

**Untersuchungen zum Redox-Verhalten der Komponenten des
humanen Blutes mit Hilfe der Elektron-Spin-Resonanz
Spektroskopie**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

2008

vorgelegt von:

Emmerich H u n s d o r f e r

geb. am: 31.08.1966 in Großsteffelsdorf

Aus dem Bereich Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Untersuchungen zum Redox-Verhalten der Komponenten des
humanen Blutes mit Hilfe der Elektron-Spin-Resonanz
Spektroskopie**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

2008

vorgelegt von:

Emmerich H u n s d o r f e r

geb. am: 31.08.1966 in Großsteffelsdorf

meinem Vater gewidmet († 19.08.2007)

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Zusammenfassung	3
Summary	6
2. Einleitung	9
3. Grundlagen	12
3.1 Chemische Vorgänge in der Zelle auf der Basis von Redox-Reaktionen	12
3.2 Pathologische Prozesse auf der Basis von Enzymdefekten.....	14
3.3 Blut als Teilsystem des Organismus.....	15
3.4 Grundlagen der ESR-Spektroskopie	17
3.4.1 Relaxationszeiten	20
3.4.2 Anisotropie des g-Faktors	21
3.4.3 Nullfeldaufspaltung	22
3.4.4 Theoretische Beschreibung der ESR-Spektren	23
3.5 Grundlagen der Strahlenchemie	30
3.6 ESR-aktive Metalloproteine im Blut.....	32
3.6.1 Hämoglobin.....	32
3.6.2 Katalase	35
3.6.3 Transferrin	39
3.6.4 Kupferhaltige Proteine	47
3.6.5 Weitere Metalloproteine.....	48
4. Material und Methoden	49
4.1 Proben und Chemikalien	49
4.2 Erythrozytenkonzentrat-Präparation.....	50
4.3 Plasma („Fresh-Frozen-Plasma“) Präparation.....	52
4.4 Herstellung der Dithionit-Titrationsreihe.....	53
4.5 Herstellung der Hexacyanoferrat-Titrationsreihe	55
4.6 Bestrahlung der Fraktionen	57
4.7 Spektrometeranordnung	57
4.8 ESR-Signalaufnahme	60
4.9 Quantitative Auswertung der ESR-Signale.....	61

4.10 Hintergrundsignale des Messsystems	62
5. Ergebnisse	65
5.1 Einführung.....	65
5.2 Ery-Fraktion	65
5.2.1 Plasma>30kDa, Plasma 30-10kDa, Plasma <10kDa	72
5.2.2 ERY-Fraktion / Dithionit-Titrationsreihe.....	74
5.2.3 ERY-Fraktion / Hexacyanoferrat-Titrationsreihe.....	82
5.2.4 ERY-Fraktion-Bestrahlungsreihe	88
5.3 Hämoglobin(A)-Fraktion.....	100
5.3.1 Hämoglobin(A) / Dithionit-Titrationsreihe	100
5.3.2 Hämoglobin(A)-Bestrahlungsreihe.....	102
5.4 Plasma-Fraktion	107
5.4.1 Plasma-Fraktion / Dithionit-Titrationsreihe	111
5.4.2 Plasma (30/10)kDa, Plasma < 10kDa	116
5.4.3 Plasma / Hexacyanoferrat-Titrationsreihe	117
5.4.4 Plasma-Fraktion-Bestrahlungsreihe	122
6. Diskussion	130
Literaturverzeichnis.....	139
Danksagung	Anhang I
Tabellarischer Lebenslauf	Anhang II

1. Zusammenfassung

Die Elektronen Spin Resonanz (ESR)-Spektroskopie kann zur Untersuchung von pathologischen Vorgängen in Zellen eingesetzt werden mit dem Ziel, charakteristische ESR-Signale nachzuweisen, diese entsprechenden Spezies zuzuordnen und deren Verhalten unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen. Allerdings ist die Zusammensetzung biologischer Proben oft nicht exakt zu definieren und die Spektren bestehen aus komplexen, sich überlagernden Signalen, so dass eine Identifikation nicht immer gelingt. Daher ist eine systematische Untersuchung an möglichst nativen, gut definierten Proben für einen Vergleich mit pathologischen Zellproben von grundlegender Bedeutung. Durch gezielte chemische Beeinflussung der Proben oder Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen kann deren Signalverhalten modellmäßig beschrieben werden, um Signalveränderungen an pathologischen Proben später interpretieren zu können.

Blut nimmt im Organismus eine zentrale Stellung ein und ist neben einer reinen Transportaufgabe für Sauerstoff an nahezu allen Transport- und Stoffwechselprozessen im Körper beteiligt. Somit sind die im Blut enthaltenen Proteinsysteme in besonderem Maße ständig wechselnden physiologischen und besonders pathologischen Veränderungen ausgesetzt.

In dieser Arbeit wurden die einzelnen Bestandteile humanen Blutes systematisch auf ESR-Signale untersucht. Dazu wurden Erythrozytenkonzentrate und Plasmakonzentrate („Fresh-Frozen-Plasma“) präpariert und anschließend bei 77K und 4K vermessen. Der Hauptbestandteil der im Blut natürlich vorkommenden ESR-Signale wird gebildet von den drei eisenhaltigen Proteinen Ferri-Hämoglobin, Katalase und Transferrin. Diese Proteine bilden alle ein Fe(III)-„high-spin“-System mit jeweils charakteristischem ESR-Spektrum, gekennzeichnet durch den so genannten g-Faktor, der durch deren unterschiedliche paramagnetische Eigenschaften bestimmt wird. Aufgrund der kurzen Relaxationszeit dieser Metalloproteine sind zur bestmöglichen Signableitung ESR-Messungen bei Temperaturen von 4K notwendig. Ferri-Hämoglobin besteht aus einem axialen Signal mit $g_{\perp}=5,9$ und $g_{\parallel}=2$, die Katalase aus zwei rhombischen, sich überlagernden Signalen mit $g=(6,78; 5,02; 1,99)$ und $g=(6,46; 5,26; 1,99)$. Transferrin hingegen bildet ein Spektrum zwischen einem axialen und einem rhombischen System aus,

das im wesentlichen von sich anlagernden „synergistischen Anionen“ bestimmt wird. Um das Verhalten der Eisengruppen unter veränderten Redox-Bedingungen zu beschreiben, wurden Dithionit als Reduktionsmittel und Hexacyanoferrat als Oxidationsmittel in definierten Konzentrationen zugesetzt. Während Dithionit Ferri-Hämoglobin und Fe(III)-Transferrin reduziert, werden die beiden Signalpaare der Katalase in ein einzelnes rhombisches Signal mit $g=(6,67; 5,22; 1,99)$ überführt. Durch Hexacyanoferrat wiederum erfolgt eine Oxidation des Fe(II)-Hämoglobin zu Ferri-Hämoglobin, wohingegen Katalase und Fe(III)-Transferrin nicht weiter reagieren.

Da auch ionisierende Strahlen Reaktionen an Biomolekülen bewirken können, wurden die Blutbestandteile mit Röntgenstrahlen von definierter Dosis bestrahlt. Hämoglobin zeigt dabei in Abhängigkeit der Umgebung unterschiedliches Signalverhalten.

Während intrazelluläres Fe(II)-Hämoglobin unter Bestrahlung durch ein oxidierendes Äquivalent oxidiert wird, kommt es bei frei in der Lösung vorhandenem Ferri-Hämoglobin zu einer Reduktion. Diese erfolgt durch mobile Elektronen, die durch die Bestrahlung im Lösungsmittel generiert werden. Zusätzlich wird das ESR-Signal des bestrahlten, intrazellulär gelegenen Ferri-Hämoglobins im Vergleich zum nativen Ferri-Hämoglobin-Signals deutlich verändert. Dies weist auf eine Beeinflussung benachbarter Fe(III)-Zentren oder auf eine Interaktion mit im Protein generiertem Radikalprodukt hin.

Das Katalase-Signal wird durch das Ferri-Hämoglobin-Signal überlagert und kann daher nicht genau betrachtet werden, die Signalintensität erscheint nach Bestrahlung aber unverändert. Transferrin wird unter Bestrahlung nur allmählich reduziert, gleichzeitig bildet sich eine Fe(III) basierte Radikalspezies aus, die neue Signalbeiträge im Bereich $g=4$ und möglicherweise $g=11,2$ liefert. Im oberen Feldbereich entstehen durch die Bestrahlung neben den bekannten Signalen der FeO_2^- -Zentren der α - und β -Ketten des Hämoglobins sowie der H^\bullet - und OH^\bullet -Radikale, organische Radikale und Radikale im Lösungsmittel, deren komplex zusammengesetzte Signale nicht weiter aufgetrennt werden können. Allein ein strahleninduziertes Signal mit einem g-Faktor $g=2,09$, das im Temperaturbereich von

77K nicht nachweisbar ist, weist auf ein schnell relaxierendes organisches oder metallgebundenes Peroxidradikal hin.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Blutbestandteile systematisch auf ESR-Signale untersucht. Neben der genauen Beschreibung der ESR-Eigenschaften der Fe(III)-Systeme konnte modellmäßig deren Verhalten unter veränderten Redox-Bedingungen und nach Bestrahlung aufgezeigt werden. Neben bereits bekanntem Verhalten der Fe(III)-Systemen unter unterschiedlichen Redox-Bedingungen konnten insbesondere durch Bestrahlung neue Erkenntnisse gewonnen und zum Teil neue Signale generiert werden. Obwohl die Ergebnisse dieser Arbeit nicht ohne weiteres auf physiologische Vorgänge übertragbar sind, können sie als Grundlage für systematische Untersuchung von Blutproben im Rahmen pathologischer Veränderungen (Neoplasie, Ischämie, Sepsis, Medikamenten-Wirkung, Bestrahlung, Dialyse) genutzt werden.

Examination of the redox behavior of components of human blood with electron spin resonance (ESR-) spektroskopy

Summary

Electron spin resonance (ESR)-spectroscopy can be applied for studying pathological cells with the aim of monitoring characteristic ESR-signals and their behavior under varying conditions, attributing them to corresponding paramagnetic species, and explaining pathophysiological processes. However, often the composition of biological samples cannot be precisely determined, and, in addition, the spectra consist of complex overlapping signals which cannot always be separated and identified. Therefore, a systematic study with native and well defined samples is of fundamental importance for a possible later comparison with pathological cells. Modifying the samples chemically or exposing them to ionizing radiation it is possible to follow and interpret signal behavior of the samples.

Within the organism blood plays a central role. Apart from its mere purpose of transporting oxygen, it is involved in almost all processes of transport and of metabolism. Therefore, the protein systems that are contained in the blood are particularly exposed to constantly changing physiological and also pathological conditions.

In this study human blood components were systematically examined for ESR-signals. For this purpose packed red cells and packed plasma ("Fresh-Frozen-Plasma") were prepared and then measured at 77K and 4K. The major components of the ESR-signals that naturally exist in blood are arising from the three iron containing proteins ferric-hemoglobin, catalase and transferrin. They form Fe(III)-"high-spin" systems, but their ESR-spectra differ considerably in their specific properties. Fe(III)-hemoglobin consists of mainly an axial signal with $g_{\perp}=5,9$ and $g_{\parallel}=2$, the catalase of two rhombic overlapping signals with $g=(6,78; 5,02; 1,99)$ and $g=(6,46; 5,26; 1,99)$ and Fe(III)-transferrin on the other hand produces ESR-spectra with a symmetry in between an axial and a rhombic system, which is largely determined by attaching "synergistic anions". Due to the short relaxation time of

these metallo-proteins the ESR measurements had to be performed mostly at a temperature of 4K. In order to determine the behavior of the iron groups under changed redox conditions, dithionite was added as a reducing agent and hexacyanoferrat as an oxidizing agent, both in defined concentrations. Fe(III)-hemoglobin and Fe(III)-transferrin were completely reduced by dithionite. The reaction with dithionite transforms both signal pairs of the catalase into a single rhombic signal with $g=(6,67; 5,22; 1,99)$. Hexacyanoferrat causes an oxidation of Fe(II)- to Fe(III)-hemoglobin, whereas catalase and Fe(III)-transferrin could not be oxidized any further.

Since ionizing radiation also affects biomolecules either via direct interaction or through the creation of radical products, blood components were exposed to X-rays of a defined dose at 77K. It was found that the radiation effect on hemoglobin depends on its environment. Whereas intracellular Fe(II)-hemoglobin is oxidized upon exposure, a reduction of Fe(III)-hemoglobin in frozen solution is occurring. The reduction of ferric hemoglobin in the solution matrix is attributable to radiation generated mobile electrons, whereas the oxidation of intracellular ferrous hemoglobin requires the action of an oxidizing equivalent. In addition, the ESR features of the radiation generated intracellular Fe(III)-hemoglobin are also significantly altered as compared to the originally observed Fe(III)-hemoglobin signals. This may be indicative for a mutual influence between the Fe(III)-centers in close proximity or for the interaction with a nearby radical generated in the protein. The radiation dose dependent behavior of the typical catalase ESR-signals cannot be analysed in detail because of the strong overlap with the modified Fe(III)-hemoglobin signal. For small doses the signal intensities appear to be unchanged. Upon exposure to X-rays transferrin is reduced only gradually. Simultaneously a Fe(III) based species is formed with signal contributions at $g=4$ and possibly $g=11,2$. At higher magnetic field complex signals are found upon irradiation with X-rays. Apart from the known signals of the FeO_2^- -centers of the α - and β -chains of hemoglobin, the H^\bullet - and OH^\bullet -radicals, additional organic and solvent radicals are formed which cannot be separated further. Only one new radiation induced organic or metal bound peroxide radical can be observed with a g -factor $g=2,09$, which shows short relaxation times and therefore can not be detected at 77K.

In this study the components of human blood were systematically examined for ESR-Signals. In addition to the precise description of the ESR properties of the Fe(III)-systems, it was also possible to follow their behavior upon changing redox conditions and after exposure to X-rays under model conditions. Some well known reactions of the Fe(III)-systems particularly under changing redox-conditions were observed. However, after exposure to X-rays some novel signals were generated and tentatively assigned. Even though the result of this study cannot simply be applied to physiological processes, they can serve as a starting point for the systematic examination of blood samples related to pathological changes (such as neoplasia, ischemia, sepsis, the effect of medication or dialysis, or exposure to ionizing radiation).

2. Einleitung

Die komplexen Vorgänge in lebenden Zellen laufen vielfach auf der Grundlage von Redox-Reaktionen ab. Zu diesem Zweck nützen sie Enzyme, die als Katalysatoren diese Reaktionen ermöglichen. Die einzelnen Reaktionsschritte werden dabei genau gesteuert und hängen in ihrer Abfolge voneinander ab [ALBERTS, 1986]. Bereits geringe Änderungen in der Abfolge einer Reaktionskette können zu veränderten oder fehlenden Endprodukten und damit zu einer pathologischen Entgleisung führen [LÖFFLER, 1988]. Damit kommt den Enzymen eine besondere Stellung in der Funktionsweise einer Zelle zu. Die prosthetische Gruppe dieser Enzyme besteht oft aus Metallen, die über Elektronenaufnahme und -abgabe die eigentliche Reaktionseinheit bereitstellen. Diese Metallo-Proteine bilden häufig paramagnetische Zentren und sind damit durch die Elektronenspin-Resonanz (ESR)-Spektroskopie darstellbar [WALLICK, 1984; BLOOM, 1986; PERUSSI, 1990; CAMMACK, 1993; GAFFNEY, 1993; FIEGE, 1995]. Sie ist eine physikalische Methode zum Nachweis von paramagnetischen Molekülen, wobei diese bereits ab einer Konzentration von ca. 10^{-8} M detektierbar sind [CAMPBELL, 1984]. In Abhängigkeit von den Messbedingungen können Informationen über die Zentren selbst, über deren Umgebung sowie über ablaufende Reaktionen erhalten werden. Damit kann die ESR-Spektroskopie für die Untersuchung von biologischen Systemen und die Aufklärung von pathologischen Prozessen sowie deren biochemischen Vorgängen eingesetzt werden [INGRAM, 1969].

In vielen pathologischen Prozessen werden freie Radikale für die eigentliche Störung der Zellen verantwortlich gemacht [McBRIEN, 1982; BULKLEY, 1983; PARKS, 1983; HALLIWELL, 1987; AUST, 1993]. Es sind reaktive Spezies mit einem ungepaarten Elektron und damit ebenfalls durch die ESR-Spektroskopie detektierbar.

Betrachtet man zum Beispiel Perfusions- und Reperfusionstörungen (Myokardinfarkt, cerebraler Insult, Ischämie, Sepsis) kommt es unter ischämischen Bedingungen zunächst zu einer Umwandlung des Enzyms Xanthin-Dehydrogenase in Xanthin-Oxidase, das in der anschließenden Phase der Reperfusion die Bildung von Superoxidradikalen hervorruft. Diese Sauerstoffradikale werden für die resultierenden pathologischen Entzündungsprozesse (zelluläre Entzündungs-

reaktion, interstitielles Ödem, Gewebsnekrosen) mitverantwortlich gemacht, die dann selbst unabhängig vom auslösendem Agens ablaufen [McCORD, 1983, 1985; ZIVIN, 1991]. Diese pathologischen Prozesse, hervorgerufen durch die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale, können ebenfalls mit Hilfe der ESR-Spektroskopie untersucht werden [van der KRAAIJ, 1989; UKEI, 1994].

Auch die maligne Entartung einer Zelle geht mit einem veränderten Stoffwechsel einher. Radikale können dabei eine direkte schädigende Wirkung an der DNS oder die Bildung von Zwischenprodukten mit Veränderung der DNS verursachen. Diese Veränderungen können die Grundlage einer Entartung der betroffenen Zelle mit veränderten Stoffwechselleistungen bewirken [SCHWARTZ, 1972]. Die Folge kann eine Änderung der Konzentration natürlich vorkommender Radikale oder die Entstehung neuer Radikale sein. ESR-Messungen haben gezeigt, dass bei bestimmten malignen Erkrankungen eine Korrelation zwischen der Erkrankung und der Änderung eines ESR-Signals besteht [MARUYAMA, 1971; RIKHIREVA, 1978; PULATOVA, 1978; LASSMANN, 1989; WICKENS, 1990]. Ist dieses Signal spezifisch für die Erkrankung, könnte es als Marker bei der Diagnose oder als Verlaufparameter bei der Therapie Verwendung finden.

