv bezüglich der Koordinationsumgebung von Eu(III)

MD: magnetischer Dipolübergang, ED: elektrischer Dipolübergang
vw: sehr schwach, m: mittel, s: stark, vs: sehr stark

Im Gegensatz zu den anderen ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ -Übergängen handelt es sich beim ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ -Übergang um einen magnetischen Dipolübergang. Dieser unterliegt nicht dem Laporte-Verbot und ist daher verhältnismäßig intensiv.⁸⁷ Außerdem wird er nur geringfügig durch die chemische Umgebung von Eu(III) beeinflusst. Im Gegensatz hierzu handelt es sich bei dem ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ -Übergang um einen hypersensitiven Übergang, der sehr sensitiv auf Änderungen in der Koordinationsumgebung des Metallions reagiert.¹¹⁹ Während der Übergang bei Systemen mit hoher Symmetrie dem Laporte-Verbot unterliegt, wird dieses bei einer Symmetrierniedrigung abgeschwächt und die Emissionsintensität des Übergangs nimmt zu. Solche hypersensitiven Übergänge treten neben Eu(III) auch bei anderen Metallionen wie Sm(III), Nd(III), Dy(III) oder Tm(III) auf.¹⁰⁰ Da die Intensität der ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ -Bande nicht von der Koordinationsumgebung abhängt, kann sie als interner Intensitätsstandard verwendet werden. Das Verhältnis der Intensitäten der 7F_2 - zur 7F_1 -Bande $I({}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2)/I({}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1)$ ist somit ein Maß für die Komplexsymmetrie und liefert wichtige strukturelle Informationen. Für das hochsymmetrische $[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})_9]^{3+}$ -Ion (D_{3h} -Symmetrie) beträgt das Intensitätsverhältnis 0,5.¹²⁰ Beim Austausch von Wassermolekülen gegen andere Liganden wird die Symmetrie des Komplexes herabgesetzt. Die Intensität der ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ -Emissionsbande und somit auch das Intensitätsverhältnis $I({}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2)/I({}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1)$ nimmt hierbei deutlich zu.

2.2.3.2. Fluoreszenzeigenschaften von Cm(III)

Im Grundzustand weist Cm(III) eine $[\text{Rn}]5f^7$ -Konfiguration mit einer halbgefüllten 5f-Schale auf, woraus sich nach den Hundt'schen Regeln ein ${}^8S_{7/2}$ -Grundterm ergibt.¹²¹ Allerdings kann zur Bestimmung der Zustände bei den schwereren Actiniden aufgrund der stärkeren Spin-Bahn-Wechselwirkung im Gegensatz zu den Lanthaniden nicht mehr die Russel-Saunders-Kopplung verwendet werden.⁹⁰ Da die Coulomb- und die Spin-Bahn-Wechselwirkung bei den Actiniden in der gleichen Größenordnung liegt, wird stattdessen ein intermediäres Kopplungsschema angewendet. Hierbei werden die Zustände durch Linearkombinationen verschiedener Russel-Saunders-Zustände bestimmt.⁹⁰ Im Fall des Cm(III) weist der Grundzustand zu rund 78% ${}^8S_{7/2}$ -Charakter und 19% ${}^6P_{7/2}$ -Charakter auf und wird daher als der ${}^8S'_{7/2}$ -Zustand bezeichnet.¹²²

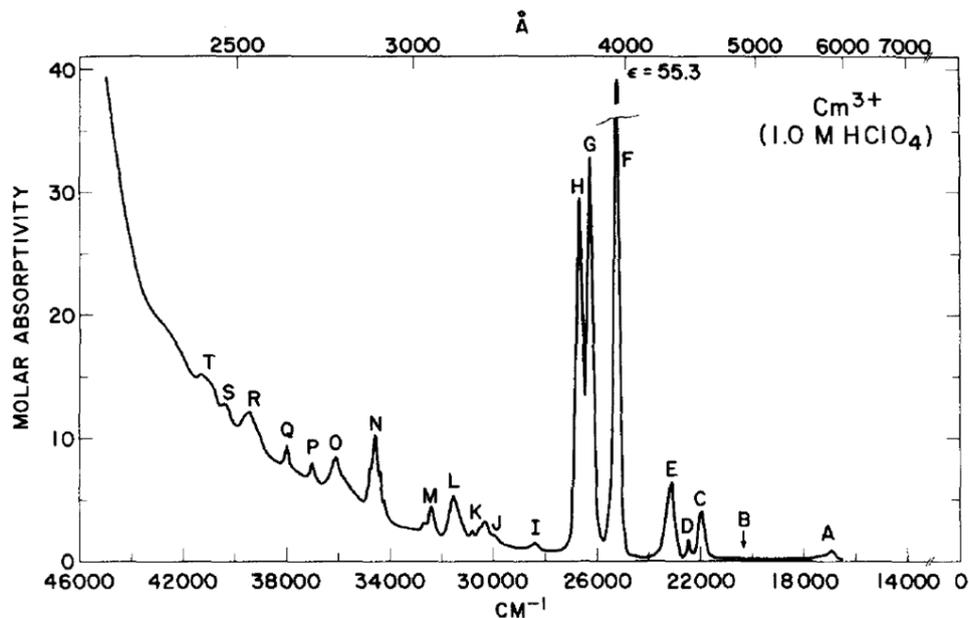


Abbildung 2.8 Absorptionsspektrum von Cm(III) in 1,0 M HClO₄.¹²³

Das Absorptionsspektrum von Cm(III) in 1,0 M HClO₄ ist in Abbildung 2.8 gezeigt.¹²³ Es zeigt eine Vielzahl scharfer 5f-5f-Übergänge, die mit steigender Energie in alphabetischer Reihenfolge gekennzeichnet werden. Die Anregung von Cm(III) bei fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen erfolgt in der Regel im Bereich der drei intensivsten Banden (bezeichnet mit F, G und H), da diese die höchsten Absorptionskoeffizienten aufweisen.¹²³

Abbildung 2.9 zeigt ein vereinfachtes Energieniveauschema von Cm(III), an dem der Fluoreszenzprozess verdeutlicht werden kann. Durch Absorption elektromagnetischer Strahlung im UV-Bereich gelangt das Cm(III)-Ion aus dem $^8S'_{7/2}$ -Grundzustand in einen der angeregten Zustände F, G oder H. Von dort erfolgt eine strahlungslose Relaxation in den ersten angeregten $^6D'_{7/2}$ -Zustand (bezeichnet als A-Zustand). Die Energiedifferenz dieses Zustandes zum Grundzustand beträgt $\Delta E = 16840 \text{ cm}^{-1}$ und ist so groß, dass die Fluoreszenzemission in Konkurrenz mit strahlungslosen Prozessen treten kann.¹²⁴ Die große Energiedifferenz kann auf die besonders hohe Stabilität des Cm(III)-Grundzustandes mit einer halbgefüllten 5f-Schale zurückgeführt werden, wie es auch beim homologen Gd(III) ($4f^7$) mit $\Delta E = 32000 \text{ cm}^{-1}$ der Fall ist.

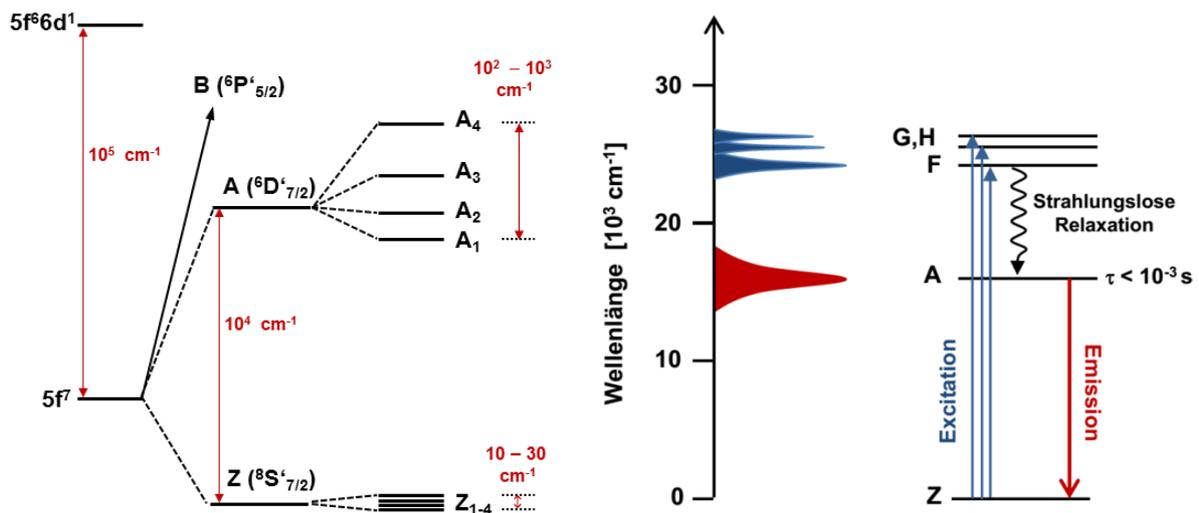


Abbildung 2.9 Energieniveauschema (links) und Darstellung des Fluoreszenzprozesses von Cm(III) (rechts).¹¹²

Sowohl der Grundzustand als auch der angeregte Zustand werden durch ein Ligandenfeld in jeweils vier Niveaus aufgespalten.¹²⁴ Die Ligandenfeldaufspaltung des Grundzustands beträgt nur wenige Wellenzahlen ($\Delta E = 10 - 30 \text{ cm}^{-1}$) und ist so gering, dass die vier Niveaus in erster Näherung als entartet angenommen werden können. Im Falle des angeregten ${}^6D'_{7/2}$ -Zustandes liegt die Aufspaltung in der Größenordnung von mehreren 100 Wellenzahlen, sodass theoretisch vier Übergänge zwischen dem Grundzustand und den Niveaus des angeregten Zustands möglich sind. Deren Intensitäten werden infolge der langen Lebensdauer des A-Zustands durch die thermische Gleichgewichtsverteilung der Elektronen in den Ligandenfeldniveaus bestimmt.¹²⁵ Ein Vergleich der Ligandenfeldaufspaltung mit der thermischen Energie von Elektronen bei Raumtemperatur ($kT = 207 \text{ cm}^{-1}$) zeigt, dass unter diesen Bedingungen bevorzugt das niedrigste Ligandenfeldniveau besetzt wird.¹⁰⁸ Hieraus resultiert im Emissionsspektrum eine einzige Bande bei 593,8 nm mit einer Halbwertsbreite von 7,7 nm (Abbildung 2.10). Diese ist jedoch aufgrund nicht aufgelöster heißer Banden unsymmetrisch zur höherenergetischen blauen Seite verbreitert. Heiße Banden treten auf, wenn energetisch höherliegende Niveaus entsprechend der Boltzmann-Verteilung ebenfalls besetzt sind und die Fluoreszenzemission aus einem dieser Niveaus erfolgt. Heiße Banden weisen jedoch in Lösung meist nur geringe Intensitäten auf und sind deshalb oft nur schwach oder überhaupt nicht sichtbar.

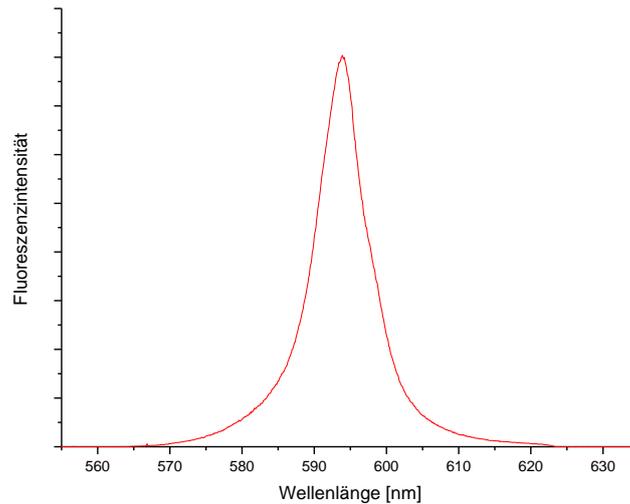


Abbildung 2.10 Emissionsspektrum des Cm(III)-Aquoions mit $\lambda_{\max} = 593,8 \text{ nm}$.

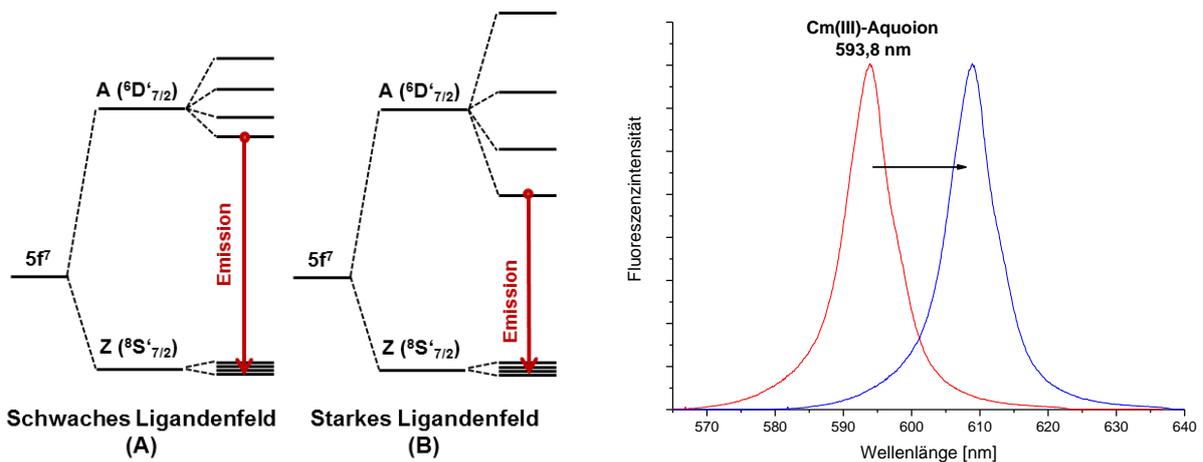


Abbildung 2.11 Einfluss des Ligandenfelds auf die Lage der Energieniveaus sowie der Emissionsbande von Cm(III) (Ligandenfeldeffekt).¹¹²

Das Cm(III)-Aquoion kann in guter Näherung mit einer sphärischen Symmetrie beschrieben werden.¹²⁶ Bei einer Komplexierung mit anderen Liganden wird die Koordinationsumgebung verändert und die Symmetrie herabgesetzt. Hierbei wird auch das Ligandenfeld verändert, was einen signifikanten Einfluss auf die Lage der Energieniveaus sowie der Emissionsbande von Cm(III) hat (Abbildung 2.11). Während die Ligandenfeldaufspaltung im Falle des Cm(III)-Aquoions gering ist, nimmt sie bei stärker komplexierenden Liganden zu. Dies führt zu einer Verringerung der Energiedifferenz zwischen angeregtem Zustand und Grundzustand, weshalb die zugehörige Bande im Emissionsspektrum bathochrom verschoben ist. Hierbei können Verschiebungen von bis zu 30 nm auftreten.¹²⁷⁻¹³⁰

Somit können anhand der Änderung der Lage, Form und Intensität der entsprechenden Cm(III)-Emissionsbande Rückschlüsse auf die Koordinationsumgebung des Cm(III) gezogen werden.¹³¹

2.2.3.3. Zeitaufgelöste Laserfluoreszenzspektroskopie

Die zeitaufgelöste Laserfluoreszenzspektroskopie (engl. *Time-Resolved Laser Fluorescence Spectroscopy*, TRLFS) ist eine Methode, mit der sehr sensitiv die Koordinationsumgebung von Metallionen mit entsprechenden Fluoreszenzeigenschaften untersucht werden kann. Sie wird häufig zur Speziation von Actiniden und Lanthaniden eingesetzt. Nach IUPAC beschreibt der Begriff Speziation die Verteilung eines Elementes auf definierte chemische Spezies in einem System.⁶ Vorteile der TRLFS sind kurze Messzeiten sowie sehr niedrige Nachweisgrenzen von z.B. $5 \cdot 10^{-13}$ M im Falle des Cm(III).¹³² Für Speziationsuntersuchungen werden jedoch etwas höhere Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-9}$ M für Cm(III) und $1 \cdot 10^{-7}$ M für Eu(III) benötigt.

Bei der TRLFS wird das Metallion durch einen Laser im Pulsbetrieb angeregt und anschließend die Fluoreszenzemission zeitaufgelöst detektiert.¹³³ Dies bedeutet, dass zwischen Anregung und Detektion des Fluoreszenzsignals eine Verzögerungszeit von 1 – 10 μ s eingehalten wird. Dadurch wird gewährleistet, dass ausschließlich die charakteristische Emission des Metallions gemessen wird, während Streulichtprozesse und Fluoreszenzerscheinungen von organischen Molekülen, die meist Lebensdauern im ns-Bereich aufweisen, diskriminiert werden.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, mit TRLFS Informationen über die Koordinationsumgebung der Metallionen zu erhalten. Bei der Aufnahme von Excitationsspektren wird die Fluoreszenzemission in einem bestimmten Wellenlängenbereich in Abhängigkeit der Anregungswellenlänge detektiert. Das erhaltene Spektrum entspricht im Wesentlichen dem Absorptionsspektrum, zeichnet sich allerdings durch eine um mehrere Größenordnungen höhere Empfindlichkeit und ein geringeres Untergrundsignal aus. Die Auflösung des Excitationsspektrums wird ausschließlich durch die spektrale Breite des Anregungslasers bestimmt und ist daher deutlich höher als bei entsprechenden Absorptionsspektren.

Zur Aufnahme von Emissionsspektren wird die Fluoreszenzemission bei fester Anregungswellenlänge (396,6 nm für Cm(III) und 394,0 nm für Eu(III)) in einem konstanten Zeitfenster detektiert. Sowohl Emissions- als auch Excitationsspektren verschiedener Spezies weisen charakteristische Bandenformen und Bandenverschiebungen, Aufspaltungsmuster und Intensitätsverhältnisse auf, aus denen Rückschlüsse auf die direkte Koordinationsumgebung des Metallions gezogen werden können.

Ein weiterer wichtiger spektroskopischer Parameter der TRLFS ist die Fluoreszenzlebensdauer τ . Hierunter versteht man die mittlere Zeit, die ein Metallion im angeregten Zustand verbleibt, bevor es unter Aussendung eines Photons in den Grundzustand zurückkehrt. Die Fluoreszenzlebensdauer wird aus der Abnahme der Fluoreszenzintensität mit der Zeit bestimmt, die einem exponentiellen Gesetz folgt:

$$I(t) = I_0 e^{-k_{obs}t} \quad \text{mit} \quad k_{obs} = \frac{1}{\tau} \quad (2.1)$$

Hierbei ist $I(t)$ die Fluoreszenzintensität zu einem bestimmten Zeitpunkt t , I_0 die Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt $t = 0$, k_{obs} die Fluoreszenzzerfallskonstante und τ die Fluoreszenzlebensdauer. Durch logarithmische Auftragung der Fluoreszenzintensität gegen die Delayzeit t erhält man eine Gerade mit der Steigung $k_{obs} = 1/\tau$.

Neben der Emission des Fluoreszenzlichts tragen auch verschiedene strahlungsfreie Prozesse zur Depopulation des angeregten Zustands bei, die die Fluoreszenzlebensdauer signifikant verringern können. In wässrigen Systemen ist der wichtigste Beitrag die Schwingungsrelaxation durch die OH-Funktionen von Wassermolekülen in der ersten Koordinationssphäre. Hierbei erfolgt die Relaxation durch einen Energieübertrag vom Metallion in hochenergetische Schwingungszustände der OH-Gruppen.¹³⁴ Die Energie der OH-Streckschwingung beträgt rund 3500 cm^{-1} . Daher kann die Energiedifferenz von ca. 17000 cm^{-1} zwischen dem Grundzustand und dem angeregten Zustand für Cm(III) und Eu(III) bereits durch die vierte Obertonschwingung überbrückt werden.¹³⁵ Hierdurch wird eine effektive strahlungslose Depopulation des angeregten Zustands erreicht, was in einer sehr kurzen Fluoreszenzlebensdauer resultiert ($\tau([\text{Cm}(\text{H}_2\text{O})_9]^{3+}) = 65 \mu\text{s}$).¹³⁶ Im Gegensatz hierzu ist die Schwingungsenergie der OD-Streckschwingung in deuteriertem

Wasser aufgrund der größeren Masse von Deuterium mit ca. 2500 cm^{-1} deutlich geringer. Daher müsste der sechste Oberton dieser Schwingung angeregt werden, um einen Energietransfer aus den emittierenden Niveaus von Cm(III) oder Eu(III) zu ermöglichen. Allerdings ist die Besetzung eines Zustands mit einer so großen Schwingungsquantenzahl äußerst unwahrscheinlich, weshalb die Quencheffektivität stark herabgesetzt wird. Folglich sind die Fluoreszenzlebensdauern in D_2O -Systemen deutlich höher ($\tau([\text{Cm}(\text{D}_2\text{O})_9]^{3+}) = 1270\text{ }\mu\text{s}$)¹³⁷ als in Systemen mit H_2O . Anhand dieses Zusammenhangs entwickelten *Kimura et al.* (Cm(III), Gleichung 2.2) bzw. *Horrocks et al.* (Eu(III), Gleichung 2.3) empirische Gleichungen, die den Zusammenhang zwischen der Anzahl q der koordinierten Wassermoleküle in der ersten Koordinationssphäre und der Fluoreszenzzerfallskonstanten k_{obs} beschreiben.^{126, 137, 138} Der Fehlerbereich beider Gleichungen liegt bei $\pm 0,5$ Wassermolekülen.

$$\text{Cm(III)} \quad q = 0.65k_{\text{obs}}(\text{Cm(III)}) - 0.88 \quad (2.2)$$

$$\text{Eu(III)} \quad q = 1.07k_{\text{obs}}(\text{Eu(III)}) - 0.62 \quad (2.3)$$

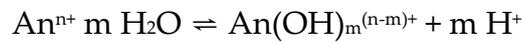
Treten im System mehrere Spezies auf, die im Gleichgewicht nebeneinander vorliegen, wird der Abfall der Fluoreszenzintensität durch ein multiexponentielles Zeitgesetz beschrieben. Voraussetzung hierfür ist, dass sich die Fluoreszenzlebensdauern der einzelnen Spezies signifikant unterscheiden und keine schnellen Ligandenaustauschprozesse stattfinden.

2.2.3.1. Hydrolyse von Cm(III)

Im sauren wässrigen Medium liegen die dreiwertigen Actiniden als Aquoionen vor. Bei den leichteren Actiniden befinden sich neun Wassermoleküle in der inneren Koordinationssphäre, bei den schwereren Actiniden ab Einsteinium liegt eine achtfache Koordination vor.⁹⁷ Cm(III) liegt im sauren Medium als neunfach koordiniertes Cm(III)-Aquoion vor.^{137, 138} Dieses weist eine dreifach überkappte, trigonal-prismatische Struktur auf, was von *Skanthakumar et al.* durch Röntgenstreuung und EXAFS-Messungen anhand der Verbindung $[\text{Cm}(\text{H}_2\text{O})_9](\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ gezeigt wurde.¹²⁶ Das Ergebnis wurde durch DFT-Rechnungen bestätigt.

2. Kenntnisstand

Bei zunehmendem pH-Wert sowie in Abwesenheit anderer komplexierender Liganden ist die Hydrolyse der Actinidionen die dominierende Reaktion. Sie verläuft nach folgender Gleichung:



Hierbei nimmt die Tendenz zur Hydrolyse analog zur Komplexierungsstärke der Actinidionen in der Reihenfolge $\text{AnO}_2^+ < \text{An}^{3+} < \text{AnO}_2^{2+} < \text{An}^{4+}$ zu. Bei Cm(III) beginnt die Hydrolyse in Abhängigkeit von der Ionenstärke bei einem pH-Wert von 5 - 6. *Wimmer et al.* führten Untersuchungen im pH-Bereich von 6 bis 10 in einer 0,1 M NaClO_4 -Lösung durch.¹³⁹ Neben dem Cm(III)-Aquoion konnten die Spezies $\text{Cm}(\text{OH})^{2+}$ und $\text{Cm}(\text{OH})_2^+$ identifiziert werden. Die Existenz dieser Hydrolysespezies wurde von *Fanghänel et al.* bestätigt, die die Hydrolyse von Cm(III) in wässrigen NaCl-Lösungen bei variierenden NaCl-Konzentrationen zwischen 0,01 und 6,15 mol/kg H_2O untersuchten.¹⁴⁰ *Rabung et al.* konnten bei pH-Werten über 10,5 und CaCl_2 -Konzentrationen zwischen 0,1 und 3,5 mol/l außerdem die Spezies $\text{Cm}(\text{OH})_3$, $\text{Cm}(\text{OH})_4^-$ und $\text{Cm}(\text{OH})_6^{3-}$ identifizieren.¹⁴¹ Die charakteristischen spektroskopischen Parameter der Cm(III)-Hydrolysespezies sind in Tabelle 2.6 zusammengestellt.

Tabelle 2.6 Komplexierungskonstanten und charakteristische spektroskopische Daten der Cm(III)-Hydrolysespezies.

Hydrolysespezies	λ_{max} [nm]	τ [μs]	$\log \beta$	Ionenstärke	Referenz
$\text{Cm}(\text{H}_2\text{O})_9^{3+}$	593,8	65 ± 2	-	0,1 M NaClO_4	139
$\text{Cm}(\text{OH})^{2+}$	598,8	72 ± 2	$6,67 \pm 0,18$	0,1 M NaClO_4	139
	598,7		5,76	0,1 M NaCl	140
$\text{Cm}(\text{OH})_2^+$	603,5	80 ± 10	$12,06 \pm 0,28$	0,1 M NaClO_4	139
	603,5		11,10	0,1 M NaCl	140
$\text{Cm}(\text{OH})_3$	610,3	115 – 170	-	0,1 – 1,5 M CaCl_2	141

Die Verteilung der Cm(III)-Hydrolysespezies in Abhängigkeit des pH-Wertes bei verschiedenen Ionenstärken ist in Abbildung 2.12 gezeigt. Im physiologischen Milieu bei einem pH-Wert von 7,4 und einer NaCl-Konzentration von 0,15 mol/l liegen sowohl das Cm(III)-Aquoion als auch die erste Hydrolysespezies vor, die Cm(OH)₂⁺-Spezies tritt nur in sehr geringen Mengen auf.

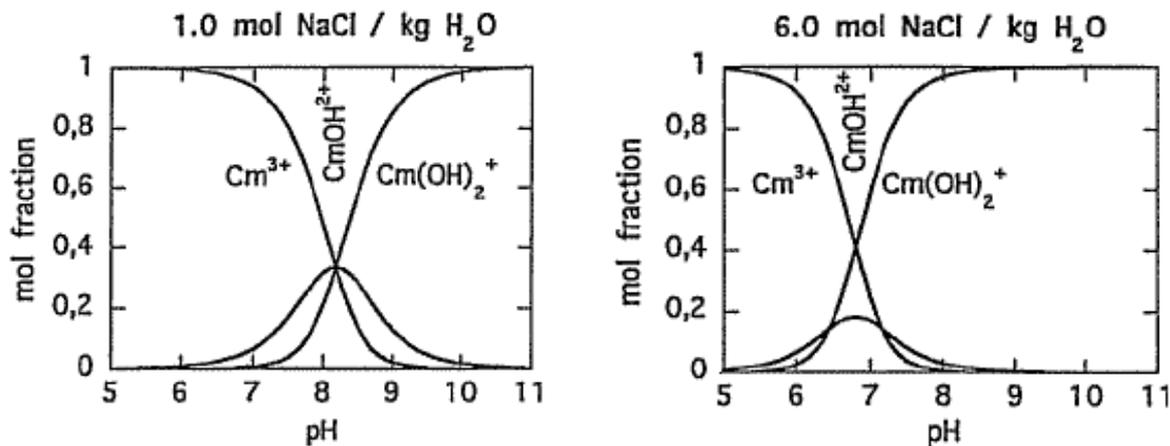
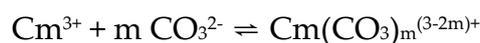


Abbildung 2.12 Speziesverteilung des Cm(III)-Aquoions und der Cm(III)-Hydrolysespezies im pH-Bereich von 5,0 bis 11,0 bei verschiedenen Ionenstärken.¹⁴⁰

2.2.3.2. Carbonatkomplexierung von Cm(III)

Carbonate kommen überall in der Natur vor, entweder als gesteinsbildendes Material oder gelöst in wässriger Phase. Im menschlichen Blut sind Carbonatspezies mit einer Gesamtkonzentration von rund 24 mM nach Chlorid die zweithäufigsten Anionen.²² Aufgrund der guten Komplexierungseigenschaften ist die Carbonatkomplexierung neben der Hydrolyse die zweitwichtigste Reaktion, die die trivalenten Actinidionen bei erhöhten pH-Bedingungen eingehen können.

Die Komplexierung von Cm(III) mit Carbonat verläuft nach folgendem Schema:



Mit steigender Carbonatkonzentration werden die Cm(III)-Carbonatspezies Cm(CO₃)_m^{(3-2m)+} mit m = 1 – 4 gebildet. Diese wurden bei verschiedenen Ionenstärken von 0,1 bis 6,0 m NaCl mittels TRLFS eingehend untersucht und charakterisiert.¹⁴²⁻¹⁴⁴

2. Kenntnisstand

Fanghänel *et al.* konnten bei einem CO₂-Partialdruck von 11 bar und einem pH-Wert von 4,4 in 1 M NaCl-Lösung außerdem die Cm(III)-Hydrogencarbonatspezies Cm(HCO₃)²⁺ nachweisen.¹⁴⁵ In natürlichen aquatischen Systemen wird bei atmosphärischem CO₂-Partialdruck die Bildung von Hydrogencarbonatkomplexen jedoch vollständig unterdrückt. Die charakteristischen spektroskopischen Parameter der Cm(III)-Carbonat- und Hydrogencarbonatspezies sind in Tabelle 2.7 zusammengestellt. Abbildung 2.13 zeigt die Speziesverteilung der Cm(CO₃)_m^{(3-2m)+}-Spezies (m = 0 - 4) in Abhängigkeit der Carbonatkonzentration in einer 1 m NaCl-Lösung.¹²¹

Tabelle 2.7 Komplexierungskonstanten und charakteristische spektroskopische Daten der Cm(III)-Carbonatspezies nach ^{144, 145}.

Carbonatspezies	λ_{\max} [nm]	τ [μ s]	$\log \beta^0$	Referenz
Cm(CO ₃) ⁺	598,5	79	8,1 ± 0,3	144
Cm(CO ₃) ₂ ⁻	603,0	89	13,0 ± 0,6	144
Cm(CO ₃) ₃ ³⁻	605,7	126	15,2 ± 0,4	144
Cm(CO ₃) ₄ ⁵⁻	607,5	256	13,0 ± 0,5	144
Cm(HCO ₃) ²⁺	594,9	70	3,1 ± 0,3	145

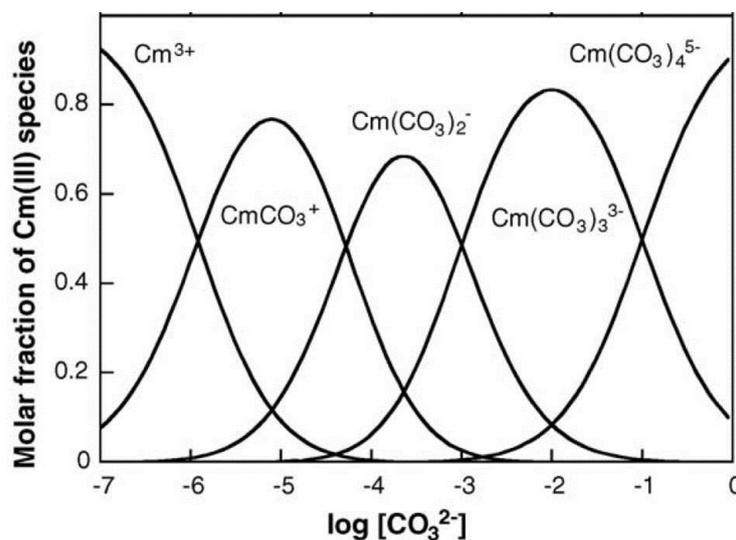


Abbildung 2.13 Verteilung des Cm(III)-Aquoions und der Cm(III)-Carbonatspezies in Abhängigkeit der Carbonatkonzentration in einer 1 m NaCl-Lösung.¹²¹

2.3. EXAFS-Spektroskopie

Die *Extended X-Ray Absorption Fine Structure*-Spektroskopie (EXAFS-Spektroskopie) ist eine Methode, die es ermöglicht, Informationen über die dreidimensionale Koordinations-umgebung eines Atoms zu erhalten. Sie basiert auf der Analyse der Oszillator-Feinstruktur oberhalb der Absorptionskante dieses Zentralatoms. Durch Analyse der EXAFS-Spektren können Art, Anzahl und Entfernung der Nachbaratome ermittelt werden. Für EXAFS-Messungen wird monochromatische Synchrotronstrahlung verwendet.

Atome können durch Absorption eines Röntgenquants ionisiert werden. Ist die Energie der einfallenden Strahlung E_{hv} kleiner als die Energie E_0 , die für die Freisetzung eines Photoelektrons aus dem entsprechenden Atom A aufgebracht werden muss, findet keine Ionisierung statt. Ist $E_{\text{hv}} = E_0$, kommt es zu einem starken Anstieg der Absorption im EXAFS-Spektrum, was als Kante bezeichnet wird.¹⁴⁶ Für die Aufnahme von EXAFS-Spektren werden meist Elektronen aus der ersten oder zweiten Schale verwendet, man spricht dann von der K- oder L-Kante. Die verschiedenen Kantenenergien E_0 aller Elemente sind bekannt und tabelliert.¹⁴⁷ Bei Energien größer als E_0 wird ein Photoelektron mit einer kinetischen Energie von $E_{\text{kin}} = E_{\text{hv}} - E_0$ freigesetzt. Dieses kann aufgrund des Welle-Teilchen-Dualismus auch als Materiewelle beschrieben werden, die an den umgebenden Atomen B gestreut wird. In Abhängigkeit von der Energie der einfallenden Strahlung variiert auch die Energie und somit die Wellenlänge der Photoelektronen. Daher kann es sowohl zu konstruktiver als auch destruktiver Interferenz zwischen dem freigesetzten und dem rückgestreuten Photoelektron bzw. den entsprechenden Materiewellen kommen, was zu Oszillationen im EXAFS-Spektrum (Feinstruktur) führt.¹⁴⁸ Form und Amplitude der Oszillationen hängen von der Art der Streuzentren B sowie vom Abstand R_{AB} zwischen dem Zentralatom A und den umgebenden Atomen B ab.¹⁴⁹ Abbildung 2.14 zeigt schematisch die der EXAFS-Spektroskopie zugrunde liegenden Prozesse.

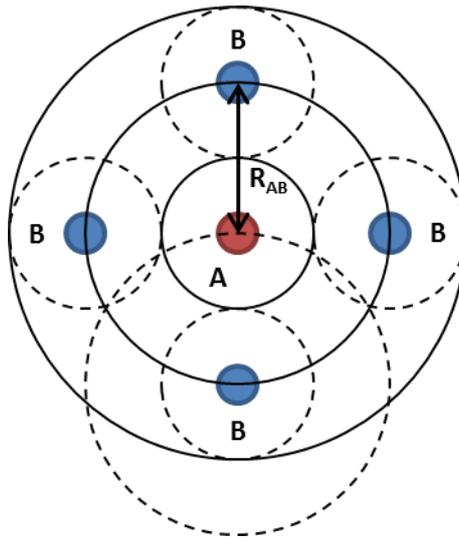


Abbildung 2.14 Schematische Darstellung des Röntgenabsorptions- und der Streuprozesse, die der EXAFS-Spektroskopie zugrunde liegen.^{146, 149} Durchgezogene Linien symbolisieren die ausgehenden, gestrichelte Linien die gestreuten Photoelektronenwellen.

Durch die Anregung und Emission der Photoelektronen entstehen Lücken, die durch höherenergetische Elektronen aufgefüllt werden. Bei diesem Relaxationsprozess wird Energie in Form von Fluoreszenzlicht freigesetzt. Neben der Absorption kann bei der Aufnahme von EXAFS-Spektren daher alternativ auch die Fluoreszenz gemessen werden, die Spektren sind komplementär und die Auswertung erfolgt analog.

Das Röntgenabsorptionsspektrum an der Ni K-Kante von NiO in Abbildung 2.15 (a) zeigt den Bereich vor der Kante, in dem fast keine Absorption auftritt, die Kante bei einer Energie von rund 8330 eV sowie den darauf folgenden EXAFS-Bereich, der ungefähr 20 eV oberhalb der Kante beginnt. Lage und Form der Kante hängen von der Oxidationsstufe des Atoms ab, weshalb durch Vergleich mit Referenzsystemen Rückschlüsse auf den Oxidationszustand des untersuchten Zentralatoms gezogen werden können. Der Kantenbereich wird bei der NEXAFS- (*Near-Edge X-Ray Absorption Fine Structure*) bzw. XANES-Spektroskopie (*X-Ray Absorption Near-Edge Structure*) untersucht.

Der erste Schritt bei der Datenanalyse ist die Isolation des EXAFS-Anteils $\chi(k)$ des gesamten Röntgenabsorptionsspektrums. Hierbei wird die Energieachse von eV in Einheiten von k (\AA^{-1}) umgewandelt, wobei k die Wellenzahl der Photoelektronen ist. Um die mit zunehmender Energie schwächer werdenden Oszillationen hervor-

zuheben, wird $X(k)$ mit dem Faktor k^n multipliziert (Abbildung 2.15 (b)).¹⁵⁰ Für die Potenz n wird üblicherweise ein Wert von 2 oder 3 eingesetzt.

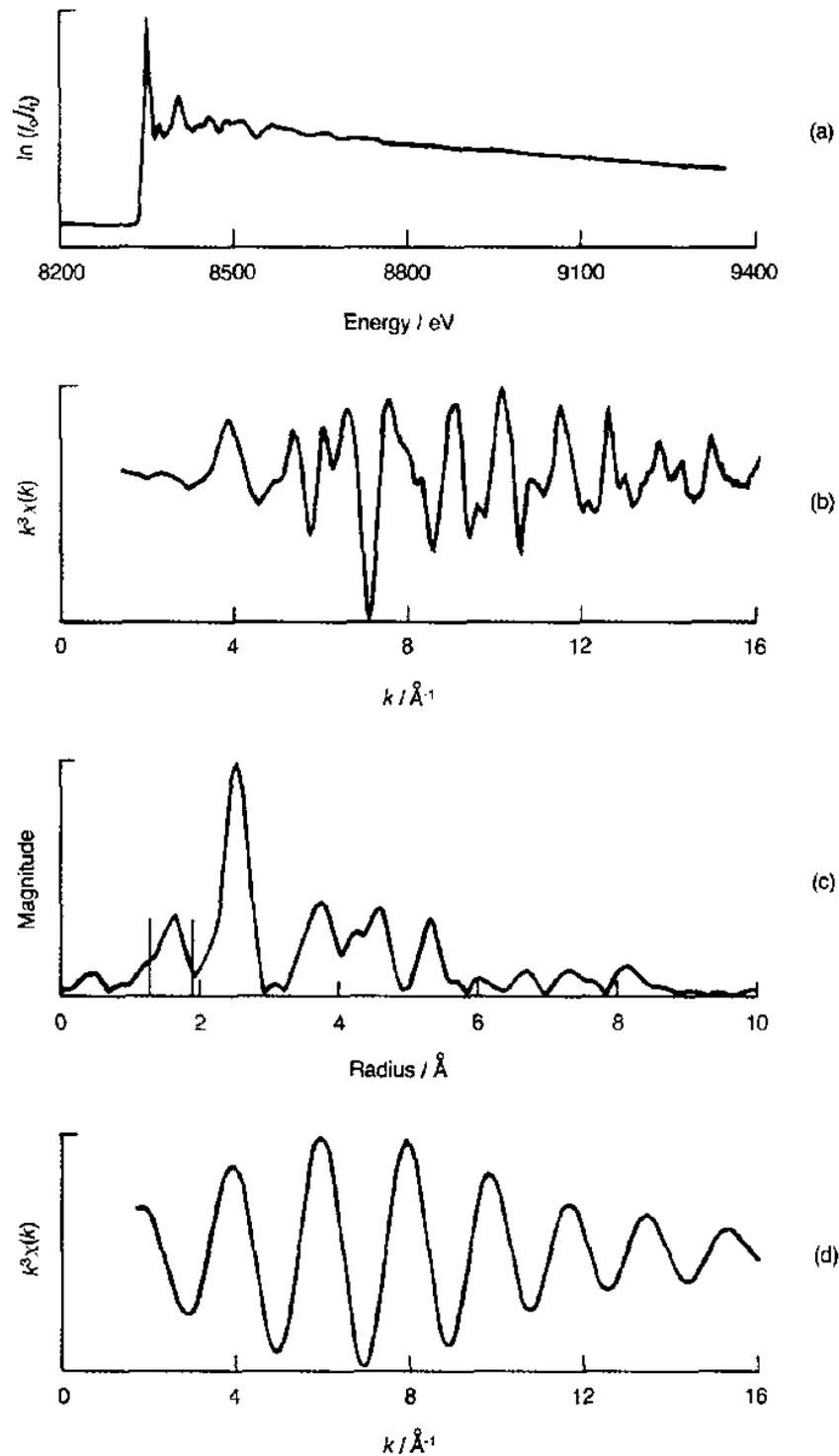


Abbildung 2.15 Einzelne Schritte der Analyse der experimentell bestimmten EXAFS-Daten von NiO.¹⁴⁶ (a) Röntgenabsorptionsspektrum an der Ni K-Kante von NiO; (b) $k^3X(k)$ -Spektrum von NiO; (c) PRDF von NiO; (d) zurücktransformiertes $k^3X(k)$ -Spektrum der ersten Koordinationsschale von NiO.

$X(k)$ setzt sich aus verschiedenen sinusförmigen Komponenten zusammen, die durch Rückstreuung der Photoelektronenwelle an den verschiedenen Koordinationsschalen entstehen.¹⁴⁶ Die Frequenzen der einzelnen Anteile hängen maßgeblich vom Abstand R_{AB} zwischen dem Zentralatom A und den Streuzentren B ab. Durch Fouriertransformation von $k^3X(k)$ erhält man ein Frequenzspektrum, das als *Pseudo Radial Distribution Function* (PRDF) bezeichnet wird (Abbildung 2.15 (c)).¹⁵¹ Die einzelnen Banden repräsentieren hierbei verschiedene Sinusfrequenzen bzw. radiale Koordinationsebenen. Allerdings stimmen die Abstände nicht exakt mit den tatsächlichen Abständen der verschiedenen Koordinationsschalen vom Zentralatom überein (Pseudoabstände), weshalb dieses Spektrum keine quantitativen Informationen liefert.