LOHMANN [1979, 1981, 1986] untersuchte Blut von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) mit Hilfe der ESR-Spektroskopie. Er konnte ein charakteristisches Signal bei $g=2,005$ nachweisen, das im Blut gesunder Probanden nicht vorhanden war. Verursacht wird dieses Radikalsignal nach Ansicht von LOHMANN [1986] durch eine verminderte Wirkung oxidierender Substanzen (z.B. Ascorbin-Oxidase) in maligne veränderten Zellen. Unter Vermittlung eines kupferhaltigen Membranproteins in der Erythrozytenmembran kommt es dadurch zu Reaktion von Ascorbinsäure mit Bildung eines Semihydroascorbat-Radikals, welches das für die ALL charakteristische ESR-Signal liefert. Dieses spezifische Signal könnte zur Diagnostik und Therapiekontrolle der ALL genutzt werden.

Auch Untersuchungen an Proben von Endometrium-Karzinomen, die bei Patientinnen bioptisch entnommen wurden, zeigten eine deutliche Abnahme von ESR-Signalen im Vergleich mit Gewebeproben gesunder Probanden. Da man mit der ESR-Spektroskopie paramagnetische Zentren kleinster Konzentration detektieren kann, könnte mit dieser Methode daher theoretisch die maligne

Transformation von Zellen nachgewiesen werden, noch bevor sie histologisch Auffälligkeiten zeigen.

Allerdings kam gerade im Rahmen dieser Versuch die Frage auf, inwieweit die Signalveränderungen nicht durch Verarbeitungsprozesse der Probe verursacht waren [BENEDETTO, 1981; McBRIEN, 1982; TOMASI, 1984].

Biologische Proben stellen ein komplexes System dar. Sie sind in der Zusammensetzung der paramagnetischen Zentren variabel und oft können diese auch nicht genau identifiziert werden. Ihre ESR-Spektren bestehen aus zum Teil sich stark überlagernden Einzelsignalen, deren Trennung und Zuordnung nicht immer gelingt. Auch die Veränderung der ESR-Signale ist wegen der vielfachen Wechselwirkung einzelner paramagnetischer Zentren im intakten zellulären Verbund häufig nur schwer zu interpretieren. Weiterhin muss der Einfluss der Probenverarbeitung auf die Signalveränderung berücksichtigt und untersucht werden. Nur die genaue Untersuchung weitgehend natürlicher Proben und die Beschreibung der darin enthaltenen Signale ermöglichen einen späteren Vergleich mit pathologischen Proben. Somit erlauben erst die Auftrennung der zusammengesetzten Signale und deren Zuordnung zu einzelnen Zellbestandteilen eine Interpretation komplexer Prozesse an biologischen Systemen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Komponenten des Organsystems Blut mit Hilfe der ESR-Spektroskopie untersucht. Dabei sollten die im Blut natürlich vorhandenen Bestandteile aufgetrennt, deren Signale charakterisiert und soweit möglich einzelnen Molekülsystemen zugeordnet werden. Die Untersuchung sollte an möglichst unveränderten Blutproben erfolgen. Um die zu erwartenden komplexen ESR-Signale auftrennen zu können, wurde bereits vor der Messung eine Aufteilung des Blutes in zelluläre (Erythrozytenkonzentrat) und plasmatische („Fresh-Frozen-Plasma“-Konzentrat) Bestandteile vorgenommen. Diese beiden Hauptgruppen wurden durch Zentrifugation gegen eine semipermeable Membran nach ihrem Molekulargewicht weiter aufgetrennt. Dadurch sollte die Zuordnung der Signale zu den so erhaltenen Fraktionen noch genauer möglich werden. Die gemessenen Signale wurden in Hinsicht auf ihr Temperaturverhalten und ihrer Abhängigkeit von Spektrometerparametern untersucht. Um modellmäßig Aussagen über das Verhalten der Molekülsysteme unter veränderten Redox-Bedingungen zu bekommen, erfolgte die Zugabe eines starken Reduktionsmittels (Dithionit) und eines starken

Oxidationsmittels (Hexacyanoferrat) in definierten Konzentrationen. Eine Änderung der Elektronenkonfiguration der paramagnetischen Zentren sollte sich in einer Änderung des ESR-Signals bemerkbar machen. Auch ionisierende Strahlung erzeugt eine Vielzahl an Radikalprodukten und kann zudem direkte Schäden an biologischen Systemen verursachen. Daher erfolgten in einem weiteren Schritt die Bestrahlung der Blutbestandteile mit variablen Dosen und eine anschließende Untersuchung mit Hilfe der ESR-Spektroskopie.

Die ESR-Messungen waren in erster Linie qualitativ und beschränkten sich auf die Beschreibung der Signalveränderungen. Soweit möglich wurde auch eine quantitative Auswertung vorgenommen, um die gemessenen Signalveränderungen in Beziehung zum Reaktionspartner zu setzen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen könnten dann als Grundlage zur Interpretation veränderter ESR-Signale des Blutes im Rahmen von pathologischen Prozessen nach chemischen, medikamentösen und ionisierenden Einflüssen dienen.

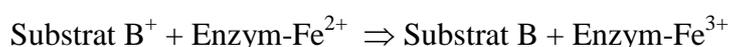
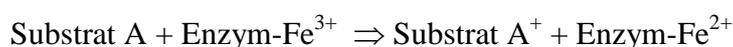
3. Grundlagen

3.1 CHEMISCHE VORGÄNGE IN DER ZELLE AUF DER BASIS VON REDOX-REAKTIONEN

Lebende Zellen leisten im erheblichen Umfang Arbeit. Dazu gehören mechanische Arbeit Biosynthese-, und Transportarbeit. Heterotrophe Zellen beziehen die dafür notwendige Energie aus der O₂-abhängigen Oxidation komplizierter organischer Moleküle wie Kohlenhydrate, Aminosäuren und Fette zu CO₂, Ammoniak (NH₃) und H₂O. Alle chemischen Reaktionen gehen mit der Übertragung von Elektronen zwischen den Reaktionspartnern einher, wobei der eine Reaktionspartner Elektronen abgibt und damit oxidiert wird, während der andere Elektronen aufnimmt und reduziert wird. Man spricht allgemein von Redox-Reaktionen [BOLTON, 1991]. Die einzelnen Reaktionen folgen den Gesetzen der Thermodynamik. Exergone Reaktionen werden entweder direkt an endergone Prozesse gekoppelt oder in Form von chemischer Energie in energiereichen Verbindungen gespeichert und bei Bedarf freigegeben. Enzyme erhöhen zusätzlich als biologische Katalysatoren die

Reaktionsgeschwindigkeit durch Verminderung der Aktivierungsenergie. In vielen wichtigen Enzymen sind Übergangsmetalle als prosthetische Gruppe enthalten. Sie zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, mehrere Oxidationsstufen zu bilden. Häufig sind sie über feste koordinative Verbindungen im Enzym verankert und stellen die eigentlichen Reaktionspartner bei Redox-Reaktionen dar.

Die Redox-Reaktion kann hierbei im Fall eines eisenhaltigen Enzyms nach folgendem Schema erfolgen:



In Tabelle 1 sind einige Enzymklassen mit den beteiligten Übergangsmetallen aufgeführt.

Gruppenbezeichnung	Funktionelle Gruppe	Wichtigste Vertreter
Oxidase	Cu(II) , Fe(III)	Cytochromoxidase, Caeruloplasmin, Superoxiddismutase
Aerobe Dehydrogenasen	Fe(II), Mo(VI)	Xanthinoxidase, Aldehydoxidase
Anaerobe Dehydrogenasen	Fe(III)	Cytochrome, Lipoxygenase
Hydroperoxidasen	Fe(III)	Peroxidase, Katalase
Oxygenasen	Fe(II)	Phenylalaninhydroxylase, Cytochrom P ₄₅₀

Tabelle 1

Als Beispiel kann die Regenerierung von ADP und P zu ATP in der als „Atmungskette“ bekannten Abfolge von Reaktionen angeführt werden, bei der eine Übertragung von Elektronen über gekoppelte Redox-Reaktionen auf Sauerstoff stattfindet. Diese wird auch „Elektronentransportphosphorylierung“ genannt [LÖFFLER, 1988]. Die Elektronen folgen dabei einem elektrochemischen Gradienten, und die dadurch frei werdende Energie wird über weitere Schritte zur

Phosphorylierung von ADP zu ATP genutzt. Die an dieser Reaktionsabfolge beteiligten Enzyme, die Cytochrome, enthalten Eisenatome in der prosthetischen Gruppe, einer Häm-Gruppe, die als Elektronen-Akzeptoren und -Donatoren wirken. Das Schema in Abb.1 verdeutlicht die Reaktionsschritte.

Als Grundprinzipien der chemischen Vorgänge der Zelle erkennt man hier die kontrollierte Übertragung von Elektronen, die Aufspaltung einer stark exergonen Reaktion in mehrere kleinere Schritte und die Kopplung der frei werdenden Energie an eine endergone Reaktion.

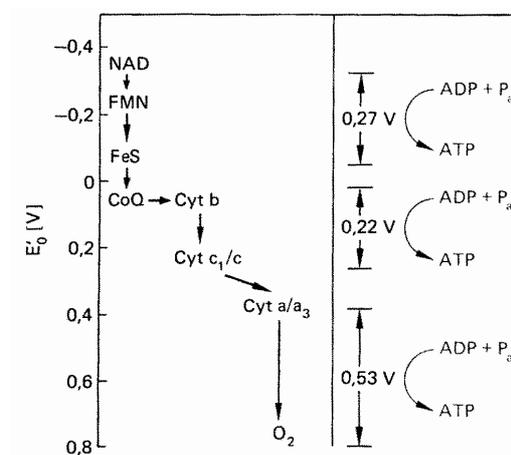


Abb.1: Elektronentransportphosphorylierung / Atmungskette [LÖFFLER, 1988]

3.2 PATHOLOGISCHE PROZESSE AUF DER BASIS VON ENZYMDEFEKTEN

Jedes katalytisch wirksame Protein ist in einem System von Stoffwechselreaktionen und Stoffwechselzyklen mit anderen Enzymen verbunden. Nur durch die gegenseitige Kontrolle der einzelnen Reaktionsschritte kann das komplizierte Gleichgewicht der Zelle und des Organismus erhalten bleiben.

Abb.2 zeigt schematisch die möglichen Reaktionswege eines Produkts A, in Abhängig von der Enzymleistung der Zelle und die negative Rückkopplung des

Endprodukts D. Genetische Störungen, die eine veränderte Genexpression zur Folge haben, beeinflussen in Abhängigkeit von der Stellung des jeweiligen Enzyms den Stoffwechsel der Zelle. So kann die fehlende oder verminderte Aktivität eines Enzyms die vollständige oder partielle Blockade einer Reaktionskette zur Folge haben (siehe Abb.3). Die daraus resultierende Pathologie entsteht durch sich anhäufende Zwischenprodukte oder fehlende Endprodukte des Stoffwechsels. Weiterhin können normalerweise nicht eingeschlagene Nebenwege des Stoffwechsels zur vermehrten Bildung pathologisch wirkender Substanzen führen. Ein Beispiel hierfür ist die Transformation einer Zelle in eine maligne Zelle, die eine genetische Mutation voraussetzt. Die daraus resultierenden Eigenschaften unterscheiden sich von denen der normalen Zelle im zugehörigen Zellverband. Ungehemmtes Wachstum, Verlust der spezifischen Stoffwechsellistung und Produktion zellfremder Stoffwechselprodukte sind Folgen einer „Entgleisung“ des Stoffwechsels durch eine veränderte Genexpression.

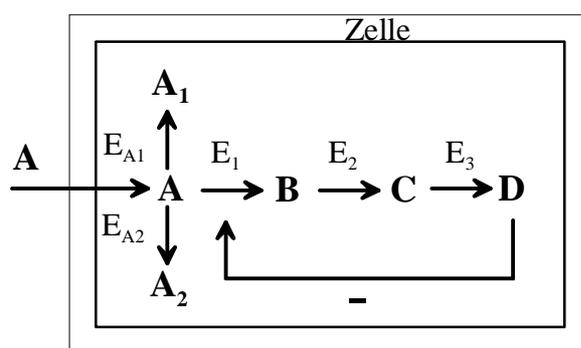


Abb.2: Abbauwege des Stoffs A in einer Abfolge von Enzymsystemen und negative Rückkopplung des Endprodukts D auf ein Schlüsselenzym (E_1). Daneben mögliche parallele Abbauwege

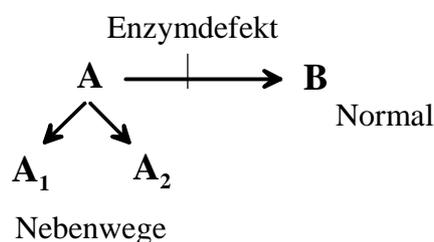


Abb.3: Vermehrte Bildung von Nebenprodukten bei Blockade des normalen Abbauwegs durch einen Enzymdefekt [LÖFFLER, 1988]

3.3 BLUT ALS TEILSYSTEM DES ORGANISMUS

Da in dieser Arbeit speziell humanes Blut mit der ESR-Spektroskopie untersucht wurde, soll hier kurz auf die wesentlichen Komponenten des Blutes und deren

Funktionen eingegangen werden. Durch seine vielfältigen Aufgaben und seine Zusammensetzung an spezialisierten Zellen lässt sich Blut als Teilsystem des Organismus, im weiteren Sinn als ein eigenständiges Organ betrachten. Die Komplexität der Funktionen und Erkrankungen führte zur Bildung eigenständiger Teilgebiete innerhalb der Inneren Medizin (Hämato-Onkologie, Haemostasiologie), die sich mit allen Fragen der Zusammensetzung, der Funktion sowie der Pathologie des Blutes und deren Auswirkung auf andere Organsysteme beschäftigen. Wichtige Erkrankungen sind hier z.B. die Anämien, die myeloproliferativen und myelodysplastischen Erkrankungen, die Leukämien und Lymphome sowie die hämorrhagischen Diathesen.

Das Blut besteht aus korpuskulären Elementen, eingeteilt in rote (Erythrozyten) und weiße Blutkörperchen (Leukozyten, Lymphozyten), den Blutplättchen (Thrombozyten) und einem wässrigem Medium, dem Blutplasma mit seinen Bestandteilen. Die Blutbildung erfolgt im roten Knochenmark und selten in blutbildungsfähigen Organen wie der Leber oder der Milz. Die einzelnen korpuskulären Bestandteile haben wie alle Zellen eine begrenzte Lebensdauer. Ihre Bildung und der Abbau liegen im Gleichgewicht und unterliegen strengen Kontrollmechanismen durch Hormone (z.B. Erythropoetin, „colony-stimulating-factors“ (CSF)).

Die Aufgaben des Blutes sind der Transport, die Pufferung, die Abwehr, die Regulation der Körpertemperatur und des Wasserhaushalts. Blut transportiert Hormone von den endokrinen Drüsen zu den Erfolgsorganen, sowie Nährstoffe, Stoffwechselprodukte, Elektrolyte, Medikamente und Gase. Blut dient der Kommunikation zwischen den einzelnen Organen und ermöglicht dadurch die Verbindung der einzelnen Organe zu einem Gesamtorganismus. Der Transport der Stoffe erfolgt entweder in Form von frei gelösten Substanzen oder gebunden an speziellen Transportproteinen wie dem Albumin.

Sauerstoff als die wichtigste zu verteilende Substanz wird an Hämoglobin gebunden und durch die Erythrozyten transportiert. Durch Bindung von H^+ -Ionen an Hämoglobin sind die Erythrozyten auch an der Pufferung bei der Regulation des Säure-Base-Haushalts beteiligt. Zusätzlich verändert sich in Abhängigkeit vom Säure-Base-Status des Organismus die Konzentration von Kohlendioxid und dessen

Reaktionsprodukt Bicarbonat im Blut, die Gegenregulation erfolgt dann in den beiden Ausscheidungsorganen Lunge und Niere.

Bei der Abwehr gegen schädigende Einflüsse sind die weißen Blutkörperchen direkt beteiligt (zelluläre Abwehrreaktion). Zudem werden im Blut humorale Bestandteile der Abwehrreaktion (Immunglobuline, Interleukine und andere Serumproteine) vom Ort der Bildung (z.B. Lymphknoten, Leber) zum betroffenen Organ transportiert [LÖFFLER, 1988].

Aufgrund der hohen spezifischen Wärme von Wasser ist das Blut imstande, die in einzelnen Organen gebildete Wärme auf den gesamten Organismus zu verteilen. Die überschüssige Wärme wird an der Hautoberfläche abgegeben [SCHMIDT, 1987]. Die Konzentration von Proteinen und Elektrolyten im Blut bestimmt dessen kolloidosmotisches und osmotisches Gewicht. Davon abhängig kommt es zum Austausch von Wasser zwischen der zirkulierenden Flüssigkeit und der Gewebsflüssigkeit [LÖFFLER, 1988].

3.4 GRUNDLAGEN DER ESR-SPEKTROSKOPIE

Die im folgendem dargelegten theoretischen Grundlagen der ESR-Spektroskopie stützen sich im Wesentlichen auf gängige Lehrbücher [CHESTON, 1964; BÄR 1975; HOPPE, 1977; CAMPBELL, 1984; FINKELNBURG, 1976; CAMMACK, 1993; HAGEN, 1993; WERTZ, 1972]

Das freie Elektron besitzt einen Eigendrehimpuls, den Spin, beschrieben durch den Vektor \vec{S} , und damit ein magnetisches Moment $\vec{\mu}_s$. Die Entstehung dieses magnetischen Moments kann man mit der klassischen Betrachtung der Kreisströme erklären, die eine rotierende Ladung erzeugt. Für die quantitative Beziehung zwischen \vec{S} und $\vec{\mu}_s$ gilt:

$$\vec{\mu}_s = -g_e \cdot \mu_B \cdot \vec{S}$$

$\vec{\mu}_s$: magnetisches Moment des Elektrons

μ_B : Bohrsches Magneton, als Grundeinheit für atomare magnetische Momente

g_e : Lande-Faktor

\vec{S} : Spinmoment des Elektrons

In einem äußeren homogenen Magnetfeld \vec{H} richtet sich das Elektron als magnetischer Dipol mit seinem Spin \vec{S} parallel oder antiparallel zu einer gegebenen Magnetfeldrichtung aus. Nach den Gesetzen der Quantenmechanik gilt für den Betrag des Spinvektors \vec{S} :

$$|\vec{S}| = \hbar \cdot \sqrt{S \cdot (S+1)} \quad \text{mit} \quad \hbar = h/2\pi$$

S : Spin-Quantenzahl, mit $S = 1/2, 1, \pm 3/2, \dots$

\hbar : Plancksches Wirkungsquantum

Wählt man die Richtung des äußeren Magnetfeldes als Vorzugsrichtung z , so schließt der Vektor \vec{S} mit z einen bestimmten, von der Quantenmechanik vorgegebenen Winkel ein.

Für die Projektion von \vec{S} auf z gilt:

$$S_z = m_s \cdot \hbar$$

m_s : magnetische Quantenzahl, mit: $m_s = S, S - 1, S - 2, \dots, -S+1, -S$

Somit ergeben sich $(2S + 1)$ Einstellungsmöglichkeiten im angelegten Magnetfeld. Aus der klassischen Betrachtung der Energie eines Dipols im äußeren Magnetfeld, berechnet sich die Energie des Elektrons allgemein mit:

$$E = E_0 + m_s \cdot g_e \cdot \mu_B \cdot \vec{H}_z$$

E_0 : Energie im Grundzustand, ohne äußeres Magnetfeld

\vec{H}_z : Magnetfeld in Richtung der z -Achse

Für ein einzelnes freies Elektron mit $m_s = \pm 1/2$ gilt:

$$E = E_0 \pm 1/2 \cdot g_e \cdot \mu_B \cdot \vec{H}_z$$

Somit ergeben sich zwei unterschiedliche Energieniveaus. Wird nun dem System Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung mit der Frequenz ν zugeführt, können die Spins durch Absorption dieser Energie von einem Energieniveau ins andere übergehen, wenn folgende Resonanzbedingung erfüllt ist:

$$\Delta E = h \cdot \nu = g_e \cdot \mu_B \cdot \vec{H}_z$$

Abb.4 veranschaulicht die Aufspaltung der Energieniveaus durch ein externes Magnetfeld und die bei einer bestimmten Frequenz stattfindende Resonanz.

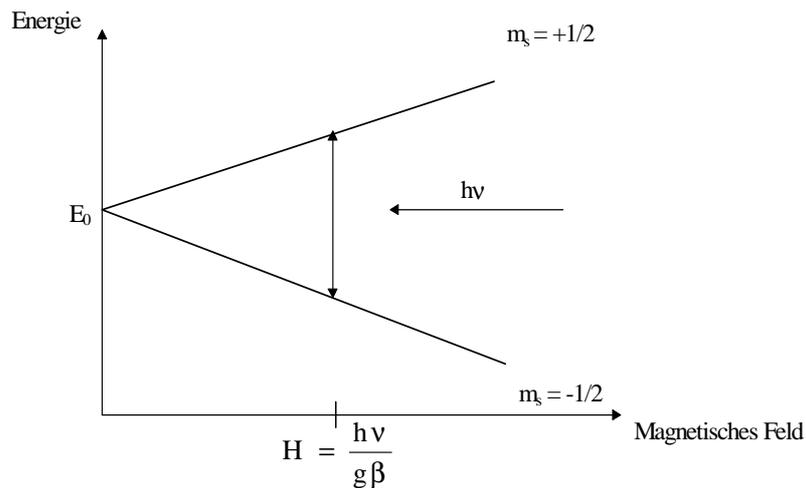


Abb.4: Aufspaltung der Energieniveaus eines freien Elektrons in einem magnetischen Feld

Innerhalb eines Systems mit einer Vielzahl von freien Elektronen folgt die Besetzung der beiden Energieniveaus im thermischen Gleichgewicht der Boltzmann-Verteilung:

$$N_+ / N_- = \exp(-\Delta E / (k \cdot T))$$

- N_+ : Besetzungszahl im oberen Energieniveau
- N_- : Besetzungszahl im unteren Energieniveau
- k : Boltzmann-Konstante, mit $k = 1,38 \cdot 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$
- T : Absolute Temperatur in K

Die Wahrscheinlichkeit für Absorptions- und Emissionsübergänge ist gleich. Ein Überwiegen der Absorptionsübergänge erhält man, wenn das untere Energieniveau gegenüber dem oberen stärker besetzt ist. Bei gegebener Energie der eingestrahnten elektromagnetischen Welle hängen die Besetzungszahldifferenz und damit die Absorption von der Temperatur ab.

3.4.1 RELAXATIONSZEITEN

Eine unendliche Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Spins im höheren Energieniveau nach Absorption der eingestrahlten Energie würde zu einer Gleichbesetzung der Energieniveaus und damit zur Auslöschung des ESR-Absorptionssignals führen. Eine kontinuierliche Beobachtung der Übergangsphänomene ist daher nur möglich, wenn die absorbierte Energie strahlungsfrei an die Umgebung wieder abgegeben wird und die Spins in ihren Grundzustand zurückkehren. Dieser zeitabhängige Vorgang wird durch die longitudinale Relaxationszeit T_1 beschrieben, die auch Spin-Gitter-Relaxationszeit genannt wird. T_1 gibt die Zeit an, in der die Störung der Besetzungszahldifferenz ($N_+ - N_-$) gegenüber der Boltzmann-Verteilung auf $1/e$ abgesunken ist, gemäß der Beziehung:

$$N(t) = N_0 \cdot (1 - e^{-t/T_1})$$

$N(t)$: Besetzungszahl eines Energieniveaus zum Zeitpunkt t

N_0 : Besetzungszahl eines Energieniveaus im thermischen Gleichgewicht

Die strahlungsfreie Energieabgabe erfolgt dabei an das Gitter, das alle Freiheitsgrade beinhaltet, mit Ausnahme des Spinfreiheitsgrades. Die Relaxationsprozesse sind stark temperaturabhängig. In Festkörpern wird bei Temperaturen $T > 20\text{K}$ die Energieabgabe durch den „Raman-Prozess“ bestimmt, bei dem die Spin-Energie von Phononen absorbiert wird [SCHNEIDER, 1971]. Die notwendige Wechselwirkung des Spins mit den Phononen erfolgt über die Spin-Bahn-Kopplung. Dabei gilt für die Relaxationszeit T_1 :

$$1/T_1 \cong H^2 \cdot T^7$$

Bei tieferen Temperaturen dominiert ein „direkter Prozess“, der die direkte Wechselwirkung der Spins mit den Phononen beschreibt [GORDY, 1980]. Für T_1 gilt dann:

$$1/T_1 \cong H^4 \cdot T$$

Magnetische Wechselwirkungen der Spins untereinander bewirken eine zeitliche Fluktuation der Energieniveaus. Dieser Prozess wird durch die transversale oder

Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 charakterisiert. In erster Näherung ist T_2 nur von der Konzentration der paramagnetischen Zentren abhängig [SCHNEIDER, 1971]. Sowohl die Spin-Gitter-Relaxation als auch die Spin-Spin-Relaxation führen zur Verbreiterung der ESR-Linie. Bei extrem kurzen Relaxationszeiten tritt unter Linienverbreiterung ein Sättigungseffekt auf, so dass eine Detektion des ESR-Signals unmöglich wird.

3.4.2 ANISOTROPIE DES G-FAKTORS

Der g-Faktor des freien Elektrons (der Landé-Faktor) mit Spin $S = 1/2$ beträgt 2,0023. Betrachtet man ein Elektron in einem atomaren System, so kann neben dem Spin-Moment ein Bahn-Drehimpuls L wirken, für den gilt:

$$|\vec{L}| = \sqrt{L \cdot (L + 1)} \quad L = 0, 1, 2, \dots, n - 1$$

n : Hauptquantenzahl

Das wirksame magnetische Moment ist damit durch den Gesamtdrehimpuls \vec{J} gegeben, der sich additiv aus dem Spin-Moment und dem Bahn-Drehimpuls des Elektrons zusammensetzt:

$$\vec{J} = \vec{S} + \vec{L}$$

mit: $|\vec{J}| = \sqrt{J \cdot (J + 1)} \cdot \hbar$

Diese Wechselwirkung des Bahn-Drehimpulses mit dem Spin-Moment führt zu Abweichungen der g-Faktoren vom Wert des freien Elektrons. Ohne Einfluss von elektromagnetischen Wechselwirkungen durch innere Felder wird der g-Faktor berechnet nach:

$$g = 1 + \frac{J(J + 1) + S(S + 1) - L(L + 1)}{2J(J + 1)}$$

Paramagnetische Zentren in biologischen Molekülen gehören überwiegend zur Reihe der Übergangsmetalle. Diese besitzen fünf 3d-Orbitale, die im freien Ion

energetisch gleich, somit fünffach entartet sind und mit bis zu 10 Elektronen aufgefüllt werden können. Oft stehen die Metallionen innerhalb eines biochemischen Komplexes unter Einfluss innerer elektrostatischer Felder, erzeugt durch sie umgebende Liganden. Die Abweichung des g-Faktors vom Wert des freien Elektrons ist dann abhängig von der Richtung des Magnetfeldes und damit anisotrop. Somit muss der g-Faktor dann durch einen 3-dimensionalen Tensor \bar{g} dargestellt werden:

$$\bar{g} = g_e \cdot (1 + k_{xyz} \cdot \lambda)$$

Die Spin-Bahn-Kopplungskonstante λ beschreibt dabei die Stärke der Spin-Bahn-Kopplung. Durch symmetrische Anordnung der Liganden und unter Berücksichtigung der z-Achse als Hauptachse in Richtung des äußeren Magnetfeldes, kann man folgende Fälle unterscheiden:

isotropes Spektrum:	$g_x = g_y = g_z$	
axiales Spektrum:	$g_x = g_y \neq g_z$	mit $g_x, g_y = g_{\perp}, g_z = g_{\parallel}$
rhombrisches Spektrum:	$g_x \neq g_y \neq g_z$	

3.4.3 NULLFELDAUFSPALTUNG

Durch innere Felder, bedingt durch die Einbettung des Metallions in seine Umgebung, etwa in ein Protein, werden die d-Orbitale der Metallionen energetisch getrennt, die Entartung wird aufgehoben. Diese Trennung der Energieniveaus bei Abwesenheit eines äußeren magnetischen Feldes nennt man Nullfeldaufspaltung. Die Besetzung der Orbitale mit Elektronen richtet sich dann nach der Stärke der inneren Felder. Bei schwachen Feldern mit nicht zu starker energetischer Trennung der Orbitale werden sie nach der Hund'schen Regel so besetzt, dass das resultierende Spin-Moment maximal ist. Man spricht vom „high-spin“-System. In einem „low-spin“-System verursachen die starken inneren Felder („starke Liganden“) eine große energetische Aufspaltung der Orbitale. Die energetisch niedrigsten Orbitale werden dann nach dem Pauli-Prinzip maximal mit Elektronen aufgefüllt.

3.4.4 THEORETISCHE BESCHREIBUNG DER ESR-SPEKTREN

Quantenmechanisch kann der Energiezustand eines Systems durch folgende Eigenwertgleichung beschrieben werden:

$$\hat{H} \cdot \Psi = E \cdot \Psi$$

Dabei definiert die Wellenfunktion ψ die Eigenfunktion, das System \hat{H} ist der Hamilton-Operator, der alle Wechselwirkungen beinhaltet, denen das System ausgesetzt ist. Angewandt auf die Wellenfunktion erzeugt der Operator eine neue Funktion, die sich von der ursprünglichen nur durch die Multiplikation mit einer reellen Zahl unterscheidet, diese wird als Eigenwert E bezeichnet. Der für die ESR-Theorie relevante Operator, der Spin-Hamilton-Operator, beschreibt die magnetischen Eigenschaften und Wechselwirkungen des ungepaarten Elektrons. Er setzt sich aus mehreren Einzeloperatoren zusammen. Das mathematische Korrelat zur Wechselwirkung zwischen äußerem Magnetfeld und ungepaartem Elektron ist der Elektron-Zeeman-Term \hat{H}_{ZE} . Er wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$\hat{H}_{ZE} = \mu_B \cdot \vec{H} \cdot \vec{g} \cdot \vec{S}$$

\vec{H} : äußeres Magnetfeld als Zeilenvektor
 \vec{S} : Spinvektor-Operator als Spaltenvektor
 \vec{g} : g-Tensor

Benachbarte Atomkerne mit Kernspin $I > 0$ erzeugen ein lokales Magnetfeld und üben dadurch eine Wechselwirkung auf das ungepaarte Elektron aus. Diese wird beschrieben durch den Hyperfeinstrukturterm \hat{H}_{hfs} , der sich aus zwei Anteilen zusammensetzt:

$$\hat{H}_{hfs} = \hat{H}_k + \hat{H}_{dd}$$

Die isotrope Fermi-Kontakt-Wechselwirkung \hat{H}_k entsteht durch die nicht verschwindende Aufenthaltswahrscheinlichkeit des ungepaarten Elektrons am Kernort im kugelsymmetrischen s-Orbital. Sie ist richtungsunabhängig (isotrop) und wird bestimmt durch die isotrope Kopplungskonstante a :

$$\hat{H}_k = a \cdot \vec{I} \cdot \vec{S}$$

\vec{I} : Kernspin-Operator

\hat{H}_{dd} gibt die klassische Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen magnetischen Dipolen an. Sie ist stark richtungsabhängig, damit anisotrop und kann durch den symmetrischen Tensor (\bar{A}') mit der Spur (A') = 0 beschrieben werden:

$$\hat{H}_{dd} = \vec{S} \cdot \bar{A}' \cdot \vec{I}$$

Für den Hyperfeinstrukturterm gilt nach Umformung:

$$\hat{H}_{hfs} = h \cdot \vec{S} \cdot \bar{A} \cdot \vec{I}$$

Der Tensor \bar{A} setzt sich zusammen aus den isotropen und anisotropen Anteilen nach:

$$\bar{A} = a \cdot \bar{1} + A' \quad \text{mit } \bar{1} \text{ als Einheitsmatrix}$$

Der Kern-Zeeman-Operator \hat{H}_{kz} gibt die Wechselwirkung zwischen äußerem Magnetfeld und dem Kern-Spin an:

$$\hat{H}_{kz} = g_n \cdot \mu_n \cdot \vec{H} \cdot \vec{I}$$

μ_n : Kernmagneton

g_n : Kern-g-Faktor

Für ein ungepaartes Elektron in einem atomaren System ergibt sich somit für den Spin-Hamilton-Operator:

$$\hat{H} = \hat{H}_{ZE} + \hat{H}_{hfs} - \hat{H}_{kz}$$

Bei biochemischen Metallionen-Komplexen mit $S > 1/2$ spielt häufig die Nullfeldaufspaltung eine wesentliche Rolle. Sie wird beschrieben durch den Hamilton-Operator \hat{H}_{nf} :

$$\hat{H}_{nf} = \vec{S} \cdot \bar{D} \cdot \vec{S}$$

Die Nullfeldaufspaltung muss zum Spin-Hamilton-Operator addiert werden. Der Tensor \bar{D} gibt die Wirkung der Liganden auf das Metallion an, die in biochemischen Komplexen oft sehr viel stärker ist als die Wirkung des äußeren Magnetfeldes. Die Hauptachsen sind dann durch die Anordnung der Liganden gegeben. Der Tensor \bar{D} wird symmetrisch mit der Spur $(D)=0$ und der Hamilton-Operator kann in folgender Weise geschrieben werden:

$$\hat{H}_{nf} = D \cdot [S_z^2 - 1/3 \cdot S \cdot (S + 1)] + E \cdot (S_x^2 - S_y^2)$$

Dabei ist D die axiale Aufspaltungskonstante und E die rhombische, mit:

$$D = D_z - 1/2 \cdot (D_x + D_y)$$

$$E = 1/2 \cdot (D_x - D_y)$$

Üblicherweise wählt man die Achsen so, dass der axiale Term der dominante ist. Das Ligandenfeld hebt die Entartung der Energieniveaus auf und damit zumindest teilweise auch die Wirkung des Bahn-Drehimpulses. Ist zudem die Differenz zwischen dem energetisch tiefsten Niveau, dem Grundniveau, und den höheren Niveaus größer als die Energie der eingestrahlten Mikrowelle, so erfolgt der ESR-Übergang nur innerhalb des Grundniveaus. Das System hat einen fiktiven Spin $S=1/2$ und der g-Faktor liegt im Bereich des Wertes des freien Elektrons. Vielfach bleibt in biochemischen Systemen eine geringe Wechselwirkung der höheren Energieniveaus mit dem Grundniveau bestehen. Dies führt zu einem Beitrag des Bahn-Drehimpulses zum Spinnmoment, der stark von der Richtung des Kristallfeldes abhängig ist. Analog der g-Faktor-Anisotropie variiert der beobachtete g-Faktor, der effektive g-Faktor, mit der Richtung des äußeren Magnetfeldes.

Die Energieniveaus eines „high-spin“ Eisens mit $S=5/2$ kann man in einem streng axialem System angeben mit:

$$H_{(zero)} = D \cdot (S_z^2 - 35/12) \quad \text{mit } E = 0$$

Diese Gleichung beschreibt ein System, wie man es z.B. im „high-spin“ Ferri-Hämoglobin findet. Wählt man das Magnetfeld parallel zur Hauptachse z, ergibt sich für die einzelnen Energieniveaus eine Aufspaltung, wie sie in Abb.5 gezeigt ist.