Um Strukturdaten zu erhalten, wird das sogenannte *Fourier Filtering* durchgeführt. Hierbei wird ein einzelner Peak der PRDF, d.h. eine einzelne Frequenz (markiert durch zwei senkrechte Linien in Abbildung 2.15 (c)), in den k -Raum zurücktransformiert. Man erhält auf diese Weise eine $k^3X(k)$ -Funktion für eine einzelne Schale (Abbildung 2.15 (d)), die nun mit verschiedenen EXAFS-Programmen analysiert werden kann.

Grundlage für die Analyse der experimentellen Daten ist die EXAFS-Gleichung, die $X(k)$ in Abhängigkeit verschiedener Strukturparameter beschreibt (Gleichung 2.4).¹⁵²

$$X(k) = \sum_j 3\cos^2\theta_j N_j F_j(k) e^{-2\sigma_j^2 k^2} e^{-2r_j/\lambda} \frac{\sin(2kr_j + \phi_j(k))}{kr_j^2} \quad (2.4)$$

Hierbei ist N_j die Anzahl der j -ten Nachbaratome im Abstand r_j . $F_j(k)$ ist die Amplitude der von den Nachbaratomen N_j zurückgestreuten Elektronenwelle und σ_j der entsprechende Debye-Waller-Faktor. θ_j beschreibt den Winkel, den die j -ten Nachbaratome mit dem Polarisationsvektor der Röntgenstrahlung bilden, und $\phi_j(k)$ die gesamte Phasenverschiebung des Photoelektrons. Sind Amplitude und Phasenverschiebung bekannt, können anhand der EXAFS-Gleichung die Strukturparameter N und R sowie σ^2 bestimmt werden. Die EXAFS-Gleichung ist streng genommen nur für K-Kanten gültig, allerdings können damit auch L_{III}-Kanten-Spektren mit ausreichender Genauigkeit beschrieben werden.¹⁵²

Die Auswertung der EXAFS-Daten erfolgt durch Berechnung und Anpassung eines theoretischen Spektrums an das experimentell bestimmte. Hierfür wird zunächst ein Modell unter Verwendung verschiedener Strukturparameter (Art, Anzahl und Abstand der Nachbaratome sowie Debye-Waller-Faktoren) aufgestellt. Anhand des Strukturmodells wird nun ein Spektrum errechnet und mit den Messdaten verglichen. Durch Variation der verschiedenen Parameter wird versucht, eine größtmögliche Übereinstimmung zu finden und somit die experimentellen Daten möglichst genau wiederzugeben.

3. Experimenteller Teil

3.1. Chemikalien

Alle eingesetzten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von Merck und Sigma Aldrich in höchstem Reinheitsgrad bezogen und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

Als Cm(III)-Stammlösung wurde eine $2,12 \cdot 10^{-5}$ M $\text{Cm}(\text{ClO}_4)_3$ -Lösung in 0,1 M HClO_4 verwendet. Die Konzentrationsbestimmung und die Ermittlung der Isotopenzusammensetzung erfolgten mittels ICP-MS-Messungen und α -Spektrometrie (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1 Isotopenzusammensetzung der $\text{Cm}(\text{ClO}_4)_3$ -Stammlösung.

Cm-Isotope	prozentualer Anteil	Aktivität [Bq/ml]
^{243}Cm	0,4	$2,53 \cdot 10^5$
^{244}Cm	0,3	$2,83 \cdot 10^5$
^{245}Cm	0,1	$2,80 \cdot 10^2$
^{246}Cm	9,4	$3,33 \cdot 10^4$
^{247}Cm	0,1	$7,89 \cdot 10^2$
^{248}Cm	89,7	$4,46 \cdot 10^3$

Die Konzentration der Eu(III)-Stammlösung, die zur Herstellung der Eu(III)-Flüssigproben verwendet wurde, betrug $c(\text{Eu}) = 9,0 \cdot 10^{-4}$ M in 10 mM HClO_4 . Für die Herstellung der EXAFS- Proben sowie der Eu(III)-Festkörper-Proben wurden folgende Stammlösungen verwendet: Eu(III) ($c(\text{EuCl}_3) = 1,0 \cdot 10^{-2}$ M in H_2O), Am(III): ($c(\text{Am}) = 1,65 \cdot 10^{-2}$ M in 0,5 mM HNO_3), Np(V) ($c(\text{Np}) = 4,0 \cdot 10^{-3}$ M in 10 mM HClO_4).

Zur Messung des pH-Wertes wurde eine Glas-Kombinationselektrode von Ross (Orion, pH-Meter: Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet. Die Kalibrierung erfolgte mit drei Pufferlösungen mit pH-Werten von 4,0, 7,0 und 10,0.

3.2. Herstellung der Proteinlösungen

Zur Herstellung der Proteinlösungen wurden TRIS- oder HEPES-gepufferte Lösungen (10 mM, pH 7,4) mit einer physiologischen NaCl-Konzentration von 150 mM aus ultrapurem Wasser (Millipore, Billerica, MA, USA; 18,2 MΩcm) verwendet. Humanes Serumtransferrin wurde entsprechend der Vorschrift von Harris *et al.* vor Gebrauch mittels Größenausschlusschromatographie mit Sephadex G-25 medium Säulenmaterial (GE Healthcare) und Filtration mit Amicon Zentrifugenfiltern (30 kDa) gereinigt.^{58, 153} Die Proteinkonzentration der Transferrin-Stammlösung wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ ($\epsilon = 93000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ermittelt (Cary 5G UV-VIS-NIR-Spektrophotometer, Varian).⁵⁵

5 mg des Transferrin-Halbmoleküls $\text{Fe}_2\text{hTf}/2\text{N}$ in 10-25 mM TRIS-Pufferlösung (pH 7,4, $V \approx 250 \mu\text{l}$) wurden mit 1,2 ml einer Lösung mit 0,5 M Natriumcitrat, 1 mM NTA und 1 mM EDTA (pH 4,9) versetzt. Das sofortige Verschwinden der roten Farbe zeigt die Freisetzung des Fe(III) aus dem hTf/2N-Komplex an. Die Abtrennung des Eisens sowie die Reinigung des Proteins erfolgte durch 22 Filtrationszyklen mit Amicon Zentrifugenfiltern (10 kDa) bei 6500 rpm. Bei jedem Filtrationszyklus wurden 4 ml einer 10 mM TRIS-Pufferlösung (pH 7,4) mit einer physiologischen NaCl-Konzentration von 150 mM zugesetzt, um das Protein zu waschen. Die Proteinkonzentration der hTf/2N-Stammlösung wurde mit UV/Vis-Spektroskopie bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ ($\epsilon = 38500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ermittelt (Cary 5G UV-VIS-NIR-Spektrophotometer, Varian).¹⁵⁴

3.3. Probenpräparation

3.3.1. Präparation der Cm(III)-Transferrin- und Cm(III)-hTf/2N-Proben

Die Proben für die Komplexierungsuntersuchungen von Cm(III) mit Transferrin und hTf/2N in Lösung wurden durch Zugabe von 30 μl der Cm(III)-Stammlösung zu 970 μl einer TRIS-gepufferten Proteinlösung mit einer Proteinkonzentration von $5,15 \cdot 10^{-6}$ M hergestellt. Die Cm(III)-Konzentration der Proben betrug somit $c(\text{Cm}) = 1,0 \cdot 10^{-7}$ M und die Proteinkonzentration $c(\text{Protein}) = 5,0 \cdot 10^{-6}$ M. Die Komplexierungsuntersuchungen wurden im pH-Bereich von 3,5 bis 11,0 durchgeführt. Es wurden jeweils zwei Proben mit einem physiologischen pH-Wert von pH 7,4 hergestellt und der pH-Wert dann schrittweise erniedrigt bzw. erhöht. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit 0,01 M, 0,1 M, 0,2 M und 1,0 M NaOH- und HCl-Lösungen. Die TRLFS-Untersuchungen wurden sowohl bei Raumtemperatur (296 K) als auch bei physiologischer Temperatur (310 K) durchgeführt.

Um die Komplexierung von Cm(III) mit Transferrin in carbonatfreier Atmosphäre zu untersuchen, wurde zunächst die gereinigte Transferrin-Stammlösung nach dem *freeze-pump-thaw*-Verfahren entgast. Hierbei wird die Lösung mit flüssigem N_2 eingefroren und anschließend Vakuum angelegt. Der Kolben wird verschlossen und dann langsam wieder aufgetaut. Dieser Prozess wurde zum Entgasen der Proteinlösung 10 mal wiederholt. Die weitere Probenpräparation und die Einstellung des pH-Wertes erfolgte unter Argonatmosphäre in einer Handschuhbox. Hierfür wurden ausschließlich entgaste, carbonatfreie Lösungen und Chemikalien verwendet.

Für die Komplexierungsuntersuchungen von Cm(III) mit Transferrin und hTf/2N bei physiologischer Carbonatkonzentration wurde für die Probenpräparation eine TRIS-Pufferlösung verwendet, die 25 mM NaHCO_3 enthielt. Um eine schnelle Gleichgewichtseinstellung zu erreichen, wurden die Proben mit $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 25$ mM bei pH 11,0 präpariert und der pH-Wert bei der Titration schrittweise erniedrigt.

Für die temperaturabhängigen Komplexierungsstudien im Temperaturbereich von $T = 5 - 37,5^\circ\text{C}$ wurden Cm(III)-Transferrin- und Cm(III)-hTf/2N-Proben ($c(\text{Cm}) = 1,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, $c(\text{Protein}) = 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) bei pH 7,4, 7,7 und 8,0 hergestellt. Die pH-Elektrode wurde für jede Temperatur separat kalibriert und der pH-Wert der Probe nachjustiert.

3.3.2. Präparation der Eu(III)-Transferrin-Proben

Die Komplexierungsuntersuchungen von Eu(III) mit Transferrin in Lösung wurden im pH-Bereich von 4,5 bis 9,0 durchgeführt. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit 0,1 M, 0,2 M und 1,0 M NaOH- und HCl-Lösungen. Falls nicht anderes vermerkt betrug die Eu(III)-Konzentration $c(\text{Eu}) = 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ und die Transferrinkonzentration $c(\text{Tf}) = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Das Probenvolumen betrug jeweils 1 ml .

Für die Tieftemperatur-TRLFS-Messungen des Eu(III)-Transferrin-Systems wurden Lösungen bei pH 4,5, 6,0, 7,4 und 8,0 mit folgenden Konzentrationen hergestellt:

Tabelle 3.2 Zusammensetzung der Eu(III)-Transferrin-Proben für die Tieftemperatur-TRLFS-Messungen.

pH	$c(\text{Eu(III)}) [\text{M}]$	$c(\text{Tf}) [\text{M}]$
4,5	$3,64 \cdot 10^{-4}$	$7,27 \cdot 10^{-4}$
	$8,33 \cdot 10^{-4}$	$1,66 \cdot 10^{-3}$
6,0	$3,64 \cdot 10^{-4}$	$7,27 \cdot 10^{-4}$
	$8,33 \cdot 10^{-4}$	$1,66 \cdot 10^{-3}$
7,4	$3,64 \cdot 10^{-4}$	$7,27 \cdot 10^{-4}$
	$5,88 \cdot 10^{-4}$	$1,18 \cdot 10^{-3}$
8,0	$8,33 \cdot 10^{-4}$	$1,66 \cdot 10^{-3}$

Ein Tropfen der Eu(III)-Transferrin-Lösungen wurde in einem Probenhalter in flüssigem Stickstoff vorgekühlt und dann bei $T \leq 20 \text{ K}$ Anregungs- und Emissionsspektren gemessen.

Für die fluorimetrischen Untersuchungen wurden Lösungen mit $c(\text{Tf}) = 1,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ und $V = 1 \text{ ml}$ bei pH 6,0, 7,4 und 8,0 hergestellt und schrittweise $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ bzw. $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ EuCl_3 -Lösung zugegeben, wobei die Gesamtkonzentration im Bereich von $c(\text{Eu(III)}) = 0 - 7,24 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ variierte. Der pH-Wert wurde nach jedem Schritt kontrolliert und gegebenenfalls mit NaOH und HCl nachjustiert.

3.3.3. Präparation der EXAFS-Proben

Die Metallion-Transferrin-Proben, die mit EXAFS untersucht wurden, setzen sich folgendermaßen zusammen: 1) Eu(III)-Tf : $c(\text{Eu(III)}) = c(\text{Tf}) = 6,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; 2) Np(V)-Tf : $c(\text{Np(V)}) = c(\text{Tf}) = 5,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; 3) Am(III)-Tf : $c(\text{Am(III)}) = c(\text{Tf}) = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; 4) Am(III)-Tf : $c(\text{Am(III)}) = 5,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $c(\text{Tf}) = 2,4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Es wurden jeweils zwei Proben bei pH 7,2 und 8,5 hergestellt. Die Proben 1 – 3 wurden bei Raumtemperatur und Probe 4 bei 70 K gemessen.

3.4. Zeitaufgelöste Laserfluoreszenzspektroskopie

Für die TRLFS-Untersuchungen wurden zwei verschiedene Systeme verwendet. Die Messung der Cm(III) - und $\text{Eu(III)-Transferrin-Flüssigproben}$ erfolgte mit dem TRLFS-System I, während das TRLFS-System II für die Tieftemperaturuntersuchungen verwendet wurde.

3.4.1. TRLFS-System I

Das TRLFS-System I besteht aus einem Nd:YAG-Laser (Continuum Surelite Laser), einem von diesem gepumpten Farbstofflaser (NARROWscan D-R Dye Laser) sowie dem Detektionssystem (Abbildung 3.1). Die Anregung des Neodym-dotierten Yttrium-Aluminium-Granats im Nd:YAG-Laser erfolgt durch eine Blitzlampe mit einer Frequenz von 10 Hz. Nach einer Frequenzverdreifung an nichtlinearen Kristallen emittiert der Laser bei $\lambda = 355 \text{ nm}$ und pumpt den Farbstofflaser. Dieser wird mit dem Farbstoff Exalite 398 in p-Dioxan betrieben, der in einem Wellenlängenbereich von 391 bis 404 nm durchstimmbare ist und mit einer maximalen Effizienz von 20% bei $\lambda = 398 \text{ nm}$ arbeitet. Zur Anregung von Cm(III)

und Eu(III) wird Laserlicht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 396,6 \text{ nm}$ bzw. $394,0 \text{ nm}$ verwendet.

Die Quarzglaszuvette mit der Probenlösung wird in einem temperierbaren Küvettenhalter platziert. Im 90° -Winkel zum einfallenden Laserstrahl ist eine Quarzfaser angebracht, durch die das Fluoreszenzlicht in einen Spektrograph (Shamrock 303i, ANDOR) geleitet wird. Dort erfolgt die spektrale Zerlegung an Gittern mit 300, 900 oder 1200 Linien/mm, die auf einem drehbaren Gitterturm angebracht sind. Diese Gitter werden vor jeder Messung anhand der Emissionslinien einer Neon-Lampe kalibriert. Die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgt mit einer ICCD-Kamera (iStar Gen III, A-DH 720 18F-63, ANDOR), in die ein digitaler Delaygenerator integriert ist. Um kurzlebige Prozesse wie Streulicht und die Fluoreszenz organischer Verbindungen zu diskriminieren, werden alle Spektren mit einem zeitlichen Delay von $1 \mu\text{s}$ aufgenommen.

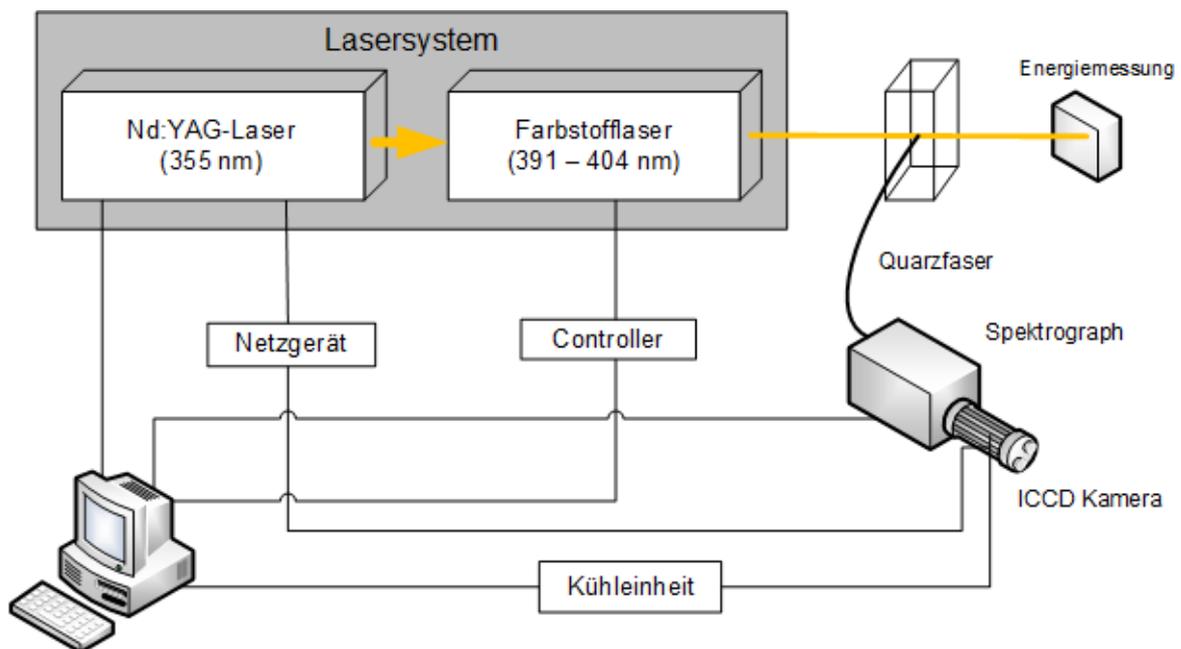


Abbildung 3.1 Schematischer Aufbau des TRLFS-Systems I zur Messung von Cm(III)- und Eu(III)-Transferrin-Flüssigproben.

3.4.2. TRLFS-System II

TRLFS-Messungen der Cm(III)- und Eu(III)-Transferrin-Proben bei $T < 20$ K wurden an einem Nd:YAG-Laser gepumpten (Quanta-Ray Pro Series) OPO-Lasersystem (*Optical Parametric Oscillator*, Quanta-Ray) durchgeführt. Der schematische Aufbau dieses TRLFS-Systems ist in Abbildung 3.2 gezeigt. Die Emission des OPO-Lasers kann in einem Bereich von $\lambda = 440 - 900$ nm durchgestimmt werden. Die Einstellung der Strahlenergie erfolgt mit einem Polarisator. Das Laserlicht wird auf die Probe gelenkt, die sich in einer unter Ultrahochvakuum (10^{-6} mbar) stehenden Probenkammer befindet. Diese wird mit einem He-gekühlten Kryostat (CTI-Cryogenics) auf $T < 20$ K gekühlt. Die Probe befindet sich im 45° -Winkel zum einfallenden Strahl und die Quarzfaser zur Auskopplung des Fluoreszenzsignals ist direkt über der Probe angeordnet. Auf diese Weise wird eine mögliche Detektion des einfallenden Laserlichtes reduziert und nur die Fluoreszenz der Probe erfasst. Das Fluoreszenzsignal wird zu einem Spektrographen (Shamrock 303i, ANDOR) geleitet, wo die spektrale Zerlegung an Gittern mit 400, 1200 und 2400 Linien/mm erfolgt. Die Detektion des Signals erfolgt mit einer ICCD-Kamera (iStar Gen III, ANDOR) mit integriertem Delay-Controller nach einer Verzögerungszeit von $10 \mu\text{s}$, um kurzlebige Prozesse wie Streulicht und Fluoreszenzemissionen organischer Liganden zu diskriminieren.

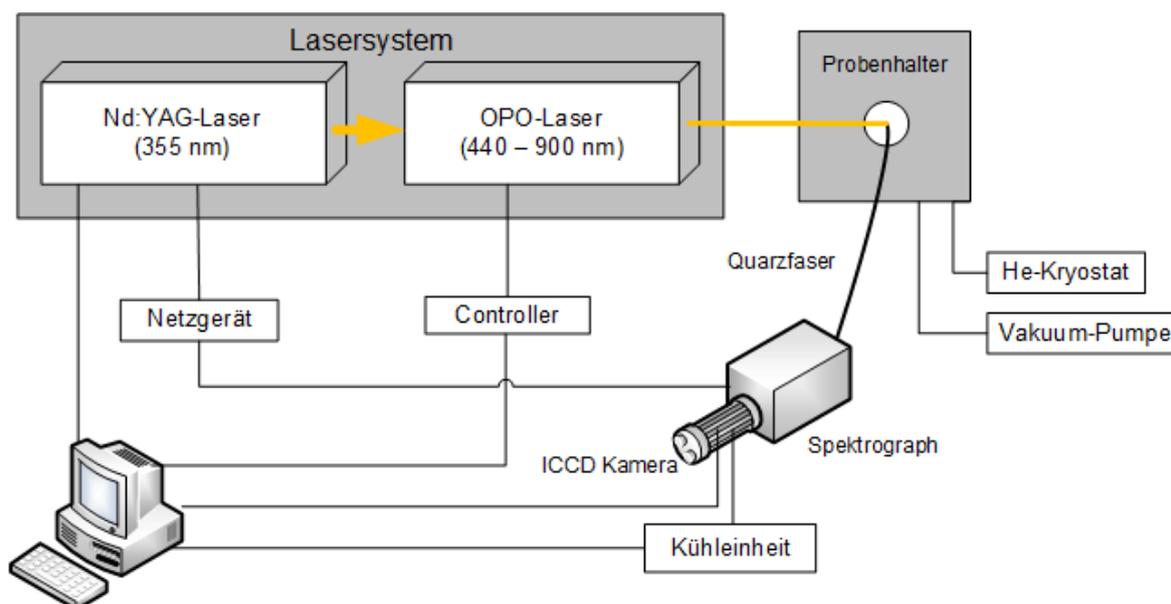


Abbildung 3.2 Schematischer Aufbau des TRLFS-Systems II zur Messung von Cm(III)- und Eu(III)-Transferrin-Proben bei $T < 20$ K.

3.5. EXAFS-Spektroskopie

Die EXAFS-Messungen wurden an der INE-Beamline der Angströmquelle Karlsruhe (ANKA, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt.¹⁵⁵ Die Beamline ist mit einem Zweikristallmonochromator und einem Fokussiersystem (Rh-beschichteter Siliciumspiegel) ausgestattet. Röntgenabsorptionsspektren wurden in einem Winkel von 90° zum einfallenden Strahl unter Verwendung eines Siliciumdetektors (Vortex EX-60, SII NanoTechnology) oder eines 5 Pixel HPGe-Festkörperdetektors (Canberra Ultra-LEGe) aufgenommen.

Zur Auswertung der Daten wurden die Software-Pakete Athena 0.8.061 und EXAFSPAK verwendet.^{156, 157} Die Berechnung theoretischer Streuphasen und Amplituden erfolgte mit FEFF8.40 anhand der Kristallstruktur des Fe(III)-Transferrins (RCSB-PDB-Eintrag: 3QYT), indem Fe(III) durch Am(III), Np(V) oder Eu(III) ersetzt wurde.¹⁵⁸ Das beste theoretische Modell wurde für die Anpassung der k^3 -gewichteten Am/Np/Eu-EXAFS-Daten (L_{III} -Kante) verwendet.

3.6. Fluorimetrie

Fluoreszenzmessungen an Transferrin als Funktion der Metallionenkonzentration wurden an einem Aminco-Bowman Series 2 Spektrofluorimeter durchgeführt. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 3.3 gezeigt. Als Lichtquelle dient eine 150 W Continuous Wave Xenon-Lampe, die ein nahezu kontinuierliches Emissionsspektrum von ca. 200 – 800 nm aufweist. Die Selektion der Anregungswellenlänge erfolgt mit Hilfe eines Monochromators, wobei Intensität und spektrale Auflösung anhand eines Ein- und Ausgangspaltes gesteuert werden. Zur Anregung der aromatischen Aminosäuren des Transferrins werden Wellenlängen von 280 nm bzw. 290 nm gewählt. Um die Fluoreszenzemission auf die Anregungsenergie zu kalibrieren, wird ein kleiner Teil des Strahles ausgekoppelt und mit einer Referenzphotodiode detektiert. Der Hauptteil der Strahlung trifft auf die Küvette im Probenhalter, wo das Fluoreszenzlicht im 90°-Winkel zum einfallenden Strahl gemessen wird. Dabei wird die gewünschte Detektionswellenlänge aus dem Fluoreszenzspektrum isoliert und mittels eines Photoelektronenvervielfachers

3. Experimenteller Teil

detektiert. Ebenso wie beim Excitationsmonochromator dienen Ein- und Ausgangsspalt zur Steuerung der Intensität und Auflösung.

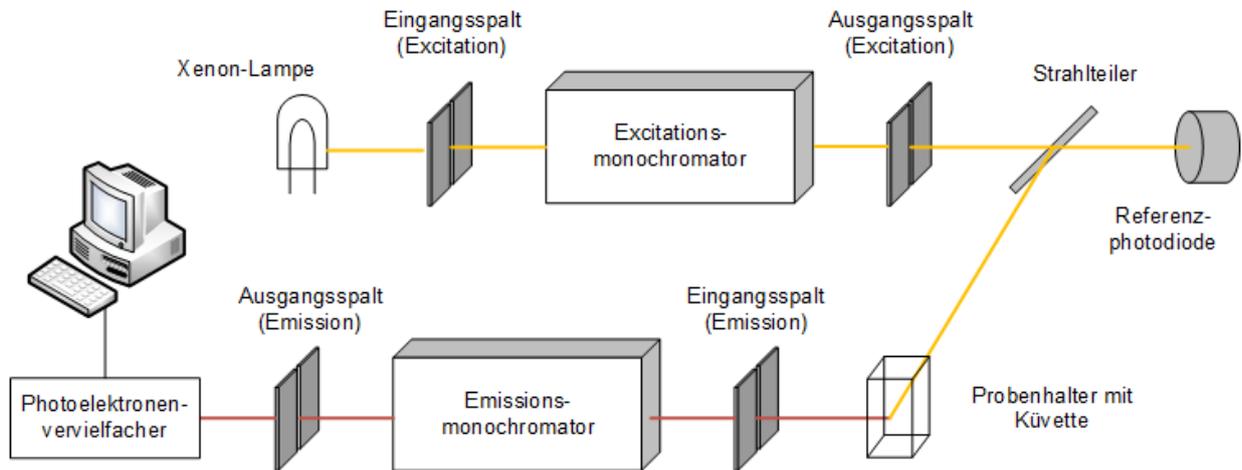


Abbildung 3.3 Schematischer Aufbau des Spektrofluorimeters Aminco-Bowman 2.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Komplexierung von Cm(III) mit Transferrin

Die Komplexierung von Cm(III) mit Transferrin wurde in Abhängigkeit des pH-Wertes bei Raumtemperatur (296 K) und bei physiologischer Temperatur (310 K) sowie bei verschiedenen Carbonatkonzentrationen ($c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 0 \text{ mM}, 0,23 \text{ mM}$ und 25 mM) mittels TRLFS untersucht. Neben der Identifikation und Charakterisierung der verschiedenen Cm(III)-Spezies ist die Abhängigkeit der Komplexierungsreaktion von der Carbonatkonzentration sowie der Einfluss der Temperatur von besonderem Interesse.

Die C- und N-terminalen Bindungsstellen unterscheiden sich sowohl in ihren kinetischen als auch thermodynamischen Eigenschaften. Dies zeigt sich auch anhand der Stabilitätskonstanten, die bei pH 8,6 für die Komplexierung von Cm(III) am C- und N-Lobe des Transferrins bestimmt wurden ($\log K_C = 8,8 \pm 0,3$, $\log K_N = 7,0 \pm 0,1$).⁸⁵ Die $\log K$ -Werte unterschieden sich um fast zwei Größenordnungen, wobei Cm(III) bevorzugt an der C-terminalen Bindungsstelle komplexiert. Da bei den TRLFS-Untersuchungen Transferrin in deutlichem Überschuss eingesetzt wurde ($c(\text{Cm}) = 1,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, $c(\text{Tf}) = 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$), kann aufgrund der unterschiedlichen Komplexierungseigenschaften der beiden Bindungsstellen sichergestellt werden, dass unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen Cm(III) ausschließlich an der Fe(III)-Bindungsstelle des C-Lobes komplexiert und ein Cm(III)-Transferrin-Komplex mit 1:1-Stöchiometrie gebildet wird. Daher beschreiben die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse die Komplexierung von Cm(III) an der C-terminalen Bindungsstelle des Transferrins.

4.1.1. Komplexierung von Cm(III) mit Transferrin bei Raumtemperatur

4.1.1.1. Emissionsspektren von Cm(III) mit Transferrin

Die Komplexierung von Cm(III) mit Transferrin bei Raumtemperatur (296 K) wurde im pH-Bereich von 3,5 bis 11,0 mittels TRLFS untersucht. Hierfür wurden zwei Proben mit $c(\text{Cm}) = 1,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ und $c(\text{Tf}) = 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ bei pH 7,4 verwendet. Der pH-Wert der Proben wurde durch Zugabe von HCl oder NaOH schrittweise erniedrigt bzw. erhöht und für jeden pH-Schritt ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen. Um eine mögliche Komplexierung von Cm(III) mit dem Puffermedium auszuschließen, wurden zunächst Messungen in TRIS- und HEPES-gepufferten Lösungen durchgeführt. Diese liefern im gesamten untersuchten pH-Bereich identische Spektren, wie in Abbildung 4.1 exemplarisch für pH 7,4 (links) und 9,3 (rechts) gezeigt ist. Dies bestätigt, dass im pH-Bereich von 3,5 bis 11,0 keine zusätzliche Wechselwirkung von Cm(III) mit den Puffermolekülen auftritt. Im Folgenden wurden alle Messungen in TRIS-gepufferten Lösungen durchgeführt.

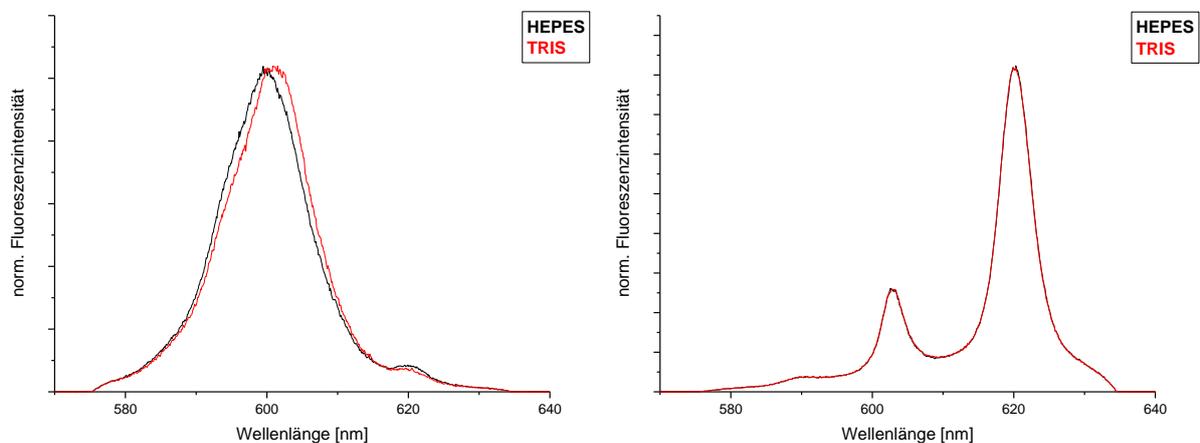


Abbildung 4.1 Flächennormierte Fluoreszenzspektren von Cm(III) mit Transferrin in HEPES- und TRIS-gepufferten Lösung bei pH 7,4 (links) und pH 9,3 (rechts); $T = 296 \text{ K}$, $c(\text{Cm}) = 1,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, $c(\text{Tf}) = 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

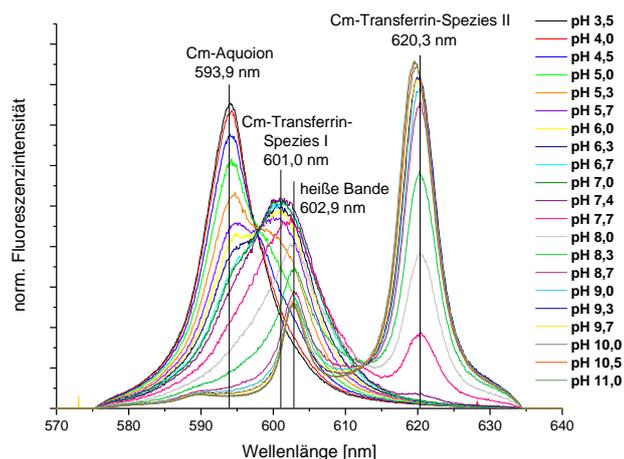


Abbildung 4.2 Flächennormierte Fluoreszenzspektren von Cm(III) mit Transferrin im pH-Bereich von 3,5 bis 11,0 bei $T = 296 \text{ K}$; $c(\text{Cm}) = 1,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, $c(\text{Tf}) = 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

Abbildung 4.2 zeigt die flächennormierten Fluoreszenzspektren von Cm(III) mit Transferrin im pH-Bereich von 3,5 bis 11,0. Die Komplexbildungsreaktion von Cm(III) mit Transferrin ist stark pH-abhängig. Bis zu einem pH-Wert von 5,3 dominiert die Emissionsbande des Cm(III)-Aquoions mit einem Emissionsmaximum bei $\lambda_{\text{max}} = 593,9 \text{ nm}$.^{131, 133, 136} Mit zunehmendem pH-Wert tritt eine Emissionsbande bei $\lambda_{\text{max}} = 601,0 \text{ nm}$ auf, deren Intensitätsmaximum bei $\text{pH} = 7,4$ erreicht wird. Ein Vergleich der Fluoreszenzspektren mit den entsprechenden Referenzspektren ohne Transferrin (hier nicht gezeigt) bestätigt, dass die Emissionsbande bei $\lambda_{\text{max}} = 601,0 \text{ nm}$ auf die Wechselwirkung von Cm(III) mit Transferrin zurückzuführen ist. Diese Komplexspezies wird im Folgenden als Cm(III)-Transferrin-Spezies I bezeichnet. Bei einer weiteren Erhöhung des pH-Wertes tritt ab $\text{pH} 7,4$ die Emissionsbande einer zweiten Cm(III)-Transferrin-Spezies auf (Cm(III)-Transferrin-Spezies II). Die Spektren zeigen eine sehr schmale Emissionsbande mit einem Emissionsmaximum bei $\lambda_{\text{max}} = 620,3 \text{ nm}$ sowie einer heißen Bande bei $\lambda_{\text{max}} = 602,9 \text{ nm}$. Diese resultiert aus der Fluoreszenzemission aus einem energetisch höher liegenden, teilweise besetzten Ligandenfeldniveau des ersten angeregten Zustandes ${}^6\text{D}'_{7/2}$ des Cm(III)-Ions.

Um zu bestätigen, dass es sich bei der Emissionsbande bei $\lambda_{\text{max}} = 602,9 \text{ nm}$ tatsächlich um eine heiße Bande und nicht um die Emissionsbande einer weiteren Cm(III)-Transferrin-Spezies handelt, wurde eine Cm(III)-Transferrin-Probe mit einem pH-Wert von 9,0 selektiv bei 603 nm und 620 nm, entsprechend den Emissionsmaxima der Emissionsbande sowie der heißen Bande, angeregt (Abbildung 4.3). Die Spektren sind identisch und zeigen, dass es sich bei der Bande bei 602,9 nm tatsächlich um

eine heiße Bande handelt. Dies bestätigt, dass bei hohen pH-Werten ausschließlich die Cm(III)-Transferrin-Spezies II vorliegt. Die Charakteristika des Emissionsspektrums stimmen mit den Ergebnissen von *Sturzbecher-Hoehne et al.* überein, die die Komplexierung von Cm(III) mit Transferrin bei pH 8,6 untersuchten und ein vergleichbares Spektrum mit einer Emissionsbande sowie einer deutlich ausgeprägten heißen Bande erhielten.⁸⁵

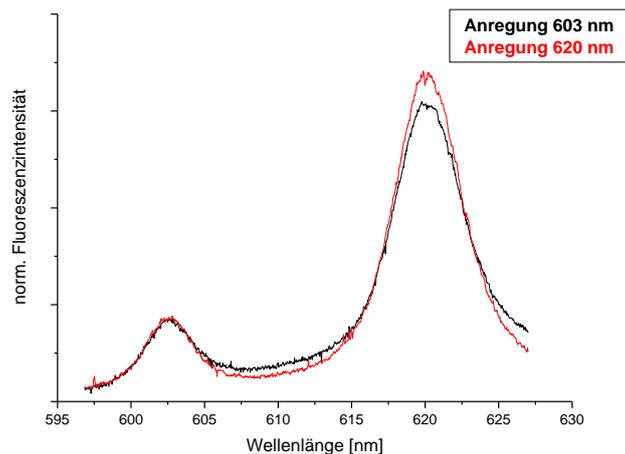


Abbildung 4.3 Flächennormierte Fluoreszenzspektren von Cm(III) mit Transferrin bei pH 9,0, die nach Anregung bei $\lambda = 603$ nm und $\lambda = 620$ nm erhalten wurden; $T = 296$ K, $c(\text{Cm}) = 1,0 \cdot 10^{-6}$ M und $c(\text{Tf}) = 5,0 \cdot 10^{-5}$ M.

Die Emissionsbanden beider Cm(III)-Transferrin-Spezies sind im Vergleich zur Bande des Cm(III)-Aquoions ($\lambda_{\text{max}} = 593,9$ nm) bathochrom verschoben. Die bei der Komplexierung auftretende Verschiebung der Emissionsbanden ist ein Maß für die Ligandenfeldaufspaltung. Die Verschiebung der Emissionsbande der Cm(III)-Transferrin-Spezies I bei $\lambda_{\text{max}} = 601,0$ nm relativ zu der des Cm(III)-Aquoions beträgt 7,2 nm und liegt somit in der typischen Größenordnung für Cm(III)-Komplexe mit verschiedenen organischen Bioliganden.¹⁵⁹⁻¹⁶¹ Im Gegensatz dazu weist die Emissionsbande der Cm(III)-Transferrin-Spezies II bei $\lambda_{\text{max}} = 620,3$ nm eine außergewöhnlich große bathochrome Verschiebung von 26 nm relativ zur Emissionsbande des Cm(III)-Aquoions auf. Bisher wurden solch große Verschiebungen ausschließlich beim Einbau von Cm(III) in Mineralphasen wie Calcit- oder Ca-Montmorillonit-Strukturen beobachtet.¹²⁷⁻¹³⁰ Außerdem ist die Emissionsbande bei 620,3 nm sehr schmal, was charakteristisch für Komplexe mit chelatisierenden Liganden wie beispielsweise EDTA ist (siehe Spektrum der Cm(III)-EDTA-Spezies in Abbildung 4.22). Die Bande der Cm(III)-Transferrin-Spezies I hingegen ist deutlich

breiter, was typisch für Cm(III)-Sorptionsspezies ist.^{130, 162-164} Diese Unterschiede in Form und Verschiebung der beiden Emissionsbanden der Cm(III)-Transferrin-Spezies deuten darauf hin, dass Cm(III) bei höheren pH-Werten an der Fe(III)-Bindungsstelle des Transferrins komplexiert. Das Protein fungiert dabei als starker Chelatligand, weshalb die spektroskopischen Charakteristika der Emissionsbande einem „Einbau“ des Cm(III) in die Proteinstruktur entsprechen. Bei der Cm(III)-Transferrin-Spezies I hingegen erfolgt nur eine partielle Komplexierung von Cm(III) durch das Protein, wobei vermutlich eine nichtspezifische Bindung an Aminosäuren auf der Proteinoberfläche vorliegt.

Die Emissionsbande der Cm(III)-Transferrin-Spezies II zeigt mit zunehmendem pH-Wert eine leicht hypsochrome Verschiebung. Während das Emissionsmaximum bei $\text{pH} \leq 8,7$ bei $\lambda_{\text{max}} = 620,3 \text{ nm}$ liegt, wird es im basischen pH-Bereich bis $\text{pH} 11,0$ um $0,7 \text{ nm}$ verschoben ($\lambda_{\text{max}} = 619,6 \text{ nm}$ bei $\text{pH} 11,0$). Allerdings bleiben die Form der Emissionsbande sowie der heißen Bande im gesamten pH-Bereich unverändert. Dies zeigt, dass die erste Koordinationssphäre von Cm(III) im Transferrin-Komplex auch bei einer Erhöhung des pH-Wertes intakt bleibt. Allerdings können verschiedene funktionelle Gruppen im Protein deprotoniert werden, wodurch strukturelle Veränderungen in der sekundären oder tertiären Koordinationssphäre des Cm(III)-Transferrin-Komplexes auftreten können, was in einer leichten hypsochromen Verschiebung der Emissionsbande resultiert.

4.1.1.2. f_i -Faktoren und Speziation

Für die quantitative Auswertung der Emissionsspektren von Cm(III) mit Transferrin in Abhängigkeit des pH-Wertes werden die Emissionsspektren der Einzelkomponenten, d.h. des Cm(III)-Aquoions sowie der beiden Cm(III)-Transferrin-Spezies, benötigt. Das Spektrum des Cm(III)-Aquoions wurde anhand einer Probe von $\text{Cm}(\text{ClO}_4)_3$ in $0,1 \text{ M HClO}_4$ direkt gemessen. Da die Cm(III)-Transferrin-Spezies II bei hohen pH-Werten als Reinspezies vorliegt, wurde das Emissionsspektrum bei $\text{pH} 9,7$ als Spektrum dieser Einzelkomponente verwendet. Die Cm(III)-Transferrin-Spezies I hingegen liegt im untersuchten pH-Bereich nicht als Reinspezies vor, weshalb das Spektrum dieser Spezies iterativ aus den gemessenen Spektren der pH-

Titration ermittelt wurde. Abbildung 4.4 zeigt die flächennormierten Fluoreszenzspektren des Cm(III)-Aquoions sowie der beiden Cm(III)-Transferrin-Spezies.