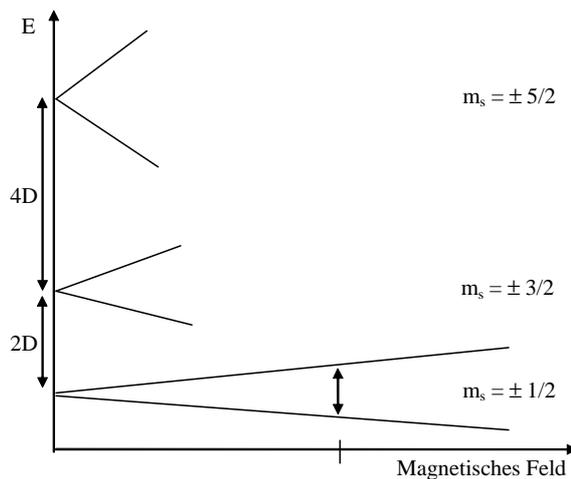


Abb.5: Aufspaltung der Energieniveaus eines „high-spin“-Ferri-Hämoglobins in einem axialen Feld mit den möglichen Resonanzübergängen. Die einzelnen Energieniveaus stellen die Kramer-Dubletts dar

Die durch das Magnetfeld erzeugten Aufspaltungen der Energieniveaus, zwischen denen Resonanzübergänge stattfinden können, werden Kramer-Dubletts genannt. Für das „high-spin“ Ferri-Hämoglobin ist D mit $D=0,7\text{cm}^{-1}$ sehr viel größer als die eingestrahlte Mikrowelle (für X-Band: $h\nu=0,3/\text{cm}$) [GAFFNEY, 1993]. Der Resonanzübergang erfolgt damit nur im unteren Kramer-Dublett (Abb.5), das System hat einen fiktiven Spin $S=1/2$. Wegen der starken Anisotropie, die durch die Wirkung des Ligandenfeldes im Hämoglobin erzeugt wird, ist der effektive g -Faktor anisotrop, mit $g_{\perp}=5,9$ und $g_{\parallel}=2$. Abb.6 zeigt ein typisches „high-spin“-Ferri-Hämoglobin ESR-Spektrum, aufgenommen bei 4K.

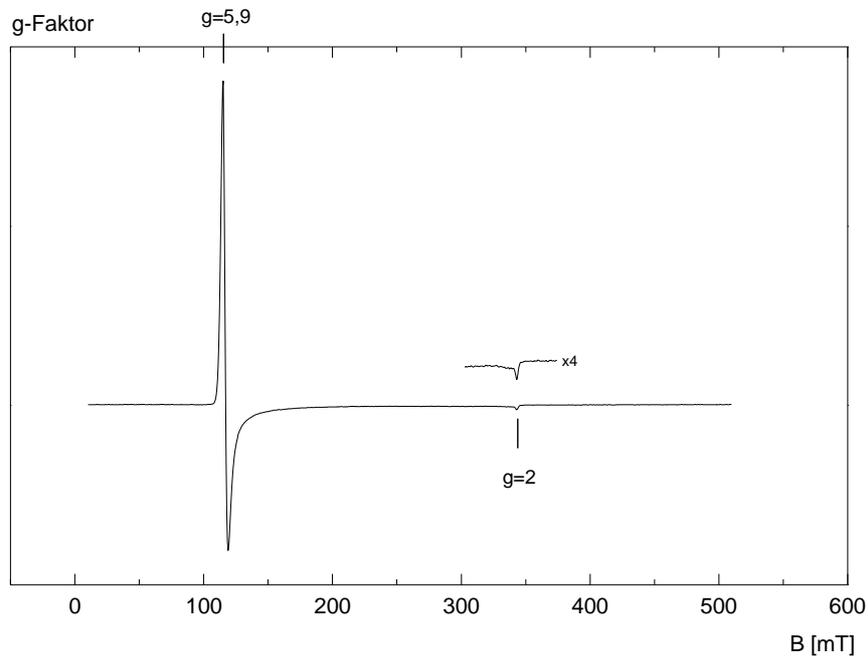


Abb.6: ESR-Signal von Ferri-Hämoglobin, Sweep Time=671s, Time const.=655ms, Mod. Ampl.=0,8mT, 18,6mW, 4K

Für ein maximal rhombisches System ist E ungleich Null und es gilt $E/D=1/3$. Das resultierende Signal hat den g -Faktor $g=4,3$. Der Resonanzübergang erfolgt hierbei im mittleren Energie-Niveau, dem mittlerem Kramer-Dublett. GAFFNEY [1993] hat die effektiven g -Faktoren (g_x, g_y, g_z) in Abhängigkeit von E/D für ein $S=5/2$ System berechnet. Die folgende Abb.7 zeigt das g -Faktor-Verhalten der einzelnen Kramer-Dubletts. Die Nummern 1 bis 6 repräsentieren die Energieniveaus (siehe Abb. 5), die Resonanzwahrscheinlichkeiten für die Übergänge sind durch Zahlen angegeben, wobei hohe Zahlen höhere Resonanzwahrscheinlichkeiten repräsentieren. Die zugehörigen g -Faktoren sind an der linken Ordinate angegeben.

Man erkennt in Abb.7, dass das obere Kramer-Dublett („5 to 6“) keine signifikante Resonanzwahrscheinlichkeit hat und somit kein Signal liefert. Die Resonanzwahrscheinlichkeit für das mittlere Kramer-Dublett („3 to 4“) ist für ein

rhombisches System mit $E/D=1/3$ am höchsten, der g-Faktor beträgt dabei $g = 4,3$. Im Fall eines rein axialen Systems mit $E/D=0$ liefert das untere Kramer-Dublett („1 to 2“) ein Signal bei $g=6$ und $g=2$, die Resonanzwahrscheinlichkeit des mittleren Kramer-Dubletts ist hierbei 0. Das Signalverhalten eines Fe(III) $S=5/2$ Systems ist also stark vom Verhältnis E/D und damit von der Anordnung und Art der Liganden abhängig. In Abb.8 ist das Verhalten des Signals und der Signalintensität des unteren Kramer-Dubletts eines Fe(III) „high-spin“ Systems im unteren Feldbereich ($g=6$ bis $g=10$) in Abhängigkeit von E/D gezeigt, wie sie von YANG [1987] berechnet wurde.

Bei konstanter Spinkonzentration ist die höchste Signalintensität in einem axialen System mit $E=0$ gegeben. Dies entspricht der in Abb.7 berechneten Übergangswahrscheinlichkeit des unteren Kramer-Dubletts („1 to 2“). Mit zunehmender rhombischer Komponente ($E/D\approx 1/3$) nimmt die Übergangswahrscheinlichkeit und damit die Signalintensität im unteren Kramer-Dublett ab, es kommt zu einer Verschiebung des Signals in einen Bereich von $g=9$ [YANG, 1987]. Gleichzeitig nimmt die Übergangswahrscheinlichkeit im mittlerem Kramer-Dublett zu (Abb.7) und man erhält einen zusätzlichen Signalbeitrag bei $g=4,3$ (nicht gezeigt in Fig. 8).

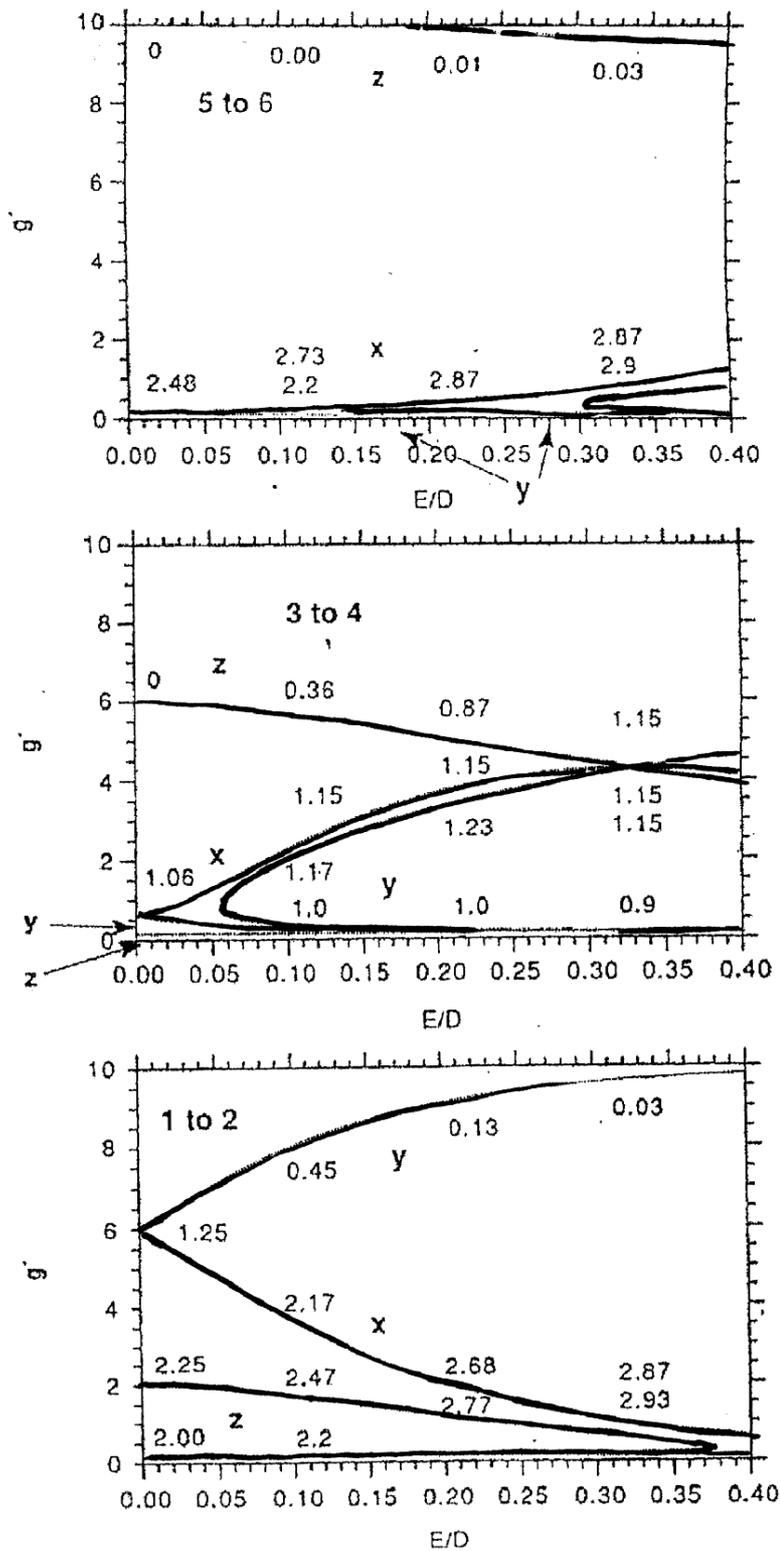


Abb.7: Errechnete effektive g -Faktoren der einzelnen Kramer-Dubletts in Abhängigkeit von E/D mit $D = 2 \text{ cm}^{-1}$; die berechnete Übergangswahrscheinlichkeiten sind durch die Zahlen repräsentiert [Gaffney, 1993]

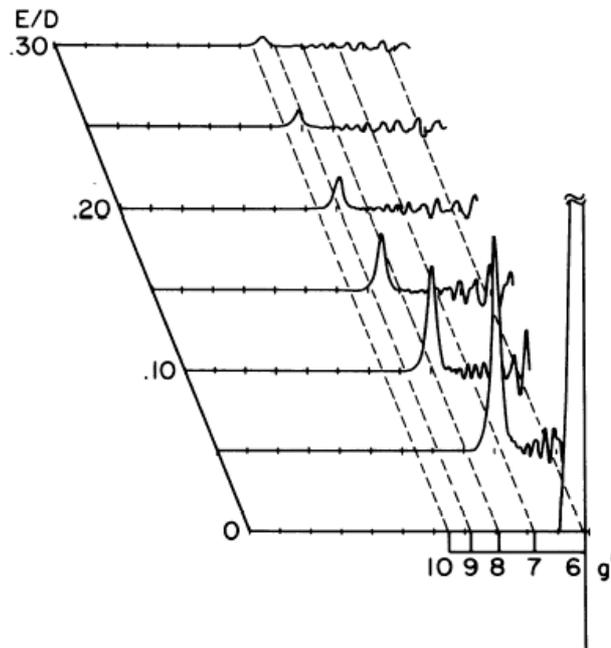
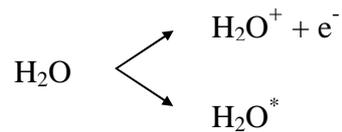


Abb.8: Signalverhalten des unteren Kramer-Dublett eines Fe(III) „high-spin“-Systems in Abhängigkeit von E/D im unteren Magnetfeldbereich (i.e. $g=6$ bis 10). Die Spin-Konzentration ist normiert, $D = 2,0 \text{ cm}^{-1}$ [YANG, 1987]

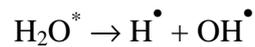
3.5 GRUNDLAGEN DER STRAHLENCHEMIE

Da in dieser Arbeit auch Röntgenstrahlen zur Erzeugung bzw. Auslöschung paramagnetischer Zentren eingesetzt wurden, soll kurz auf die wesentlichen Prozesse eingegangen werden, die sich bei der Absorption von Strahlungsenergie in wässrigen Lösungen abspielen. Die Ausführungen beziehen sich dabei auf gängige Lehrbücher und Übersichtsartikel [z.B. SYMONS, 1982].

Bei der Wechselwirkung ionisierender Strahlung mit Wasser entstehen im Wesentlichen drei primäre Radiolyseprodukte: hydratisierte Elektronen e_{aq}^- , Hydroxyl-Radikale OH^\bullet und Wasserstoffatome H^\bullet . Ihre Bildung wird nachfolgend beschrieben. Durch Absorption der Strahlungsenergie wird zunächst Wasser ionisiert oder angeregt:

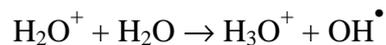


Das angeregte Wassermolekül (H_2O^*) kann in den Grundzustand relaxieren oder durch homolytischen Bindungsbruch in H^\bullet und OH^\bullet zerfallen:



Diese Radikale besitzen eine hohe Mobilität und Reaktivität und reagieren mit anderen Molekülen oder rekombinieren zu molekularen Folgeprodukten (H_2O , H_2 , H_2O_2).

Das H_2O^+ - Kation ist äußerst kurzlebig und reagiert mit Wassermolekülen nach folgender Gleichung:

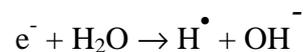


Diese Reaktion stellt den hauptsächlichen Bildungsmechanismus von Hydroxyl-Radikalen dar.

Wegen ihrer hohen Energie sind die strahlungserzeugten primären Elektronen zunächst in der Lage, weitere Wassermoleküle in ihrer Umgebung zu ionisieren. Wenn ihre Energie abgesunken ist, findet entweder Hydratisierung



oder eine weitere Reaktion mit Wassermolekülen statt:



Das hydratisierte Elektron (e^-_{aq}) hat selbst bei Raumtemperatur eine relativ lange Lebensdauer von ca. 10^{-3} s. Die Ausbeute der Radiolyseprodukte wird über den G-Wert messbar, der durch die folgende Gleichung definiert ist:

$$G = \frac{\text{Anzahl der Produkte}}{100 \text{ eV absorbiertes Strahlungsenergie}}$$

Bei Raumtemperatur und pH=7 nimmt der G-Wert der Radiolyseprodukte des Wassers folgende Werte an:

$$G(e^-)=2,6 \quad G(OH^\bullet)=2,6 \quad G(H^\bullet)=0,6$$

Bei Temperaturen von 77 K sind die G-Werte deutlich kleiner und betragen:

$$G(e^-)=0,0002 \quad G(OH^\bullet)=0,2-0,8.$$

Das bedeutet, es werden unter diesen Bedingungen fast nur OH^\bullet stabilisiert. Bei genügend großer Reichweite können die Radiolyseprodukte mit den im Wasser enthaltenen Proben reagieren.

Zu berücksichtigen ist auch ein direkter Strahleneffekt an den Proben, der ganz allgemein nach folgender Gleichung beschrieben werden kann:



Die im Wasser und in der Probe erzeugten Elektronen (e^-) sind auch in gefrorenen Lösungen sehr mobil und besitzen Reichweiten bis zu 100Å. Sie können also mit Substratmolekülen reagieren.

3.6 ESR-AKTIVE METALLOPROTEINE IM BLUT

3.6.1 HÄMOGLOBIN

Den Hauptanteil der für die ESR-Spektroskopie wichtigen Metalloproteine im Blut liefert das Hämoglobin. Adultes menschliches Hämoglobin besteht aus vier paarweise identischen Polypeptidketten, den so genannten α -Ketten und β -Ketten, die jeweils eine prosthetische Gruppe enthalten. Diese wird als Häm-Gruppe bezeichnet und setzt sich aus Protoporphyrin IX und einem Eisen-(II)-Ion zusammen. Das Protoporphyrin IX wird aus 4 Pyrrolringen gebildet, die über Methin-Brücken miteinander verbunden sind. Dieses konjugierte Ringsystem weist einen hohen Grad

an Resonanzstabilisierung auf und bildet leicht Komplexe mit Übergangsmetallen. Das Eisen(II)-Ion wird in der Mitte ringförmig in einer Ebene mit den Pyrrolringen eingeschlossen. Die Bindungspartner des Eisen(II)-Ions sind die vier Stickstoffatome der Pyrrolringe (Abb.9). Die Bindung erfolgt über die „van der Waals-Wechselwirkung“ [LÖFFLER 1988].