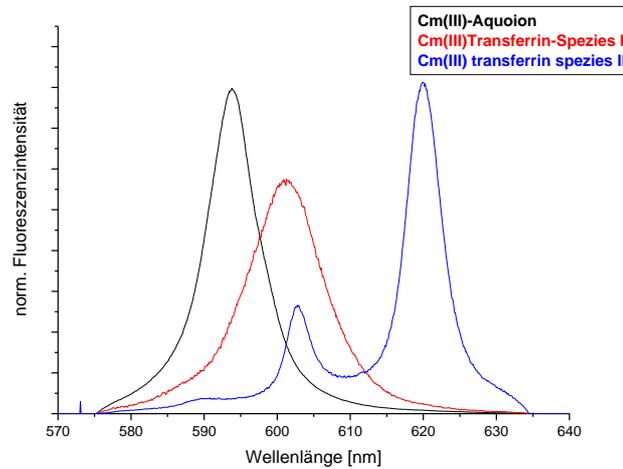


Abbildung 4.4 Flächennormierte Fluoreszenzspektren des Cm(III)-Aquoions sowie der Cm(III)-Transferrin-Spezies I und II.

Die Flächenanteile des Cm(III)-Aquoions sowie der beiden Cm(III)-Transferrin-Spezies I und II an den gemessenen, pH-abhängigen Spektren der Titration werden mittels Peakentfaltung bestimmt. Dabei werden die Emissionsspektren der Titration als Linearkombination aus den zuvor ermittelten Spektren des Cm(III)-Aquoions sowie der Cm(III)-Transferrin-Spezies I und II dargestellt. Durch Variation der Anteile der verschiedenen Spezies werden die Residuen zwischen den experimentell bestimmten und den berechneten Spektren minimiert, um eine möglichst genaue Beschreibung des gemessenen Spektrums zu erreichen.

Die durch Peakentfaltung erhaltenen Flächenanteile der einzelnen Spezies an den gemessenen Spektren müssen nun in die entsprechenden Spezieskonzentrationen umgerechnet werden. Dies erfolgt unter Berücksichtigung sogenannter Fluoreszenzintensitätsfaktoren f_i (FI-Faktoren). FI-Faktoren beschreiben die Zu- oder Abnahme der Fluoreszenzintensität I_i einer Spezies i im Verhältnis zur Intensität der Fluoreszenzemission einer Referenzspezies I_{ref} (Gleichung 4.1).^{143, 165} Als Referenzspezies wird in der Regel die Solvensspezies verwendet, d.h. bei den vorliegenden Messungen das Cm(III)-Aquoion. Dessen FI-Faktor wird als 1 definiert.

$$f_i = \frac{I_i}{I_{ref}} \quad (4.1)$$

Der Zusammenhang zwischen der Gesamtfluoreszenzintensität I_{ges} , den relativen Flächenanteilen χ_i und den Fluoreszenzintensitätsfaktoren f_i wird durch folgende Gleichung beschrieben:¹⁴³

$$I_{ges} = \sum_{i=0}^n f_i \chi_i \quad (4.2)$$

Bleibt die Gesamtfluoreszenzintensität im Verlauf der Titration bzw. mit zunehmender Komplexierung konstant, sind die FI-Faktoren aller Spezies gleich 1. Die Konzentrationen der gebildeten Spezies entsprechen in diesem Fall direkt den anhand der durch Peakentfaltung ermittelten Flächenanteilen. Meistens verändert sich jedoch die Gesamtintensität des Fluoreszenzsignals während der Titration. Nimmt die Fluoreszenzintensität im Verlauf der Komplexierung ab, ist $f_i < 1$, bei einer Intensitätszunahme hingegen gilt $f_i > 1$.

Bezogen auf das vorliegende System mit drei Komponenten (Cm(III)-Aquoion, Cm(III)-Transferrin-Spezies I und II) ergibt sich aus Gleichung 4.2 der Ausdruck:

$$I_{ges} = \chi_{Cm_{aq}} f_i(Cm_{aq}) + \chi_{Cm_{tfI}} f_i(Cm_{tfI}) + \chi_{Cm_{tfII}} f_i(Cm_{tfII}) \quad (4.3)$$

Unter Berücksichtigung dieser Gleichung wurde die Gesamtfluoreszenzintensität mittels linearer Regressionsanalyse angepasst. Hierbei wurden die Flächenanteile der verschiedenen Cm(III)-Spezies sowie ein FI-Faktor von 1 für das Cm(III)-Aquoion berücksichtigt. Die zu bestimmenden FI-Faktoren wurden nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate optimiert, um den Verlauf der Fluoreszenzintensität möglichst exakt zu beschreiben. Abbildung 4.5 zeigt die gemessene und berechnete Gesamtfluoreszenzintensität in Abhängigkeit des pH-Wertes. Für die gemessene Fluoreszenzintensität wurde ein Fehler von 10% angenommen, der im Wesentlichen auf Schwankungen der Laserenergie zurückgeführt werden kann.

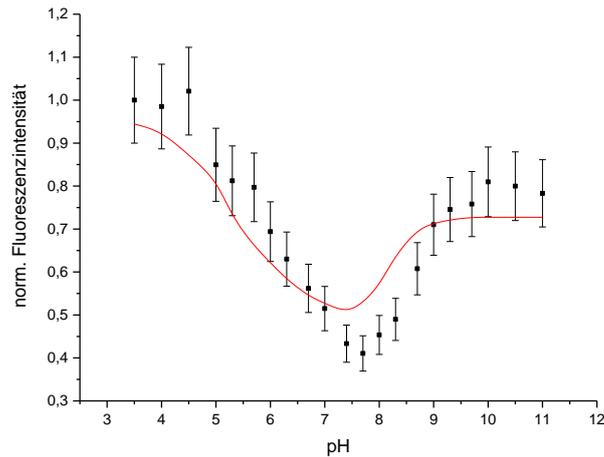


Abbildung 4.5 Experimentell bestimmte (schwarz) sowie berechnete (rot) Fluoreszenzintensität der Emissionsspektren von Cm(III) mit Transferrin in Abhängigkeit des pH-Wertes; $T = 296 \text{ K}$, $c(\text{Cm}) = 1,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $c(\text{Tf}) = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

Anhand von Gleichung 4.3 wurden FI-Faktoren von 0,44 für die Cm(III)-Transferrin-Spezies I und 0,73 für die Cm(III)-Transferrin-Spezies II bestimmt. Üblicherweise treten bei einer Komplexierung mit organischen Liganden $f_i > 1$ auf, wobei je nach Art des Liganden FI-Faktoren von bis zu $f_i = 165$ bekannt sind.¹¹² Eine derart starke Zunahme der Fluoreszenzintensität bei der Komplexierung beruht neben der Erhöhung der Quantenausbeute durch Austausch von Wassermolekülen auf einem intramolekularen Ligand-Metallion-Energietransfer.¹⁶⁶ Dies legt eine Überlappung der beteiligten Orbitale von Ligand und Metallion zugrunde.¹⁶⁷ Die FI-Faktoren, die für die Cm(III)-Transferrin-Spezies I und II bestimmt wurden, sind jedoch < 1 . Sie sind vergleichbar mit FI-Faktoren, die üblicherweise bei der Sorption von Cm(III) an Mineraloberflächen oder bei kolloidalen Cm(III)-Spezies auftreten.^{168, 169} Die niedrigen FI-Faktoren der beiden Cm(III)-Transferrin-Spezies können darauf zurückgeführt werden, dass bei einer Anregung bei 396,6 nm (Anregungsmaximum von Cm(III)) kein Energieübertrag vom Protein auf das Metallion erfolgt, da der Absorptionskoeffizient von Transferrin bei dieser Wellenlänge vernachlässigbar klein ist. Im Gegensatz hierzu konnten *Sturzbecher-Hoehne et al.* zeigen, dass die Fluoreszenzintensität der Cm(III)-Transferrin-Spezies II bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm (Absorptionsmaximum von Transferrin) ca. 10^7 mal größer ist als bei einer Anregungswellenlänge von 397 nm (Anregung von Cm(III)), da unter diesen Bedingungen ein effektiver Energieübertrag vom Protein auf das Metallion erfolgt.⁸⁵ Die indirekte Anregung eines Metallions durch Anregung des Liganden gefolgt von

einem intramolekularen Energietransfer auf das Metallion wird als Antenneneffekt bezeichnet.¹⁶⁶

Die Konzentrationen c_i der verschiedenen Spezies werden anhand der Flächenanteile χ_i , der Gesamtkonzentration des Metallions c_m sowie der zuvor ermittelten FI-Faktoren berechnet:

$$c_i = \frac{\frac{\chi_i}{f_i}}{\sum_l \frac{\chi_l}{f_l}} \cdot c_m \quad (4.4)$$

Auf diese Weise kann für die Cm(III)-Transferrin-Komplexierung die in Abbildung 4.6 gezeigte Speziesverteilung berechnet werden, die die Konzentrationen des Cm(III)-Aquoions sowie der Cm(III)-Transferrin-Spezies I und II in Abhängigkeit des pH-Wertes beschreibt. Das Cm(III)-Aquoion dominiert die Speziation bis zu einem pH-Wert von 4,7, allerdings nimmt die Konzentration mit zunehmendem pH-Wert kontinuierlich ab. Die Cm(III)-Transferrin-Spezies I wird im pH-Bereich von 3,5 bis 9,7 gebildet und ist die dominierende Spezies zwischen pH 5,0 und 8,2. Ab $\text{pH} \geq 7,0$ nimmt der Anteil der Cm(III)-Transferrin-Spezies II kontinuierlich zu, bis sie bei $\text{pH} \geq 9,7$ quantitativ vorliegt.

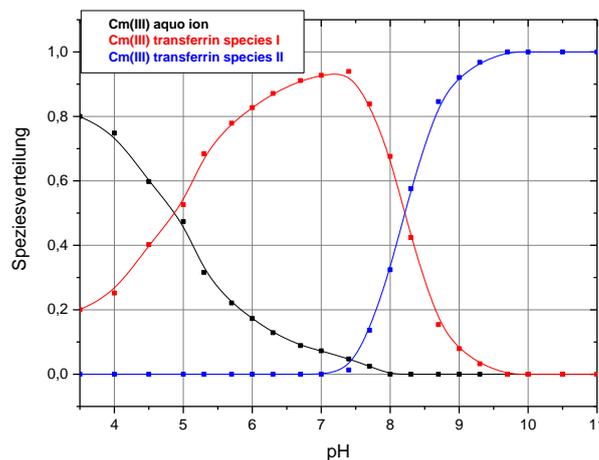


Abbildung 4.6 Speziation von Cm(III) mit Transferrin in Abhängigkeit des pH-Wertes; $T = 296 \text{ K}$, $c(\text{Cm}) = 1,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $c(\text{Tf}) = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

Da die FI-Faktoren temperaturabhängig und experimentspezifisch sind, müssen sie für jede Messreihe neu bestimmt werden. Allerdings liegen die FI-Faktoren für alle in dieser Arbeit auftretenden Cm(III)-Spezies im Bereich von $1 \pm 0,6$, d.h. sie sind im

Vergleich zu anderen Systemen, bei denen die FI-Faktoren teilweise um den Faktor 10 bis 100 größer sind, verhältnismäßig klein. Bei der Komplexierung von Cm(III) mit Transferrin tritt folglich keine signifikante Zu- oder Abnahme der Fluoreszenzintensität auf und der Einfluss der FI-Faktoren auf die Speziesverteilungen ist vernachlässigbar. Trotzdem wurden bei allen Messungen, die in dieser Arbeit diskutiert werden, die FI-Faktoren für alle auftretenden Spezies bestimmt und bei der Berechnung der Speziationen berücksichtigt.

Die Komplexierung von Cm(III) mit Transferrin kann mit der des Gd(III) verglichen werden. Gd ist das Homologe von Cm aus der Lanthanidenreihe. Die trivalenten Ionen beider Metalle weisen ähnliche physikalische und chemische Eigenschaften sowie vergleichbare effektive Ionenradien auf ($IR_{Gd(III)} = 110,7$ pm, $IR_{Cm(III)} = 114,6$ pm bei Koordinationszahl neun), weshalb sie auch in ihrem Komplexierungsverhalten vergleichbar sind.^{92, 170} UV/Vis-, ESR- und NMRD-Messungen zeigen, dass Gd(III) bei $pH \geq 8,0$ stöchiometrisch an den beiden Fe(III)-Bindungsstellen des Transferrins komplexiert.⁶⁵ Bei $pH \leq 7,0$ hingegen wird eine nichtspezifische Gd(III)-Transferrin-Spezies gebildet. Diese Ergebnisse stimmen mit der Bildung der Cm(III)-Transferrin-Spezies II bei $pH \geq 7,0$ sowie der unspezifischen Cm(III)-Transferrin-Spezies I bei kleineren pH-Werten sehr gut überein.

4.1.1.3. Fluoreszenzlebensdauern der Cm(III)-Transferrin-Spezies

Neben den Emissionsspektren liefert auch die Fluoreszenzlebensdauer τ des angeregten ${}^6D'_{7/2}$ -Zustands Informationen über die Koordinationssphäre der beiden Cm(III)-Transferrin-Spezies. Da die Cm(III)-Transferrin-Spezies II bei hohen pH-Werten als Reinkomponente vorliegt, kann die Lebensdauer direkt aus der zeitabhängigen Abnahme der Fluoreszenzintensität ermittelt werden. Hierfür wurden mehrere Messungen bei pH-Werten zwischen 9,0 und 10,0 durchgeführt. Abbildung 4.7 zeigt exemplarisch die zeitabhängige Abnahme der Cm(III)-Fluoreszenzintensität sowie die lineare Anpassung für eine Cm(III)-Transferrin-Probe bei pH 9,7. Die Fluoreszenzlebensdauer wurde sowohl für den Bereich der heißen Bande (600 – 607 nm, Abbildung 4.7 (links)) als auch der Emissionsbande der Cm(III)-Transferrin-Spezies II (610 – 645 nm, Abbildung 4.7 (rechts)) getrennt

bestimmt. In beiden Fällen folgt die Abnahme der Fluoreszenzintensität einem monoexponentiellen Zeitgesetz, sodass eine lineare Regression der logarithmischen Intensität durchgeführt werden konnte. Die Steigung k_{obs} der linearen Anpassung entspricht dem Reziproken der Fluoreszenzlebensdauer τ (siehe Gleichung 2.1). Die mittleren Lebensdauern τ , die anhand einer Vielzahl verschiedener Messungen für die heiße Bande bei $\lambda_{\text{max}} = 602,9 \text{ nm}$ sowie die Emissionsbande bei $\lambda_{\text{max}} = 620,3 \text{ nm}$ bestimmt wurden, stimmen im Fehlerbereich sehr gut überein. Auch dies bestätigt, dass es sich bei der Bande bei $\lambda_{\text{max}} = 602,9 \text{ nm}$ tatsächlich um eine heiße Bande und keine zusätzliche Cm(III)-Komplexspezies handelt.

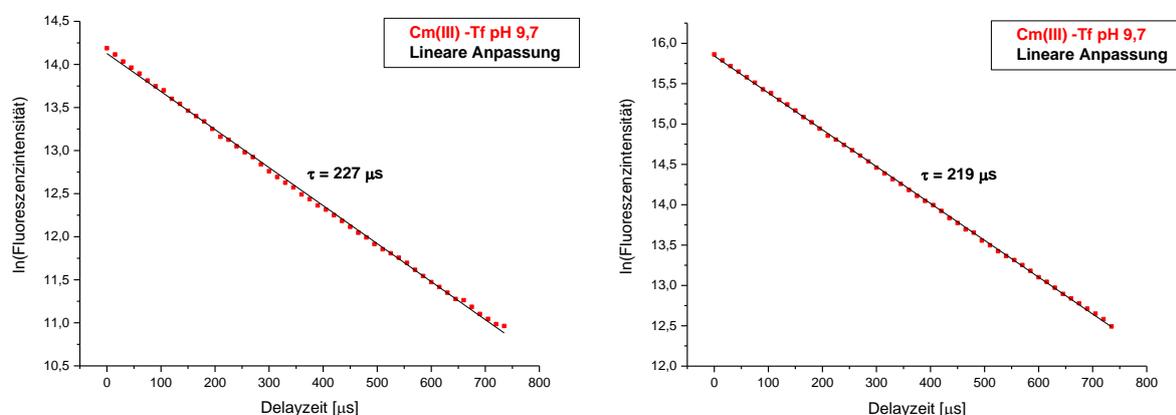


Abbildung 4.7 Zeitabhängigkeit der Fluoreszenzemission von Cm(III) mit Transferrin bei pH 9,7 im Bereich der heißen Bande (600 – 607 nm, links) sowie der Emissionsbande der Cm(III)-Transferrin-Spezies II (610 – 645 nm, rechts); $T = 296 \text{ K}$, $c(\text{Cm}) = 1,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, $c(\text{Tf}) = 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

Für die Cm(III)-Transferrin-Spezies II wurde im pH-Bereich zwischen 9,0 und 10,0 eine mittlere Fluoreszenzlebensdauer von $\tau = 221 \pm 10 \mu\text{s}$ bestimmt. Dieser Wert stimmt sehr gut mit den Lebensdauern von Cm_cTf ($220 \mu\text{s}$) und Cm_NTf ($206 \mu\text{s}$) überein, die bei pH 8,6 von *Sturzbecher-Hoehne et al.* ermittelt wurden.⁸⁵ Die exzellente Übereinstimmung der Fluoreszenzlebensdauer von $\tau = 221 \pm 10 \mu\text{s}$ mit dem Wert für Cm_cTf bestätigt zudem, dass Cm(III) unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen aufgrund des großen Transferrinüberschusses primär an der C-terminalen Bindungsstelle komplexiert und somit ein Cm(III)-Transferrin-Komplex mit 1:1-Stöchiometrie gebildet wird (siehe Kapitel 4.1).

Gemäß der Kimura-Gleichung entspricht die Fluoreszenzlebensdauer der Cm(III)-Transferrin-Spezies II von $\tau = 221 \pm 10 \mu\text{s}$ $2,2 \pm 0,5$ Wassermolekülen in der ersten Koordinationssphäre des Metallions.^{137, 138} Da Cm(III) üblicherweise eine Koor-

dinationszahl von neun aufweist, sind neben den zwei Wassermolekülen sieben weitere Liganden an der Komplexbildung beteiligt. Kristallstrukturanalysen zeigen, dass Fe(III) an den Bindungsstellen des Transferrins von vier Aminosäureresten (His, Asp, und zwei Tyr) sowie dem synergistischen Anion Carbonat komplexiert wird.³⁴ Auch Cm(III) wird an der Bindungsstelle von den vier Aminosäureresten des Transferrins komplexiert. Darüber hinaus befinden sich zwei Wassermoleküle und drei weiteren Koordinationsstellen in der ersten Koordinationssphäre des Cm(III). OH⁻, CO₃²⁻ und HCO₃⁻ sind in der Lösung vorhanden und könnten als zusätzliche Liganden für Cm(III) fungieren. Allerdings ist es nicht möglich, mit TRLFS Art und Anzahl der Liganden in der ersten Koordinationssphäre von Cm(III) eindeutig zu identifizieren. Der Einfluss von Carbonat auf die Cm(III)-Transferrin-Komplexierung und seine Funktion als synergistisches Anion wird deshalb in Kapitel 4.1.3 ausführlich behandelt. Abbildung 4.8 zeigt einen Strukturvorschlag für die Cm(III)-Transferrin-Spezies II.

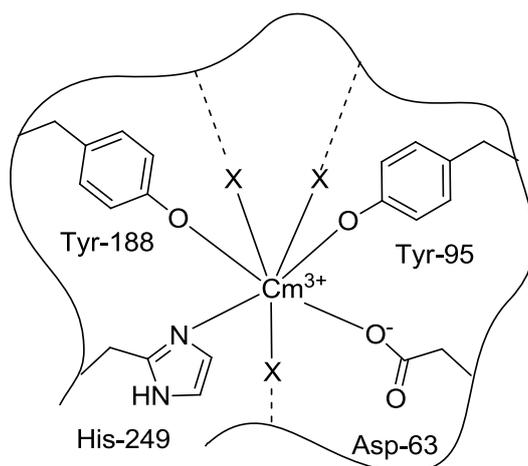


Abbildung 4.8 Strukturvorschlag für die Cm(III)-Transferrin-Spezies II.

Die Cm(III)-Transferrin-Spezies I liegt im gesamten untersuchten pH-Bereich nicht als alleinige Komponente vor. Daher wurde die Fluoreszenzlebensdauer dieser Spezies durch biexponentielle Anpassung aus Speziesgemischen bei pH 6,0 und 7,0 ermittelt. In diesem pH-Bereich liegen das Cm(III)-Aquoion und die Cm(III)-Transferrin-Spezies I im Gleichgewicht vor. Daher wurde als Fluoreszenzlebensdauer der kürzerlebigen Spezies die des Cm(III)-Aquoions verwendet ($\tau = 65 \mu\text{s}$).¹³⁶ Anhand einer Vielzahl verschiedener Messungen wurde eine mittlere Fluoreszenzlebensdauer von $\tau = 129 \pm 20 \mu\text{s}$ für die Cm(III)-Transferrin-Spezies I bestimmt. Der größere Fehler im Vergleich zur Lebensdauer der Cm(III)-Transferrin-

Spezies II resultiert aus der insgesamt geringeren Fluoreszenzintensität sowie der Methode der biexponentiellen Anpassung.

Die Lebensdauer der Cm(III)-Transferrin-Spezies I von $\tau = 129 \pm 20 \mu\text{s}$ entspricht gemäß der Kimura-Gleichung $4,2 \pm 1,0$ Wassermolekülen in der ersten Koordinationssphäre.^{137, 138} Folglich wird das Metallion von vier bis fünf weiteren Liganden komplexiert. Hierbei handelt es sich vermutlich um Aminosäuren des Proteins und Anionen wie OH^- , CO_3^{2-} oder HCO_3^- . Neben der Fluoreszenzlebensdauer deuten sowohl die Breite der Emissionsbande als auch die im Vergleich zur Cm(III)-Transferrin-Spezies II geringere bathochrome Verschiebung von 7,2 nm relativ zur Emissionsbande des Cm(III)-Aquoions darauf hin, dass es sich bei der Cm(III)-Transferrin-Spezies I um eine unspezifisch gebundene Cm(III)-Transferrin-Komplexspezies handelt, bei der Cm(III) an Aminosäuren auf der Oberfläche des Proteins komplexiert.

4.1.1.4. Kinetikuntersuchungen von Cm(III) mit Transferrin

Viele Liganden wie beispielsweise DOTA weisen langsame Komplexierungskinetiken auf.¹⁷¹⁻¹⁷⁴ Da der effektive Ionenradius von Cm(III) zudem fast doppelt so groß ist wie der von Fe(III) ($\text{IR}_{\text{Fe(III)}} = 55 \text{ pm}$, $\text{IR}_{\text{Cm(III)}} = 97 \text{ pm}$, die Werte gelten für eine Koordinationszahl von sechs und Fe(III)-*low-spin*-Konfiguration), passt das Cm(III)-Ion nicht ideal in die Bindungsstelle des Transferrins.⁹² Dies könnte eine langsame Komplexierungskinetik zur Folge haben.

Daher wurde vor der Durchführung der Komplexierungsstudien (Kapitel 4.1.1.1 bis 4.1.1.3) die Komplexierung von Cm(III) mit Transferrin bei verschiedenen pH-Werten in Abhängigkeit der Zeit untersucht. Abbildung 4.9 zeigt exemplarisch die Emissionsspektren von zwei Cm(III)-Transferrin-Proben bei pH 7,4 und 9,0 im Zeitraum zwischen 0 und 96 Stunden. Die Emissionsbanden bei pH 7,4 (> 90% Cm(III)-Transferrin-Spezies I) und pH 9,0 (Cm(III)-Transferrin-Spezies II) bleiben im gesamten Zeitraum unverändert. Dies zeigt, dass die Komplexierungsreaktion für beide Cm(III)-Transferrin-Spezies sehr schnell verläuft. Bei beiden pH-Werten ist das Gleichgewicht schon nach weniger als fünf Minuten erreicht, weshalb bei den TRLFS-Untersuchungen mit Cm(III)-Transferrin keine langen Equilibrationszeiten berücksichtigt werden müssen.

4. Ergebnisse und Diskussion

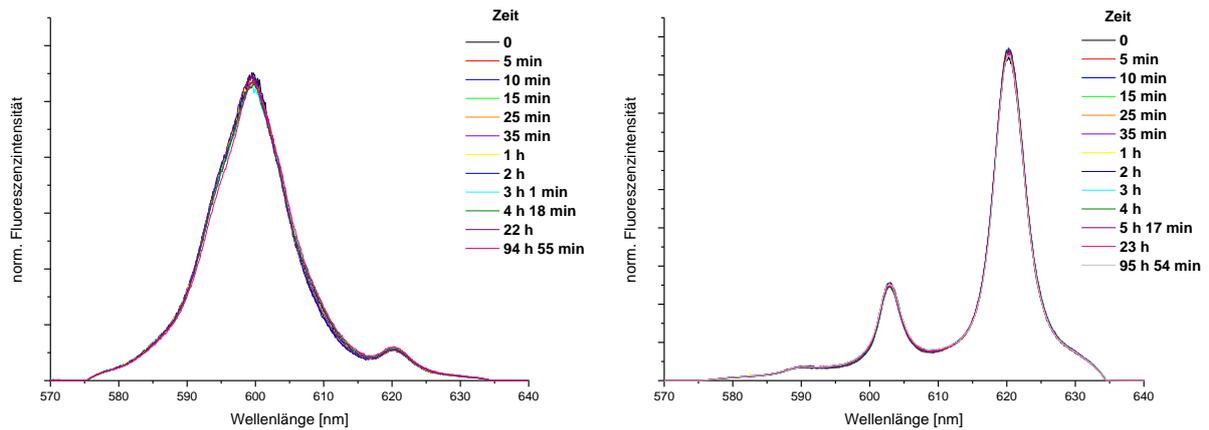


Abbildung 4.9 Fluoreszenzspektren von Cm(III) mit Transferrin bei pH 7,4 (links) und 9,0 (rechts) im Zeitraum von 0 bis 96 Stunden; $T = 296 \text{ K}$ $c(\text{Cm}) = 1,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, $c(\text{Tf}) = 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

4.1.1.5. Bestimmung der Stabilitätskonstanten der Cm(III)-Transferrin-Spezies II

Um die Komplexierung von Cm(III) an der Fe(III)-Bindungsstelle des Transferrins auch quantitativ beschreiben zu können, wurde die Stabilitätskonstante der Cm(III)-Transferrin-Spezies II bestimmt. Hierfür wurde die Komplexierung von Cm(III) mit Transferrin in Abhängigkeit der Transferrinkonzentration beim physiologisch relevanten pH-Wert von 7,4 untersucht (Abbildung 4.10).

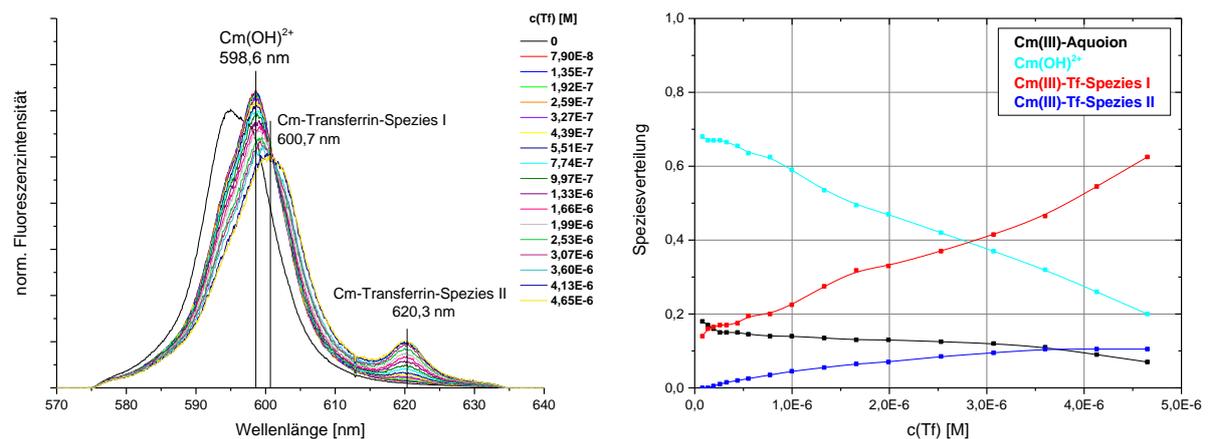
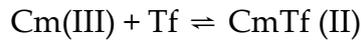


Abbildung 4.10 Flächennormierte Fluoreszenzspektren (links) und Speziation (rechts) von Cm(III) mit Transferrin in Abhängigkeit der Transferrinkonzentration bei pH 7,4; $T = 296 \text{ K}$, $c(\text{Cm}) = 1,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, $c(\text{Tf}) = 0 - 4,65 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

Die Bildung der Cm(III)-Transferrin-Spezies II wird durch folgende Gleichgewichtsreaktion beschrieben:



Unter Anwendung des Massenwirkungsgesetzes erhält man für die Gleichgewichtskonstante K:

$$K = \frac{[\text{CmTf (II)}]}{[\text{Cm(III)}]_{\text{frei}}[\text{Tf}]_{\text{frei}}} \quad (4.5)$$

Logarithmieren und Umformen von Gleichung 4.5 führt zu folgendem Zusammenhang:

$$\log\left(\frac{[\text{CmTf (II)}]}{[\text{Cm(III)}]_{\text{frei}}}\right) = \log[\text{Tf}]_{\text{frei}} + \log K \quad (4.6)$$

Die Transferrinkonzentration [Tf] sowie die freie Cm(III)-Konzentration [Cm(III)]_{frei} wird unter Berücksichtigung der Gleichungen 4.7 und 4.8 berechnet, wobei die Konzentrationen der Cm(III)-Hydrolysespezies sowie der beiden Cm(III)-Transferrin-Spezies durch Peakentfaltung der in Abbildung 4.10 gezeigten Emissionsspektren zugänglich sind.

$$[\text{Tf}] = [\text{Tf}]_{\text{tot}} - [\text{CmTf (I)}] - [\text{CmTf (II)}] \quad (4.7)$$

$$[\text{Cm(III)}]_{\text{frei}} = [\text{Cm(III)}]_{\text{tot}} - [\text{Cm(OH)}^{2+}] - [\text{CmTf (I)}] - [\text{CmTf (II)}] \quad (4.8)$$

Da ausschließlich Transferrinmoleküle, bei denen die vier Aminosäurereste an der Bindungsstelle (Asp, His, 2 Tyr) deprotoniert sind, Metallionen komplexieren, muss die freie Konzentration des vierfach deprotonierten Transferrins bestimmt werden. Diese wird im Folgenden als [Tf]_{frei} bezeichnet. Da die pK_s-Werte der Aminosäurereste an der C-terminalen Bindungsstelle nicht bekannt sind, werden im Rahmen einer Abschätzung die pK_s-Werte der freien Aminosäuren Asp, His und Tyr (Tabelle 4.1) verwendet. Beim physiologisch relevanten pH-Wert von 7,4 ist in erster Linie der pK_s-Wert der Tyrosinreste von 10,07 relevant, die anderen Aminosäurereste können als vollständig deprotoniert angenommen werden.

Tabelle 4.1 Übersicht über die pK_s-Werte der Aminosäuren Asp, Tyr und His.¹⁷⁵

Aminosäure	pK _s -Wert ¹⁷⁵
Asp	3,65
His	6,0
Tyr	10,07

Gleichung 4.6 beschreibt einen linearen Zusammenhang zwischen dem Logarithmus des Konzentrationsverhältnisses $[CmTf(II)]/[Cm(III)]$ sowie dem Logarithmus von $[Tf]_{frei}$. Durch eine Auftragung von $\log\left[\frac{[CmTf(II)]}{[Cm(III)]}\right]$ gegen $\log[Tf]_{frei}$ ergibt sich eine Gerade, deren Steigung der Anzahl der koordinierten Transferrinmoleküle pro Cm(III) entspricht. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen sollte Cm(III) ausschließlich an der C-terminalen Bindungsstelle koordinieren, weshalb eine Steigung von eins erwartet wird. Solche als Steigungsanalysen bezeichneten Auswertungen ermöglichen, die Stöchiometrie der untersuchten Komplexe zu bestimmen und somit die zugrunde liegenden Komplexierungsmodelle zu bestätigen.

Abbildung 4.11 zeigt die doppeltlogarithmische Auftragung des Konzentrationsverhältnisses $[CmTf(II)]/[Cm(III)]$ gegen $[Tf]_{frei}$. Für die Regressionsgerade wurde eine mittlere Steigung von $0,98 \pm 0,05$ bestimmt. Dies steht in sehr guter Übereinstimmung mit der erwarteten Steigung von 1 und bestätigt, dass unter den gegebenen experimentellen Bedingungen eine Cm(III)-Transferrin-Spezies mit 1:1-Stöchiometrie gebildet wird. Aufgrund des unterschiedlichen Bindungsvermögens der Bindungsstellen erfolgt die Koordination dabei bevorzugt an der C-terminalen Bindungsstelle.

Neben der Steigungsanalyse wurde basierend auf Gleichung 4.5 eine mittlere Stabilitätskonstante von $\log K_C = 8,06 \pm 0,5$ für die Komplexierung von Cm(III) an der Bindungsstelle des C-Lobes (Cm(III)-Transferrin-Spezies II) bestimmt. Die Stabilitätskonstante ist mit einem verhältnismäßig großen Fehler angegeben, da die exakten pK_s-Werte der Aminosäurereste an der C-terminalen Bindungsstelle, die zur Berechnung der freien Konzentration des vierfach deprotonierten Transferrins benötigt werden, nicht bekannt sind. Stattdessen wurden im Rahmen einer

Abschätzung die pK_s -Werte der freien Aminosäuren verwendet. Allerdings kann die Acidität der Aminosäurereste durch die Bindung in einem Proteinstrang beeinflusst werden. Aus diesem Grund ist es möglich, dass sich die pK_s -Werte der Aminosäurereste an der Bindungsstelle durchaus von denen der freien Aminosäuren unterscheiden. Nichtsdestotrotz steht die in dieser Arbeit berechnete Stabilitätskonstante von $\log K_C = 8,06 \pm 0,5$ in guter Übereinstimmung mit der von *Sturzbecher-Hoehne et al.* bestimmten Stabilitätskonstanten von $\log K_C = 8,8 \pm 0,3$ (pH 8,6).⁸⁵

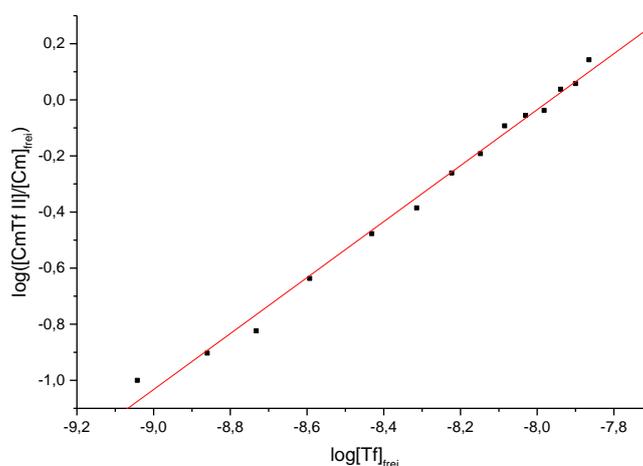


Abbildung 4.11 Doppeltlogarithmische Auftragung des Konzentrationsverhältnisses $[CmTf(II)]/[Cm(III)]_{\text{frei}}$ gegen die $\log[Tf]_{\text{frei}}$ bei pH 7,4.

4.1.2. Komplexierung von Cm(III) mit Transferrin bei physiologischer Temperatur

In Ergänzung zu den Messungen bei Raumtemperatur wurde die Komplexierung von Cm(III) mit Transferrin bei physiologischer Temperatur (37°C/310 K) untersucht. Abbildung 4.12 zeigt die normierten Emissionsspektren im pH-Bereich von 3,5 bis 11,0. Diese sind vergleichbar mit den Ergebnissen der Komplexierungsuntersuchung von Cm(III) mit Transferrin bei Raumtemperatur. Sie zeigen die Emissionsbanden des Cm(III)-Aquoions bei $\lambda_{\text{max}} = 594,0$ nm, der Cm(III)-Transferrin-Spezies I bei $\lambda_{\text{max}} = 600,6$ nm sowie der Cm(III)-Transferrin-Spezies II bei $\lambda_{\text{max}} = 620,3$ nm mit der heißen Bande ($\lambda_{\text{max}} = 602,9$ nm).

4. Ergebnisse und Diskussion

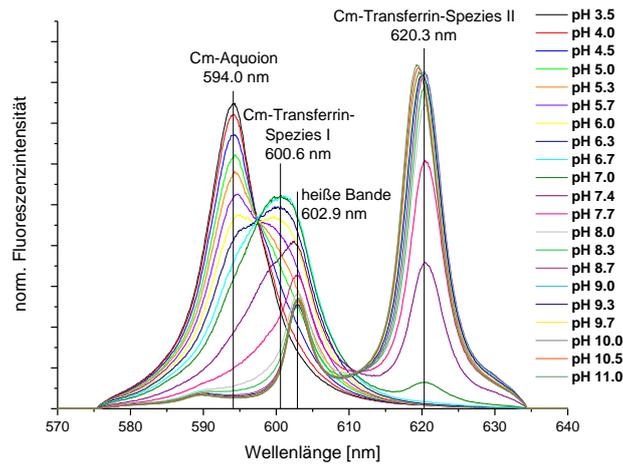


Abbildung 4.12 Flächennormierte Fluoreszenzspektren von Cm(III) mit Transferrin im pH-Bereich von 3,5 bis 11,0 bei $T = 310 \text{ K}$; $c(\text{Cm}) = 1,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, $c(\text{Tf}) = 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

Anhand der aus der Peakentfaltung erhaltenen Flächenanteile und unter Berücksichtigung der FI-Faktoren der Cm(III)-Spezies wurden die Konzentrationen dieser Spezies in Abhängigkeit des pH-Werts berechnet (Speziesverteilung, Abbildung 4.13). Das Cm(III)-Aquoion wird bis zu einem pH-Wert von 8,0 gebildet, allerdings nimmt die Konzentration mit zunehmendem pH-Wert kontinuierlich ab. Die Cm(III)-Transferrin-Spezies I ist die dominierende Spezies zwischen pH 5,2 und 7,6. Ab $\text{pH} \geq 6,7$ nimmt der Anteil der Cm(III)-Transferrin-Spezies II zu, bis sie bei $\text{pH} \geq 7,7$ als alleinige Komponente vorliegt.

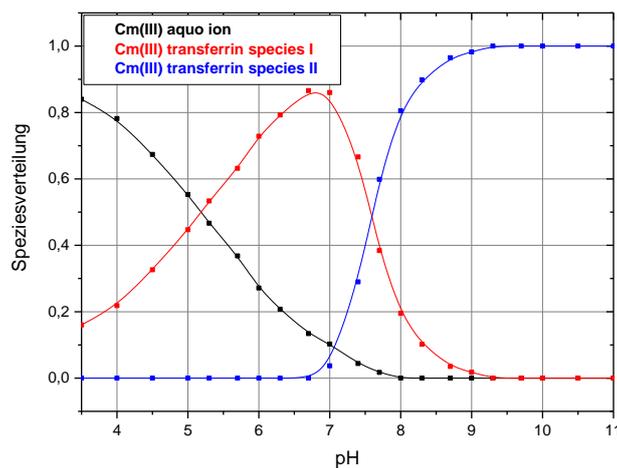


Abbildung 4.13 Speziation von Cm(III) mit Transferrin in Abhängigkeit des pH-Wertes; $T = 310 \text{ K}$, $c(\text{Cm}) = 1,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, $c(\text{Tf}) = 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$

Ein Vergleich der Speziationsdiagramme von Cm(III) mit Transferrin bei Raumtemperatur (Abbildung 4.6) und physiologischer Temperatur (Abbildung 4.13) zeigt, dass die Temperaturerhöhung keinen signifikanten Einfluss auf die Bildung der Cm(III)-Transferrin-Spezies I hat. Die Cm(III)-Transferrin-Spezies II hingegen wird bei physiologischer Temperatur schon bei $\text{pH} \geq 6,7$ gebildet, während die Komplexbildung bei Raumtemperatur erst bei einem um 0,5 pH-Einheiten höheren Wert beginnt. Die Temperaturerhöhung begünstigt somit die Komplexierung von Cm(III) an der Fe(III)-Bindungsstelle bei niedrigeren pH-Werten. Die Temperaturabhängigkeit der Komplexierungsreaktion spiegelt sich auch in der Stabilitätskonstanten der Cm(III)-Transferrin-Spezies II wider. Eine Erhöhung der Temperatur von Raumtemperatur auf physiologische Temperatur führt zu einem Anstieg des $\log K$ -Werts um rund 1 Größenordnung.

Beim physiologisch relevanten pH-Wert von 7,4 wird bei Raumtemperatur fast ausschließlich die Cm(III)-Transferrin-Spezies I gebildet, während bei physiologischer Temperatur 70% Cm(III)-Transferrin-Spezies I und 30% Cm(III)-Transferrin-Spezies II vorliegen. Letztere kann möglicherweise an den Rezeptor binden und somit relevant für den Transport von Cm(III) in die Zelle sein. Voraussetzung hierfür ist allerdings, dass an der N-terminalen Bindungsstelle Fe(III) oder ein anderes Metallion koordiniert, sodass das vollständig beladene Transferrin in der geschlossenen Konformation vorliegt.

4.1.3. Einfluss von Carbonat auf die Cm(III)-Transferrin-Komplexierung

4.1.3.1. Bestimmung der Ionenstärke der Transferrinlösungen

Die Ionenstärke I einer Lösung ist ein Maß für die Konzentration der Ionen in dieser Lösung. Sie ist über folgende Formel definiert,

$$I = 0,5 \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 \quad (4.9)$$

wobei z_i die Ladung und c_i die Konzentration des Stoffes i in der Lösung beschreibt. Bei einfach geladenen Ionen entspricht die Ionenstärke der Salzkonzentration,

während beispielsweise zweifach geladene Ionen den vierfachen Beitrag ihrer Salzkonzentration zur Gesamtionenstärke liefern.

Im Falle der in der vorliegenden Arbeit verwendeten gepufferten Transferrinlösungen wird die Ionenstärke durch Natriumchlorid sowie die Puffersubstanz Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) bestimmt. Der Beitrag der Na⁺- und Cl⁻-Ionen zur Ionenstärke entspricht der NaCl-Konzentration von 0,15 M. Um den Beitrag des TRIS-Puffers zur Ionenstärke der Lösung zu berechnen, muss zunächst die Konzentration der protonierten TRIS-Moleküle (TRIS⁺) in der Lösung bestimmt werden. Dies erfolgt anhand der Henderson-Hasselbalch-Gleichung:

$$pH = pK_s + \log \frac{[TRIS]}{[TRIS^+]} = pK_s + \log \frac{[TRIS]_{ges} - [TRIS^+]}{[TRIS^+]} \quad (4.10)$$

[TRIS] und [TRIS⁺] beschreiben die Konzentrationen neutraler und protonierter TRIS-Moleküle im Gleichgewicht und [TRIS]_{ges} die Gesamtkonzentration an TRIS (10 mM). Durch Auflösen von Gleichung 4.6 nach [TRIS⁺] kann die Konzentration an TRIS-Ionen im Gleichgewicht bestimmt werden (pH = 7,4; pK_s = 8,1). Diese beträgt 8,3 mM und entspricht dem Beitrag des TRIS-Puffers zur Gesamtionenstärke. Somit ergibt sich eine Gesamtionenstärke von I = 158,3 mM. Da zur Bestimmung von thermodynamischen Daten üblicherweise nicht molare Einheiten verwendet werden, wurde die Ionenstärke in molale Einheiten umgerechnet.¹⁷⁶ Im Folgenden wird für die Gesamtionenstärke der Proteinlösungen ein Wert von I_m = 0,16 m verwendet.

Da Transferrin viele funktionelle Gruppen besitzt, die protoniert und deprotoniert werden können, trägt es prinzipiell auch zur Ionenstärke bei. Allerdings kann aufgrund der Größe des Proteins und der Vielzahl der funktionellen Gruppen keine Aussage über den Anteil ionischer Spezies in Lösung getroffen werden. Außerdem ist die Proteinkonzentration verglichen mit der Konzentration von NaCl, das den Hauptanteil der Ionenstärke ausmacht, mit 5·10⁻⁶ M gering, weshalb der Beitrag des Proteins zur Gesamtionenstärke vernachlässigt werden kann.

4.1.3.2. Berechnung der Carbonatkonzentration

Die Komplexierung von Transferrin mit Cm(III) wurde bisher in offenen Systemen mit Kontakt zur Atmosphäre untersucht. Daher müssen für eine umfassende Beschreibung der Speziation auch die Konzentrationen der verschiedenen Carbonatspezies in der Lösung berücksichtigt werden. Die zur Beschreibung des Carbonatgleichgewichts benötigten $\log K$ -Werte bei $I_m = 0$ wurden der *Thermodynamical Database* der *Nuclear Energy Agency* (NEA - TDB) entnommen und gemäß folgender Formeln auf eine Ionenstärke von $I_m = 0,16$ umgerechnet:¹⁷⁷



$$\log K_H^0 = \log K_H = -1,472$$



$$\log K_1^0 = -6,354$$

$$\log K_1 = \log K_1^0 + 2D = -6,0995$$



$$\log K_2^0 = -10,329$$

$$\log K_2 = \log K_2^0 + 4D = -9,82$$

$$\text{mit } D = \frac{0,509\sqrt{I_m}}{1+1,5\sqrt{I_m}} = 1,27$$

Hieraus können nun die Konzentrationen der Carbonatspezies bei einer Ionenstärke von $I_m = 0,16$ m sowie einem atmosphärischen CO_2 -Partialdruck von 0,316 mbar berechnet werden.

$$\log[CO_{2(aq)}] = \log K_H + \log p_{CO_{2(g)}} \quad (4.14)$$

$$\log[CO_{2(aq)}] = -1,472 - 3,5 = -4,972$$

$$\log[HCO_3^-] = \log K_H + \log p_{CO_{2(g)}} + \log K_1 - \log[H^+] \quad (4.15)$$

$$\log[HCO_3^-] = -1,472 - 3,5 - 6,0995 + pH_c$$

$$\log[HCO_3^-] = -11,0715 + pH_c$$

$$\log[CO_3^{2-}] = \log K_H + \log p_{CO_2(g)} + \log K_1 + \log K_2 - 2\log[H^+] \quad (4.16)$$

$$\log[CO_3^{2-}] = -1,472 - 3,5 - 6,0995 - 9,82 + 2pH_c$$

$$\log[CO_3^{2-}] = -20,8915 + 2pH_c$$

Abbildung 4.14 zeigt die anhand der Gleichungen 4.14 bis 4.16 berechneten logarithmischen Konzentrationen der verschiedenen Carbonatspezies in Abhängigkeit des pH-Wertes. Diese Konzentrationen sind nur dann gültig, wenn eine vollständige Gleichgewichtseinstellung erfolgt ist, ansonsten entsprechen die angegebenen Werte den Maximalkonzentrationen. Bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 liegen im Gleichgewicht $1,07 \cdot 10^{-5}$ M $CO_{2(aq)}$, $2,13 \cdot 10^{-4}$ M HCO_3^- und $8,10 \cdot 10^{-7}$ M CO_3^{2-} vor. Hieraus ergibt sich eine Gesamtkonzentration aller Carbonatspezies von $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 2,3 \cdot 10^{-4}$ M (0,23 mM).

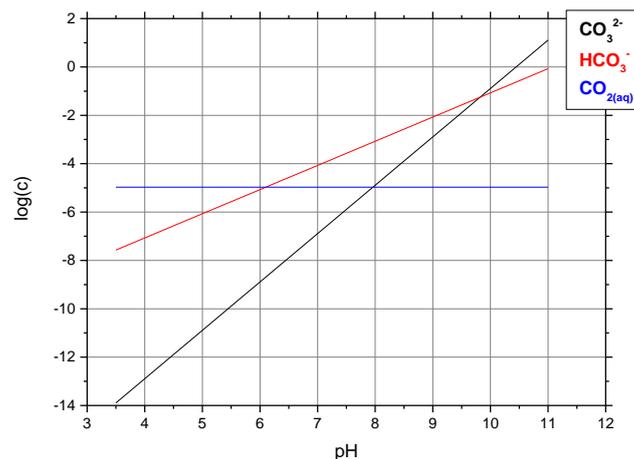


Abbildung 4.14 Logarithmische Konzentrationen von $CO_{2(aq)}$, HCO_3^- und CO_3^{2-} in einem offenen System in Abhängigkeit des pH-Wertes; $I_m = 0,16$ m, $p(CO_2) = 0,316$ mbar.

Um den Einfluss von Carbonat/Hydrogencarbonat auf die Komplexierung von Transferrin mit Cm(III) unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurden Speziationsuntersuchungen unter Argonatmosphäre mit einer definierten Carbonatkonzentration von 25 mM durchgeführt, was der Gesamtcarbonatkonzentration im Blut entspricht.²² In einem geschlossenen System ohne Kontakt zur Atmosphäre setzt sich $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}}$ aus folgenden Beiträgen zusammen:

$$c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = [CO_{2(aq)}] + [HCO_3^-] + [CO_3^{2-}] \quad (4.17)$$

Unter Berücksichtigung des durch die Gleichungen 4.11 und 4.12 beschriebenen Carbonatgleichgewichts sowie der auf eine Ionenstärke von $I_m = 0,16$ m angepassten $\log K_1$ - und $\log K_2$ -Werte kann Gleichung 4.16 umgeschrieben werden zu

$$c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = [\text{CO}_3^{2-}] \cdot \left(\frac{[\text{H}^+]^2}{K_1 K_2} + \frac{[\text{H}^+]}{K_2} + 1 \right) \quad (4.18)$$

$$\text{mit } \left(\frac{[\text{H}^+]^2}{K_1 K_2} + \frac{[\text{H}^+]}{K_2} + 1 \right) = \alpha$$

Die im Gleichgewicht vorliegenden Konzentrationen von $\text{CO}_{2(\text{aq})}$, HCO_3^- und CO_3^{2-} in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration der Carbonatspezies $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}}$ sowie des pH-Wertes wird durch die Gleichungen 4.19 bis 4.21 beschrieben.

$$[\text{CO}_3^{2-}] = \frac{c(\text{Carbonat})_{\text{tot}}}{\alpha} \quad (4.19)$$

$$[\text{HCO}_3^-] = \frac{[\text{H}^+] c(\text{Carbonat})_{\text{tot}}}{K_2 \alpha} \quad (4.20)$$

$$[\text{CO}_{2(\text{aq})}] = \frac{[\text{H}^+]^2 c(\text{Carbonat})_{\text{tot}}}{K_1 K_2 \alpha} \quad (4.21)$$

Abbildung 4.15 zeigt die Konzentrationen der verschiedenen Carbonatspezies in einem geschlossenen System in Abhängigkeit des pH-Wertes bei einer Gesamtkonzentration $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 25$ mM. Im Folgenden wird die Gesamtkonzentration der Carbonatspezies $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 25$ mM als physiologische Carbonatkonzentration bezeichnet.

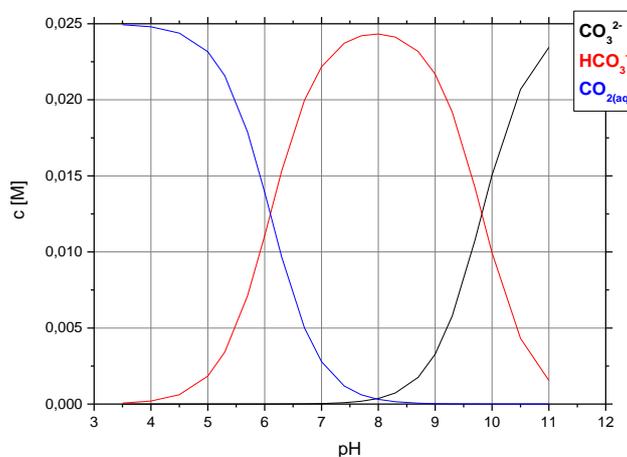


Abbildung 4.15 Konzentrationen von $\text{CO}_{2(\text{aq})}$, HCO_3^- und CO_3^{2-} in einem geschlossenen System in Abhängigkeit des pH-Wertes; $I_m = 0,16$ m, $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 25$ mM.

4.1.3.3. Komplexierung von Cm(III) mit Transferrin in Abwesenheit von Carbonat

Um den Einfluss von Carbonat auf die Komplexbildungsreaktion von Cm(III) mit Transferrin zu untersuchen, wurden zunächst Messungen bei Raumtemperatur ($T = 296 \text{ K}$) und in Abwesenheit von Carbonat durchgeführt. Die normierten Fluoreszenzspektren (Abbildung 4.16 (links)) sind vergleichbar mit denen, die bei $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 0,23 \text{ mM}$ (offenes System mit Kontakt zur Atmosphäre) aufgenommen wurden und zeigen die Emissionsbanden des Cm(III)-Aquoions bei $\lambda_{\text{max}} = 593,9 \text{ nm}$ ^{131, 133, 136} sowie der beiden Cm(III)-Transferrin-Spezies I und II bei $\lambda_{\text{max}} = 599,8 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{max}} = 619,9 \text{ nm}$ mit der heißen Bande bei $\lambda_{\text{max}} = 602,9 \text{ nm}$.

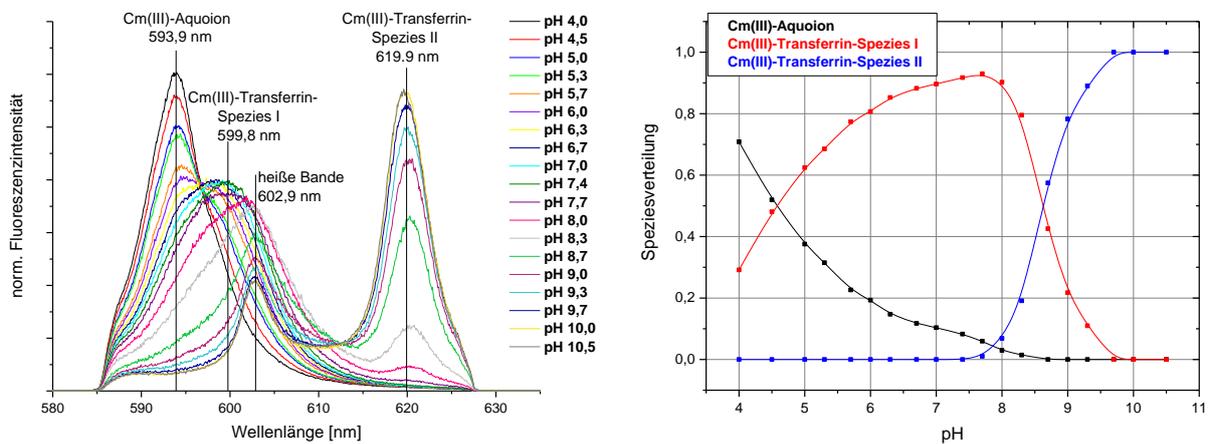


Abbildung 4.16 Flächennormierte Fluoreszenzspektren (links) und Speziation (rechts) von Cm(III) mit Transferrin bei $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 0$ im pH-Bereich von 3,5 bis 11,0; $T = 296 \text{ K}$, $c(\text{Cm}) = 1,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, $c(\text{Tf}) = 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

Abbildung 4.16 (rechts) zeigt die Speziation der verschiedenen Cm(III)-Spezies in Abhängigkeit des pH-Werts. Das Cm(III)-Aquoion tritt im pH-Bereich von 4,0 bis 8,7 auf, wobei die Konzentration mit steigendem pH-Wert kontinuierlich abnimmt. Die Cm(III)-Transferrin-Spezies I ist die dominierende Spezies zwischen pH 4,5 und 8,6, während die Cm(III)-Transferrin-Spezies II erst ab $\text{pH} \geq 7,7$ gebildet wird.

Ein Vergleich der Speziesverteilungen von Cm(III) mit Transferrin bei $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 0$ (Abbildung 4.16) und $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 0,23 \text{ mM}$ (Abbildung 4.6) zeigt, dass die Abwesenheit von Carbonat keinen signifikanten Einfluss auf die Bildung der unspezifisch gebundenen Cm(III)-Transferrin-Spezies I hat. Die Cm(III)-Transferrin-Spezies II hingegen wird bei $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 0$ erst ab $\text{pH} \geq 7,7$ gebildet,

während die Komplexbildung bei $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 0,23 \text{ mM}$ schon bei pH 7,4 beginnt. Folglich werden in Abwesenheit von Carbonat leicht höhere pH-Werte benötigt, um eine Komplexbildung von Cm(III) an der Fe(III)-Bindungsstelle des Transferrins zu erreichen. Dies bedeutet, dass Carbonat die Bildung der Cm(III)-Transferrin-Spezies II bei niedrigeren pH-Werten begünstigt und daher ähnlich wie bei der Komplexbildung von Fe(III) an der Bindungsstelle als synergistisches Anion wirkt.

Obwohl alle verwendeten Chemikalien sorgfältig entgast wurden und die Probenpräparation in einer Argon-Handschuhbox durchgeführt wurde (siehe Kapitel 3.3.1), kann nicht ausgeschlossen werden, dass Spuren von Carbonat in den Proben vorhanden waren. Da die Cm(III)-Konzentration bei den TRLFS-Messungen sehr klein ist ($c(\text{Cm}) = 1,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$), sind bereits Spurenkonzentrationen von Carbonat ausreichend, um mögliche ternäre Cm(III)-Transferrin-Carbonat-Komplexe zu bilden. Dies könnte die Ursache dafür sein, dass in Abwesenheit von Carbonat die gleiche Cm(III)-Transferrin-Spezies II auftritt, die auch bei den Messungen bei $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 0,23 \text{ mM}$ identifiziert und charakterisiert wurde. Nichtsdestotrotz zeigen die Ergebnisse deutlich den positiven Einfluss von Carbonate auf die Cm(III)-Transferrin-Komplexbildung.

4.1.3.4. Komplexbildung von Cm(III) mit Transferrin bei physiologischer Carbonatkonzentration

Neben den Messungen bei $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 0 \text{ mM}$ und $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 0,23 \text{ mM}$ wurde die Komplexbildung von Cm(III) mit Transferrin auch bei physiologischer Carbonatkonzentration $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 25 \text{ mM}$ im pH-Bereich von 3,5 bis 11,0 untersucht (Abbildung 4.17 (links)). Bei kleinen pH-Werten dominiert die Emissionsbande des Cm(III)-Aquoions bei $\lambda_{\text{max}} = 593,9 \text{ nm}$. Im Gegensatz zu den bisherigen Messungen bei $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 0 \text{ mM}$ und $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 0,23 \text{ mM}$ tritt bei zunehmendem pH-Wert nicht die Emissionsbande der unspezifischen Cm(III)-Transferrin-Spezies I auf. Stattdessen werden die drei Cm(III)-Carbonat-Spezies $\text{Cm}(\text{CO}_3)^+$, $\text{Cm}(\text{CO}_3)_2^-$ und $\text{Cm}(\text{CO}_3)_3^{3-}$ mit Emissionsbanden bei $\lambda_{\text{max}} = 599,4 \text{ nm}$, $603,3 \text{ nm}$ und $605,9 \text{ nm}$ gebildet.¹⁴⁴ Ein Vergleich mit Emissionsspektren von Referenzlösungen ohne Transferrin zeigt, dass es sich hierbei tatsächlich um Cm(III)-Carbonat-Komplexe handelt und keine zusätzlichen Transferrin-Spezies gebildet werden. Bei $\text{pH} \geq 7,0$

4. Ergebnisse und Diskussion

tritt die charakteristische Emissionsbande der Cm(III)-Transferrin-Spezies II bei $\lambda_{\max} = 620,0 \text{ nm}$ auf und nimmt mit steigendem pH-Wert kontinuierlich zu.

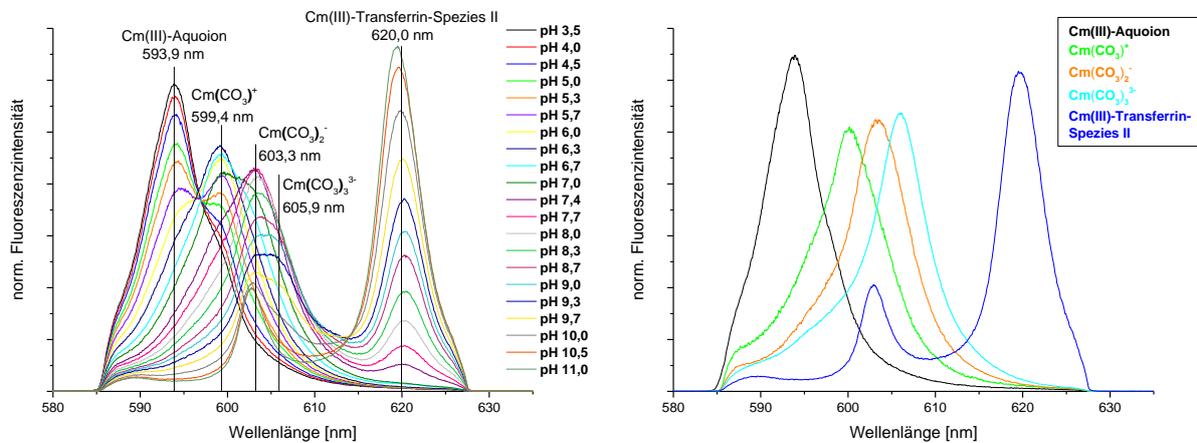


Abbildung 4.17 Links: Flächennormierte Fluoreszenzspektren von Cm(III) mit Transferrin bei physiologischer Carbonatkonzentration im pH-Bereich von 3,5 bis 11,0; rechts: Flächennormierte Fluoreszenzspektren des Cm(III)-Aquoions, der $\text{Cm}(\text{CO}_3)^+$, $\text{Cm}(\text{CO}_3)_2^-$ und $\text{Cm}(\text{CO}_3)_3^{3-}$ -Spezies sowie der Cm(III)-Transferrin-Spezies II; $c(\text{Cm}) = 1,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, $c(\text{Tf}) = 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 25 \text{ mM}$, $T = 296 \text{ K}$.

Die Fluoreszenzspektren des Cm(III)-Aquoions, der drei Cm(III)-Carbonat-Spezies $\text{Cm}(\text{CO}_3)^+$, $\text{Cm}(\text{CO}_3)_2^-$ und $\text{Cm}(\text{CO}_3)_3^{3-}$ sowie der Cm(III)-Transferrin-Spezies II (Abbildung 4.17 (rechts)) wurden iterativ aus den pH-abhängigen Emissionsspektren von Cm(III) mit und ohne Transferrin bei $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 25 \text{ mM}$ bestimmt. Anhand der aus der Peakentfaltung erhaltenen Flächenanteile und unter Berücksichtigung der FI-Faktoren der Cm(III)-Spezies wurden die Konzentrationen dieser Spezies in Abhängigkeit des pH-Werts berechnet (Speziesverteilung, Abbildung 4.18 (links)). Das Cm(III)-Aquoion tritt im pH-Bereich von 3,5 bis 7,0 auf. Mit steigendem pH-Wert werden sukzessive die Cm(III)-mono-, di- und tri-Carbonat-Spezies gebildet. $\text{Cm}(\text{CO}_3)^+$ und $\text{Cm}(\text{CO}_3)_2^-$ dominieren zwischen pH 5,3 und 7,2 bzw. 7,2 und 8,7. Zusätzlich werden im pH-Bereich von 7,7 bis 11,0 noch bis zu 30% der $\text{Cm}(\text{CO}_3)_3^{3-}$ -Spezies gebildet. Die Bildung der Cm(III)-Transferrin-Spezies II beginnt bei $\text{pH} \geq 7,0$, während die Komplexbildung bei $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 0,23 \text{ mM}$ bei pH 7,4 und in Abwesenheit von Carbonat sogar erst ab pH 7,7 erfolgt. Diese Ergebnisse bestätigen, dass eine Erhöhung der Carbonatkonzentration die Komplexierung von Cm(III) an der Fe(III)-Bindungsstelle des Transferrins bei kleineren pH-Werten begünstigt. Dies bestätigt die synergistische Wirkung des Carbonats bei der Bildung der Cm(III)-Transferrin-Spezies II.

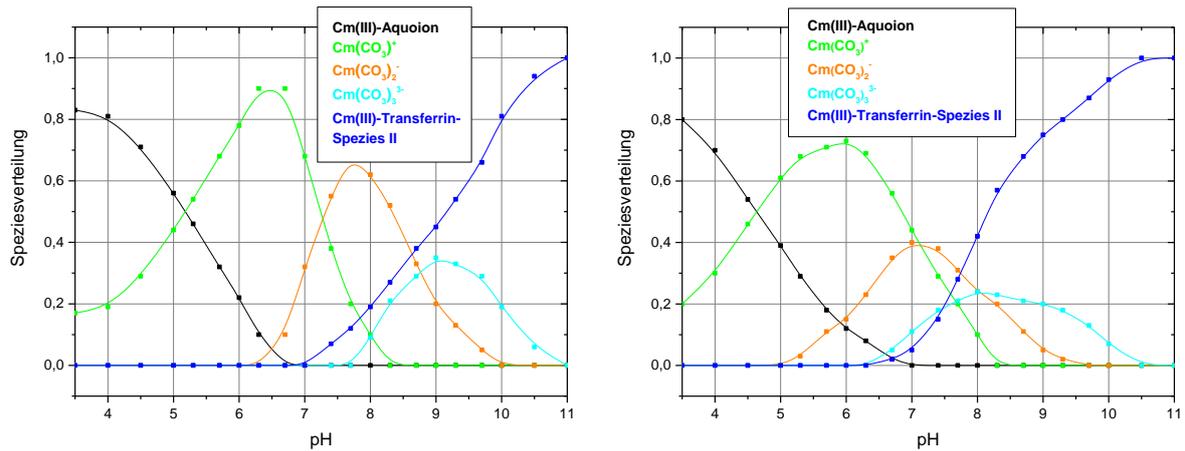


Abbildung 4.18 Speziation von Cm(III) mit Transferrin bei physiologischer Carbonatkonzentration in Abhängigkeit des pH-Wertes; links: $T = 296 \text{ K}$, rechts: $T = 310 \text{ K}$, $c(\text{Cm}) = 1,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, $c(\text{Tf}) = 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 25 \text{ mM}$.

Neben dem positiven Effekt, den Carbonat als synergistisches Anion auf die Komplexierung von Cm(III) an der Bindungsstelle des Transferrins ausübt, ist es auch ein Konkurrenzligand für Transferrin. Dies zeigt sich vor allem im Falle der nichtspezifischen Cm(III)-Transferrin-Spezies I, deren Bildung in Gegenwart des Konkurrenzliganden Carbonat vollständig unterdrückt wird. Allerdings hat Carbonat auch einen kompetitiven Effekt auf die Komplexierung von Cm(III) an der Fe(III)-Bindungsstelle des Transferrins. In Abwesenheit von Carbonat steigt der Anteil der Cm(III)-Transferrin-Spezies II im pH-Bereich zwischen 7,7 und 9,7 von 0% auf 100%. Bei physiologischer Carbonatkonzentration hingegen erstreckt sich dieser Anstieg über einen deutlich größeren pH-Bereich, die Cm(III)-Transferrin-Spezies II liegt erst ab pH 11,0 als alleinige Spezies vor. Dies kann auf die Konkurrenz zwischen Transferrin und Carbonat als Liganden für die Cm(III)-Komplexierung zurückgeführt werden. Der kompetitive Effekt von Carbonat spielt auch bei der Komplexierungsreaktion anderer Lanthanid- und Actinidionen mit Transferrin eine wichtige Rolle.^{63, 64, 80, 178, 179} Basierend auf Studien mit Gd(III) und Transferrin *in vitro* postulierten Zak und Aisen, dass aufgrund der Bildung von Gd(III)-Carbonat-Komplexen die Komplexierung von Gd(III) mit Transferrin *in vivo* keine Rolle bei der Verteilung des Metallions im Körper spielt.⁶⁴ Laut Taylor *et al.* liegen nur rund 20% Eu(III), Yb(III), Am(III) und Cm(III) *in vivo* tatsächlich als Transferrinkomplex vor, was ebenfalls auf die Konkurrenz mit Carbonat zurückgeführt werden kann.^{80, 178} Auch U(VI) liegt *in vivo* nur zu rund 40% als Transferrinkomplex vor, der überwiegende Teil wird durch Carbonat komplexiert.^{179, 180}

In der Literatur wird der Begriff des synergistischen Anions teilweise sehr nachlässig verwendet und es wird kontrovers diskutiert, ob Carbonat oder Bicarbonat als synergistisches Anion fungieren. Daher ist der Rolle des synergistischen Anions für die Komplexbildung von Cm(III) mit Transferrin von besonderem Interesse. Basierend auf den strukturellen Merkmalen können sowohl CO_3^{2-} als auch HCO_3^- die Rolle des synergistischen Anions im Transferrin-Komplex einnehmen. Die Speziation von CO_3^{2-} , HCO_3^- und $\text{CO}_2(\text{aq})$ in einem geschlossenen System bei physiologischer Carbonatkonzentration $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 25 \text{ mM}$ (Abbildung 4.15) wird mit der Speziation von Cm(III) mit Transferrin bei gleicher Carbonatkonzentration (Abbildung 4.18) verglichen. Der Anstieg der CO_3^{2-} -Konzentration mit steigendem pH-Wert (schwarze Kurve in Abbildung 4.15) ist vergleichbar mit dem Verlauf der Konzentration der Cm(III)-Transferrin-Spezies II in Abhängigkeit des pH-Wertes (blaue Kurve in Abbildung 4.18). Die Bildung beider Spezies beginnt bei $\text{pH} \geq 7,0$. Diese Analogie zeigt, dass Carbonat und nicht Bicarbonat als synergistisches Anion bei der Komplexbildung von Cm(III) an der Fe(III)-Bindungsstelle des Transferrins fungiert.

Bicarbonat ist generell ein schwacher Ligand für trivalente Lanthaniden und Actiniden. Beispielsweise liegen die Stabilitätskonstanten verschiedener Lanthaniden-Bicarbonat-Komplexe in Meerwasser (Ionenstärke 0,7 m) im Bereich von $\log K = 1,5 - 1,9$.¹⁸¹ Sie sind vergleichbar mit der Stabilitätskonstante der CmHCO_3^- -Komplexspezies ($\log \beta(\text{CmHCO}_3^-) = 1,9 \pm 0,2$ ($I = 1 \text{ m NaCl}$))^{143, 145}, wogegen die Stabilitätskonstanten der Cm(III)-Carbonat-Komplexe deutlich größer sind ($\log \beta^0(\text{CmCO}_3^+) = 8,30$, $\log \beta^0(\text{Cm}(\text{CO}_3)_2^-) = 13,52$, $\log \beta^0(\text{Cm}(\text{CO}_3)_3^{3-}) = 15,52$)¹⁴⁴. Der Cm(III)-Bicarbonat-Komplex wurde bei einem erhöhten CO_2 -Partialdruck von 11 bar in 1 m NaCl-Lösung (pH 4,4) untersucht. Bei diesen Bedingungen kann die Bildung von Cm(III)-Carbonat-Komplexen vernachlässigt werden. Eine Verringerung des CO_2 -Partialdrucks sowie eine Erhöhung des pH-Wertes begünstigen die Komplexbildung von Cm(III) mit Carbonat. Bei physiologischen Bedingungen (pH 7,4 und Atmosphärendruck) kann daher die Bildung von Cm(III)-Bicarbonat-Komplexen vernachlässigt werden. Auch dies bestätigt, dass Carbonat und nicht Bicarbonat bei der Komplexbildung von Cm(III) an der Fe(III)-Bindungsstelle als synergistisches Anion fungiert.

Um den Einfluss der Temperatur auf die Komplexierung von Cm(III) mit Transferrin bei physiologischer Carbonatkonzentration ($c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 25 \text{ mM}$) zu untersuchen, wurden Messungen bei physiologischer Temperatur ($T = 310 \text{ K}$) durchgeführt. Die Emissionsspektren sind vergleichbar mit den Spektren der Cm(III)-Transferrinkomplexierung bei Raumtemperatur (Abbildung 4.17). Die Speziesverteilung in Abhängigkeit des pH-Wertes ist in Abbildung 4.18 (rechts) dargestellt. Die Bildung der Cm(III)-Transferrin-Spezies II beginnt bei physiologischer Temperatur bereits bei pH 6,3, sie liegt ab $\text{pH} \geq 10,5$ als alleinige Spezies vor. Bei Raumtemperatur hingegen wird die Cm(III)-Transferrin-Spezies II erst bei $\text{pH} \geq 7,0$ gebildet. Eine Temperaturerhöhung begünstigt somit die Komplexierung von Cm(III) an der Fe(III)-Bindungsstelle des Transferrins. Die Temperaturabhängigkeit der Komplexierungsreaktion von Cm(III) mit Transferrin bei physiologischer Carbonatkonzentration ist vergleichbar mit der bei $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 0,23 \text{ mM}$ (vergleiche Kapitel 4.1.2). Unter diesen Bedingungen erfolgt die Bildung der Cm(III)-Transferrin-Spezies II bei physiologischer Temperatur ebenfalls bei um 0,5 Einheiten kleineren pH-Werten als bei Raumtemperatur.

Unter physiologischen Bedingungen ($\text{pH} 7,4$, $T = 310 \text{ K}$, $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 25 \text{ mM}$, 150 mM NaCl) komplexiert Fe(III) quantitativ an die Bindungsstellen des Transferrins und bildet stabile Komplexe. Im Gegensatz hierzu wird die Cm(III)-Transferrin-Spezies II erst ab einem pH-Wert von $\text{pH} \geq 6,3$ gebildet, bei pH 7,4 liegt sie im Gleichgewicht mit den Carbonatspezies $\text{Cm}(\text{CO}_3)^+$, $\text{Cm}(\text{CO}_3)_2^-$ und $\text{Cm}(\text{CO}_3)_3^{3-}$ vor. Die Unterschiede im Komplexierungsverhalten von Fe(III) und Cm(III) mit Transferrin können auf den rund doppelt so großen effektiven Ionenradius von Cm(III) zurückgeführt werden ($\text{IR}_{\text{Fe(III)}} = 55 \text{ pm}$, $\text{IR}_{\text{Cm(III)}} = 97 \text{ pm}$; gültig für Koordinationszahl sechs und Fe(III)-*low-spin*-Konfiguration).⁹² Das Cm(III)-Ion passt nicht optimal in die Bindungstasche des Transferrins, weshalb ein höherer pH-Wert benötigt wird, um eine Komplexierung an der Bindungsstelle zu erreichen.

Obwohl die Carbonatkomplexierung unter physiologischen Bedingungen eine starke Konkurrenzreaktion zur Komplexierung von Cm(III) mit Transferrin darstellt, liegen unter diesen Bedingungen 15% der Cm(III)-Transferrin-Spezies II, bei der Cm(III) an der C-terminalen Bindungsstelle des Transferrins komplexiert, in Lösung vor. Dieser Cm(III)-Transferrin-Komplex kann potentiell an den Rezeptor binden und via Endocytose in die Zelle eingeschleust werden. Voraussetzung hierfür ist allerdings,

dass an der N-terminalen Bindungsstelle Fe(III) oder ein anderes Metallion koordiniert, sodass das vollständig beladene Transferrin in der geschlossenen Konformation vorliegt. Eine erste Studie von *Sturzbecher-Hoehne et al.* zeigt, dass sich Form und Verschiebung der Emissionsbande sowie die Fluoreszenzlebensdauer von Cm₂Tf bei der Bindung an den Rezeptor nicht ändern.⁸⁵ Dies lässt darauf schließen, dass die Koordinationsumgebung von Cm(III) im Transferrin-Komplex bei der Bindung an den Rezeptor intakt bleibt. *Deblonde et al.* bestimmten die Stabilitätskonstanten verschiedener TfR:(M_xTf)_y-Addukte mit einer HPLC-basierten Methode, wobei als Metallionen verschiedene Lanthanid- und Actinidionen verwendet wurden.¹⁸² Diese nehmen in der Reihenfolge Fe(III) >> Th(IV) ~ U(VI) ~ Cm(III) > Ln(III) ~ Ga(III) >>> Yb(III) ~ Pu(IV) ab. Diese Daten zeigen, dass die Komplexierung von Cm(III) mit Transferrin sowie die Rezeptor-gesteuerte Endocytose dieses Komplexes in die Zellen ein möglicher Weg für die Verteilung des Metallions im Körper ist.

4.1.4. Bestimmung der thermodynamischen Daten der Komplexierungsreaktion von Cm(III) mit Transferrin

Um thermodynamische Daten wie die bei der Komplexierung von Cm(III) mit Transferrin auftretenden Enthalpie- und Entropieänderungen ΔH und ΔS zu bestimmen, wurde die Temperaturabhängigkeit der Komplexierungsreaktion bei pH 7,4, 7,7 und 8,0 und einer Gesamtcarbonatkonzentration von $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 0,23 \text{ mM}$ untersucht. Abbildung 4.19 zeigt exemplarisch die Emissionsspektren von Cm(III) mit Transferrin bei pH 7,7 und 8,0, die im Temperaturbereich von 5 bis 37,5°C aufgenommen wurden. Bei zunehmender Temperatur nimmt die Emissionsbande der Cm(III)-Transferrin-Spezies II bei $\lambda_{\text{max}} = 620 \text{ nm}$ kontinuierlich zu, während der Anteil des Cm(III)-Aquoions sowie der Cm(III)-Transferrin-Spezies I abnimmt. Die in Abbildung 4.4 gezeigten Emissionsspektren des Cm(III)-Aquoions sowie der beiden Cm(III)-Transferrin-Spezies I und II wurden verwendet, um mittels Peakentfaltung die Konzentrationen der einzelnen Komponenten in Abhängigkeit der Temperatur zu ermitteln.

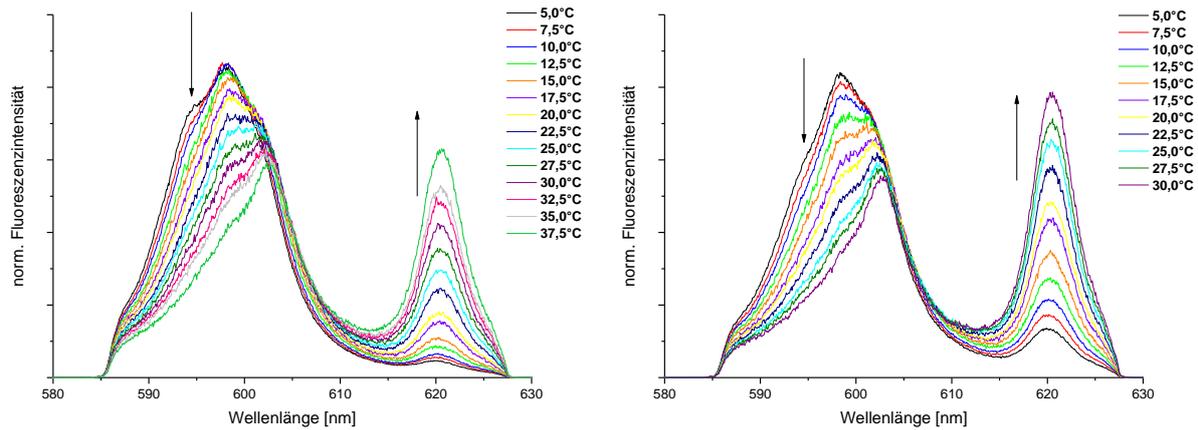
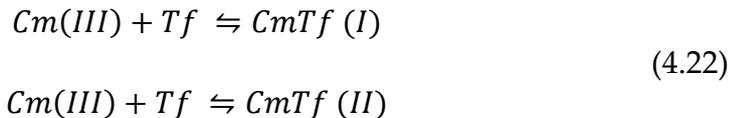


Abbildung 4.19 Flächennormierte Emissionsspektren von Cm(III) mit Transferrin bei pH 7,7 (links) und 8,0 (rechts) im Temperaturbereich von $T = 5 - 37,5^\circ\text{C}$ (links) bzw. $T = 5 - 30^\circ\text{C}$ (rechts); $c(\text{Cm}) = 1,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, $c(\text{Tf}) = 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 0,23 \text{ mM}$.

Bei der Berechnung der Stabilitätskonstanten wurden folgende Komplexierungsgleichgewichte für die Bildung der Cm(III)-Transferrin-Spezies I und II berücksichtigt:



Hierbei wird davon ausgegangen, dass die Bildung der beiden Cm(III)-Transferrin-Spezies völlig unabhängig voneinander erfolgt und in beiden Fällen Komplexe mit 1:1-Stöchiometrie gebildet werden. Unter Anwendung des Massenwirkungsgesetzes auf die Gleichgewichtsreaktionen erhält man folgende Ausdrücke für die Gleichgewichtskonstante K :

$$K_{\text{CmTfI}} = \frac{[\text{CmTf I}]}{[\text{Cm}]_{\text{frei}}[\text{Tf}]_{\text{frei}}} \quad K_{\text{CmTfII}} = \frac{[\text{CmTf II}]}{[\text{Cm}]_{\text{frei}}[\text{Tf}]_{\text{frei}}} \quad (4.23)$$

Die im Gleichgewicht vorliegenden Konzentrationen der Cm(III)-Transferrin-Spezies I und II ($[\text{CmTf I}]$ und $[\text{CmTf II}]$) können direkt aus der durch Peakentfaltung erhaltenen Speziesverteilung ermittelt werden. Die freie Cm(III)-Konzentration $[\text{Cm}]_{\text{frei}}$ entspricht der Konzentration der Cm(III)-Aquo-Spezies. Bei der Cm(III)-Transferrin-Spezies I handelt es sich um eine unspezifische Komplexspezies, weshalb keine Informationen über die bindenden Aminosäurereste bekannt sind. Aus diesem

4. Ergebnisse und Diskussion

Grund wird für diese Spezies die nach Gleichung 4.7 in Kapitel 4.1.1.5 berechnete Transferrinkonzentration als freie Transferrinkonzentration $[Tf]_{\text{frei}}$ verwendet. Bei der Cm(III)-Transferrin-Spezies II hingegen entspricht $[Tf]_{\text{frei}}$ der Konzentration des vierfach deprotonierten Transferrins. Diese wird wie in Kapitel 4.1.1.5 gezeigt unter Berücksichtigung der pK_s -Werte der freien Aminosäuren Asp, His und Tyr stellvertretend für die pK_s -Werte der Aminosäurereste an der C-terminalen Bindungsstelle berechnet.

Abbildung 4.20 zeigt sowohl für die Cm(III)-Transferrin-Spezies I (links) als auch für die Cm(III)-Transferrin-Spezies II (rechts) exemplarisch bei pH 7,7 die logarithmischen Stabilitätskonstanten $\ln K$ in Abhängigkeit der reziproken Temperatur $1/T$ (in $1/K$) (Van't-Hoff-Diagramm). Entsprechend der Van't-Hoff-Gleichung (Gleichung 4.20) können ΔH und ΔS aus Steigung und Achsenabschnitt der linearen Regression der $\ln K$ -Werte berechnet werden.

$$\ln K = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (4.24)$$

In Tabelle 4.2 sind die thermodynamischen Daten (ΔH und ΔS) der Komplexbildung von Cm(III) mit Transferrin in Abhängigkeit des pH-Werts zusammengefasst.

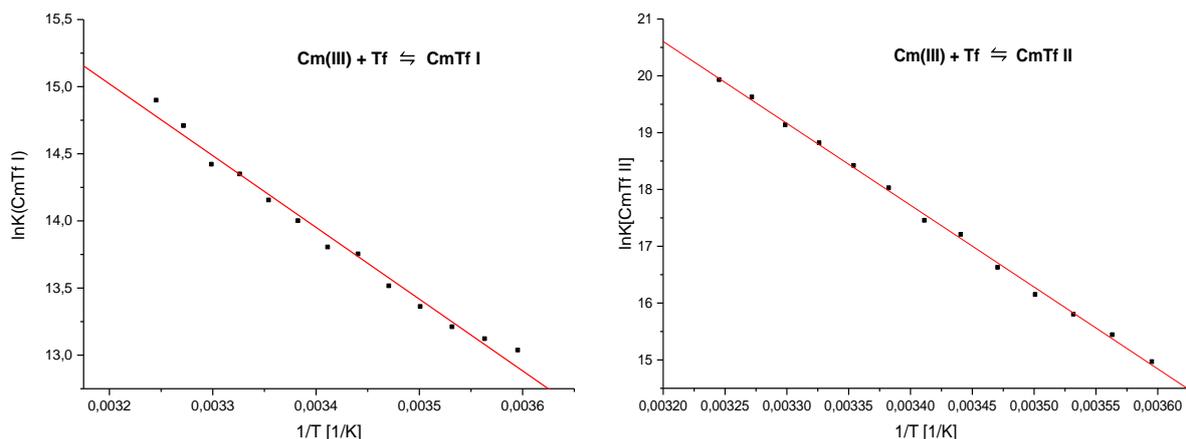


Abbildung 4.20 Temperaturabhängige Stabilitätskonstanten in Abhängigkeit der reziproken Temperatur (Van't-Hoff-Diagramm) zur Bestimmung der thermodynamischen Daten der Bildung der Cm(III)-Transferrin-Spezies I (links) und der Cm(III)-Transferrin-Spezies II (rechts) bei pH 7,7.