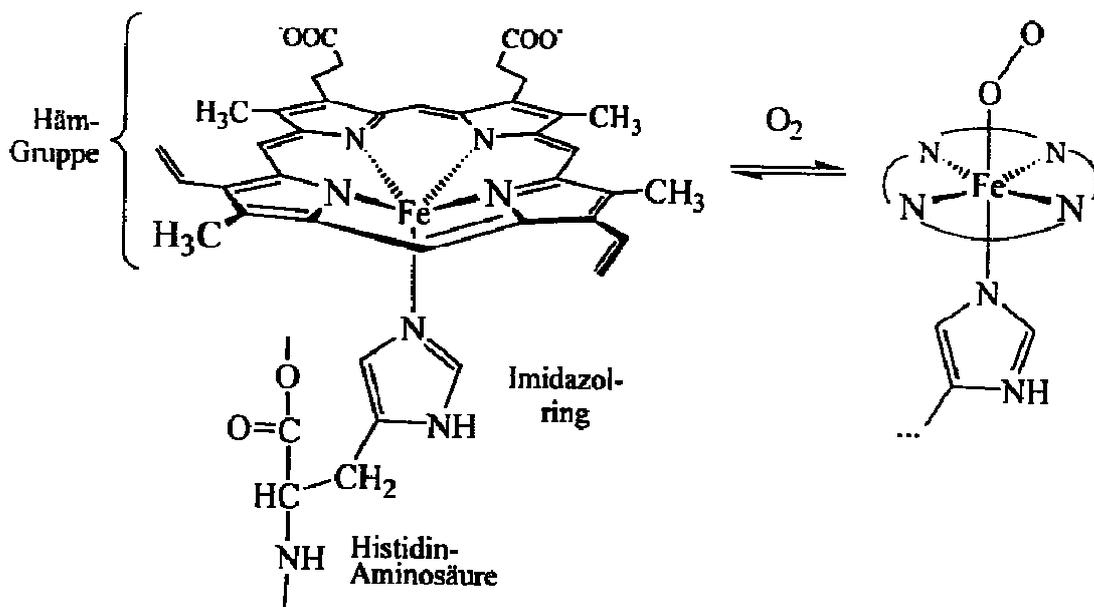


Abb. 9: Pyrrolring der Häm-Gruppe mit einem in der Häm-Ebene gebundenem Fe(II)-Atom. Schematische Bindung von molekularem Sauerstoff an die 6. Koordinationsstelle des Fe(II) [LÖFFLER, 1988]

Die fünfte Koordinationsstelle, senkrecht zur Häm-Ebene wird vom proximalen Histidin besetzt. Hier ist das Fe(II)-Ion kovalent mit dem Histidin gebunden. Über die sechste Koordinationsstelle, wiederum senkrecht zur Häm-Ebene, werden externe Liganden angelagert und hier vor allem molekularer Sauerstoff. Jede der vier Untereinheiten des Hämoglobins kann ein Sauerstoffmolekül am Fe(II)-Ion der Häm-Gruppe binden [HO CHIEN, 1982], wobei sich dabei die Wertigkeit des Fe(II)-Ions nicht verändert. Die Bindung eines Sauerstoffmoleküls an eine Häm-Gruppe führt zu beträchtlichen Veränderungen der Tertiär- und Quartärstruktur der Polypeptidkette

und beeinflusst darüber hinaus durch Änderung der Konfiguration das Bindungsverhalten der restlichen Untereinheiten. Durch diese als kooperatives Verhalten bezeichnete Eigenschaft wird die Bindung nachfolgender Sauerstoffmoleküle erleichtert.

Das Häm-Eisen kann, je nach Ligand, in der Fe(II)- und der Fe(III)-Oxidationsstufe (Methämoglobin oder Ferri-Hämoglobin) vorliegen. Unter Beteiligung starker Oxidationsmittel (z.B. H_2O_2) ist sogar die Bildung eines Fe(IV)-Hämoglobins (Ferryl-Hb) nachgewiesen worden [SVISTUNENKO, 1997]. Allerdings ist nur das Fe(II)-Hämoglobin in der Lage, Sauerstoffmoleküle zu binden. Bereits durch die Ummantelung mit der Polypeptidkette wird die Häm-Gruppe abgeschirmt, um die Oxidationsrate zu Ferri-Hämoglobin zu erschweren. Die Anlagerung von O_2 kann zu einer partiellen, geringfügigen Oxidation des Fe(II)-Hämoglobins (Autooxidation) führen [RACHMILEWITZ, 1971; KANNER, 1985]. Daher besitzen die Erythrozyten das Enzym Methämoglobinreduktase, das intrazellulär entstandenes Ferri-Hämoglobin (Methämoglobin) wieder in Fe(II)-Hämoglobin umwandelt, so dass unter physiologischen Bedingungen die Ferri-Hämoglobin-Konzentration nur 1-2% beträgt [LÖFFLER, 1988].

Eisen gehört zu den Übergangsmetallen und besitzt fünf d-Orbitale in der äußeren Schale. Durch die Nullfeldaufspaltung (Wechselwirkung mit umliegenden Liganden) wird die Entartung der 3d-Orbitale aufgehoben (siehe S.22ff.). Wenn die Differenz zwischen den Energie-Niveaus nur gering ist, können die 3d-Orbitale maximal einfach mit Elektronen belegt werden. Das Eisen erhält den größt möglichen Spin und man spricht vom „high-spin“-Zustand. Führt die Wechselwirkung mit der Umgebung zu einer großen Auftrennung der Energie-Niveaus, so werden die 3d-Orbitale maximal doppelt besetzt. Es liegt ein „low-spin“-Zustand vor, mit dem kleinst möglichen Spin [INGRAM, 1969; SWARTZ, 1972].

Das für die Sauerstoffbindung benötigte Fe(II)-Hämoglobin mit dem zweiwertigen Eisen besitzt 6 d-Elektronen und kann somit im Spin-Zustand $S=2$ („high-spin“) oder $S=0$ („low-spin“) vorliegen. Nur der „high-spin“-Zustand mit $S=2$ ist paramagnetisch wirksam. Allerdings führt hier die Nullfeldaufspaltung zu Energieniveaus, deren Differenz größer ist als die Energie der eingestrahlten Mikrowelle. Selbst wenn die Differenz der Energieniveaus kleiner und somit eine Resonanz möglich wäre, führt die extrem kurze Relaxationszeit doch zu einer zu starken Verbreiterung des Signals.

Damit ist der Fe(II)-„high-spin“-Hämoglobin-Zustand mit der ESR-Spektroskopie nicht ohne weiteres zu beobachten.

Dagegen besitzt das Ferri-Hämoglobin mit fünf d-Elektronen eine ungerade Anzahl mit einem Spin $S=5/2$ im „high-spin“-Zustand. Durch die starke Nullfeldaufspaltung wird die Entartung der 3d-Orbitale aufgehoben. Die Differenz der Energie-Niveaus ist größer als die Energie der eingestrahlten Mikrowelle, so dass nur Resonanzübergänge im Grundniveau möglich sind. Somit liegt hier ein fiktiver Spin $S=1/2$ vor, der zur Ausbildung des charakteristischen Ferri-Hämoglobin „high-spin“ Signals mit $g_{\perp}=5,9$ und $g_{\parallel}=2$ führt [GERSONDE, 1964; PALMER, 1983; GAFFNEY, 1993]. Unter physiologischen Bedingungen kann also nur ein geringer Anteil des Gesamt-Hämoglobins (max. 1-2%) zur Signalintensität beitragen. Das typische ESR-Spektrum von Ferri-Hämoglobin und das zugehörige Energieniveau-Schema sind in Abb.5 und 6 des Kap. 3.4.4 gezeigt.

3.6.2 KATALASE

Aerobe Organismen benötigen molekularen Sauerstoff zur Energiegewinnung, eukaryote Zellen erzeugen aus Sauerstoff und Wasser energiereiche Phosphate. Da molekularer Sauerstoff durch seine Elektronenkonfiguration eine hohe oxidative Potenz besitzt, wird er im normalen Stoffwechsel durch Enzyme (Katalase, Peroxidase) über mehrere Schritte zu H_2O reduziert. In diesen Stoffwechselprozessen entstehen als unerwünschte Nebenprodukte zu 1 bis 2% hoch reaktive Sauerstoffspezies wie das Hydroxid-Radikal (OH^{\bullet}), das Superoxid-Radikal ($O_2^{\bullet-}$), oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Diese kurzlebigen Radikale und Produkte reagieren sofort weiter und können am Entstehungsort Schäden verursachen (z.B. DNA-Schäden, Zellwandschäden) oder aber Radikal-Kettenreaktionen auslösen, die zur Bildung länger lebiger Radikale führen (Lipidperoxidation, Ascorbin-Radikal-Bildung) [BULKLEY, 1983]. Nachfolgende Gleichungen verdeutlichen schematisch die Bildung der Sauerstoffradikale:



Diese Reaktionsprodukte sind für die Zelle toxisch. Gerade Erythrozyten sind wegen der hohen Konzentration an gebundenem und frei gelöstem Sauerstoff im hohen Maße durch die Bildung von Sauerstoffradikalen gefährdet. Zur Protektion besitzen die Erythrozyten eine Reihe von Enzymen, die entstehende Sauerstoffradikale abfangen. Neben der Superoxiddismutase, einem kupferhaltigen Enzym, dessen Konzentration im Erythrozyten ca. 20mmol/l beträgt, kommt die Gruppe der Hydroperoxidasen mit den Enzymen Peroxidase und Katalase vor. Beide Enzyme besitzen Häm als prosthetische Gruppe und reduzieren H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff.

Das Schema in Abb.10 verdeutlicht die möglichen Reaktionswege mit den beteiligten Enzymsystemen.

Während die Peroxidase für diese Reaktion andere Substanzen als Protonendonatoren benötigt, zeigt die Katalase in Abhängigkeit vom jeweiligen Substratangebot Peroxidaseaktivität, kann aber auch mit Wasserstoffperoxid als Protonendonator reagieren.

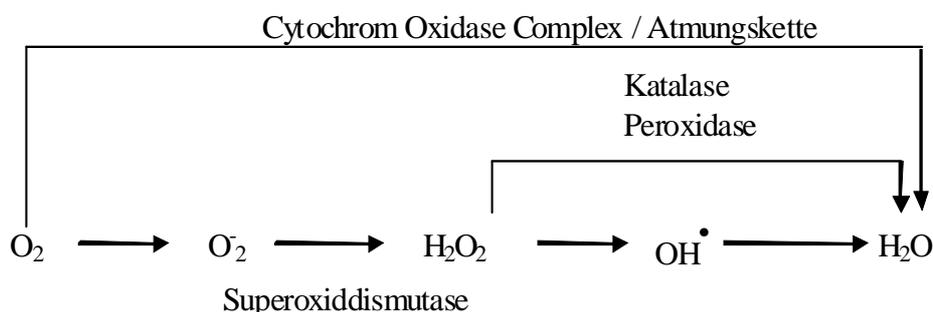
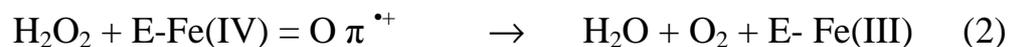
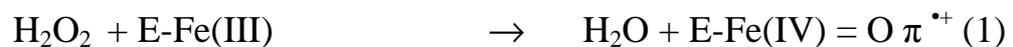


Abb.10.: Reaktionswege des Sauerstoffmoleküls mit den beteiligten Enzymsystemen [BULKLEY, 1983]

Der Reaktionsweg der Katalase erfolgt hierbei in mehreren Schritten [HEWSON, 1979; JOUVE, 1997]. Im ersten Schritt findet eine 2 Elektronen Oxidation der Katalase durch H_2O_2 statt. Dabei wird Wasser und als Zwischenprodukt ein Oxoferryl-Radikal Kation ($\text{E-Fe(IV) = O } \pi^{\bullet+}$) gebildet. Dieses wird allgemein als „Compound I“ bezeichnet. In einem zweiten Schritt reagiert „Compound I“ sofort weiter und wird über eine 2 Elektronen Reduktion mit H_2O_2 unter Bildung von Wasser und Sauerstoff in den Ausgangszustand zurückgeführt.

Nachfolgende Gleichungen zeigen schematisch den Reaktionsweg:



Die Katalase ist ein Tetramer mit einem Molekulargewicht von 220 bis 350 kDa. In den vier identischen Untereinheiten ist jeweils eine Häm-Gruppe als prosthetische Gruppe gebunden [VAINSHTEIN, 1986]. Die Häm-Gruppe ist tief in der Domäne eingebettet, die einzelnen Häm-Gruppen sind deutlich voneinander getrennt. Bei der Reaktion mit Wasserstoffperoxid und dem dabei erfolgten Elektronentransport sind die benachbarten Aminosäuren mit beteiligt. Die katalytische Aktivität der Katalase ist mit 200×10^3 katalytischen Einheiten pro Sekunde sehr hoch. Die Katalase der einzelnen Spezies (Tiere, Pflanzen und Mikroorganismen) unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung und Funktion nur wenig voneinander [GOLDBERG, 1989].

Da die prosthetische Gruppe der Katalase eine Häm-Gruppe mit dreiwertigem Fe-Ion enthält und damit paramagnetisch aktiv ist, konnten ESR-Untersuchungen an isolierten Enzymen zur Aufklärung der Struktur und der Reaktionswege durchgeführt werden [BLUMBERG, 1971; WILLIAMS-SMITH und MORRISON, 1975; WILLIAMS-SMITH und PATEL, 1975; BLUM, 1978; JACOB, 1979; MANDON, 1992]. Isolierte Katalase unterschiedlicher Herkunft liefert jeweils ein aus zwei Komponenten (breite (B) und schmale (A) Signalkomponente) zusammengesetztes rhombisches „high-spin“-Fe(III) Signal mit $g_x \approx 6,5$, $g_y \approx 5,3$ und $g_z \approx 2$. Die beiden Signalgruppen sind aber nicht Folge einer Hyperfein-Aufspaltung, sondern werden durch unterschiedliche paramagnetische Eigenschaften ansonsten identischer Häm-

Gruppen verursacht. Dies wird durch das Verhalten der ESR-Signale unter dem Einfluss chemischer Reaktionspartner deutlich [GARY, 1979]. Durch Reaktion mit bestimmten niedrigmolekularen Substanzen kann in Abhängigkeit des Reaktionspartners die eine Signalkomponente in die andere konvertiert werden [WILLIAMS-SMITH und PATEL, 1975], oder es resultiert ein einzelnes rhombisches Signal mit leicht abweichenden g-Faktoren [JACOB, 1979]. Bei Untersuchungen an der Katalase der Leber konnte eine Konversion der schmalen Signalkomponente in die breite Signalkomponente durch Senkung des pH-Werts erreicht werden [BLUM, 1978]. Die gleiche Veränderung wurde unter anaeroben Bedingungen der Leber beobachtet [WILLIAMS-SMITH und MORRISON, 1975]. Demgegenüber besteht das ESR-Signal der Katalase aus frisch entnommenem menschlichem Blut hauptsächlich aus der schmalen Signalkomponente und verändert sich unter anaeroben Bedingungen nicht (z.B. Lagerung bis 48h bei 4°C) [WILLIAMS-SMITH und MORRISON, 1975]. Der genaue Mechanismus der Änderung der lokalen Umgebung des Fe(III)-Ions, die zur Ausbildung unterschiedlicher ESR-Signale führt ist noch nicht genau geklärt, allerdings scheint die katalytische Aktivität nicht von der Signalkomponente abhängig zu sein [BLUM, 1978]. Ein typisches ESR-Signal der Leber-Katalase bei 4K ist in Abb.11 dargestellt, wobei die beiden Signale unterhalb 100mT nicht mit der Häm-Gruppe der Katalase verknüpft sind.

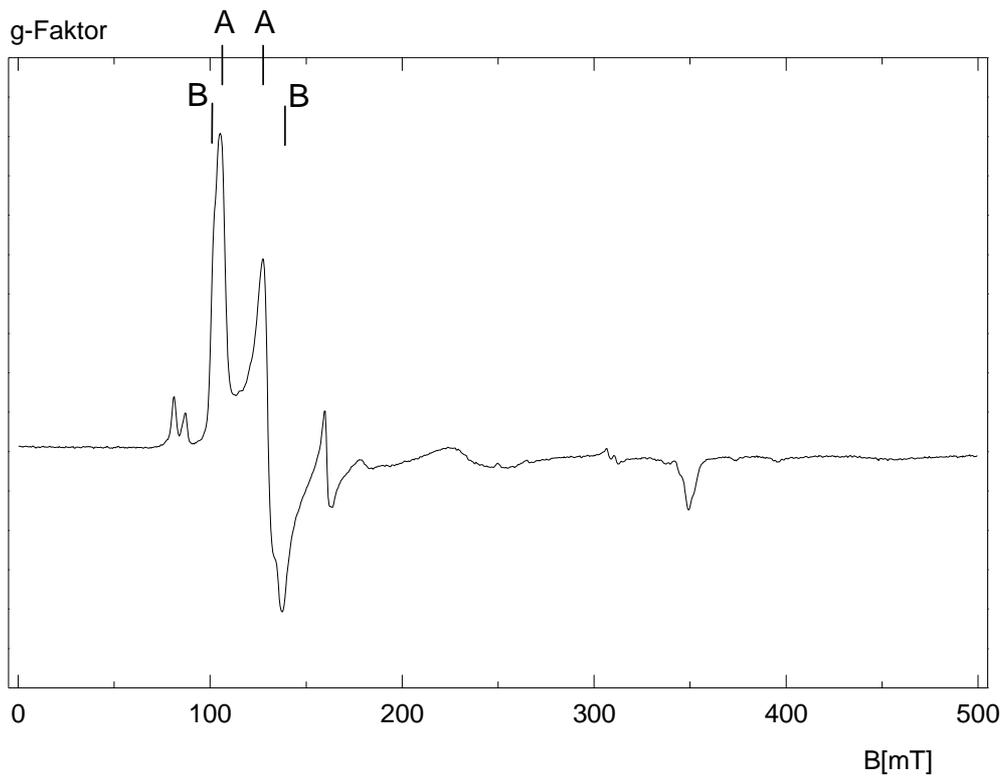


Abb.11: ESR-Signal der Leber-Katalase, 4K, A: schmale Signalkomponente, B: breite Signalkomponente (überlassen von P.-P. Schmidt, Biophysik Homburg/Saar)

3.6.3 TRANSFERRIN

Transferrin ist ein Glycoprotein aus 700 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 79,5 kDa, das aus zwei ähnlichen, aber nicht identischen Domänen besteht. In Abb.12 ist die schematische Struktur des Transferrins mit 2 angelagerten Eisenatomen am N-terminalen und am C-terminalen Ende abgebildet [FLETCHER, 1968; PRICE, 1972; PRINCIOTTO, 1975; SADLER, 1997].

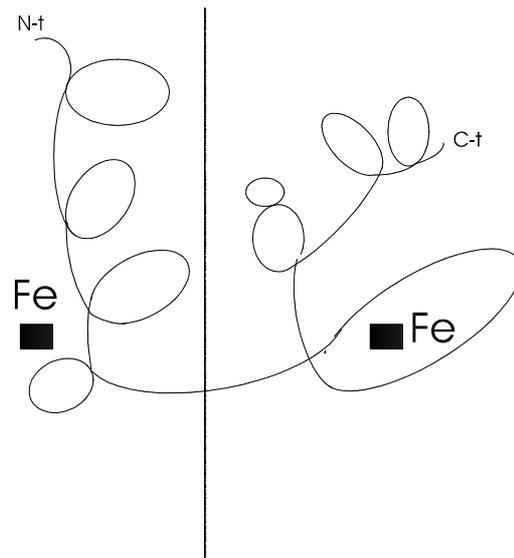


Abb.12: Schematische Darstellung der Polypeptidkette eines menschlichen Transferrinmoleküls [HUEBERS, 1984]

Abb.13 zeigt die räumliche Anordnung der Liganden an der Eisenbindungsstelle der N-terminalen Domäne von Transferrin. Die Zahlen in Klammern beziehen sich auf die entsprechenden Aminosäuren der C-terminalen Domäne. Das Fe(III)-Ion ist von zwei Tyrosin-, einer Histidin- und einer Aspartatgruppe umgeben und wie in einer Tasche eingefasst. Zusätzlich ist die Anlagerung des Bicarbonats als „synergistisches Anion“ dargestellt. Pro Molekül Transferrin werden zwei Fe(III)-Ionen gebunden, wobei nur der „Diferric-Transferrin-Komplex“ an den spezifischen Rezeptor der Zelle bindet. Durch Endocytose wird der „Diferric-Transferrin-Rezeptor-Komplex“ in die Zelle aufgenommen. Innerhalb der Vakuole sinkt der pH-Wert von 7,4 (extrazellulär) auf ca. 5,5, wodurch die beiden Eisenatome abgegeben werden. Der entstandene „Apotransferrin-Rezeptor-Komplex“ bleibt bestehen und wird an die Zellmembran transportiert. Die Erhöhung des pH-Werts auf den extrazellulären Wert von 7,4 führt schließlich zur Dissoziation des Komplexes, das Apotransferrin wird in den Kreislauf freigegeben [SADLER, 1997].

Durch Röntgenbeugungs-Analysen an Lactoferrin-Kristallen, einem dem Transferrin verwandten Eisenbindungsprotein, konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme und Abgabe der Eisen-Atome mit einer Konformationsänderung der jeweiligen Domäne verbunden ist. Dabei führt eine Protonierung und Deprotonierung zweier benachbarter Lysine (Lys 209 – Lys 301) zu einer Rotation innerhalb der

N-terminalen Domänen und damit zum Öffnen und Schließen der Eisenbindungsstelle. In der C-terminalen Domäne ist eine ähnliche Stelle nachgewiesen worden (Gln541-Lys 638). Somit könnte hier eine pH-abhängige Triggerung der Eisenaufnahme und Eisenabgabe vorliegen (Abb.14) [SADLER, 1997; HOGZHE; 1997]. Die Bindungskonstante der C-terminalen Domäne ist für das Fe(III) bei einem pH-Wert von pH=7,4 etwa 20 Mal stärker als die der N-terminalen [AASA, 1963]. Die Abgabe des Eisenatoms erfolgt an der N-terminalen Domäne bei pH=5,7, an der C-terminalen bei pH=4,8. Die Eisenaufnahme der beiden Domänen ist dabei unabhängig voneinander. Die Bindung von Eisen an die spezifische Bindungsstelle des Transferrins vollzieht sich nur in Anwesenheit eines Anions, dem „synergistischen Anion“, so dass man von einem Fe(III)-Transferrin-Anionen-Komplex (Fe(III)-Tf-Anion) sprechen muss [BATES, 1971; 1975]. Unter physiologischen Bedingungen dient ein Carbonat-Anion als Partner. Das Carbonat-Anion kann aber durch eine Reihe weiterer Anionen ersetzt werden, wobei sich das typische ESR-Spektrum des Eisen-Transferrins ändert.

DUBACH [1991] untersuchte die ESR-Spektren der Fe(III)-Tf-Anionen-Komplexe in Abhängigkeit von unterschiedlichen Anionen-Typen. Die Abb.15 zeigt schematisch die in dieser Studie vorgeschlagene Anionenbindung an das Fe(III)-Ion. Jeweils zwei Carboxylgruppen bzw. eine Carboxylgruppe und eine weitere polare Gruppe stellen die Liganden für das Eisenatom. Eine Carboxylgruppe bildet zusätzlich eine Art Brücke zu den positiven Ladungen des Proteins. In Abb.15 ist bereits erkennbar, dass sich die Art der Ligandierung des Fe(III)-Ions unterscheidet. Die unterschiedlichen Liganden beeinflussen die paramagnetischen Eigenschaften des Fe(III)-Ions, so dass die ESR-Spektren in Abb.16 für verschiedene Liganden-Typen deutlich differieren und als Modellsubstanzen für unterschiedliche Kristallfeld-Symmetrien dienen können. Das Spektrum von Fe(III)-Tf-Nitrilotriacetat stellt ein rein rhombisches System mit $E/D=1/3$ dar.

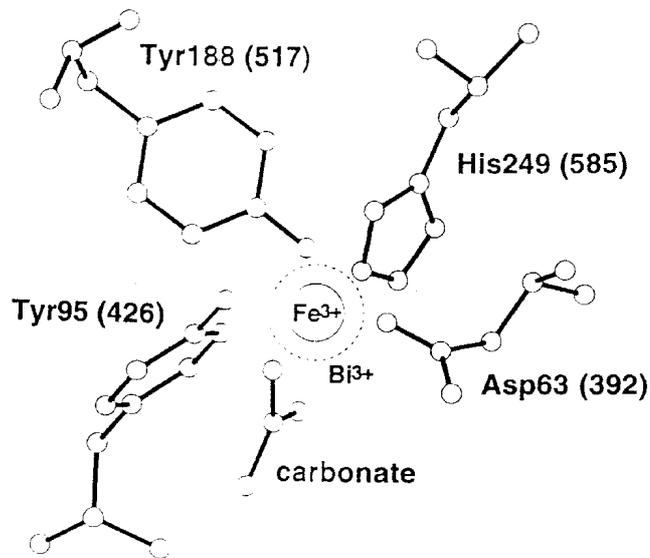


Abb.13: Modell der N-terminalen Domäne der Metallbindungsstelle des humanen Serumtransferrins. Die Nummern in Klammern beziehen sich auf die entsprechende C-terminale Domäne, Bi^{3+} entspricht dem Bicarbonat [HONGZE, 1997]

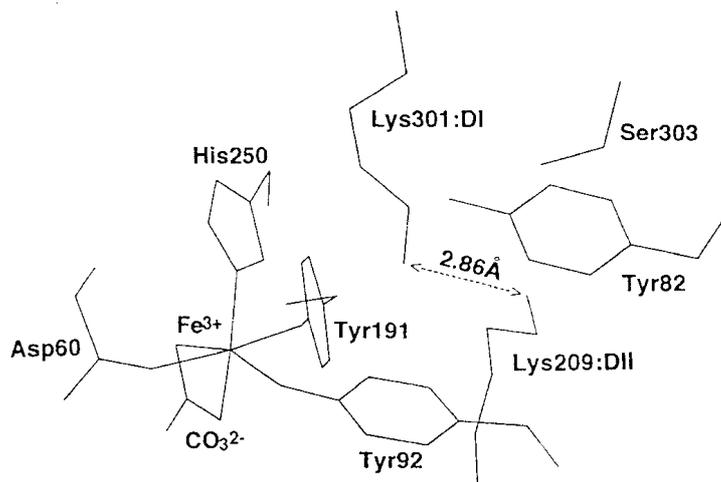


Abb.14: Schematische Darstellung des Triggers der beiden Lysine (Lys 301, Lys 209) am Ovotransferrin. Protonierung in diesem Bereich führt als Trigger zum Öffnen der „Tasche“ und zur Eisenabgabe [HONGZE, 1997]

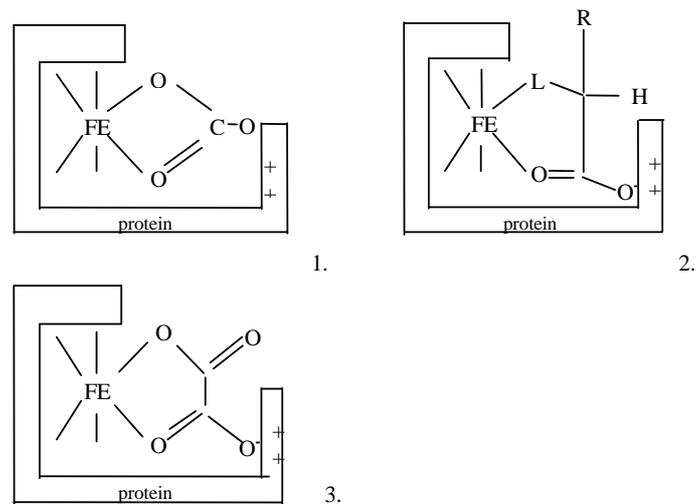


Abb.15: Modelle des Eisen-Transferrin-Anionen-Komplexes, mit verschiedenen Anionengruppen: 1: Fe(III)-Tf-Carbonat, 2: Fe(III)-Tf-Carboxylat mit einer OH-, Keto oder Amino-Gruppe (-L-) und zusätzlich einer polaren Gruppe (-R), 3: Fe(III)-Tf-Dicarboxylat [Dubach, 1991]

Die Resonanzübergänge erfolgen hier nur im mittleren Kramer-Dublett (Spektrum 1 in Abb.16). Fe(III)-Tf-Thioglycolat ist ein nicht ganz rhombisches System mit $E/D \leq 1/3$, man erhält auch Resonanzwahrscheinlichkeiten im unteren Kramer-Dublett mit einem schwachen Signal bei $g=9$ (Spektrum 2 in Abb.16). Fe(III)-Tf-Oxalat und - Malonat zeigen ein zunehmend axiales System mit dem Verhältnis E/D zwischen 0 und $1/3$ (Spektrum 3+4). Man erkennt einen zunehmend stärkeren Beitrag des unteren Kramer-Dubletts im Bereich $g=6$, während die Resonanzwahrscheinlichkeit im mittlerem Kramer-Dublett bei $g=4,3$ abnimmt. Insbesondere Fe(III)-Tf-Oxalat dient als Modellschubstanz für ein Fe(III)-„high-spin“-System mit $0 < E/D < 1/3$, und liegt in der Symmetrie zwischen einem rein axialem System, wie dem Ferri-Hämoglobin, und einem nahezu rein rhombischem System, wie dem Fe(III)-Transferrin-Bicarbonat [AISEN, 1972].

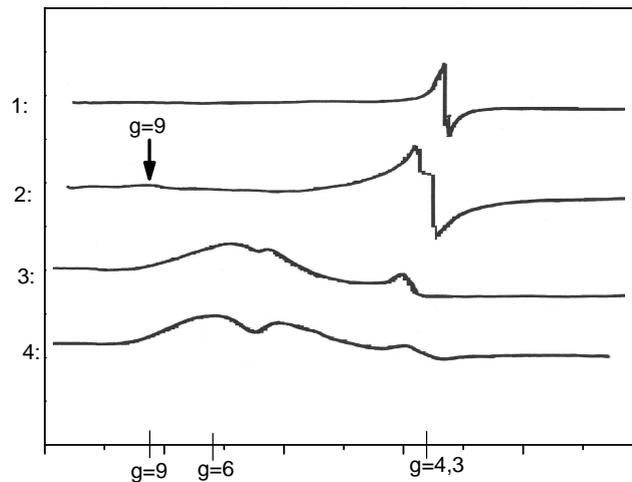


Abb.16: *Fe(III)-Transferrin mit unterschiedlichen Anionengruppen, 77K.*
 1: *Fe(III)-Tf-nitrilotriacetat, ein rein rhombisches System mit $E/D=1/3$; 2: Fe(III)-Tf-thioglycolat; 3,4: Fe(III)-Tf-malonat und -oxalat [Aisen, 1972]*

Das ESR-Spektrum des humanen Eisen-Transferrins besteht aus zwei sich überlagernden Signalkomponenten. Untersuchungen an den beiden Transferrin-Monomeren zeigten, dass die Eisenbindungsdomäne in zwei unterschiedlichen Konformationen vorliegt. Das Verhältnis der beiden Signalkomponenten ist abhängig von der Ionenkonzentration so genannter „nicht-synergistischer Anionen“, von denen besonders das Chlorid-Anion eine wichtige Rolle spielt [FOLAJTAR, 1982]. Das „nicht-synergistische Anion“ bindet, allerdings nur in Anwesenheit eines synergistischen Anions, an positive Ladungen des Transferrin-Proteins und verursacht so die Verlagerung der Eisenbindungsdomäne von einer Konformationsstellung in die andere. Dies führt zur Änderung des ESR-Spektrums [PRICE, 1972]. Dieser Effekt zeigt Sättigungsverhalten und deutet auf einen Bindungsprozess hin [FOLAJTAR, 1982]. Die „nicht-synergistischen Anionen“ erleichtern die Eisenabgabe, so dass hier ein möglicher Regulationsmechanismus vermutet wird. In einer ionenfreien Lösung konnte keine Eisenabgabe beobachtet werden [KRETCHMAR, 1988].

Auch die Simulationen des Fe(III)-Transferrin-Komplexes sind nur mit mehreren Komponenten möglich. YANG [1987] simulierten Fe(III)-Tf-Bicarbonat-Spektren des unteren Kramer-Dubletts mit zwei Komponenten, mit den Anteilen von 70% für Komponente I und 30% für Komponente II, mit $D=0,23 \text{ cm}^{-1}$ (Abb.17).

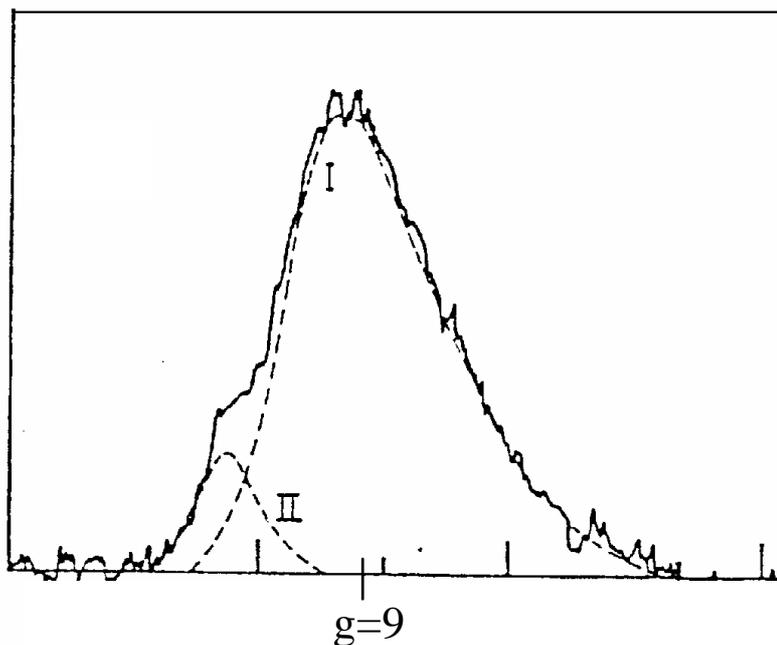


Abb.17:
 Experimentelles (-)
 und simuliertes (---)
 Signal des unteren
 Kramer-Dubletts von
 Fe-Transferrin mit
 Bicarbonat mit zwei
 Komponenten (I und
 II) [Yang, 1987]

Simulationen des mittleren Kramer-Dubletts mit $D=0,23 \text{ cm}^{-1}$ waren mit 3 Komponenten mit unterschiedlichen Resonanzwahrscheinlichkeiten notwendig (Komponente I=46%, Komponente II=48%, Komponente III=6%), wobei Komponente III keine Intensität im unteren Kramer-Dublett aufweist (Abb.18).

Das ESR-Signal des Fe(III)-Transferrin-Komplexes ist in seiner Symmetrie abhängig von den „synergistischen Anionen“. Unter physiologischen Bedingungen dient Bicarbonat als Partner, das entsprechende ESR-Signal ist ein rhombisches Signal mit $E/D < 1/3$ [WINDLE, 1963]. Allerdings setzt sich das Signal aus zwei Komponenten zusammen. Die beiden Komponenten entsprechen zwei Konformationszuständen der einzelnen Domänen. Das Verhältnis der beiden

Konformationszuständen und damit die Zusammensetzung des ESR-Signals werden durch die „nicht-synergistischen“ Ionen und dem pH-Wert bestimmt. Änderungen des ESR-Signals lassen also Rückschlüsse auf die Reaktionspartner des Fe(III)-Transferrin-Komplexes zu.

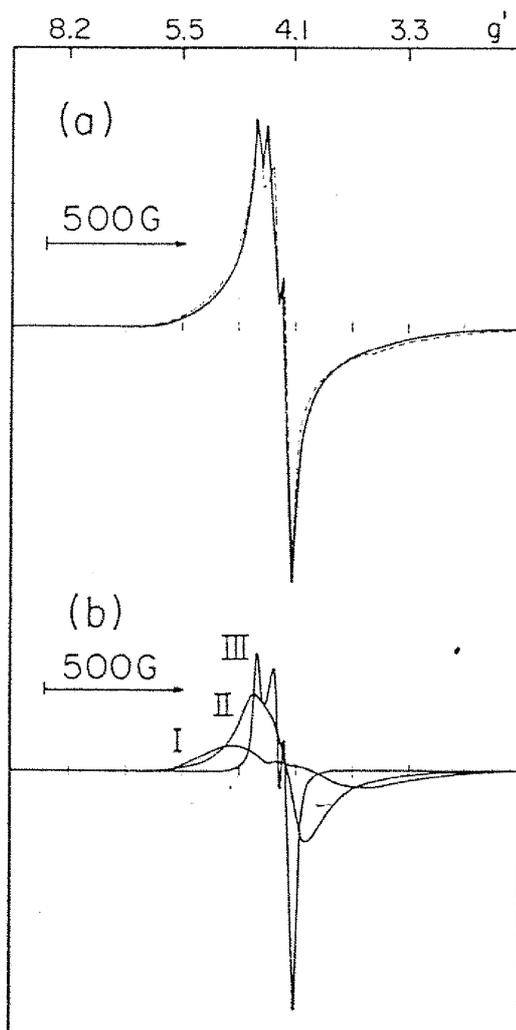


Abb.18:

(a) Gemessenes und simuliertes ESR-Spektrum des Transferrins des mittleren Kramer-Dubletts mit 3 Komponenten [YANG, 1987]; Experimentelles Spektrum von Fe(III)-Transferrin und Simulation in Abhängigkeit von E/D (gestrichelte Linie), mit den Einzelkomponenten (b), die bei der Simulation verwendet wurden [Yang, 1987]

3.6.4 KUPFERHALTIGE PROTEINE

Kupfer wird im Blutplasma an Albumin und an das Kupfertransportprotein Transcuprein gebunden und transportiert. Weitere kupferhaltige Proteine sind Oxidasen mit hohen Redox-Potentialen. Wegen ihrer entscheidenden Rolle bei der Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff in der Atmungskette kommen sie in allen eukaryoten Zellen vor [LÖFFLER, 1988]. Im Erythrozyten katalysiert das Kupfer-Protein Superoxiddismutase die Umwandlung von O_2^- zu H_2O_2 .