Tabelle 4.2 Thermodynamische Daten (ΔH und ΔS) der Komplexbildung von Cm(III) mit Transferrin in Abhängigkeit des pH-Werts.

pH	CmTf I		CmTf II	
	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol·K]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol·K]
7,4	36,6 ± 15	235,3 ± 100	120,6 ± 15	548,3 ± 100
7,7	44,4 ± 15	267,1 ± 100	110,8 ± 15	523,5 ± 100
8,0	47,2 ± 15	283,1 ± 100	121,5 ± 15	570,8 ± 100

Für die Cm(III)-Transferrin-Spezies I und II ergeben sich im untersuchten pH-Bereich positive Werte für ΔH und ΔS , folglich handelt es sich bei der Komplexbildung in beiden Fällen um eine endotherme und entropiegetriebene Reaktion. Die Komplexbildungsreaktion kann anhand eines zweistufigen Modells erläutert werden, bei dem der erste Schritt die Desolvatation von Metallion und Ligand und der zweite Schritt die Koordination des Metallions durch den Liganden beschreibt.¹⁸³ Die Entfernung von Lösungsmittelmolekülen aus der Solvathülle von Metallion und Ligand ist ein endothermer Prozess ($\Delta H_{\text{Desolv}} > 0$), der durch einen Gewinn an Entropie getrieben wird ($\Delta S_{\text{Desolv}} > 0$). Die Entropie- und Enthalpieänderung des Komplexbildungsschritts hingegen sind negativ ($\Delta H_{\text{Komplex}}, \Delta S_{\text{Komplex}} < 0$), dieser Reaktionsschritt ist daher enthalpiegetrieben. Im Falle der Cm(III)-Transferrin-Spezies I und II ist der Beitrag von ΔH_{Desolv} größer als der von $\Delta H_{\text{Komplex}}$, d.h. die Komplexbildungsreaktion ist für beide Spezies insgesamt endotherm. Im Gegensatz hierzu ist der Beitrag von $\Delta S_{\text{Komplex}}$ vernachlässigbar gegenüber ΔS_{Desolv} , die Komplexbildungsreaktion wird durch einen hohen Gewinn an Entropie getrieben. Vor allem für die Cm(III)-Transferrin-Spezies II ist ΔS außergewöhnlich groß. Dies kann auf die Bildung eines sehr starken Chelatkomplexes zurückgeführt werden, wenn Cm(III) an der Fe(III)-Bindungsstelle des Transferrins komplexiert und in die Proteinstruktur „eingebaut“ wird.

Die Veränderung der ΔH - und ΔS -Werte in Abhängigkeit des pH-Werts ist im Rahmen des Fehlerbereichs nicht signifikant. Dies deutet darauf hin, dass im untersuchten pH-Bereich keine Deprotonierung funktioneller Gruppen auftritt, die an der Komplexbildung direkt beteiligt sind. Daher wurden jeweils über alle durchgeführten Messungen gemittelte Werte bestimmt: CmTf I: $\Delta H = 41,2$ kJ/mol, $\Delta S = 255,2$ J/mol·K; CmTf II: $\Delta H = 118,2$ kJ/mol, $\Delta S = 547,5$ J/mol·K.

Die thermodynamischen Daten, die für die Bildung der Cm(III)-Transferrin-Spezies I und II ermittelt wurden, sind mit großen Fehlern behaftet und ermöglichen daher nur begrenzt eine quantitative Analyse der Komplexbildungsreaktion. Ursache hierfür ist, dass bereits kleine Veränderungen in der mittels Peakentfaltung bestimmten Speziation große Abweichungen in den Van't-Hoff-Diagrammen bewirken. Außerdem gibt es für die nichtspezifische Cm(III)-Transferrin-Spezies I keine Informationen über die komplexierenden Aminosäurereste, weshalb die Deprotonierung dieser Reste bei der Berechnung der freien Transferrinkonzentration nicht berücksichtigt werden kann. Auch bei der Cm(III)-Transferrin-Spezies II wurden die pK_s -Werte der Aminosäurereste an der C-terminalen Bindungsstelle durch Verwendung der pK_s -Werte der freien Aminosäuren nur abgeschätzt, weshalb die Konzentration des vierfach deprotonierten Transferrins und somit auch die berechneten $\ln K$ -, ΔH - und ΔS -Werte mit einem großen Fehler behaftet sind. Des Weiteren ist nicht eindeutig belegt, dass die Bildung der beiden Cm(III)-Transferrin-Spezies tatsächlich als völlig unabhängig voneinander betrachtet werden kann. Wäre dies nicht der Fall, könnten die Komplexbildungsgleichgewichte (4.22), die der Berechnung der konditionalen Stabilitätskonstanten zugrunde liegen, so nicht verwendet werden. Auch wenn die bestimmten thermodynamischen Daten fehlerbehaftet sind, lassen die Ergebnisse erstmals Rückschlüsse auf den der Komplexbildungsreaktion zugrunde liegenden Mechanismus zu. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Komplexbildung von Cm(III) an der C-terminalen Bindungsstelle des Transferrins eine endotherme und stark entropiegetriebene Reaktion ist, was auf den ausgeprägten Chelateffekt der Komplexbildung mit dem Protein zurückgeführt werden kann.

4.2. Komplexbildung von Cm(III) mit hTf/2N

Bei den bisher durchgeführten Komplexbildungsuntersuchungen von Cm(III) mit Transferrin wurde ein großer Transferrinüberschuss eingesetzt. Aufgrund des unterschiedlichen Bindungsvermögens der beiden Lobes für Metallionen (Cm(III): $\log K_C = 8,8 \pm 0,3$ und $\log K_N = 7,0 \pm 0,1$ bei pH 8,6)⁸⁵ erfolgte die Komplexbildung des Metallions daher ausschließlich an der C-terminalen Bindungsstelle und ein Komplex mit 1:1-Stöchiometrie wurde gebildet. Allerdings kann nur Transferrin in

der geschlossenen, kompakten Konformation, bei der zwei Metallionen an den C- und N-terminalen Bindungsstellen komplexieren, via Endocytose in die Zellen eingeschleust werden. Daher ist es notwendig, auch die Komplexbildung von Cm(III) am N-Lobe zu untersuchen und mit der am C-Lobe zu vergleichen. Aufgrund der um fast zwei Größenordnungen größeren Stabilitätskonstante erfolgt die Komplexbildung von Cm(III) bevorzugt an der C-terminalen Bindungsstelle. Es ist daher nicht möglich, die Bildung eines Cm_NTf-Komplexes zu erreichen, bei der der C-Lobe unbesetzt bleibt und Cm(III) ausschließlich an der N-terminalen Bindungsstelle komplexiert. Aus diesem Grund wird für die folgenden Untersuchungen der rekombinante N-Lobe des Transferrins (hTf/2N) als Modellverbindung für den N-Lobe des Transferrins verwendet.

hTf/2N besteht nur aus dem N-terminalen Lobe des Transferrins und weist somit auch nur eine Bindungsstelle auf. Fe(III)-hTf/2N wird in BHK-Zellen (*baby hamster kidney cells*) exprimiert.¹⁸⁴ Zur Überprüfung der Reinheit werden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Abbildung 4.21) sowie Elektrospray-Massenspektrometrie verwendet. 5 mg exprimiertes und gereinigtes Fe(III)-hTf/2N wurden von Prof. Dr. R. T. A. MacGillivray (*University of British Columbia, Vancouver*) für die Komplexbildungsuntersuchungen mit Cm(III) zur Verfügung gestellt.

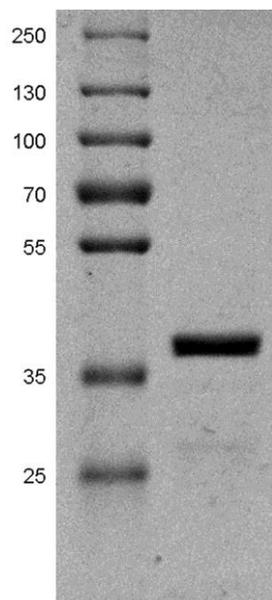


Abbildung 4.21 SDS-Gel zur Bestimmung der Molmasse (in kDa) von Fe(III)-hTf/2N; links: Größenmarker mit Proteinen bekannter Molekülmasse, die als Referenz dienen; rechts: Fe(III)-hTf/2N.

Bisher wurden kaum Studien durchgeführt, die den isolierten N-Lobe des Transferrins mit dem intakten Protein vergleichen. *Sun et al.* konnten erstmals eine Stabilitätskonstante für die Komplexierung von Bi(III) an das Halbmolekül hTf/2N bestimmen.¹⁸⁵ Diese beträgt $\log K_N^* = 18,9 \pm 0,2$ und ist somit fast identisch mit der Stabilitätskonstanten des N-Lobes im intakten Transferrin ($\log K_C = 19,4$, $\log K_N = 18,6$).⁵⁷ Diese Übereinstimmung in den Stabilitätskonstanten deutet darauf hin, dass hTf/2N tatsächlich als Modell für den N-Lobe des Transferrins dienen kann.

4.2.1. Komplexierung von Cm(III) mit hTf/2N bei Raumtemperatur

4.2.1.1. Emissionsspektren und Speziation

Die Komplexierung von Cm(III) mit hTf/2N in Abhängigkeit des pH-Wertes wurde bei $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 0,23 \text{ mM}$ und Raumtemperatur (296 K) im pH-Bereich von 4,0 bis 11,0 untersucht (Abbildung 4.22 (links)). Bis zu einem pH-Wert von 7,4 dominiert die Emissionsbande des Cm(III)-Aquoions bei $\lambda_{\text{max}} = 593,8 \text{ nm}$.^{131, 133, 136} Mit zunehmendem pH-Wert tritt eine Emissionsbande bei $\lambda_{\text{max}} = 598,7 \text{ nm}$ auf, die einer Mischung aus erster Cm(III)-Hydrolysespezies $\text{Cm}(\text{OH})^{2+}$ und erster Cm(III)-Carbonat-Spezies $\text{Cm}(\text{CO}_3)^+$ zugeordnet werden kann.^{139, 144} Da sich die Emissionsbanden dieser beiden Spezies nur um 0,3 nm unterscheiden, werden sie im Folgenden zusammengefasst. Bei $\text{pH} \geq 7,7$ wird die Cm(III)-hTf/2N-Komplexspezies gebildet. Die Spektren zeigen eine schmale Emissionsbande bei $\lambda_{\text{max}} = 620,3 \text{ nm}$ sowie eine heiße Bande bei $\lambda_{\text{max}} = 603,1 \text{ nm}$. Außerdem lässt sich ein kleiner Anteil eines Cm(III)-EDTA-Komplexes mit dem Emissionsmaximum bei $\lambda_{\text{max}} = 603,8 \text{ nm}$ nachweisen.¹³³ Diese EDTA-Verunreinigung resultiert aus dem Reinigungsprozess des hTf/2N (siehe Kapitel 3.2). Die flächennormierten Fluoreszenzspektren des Cm(III)-Aquoions, der $\text{Cm}(\text{OH})^{2+}/\text{Cm}(\text{CO}_3)^+$ -Spezies, der Cm(III)-EDTA-Spezies sowie der Cm(III)-hTf/2N-Spezies sind in Abbildung 4.22 (rechts) dargestellt.

Die Emissionsbande der Cm(III)-hTf/2N-Spezies ist identisch zur Emissionsbande der Cm(III)-Transferrin-Spezies II, bei der Cm(III) an der C-terminalen Bindungsstelle des Transferrins komplexiert. Auch die Fluoreszenzlebensdauern beider Spezies stimmen überein. Während für die Cm(III)-hTf/2N-Spezies eine Lebensdauer

von $\tau = 217 \pm 5 \mu\text{s}$ bestimmt wurde, beträgt die Lebensdauer der Cm(III)-Transferrin-Spezies II $\tau = 221 \pm 5 \mu\text{s}$. Folglich ist die Koordinationsumgebung von Cm(III) im hTf/2N-Komplex und an der C-terminalen Fe(III)-Bindungsstelle des Transferrins vergleichbar. In beiden Fällen wird Cm(III) durch vier Aminosäurereste des Proteins, zwei H₂O-Moleküle sowie drei zusätzliche Liganden (z.B. synergistische Anionen wie Carbonat) komplexiert. Dies entspricht den Daten der Kristallstrukturanalysen von Fe(III)hTf¹⁸⁶ und Fe(III)hTf/2N³⁴, die zeigen, dass die koordinierenden Liganden und somit die direkte Koordinationsumgebung von Fe(III) an der C-terminalen Bindungsstelle des Transferrins und im hTf/2N-Komplex identisch sind.

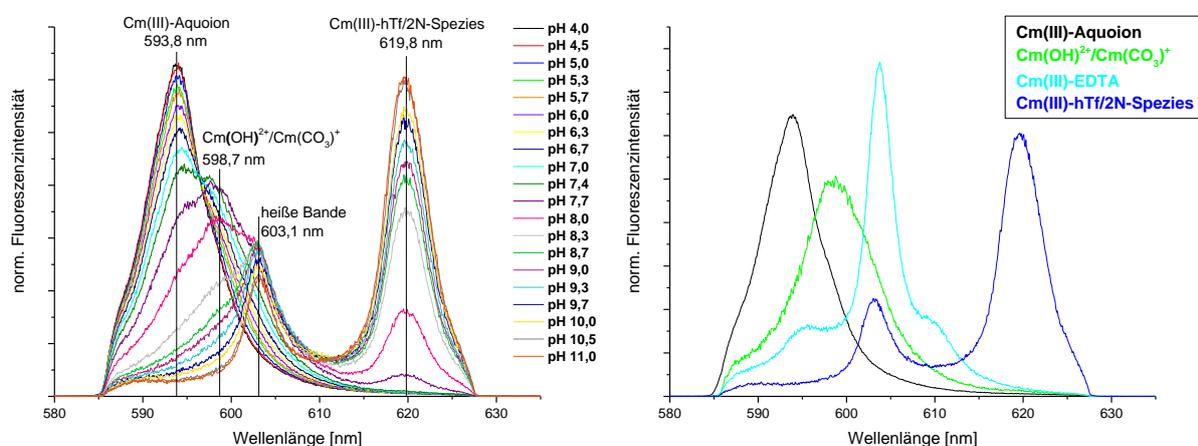


Abbildung 4.22 Links: Flächennormierte Fluoreszenzspektren von Cm(III) mit hTf/2N im pH-Bereich von 4,0 bis 11,0 Rechts: Flächennormierte Fluoreszenzspektren des Cm(III)-Aquoions, der Cm(OH)²⁺/Cm(CO₃)⁺-Spezies, der Cm(III)-EDTA-Spezies und der Cm(III)-hTf/2N-Spezies; T = 296 K; c(Cm) = 1,0·10⁻⁷ M, c(hTf/2N) = 5,0·10⁻⁶ M.

Im Falle des Transferrin wird zusätzlich zur Cm(III)-Transferrin-Spezies II zwischen pH 3,5 und 9,7 noch eine weitere, unspezifische Cm(III)-Transferrin-Spezies I gebildet. Eine solche Spezies tritt bei der Komplexbildung von Cm(III) mit hTf/2N nicht auf. Stattdessen liegt in diesem pH-Bereich eine Mischung aus erster Cm(III)-Hydrolysespezies Cm(OH)²⁺ und erster Cm(III)-Carbonat-Spezies Cm(CO₃)⁺ vor. Dies bedeutet, dass bei der Bildung der Cm(III)-Transferrin-Spezies I die Komplexbildung von Cm(III) entweder am C-Lobe erfolgt oder Aminosäurereste von beiden Lobes an der Bildung dieser Spezies beteiligt sind, weshalb mit hTf/2N keine solche unspezifische Cm(III)-Spezies gebildet wird.

Abbildung 4.23 zeigt die Speziesverteilung des Cm(III)-Aquoions, der Cm(OH)²⁺/Cm(CO₃)⁺-Spezies, der Cm(III)-EDTA-Spezies sowie der Cm(III)-hTf/2N-Spezies in Abhängigkeit des pH-Wertes. Das Cm(III)-Aquoion liegt im pH-Bereich von 4,0 bis 8,3 vor, wobei die Konzentration kontinuierlich abnimmt. Die Konzentration der Cm(OH)²⁺/Cm(CO₃)⁺-Komplexspezies nimmt stetig zu, diese Spezies dominieren zwischen pH 6,5 und 8,2. Ab pH ≥ 7,4, wird die Cm(III)-hTf/2N-Spezies gebildet. Die Bildung dieser Spezies in Abhängigkeit des pH-Wertes korreliert mit der Bildung der Cm(III)-Transferrin-Spezies II (vergleiche Abbildung 4.6), wodurch die Vergleichbarkeit der C- und N-terminalen Bindungsstellen unterstrichen wird. Zusätzlich liegt im pH-Bereich von 7,0 bis 11,0 noch ein geringer Anteil der Cm(III)-EDTA-Spezies vor. Da ihr Anteil aber nur maximal 5% beträgt, hat diese Spezies keinen signifikanten Einfluss auf die Speziation und kann vernachlässigt werden.

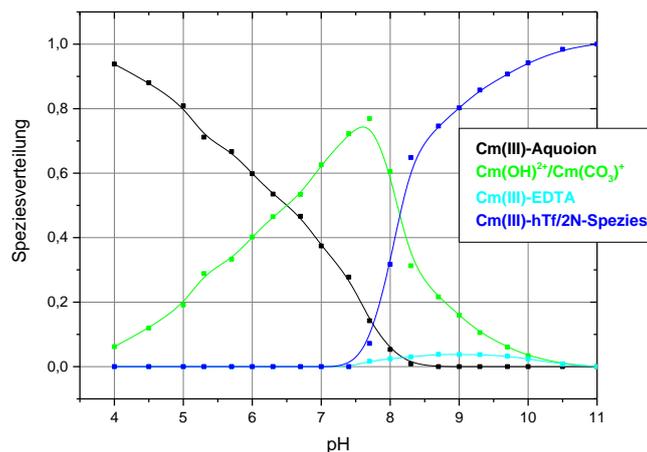


Abbildung 4.23 Speziation von Cm(III) mit hTf/2N in Abhängigkeit des pH-Wertes; T = 296 K, c(Cm) = 1,0·10⁻⁶ M, c(hTf/2N) = 5,0·10⁻⁵ M

4.2.1.2. Kinetikuntersuchungen von Cm(III) mit hTf/2N und Stabilität des Cm(III)-hTf/2N-Komplexes

Die Komplexierungskinetik von Cm(III) mit hTf/2N wurde bei verschiedenen pH-Werten im Zeitraum zwischen 0 und 189 Stunden untersucht und mit den Ergebnissen der Kinetikuntersuchungen von Cm(III) mit Transferrin verglichen. Abbildung 4.24 zeigt die flächennormierten Spektren von zwei Cm(III)-hTf/2N-Proben bei pH 8,0 (links) und 10,0 (rechts) in Abhängigkeit der Zeit. Im Zeitraum

von 0 bis 24 Stunden verändern sich die Spektren kaum, was eine schnelle Komplexierungskinetik impliziert. Bei beiden pH-Werten ist das System bereits nach fünf Minuten im Gleichgewicht. Dies ist vergleichbar mit der schnellen Kinetik der Cm(III)-Transferrin-Komplexbildung (vergleiche Kapitel 4.1.1.4) und bestätigt die schnelle Komplexierung von Cm(III) sowohl an der C- als auch an der N-terminalen Bindungsstelle.

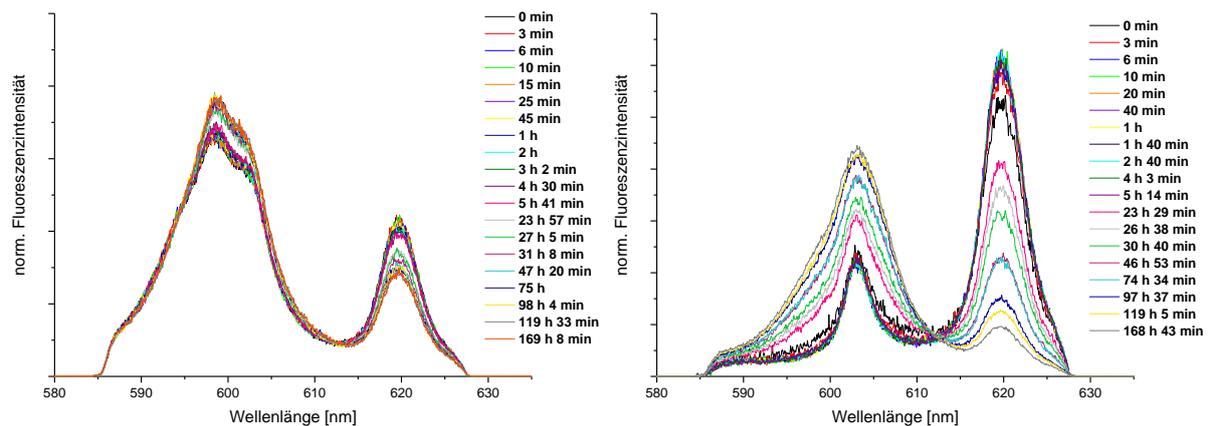


Abbildung 4.24 Flächennormierte Fluoreszenzspektren von Cm(III) mit hTf/2N bei pH 8,0 (links) und 10,0 (rechts) im Zeitraum zwischen 0 und 189 Stunden; $T = 296 \text{ K}$ $c(\text{Cm}) = 1,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ und $c(\text{hTf}/2\text{N}) = 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

Um die Stabilität der Cm(III)-hTf/2N-Komplexspezies zu untersuchen, wurden Fluoreszenzspektren nach langen Equilibrationszeiten von bis zu 189 Stunden aufgenommen. Bei den bisherigen Untersuchungen mit Cm(III)-Transferrin verändern sich die Spektren der Cm(III)-Transferrin-Spezies I und II im Zeitraum bis zu 96 Stunden nicht, was auf die Bildung sehr stabiler Komplexe schließen lässt. Im Gegensatz dazu treten bei den Spektren von Cm(III) mit hTf/2N bereits nach einem Tag Veränderungen auf. Die Emissionsbande der Cm(III)-hTf/2N-Spezies bei $\lambda_{\text{max}} = 620,3 \text{ nm}$ nimmt ab, während die Anteile des Cm(III)-Aquoions sowie der $\text{Cm}(\text{OH})^{2+}/\text{Cm}(\text{CO}_3)^+$ -Spezies zunehmen, wobei die Veränderung bei pH 10,0 deutlich größer ist als bei pH 8,0. Folglich tritt im Zeitraum zwischen 24 und 189 Stunden Dekomplexierung auf. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Cm(III)-Transferrin-Komplex (Cm(III)-Transferrin-Spezies II) deutlich stabiler ist als der entsprechende Cm(III)-Komplex mit hTf/2N. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die generell geringere Stabilität von hTf/2N im Vergleich zu Transferrin sein. Die Abwesenheit des zweiten Lobes verringert die Stabilität des Proteins selbst und

damit auch der entsprechenden Cm(III)-Komplexe. Außerdem scheint die vor allem bei hohen pH-Werten auftretende Deprotonierung funktioneller Gruppen und eventuell damit verbundene Strukturänderung des hTf/2N die Stabilität des Cm(III)-hTf/2N-Komplexes zusätzlich zu verringern. Bei pH 10,0 ist die Dekomplexierung daher deutlich stärker ausgeprägt als bei pH 8,0.

4.2.2. Komplexierung von Cm(III) mit hTf/2N bei physiologischer Temperatur

Zusätzlich zu den Messungen bei Raumtemperatur wurde die Komplexierung von Cm(III) mit hTf/2N in Abhängigkeit des pH-Werts bei physiologischer Temperatur (310 K) untersucht (Abbildung 4.25 (links)). Die Spektren sind vergleichbar mit den Spektren der Komplexierungsuntersuchungen von Cm(III) mit hTf/2N bei Raumtemperatur (296 K). Sie zeigen die Emissionsbanden des Cm(III)-Aquoions ($\lambda_{\max} = 593,9 \text{ nm}$), der $\text{Cm}(\text{OH})^{2+}/\text{Cm}(\text{CO}_3)^+$ -Spezies ($\lambda_{\max} = 598,7 \text{ nm}$), der Cm(III)-EDTA-Spezies ($\lambda_{\max} = 603,5 \text{ nm}$) sowie der Cm(III)-hTf/2N-Spezies ($\lambda_{\max} = 619,9 \text{ nm}$) mit der heißen Bande bei $\lambda_{\max} = 603,2 \text{ nm}$.

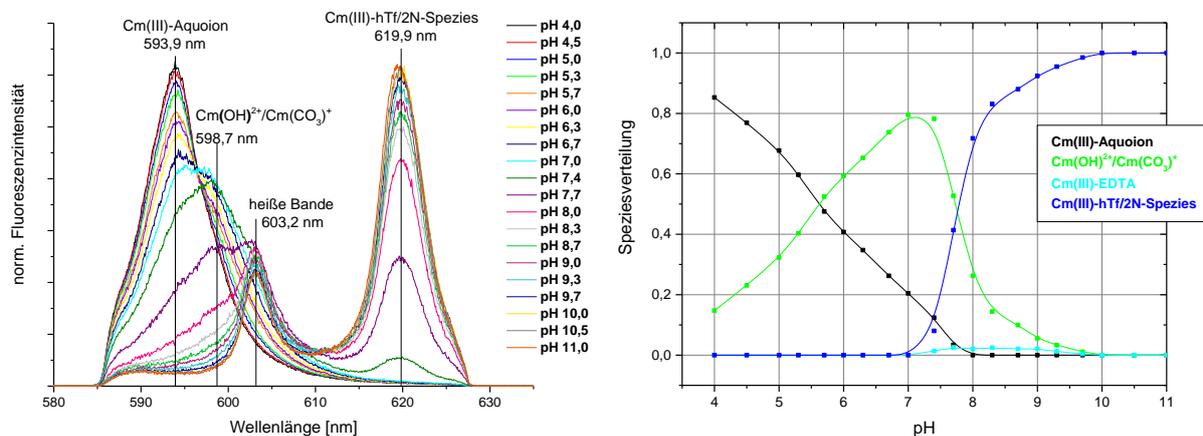


Abbildung 4.25 Flächennormierte Fluoreszenzspektren (links) und Speziation (rechts) von Cm(III) mit hTf/2N im pH-Bereich von 4,0 bis 11,0 bei $T = 310 \text{ K}$; $c(\text{Cm}) = 1,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, $c(\text{hTf}/2\text{N}) = 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

Abbildung 4.25 (rechts) zeigt die Speziesverteilung in Abhängigkeit des pH-Wertes. Genau wie bei den Messungen mit Transferrin hat die Temperaturerhöhung von 296 K auf 310 K zur Folge, dass die verschiedenen Cm(III)-Spezies bei physiologischer Temperatur bei niedrigeren pH-Werten gebildet werden (vergleiche

Abbildung 4.23). Die Cm(III)-hTf/2N-Spezies tritt bei Raumtemperatur bei $\text{pH} \geq 7,4$ auf, während die Bildung dieser Spezies bei physiologischer Temperatur schon bei $\text{pH} \geq 7,0$ beginnt. Ein Anstieg der Temperatur begünstigt die Bildung der Cm(III)-Transferrin-Spezies II sowie der Cm(III)-hTf/2N-Spezies bei kleineren pH-Werten, wodurch erneut die Ähnlichkeit der C- und N-terminalen Bindungsstellen unterstrichen wird.

4.2.3. Komplexierung von Cm(III) mit hTf/2N bei physiologischer Carbonatkonzentration

Um Informationen über den Einfluss von Carbonat auf die Komplexierung von Cm(III) mit hTf/2N zu erhalten, wurden zusätzlich zu den Messungen bei $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 0,23 \text{ mM}$ Untersuchungen bei physiologischer Carbonatkonzentration ($c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 25 \text{ mM}$) durchgeführt (Abbildung 4.26). Genau wie bei den Komplexierungsuntersuchungen von Cm(III) mit Transferrin bei physiologischer Carbonatkonzentration werden mit steigendem pH-Wert sukzessive die Emissionsbanden des Cm(III)-Aquoions ($\lambda_{\text{max}} = 593,9 \text{ nm}$) und der drei Cm(III)-Carbonat-Spezies $\text{Cm}(\text{CO}_3)^+$, $\text{Cm}(\text{CO}_3)_2^-$ und $\text{Cm}(\text{CO}_3)_3^{3-}$ mit Emissionsmaxima bei $\lambda_{\text{max}} = 598,8 \text{ nm}$, $603,2 \text{ nm}$ und $605,8 \text{ nm}$ gebildet.¹⁴⁴ Bei $\text{pH} \geq 10,5$ tritt außerdem die Emissionsbande der Cm(III)-hTf/2N-Spezies bei $\lambda_{\text{max}} = 619,7 \text{ nm}$ auf.

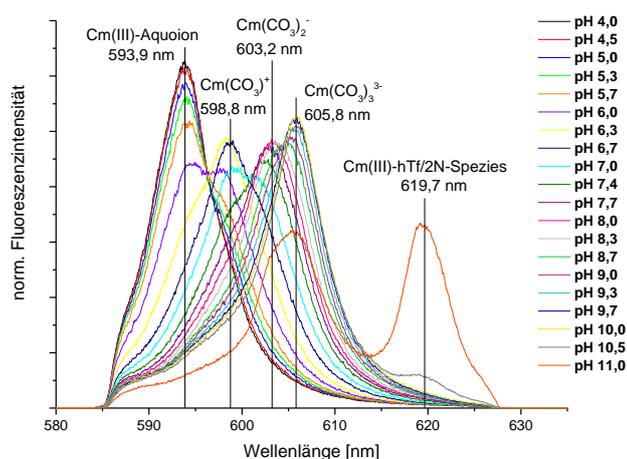


Abbildung 4.26 Flächennormierte Fluoreszenzspektren von Cm(III) mit hTf/2N bei physiologischer Carbonatkonzentration im pH-Bereich von 4,0 bis 11,0; $T = 296 \text{ K}$, $c(\text{Cm}) = 1,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, $c(\text{hTf/2N}) = 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 25 \text{ mM}$.

4. Ergebnisse und Diskussion

Die Verteilung der Cm(III)-Spezies in Abhängigkeit des pH-Wertes bei physiologischer Carbonatkonzentration ist in Abbildung 4.27 (links) dargestellt. Mit zunehmendem pH-Wert werden sukzessive bis zu 90% des Cm(III)-Aquoions sowie der Cm(III)-mono-, di- und tri-Carbonat-Spezies gebildet. Die Cm(III)-hTf/2N-Spezies tritt bei $\text{pH} > 10,0$ auf. Im Vergleich hierzu beginnt die Bildung der Cm(III)-hTf/2N-Spezies bei $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 0,23 \text{ mM}$ bereits bei einem deutlich niedrigeren pH-Wert von 7,4 (vergleiche Abbildung 4.23). Bei einer Erhöhung der Carbonatkonzentration wird folglich ein um mehrere Einheiten höherer pH-Wert zur Bildung der Cm(III)-hTf/2N-Spezies benötigt. Dies zeigt, dass Carbonat einen großen Einfluss auf die Komplexbildung von Cm(III) mit hTf/2N hat. Die Carbonatkomplexbildung ist eine wichtige Konkurrenzreaktion zur Cm(III)-hTf/2N-Komplexbildung.

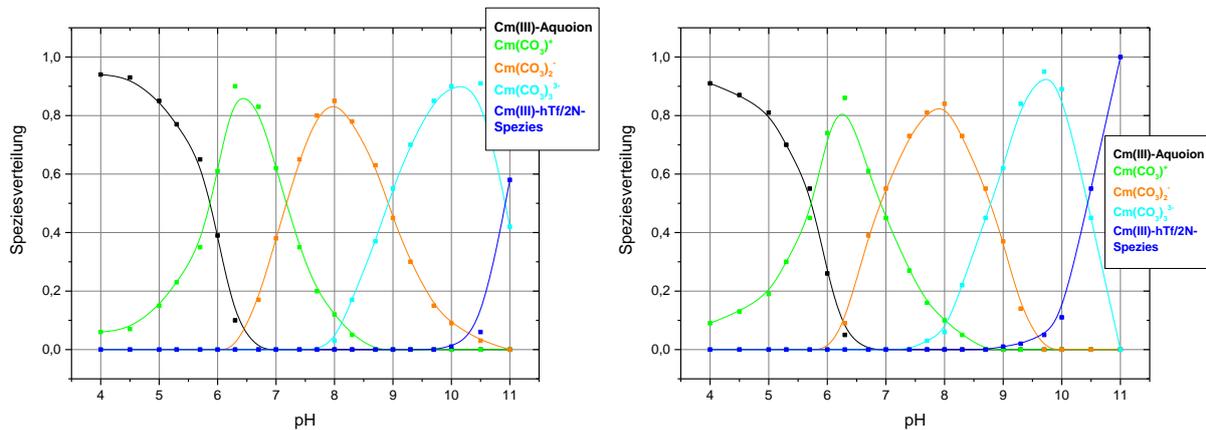


Abbildung 4.27 Speziation von Cm(III) mit hTf/2N bei physiologischer Carbonatkonzentration in Abhängigkeit des pH-Wertes bei $T = 296 \text{ K}$ (links) und $T = 310 \text{ K}$ (rechts); $c(\text{Cm}) = 1,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, $c(\text{hTf/2N}) = 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 25 \text{ mM}$.

Zusätzlich zu den Messungen bei Raumtemperatur wurde die Komplexbildung von Cm(III) mit hTf/2N bei physiologischer Carbonatkonzentration ($c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 25 \text{ mM}$) auch bei physiologischer Temperatur ($T = 310 \text{ K}$) untersucht. Die Emissionsspektren und die Speziation (Abbildung 4.27 (rechts)) sind vergleichbar mit den Ergebnissen bei Raumtemperatur und zeigen bei steigendem pH-Wert die sukzessive Bildung des Cm(III)-Aquoions sowie der $\text{Cm}(\text{CO}_3)^+$ -, $\text{Cm}(\text{CO}_3)_2^-$ - und $\text{Cm}(\text{CO}_3)_3^{3-}$ -Komplexspezies. Die Cm(III)-hTf/2N-Spezies wird bei $\text{pH} > 9,0$ gebildet, sie dominiert die Speziation ab $\text{pH} 10,5$. Im Vergleich hierzu beginnt die Bildung der Cm(III)-hTf/2N-Spezies bei Raumtemperatur erst bei $\text{pH} > 10,0$. Die Temperaturabhängigkeit der Komplexbildungsreaktion ist für beide

Proteine vergleichbar. Unabhängigkeit von der Carbonatkonzentration begünstigt die Temperaturerhöhung von Raumtemperatur ($T = 296 \text{ K}$) auf physiologische Temperatur ($T = 310 \text{ K}$) die Bildung der Cm(III)-Transferrin-Spezies II sowie der Cm(III)-hTf/2N-Spezies.

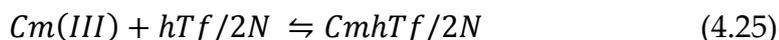
Die Speziesverteilungen von Cm(III) mit Transferrin und hTf/2N bei $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 0,23 \text{ mM}$ (siehe Kapitel 4.2.1 und 4.2.2) zeigen, dass die Bildung der Cm(III)-Transferrin-Spezies II und der Cm(III)-hTf/2N-Spezies unter diesen Bedingungen vergleichbar ist, wodurch die Ähnlichkeit der C- und N-terminalen Bindungsstellen unterstrichen wird. Bei physiologischer Carbonatkonzentration hingegen zeigen die Speziesverteilungen (Abbildung 4.18 und Abbildung 4.27) deutliche Abweichungen: Bei Raumtemperatur beginnt die Bildung der Cm(III)-Transferrin-Spezies bei $\text{pH} \geq 7,0$, während die Cm(III)-hTf/2N-Spezies erst bei $\text{pH} > 10,0$ auftritt. Dies kann durch den kompetitiven Effekt von Carbonat auf die Komplexierungsreaktion von Cm(III) mit Transferrin und hTf/2N erklärt werden. Neben dem positiven Effekt, den Carbonat als synergistisches Anion für die Komplexierung von Cm(III) an der C-terminalen Bindungsstelle des Transferrins hat, wirkt sich die Carbonatkomplexierung bei $\text{pH} \geq 7,4$ kompetitiv auf die Bildung der Cm(III)-Transferrin-Spezies aus. Dies zeigt sich durch im Vergleich zu den Messungen bei $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 0 \text{ mM}$ oder $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 0,23 \text{ mM}$ geringere Anteile dieser Spezies. Der kompetitive Effekt von Carbonat auf die Komplexierung von Cm(III) mit hTf/2N ist deutlicher ausgeprägter als bei Transferrin, die Bildung der Cm(III)-hTf/2N-Spezies wird im untersuchten pH-Bereich fast vollständig unterdrückt. Dies zeigt eindeutig die deutlich größere Stabilität des Cm(III)-Transferrin-Komplexes, bei dem das Metallion an der C-terminalen Bindungsstelle des Transferrins komplexiert, gegenüber der Cm(III)-hTf/2N-Spezies (vergleiche Kapitel 4.1.1.4 und Kapitel 4.2.1.2). Diese Ergebnisse stehen in sehr guter Übereinstimmung mit den um fast zwei Größenordnungen unterschiedlichen Stabilitätskonstanten für den C- und N-Lobe des Transferrins.

Da Transferrin im Körper potentiell Actinidionen transportieren kann, ist die Komplexierung von Cm(III) mit hTf/2N bei physiologischen Bedingungen ($\text{pH} 7,4$, $T = 310 \text{ K}$, $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 25 \text{ mM}$, $c(\text{NaCl}) = 150 \text{ mM}$) von besonderem Interesse. Im Falle von hTf/2N liegen ausschließlich die Cm(III)-Carbonat-Spezies $\text{Cm}(\text{CO}_3)^+$ und $\text{Cm}(\text{CO}_3)_2^-$ vor, die Bildung der Cm(III)-hTf/2N-Spezies hingegen ist vollständig

unterdrückt. Unter der Voraussetzung, dass hTf/2N ein geeignetes Modell für den N-Lobe des Transferrins darstellt, ist die Komplexierung von Cm(III) an der N-terminalen Bindungsstelle unter physiologischen Bedingungen somit nicht relevant. Im Gegensatz hierzu liegen im Falle des Transferrins rund 29% der Cm(CO₃)⁺-Spezies, 38% der Cm(CO₃)₂⁻-Spezies, 18% der Cm(CO₃)₃³⁻-Spezies und 15% der Cm(III)-Transferrin-Spezies II vor (Kapitel 4.1.3.4). Obwohl der Anteil der Cm(III)-Transferrin-Spezies II bei diesen Bedingungen im Verhältnis zu den Cm(III)-Carbonat-Komplexen klein ist, könnte ein Komplex, bei dem Cm(III) an der C-terminalen Bindungsstelle des Transferrins komplexiert, an den Rezeptor binden und via Endocytose in die Zelle eingeschleust werden. Voraussetzung hierfür ist allerdings, dass an der N-terminalen Bindungsstelle Fe(III) oder ein anderes Metallion koordiniert, sodass das vollständig beladene Transferrin in der geschlossenen Konformation vorliegt.

4.2.4. Bestimmung der thermodynamischen Daten der Komplexierungsreaktion von Cm(III) mit hTf/2N

Analog zu den Komplexierungsuntersuchungen von Cm(III) mit Transferrin wurde die Temperaturabhängigkeit der Komplexierungsreaktion von Cm(III) mit hTf/2N bei pH 7,7 und 8,0 untersucht, um die thermodynamischen Daten ΔH und ΔS zu bestimmen. Abbildung 4.28 zeigt exemplarisch die Emissionsspektren von Cm(III) mit hTf/2N bei pH 7,7 im Temperaturbereich von 12,5 bis 37,5°C (links) sowie die durch Peakentfaltung ermittelte Speziesverteilung (rechts). Unter diesen Bedingungen liegen das Cm(III)-Aquoion, die Cm(III)-hTf/2N-Spezies, die Cm(OH)²⁺/Cm(CO₃)⁺-Spezies sowie ein kleiner Anteil der Cm(III)-EDTA-Spezies vor. Bei der Berechnung der Stabilitätskonstanten wird das Komplexierungsgleichgewicht



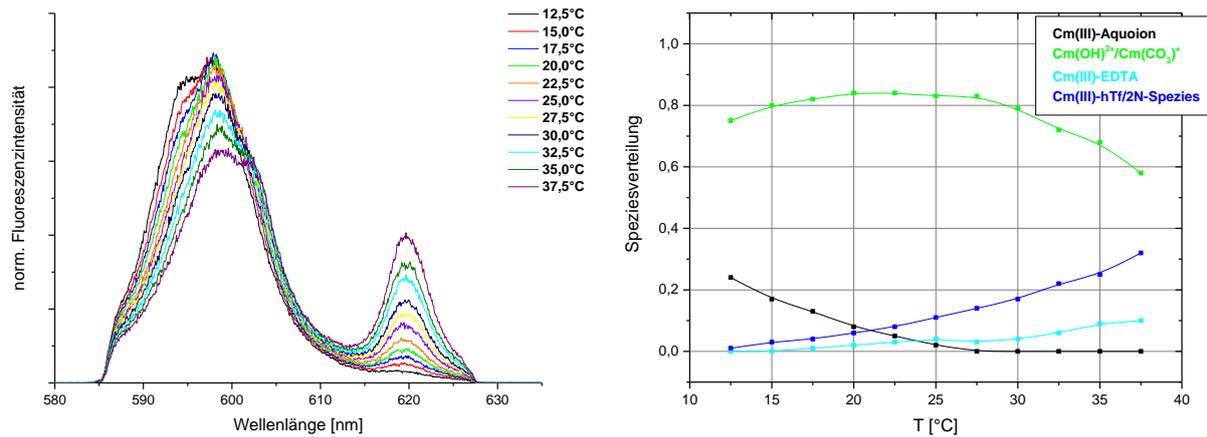


Abbildung 4.28 Normierte Emissionsspektren (links) und Speziation (rechts) von Cm(III) mit hTf/2N bei pH 7,7 im Temperaturbereich von $T = 12,5 - 37,5^\circ\text{C}$; $c(\text{Cm}) = 1,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, $c(\text{hTf}/2\text{N}) = 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 0,23 \text{ mM}$.

für die Bildung der Cm(III)-hTf/2N-Spezies zugrunde gelegt. Unter Anwendung des Massenwirkungsgesetzes auf die Gleichgewichtsreaktionen erhält man folgenden Ausdruck für die Gleichgewichtskonstante K :

$$K_{\text{CmhTf}/2\text{N}} = \frac{[\text{CmhTf}/2\text{N}]}{[\text{Cm}]_{\text{frei}}[\text{hTf}/2\text{N}]_{\text{frei}}} \quad (4.26)$$

Die Berechnung der hTf/2N-Konzentration $[\text{hTf}/2\text{N}]$ sowie der freien Cm(III)-Konzentration $[\text{Cm(III)}]_{\text{frei}}$ erfolgt unter Berücksichtigung der Gleichungen 4.27 und 4.28.

$$[\text{hTf}/2\text{N}] = [\text{Tf}]_{\text{tot}} - [\text{CmTf(II)}] \quad (4.27)$$

$$[\text{Cm(III)}]_{\text{frei}} = [\text{Cm(III)}]_{\text{tot}} - [\text{Cm(OH)}^{2+}/\text{Cm(CO}_3\text{)}^+] - [\text{CmhTf}/2\text{N}] \quad (4.28)$$

Genau wie bei intaktem Transferrin erfolgt auch bei hTf/2N die Komplexbildung durch die deprotonierte Spezies (vergleiche Kapitel 4.1.1.5 und 4.1.4). Zur Berechnung der freien Proteinkonzentration $[\text{hTf}/2\text{N}]_{\text{frei}}$ werden die pK_s -Werte der Aminosäurereste an der N-terminalen Bindungsstelle benötigt. Experimentell sind allerdings nur die pK_s -Werte von Tyr188 und His249 zugänglich (Tyr188: $\text{pK}_s = 6,86 - 6,96$; His249: $\text{pK}_s = 7,40$)^{187, 188}, weshalb für Tyr95 der pK_s -Wert von Tyr188 verwendet wurde und für Asp63 der Wert der freien Aminosäure ($\text{pK}_s = 3,65$).