Das Kupfer liegt in den meisten Proteinkomplexen in der zweiwertigen Valenzform vor (Cu^{2+}) und besitzt 9 d-Elektronen in der äußeren Schale. Kupferhaltige Proteinkomplexe sind paramagnetisch aktiv ($S=1/2$) und können dadurch mit der ESR-Spektroskopie untersucht werden.

Die fünf 3d-Orbitale spalten sich in Abhängigkeit des Kristallfeldes energetisch auf, beeinflussen sich aber gegenseitig. Die draus resultierende Spin-Bahn-Kopplung führt zu einer Abweichung des g-Faktors vom Wert des freien Elektrons. Daneben verursacht der Kernspin mit $I=3/2$ eine Hyperfein-Aufspaltung, die durch klassische Dipol-Dipol-Wechselwirkung benachbarter Cu^{2+} -Ionen zusätzlich modifiziert werden kann [INGRAM, 1969; SWARTZ, 1972].

Im Blutplasma liegt das kupferhaltige Enzym Caeruloplasmin mit einer Konzentration von 20-40 mg/100 ml vor. Caeruloplasmin spielt im Eisenstoffwechsel bei der Mobilisierung von Eisen aus den Eisenspeichern eine entscheidende Rolle. Durch seine Fähigkeit zur Oxidation von Fe(II) zu Fe(III) mit anschließender Bindung an Transferrin scheint Caeruloplasmin eine transmembranäre Carrier-Funktion für Fe(II) auszuüben [AISEN, 1977]. Zusätzlich stellt Caeruloplasmin ein, allerdings unbedeutendes, Kupfer-Transportprotein dar [LÖFFLER, 1988].

Caeruloplasmin kann bei der ESR-Untersuchung von menschlichem Blutplasma einen bedeutenden Signalanteil liefern [FEE, 1975; ONORI, 1981]. Caeruloplasmin beinhaltet bis zu 8 Kupfer-Ionen pro Molekül, die sich in ihren ESR-Eigenschaften unterscheiden [INGRAM, 1969; SWARTZ, 1972]. Durch die Spin-Bahn Kopplung und die Kristallfeld-Symmetrie liegt ein axiales System mit $g_{\perp}=2,05$ und $g_{\parallel}=2,2$ vor. Anhand der Hyperfein-Aufspaltung im ESR-Signal können zwei Kupfer-Systeme differenziert werden, die sich bereits in ihren optischen Eigenschaften unterscheiden. Das als „Typ I“ bezeichnete, blaue Kupfer-System hat eine geringere Hyperfein-

Aufspaltung ($A_{\parallel} \approx 10 \text{ mT}$) als das „Typ II“-Protein ($A_{\parallel} \approx 20 \text{ mT}$), das nicht optisch aktiv ist. Die entsprechende Komponente A_{\perp} ist in den ESR-Spektren von Caeruloplasmin nicht aufgelöst [INGRAM, 1969; SWARTZ, 1972; HAGEN, 1993].

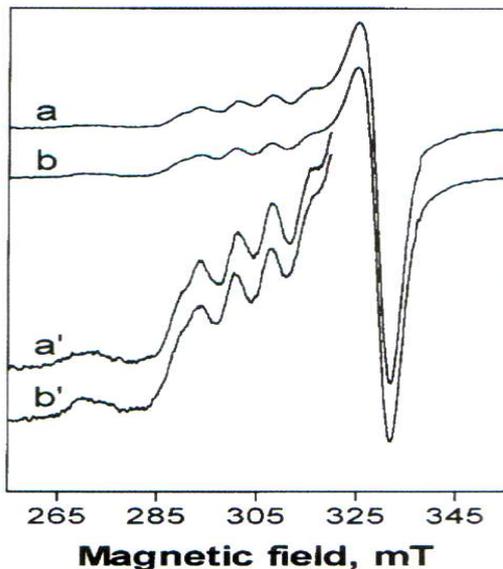


Abb19.:

Darstellung eines X-Band Tieftemperatur-ESR-Spektrums nativen Schaf-Caeruloplasmins (Spektr. a) und der 5-fach verstärkt gezeigten Hyperfeinübergänge des Kupfers [modifiziert nach G. MUSCI, 1999]

Bei der Auswertung der ESR-Signale von plasmatischem Caeruloplasmin muss berücksichtigt werden, dass bei Lagerung der Proben in einem Temperaturbereich bis zu -65°C die Signalintensität innerhalb weniger Tage deutlich abnimmt. Nur bei Lagerungstemperaturen unter -80°C bleibt die Signalintensität stabil [ONORI, 1981].

3.6.5 WEITERE METALLOPROTEINE

Neutrophile Granulozyten besitzen zur Infektabwehr eine Reihe von Oxidasen und Peroxidasen, die in Vakuolen gespeichert sind. Im Rahmen einer Infektabwehr kommt es zu Phagozytose des Erregers mit der Bildung einer intrazellulären Vakuole, dem Phagosom. Oxidasen und Peroxidasen bilden Sauerstoffradikale, um den eingeschlossenen Erreger zu zerstören. Die speziell in neutrophilen Granulozyten vorhandene Myeloperoxidase erzeugt ein Chloridradikal, das zur Peroxidation von Membranlipiden führt. Die Myeloperoxidase ist ein Häm-Eisen-Protein mit einem „high-spin“-Fe(III)-Signal mit rhombischer Symmetrie.

Die g-Faktoren betragen: $g=(7,03; 5,20; 1,94)$. In Abhängigkeit vom Reaktionszustand des Enzyms bilden sich zusätzlich „low-spin“ Fe(III) Signale mit g-Faktoren 2,87; 2,21 und 1,67 [FUJII, 1992]. Die Konzentration der Neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut unter normalen Bedingungen beträgt 4000-8000/ μ l. Besonders in der frühen Phase einer entzündlichen Reaktion kann sich die Konzentration sehr stark erhöhen.

Die Konzentration weiterer Cytochrome z.B. aus der Atmungskette ist im Blut vernachlässigbar klein, weil die reifen Erythrozyten keine Mitochondrien mehr besitzen. Das Eisen-Speicherprotein Ferritin ist hauptsächlich im Gewebe vorhanden, seine Konzentration im Plasma beträgt ca. 20-300ng/ml. Ferritin bindet Eisen in der zweiwertigen Form und kann im Rahmen pathologischer Prozesse als „Akut Phase Protein“ stark erhöht sein.

Metallionen zählen zu den Spurenelementen, die im Blutplasma an spezielle Proteine gebunden transportiert werden. Der Plasmaspiegel von Eisen und Kupfer beträgt jeweils 13-32 μ mol/l, von Zink 15-20 μ mol/l, Molybdän 0,16 μ mol/l, Mangan 0,27 μ mol/l, Kobalt, Zinn und Vanadium sind wegen der geringen Konzentration im Blutplasma nicht nachweisbar [LÖFFLER, 1988].

4. Material und Methoden

4.1 PROBEN UND CHEMIKALIEN

Zur Herstellung sämtlicher wässriger Lösungen wurde destilliertes Wasser aus einer Millipore-Anlage verwendet. Hexacyanoferrat-III der Firma Sigma, angesetzt als 10mM Stammlösung diente als Oxidationsmittel. Dithionit der Firma Sigma wurde als 1M Stammlösung angesetzt. Die Herstellung der Dithionit-Lösung erfolgte in einem Handschuhkasten unter Stickstoff-Atmosphäre. Dafür wurde das destillierte Wasser etwa 3h mit Stickstoff unter konstantem Rühren inkubiert, um den physikalisch gelösten Sauerstoff zu verdrängen.

Menschliches Erythrozytenkonzentrat als Blutkonserve und gefrorenes gerinnungsfähiges Plasmakonzentrat („Fresh-Frozen-Plasma“/FFP) wurden von der

Blutbank der Abteilung für klinische Haemostasiologie und Transfusionsmedizin der Universität des Saarlandes bereitgestellt.

4.2 ERYTHROZYTENKONZENTRAT-PRÄPARATION

Die von der Blutbank zur Verfügung gestellten Erythrozytenkonzentrate (Ery-Konzentrate) werden in der Klinik für die Bluttransfusion verwendet. Sie sind industriell hergestellt, haben ein Volumen von 200-350ml und entsprechen den geforderten Qualitätskriterien mit einem Hämatokrit (HK) von 50-70% und einem Gesamt-Hämoglobin Gehalt von >40g (>24,8mmol) pro Konserve. Der Gehalt an Leukozyten ist kleiner 1×10^6 und der Anteil von Restplasma beträgt weniger als 25ml auf 300 ml. Die Hämolyserate am Ende der Laufzeit muss unter 0,8% betragen. In den Erythrozytenkonserven sind die übrigen zellulären Bestandteile (Leukozyten und Thrombozyten) entsprechend den Qualitätskriterien entfernt.

In einer Zentrifuge (Centrikon H-401 der Firma Kontron) wurden durch Zentrifugieren mit 1000g (5000U/min) die Erythrozyten von vorhandenen Lipiden und anderen Plasmabestandteilen getrennt und aufkonzentriert. Die Zentrifugation erfolgte in mehreren Zyklen von 15 min Dauer bei einer Durchschnittstemperatur von 4°C. Der Überstand wurde jeweils vorsichtig abpipettiert, das gleiche Volumen durch physiologische Kochsalzlösung ersetzt, mit dem Sediment vermischt und erneut zentrifugiert. Die Erythrozyten konnten dadurch zusätzlich gereinigt werden. Nach mindestens drei Zentrifugationszyklen wurden zuerst der Überstand, dann das auskonzentrierten und gereinigten, intakten Erythrozyten bestehende Sediment abpipettiert. Zur Bestimmung der Hämoglobinkonzentration des Sediments wurde der von der Firma Merck gelieferte Merkotest 3317 und das Spektralphotometer Uvikon 810 der Firma Kontron verwendet. Hämoglobin wird durch eine standardisierte Reaktion in Hämoglobincyanid umgewandelt und anschließend die Extinktion im Spektralphotometer bei 540nm gemessen. Die Hämoglobinkonzentration wird nach folgender Formel berechnet:

$$[\text{Hb}] = \text{Extinktion} \cdot 22,8\text{mmol Hb/l}$$

$$= \text{Extinktion} \cdot 36,8\text{g Hb/dl}$$

Die gemessene Hämoglobinkonzentration des Sediments, im weiteren Erythrozyten-Fraktion (ERY-Fraktion) genannt, lag bei den verschiedenen Blutkonserven zwischen 30 und 49g/dl. Die quantitative Auswertung der ESR-Signale erfolgte jeweils nur innerhalb einer Probereihe, so dass die große Schwankung der Hämoglobinkonzentration der unterschiedlichen Blutkonserven nach der Präparation keinen Einfluss auf die Messergebnisse hatte.

Zur Untersuchung der Plasmabestandteile wurde der aus der Erythrozytenreinigung gewonnene Überstand durch Zentrifugation in Zentrifugenröhrchen mit eingebauten Membranen (Centriprep der Firma Amicon) weiter aufgetrennt. Die Zentrifugation erfolgte bei 2500g (3000U/min) mit einer Durchschnitts-Temperatur von 4°C und dauerte etwa 75 bis 95 min. Zentrifugation mit „Centriprep 30“ lieferte im Rückstand Bestandteile des (Erythrozyten-) Plasma (EP) mit einer Molekülgröße größer 30kDa. Diese Fraktion wird im weiteren „EP 30“ genannt. Das übrig gebliebene Sediment wurde in einem letzten Schritt mit „Centriprep 10“ in die Fraktion mit Molekülgrößen zwischen 30kDa und 10kDa, „EP 30/10“, und in eine mit Molekülgrößen kleiner 10kDa, „EP 10“, aufgetrennt. Das Diagramm in Abb.20 verdeutlicht die Separationsschritte.

Die so gewonnenen Proben wurden in Quarzröhrchen (4mm Außendurchmesser) mit jeweils gleichen Volumina pipettiert, vorsichtig in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 77K gelagert. ESR-Untersuchungen zeigten, dass eine Lagerung von Erythrozyten und Hämoglobin bei 77K ohne Signalveränderung für mindestens 2 Monate erfolgen kann und erst die Lagerung bei Temperaturen über -20°C (im gefrorenen Zustand) bereits nach einer Woche zu einer Zunahme an Ferri-Hämoglobin führt [WAJNBERG, 1993].

Die Erythrozytenkonzentrate werden in der Blutbank standardmäßig bei 3°C bis zu 7 Wochen gelagert. Nach 7 Wochen ist die Haltbarkeit einer Blutkonserve abgelaufen und sie darf nicht mehr transfundiert werden. Die bei den Versuchen verwendeten Konserven hatten ein unterschiedliches Alter. Die Ausgangskonzentration an Ferri-Hämoglobin war vor den Messungen nicht bekannt, so dass die Signalintensität insbesondere des Ferri-Hämoglobin-Signals in den unterschiedlichen Chargen stark variierte. Auch konnte im Rahmen dieser Versuche nicht unterschieden werden, ob die beobachtete Variabilität der Signale durch eine physiologisch unterschiedliche

Zusammensetzung des Blutes bezüglich Radikalspezies verursacht wird oder nur Folge der Lagerung ist (z.B. Abbauprozesse, Oxidationsprozesse).

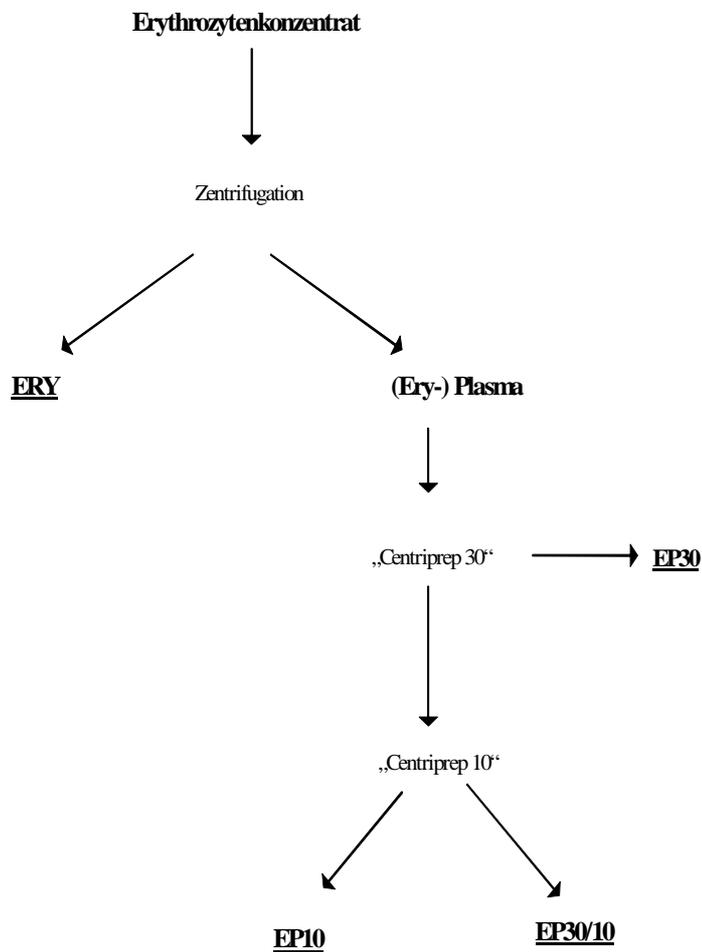


Abb.20: Schema der Auftrennung der Blutkonserve (Erythrozytenkonzentrat) durch Zentrifugation in einzelne Fraktionen (ERY, EP30, EP30/10 und EP10)

4.3 PLASMA („FRESH-FROZEN-PLASMA“) PRÄPARATION

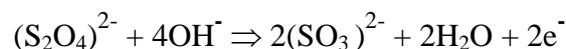
Für die Untersuchungen an Plasmabestandteilen des Blutes wurden zusätzlich gefrorene gerinnungsaktive Plasmakonserven, das „Fresh-Frozen-Plasma“ (FFP) verwendet, wie sie von der Blutbank für die klinische Routine bereitgestellt werden. Das gerinnungsaktive Plasma wird aus der Vollblutspende (Einzelspende oder Pool) durch verschiedene industrielle Verfahren gewonnen (Zentrifugation und Abpressen,

Apherese). Das gewonnene Frischplasma muss baldmöglichst schockgefroren und bei -30°C gelagert werden. Es beinhaltet alle plasmatischen Gerinnungsfaktoren und deren Inaktivatoren, wobei deren Gehalt in Abhängigkeit der individuellen Ausgangswerte stark schwanken kann. Als Qualitätskriterium dient die Faktor VIII-Aktivität, die mindestens 70% der Ausgangsaktivität betragen muss [BUNDESGESUNDHEITSBLATT, 2000]. Das Frischplasma sollte frei sein von zellulären Bestandteilen. Die maximal tolerierten Grenzwerte betragen hierbei: 6000 Erythrozyten/ μl , 500 Leukozyten/ μl und 20000 Thrombozyten/ μl .

Die Trennung der Bestandteile des Plasmakonzentrats erfolgte entsprechend der rechten Spalte des Schemas in Abb.20 unter Verwendung der Zentrifugenröhrchen „Centriprep 30“ und „Centriprep 10“ der Firma Amicon. Zentrifugiert wurde bei einer Durchschnittstemperatur von 4°C mit 2500g (3000U/min). Die Zentrifugationsdauer betrug bei der Herstellung der Plasma-Fractionen mit Molekülgrößen größer 30kDa (P30) 6 bis 10h und bei der Herstellung der Fractionen mit Molekülgrößen von 30kDa bis 10kDa (P30/10), bzw. kleiner 10kDa (P10) maximal 6h. Die so gewonnenen Proben konnten ohne Verlust an Signalen bei -20°C gelagert werden.