Abbildung 4.29 zeigt die logarithmischen Stabilitätskonstanten $\ln K$ in Abhängigkeit der reziproken Temperatur $1/T$ (in $1/K$) (Van't-Hoff-Diagramm) für die Komplexierung von Cm(III) mit hTf/2N bei pH 7,7. Entsprechend der Van't-Hoff-Gleichung (Gleichung 4.24) können ΔH und ΔS aus Steigung und Achsenabschnitt der linearen Regression der $\ln K$ -Werte berechnet werden.

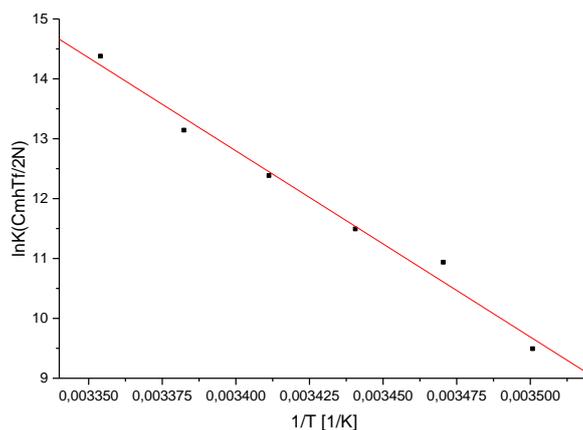


Abbildung 4.29 Temperaturabhängige Stabilitätskonstanten in Abhängigkeit der reziproken Temperatur (Van't-Hoff-Diagramm) zur Bestimmung der thermodynamischen Daten der Komplexierungsreaktion von Cm(III) mit hTf/2N bei pH 7,7.

In Tabelle 4.3 sind die Enthalpie- und Entropieänderungen ΔH und ΔS der Komplexierung von Cm(III) mit hTf/2N für die zwei untersuchten pH-Werte zusammengefasst. Wie bei den beiden Cm(III)-Transferrin-Spezies (siehe Kapitel 4.1.4) sind die Enthalpie- und Entropieänderungen bei der Bindung von Cm(III) an hTf/2N positiv. Dies bedeutet, dass auch für das Halbmolekül die Desolvatationsenthalpie ΔH_{Desolv} den Hauptbeitrag zur Enthalpieänderung der Komplexierungsreaktion liefert, weshalb diese insgesamt endotherm verläuft. Die Koordination von Cm(III) an Transferrin und hTf/2N wird durch einen hohen Gewinn an Entropie getrieben.

Tabelle 4.3 Thermodynamische Daten (ΔH und ΔS) der Komplexierung von Cm(III) mit hTf/2N in Abhängigkeit des pH-Werts.

pH	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol·K]
7,7	$257,3 \pm 50$	$980,8 \pm 150$
8,0	$190,4 \pm 50$	$771,6 \pm 150$

Die thermodynamischen Daten, die für die Bildung der Cm(III)-hTf/2N-Spezies ermittelt wurden, sind mit großen Fehlern behaftet und ermöglichen daher nur begrenzt eine quantitative Analyse der Komplexbildungsreaktion. Ursache hierfür ist, dass bereits kleine Veränderungen in der mittels Peakentfaltung bestimmten Speziation große Abweichungen in den Van't-Hoff-Diagrammen bewirken. Außerdem sind nur die pK_s -Werte von zwei der Aminosäurereste an der Bindungsstelle bekannt, die anderen beiden wurden abgeschätzt. Daher sind sowohl die Konzentration der vierfach deprotonierten hTf/2N-Spezies als auch die berechneten $\ln K$ -, ΔH - und ΔS -Werte mit einem großen Fehler behaftet. Aus diesem Grund ist ein direkter Vergleich der ΔH - und ΔS -Werte der Cm(III)-hTf/2N-Spezies mit denen der Cm(III)-Transferrin-Spezies II (siehe Kapitel 4.1.4) nicht möglich. Nichtsdestotrotz zeigen die Ergebnisse eindeutig, dass die Komplexbildung von Cm(III) mit hTf/2N sowie an der C-terminalen Bindungsstelle des Transferrins eine endotherme und stark entropiegetriebene Reaktion ist. Dies kann auf die Bildung eines sehr starken Chelatkomplexes zurückgeführt werden, wenn Cm(III) an der Fe(III)-Bindungsstelle des Transferrins bzw. hTf/2N komplexiert und in die Proteinstruktur „eingebaut“ wird.

Aufgrund der begrenzten Menge an hTf/2N, die für die Komplexbildungsuntersuchungen mit Cm(III) zur Verfügung stand, konnten keine Untersuchungen in Abhängigkeit der hTf/2N-Konzentration durchgeführt werden. Daher kann eine Stabilitätskonstante für die Cm(III)-hTf/2N-Spezies bei Raumtemperatur ($T = 296 \text{ K}$) lediglich aus den in diesem Kapitel gezeigten Daten abgeschätzt werden. Diese beträgt $\log K_N = 5,7 \pm 0,7$ und ist somit um ca. zwei Größenordnungen kleiner als die der C-terminalen Bindungsstelle des Transferrins ($\log K_C = 8,06 \pm 0,5$, siehe Kapitel 4.1.1.5). Im Rahmen des Fehlers steht dies in hervorragender Übereinstimmung mit Stabilitätskonstanten, die von *Sturzbecher-Hoehne et al.* für die Komplexbildung von Cm(III) mit Transferrin bei pH 8,6 bestimmt wurden und sich um 1,8 Größenordnungen unterscheiden ($\log K_C = 8,8 \pm 0,3$, $\log K_N = 7,0 \pm 0,1$).⁸⁵ Trotz des sehr großen Fehlerbereichs der Stabilitätskonstanten kann anhand dieser Ergebnisse eindeutig bestätigt werden, dass sich die C- und N-terminalen Bindungsstellen des Transferrins bezüglich ihres Bindungsvermögens für Metallionen deutlich unterscheiden.

4.3. Komplexierung von Eu(III) mit Transferrin

Neben der Charakterisierung von Actiniden-Transferrin-Komplexen (Cm(III): Kapitel 4.1, Am(III): Kapitel 4.4) wurde auch die Komplexierung von Transferrin mit Lanthaniden untersucht. Aufgrund seiner guten spektroskopischen Eigenschaften wurde Eu(III) als Vertreter der trivalenten Lanthaniden verwendet. Die Komplexierungsreaktion wurde bei Raumtemperatur und Tieftemperatur ($T < 20$ K) mittels TRLFS untersucht. Zur weiteren Charakterisierung der Koordinationsumgebung wurden EXAFS-Messungen und lumineszenzspektroskopische Untersuchungen durchgeführt.

4.3.1. Komplexierung von Eu(III) mit Transferrin bei Raumtemperatur

Die Komplexierung von Eu(III) mit Transferrin bei Raumtemperatur wurde im pH-Bereich von 4,5 bis 9,0 untersucht ($c(\text{Eu(III)}) = 5,00 \cdot 10^{-6}$ M, $c(\text{Tf}) = 2,55 \cdot 10^{-4}$ M). Abbildung 4.30 zeigt die F_1 - und F_2 -Emissionsbanden von Eu(III) mit Transferrin in Abhängigkeit des pH-Wertes. Bei pH 4,5 beträgt das Intensitätsverhältnis von F_2 - zu F_1 -Bande 1,9. Dieser Wert ist deutlich größer als der für das Eu(III)-Aquoion (0,5), was zeigt, dass die Komplexierung von Eu(III) durch Transferrin bereits bei pH 4,5 beginnt. Neben der Eu(III)-Transferrin-Spezies werden außerdem das Eu(III)-Aquoion sowie bei steigendem pH-Wert mehrere Eu(III)-Hydrolysespezies $[\text{Eu(III)(OH)}_n]^{(3-n)+}$ ($n = 1,2$) gebildet. Aufgrund der großen Ähnlichkeit der Fluoreszenzspektren der Hydrolysespezies und der verhältnismäßig geringen Auflösung der in Abbildung 4.30 gezeigten Spektren ist es nicht möglich, die Anteile der beiden Hydrolysespezies getrennt zu bestimmen, sie werden daher im Folgenden zusammengefasst.

Mit steigendem pH-Wert nimmt das F_2/F_1 -Intensitätsverhältnis und somit der Anteil der Eu(III)-Transferrin-Komplexspezies zu. Ab einem pH-Wert von 8,0 kommt es zu einer starken Abnahme des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses. Dies kann auf die Bildung der Eu(III)-Hydrolysespezies sowie die Ausfällung von Eu(OH)_3 zurückgeführt werden, wodurch eine quantitative Charakterisierung der Komplexierungsreaktion mit Transferrin verhindert wird.

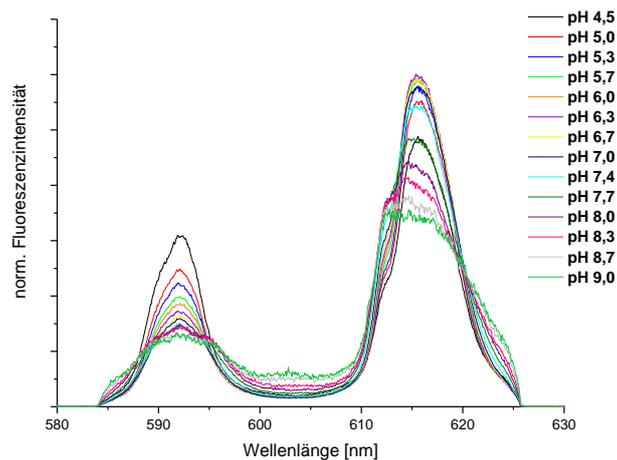


Abbildung 4.30 Flächennormierte Fluoreszenzspektren von Eu(III) mit Transferrin im pH-Bereich von 4,5 bis 9,0; $c(\text{Eu}) = 5,00 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $c(\text{Tf}) = 2,55 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

Neben den F_1 - und F_2 -Emissionsbanden wurden außerdem die F_0 -Emissionsbanden von Eu(III) mit Transferrin im pH-Bereich von 4,5 bis 9,0 untersucht. Im gesamten pH-Bereich tritt nur eine breite F_0 -Bande auf, die auf eine Mischung der verschiedenen in der Lösung vorliegenden Spezies zurückgeführt werden kann. Zudem nimmt die Qualität der Spektren ab pH 7,4 stark ab, weshalb bei Raumtemperatur keine Aussage über die Anzahl der vorliegenden Spezies getroffen werden kann.

Abbildung 4.31 (links) zeigt die Fluoreszenzspektren des Eu(III)-Aquoions sowie der Eu(III)-Transferrin-Spezies und der Eu(III)-Hydrolysespezies. Das Spektrum des Eu(III)-Aquoions wurde unter Verwendung einer sauren $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$ -Lösung direkt gemessen, während die anderen Spektren iterativ aus den gemessenen, pH-abhängigen Spektren abgeleitet wurden.

Unter Verwendung der Spektren der verschiedenen Komponenten wurde eine Peakentfaltung durchgeführt, um die Flächenanteile der verschiedenen Eu(III)-Spezies in Abhängigkeit des pH-Werts zu ermitteln (Speziesverteilung, Abbildung 4.31 (rechts)). Die Eu(III)-Transferrin-Komplexspezies tritt im pH-Bereich von 4,5 bis 8,3 auf und dominiert die Speziation bis pH 7,7. Allerdings entsprechen die Flächenanteile nicht den in der Lösung vorliegenden Konzentrationsverhältnissen, da die Bildung von $\text{Eu}(\text{OH})_3$ bei höheren pH-Werten nicht quantitativ erfasst werden kann. Somit ist nur eine qualitative Beschreibung des Komplexierungsverhaltens von Eu(III) mit Transferrin in Lösung möglich.

4. Ergebnisse und Diskussion

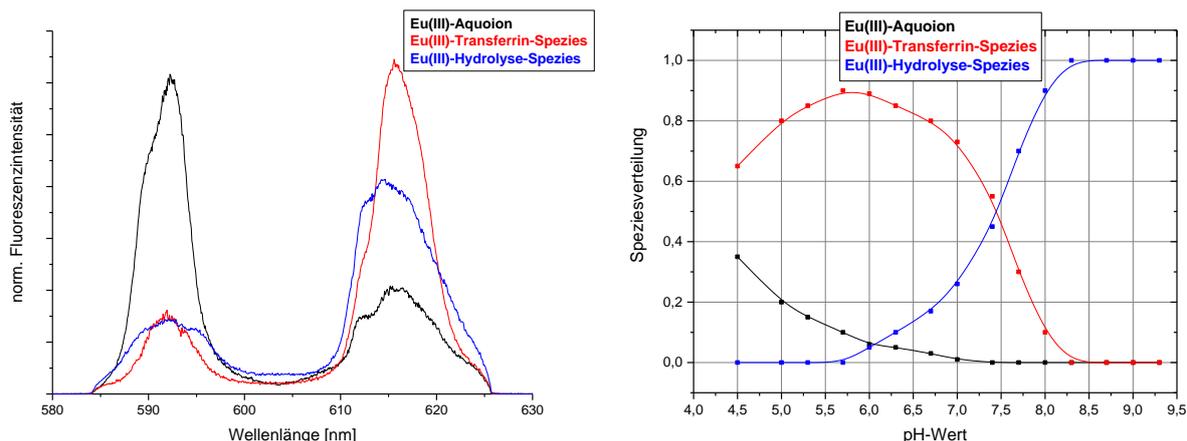


Abbildung 4.31 Flächennormierte Fluoreszenzspektren (links) und Speziesverteilung (rechts) des Eu(III)-Aquoions, der Eu(III)-Transferrin-Spezies und der Eu(III)-Hydrolyse-Spezies in Abhängigkeit des pH-Wertes für $Tf/Eu(III) = 50$; $c(Eu) = 5,00 \cdot 10^{-6} M$, $c(Tf) = 2,55 \cdot 10^{-4} M$.

Um die Eu(III)-Transferrin-Spezies weiter zu charakterisieren, wurde die Fluoreszenzlebensdauer bestimmt. Die Spezies liegt im gesamten pH-Bereich nicht als alleinige Spezies vor, weshalb die Lebensdauer durch biexponentielle Anpassung der Abnahme der Fluoreszenzintensität aus dem bei pH 4,5 vorliegenden Speziesgemisch ermittelt wurde. Die Fluoreszenzlebensdauer des Eu(III)-Aquoions ($110 \mu s$) wurde hierbei als Lebensdauer der kürzerlebigen Komponente vorgegeben. Für die Lebensdauer der Eu(III)-Transferrin-Spezies wurde ein mittlerer Wert von $201 \pm 20 \mu s$ bestimmt. Nach der Horrocks-Gleichung entspricht dies $4,7 \pm 0,5$ Wassermolekülen in der ersten Koordinationssphäre des Eu(III).¹⁸⁹ Somit werden vier Koordinationsstellen durch Liganden des Proteins und/oder synergistische Anionen wie OH^- , CO_3^{2-} oder HCO_3^- besetzt. Dies stimmt im Fehlerbereich mit den Charakteristika der Cm(III)-Transferrin-Spezies I überein, die im pH-Bereich von 3,5 bis 9,3 gebildet wird und $4,4 \pm 1,0$ Wassermoleküle in der ersten Koordinationssphäre besitzt. Folglich handelt es sich auch bei der in Lösung auftretenden Eu(III)-Transferrinspezies um eine unspezifisch gebundene Komplexspezies, bei der Eu(III) an Aminosäurereste auf der Oberfläche des Proteins komplexiert.

4.3.2. Komplexierung von Eu(III) mit Transferrin bei $T < 20 \text{ K}$

4.3.2.1. Excitations- und Emissionsspektren

Um weitere Informationen über die Komplexierungsreaktion von Eu(III) mit Transferrin zu erhalten, wurden TRLFS-Messungen bei $T < 20 \text{ K}$ durchgeführt. Der Vorteil von Tieftemperaturmessungen liegt in der Verbesserung der spektralen Auflösung, was vor allem für die Auswertung der F_0 -Emissionsbanden hilfreich ist.

Abbildung 4.32 zeigt die normierten Excitationsspektren der Eu(III)-Transferrin-Proben bei pH 4,5, 6,0, 7,4 und 8,0 im Wellenlängenbereich von 577 nm bis 582 nm. Unabhängig vom pH-Wert tritt nur eine F_0 -Bande auf, was auf das Vorliegen einer einzigen Spezies hindeutet. Das Emissionsmaximum der Proben bei pH 7,4 und 8,0 liegt bei $\lambda_{\text{max}} = 580,3 \text{ nm}$, während es bei niedrigeren pH-Werten (pH 4,5 und 6,0) um ca. 0,5 nm zu kleineren Wellenlängen verschoben ist. Folglich werden bei pH 4,5/6,0 und pH 7,4/8,0 jeweils verschiedene Eu(III)-Spezies gebildet. Außerdem zeichnen sich die Spektren der Proben bei pH 7,4 und 8,0 durch eine um ein Vielfaches höhere Fluoreszenzintensität aus als die der Proben bei kleineren pH-Werten. Dies bestätigt das Vorliegen von zwei signifikant unterschiedlichen Eu(III)-Spezies.

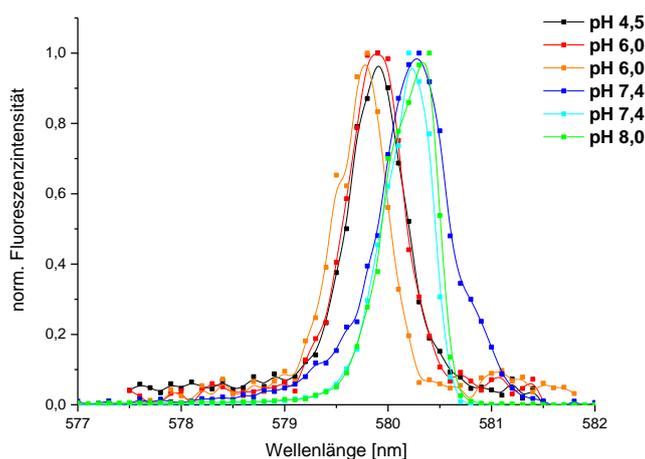


Abbildung 4.32 Normierte Excitationsspektren von Eu(III) mit Transferrin bei pH 4,5, 6,0, 7,4 und 8,0 bei $T \leq 20 \text{ K}$ (pH 4,5, 6,0: (1) $c(\text{Eu(III)}) = 3,64 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $c(\text{Tf}) = 7,27 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, (2) $c(\text{Eu(III)}) = 8,33 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $c(\text{Tf}) = 1,66 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; pH 7,4: (1) $c(\text{Eu(III)}) = 3,64 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $c(\text{Tf}) = 7,27 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, (2) $c(\text{Eu(III)}) = 5,88 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $c(\text{Tf}) = 1,18 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; pH 8,0: $c(\text{Eu(III)}) = 8,33 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $c(\text{Tf}) = 1,66 \cdot 10^{-3} \text{ M}$).

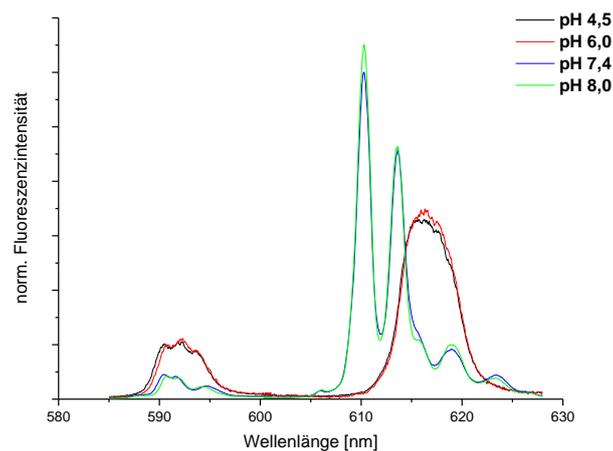


Abbildung 4.33 Flächennormierte Fluoreszenzemissionsspektren von Eu(III) mit Transferrin bei pH 4,5, 6,0, 7,4 und 8,0 bei $T \leq 20$ K (pH 4,5, 6,0, 7,4: $c(\text{Eu(III)}) = 3,64 \cdot 10^{-4}$ M, $c(\text{Tf}) = 7,27 \cdot 10^{-4}$ M; pH 8,0: $c(\text{Eu(III)}) = 8,33 \cdot 10^{-4}$ M, $c(\text{Tf}) = 1,66 \cdot 10^{-3}$ M).

Durch direkte Anregung des emittierenden Zustands, d.h. durch Anregung bei λ_{max} der in Abbildung 4.32 gezeigten F_0 -Banden, werden die Emissionsspektren der Eu(III)-Transferrin-Proben bei pH 4,5, 6,0, 7,4 und 8,0 erhalten. Diese sind in Abbildung 4.33 dargestellt. Wie bereits bei den Excitationsspektren treten auch bei den Emissionsspektren in Abhängigkeit des pH-Wertes zwei unterschiedliche Gruppen von Spektren auf. Die Spektren der Eu(III)-Transferrin-Proben bei pH 4,5 und 6,0 zeichnen sich durch eine geringe Fluoreszenzintensität und eine kaum sichtbare Aufspaltung der Emissionsbanden aus, was auf die Bildung eines schwachen Eu(III)-Komplexes hindeutet. Hierbei handelt es sich um eine unspezifisch gebundene Eu(III)-Transferrin-Komplexspezies, die der Cm(III)-Transferrin-Spezies I entspricht und in guter Übereinstimmung mit der bei Raumtemperatur nachgewiesenen Eu(III)-Transferrin-Spezies steht (Eu(III)-Transferrin-Spezies I).

Die Spektren der Eu(III)-Transferrin-Proben bei höheren pH-Werten (pH 7,4 und 8,0) sind um mehrere Größenordnungen intensiver als die der Proben bei pH 4,5/6,0. Außerdem sind die F_1 - und F_2 -Emissionsbanden maximal aufgespalten (3-fache Aufspaltung der F_1 -Bande und 5-fache Aufspaltung der F_2 -Bande, Abbildung 4.34), was charakteristisch für eine sehr unsymmetrische Koordinationsumgebung ist. Diese Ergebnisse lassen auf eine sehr starke Komplexbildung von Eu(III) durch Transferrin schließen, wie es bei der Koordination von Eu(III) an der Fe(III)-Bindungsstelle des Proteins der Fall ist (Eu(III)-Transferrin-Spezies II). Diese Eu(III)-Transferrin-Spezies wird bei Raumtemperaturbedingungen nicht beobachtet. Ursache hierfür ist

vermutlich das Auftreten von Quenchprozessen, die bei Raumtemperatur so stark ausgeprägt sind, dass der angeregte Zustand von Eu(III) im Eu(III)-Transferrin-Komplex II vollständig durch strahlungslose Prozesse depopuliert wird. Hierdurch wird die Fluoreszenzemission der Eu(III)-Transferrin-Spezies II vollständig zurückgedrängt. Bei $T < 20$ K werden Schwingungen weitestgehend unterbunden. Die Energie des angeregten Zustands kann nicht mehr effektiv durch strahlungslose Prozesse abgeführt werden und die Fluoreszenz-emission wird zum dominierenden Prozess. Daher wird die Eu(III)-Transferrin-Spezies II nur bei tiefen Temperaturen beobachtet.

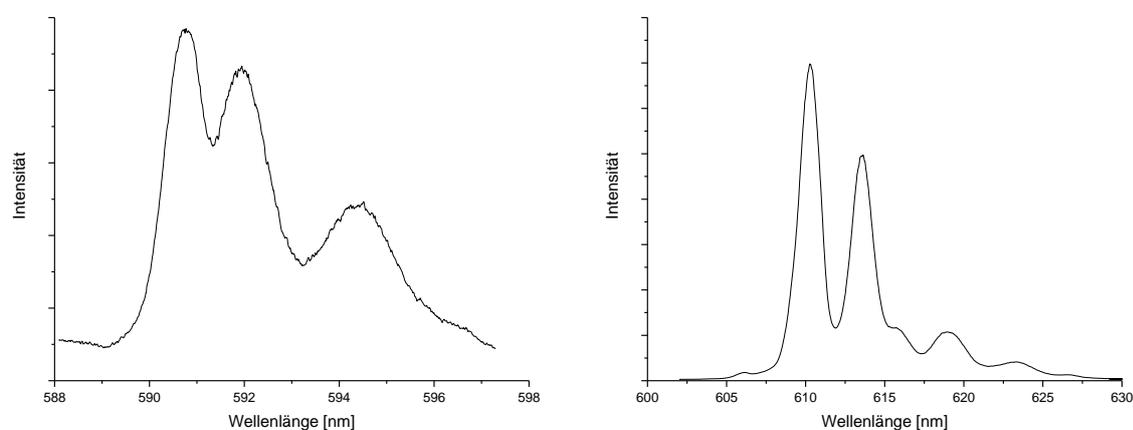


Abbildung 4.34 Aufspaltungsmuster der F₁- (links) und F₂-Emissionsbande (rechts) von Eu(III) mit Transferrin bei pH 8,0 und $T \leq 20$ K ($c(\text{Eu(III)}) = 8,33 \cdot 10^{-4}$ M, $c(\text{Tf}) = 1,66 \cdot 10^{-3}$ M).

Anhand der Eu(III)-Transferrin-Proben bei pH 7,4 und 8,0 wurde für die Eu(III)-Transferrin-Spezies II eine mittlere Fluoreszenzlebensdauer von $\tau = 341 \pm 10$ μs ermittelt (Abbildung 4.35). Gemäß der Horrocks-Gleichung entspricht dieser Wert $2,5 \pm 0,5$ Wassermolekülen in der ersten Koordinationssphäre.¹⁸⁹ Unter Berücksichtigung des Fehlers stimmt die Anzahl der Wassermoleküle sehr gut mit den Ergebnissen für die Cm(III)-Transferrin-Spezies II überein, bei der sich zwei Wassermoleküle und sieben weitere Liganden in der ersten Koordinationssphäre befinden. Dies bestätigt, dass Eu(III) ebenfalls an der Fe(III)-Bindungsstelle des Proteins koordiniert und zusätzlich weitere Liganden wie OH^- , CO_3^{2-} oder HCO_3^- die Koordinationssphäre vervollständigen. Im Gegensatz zur Eu(III)-Transferrin-Spezies II konnte die Fluoreszenzlebensdauer der Eu(III)-Transferrin-Spezies I nicht eindeutig bestimmt werden. Ursache hierfür war die geringe Fluoreszenzintensität der Proben bei pH 4,5 und 6,0.

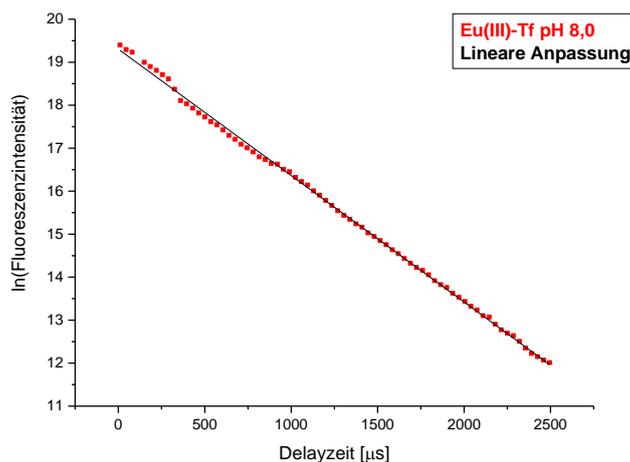


Abbildung 4.35 Zeitabhängigkeit der Fluoreszenzemission von Eu(III) mit Transferrin bei pH 8,0 und $T \leq 20$ K ($c(\text{Eu(III)}) = 8,33 \cdot 10^{-4}$ M, $c(\text{Tf}) = 1,66 \cdot 10^{-3}$ M).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Komplexierungsuntersuchungen von Eu(III) und Cm(III) mit Transferrin vergleichbare Ergebnisse liefern. Während bei $\text{pH} < 7,4$ eine nichtspezifische Eu(III)-Transferrin-Spezies I gebildet wird, die der Cm(III)-Transferrin-Spezies I entspricht, erfolgt bei $\text{pH} \geq 7,4$ der Einbau von Eu(III) an der Fe(III)-Bindungsstelle des Transferrins (Eu(III)-Transferrin-Spezies II). Diese Spezies steht in hervorragender Übereinstimmung mit den spektroskopischen Charakteristika der Cm(III)-Transferrin-Spezies II.

4.3.2.2. Vibronische Seitenbanden

An der höherenergetischen Flanke der fünffach aufgespaltenen F_2 -Emissionsbande der Eu(III)-Transferrin-Proben bei pH 7,4 und 8,0 tritt eine vibronische Seitenbande (*vibronic sideband*, VSB) auf (Abbildung 4.36). Diese Seitenbanden haben ihren Ursprung in der Kopplung der elektronischen Übergänge des Metallions mit den Schwingungsmoden der Liganden (vibronische Kopplung).^{190, 191} Anhand des Abstandes der vibronischen Seitenbanden zur sogenannten *zero-phonon line* (ZPL), im Falle der Eu(III)-TRLFS-Spektren der F_0 -Bande, können Rückschlüsse auf die direkt am Metallion koordinierenden funktionellen Gruppen und/oder Liganden gezogen werden. Beispielsweise konnten Roselli *et al.* in Spektren des Yb(III)-Transferrin-Komplexes mit SO_4^{2-} als synergistischem Anion die auftretenden vibronischen Seitenbanden den Schwingungen von Sulfat sowie der beiden koordinierenden Aminosäuren Histidin und Aspartat zuordnen.¹⁹²

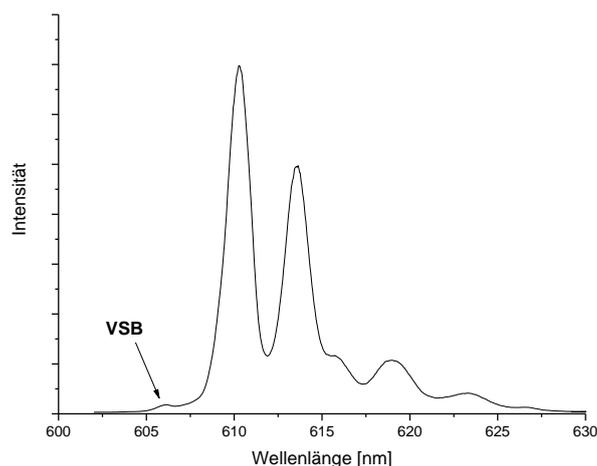


Abbildung 4.36 Vibronische Seitenbande (VSB) an der blauen Flanke der fünffach aufgespaltenen F_2 -Emissionsbande von Eu(III) mit Transferrin bei pH 8,0 und $T \leq 20$ K ($c(\text{Eu(III)}) = 8,33 \cdot 10^{-4}$ M, $c(\text{Tf}) = 1,66 \cdot 10^{-3}$ M).

In den Eu(III)-Transferrinspektren bei pH 7,4 und 8,0 beträgt der Abstand der vibronischen Seitenbande zur F_0 -Bande $720 - 730 \text{ cm}^{-1}$. Dieser Wert wird mit charakteristischen Schwingungsfrequenzen verschiedener funktioneller Gruppen und Liganden verglichen, die mittels IR- und Raman-Spektroskopie bestimmt wurden. Der Abstand der vibronischen Seitenbande zur F_0 -Bande liegt im Bereich der doppelt entarteten symmetrischen *in-plane* Deformationsschwingung von CO_3^{2-} in verschiedenen Carbonatkomplexen. Die exakte Schwingungsfrequenz hängt hierbei stark vom Metallion sowie der Koordinationsumgebung ab. Beispielsweise liegt die *in-plane* Deformationsschwingung von CO_3^{2-} in An(V)- und An(VI)-Carbonatkomplexen im Bereich von $755 - 759 \text{ cm}^{-1}$ für An(V) und $716 - 735 \text{ cm}^{-1}$ für An(VI).¹⁹³ Die entsprechende Schwingungsfrequenz von Carbonat in $\text{Eu}_2(\text{CO}_3)_3$ beträgt 755 cm^{-1} .^{194, 195} Der Vergleich dieser Literaturwerte mit dem Abstand der vibronischen Seitenbande in den Eu(III)-Transferrin-Spektren deutet darauf hin, dass Carbonat an der Komplexierung von Eu(III) mit Transferrin beteiligt ist. Allerdings ist unter den koordinierenden Aminosäuregruppen an der Fe(III)-Bindungsstelle auch ein Aspartatrest, bei dem die Komplexierung über eine COO-Gruppe erfolgt. Die Schwingungsmoden von Carboxylatgruppen sind vergleichbar mit denen des Carbonats. Die COO-Deformationsschwingung von auf einer Silberoberfläche adsorbiertem Aspartat liegt beispielsweise bei 721 cm^{-1} und ist somit in derselben Größenordnung wie die vibronische Seitenbande in den Eu(III)-Transferrin-Spektren.¹⁹⁶ Daher kann nicht zwischen Carbonat und Aspartat differenziert werden.

4.3.1. Fluorimetrie

4.3.1.1. Quenchprozesse

Bei der Fluorimetrie wird die Probe durch Absorption elektromagnetischer Strahlung elektronisch angeregt und das bei der Rückkehr in den Grundzustand ausgesendete Fluoreszenzlicht detektiert. Im Gegensatz zur TRLFS erfolgt die Detektion hierbei nicht zeitaufgelöst. Die Intensität der Fluoreszenz wird entscheidend durch Quenchprozesse beeinflusst. Man unterscheidet zwischen dynamischer und statischer Fluoreszenzlöschung. Beim statischen Quenchen wird ein Komplex aus Quencher und Fluorophor gebildet, der selbst nicht fluoresziert. Das dynamische Quenchen beruht auf Stößen des Quenchers mit dem Fluorophor, der sich im angeregten Zustand befindet. Dabei geht der Fluorophor in den Grundzustand über, ohne dabei Photonen zu emittieren (Stoßlöschung). Die Beschreibung dieser Quenchprozesse erfolgt durch die Stern-Volmer-Gleichung (4.29).^{197, 198}

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} \cdot [Q] \quad (4.29)$$

Hierbei ist F_0 die Fluoreszenzintensität des Fluorophors in Abwesenheit des Quenchers, F die Fluoreszenzintensität in Anwesenheit des Quenchers, K_{SV} die Stern-Volmer-Konstante und $[Q]$ die Quencherkonzentration. Liegt ein dynamischer Quenchprozess vor, hängt die Stern-Volmer-Konstante von der Lebensdauer τ_0 des Fluorophors bei Abwesenheit des Quenchers sowie der bimolekularen Quenchkonstante k_q ab.^{197, 198}

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} \cdot [Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (4.30)$$

Die Stern-Volmer-Gleichung kann nur im Falle von rein statischem oder rein dynamischem Quenchen angewendet werden. In diesem Fall ergibt die Auftragung von F_0/F gegen $[Q]$ eine Gerade mit der Steigung K_{SV} .

Große Moleküle bestehen in der Regel aus mehreren Fluorophoren. Bei Proteinen sind dies aromatische Aminosäuren, vor allem Tryptophan und Tyrosin. In Abhängigkeit ihrer Lage im Protein können diese für einen Quencher mehr oder weniger gut zugänglich sein.^{198, 199} In diesem Fall hat die Stern-Volmer-Auftragung

einen zur x-Achse gekrümmten Verlauf, der durch die modifizierte Stern-Volmer-Gleichung beschrieben wird:

$$\frac{F_0}{(F_0-F)} = \frac{1}{f_a} + \frac{1}{K_a \cdot f_a \cdot [Q]} \quad (4.31)$$

Hierbei ist f_a der Anteil der für den Quencher zugänglichen Fluorophore und K_a die Stern-Volmer-Konstante für diese Fluorophore. Treten zwei Arten von Fluorophoren auf (für den Quencher zugängliche und nicht zugängliche) ergibt sich durch Auftragung von $F_0/(F_0-F)$ gegen $1/[Q]$ eine Gerade, aus deren Steigung und Achsenabschnitt K_a und f_a bestimmt werden können. Im Idealfall entspricht der f_a -Wert dem prozentualen Anteil der Fluorophore, die am Quenchprozess teilnehmen.

4.3.1.2. Fluorimetrie von Eu(III)-Transferrin

Neben den Eu(III)-TRLFS-Untersuchungen, die auf Lumineszenzprozessen des Metallions beruhen, wurde die Fluoreszenzemission des Proteins in Abhängigkeit der Eu(III)-Konzentration sowie des pH-Wertes (pH 6,0, pH 7,4 und pH 8,0) untersucht. Die Anregung der aromatischen Aminosäuren erfolgte bei $\lambda = 290$ nm. Zu einer $1,0 \cdot 10^{-5}$ M Transferrinlösung wurde schrittweise $1,0 \cdot 10^{-2}$ M bzw. $1,0 \cdot 10^{-3}$ M EuCl_3 -Lösung zugegeben und jeweils ein Emissionsspektrum aufgenommen. Abbildung 4.37 zeigt exemplarisch die Fluoreszenzspektren der Eu(III)-Transferrin-Probe bei pH 7,4.

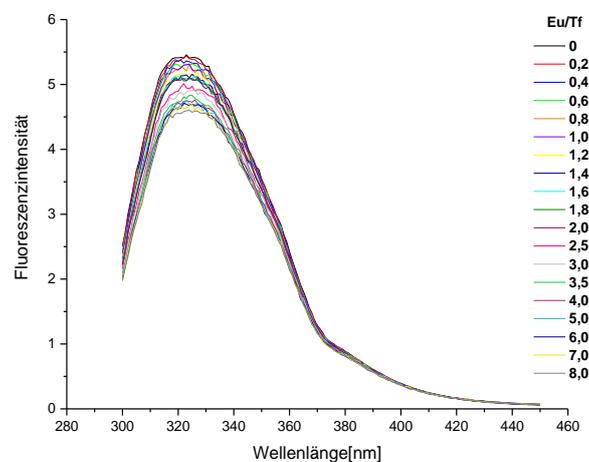


Abbildung 4.37 Fluoreszenzspektren von Transferrin in Abhängigkeit des Eu(III)/Transferrin-Verhältnisses bei pH 7,4 (Anregung bei 290 nm, $c(\text{Tf}) = 1,00 \cdot 10^{-5}$ M, $c(\text{Eu(III)}) = 0 - 7,24 \cdot 10^{-5}$ M).

4. Ergebnisse und Diskussion

Um Aussagen über die auftretenden Quenchprozesse treffen zu können, wurde eine Stern-Volmer-Anpassung durchgeführt (Abbildung 4.38). Bei pH 7,4 ergibt sich bei kleinen Eu(III)-Konzentrationen eine Gerade, aus deren Steigung eine Stern-Volmer-Konstante von $K_{SV} = 3657,56 \text{ M}^{-1}$ abgeleitet wurde. Unter Berücksichtigung einer Fluoreszenzlebensdauer von $\tau_0 = 3,34 \text{ ns}$ für das Transferrinmolekül wird hieraus eine bimolekulare Quenchkonstante von $k_q = 1,10 \cdot 10^{12} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ erhalten.²⁰⁰ Da k_q in wässrigen Lösungen nicht größer als $1 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ sein kann, liegt ein statischer Quenchprozess vor.¹⁹⁸ Analoge Ergebnisse ergeben sich für die Messungen bei pH 6,0 und 8,0. Diese stimmen mit den Ergebnissen von *Michon et al.* bezüglich des Fluoreszenzquenchings von Transferrin durch UO_2^{2+} überein, wo die Fluoreszenzlöschung ebenfalls durch statisches Quenchen erfolgt.^{83, 201}

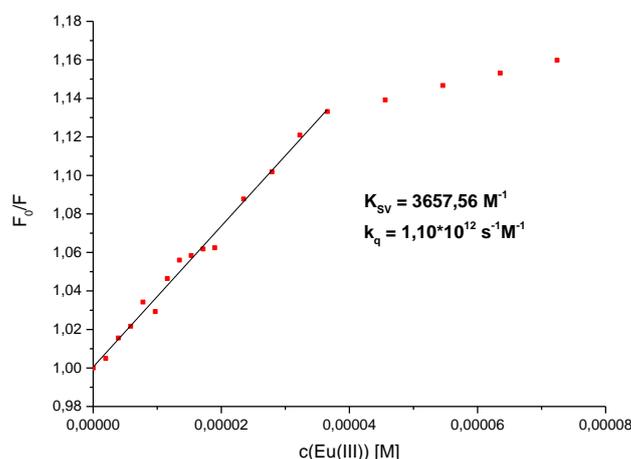


Abbildung 4.38 Stern-Volmer-Auftragung zur Bestimmung der Stern-Volmer-Konstanten für Eu(III) mit Transferrin bei pH 7,4 (Anregung bei 290 nm, $c(\text{Tf}) = 1,00 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $c(\text{Eu(III)}) = 0 - 7,24 \cdot 10^{-5} \text{ M}$).

Da bei Proteinen in der Regel mehrere Fluorophore vorliegen, wurde die modifizierte Stern-Volmer-Gleichung angewendet. Abbildung 4.39 zeigt die modifizierte Stern-Volmer-Anpassung für die Eu(III)-Transferrin-Probe bei pH 7,4. Die aus Steigung und Achsenabschnitt ermittelten f_a - und K_a -Werte für die Proben bei pH 6,0, 7,4 und 8,0 variieren von 0,21 bis 0,37 für f_a und $1,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ bis $3,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ für K_a . Die Werte liegen zwar in derselben Größenordnung, stimmen jedoch nur begrenzt überein. Zudem ist kein Trend für die verschiedenen pH-Werte erkennbar. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die auftretenden Änderungen der Fluoreszenzintensität verhältnismäßig gering sind. Daher verursachen bereits kleine Schwankungen große Abweichungen in den Stern-Volmer-Anpassungen und somit in den daraus bestimmten Werten.

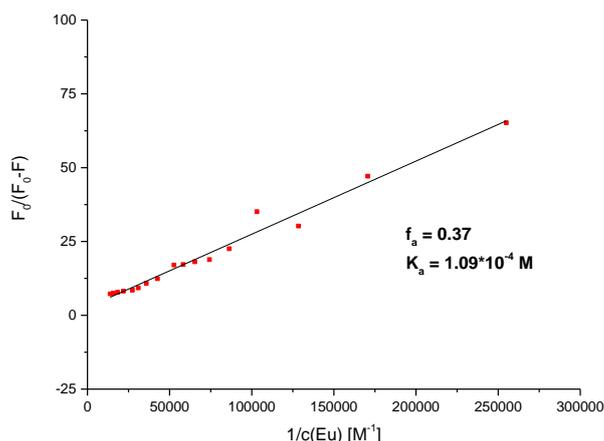


Abbildung 4.39 Modifizierte Stern-Volmer-Auftragung für Eu(III) mit Transferrin bei pH 7,4 (Anregung 290 nm, $c(\text{Eu(III)}) = 0 - 7,24 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $c(\text{Tf}) = 1,10^{-5} \text{ M}$).

Aus den f_a -Werten (0,21 – 0,37) ergibt sich, dass rund 30% der für die Fluoreszenz verantwortlichen Aminosäuren des Transferrins am Quenchprozess durch Eu(III) beteiligt sind. Da Transferrin über eine Vielzahl fluoreszierender Aminosäuren verfügt, wobei die acht Tryptophan- und 26 Tyrosinreste den Hauptbeitrag zur Fluoreszenzemission des Moleküls leisten, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse keine Aussage darüber getroffen werden, welche Aminosäuren tatsächlich am Quenchprozess beteiligt sind.

4.4. EXAFS-Spektroskopie von Am(III)-, Eu(III)- und Np(V)-Transferrin

Um weitere strukturelle Informationen über die Actiniden-/Lanthaniden-Transferrin-Komplexe zu erhalten, wurden EXAFS-Messungen durchgeführt. Zwei Np(V)-Transferrin-Proben (Metallion/Transferrin 1 : 1) bei pH 7,2 und 8,5 und eine Eu(III)-Transferrin-Probe bei pH 7,2 wurden bei Raumtemperatur an der L_{III} -Kante gemessen. Die EXAFS-Oszillationen sowie die korrespondierenden Fouriertransformationen der Np(V)-Transferrin-Proben (pH 7,2 und 8,5) stimmen mit den Daten des entsprechenden Aquoions überein. Folglich liegt keine Komplexierung des Metallions durch das Protein vor. Dies kann auf die schwachen Komplexeigenschaften des Np(V) zurückgeführt werden. Im Falle der Eu(III)-Transferrin-Probe bei pH 7,2 zeigen die EXAFS-Oszillationen und die entsprechenden Fouriertransformationen die Existenz mehrerer Koordinationssphären (Abbildung 4.40). Die

4. Ergebnisse und Diskussion

Koordinationszahl in der ersten Schale beträgt neun und der mittlere Abstand 2,41 Å (Tabelle 4.4). Dieser ist kleiner als der mittlere Abstand im Eu(III)-Aquoion ($R = 2,43 - 2,44$ Å), was auf eine Komplexierung des Eu(III) durch das Protein bei pH 7,2 hindeutet.^{202, 203}

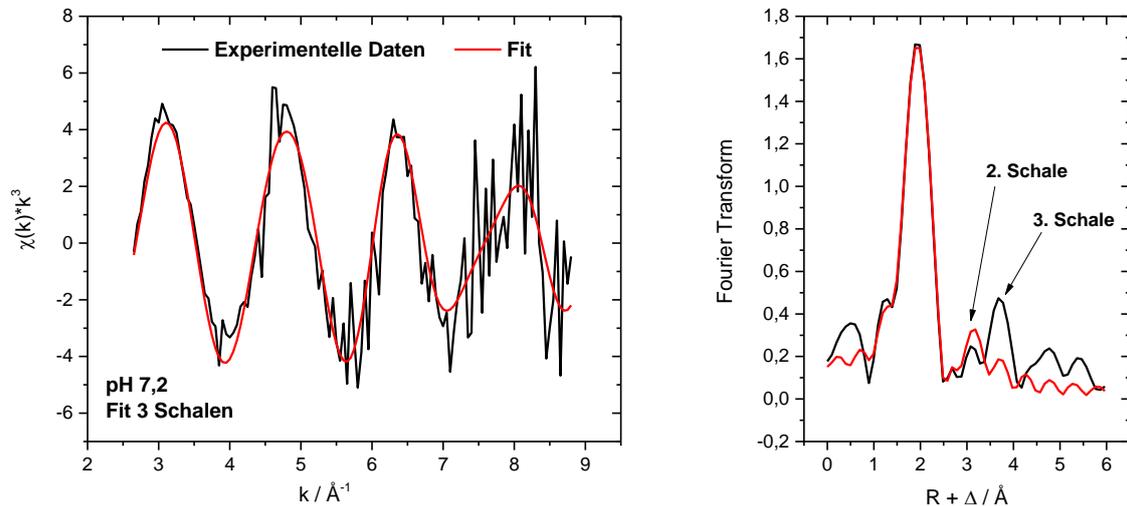


Abbildung 4.40 k^3 -gewichtete Eu(III)-EXAFS-Spektren (links) und zugehörige Fouriertransformationen (rechts) für Eu(III)-Transferrin-Probe bei pH 7,2; $T = 295$ K, $c(\text{Eu(III)}) = c(\text{Tf}) = 6,0 \cdot 10^{-4}$ M.

Tabelle 4.4 Zusammenfassung der Strukturparameter der EXAFS-Spektren der Am(III)-Transferrin-Proben (pH 7,2, 8,5; Tf:Am(III) = 4,8) bei $T = 77$ K sowie der Eu(III)-Transferrin-Probe (pH 7,2, Tf:Eu(III) = 1) bei $T = 295$ K (Fehler sind in Klammern angegeben).

M	T [K]	pH	1 Schale			2. Schale			3. Schale			ΔE_0	Red. Er.
			N	R / Å	$\sigma / \text{Å}^2$	N	R / Å	$\sigma / \text{Å}^2$	N	R / Å	$\sigma / \text{Å}^2$		
Am	70	7.2	8,7 (0,5)	2,47 (1)	0,007 (1)	-	-	-	-	-	-	-6,2 (0,6)	0,41
			8,8 (1,0)	2,38 (1)	0,013 (2)	-	-	-	-	-	-	-	-3,8 (1,0)
Am	70	8.5	8,6 (1,0)	2,38 (1)	0,012 (2)	3,0 (1,0)	3,73 (3)	0,003*	-	-	-	-3,8 (0,9)	0,63
			8,8 (1,0)	2,38 (1)	0,013 (2)	2,8 (1,0)	3,72 (3)	0,003*	6,8 (2,3)	5,19 (3)	0,003*	-4,0 (0,9)	0,59
Eu	298	7.2	8,7 (1,1)	2,41 (0,02)	0,013	2,6 (2,6)	2,76 (0,04)	0,003*	4,4 (1,2)	3,70 (0,02)	0,03*	2,21	2,04

* wurde während des Fits konstant gehalten

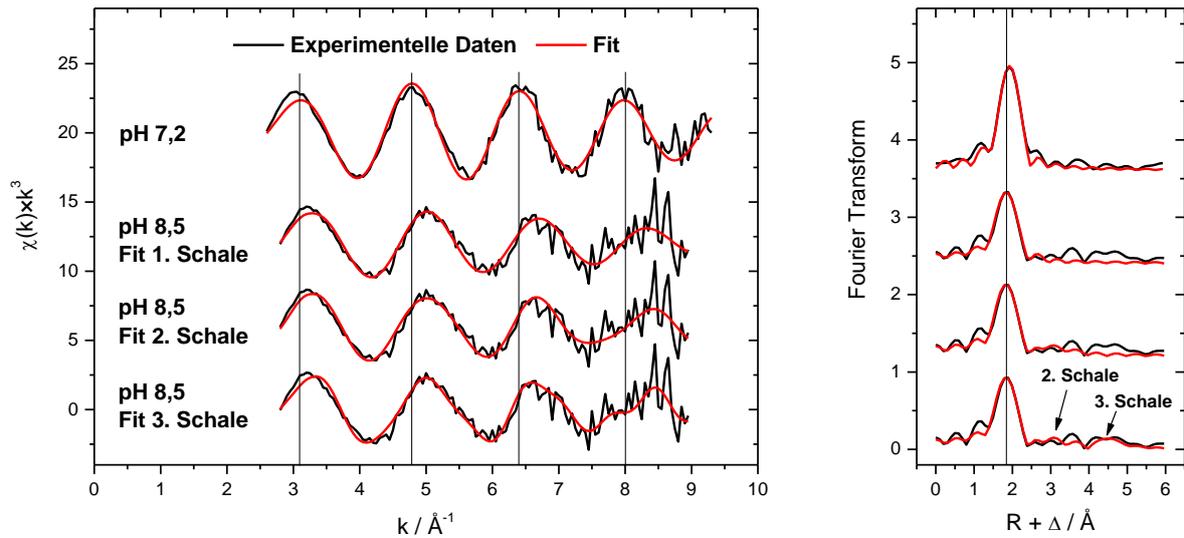


Abbildung 4.41 k^3 -gewichtete Am(III)-EXAFS-Spektren (links) und zugehörige Fourier-Transformationen (rechts) für Am(III)-Transferrin-Proben bei pH 7,2 und 8,5; $T = 77 \text{ K}$, $c(\text{Am(III)}) = 5,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $c(\text{Tf}) = 2,4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Für das Spektrum bei pH 8,5 sind drei verschiedene Anpassungen gezeigt (Strukturparameter siehe Tabelle 4.4).

Die bei Raumtemperatur untersuchten Proben wurden aufgrund der für die EXAFS-Messungen benötigten Metallionenkonzentration von 0,5 mM mit einem Metallionen : Transferrin-Verhältnis von 1 : 1 hergestellt, weshalb keine quantitative Komplexierung mit Transferrin erfolgte. Bei den Am(III)-Transferrin-Proben hingegen wurde ein größerer Transferrinüberschuss eingesetzt ($c(\text{Am(III)}) = 0,5 \text{ mM}$, $c(\text{Tf}) = 2,4 \text{ mM}$, $\text{Tf}:\text{Am(III)} = 4,8$), um einen höheren Anteil an Komplexierung zu erreichen. Um die Qualität der EXAFS-Spektren zu verbessern, wurden die Am(III)-Transferrin-Proben (pH 7,2 und 8,5) außerdem bei Tieftemperaturbedingungen ($T = 77 \text{ K}$) gemessen. Die k^3 -gewichteten Am(III)-EXAFS-Spektren (L_{III} -Kante) sind zusammen mit den entsprechenden Fourier-Transformationen in Abbildung 4.41 gezeigt.

Die EXAFS-Spektren bei pH 7,2 und 8,5 zeigen deutliche Unterschiede, was auf das Vorliegen verschiedener, strukturell unterschiedlicher Am(III)-Spezies hindeutet (Abbildung 4.41, links). Eine Erhöhung des pH-Wertes von 7,2 zu 8,5 führt zu einer Verringerung der Amplitude sowie einer deutlich sichtbaren Verschiebung der EXAFS-Oszillationen, was durch die vertikalen Linien verdeutlicht wird. Ein Vergleich der zugehörigen Fourier-Transformation zeigt, dass bei zunehmendem pH-Wert eine Verschiebung der Hauptbande zu kleineren Abständen auftritt

(Abbildung 4.41, rechts). Die strukturellen Parameter der verschiedenen Anpassungen sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Das Spektrum bei pH 7,2 kann durch Anpassung mit einer Anzahl von 8-9 Sauerstoffatomen in der ersten Koordinationssphäre bei einem durchschnittlichen Abstand von 2,47 Å beschrieben werden. Dies stimmt mit den Literaturdaten der Aquospezies von Am(III) ($R = 2,48 \text{ \AA}$) sowie anderen trivalenten Actiniden überein.²⁰³ Im Gegensatz hierzu zeigen die TRLFS-Untersuchungen, dass mit Cm(III) unter diesen Bedingungen signifikante Mengen der unspezifischen Cm(III)-Transferrin-Spezies I gebildet werden. Da mittels EXAFS-Spektroskopie nur gemittelte Bindungsabstände bestimmt werden, wäre jedoch selbst bei einem signifikanten Anteil einer solchen unspezifischen Am(III)-Transferrin-Spezies in der Probe keine deutliche Verkürzung der mittleren Abstände zu erwarten. Daher kann die Bildung einer unspezifischen Am(III)-Transferrin-Spezies bei pH 7,2 mit dieser Methode nicht ausgeschlossen werden.

Das Spektrum bei pH 8,5 wurde unter Berücksichtigung von ein, zwei oder drei Schalen angepasst. In allen Fällen können die Spektren durch neun Nachbaratome in der ersten Koordinationssphäre beschrieben werden. Der mittlere Abstand ist mit 2,38 Å deutlich kleiner als der des Am(III)-Aquoions (2,48 Å) und liegt im Bereich der Abstände, die beim Einbau von Am(III) in Mineralstrukturen vorliegen. Beispielsweise beträgt der mittlere Metallionen-Ligand-Abstand bei der Inkorporation von Am(III) in Calcit 2,40 Å.¹²⁷ Komplexspezies, die bei der Sorption von Am(III) an Mineraloberflächen auftreten, zeichnen sich durch längere Bindungsabstände aus. Der mittlere Abstand, der bei der Sorption von Am(III) an Smectit und Kaolinit auftritt, beträgt 2,466 Å – 2,487 Å.²⁰⁴ Folglich liegt im Falle der Am(III)-Transferrin-Spezies eine starke, multidentate Koordination des Metallions an der Fe(III)-Bindungsstelle des Transferrinmoleküls vor. Eine unspezifische Bindung von Am(III) an funktionelle Gruppen auf der Proteinoberfläche würde längere Bindungsabstände ergeben und kann ausgeschlossen werden. Somit stimmen die EXAFS-Ergebnisse von Am(III)-Transferrin bei pH 8,5 sehr gut mit den TRLFS-Ergebnissen von Cm(III) mit Transferrin überein, die die Komplexbildung von Cm(III) an der Fe(III)-Bindungsstelle des Proteins bei $\text{pH} > 7,4$ zeigen. Allerdings kann in den EXAFS-Spektren aufgrund der sehr komplexen Struktur des Transferrins und den geringen Unterschieden in der Ordnungszahl der verschiedenen koordinierenden

Atome nicht zwischen Sauerstoff, Stickstoff und Kohlenstoff unterschieden werden. Daher ist mit dieser Methode keine Aussage über die exakte Zusammensetzung der Koordinationssphären möglich.

Wird bei der Anpassung zusätzlich zur ersten Koordinationssphäre noch die zweite und dritte Schale berücksichtigt, erhält man hierfür 2,8 - 3,0 Nachbaratome bei einem mittleren Abstand von 3,72 - 3,73 Å und 6,8 Nachbaratome bei 5,19 Å. Die Einbeziehung mehrerer Schalen führt zu einer Verringerung des Fehlers bei der Anpassung von 0,67 zu 0,59 (Red. Er. in Tabelle 4.4). Auch wenn die genaue Zusammensetzung der Koordinationssphären nicht bekannt ist, zeigt das Vorhandensein mehrerer Schalen sowie der kurze mittlere Bindungsabstand in der ersten Koordinationssphäre, dass die Koordinationsumgebung des Metallion im Am(III)-Transferrin-Komplex komplex aber wohldefiniert ist.

Der mittlere Am(III)-Transferrin-Abstand in der ersten Koordinationssphäre der Probe bei pH 8,5 (2,38 Å) ist größer als die Abstände von Fe(III) zu den Aminosäuren des Transferrins, die mit DFT berechnet wurden (1,90 – 2,30 Å).²⁰⁵ Eine mögliche Ursache hierfür ist der fast doppelt so große effektive Ionenradius von Am(III) im Vergleich zu Fe(III) ($IR_{Fe(III)} = 55$ pm, $IR_{Am(III)} = 97,5$ pm; die Werte gelten für eine Koordinationszahl von sechs sowie Fe(III)-*low-spin*-Konfiguration).⁹² Außerdem ist es möglich, dass unter den gegebenen experimentellen Bedingungen neben der Am(III)-Transferrin-Komplexspezies auch ein geringer Anteil an nicht-komplexiertem Am(III) (Am(III)-Aquoion) vorliegt. Der mittels EXAFS bestimmte mittlere Abstand der Atome in der ersten Koordinationssphäre von 2,38 Å entspricht einem Mittelwert der Abstände der vorliegenden Spezies. Damit könnte die Anwesenheit geringer Mengen des Am(III)-Aquoions ($R = 2,48$ Å) zu einer weiteren Zunahme der Abstände für Am(III)-Transferrin führen.

Die strukturellen Parameter der Am(III)-Transferrin-Probe bei pH 8,5 ($T = 295$ K) werden mit den entsprechenden Werten der Eu(III)-Transferrin-Probe bei pH 7,2 ($T = 70$ K) verglichen. Bei beiden Proben befinden sich neun Nachbaratome in der ersten Koordinationssphäre. Allerdings liegt der mittlere Abstand der Eu(III)-Transferrin-Probe mit 2,41 Å zwischen dem des Am(III)-Transferrinkomplexes ($R = 2,38$ Å) und dem des Eu(III)-Aquoions ($R = 2,43-2,44$ Å).^{202, 203} Dies lässt darauf schließen, dass bei diesem pH-Wert keine Komplexbildung des Eu(III) an der Fe(III)-

Bindungsstelle erfolgt und somit eine unspezifische Bindung des Eu(III) neben Anteilen des Eu(III)-Aquoions überwiegt. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der EXAFS-Untersuchungen eine Komplexierung von Am(III) an der Fe(III)-Bindungsstelle bei hohem pH-Wert (pH 8,5) sowie die nichtspezifische Bindung von Eu(III) an das Protein bei niedrigerem pH-Wert (pH 7,2). Dies stimmt hervorragend mit den TRLFS-Ergebnissen von Cm(III) mit Transferrin überein, die die Bildung einer unspezifischen Cm(III)-Transferrin-Spezies im pH-Bereich von 3,5 bis 9,0 sowie die Komplexierung von Cm(III) an der Fe(III)-Bindungsstelle des Transferrins bei $\text{pH} > 7,4$ zeigen.

Ein Vergleich der Strukturparameter der Am(III)- und Eu(III)-Transferrin-Komplexe mit EXAFS-Daten anderer An(III)/Ln(III)-Transferrin-Komplexe ist nicht möglich, da bisher ausschließlich EXAFS-Untersuchungen mit tetravalenten Actinidionen (Th(IV), Np(IV), Pu(IV)) und U(VI) durchgeführt wurden.²⁰⁶⁻²⁰⁸ Um die Actinidionen in Lösung zu halten, wurde bei diesen Studien NTA oder Acetat zugesetzt, was zur Bildung von ternären An-NTA-Transferrin-Komplexen führt. Die Koordinationsumgebung der Actinidionen in diesen Komplexen entspricht nicht der Struktur, die unter physiologischen Bedingungen mit Carbonat als synergistischem Anion vorliegt.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Zur Entwicklung erfolgreicher Dekontaminationsstrategien ist die bioanorganische Chemie inkorporierter Radionuklide, insbesondere der hoch radiotoxischen Actiniden, von besonderem Interesse. Eine Möglichkeit für den Transport dieser Elemente im Körper ist die Komplexierung mit Transferrin. Dies ist eines der wichtigsten Blutserumproteine, das für den Eisentransport und die Abgabe des Eisens an die Zelle verantwortlich ist. Es setzt sich aus zwei strukturell sehr ähnlichen Lobes (N- und C-Lobe) zusammen, die jeweils eine Bindungsstelle für Fe(III) aufweisen. *In vivo* sind jedoch nur rund 30% mit Eisen beladen, weshalb potentiell auch andere Metallionen an Transferrin binden können. Auf diese Weise kann Transferrin die Bioverfügbarkeit der Metallionen in einem Organismus entscheidend beeinflussen und somit auch eine wesentliche Rolle für den Biochemie inkorporierter Actinidionen spielen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollen Informationen über die Wechselwirkung von dreiwertigen Actinid- und Lanthanidionen mit Transferrin liefern und somit zeigen, ob mittels Transferrin ein potentieller Transport dieser Metallionen im Körper erfolgen könnte.

In der vorliegenden Dissertation wurde die Komplexierung von Cm(III), Eu(III) und Am(III) mit humanem Serumtransferrin und dem rekombinanten N-Lobe des humanen Serumtransferrins (hTf/2N) mittels zeitaufgelöster Laserfluoreszenzspektroskopie (TRLFS) und EXAFS-Spektroskopie (*Extended X-Ray Absorption Fine Structure*) untersucht. Cm(III) und Eu(III) wurden aufgrund der hervorragenden Fluoreszenzeigenschaften als Vertreter der trivalenten Actiniden und Lanthaniden verwendet. Aufgrund der höheren benötigten Konzentrationen wird Cm(III) bei den EXAFS-Untersuchungen durch Am(III) ersetzt, das in wesentlich größeren Mengen zur Verfügung steht.

Mittels TRLFS konnte erstmals die Bildung zweier Cm(III)-Transferrin-Spezies in Abhängigkeit des pH-Werts nachgewiesen werden. Die Cm(III)-Transferrin-Spezies I wird im pH-Bereich von 3,5 bis 9,7 gebildet, während die Bildung der Cm(III)-Transferrin-Spezies II erst bei $\text{pH} \geq 7,0$ beginnt. Die spektroskopischen

Charakteristika der Emissionsbanden sowie die Fluoreszenzlebensdauern zeigen, dass es sich bei der Cm(III)-Transferrin-Spezies I um eine nichtspezifische Komplexspezies handelt, bei der das Metallion an Aminosäurereste auf der Proteinoberfläche bindet, während bei der Cm(III)-Transferrin-Spezies II das Metallion an einer der Fe(III)-Bindungsstellen des Transferrins komplexiert. Durch Verwendung eines großen Transferrinüberschusses und aufgrund des sehr unterschiedlichen Bindungsvermögens von C- und N-Lobe erfolgt die Bindung von Cm(III) hierbei ausschließlich an der C-terminalen Bindungsstelle. Dort wird Cm(III) von zwei Wassermolekülen sowie sieben weiteren Liganden komplexiert. Hierbei handelt es sich um die vier Aminosäurereste des Transferrins (His, Asp, 2 x Tyr) sowie drei weitere Liganden (vorzugsweise OH oder CO₃²⁻).

Um die Komplexierung von Cm(III) am N-Lobe zu untersuchen, wurden Untersuchungen mit dem rekombinanten N-Lobe des Transferrins (hTf/2N) als Modellverbindung durchgeführt. Die Cm(III)-hTf/2N-Spezies ist vergleichbar mit der Cm(III)-Transferrin-Spezies II, die bei pH > 7,4 gebildet wird. Dies unterstreicht, dass die Koordinationsumgebung an den C- und N-terminalen Bindungsstellen des Transferrins sehr ähnlich ist. Im Gegensatz zu Transferrin wird mit hTf/2N keine der Cm(III)-Transferrin-Spezies I entsprechende, nichtspezifisch gebundene Spezies gebildet. Folglich erfolgt die Komplexierung bei der Cm(III)-Transferrin-Spezies I am C-Lobe oder beide Lobes sind an der Bildung dieser Spezies beteiligt. Außerdem hat die Abwesenheit des zweiten Lobes auch einen Einfluss auf die Stabilität des Proteins selbst sowie der entsprechenden Cm(III)-Komplexe. Während die Cm(III)-Transferrin-Spezies über lange Zeiträume (< 96 Stunden) stabil sind, erfolgt bei der Cm(III)-hTf/2N-Spezies bereits nach einem Tag eine Dekomplexierung.

Zur quantitativen Beschreibung der Komplexierung von Cm(III) an der C-terminalen Fe(III)-Bindungsstelle des Transferrins, wurde die Stabilitätskonstante der Cm(III)-Transferrin-Spezies II bestimmt, sie beträgt $\log K_C = 8,06 \pm 0,5$. Die Stabilitätskonstante der Cm(III)-hTf/2N-Spezies konnte anhand der vorliegenden Daten nur abgeschätzt werden, sie ist um zwei Größenordnungen kleiner als die des C-Lobes. Im Rahmen des Fehlers stehen die Stabilitätskonstanten in guter Übereinstimmung mit den von *Sturzbecher-Hoehne et al.* bestimmten $\log K$ -Werten von $\log K_C = 8,8 \pm 0,3$ und $\log K_N = 7,0 \pm 0,1$ (pH 8,6).⁸⁵ Diese Ergebnisse bestätigen eindeutig, dass sich die C-

und N-terminalen Bindungsstellen des Transferrins bezüglich ihres Bindungsvermögens für Metallionen signifikant unterscheiden.

Für eine effektive Bindung von Fe(III) an Transferrin wird Carbonat als sogenanntes synergistisches Anion benötigt. Durch die Bildung eines ternären Komplexes werden sowohl Anion als auch Metallion fest im Komplex verankert. Um zu untersuchen, ob Carbonat einen ähnlichen Einfluss auf die Komplexbildung von Cm(III) mit Transferrin hat, wurden Komplexbildungsuntersuchungen bei verschiedenen Carbonatkonzentrationen ($c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 0 \text{ mM}$, $0,23 \text{ mM}$ und 25 mM (physiologische Carbonatkonzentration)) durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Erhöhung der Carbonatkonzentration die Bildung der Cm(III)-Transferrin-Spezies II deutlich begünstigt, was bedeutet, dass Carbonat tatsächlich als synergistisches Anion für die Komplexbildung von Cm(III) an der C-terminalen Bindungsstelle fungiert. Neben diesem positiven Effekt ist die Carbonatkomplexbildung aber auch eine wichtige Konkurrenzreaktion. Die Bildung der nichtspezifischen Cm(III)-Transferrin-Spezies I wird bei physiologischer Carbonatkonzentration ($c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 25 \text{ mM}$) vollständig unterdrückt. Darüber hinaus sind die Anteile der Cm(III)-Transferrin-Spezies II bei physiologischer Carbonatkonzentration deutlich kleiner als in Abwesenheit von Carbonat.

Im Gegensatz zu Transferrin konnte kein synergistischer Effekt von Carbonat auf die Komplexbildung von Cm(III) mit hTf/2N nachgewiesen werden. Stattdessen wird die Bildung der Cm(III)-hTf/2N-Spezies aufgrund der konkurrierenden Carbonatkomplexbildung stark zurückgedrängt, wobei dieser Effekt deutlich stärker ist als bei Transferrin. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der kompetitive Effekt von Carbonat auf die Komplexbildungsreaktion mit Transferrin und hTf/2N berücksichtigt werden muss, wenn die Komplexbildung von Actinidionen mit Transferrin unter physiologischen Bedingungen betrachtet wird.

Die Komplexbildung von Cm(III) mit hTf/2N sowie an der C-terminalen Bindungsstelle des Transferrins sind temperaturabhängige Reaktionen. Eine Erhöhung der Temperatur von Raumtemperatur ($T = 22,0^\circ\text{C}$) auf physiologische Temperatur ($T = 37,5^\circ\text{C}$) begünstigt die Komplexbildung deutlich. Die in dieser Arbeit bestimmten thermodynamischen Daten (ΔH und ΔS) zeigen erstmals, dass die Komplexbildungsreaktion für beide Proteine endotherm ist und durch einen großen

Entropiegewinn getrieben wird, was auf den ausgeprägten Chelateffekt des Proteins bei einer Komplexierung des Metallions an der Fe(III)-Bindungsstelle zurückzuführen ist.

In Ergänzung zu den Speziationsuntersuchungen mit Cm(III) wurden Tieftemperatur-TRLFS-Messungen mit Eu(III) durchgeführt. Während die Excitations- und Emissionsspektren bei pH 4,5/6,0 die Bildung einer unspezifischen Eu(III)-Transferrin-Spezies I zeigen, erfolgt bei pH 7,4/8,0 die Komplexierung von Eu(III) an der Fe(III)-Bindungsstelle des Transferrin. Dies steht in exzellenter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Cm(III)-Transferrin-Komplexierung. Auch die Fluoreszenzlebensdauer, die die Anwesenheit von $2,5 \pm 0,5$ Wassermolekülen in der ersten Koordinationssphäre bestätigt, zeigt eine analoge Zusammensetzung der Koordinationssphäre der Eu(III)- und Cm(III)-Transferrin-Komplexe.

Um weitere strukturelle Informationen über die Koordinationsumgebung der Metallionen an der Fe(III)-Bindungsstelle des Transferrins zu erhalten, wurden EXAFS-Untersuchungen durchgeführt. Die Analyse der EXAFS-Spektren der Am(III)-Transferrin-Probe bei pH 8,5 zeigt eine Koordination mit neun Nachbaratomen im mittleren Abstand von $2,38 \text{ \AA}$ in der ersten Koordinationssphäre. Der Bindungsabstand ist deutlich kleiner als der des Am(III)-Aquoions ($2,48 \text{ \AA}$) und liegt im Bereich der Abstände, die beim Einbau von Am(III) in Mineralstrukturen vorliegen, was eine starke, multidentate Koordination des Metallions an der Fe(III)-Bindungsstelle des Transferrinmoleküls belegt. Im Falle von Eu(III)-Transferrin bei pH 7,2 beträgt die Koordinationszahl in der ersten Schale ebenfalls neun, jedoch ist der mittlere Abstand mit $2,41 \text{ \AA}$ deutlich länger als der des Am(III)-Transferrinkomplexes bei pH 8,5 ($R = 2,38 \text{ \AA}$). Dies lässt darauf schließen, dass unter diesen Bedingungen eine unspezifische Bindung des Eu(III) vorliegt, was vergleichbar mit der Bildung der Cm(III)-Transferrin-Spezies I ist. Eine Wechselwirkung von Np(V) mit Transferrin konnte anhand der EXAFS-Spektren bei pH 7,2 und 8,5 nicht beobachtet werden.

Bezüglich des potentiellen Transports von Actinidionen im menschlichen Körper ist die Komplexierung von Cm(III) mit Transferrin und hTf/2N bei physiologischen Bedingungen (pH 7,4, $T = 310 \text{ K}$, $c(\text{Carbonat})_{\text{tot}} = 25 \text{ mM}$, $c(\text{NaCl}) = 150 \text{ mM}$) von besonderem Interesse. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass unter diesen

Bedingungen im Falle von hTf/2N ausschließlich die Cm(III)-Carbonat-Spezies $\text{Cm}(\text{CO}_3)^+$ und $\text{Cm}(\text{CO}_3)_2^-$ vorliegen, während die Bildung der Cm(III)-hTf/2N-Spezies vollständig unterdrückt ist. Unter der Voraussetzung, dass hTf/2N ein geeignetes Modell für den N-Lobe des Transferrins darstellt, ist die Komplexbildung von Cm(III) an der N-terminalen Bindungsstelle unter physiologischen Bedingungen somit nicht relevant. Im Gegensatz hierzu liegen im Falle des Transferrins neben 29% der $\text{Cm}(\text{CO}_3)^+$ -Spezies, 38% der $\text{Cm}(\text{CO}_3)_2^-$ -Spezies, 18% der $\text{Cm}(\text{CO}_3)_3^{3-}$ -Spezies auch 15% der Cm(III)-Transferrin-Spezies II vor. Dies bedeutet, dass die Komplexbildung von Cm(III) an der C-terminalen Bindungsstelle des Transferrins unter diesen Bedingungen durchaus mit der Carbonatkomplexbildung konkurrieren kann. Daher könnte die Cm(III)-Transferrin-Komplexspezies II potentiell im Blut transportiert werden, an den Rezeptor binden und via Endocytose in die Zelle eingeschleust werden. Voraussetzung hierfür wäre allerdings, dass an der N-terminalen Bindungsstelle Fe(III) oder ein anderes Metallion koordiniert, sodass das vollständig beladene Transferrin in der geschlossenen Konformation vorliegt.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Komplexbildungsuntersuchungen von An(III) und Ln(III) mit Transferrin und hTf/2N tragen zu einem besseren Verständnis des Verhaltens inkorporierter Radionuklide bei. Während die meisten in der Literatur beschriebenen Studien nur phänomenologischer Natur sind, liefert die vorliegende Arbeit erstmals Ergebnisse zur Speziation und Reaktionsmechanismen der Komplexbildung von An(III) und Ln(III) mit Transferrin. Die Ergebnisse zeigen darüber hinaus, dass die Komplexbildung mit Transferrin unter physiologischen Bedingungen eine relevante biochemische Reaktion ist und durchaus eine Möglichkeit für den Transport der Actiniden im Körper sein kann. Allerdings liefern die Ergebnisse keine Informationen darüber, ob bei der Komplexbildung von Cm(III) an der Bindungsstelle, genau wie bei der Bindung von Fe(III), tatsächlich eine Konformationsänderung der Lobes in eine geschlossene, kompakte Struktur auftritt. Dies ist jedoch der Schlüsselschritt für die Bindung des Transferrinkomplexes an den Rezeptor. Daher wäre es von besonderem Interesse, in zukünftigen Untersuchungen Zellstudien durchzuführen, um Aussagen darüber treffen zu können, ob Actiniden-Transferrinkomplexe tatsächlich an den Transferrinrezeptor binden und via Endocytose in die Zelle eingeschleust werden können.

Literaturverzeichnis

1. K. H. Lieser, *Einführung in die Kernchemie*, 3. neubearb. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **1991**.
2. N. M. Edelstein, Fuger, J., Katz, J. J., Morss, L. R., *Summary and Comparison of Properties of the Actinide and Transactinide Elements*, in: J. J. Katz, Seaborg, G. T., Morss, L. R., Edelstein, N. M., Fuger, J., *The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements*, Springer-Verlag, Dordrecht, 3. Auflage, **2006**, Band 3, 1753.
3. M. Yamada, Z. L. Wang, *Cs-137 in the western South Pacific Ocean*, *Sci. Total Environ.*, **2007**, 382, 342.
4. S. F. Warner, R. J. C. Kirchmann, *Nuclear Test Explosions: Environmental and Human Impacts*, Wiley-VCH, Chichester, **2000**.
5. A. Sigel, H. Sigel, R. K. O. Sigel, *Metal Ions in Biological Systems: Biogeochemistry, Availability, and Transport of Metals in the Environment*, Taylor & Francis, **2005**.
6. D. M. Templeton, F. Ariese, R. Cornelis, L. G. Danielsson, H. Muntau, H. P. Van Leeuwen, R. Lobinski, *Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000)*, *Pure Appl. Chem.*, **2000**, 72, 1453.
7. E. Ansoborlo, O. Prat, P. Moisy, C. Den Auwer, P. Guilbaud, M. Carriere, B. Gouget, J. Duffield, D. Doizi, T. Vercouter, C. Moulin, V. Moulin, *Actinide speciation in relation to biological processes*, *Biochimie*, **2006**, 88, 1605.
8. R. D. Lloyd, C. W. Jones, C. W. Mays, D. R. Atherton, F. W. Bruenger, G. N. Taylor, *Th-228 Retention and Dosimetry in Beagles*, *Radiat. Res.*, **1984**, 98, 614.
9. D. M. Taylor, *The bioinorganic chemistry of actinides in blood*, *J. Alloys Compd.*, **1998**, 271, 6.
10. W. Stevens, F. W. Bruenger, D. R. Atherton, B. J. Stover, *Subcellular Distribution of Am-241(III) and Pu-239(IV) in Livers Studied Serially*, *Radiat. Res.*, **1971**, 47, 329.
11. H. Z. Sun, H. Y. Li, P. J. Sadler, *Transferrin as a metal ion mediator*, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2817.
12. R. M. Palmour, H. E. Sutton, *Vertebrate Transferrins - Molecular Weights, Chemical Compositions, and Iron-Binding Studies*, *Biochemistry*, **1971**, 10, 4026.

13. E. N. Baker, *Structure and Reactivity of Transferrins*, in: A. G. Sykes, *Adv. Inorg. Chem.*, Academic Press, **1994**, Band 41, 389.
14. T. M. Rose, G. D. Plowman, D. B. Teplow, W. J. Dreyer, K. E. Hellstrom, J. P. Brown, *Primary Structure of the Human Melanoma-Associated Antigen P97 (Melanotransferrin) Deduced from the Messenger-RNA Sequence*, *P. Natl. Acad. Sci.*, **1986**, 83, 1261.
15. L. L. Dunn, Y. S. Rahmanto, D. R. Richardson, *Iron uptake and metabolism in the new millennium*, *Trends Cell Biol.*, **2007**, 17, 93.
16. A. J. Nowalk, S. B. Tencza, T. A. Mietzner, *Coordination of Iron by the Ferric Iron-Binding Protein of Pathogenic Neisseria Is Homologous to the Transferrins*, *Biochemistry*, **1994**, 33, 12769.
17. C. M. Bruns, A. J. Nowalk, A. S. Arvai, M. A. McTigue, K. G. Vaughan, T. A. Mietzner, D. E. McRee, *Structure of Haemophilus influenzae Fe(III)-binding protein reveals convergent evolution within a superfamily*, *Nature Structural Biology*, **1997**, 4, 919.
18. J. H. Crosa, *The Relationship of Plasmid-Mediated Iron Transport and Bacterial Virulence*, *Annu. Rev. Microbiol.*, **1984**, 38, 69.
19. T. A. Mietzner, Tencza, S. B., Adhikari, B., Vaughan, K. G., Nowalk, A. J., *Fe(III) Periplasm-to-Cytosol Transporters of Gram-Negative Pathogens*, *Curr Top Microbiol*, **1998**, 225, 113.
20. M.-H. Metz-Boutigue, J. Jollès, J. Mazurier, F. Schoentgen, D. Legrand, G. Spik, J. Montreuil, P. Jollès, *Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins*, *Eur. J. Biochem.*, **1984**, 145, 659.
21. R. T. A. MacGillivray, E. Mendez, S. K. Sinha, M. R. Sutton, J. Linebackzins, K. Brew, *The Complete Amino-Acid-Sequence of Human-Serum Transferrin*, *P. Natl. Acad. Sci.*, **1982**, 79, 2504.
22. *Pschyrembel online*, de Gruyter, Berlin.
23. R. Klinke, H.-C. Pape, S. Silbernagl, *Physiologie*, 5. komplett überarb. Auflage, Thieme, Stuttgart, **2005**.
24. R. F. Schmidt, Lang, F., Thews, G., *Physiologie des Menschen (mit Pathophysiologie)*, 29. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, **2005**.
25. A. L. Schade, L. Caroline, *An Iron-Binding Component in Human Blood Plasma*, *Science*, **1946**, 104, 340.
26. C. G. Holmberg, C. B. Laurell, *Investigations in Serum Copper. 1. Nature of Serum Copper and Its Relation to the Iron-Binding Protein in Human Serum*, *Acta Chem. Scand.*, **1947**, 1, 944.
27. B. H. Bowman, F. Yang, G. S. Adrian, *Transferrin - Evolution and Genetic-Regulation of Expression*, *Adv. Genet.*, **1988**, 25, 1.

28. P. Aisen, *Transferrin, the transferrin receptor, and the uptake of iron by cells.*, Met. Ions Biol. Syst., **1998**, 35, 585.
29. J. H. Katz, *Iron and Protein Kinetics Studied by Means of Doubly Labeled Human Crystalline Transferrin*, J. Clin. Invest., **1961**, 40, 2143.
30. P. Ponka, C. N. Lok, *The transferrin receptor: role in health and disease*, Int. J. Biochem. Cell Biol., **1999**, 31, 1111.
31. R. T. A. MacGillivray, E. Mendez, J. G. Shewale, S. K. Sinha, J. Linebackzins, K. Brew, *The Primary Structure of Human-Serum Transferrin - the Structures of 7 Cyanogen-Bromide Fragments and the Assembly of the Complete Structure*, J. Biol. Chem., **1983**, 258, 3543.
32. J. Wally, P. J. Halbrooks, C. Vonnrhein, M. A. Rould, S. J. Everse, A. B. Mason, S. K. Buchanan, *The crystal structure of iron-free human serum transferrin provides insight into inter-lobe communication and receptor binding*, J. Biol. Chem., **2006**, 281, 24934.
33. G. V. Louie, *Porphobilinogen Deaminase and Its Structural Similarity to the Bidomain Binding-Proteins*, Curr. Opin. Struct. Biol., **1993**, 3, 401.
34. R. T. A. MacGillivray, S. A. Moore, J. Chen, B. F. Anderson, H. Baker, Y. G. Luo, M. Bewley, C. A. Smith, M. E. P. Murphy, Y. Wang, A. B. Mason, R. C. Woodworth, G. D. Brayer, E. N. Baker, *Two high-resolution crystal structures of the recombinant N-lobe of human transferrin reveal a structural change implicated in iron release*, Biochemistry, **1998**, 37, 7919.
35. B. F. Anderson, H. M. Baker, E. J. Dodson, G. E. Norris, S. V. Rumball, J. M. Waters, E. N. Baker, *Structure of Human Lactoferrin at 3.2 Å Resolution*, P. Natl. Acad. Sci., **1987**, 84, 1769.
36. P. Aisen, R. Aasa, B. Malmstro, T. Vanngard, *Bicarbonate and Binding of Iron to Transferrin*, J. Biol. Chem., **1967**, 242, 2484.
37. M. R. Schlabach, G. W. Bates, *Synergistic Binding of Anions and Fe³⁺ by Transferrin - Implications for Interlocking Sites Hypothesis*, J. Biol. Chem., **1975**, 250, 2182.
38. P. Aisen, *The transferrins (siderophilins)*, in: G. L. Eichorn, *Inorganic Biochemistry*, Elsevier, New York, **1973**, Band 1, 280
39. D. C. Harris, P. Aisen, *Physical Biochemistry of the Transferrins*, in: T. M. Loehr, *Iron Carriers and Iron Proteins*, VCH, New York, **1989**, 239
40. P. Azari, J. L. Phillips, *Action of Periodate on Ovotransferrin and its Metal Complexes*, Arch. Biochem. Biophys., **1970**, 138, 32.
41. J. L. Zweier, J. B. Wooten, J. S. Cohen, *Studies of Anion Binding by Transferrin Using C-13 Nuclear Magnetic-Resonance Spectroscopy*, Biochemistry, **1981**, 20, 3505.

42. N. Kojima, G. W. Bates, *The Formation of Fe³⁺-Transferrin-CO₃²⁻ Via the Binding and Oxidation of Fe²⁺*, J. Biol. Chem., **1981**, 256, 2034.
43. G. W. Bates, M. R. Schlabach, *Nonspecific Binding of Fe³⁺ to Transferrin in Absence of Synergistic Anions*, J. Biol. Chem., **1975**, 250, 2177.
44. W. R. Harris, A. M. Cafferty, K. Trankler, A. Maxwell, R. T. A. MacGillivray, *Thermodynamic studies on anion binding to apotransferrin and to recombinant transferrin N-lobe half molecules*, BBA-Protein Struct. M., **1999**, 1430, 269.
45. J. D. Casey, N. D. Chasteen, *Vanadyl(IV) Conalbumin. 2. Mixed Metal and Anion Binding-Studies*, J. Inorg. Biochem., **1980**, 13, 127.
46. B. F. Anderson, H. M. Baker, G. E. Norris, S. V. Rumball, E. N. Baker, *Apolactoferrin Structure Demonstrates Ligand-Induced Conformational Change in Transferrins*, Nature, **1990**, 344, 784.
47. P. D. Jeffrey, M. C. Bewley, R. T. A. MacGillivray, A. B. Mason, R. C. Woodworth, E. N. Baker, *Ligand-induced conformational change in transferrins: Crystal structure of the open form of the N-terminal half-molecule of human transferrin*, Biochemistry, **1998**, 37, 13978.
48. L. C. Kühn, H. M. Schulman, P. Ponka, in: P. Ponka, H. M. Schulman, R. C. Woodworth, *Iron Transport and Storage*, CRC Press, Boca Raton, **1990**, 149.
49. S. P. Young, A. Bomford, R. Williams, *The Effect of the Iron Saturation of Transferrin on Its Binding and Uptake by Rabbit Reticulocytes*, Biochem. J, **1984**, 219, 505.
50. J. Vanrenswoude, K. R. Bridges, J. B. Harford, R. D. Klausner, *Receptor-Mediated Endocytosis of Transferrin and the Uptake of Fe in K562-Cells - Identification of a Non-Lysosomal Acidic Compartment*, P Natl Acad Sci-Biol, **1982**, 79, 6186.
51. R. D. Klausner, G. Ashwell, J. Vanrenswoude, J. B. Harford, K. R. Bridges, *Binding of Apotransferrin to K562 Cells - Explanation of the Transferrin Cycle*, P. Natl. Acad. Sci.-Biol., **1983**, 80, 2263.
52. A. Dautryvarsat, A. Ciechanover, H. F. Lodish, *pH and the Recycling of Transferrin during Receptor-Mediated Endocytosis*, P. Natl. Acad. Sci., **1983**, 80, 2258.
53. P. Aisen, A. Leibman, *Role of Anion-Binding Site of Transferrin in Its Interaction with Reticulocyte*, Biochim. Biophys. Acta, **1973**, 304, 797.
54. E. C. Theil, Aisen, P., in: G. Winkelmann, van der Helm, D., Neilands, J. B., *Iron Transport in Microbes, Plants and Animals*, Wiley-VCH, Weinheim, **1987**, 503.
55. N. D. Chasteen, *Human Serotransferrin - Structure and Function*, Coord. Chem. Rev., **1977**, 22, 1.

56. J. Williams, K. Moreton, *Distribution of Iron between the Metal-Binding Sites of Transferrin in Human-Serum*, *Biochem. J.*, **1980**, 185, 483.
57. H. Y. Li, P. J. Sadler, H. Z. Sun, *Unexpectedly strong binding of a large metal ion (Bi^{3+}) to human serum transferrin*, *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 9483.
58. W. R. Harris, V. L. Pecoraro, *Thermodynamic Binding Constants for Gallium Transferrin*, *Biochemistry*, **1983**, 22, 292.
59. J. W. Donovan, K. D. Ross, *Nonequivalence of Metal Binding-Sites of Conalbumin - Calorimetric and Spectrophotometric Studies of Aluminum Binding*, *J. Biol. Chem.*, **1975**, 250, 6022.
60. W. R. Harris, Y. Chen, *Electron-Paramagnetic-Resonance and Difference Ultraviolet Studies of Mn^{2+} Binding to Serum Transferrin*, *J. Inorg. Biochem.*, **1994**, 54, 1.
61. J. Hirose, H. Fujiwara, T. Magarifuchi, Y. Iguti, H. Iwamoto, S. Kominami, K. Hiromi, *Copper binding selectivity of N- and C-sites in serum human- and ovo-transferrin*, *BBA-Protein Struct. M.*, **1996**, 1296, 103.
62. W. R. Harris, *Estimation of the Ferrous Transferrin Binding Constants Based on Thermodynamic Studies of Nickel(II) Transferrin*, *J. Inorg. Biochem.*, **1986**, 27, 41.
63. W. R. Harris, *Binding Constants for Neodymium(III) and Samarium(III) with Human-Serum Transferrin*, *Inorg. Chem.*, **1986**, 25, 2041.
64. O. Zak, P. Aisen, *Spectroscopic and Thermodynamic Studies on the Binding of Gadolinium(III) to Human-Serum Transferrin*, *Biochemistry*, **1988**, 27, 1075.
65. P. B. Ohara, S. H. Koenig, *Electron-Spin-Resonance and Magnetic-Relaxation Studies of Gadolinium(III) Complexes with Human Transferrin*, *Biochemistry*, **1986**, 25, 1445.
66. W. R. Harris, *Equilibrium constants for the complexation of metal ions by serum transferrin.*, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1989**, 249, 67.
67. W. R. Harris, Y. Chen, K. Wein, *Equilibrium-Constants for the Binding of Indium(III) to Human Serum Transferrin*, *Inorg. Chem.*, **1994**, 33, 4991.
68. C. R. Chitambar, D. Sax, *Regulatory Effects of Gallium on Transferrin-Independent Iron Uptake by Human Leukemic HL-60 Cells*, *Blood*, **1992**, 80, 505.
69. C. A. Smith, A. J. Sutherland-Smith, B. K. Keppler, F. Kratz, E. N. Baker, *Binding of ruthenium(III) anti-tumor drugs to human lactoferrin probed by high resolution X-ray crystallographic structure analyses*, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1996**, 1, 424.
70. F. Kratz, M. Hartmann, B. Keppler, L. Messori, *The Binding-Properties of 2 Antitumor Ruthenium(III) Complexes to Apotransferrin*, *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 2581.

71. H. Sun, Li, H., Weir, R. A., Sadler, P. J., *The First Specific Ti(IV)–Protein Complex: Potential Relevance to Anticancer Activity of Titanocenes*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, *37*, 1577.
72. L. Messori, P. Orioli, V. Banholzer, I. Pais, P. Zatta, *Formation of titanium(IV) transferrin by reaction of human serum apotransferrin with titanium complexes*, *FEBS Lett.*, **1999**, *442*, 157.
73. M. C. Cox, K. J. Barnham, T. A. Frenkiel, J. D. Hoeschele, A. B. Mason, Q. Y. He, R. C. Woodworth, P. J. Sadler, *Identification of platination sites on human serum transferrin using C-13 and N-15 NMR spectroscopy*, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1999**, *4*, 621.
74. B. Corain, G. G. Bombi, A. Tapparo, M. Nicolini, P. Zatta, M. Perazzolo, M. Favarato, *Alzheimers-Disease and Aluminum Toxicology*, *Environ. Health Perspect.*, **1990**, *89*, 233.
75. P. Zatta, R. Giordano, B. Corain, G. G. Bombi, *Alzheimer Dementia and the Aluminum Hypothesis*, *Medical Hypotheses*, **1988**, *26*, 139.
76. P. Aisen, A. Leibman, J. Zweier, *Stoichiometric and Site Characteristics of Binding of Iron to Human Transferrin*, *J. Biol. Chem.*, **1978**, *253*, 1930.
77. J. V. Princiotta, E. J. Zapolski, *Difference between 2 Iron-Binding Sites of Transferrin*, *Nature*, **1975**, *255*, 87.
78. A. N. Lestas, *Effect of pH upon Human Transferrin - Selective Labeling of 2 Iron-Binding Sites*, *Br. J. Haematol.*, **1976**, *32*, 341.
79. D. A. Baldwin, D. M. R. Desousa, R. M. A. Vonwandruszka, *The Effect of pH on the Kinetics of Iron Release from Human Transferrin*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1982**, *719*, 140.
80. D. M. Taylor, J. R. Duffield, D. R. Williams, L. Yule, P. W. Gaskin, P. Unalkat, *Binding of f-Elements to the Iron-Transport Protein Transferrin*, *Eur. J. Solid State Inorg. Chem.*, **1991**, *28*, 271.
81. J. Duffield, D. M. Taylor, *The Biochemistry of the Actinides*, in: A. J. Freeman, C. Keller, *Handbook on the Physics and Chemistry of the Actinides*, Elsevier Science, Amsterdam, **1991**.
82. X. L. Du, T. I. Zhang, L. Yuan, Y. Y. Zhao, R. C. Li, K. Wang, S. C. Yan, L. Zhang, H. Z. Sun, Z. M. Qian, *Complexation of ytterbium to human transferrin and its uptake by K562 cells*, *Eur. J. Biochem.*, **2002**, *269*, 6082.
83. S. Scapolan, E. Ansoberlo, C. Moulin, C. Madic, *Uranium(VI)-transferrin system studied by time-resolved laser-induced fluorescence*, *Radiat. Prot. Dosim.*, **1998**, *79*, 505.
84. L. Yule, *A Comparison of the Binding of Plutonium and Iron to Transferrin and Citrate*, Ph.D. Thesis, University of Wales, UK, **1991**.

85. M. Sturzbecher-Hoehne, C. Goujon, G. J. P. Deblonde, A. B. Mason, R. J. Abergel, *Sensitizing Curium Luminescence through an Antenna Protein To Investigate Biological Actinide Transport Mechanisms*, JACS, **2013**, 135, 2676.
86. M. P. Jensen, D. Gorman-Lewis, B. Aryal, T. Paunesku, S. Vogt, P. G. Rickert, S. Seifert, B. Lai, G. E. Woloschak, L. Soderholm, *An iron-dependent and transferrin-mediated cellular uptake pathway for plutonium*, Nat. Chem. Biol., **2011**, 7, 560.
87. S. Cotton, *Lanthanide and Actinide Chemistry*, 1. Auflage, John Wiley Sons Ltd., Chichester, **2006**.
88. A. F. Hollemann, E. W. Hollemann, *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, Gruyter, **1995**.
89. G. T. Seaborg, *Overview of the Actinide and Lanthanide Elements*, Radiochim. Acta, **1993**, 61, 115.
90. G. Liu, Beitz, J. V., *Optical Spectra and Electronic Structure*, in: J. J. Katz, Seaborg, G. T., Morss, L. R., Edelstein, N. M., Fuger, J., *The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements*, Springer-Verlag, Dordrecht, 3. Auflage Band 3, **2006**, 2013.
91. N. M. Edelstein, *Comparison of the Electronic-Structure of the Lanthanides and Actinides*, J. Alloys Compd., **1995**, 223, 197.
92. R. D. Shannon, *Revised Effective Ionic-Radii and Systematic Studies of Interatomic Distances in Halides and Chalcogenides*, Acta Crystallogr. Sect. A: Found. Crystallogr., **1976**, 32, 751.
93. J. C. G. Bünzli, G. R. Choppin, *Lanthanide Probes in Life, Chemical, and Earth Sciences - Theory and Practice*, 1., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, **1989**.
94. R. G. Pearson, *Hard and Soft Acids and Bases Hsab. 1. Fundamental Principles*, J. Chem. Educ., **1968**, 45, 581.
95. R. G. Pearson, *The HSAB principle - More quantitative aspects*, Inorg. Chim. Acta, **1995**, 240, 93.
96. G. R. Choppin, *Structure and Thermodynamics of Lanthanide and Actinide Complexes in Solution*, Pure Appl. Chem., **1971**, 27, 23.
97. G. R. Choppin, Jensen, M. P., *Actinides in Solution: Complexation and Kinetics*, in: J. J. Katz, Seaborg, G. T., Morss, L. R., Edelstein, N. M., Fuger, J., *The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements*, Springer Verlag, Dordrecht, 3. Auflage Band 4, **2006**, 2524.
98. G. R. Choppin, *Solution Chemistry of the Actinides*, Radiochim. Acta, **1983**, 32, 43.

99. J. C. G. Bünzli, A. S. Chauvin, H. K. Kim, E. Deiters, S. V. Eliseeva, *Lanthanide luminescence efficiency in eight- and nine-coordinate complexes: Role of the radiative lifetime*, *Coord. Chem. Rev.*, **2010**, 254, 2623.
100. G. R. Choppin, D. R. Peterman, *Applications of lanthanide luminescence spectroscopy to solution studies of coordination chemistry*, *Coord. Chem. Rev.*, **1998**, 174, 283.
101. P. Hänninen, H. Härmä, *Lanthanide Luminescence*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2011**.
102. G. Meinrath, *Uranium(VI) speciation by spectroscopy*, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **1997**, 224, 119.
103. J. V. Beitz, Jursich, R. D., Sullivan, J. C., *Fluorescence studies of Am³⁺ in aqueous solution*, *J. Less-Common Met.*, **1986**, 126, 301.
104. L. J. Nugent, R. D. Baybarz, J. L. Burnett, *Electron-Transfer Spectra and 2-3 Oxidation Potentials of Some Lanthanide and Actinide Halides in Solution*, *J. Phys. Chem.*, **1969**, 73, 1177.
105. G. K. Liu, J. V. Beitz, *Fluorescence Dynamics and Cross Relaxation of 4+ Curium in Cerium Tetrafluoride*, *J. Lumin.*, **1990**, 45, 254.
106. W. T. Carnall, Goodman, G. L., Rajnak, K., Rana, R. S., Report ANL-88-8, Argonne National Laboratory, **1988**.
107. C. M. Marquardt, P. J. Panak, C. Apostolidis, A. Morgenstern, C. Walther, R. Klenze, T. Fanghänel, *Fluorescence spectroscopy on protactinium(IV) in aqueous solution*, *Radiochim. Acta*, **2004**, 92, 445.
108. W. T. Carnall, J. V. Beitz, H. Crosswhite, *Electronic-Energy Level and Intensity Correlations in the Spectra of the Trivalent Actinide Aquo Ions. 3. Bk(III)*, *J. Chem. Phys.*, **1984**, 80, 2301.
109. J. V. Beitz, D. W. Wester, C. W. Williams, *5f State Interaction with Inner Coordination Sphere Ligands - Es³⁺ Ion Fluorescence in Aqueous and Organic Phases*, *J. Less-Common Met.*, **1983**, 93, 331.
110. W. T. Carnall, *The absorption and fluorescence of rare earth ions in solution*, in: K. A. Gschneidner, L. Eyring, *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*, Elsevier, 1, **1979**, Band 3, 171
111. B. Marmodee, J. S. de Klerk, F. Ariese, C. Gooijer, M. U. Kumke, *High-resolution steady-state and time-resolved luminescence studies on the complexes of Eu(III) with aromatic or aliphatic carboxylic acids*, *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 652, 285.
112. C. M. Ruff, *Spektroskopische und thermodynamische Untersuchung der Komplexbildung von Cm(III) und Eu(III) mit hydrophilen Bis-Triazinylpyridinen*, Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **2013**.

113. M. Latva, J. Kankare, *The ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_0$ excitation spectra of europium(III) complexes of aminocarboxylic acids*, J. Coord. Chem., **1998**, 43, 121.
114. S. T. Frey, W. D. Horrocks, *On Correlating the Frequency of the ${}^7F_0\text{-}{}^5D_0$ Transition in Eu^{3+} Complexes with the Sum of Nephelauxetic Parameters for All of the Coordinating Atoms*, Inorg. Chim. Acta, **1995**, 229, 383.
115. O. L. Malta, H. J. Batista, L. D. Carlos, *Overlap polarizability of a chemical bond: a scale of covalency and application to lanthanide compounds*, Chem. Phys., **2002**, 282, 21.
116. O. K. Moune, P. Caro, *Computer-Simulation of the 5d_j Levels of $4f^6$, Eu^{3+}* , J. Less-Common Met., **1989**, 148, 181.
117. G. Boulon, M. Bouderbala, J. Seriot, *Site Selection Using Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy of the Eu^{3+} Probe Ions in Oxide Glass Hosts - a Review and Some New Results*, J. Less-Common Met., **1985**, 112, 41.
118. C. Brecher, L. A. Riseberg, *Laser-Induced Line-Narrowing of Eu^{3+} Fluorescence in Fluoroberyllate Glass - Site-Dependent Spectroscopic Properties and Their Structural Implications*, Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys., **1980**, 21, 2607.
119. C. K. Jorgensen, B. R. Judd, *Hypersensitive Pseudoquadrupole Transitions in Lanthanides*, Mol. Phys., **1964**, 8, 281.
120. J. C. G. Bünzli, J. R. Yersin, *Fluorescence-Spectra and Lifetime Measurements of Aqueous-Solutions of Europium Nitrate and Perchlorate*, Inorg. Chem., **1979**, 18, 605.
121. N. M. Edelstein, R. Klenze, T. Fanghänel, S. Hubert, *Optical properties of Cm(III) in crystals and solutions and their application to Cm(III) speciation*, Coord. Chem. Rev., **2006**, 250, 948.
122. P. Lindqvist-Reis, C. Walther, R. Klenze, A. Eichhofer, T. Fanghänel, *Large ground-state and excited-state crystal field splitting of 8-fold-coordinate Cm^{3+} in $[\text{Y}(\text{H}_2\text{O})_8]\text{Cl}_3 \cdot 15\text{-crown-5}$* , J. Phys. Chem. B, **2006**, 110, 5279.
123. W. T. Carnall, K. Rajnak, *Electronic-Energy Level and Intensity Correlations in Spectra of Trivalent Actinide Aquo Ions. 2. Cm^{3+}* , J. Chem. Phys., **1975**, 63, 3510.
124. P. Lindqvist-Reis, R. Klenze, G. Schubert, T. Fanghänel, *Hydration of Cm^{3+} in aqueous solution from 20 to 200 degrees C. A time-resolved laser fluorescence spectroscopy study*, J. Phys. Chem. B, **2005**, 109, 3077.
125. P. J. Panak, *Untersuchung von intramolekularen Energietransferprozessen in Cm(III)- und Tb(III)-Komplexen mit organischen Liganden mit Hilfe der zeitaufgelösten Laserfluoreszenzspektroskopie*, Dissertation, Fakultät für Chemie, Biologie und Geowissenschaften der Technischen Universität München, **1996**.
126. S. Skanthakumar, M. R. Antonio, R. E. Wilson, L. Soderholm, *The curium aqua ion*, Inorg. Chem., **2007**, 46, 3485.

127. T. Stumpf, M. M. Fernandes, C. Walther, K. Dardenne, T. Fanghänel, *Structural characterization of Am incorporated into calcite: A TRLFS and EXAFS study*, J. Colloid Interface Sci., **2006**, 302, 240.
128. T. Stumpf, T. Fanghänel, *A time-resolved laser fluorescence spectroscopy (TRLFS) study of the interaction of trivalent actinides (Cm(III)) with calcite*, J. Colloid Interface Sci., **2002**, 249, 119.
129. M. M. Fernandes, T. Stumpf, T. Rabung, D. Bosbach, T. Fanghänel, *Incorporation of trivalent actinides into calcite: A time resolved laser fluorescence spectroscopy (TRLFS) study*, Geochim. Cosmochim. Acta, **2008**, 72, 464.
130. T. Rabung, M. C. Pierret, A. Bauer, H. Geckeis, M. H. Bradbury, B. Baeyens, *Sorption of Eu(III)/Cm(III) on Ca-montmorillonite and Na-illite. Part 1: Batch sorption and time-resolved laser fluorescence spectroscopy experiments*, Geochim. Cosmochim. Acta, **2005**, 69, 5393.
131. J. V. Beitz, *Laser-Induced Fluorescence Studies of Cm³⁺ Complexes in Solution*, Radiochim. Acta, **1991**, 52-3, 35.
132. C. Moulin, P. Decambox, P. Mauchien, *State of the art in time-resolved laser-induced fluorescence for actinides analysis: Applications and trends*, J. Radioanal. Nucl. Chem., **1997**, 226, 135.
133. R. Klenze, J. I. Kim, H. Wimmer, *Speciation of Aquatic Actinide Ions by Pulsed Laser Spectroscopy*, Radiochim. Acta, **1991**, 52-3, 97.
134. A. Heller, *Formation of Hot OH Bonds in Radiationless Relaxations of Excited Rare Earth Ions in Aqueous Solutions*, JACS, **1966**, 88, 2058.
135. G. Stein, E. Wurzburg, *Energy-Gap Law in Solvent Isotope-Effect on Radiationless Transitions of Rare-Earth Ions*, J. Chem. Phys., **1975**, 62, 208.
136. J. V. Beitz, J. P. Hessler, *Oxidation-State Specific Detection of Transuranic Ions in Solution*, Nucl. Technol., **1980**, 51, 169.
137. T. Kimura, G. R. Choppin, *Luminescence study on determination of the hydration number of Cm(III)*, J. Alloys Compd., **1994**, 213/214, 313.
138. T. Kimura, G. R. Choppin, Y. Kato, Z. Yoshida, *Determination of the Hydration Number of Cm(III) in Various Aqueous Solutions*, Radiochim. Acta, **1996**, 72, 61.
139. H. Wimmer, R. Klenze, J. I. Kim, *A Study of Hydrolysis Reaction of Curium(III) by Time Resolved Laser Fluorescence Spectroscopy*, Radiochim. Acta, **1992**, 56, 79.
140. T. Fanghänel, J. I. Kim, P. Paviet, R. Klenze, W. Hauser, *Thermodynamics of Radioactive Trace Elements in Concentrated Electrolyte Solutions: Hydrolysis of Cm³⁺ in NaCl-Solutions*, Radiochim. Acta, **1994**, 66/67, 81.
141. T. Rabung, M. Altmaier, V. Neck, T. Fanghänel, *A TRLFS study of Cm(III) hydroxide complexes in alkaline CaCl₂ solutions*, Radiochim. Acta, **2008**, 96, 551.

142. J. I. Kim, R. Klenze, H. Wimmer, W. Runde, W. Hauser, *A Study of the Carbonate Complexation of Cm(III) and Eu(III) by Time-Resolved Laser Fluorescence Spectroscopy*, *J. Alloys Compd.*, **1994**, 213, 333.
143. T. Fanghänel, H. T. Weger, T. Konnecke, V. Neck, P. Paviet-Hartmann, E. Steinle, J. I. Kim, *Thermodynamics of Cm(III) in concentrated electrolyte solutions. Carbonate complexation at constant ionic strength (1 m NaCl)*, *Radiochim. Acta*, **1998**, 82, 47.
144. T. Fanghänel, T. Konnecke, H. Weger, P. Paviet-Hartmann, V. Neck, J. I. Kim, *Thermodynamics of Cm(III) in concentrated salt solutions: Carbonate complexation in NaCl solution at 25 degrees C*, *J. Solution Chem.*, **1999**, 28, 447.
145. T. Fanghänel, H. T. Weger, G. Schubert, J. I. Kim, *Bicarbonate complexes of trivalent actinides - Stable or unstable?*, *Radiochim. Acta*, **1998**, 82, 55.
146. M. J. Fay, A. Proctor, D. P. Hoffmann, D. M. Hercules, *Unraveling EXAFS Spectroscopy*, *Anal. Chem.*, **1988**, 60, A1225.
147. A. C. Thompson, D. Attwood, E. Gullikson, M. Howells, K.-J. Kim, J. Kirz, J. Kortright, I. Lindau, Y. Liu, P. Pianetta, A. Robinson, J. Scofield, J. Underwood, H. Winick, *X-Ray Data Booklet*, 3, Lawrence Berkeley National Laboratory, University of California, Berkeley, **2009**.
148. C. A. Ashley, S. Doniach, *Theory of Extended X-Ray Absorption-Edge Fine-Structure (EXAFS) in Crystalline Solids*, *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.*, **1975**, 11, 1279.
149. E. A. Stern, *Theory of EXAFS*, in: D. C. Koningsberger, R. Prins, *X-Ray Absorption - Principles, Applications, Techniques of EXAFS, SEXAFS and XANES*, John Wiley & Sons, New York, **1988**, 3.
150. M. Newville, *Fundamentals of XAFS*, Consortium for Advanced Radiation Sources, University of Chicago, Chicago, **2004**.
151. R. N. Bracewell, *The Fourier-Transform*, *Scientific American*, **1989**, 260, 86.
152. B. K. Teo, P. A. Lee, *Abinitio Calculations of Amplitude and Phase Functions for Extended X-Ray Absorption Fine-Structure Spectroscopy*, *JACS*, **1979**, 101, 2815.
153. W. R. Harris, B. S. Yang, S. Abdollahi, Y. Hamada, *Steric restrictions on the binding of large metal ions to serum transferrin*, *J. Inorg. Biochem.*, **1999**, 76, 231.
154. Q. Y. He, A. B. Mason, B. A. Lyons, B. M. Tam, V. Nguyen, R. T. A. MacGillivray, R. C. Woodworth, *Spectral and metal-binding properties of three single-point tryptophan mutants of the human transferrin N-lobe*, *Biochem. J.*, **2001**, 354, 423.
155. J. Rothe, S. Butorin, K. Dardenne, M. A. Denecke, B. Kienzler, M. Loble, V. Metz, A. Seibert, M. Steppert, T. Vitova, C. Walther, H. Geckeis, *The INE-Beamline for actinide science at ANKA*, *Rev. Sci. Instrum.*, **2012**, 83, 043105.

156. G. N. George, I. J. Pickering, in *EXAFSPAK – A suite of computer programs for analysis of X-ray absorption spectra*, Stanford Synchrotron Radiation Laboratory, Stanford/USA, **2000**.
157. B. Ravel, M. Newville, *ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT*, J. Synchrotron Radiat., **2005**, *12*, 537.
158. A. L. Ankudinov, C. E. Bouldin, J. J. Rehr, J. Sims, H. Hung, *Parallel calculation of electron multiple scattering using Lanczos algorithms*, Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys., **2002**, *65*.
159. H. Moll, G. Geipel, G. Bernhard, *Complexation of curium(III) by adenosine 5'-triphosphate (ATP): A time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS) study*, Inorg. Chim. Acta, **2005**, *358*, 2275.
160. J. I. Kim, H. Wimmer, R. Klenze, *A Study of Curium(III) Humate Complexation by Time Resolved Laser Fluorescence Spectroscopy (TRLFS)*, Radiochim. Acta, **1991**, *54*, 35.
161. D. R. Fröhlich, A. Skerencak-Frech, M. Gast, P. J. Panak, *Fulvic acid complexation of Eu(III) and Cm(III) at elevated temperatures studied by time-resolved laser fluorescence spectroscopy*, Dalton Trans., **2014**, *43*, 15593.
162. T. Stumpf, T. Rabung, R. Klenze, H. Geckeis, J. I. Kim, *Spectroscopic study of Cm(III) sorption onto gamma-alumina*, J. Colloid Interface Sci., **2001**, *238*, 219.
163. N. Huittinen, T. Rabung, J. Lutzenkirchen, S. C. Mitchell, B. R. Bickmore, J. Lehto, H. Geckeis, *Sorption of Cm(III) and Gd(III) onto gibbsite, alpha-Al(OH)₃: A batch and TRLFS study*, J. Colloid Interface Sci., **2009**, *332*, 158.
164. T. Rabung, D. Schild, H. Geckeis, R. Klenze, T. Fanghänel, *Cm(III) sorption onto sapphire (alpha-Al₂O₃) single crystals*, J. Phys. Chem. B, **2004**, *108*, 17160.
165. K. H. Chung, R. Klenze, K. K. Park, P. Paviet-Hartmann, J. I. Kim, *A study of the surface sorption process of Cm(III) on silica by time-resolved laser fluorescence spectroscopy (I)*, Radiochim. Acta, **1998**, *82*, 215.
166. S. I. Weissman, *Intramolecular Energy Transfer: The Fluorescence of Complexes of Europium*, The Journal of Chemical Physics, **1942**, *10*, 214.
167. J. C. G. Bünzli, C. Piguet, *Taking advantage of luminescent lanthanide ions*, Chem. Soc. Rev., **2005**, *34*, 1048.
168. T. Rabung, H. Geckeis, X. K. Wang, J. Rothe, M. A. Denecke, R. Klenze, T. Fanghänel, *Cm(III) sorption onto gamma-Al₂O₃: New insight into sorption mechanisms by time-resolved laser fluorescence spectroscopy and extended X-ray absorption fine structure*, Radiochim. Acta, **2006**, *94*, 609.

169. X. K. Wang, T. Rabung, H. Geckeis, P. J. Panak, R. Klenze, T. Fanghänel, *Effect of humic acid on the sorption of Cm(III) onto gamma-Al₂O₃ studied by the time-resolved laser fluorescence spectroscopy*, *Radiochim. Acta*, **2004**, 92, 691.
170. F. H. David, V. Vokhmin, *Thermodynamic properties of some tri- and tetravalent actinide aquo ions*, *New J. Chem.*, **2003**, 27, 1627.
171. E. Toth, E. Brucher, I. Lazar, I. Toth, *Kinetics of Formation and Dissociation of Lanthanide(III)-DOTA Complexes*, *Inorg. Chem.*, **1994**, 33, 4070.
172. S. L. Wu, W. D. Horrocks, *Direct determination of stability constants of lanthanide ion chelates by laser-excited europium(III) luminescence spectroscopy: Application to cyclic and acyclic aminocarboxylate complexes*, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1997**, 1497.
173. V. Kubicek, J. Havlickova, J. Kotek, T. Gyula, P. Hermann, E. Toth, I. Lukes, *Gallium(III) Complexes of DOTA and DOTA-Monoamide: Kinetic and Thermodynamic Studies*, *Inorg. Chem.*, **2010**, 49, 10960.
174. A. Bremer, A. Geist, P. J. Panak, *Complexation of Cm(III) with 6-(5,6-dipentyl-1,2,4-triazin-3-yl)-2,2'-bipyridine studied by time resolved laser fluorescence spectroscopy*, *Dalton Trans.*, **2012**, 41, 7582.
175. A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger: Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman, **2005**.
176. O. Söhnel, P. Novotný, *Densities of aqueous solutions of inorganic substances.*, Elsevier, Amsterdam, **1985**.
177. R. Guillaumont, T. Fanghänel, J. Fuger, I. Grenthe, V. Neck, D. A. Palmer, M. H. Rand, *Chemical thermodynamics vol. 5. update on the chemical thermodynamics of uranium, neptunium, plutonium, americium and technetium*, Elsevier, Amsterdam, **2003**.
178. J. R. Cooper, H. S. Gowing, *The Binding of Americium and Curium to Human-Serum Proteins*, *Int. J. Radiat Biol.*, **1981**, 40, 569.
179. W. Stevens, F. W. Bruenger, D. R. Atherton, J. M. Smith, G. N. Taylor, *The Distribution and Retention of Hexavalent U-233 in the Beagle*, *Radiat. Res.*, **1980**, 83, 109.
180. G. Montavon, C. Apostolidis, F. Bruchertseifer, U. Repinc, A. Morgenstern, *Spectroscopic study of the interaction of U(VI) with transferrin and albumin for speciation of U(VI) under blood serum conditions*, *J. Inorg. Biochem.*, **2009**, 103, 1609.
181. R. H. Byrne, E. R. Sholkovitz, *Marine Chemistry and Geochemistry of the Lanthanides*, in: K. A. Gschneidner, L. Eyring, *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*, Elsevier, **1996**, Band 23, 497

182. G. J. P. Deblonde, M. Sturzbecher-Hoehne, A. B. Mason, R. J. Abergel, *Receptor recognition of transferrin bound to lanthanides and actinides: a discriminating step in cellular acquisition of f-block metals*, *Metallomics*, **2013**, 5, 619.
183. P. J. Panak, A. Geist, *Complexation and Extraction of Trivalent Actinides and Lanthanides by Triazinylpyridine N-Donor Ligands*, *Chem. Rev.*, **2013**, 113, 1199.
184. A. B. Mason, W. D. Funk, R. T. A. MacGillivray, R. C. Woodworth, *Efficient production and isolation of recombinant amino-terminal half-molecule of human serum transferrin from baby hamster kidney cells*, *Protein Expression Purif.*, **1991**, 2, 214.
185. H. Z. Sun, H. Y. Li, A. B. Mason, R. C. Woodworth, P. J. Sadler, *N-lobe versus C-lobe complexation of bismuth by human transferrin*, *Biochem. J.*, **1999**, 337, 105.
186. H. J. Zuccola, *The crystal structure of monoferric human serum transferrin*, PhD Thesis, Georgia Institute of Technology, Atlanta, **1993**.
187. X. S. Sun, H. Z. Sun, R. G. Ge, M. Richter, R. C. Woodworth, A. B. Mason, Q. Y. He, *The low pKa value of iron-binding ligand Tyr188 and its implication in iron release and anion binding of human transferrin*, *FEBS Lett.*, **2004**, 573, 181.
188. E. J. Beatty, W. Q. Zhong, G. Kubal, D. Houldershaw, J. M. Goodfellow, P. J. Sadler, *Histidine pKa values for the N-lobe of human transferrin: effect of substitution of binding site Asp by Ser (D63S)*, *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, 88, 403.
189. W. D. Horrocks, 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*, *JACS*, **1979**, 101, 334.
190. G. Blasse, *The Intensity of Vibronic Transitions in the Spectra of the Trivalent Europium Ion*, *Inorg. Chim. Acta*, **1990**, 167, 33.
191. G. Blasse, *Vibronic Transitions in Rare-Earth Spectroscopy*, *Int. Rev. Phys. Chem.*, **1992**, 11, 71.
192. C. Roselli, A. Boussac, T. A. Mattioli, *Use of near-Infrared Yb³⁺ Vibronic Side-Band Spectroscopy to Probe Protein Metal-Binding Sites*, *J. Alloys Compd.*, **1995**, 225, 48.
193. C. Madic, D. E. Hobart, G. M. Begun, *Raman Spectrometric Studies of Actinide(V) and Actinide(VI) Complexes in Aqueous Sodium-Carbonate Solution and of Solid Sodium Actinide(V) Carbonate Compounds*, *Inorg. Chem.*, **1983**, 22, 1494.
194. S. Liu, R. J. Ma, *Synthesis and structure of hydrated europium carbonate*, *J. Cryst. Growth*, **1996**, 169, 190.
195. M. S. Refat, *A novel method for the synthesis of rare earth carbonates*, *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Chem.*, **2004**, 34, 1605.

196. S. Stewart, P. M. Fredericks, *Surface-enhanced Raman spectroscopy of amino acids adsorbed on an electrochemically prepared silver surface*, *Spectrochim. Acta, Part A*, **1999**, *55*, 1641.
197. O. Stern, M. Volmer, *Über die Abklingungszeit der Fluoreszenz*, *Physikalische Zeitschrift*, **1919**, *20*, 183.
198. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third, Springer Science + Business Media, **2006**.
199. S. S. Lehrer, *Solute Perturbation of Protein Fluorescence - Quenching of Tryptophyl Fluorescence of Model Compounds and of Lysozyme by Iodide Ion*, *Biochemistry*, **1971**, *10*, 3254.
200. N. G. James, J. A. Ross, A. B. Mason, D. M. Jameson, *Excited-state lifetime studies of the three tryptophan residues in the N-lobe of human serum transferrin*, *Protein Sci.*, **2010**, *19*, 99.
201. J. Michon, S. Frelon, C. Garnier, F. Coppin, *Determinations of Uranium(VI) Binding Properties with some Metalloproteins (Transferrin, Albumin, Metallothionein and Ferritin) by Fluorescence Quenching*, *J. Fluoresc.*, **2010**, *20*, 581.
202. M. Weigl, M. A. Denecke, P. J. Panak, A. Geist, K. Gompper, *EXAFS and time-resolved laser fluorescence spectroscopy (TRLFS) investigations of the structure of Cm(III)/Eu(III) complexed with di(chlorophenyl)dithiophosphinic acid and different synergistic agents*, *Dalton Trans.*, **2005**, 1281.
203. P. G. Allen, J. J. Bucher, D. K. Shuh, N. M. Edelstein, I. Craig, *Coordination chemistry of trivalent lanthanide and actinide ions in dilute and concentrated chloride solutions*, *Inorg. Chem.*, **2000**, *39*, 595.
204. T. Stumpf, C. Hennig, A. Bauer, M. A. Denecke, T. Fanghänel, *An EXAFS and TRLFS study of the sorption of trivalent actinides onto smectite and kaolinite*, *Radiochim. Acta*, **2004**, *92*, 133.
205. D. Rinaldo, M. J. Field, *A density functional theory study of the iron-binding site of human serum transferrin*, *Aust. J. Chem.*, **2004**, *57*, 1219.
206. C. Den Auwer, I. Llorens, P. Moisy, C. Vidaud, F. Goudard, C. Barbot, P. L. Solari, H. Funke, *Actinide uptake by transferrin and ferritin metalloproteins*, *Radiochim. Acta*, **2005**, *93*, 699.
207. A. Jeanson, M. Ferrand, H. Funke, C. Hennig, P. Moisy, P. L. Solari, C. Vidaud, C. Den Auwer, *The Role of Transferrin in Actinide(IV) Uptake: Comparison with Iron(III)*, *Chem. - Eur. J.*, **2010**, *16*, 1378.
208. I. Llorens, C. Den Auwer, P. Moisy, E. Ansoborlo, C. Vidaud, H. Funke, *Neptunium uptake by serum transferrin*, *FEBS J.*, **2005**, *272*, 1739.

Übersicht über Veröffentlichungen

Publikationen

N. Bauer, D. R. Fröhlich, P. J. Panak, *Interaction of Cm(III) and Am(III) with human serum transferrin studied by time-resolved laser fluorescence and EXAFS spectroscopy*, Dalton Trans., **2014**, 43, 6689-6700

N. Bauer, V. C. Smith, R. T. A. MacGillivray, P. J. Panak, *Complexation of Cm(III) with the recombinant N-lobe of human serum transferrin studied by time-resolved laser fluorescence spectroscopy (TRLFS)*, Dalton Trans., **2015**, 44, 1850-1857.

N. Bauer, P. J. Panak, *Influence of carbonate on the complexation of Cm(III) with human serum transferrin studied by Time-Resolved Laser Fluorescence Spectroscopy (TRLFS)*, New J. Chem., **2015**, 39, 1375-1381.

N. Bauer, D. R. Fröhlich, K. Dardenne, J. Rothe, P. J. Panak, *EXAFS investigation on actinide and lanthanide transferrin complexes*, ANKA User Reports 2012/2013, KIT Karlsruhe, **2015**, 12-13.

D. R. Fröhlich, A. Skerencak-Frech, N. Bauer, A. Rossberg, P. J. Panak, *The pH dependence of Am(III) complexation with acetate: an EXAFS study*, J. Synchrotron Radiat., **2015**, 22, 99-104.

Vorträge

N. Bauer, P. J. Panak, *Interaction of human serum transferrin with Cm(III) studied by TRLFS*, International Conference on the Chemistry and Physics of the Actinide Elements (Actinides), 21.-26. Juli **2013**, Karlsruhe.

N. Bauer, D. R. Fröhlich, P. J. Panak, *Interaction of human serum transferrin with Cm(III) studied by TRLFS*, GDCh Wissenschaftsforum Chemie, 1.-4. September **2013**, Darmstadt.

N. Bauer, P. J. Panak, *Interaction of human serum transferrin with Cm(III) studied by TRLFS*, The third Joint Meeting of Working Groups WG1, WG2 and WG3 and the 5th Management Committee Meeting of COST Action CM1006: European f-Element Chemistry (EUFEN-3), 12.-15. April **2014**, Nürnberg.

N. Bauer, D. R. Fröhlich, P. J. Panak, *Interaction of Cm(III), Eu(III) and Am(III) with human serum transferrin*, First Joint Student Workshop on f-Element Chemistry, 28.-30. April **2014**, Manchester, Großbritannien. – **Vortragspreis** -

Posterbeiträge

N. Bauer, P. J. Panak, *Interaction of Cm(III) with human serum transferrin studied by TRLFS*, EuCheMS International Conference on Nuclear and Radiochemistry (NRC-8), 16.-21. September **2012**, Como, Italien. - **Posterpreis** -

N. Bauer, D. R. Fröhlich, P. J. Panak, *Interaction of Cm(III), Am(III) and Eu(III) with human serum transferrin*, INE/ITU Research Fellow Day, 6. Februar **2014**, Karlsruhe.

**Eidesstattliche Versicherung gemäß § 8 der Promotionsordnung
der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der Universität Heidelberg**

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema

Untersuchung der Wechselwirkung trivalenter Actinid- und Lanthanidionen mit humanem

Serumtransferrin mittels zeitaufgelöster Laserfluoreszenzspektroskopie

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich wie folgt/bislang nicht¹⁾ an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.

Titel der Arbeit: _____

Hochschule und Jahr: _____

Art der Prüfungs- oder Qualifikationsleistung: _____

4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.

5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Ort und Datum

Unterschrift

¹⁾ Nicht Zutreffendes streichen. Bei Bejahung sind anzugeben: der Titel der andernorts vorgelegten Arbeit, die Hochschule, das Jahr der Vorlage und die Art der Prüfungs- oder Qualifikationsleistung.