4.4 HERSTELLUNG DER DITHIONIT-TITRATIONSREIHE

Dithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) wirkt nach folgender Reaktion als Reduktionsmittel:



Die molare Konzentration von Dithionit beträgt 174,11mg/ml. Die Herstellung der Dithionit-Titrationsreihe erfolgte bei allen Fractionen in gleicher Weise. 1 ml der zu untersuchenden Fraction wurde mit unterschiedlichen Volumina der 1M Dithionit Stammlösung versetzt. Die nachfolgende Tabelle 2 zeigt die jeweiligen Mischungsverhältnisse und die molare Konzentration an Dithionit in der Probe.

Bei den Mischungsverhältnissen 500:1 und 200:1 wurde eine 0,1M Dithionit-Lösung verwendet. Präparationstechnisch erwies sich dieses Verfahren sowohl bei der Dithionit- als auch bei der Hexacyanoferrat-Titrationsreihe als vorteilhaft.

Die Herstellung ungleicher Endvolumina würde zu unterschiedlicher Verdünnung der Fraktionslösung und damit alleine durch den Verdünnungseffekt zur Beeinflussung der ESR-Signalintensität führen. Daher wurde in den Erythrozyten-Verdünnungsreihen 2:1, 5:1, 10:1 und 50:1 die in der Tabelle angegebene molare Konzentration des Dithionits auf ein einheitliches Endvolumen von 1,5ml angesetzt, wobei 1ml des Erythrozytenkonzentrats mit 500ml Dithionit-Lösung versetzt wurde.

1 ml Fraktion + x µl Dithionit	⇒	Verhältnis	Dithionit-Konz.
20 µl 0,1 M	⇒	500 : 1	1,994 mM
50 µl 0,1 M	⇒	200 : 1	4,972 mM
10 µl	⇒	100 : 1	9,894 mM
20 µl	⇒	50 : 1	0,0198 M
200 µl	⇒	5 : 1	0,166 M
500 µl	⇒	2 : 1	0,4997 M

Tabelle 2: Mischungsverhältnis vom 1ml Fraktion mit der entsprechenden Menge Dithionit und Umrechnung auf die jeweilige molare Dithionit-Konzentration

Da im Fall der Plasma-Titrationsreihen das Ausgangssignal sehr schwach war, hätte eine Verdünnung auf 1,5ml Endvolumen zu einer weiteren Abnahme der Signalintensität geführt. Deshalb wurde die molare Konzentration des Dithionits auf ein Endvolumen von 1ml umgerechnet und das Dithionit direkt unter Stickstoffatmosphäre in 1ml Plasma gelöst. Der Verdünnungseffekt der übrigen untersuchten Fraktionen war wegen der geringen Volumenzugabe vernachlässigbar.

4.5 HERSTELLUNG DER HEXACYANOFERRAT-TITRATIONSREIHE

Kalium-Hexacyanoferrat gehört zu den Cyano-Komplexen des Eisens. Das Eisenatom bildet im Zentrum das Metallkation, um das sich oktaedrisch Cyanid-Liganden anlagern. Von Bedeutung sind die beiden Anionen Hexacyanoferrat(II) ($[\text{Fe(II)(CN)}_6]^{4-}$) und Hexacyanoferrat(III) ($[\text{Fe(III)(CN)}_6]^{3-}$), die sich in der Wertigkeit des Eisenatoms unterscheiden. Hexacyanoferrat(III) ist ein starkes Oxidationsmittel, das über eine Elektronenaufnahme nach folgender Gleichung in das Hexacyanoferrat(II) übergeht:



Hexacyanoferrat bildet das Hybridorbital ($\text{Fe } d^2sp^3$). Während Hexacyanoferrat(II) die Orbitale doppelt besetzt hat und damit einen stabilen und paramagnetisch inaktiven Komplex bildet, findet man bei Hexacyanoferrat(III) ein einfach besetztes Orbital, das damit paramagnetisch aktiv ist. Das typische ESR-Signal ist in Abb.21 dargestellt. Hexacyanoferrat(III) führt zu einem breiten Signal über einen Feldstärkenbereich von fast 500mT, mit einem Maximum bei $g=2,72$ und einem deutlichen „Baseline drift“. Die molare Konzentration von Hexacyanoferrat beträgt 329,26mg/ml. Als sehr starkes Oxidationsmittel musste Hexacyanoferrat als 10mM Stammlösung angesetzt werden. Die Volumenverhältnisse sind in Tabelle 3 angegeben. Auch bei den Titrationsreihen mit Hexacyanoferrat musste der Verdünnungseffekt berücksichtigt werden. In den Verdünnungsreihen 10:1 und 2:1 wurde sowohl bei der ERY-Fraktion als auch bei der Plasma-Fraktion die Hexacyanoferrat-Konzentration auf ein Endvolumen von 1,05ml umgerechnet, wobei 1ml der Fraktionslösung mit 50 μ l Hexacyanoferrat-Lösung versetzt worden ist. Der Verdünnungseffekt der übrigen Fraktionen konnte wegen des geringen Volumens vernachlässigt werden. In der Erythrozyten-Versuchsreihe erfolgten Versuche mit den Hexacyanoferrat-Konzentrationen im Verhältnis 1:1, 1:4 und 1:10. Auch hier wurde die molare Konzentration des Hexacyanoferrats auf ein Endvolumen von 1,05ml (1ml Ery + 0,05ml Hexacyanoferrat) umgerechnet.

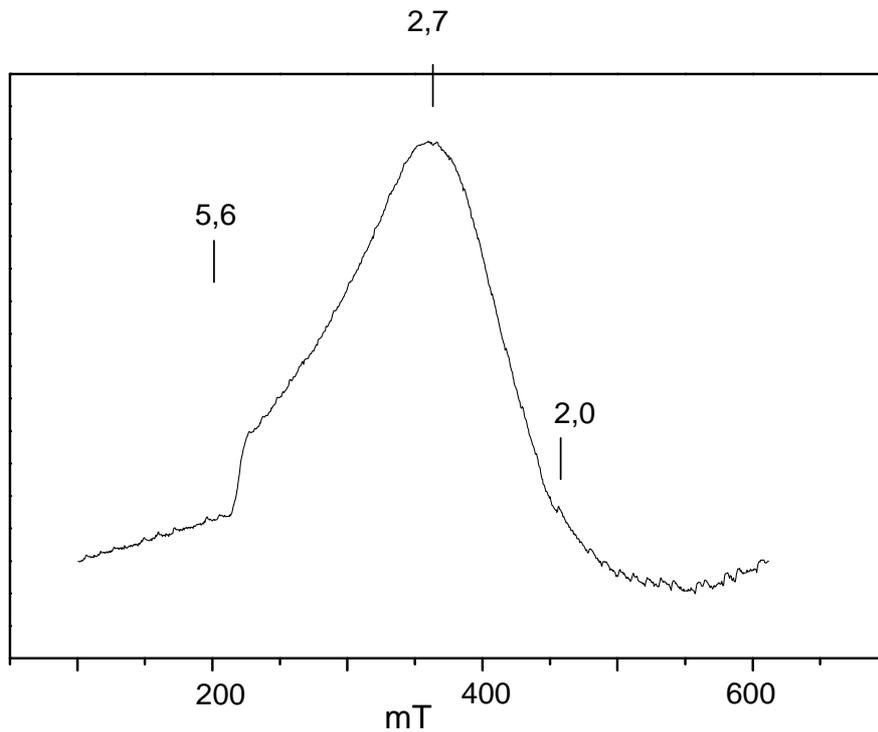


Abb.21: ESR- Signal von Hexacyanoferrat (III), Sweep Time=200s, Time const.=200ms, Mod. Ampl.=0,8mT, 18,6mW, 4K, 10mM wässrige Lösung

1 ml Fraktion + x µl Hcf	⇒	Verhältnis	Hcf-Konz.
1 µl	⇒	500:1	9,766 µM
10 µl	⇒	100:1	98,99 µM
100 µl	⇒	10:1	0,908 mM
50 µl	⇒	2:1	3,33mM
50 µl	⇒	1:1	6,34mM
50 µl	⇒	1:4	25,391mM
50 µl	⇒	1:10	63,478mM

Tabelle 3: Mischungsverhältnis vom 1ml Fraktion mit der entsprechenden Menge Hexacyanoferrat (Hcf) und Umrechnung auf die jeweilige molare Hcf-Konzentration

4.6 BESTRAHLUNG DER FRAKTIONEN

Alle Röntgenbestrahlungen der einzelnen Fraktionen fanden bei 77K statt. Die Probe wurde dafür in einem Glas-Dewar mit flüssigem Stickstoff umspült und direkt über dem Bestrahlungsfenster der Röntgenröhre angebracht. Mit dem Generator ISO Debyelex der Firma Seifert wurde eine Röntgenröhre (PW2184, Philips) mit 25mA Anodenstrom und 95kV Beschleunigungsspannung betrieben. Ein Aluminiumblech von 1mm Dicke diente der Härtung der Strahlung. Die Dosisleistung bei Bestrahlung im Dewar für flüssigen Stickstoff lag bei ca. 160 Gray/min. Die jeweilige Probe wurde vor der Bestrahlung auf ESR-Signale untersucht, danach erfolgte die Bestrahlung mit steigender Bestrahlungsdauer. Die Gesamtbestrahlungszeit wurde dabei aufsummiert. Zwischen den einzelnen Bestrahlungseinheiten erfolgte jeweils eine ESR-Messung. Für die ESR-Spektren und den daraus abgeleiteten Diagrammen ist die Bestrahlungsdauer in Minuten angegeben.

4.7 SPEKTROMETERANORDNUNG

Die Induktion und der Nachweis von Elektronenspinresonanzen erfolgten mit Hilfe eines ESR-Spektrometers. Der grundsätzliche Aufbau eines ESR-Spektrometers wird anhand der Abb.22 besprochen. Der Mikrowellengenerator, ein Klystron, erzeugt eine elektromagnetische Welle mit einer Frequenz von 9-10GHz (X-Band), die an einen Hohlleiter abgegeben wird. Am „Zirkulator“ wird sie in Richtung des Hohlraumresonators (Cavity) geleitet. Der Detektionsarm mit der Messdiode ist entkoppelt. Die Mikrowelle gelangt zur Cavity, in der die Probe positioniert ist. Durch die Geometrie der Cavity und die geeignete Ankopplung mittels einer variablen Lochblende, der Iris, entsteht im Resonator eine stehende Welle, so dass die Mikrowellenenergie dort vollständig gespeichert wird. Das Amplitudenmaximum der magnetischen Komponente liegt dabei in der Mitte der Cavity am Ort der Probe. Die vom Klystron erzeugte Mikrowellenfeldstärke wird durch diese Resonanzüberhöhung verstärkt [SCHNEIDER 1971; FITZKY, 1984; GALLA; 1988].

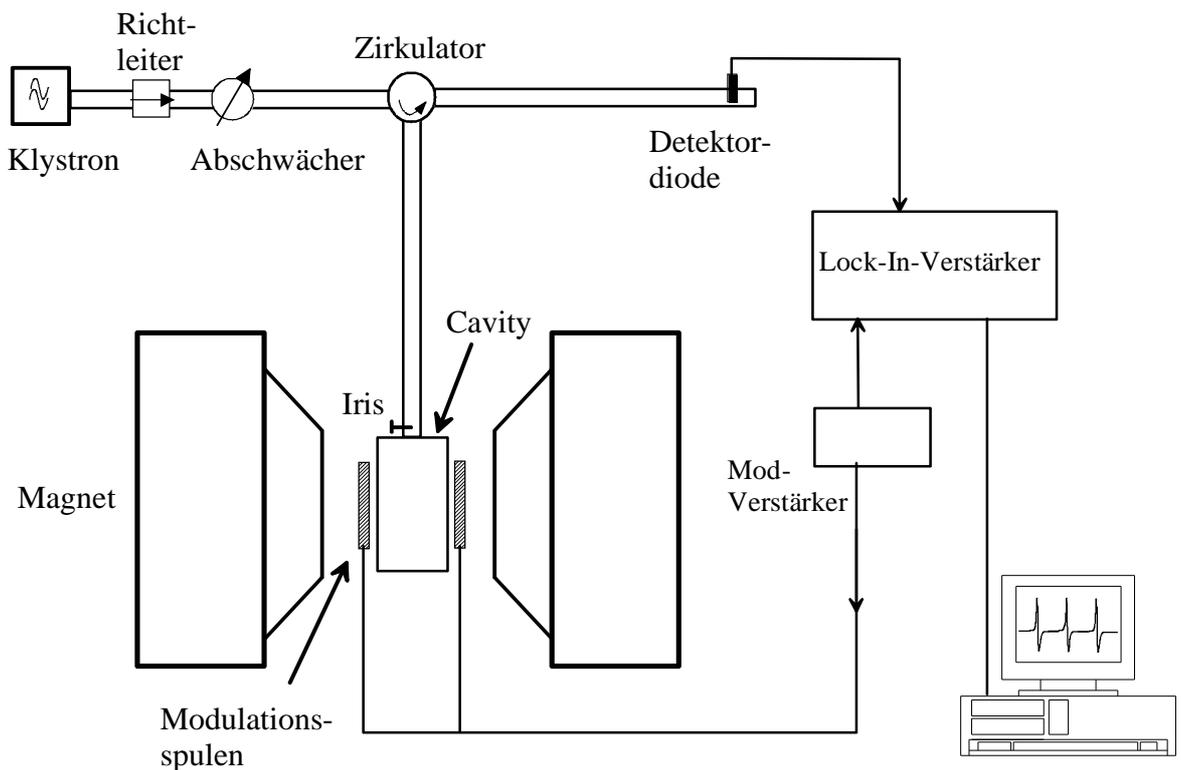


Abb.22: Schematischer Aufbau eines ESR-Spektrometers

Die Cavity mit der Probe befindet sich im homogenen Feld zwischen den Polschuhen eines Elektromagneten. Das in der Cavity aufgebaute magnetische Feld der Mikrowelle liegt dabei senkrecht zum homogenen Feld des Elektromagneten.

Um bei konstanter Mikrowellenfrequenz die Resonanzbedingung:

$$h \cdot \nu = g \cdot \mu \cdot H$$

zu erfüllen, wird die Feldstärke des Elektromagneten zeitlich definiert geändert. Im Zustand der Resonanz absorbiert die Probe einen Teil der Mikrowellenleistung, die optimale Anpassung der Cavity geht verloren und ein geringer Teil der Mikrowellenenergie wird reflektiert. Am Zirkulator wird die reflektierte Welle zum Detektor geleitet. Um störende Koppelschwingungen am Klystron zu verhindern, ist dieses durch einen Richtleiter geschützt. Der zum Detektor laufende Teil der Mikrowelle enthält das ESR-Signal in Form einer Amplitudenmodulation. Das

Modulationsfeld wird durch Spulen erzeugt, die sich an den seitlichen Wänden der Cavity befinden. Es handelt sich um ein sinusförmiges Wechselfeld mit konstanter Frequenz (100kHz) und veränderbarer Modulationsamplitude, das parallel zum homogenen Feld des Elektromagneten liegt. Der Modulationshub soll dabei kleiner als die Linienbreite des ESR-Signals sein. Abb.22 zeigt, wie sich die Feldmodulation der Absorptionskurve in eine Amplitudenmodulation der Mikrowelle umsetzt. Am Lock-In-Detektor erfolgt eine phasen- und frequenzempfindliche Verstärkung und Gleichrichtung des sinusförmigen ESR-Signals, wodurch das Signal-Rausch-Verhältnis wesentlich verbessert wird. Die registrierte Kurve entspricht dann der 1. Ableitung des Absorptionssignals.

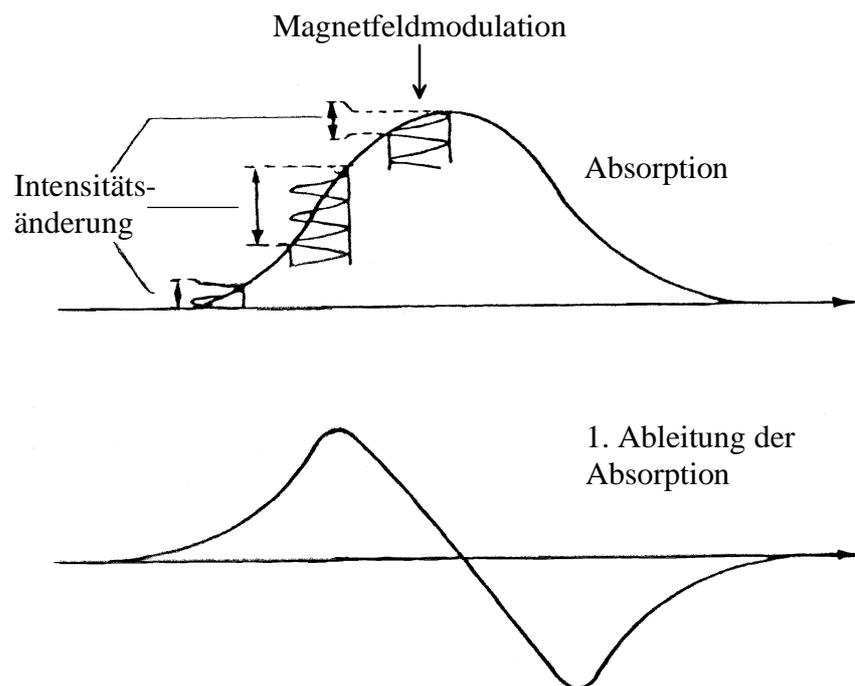


Abb.23: Umsetzung der Feldmodulation der Mikrowelle in eine Amplitudenmodulation des ESR-Absorptionssignals [GALLA, 1988]

4.8 ESR-SIGNALAUFNAHME

Für Messungen bei 77K befand sich das ESR-Quarzröhrchen mit der Probe in einem Quarzfinger-Dewar, der mit flüssigem Stickstoff gefüllt war. Wegen der in Kapitel 3.4.1 näher beschriebenen kurzen Relaxationszeiten der Metalloproteine mussten die meisten Messungen bei Temperaturen um 4K durchgeführt werden. Dazu wurde folgender Helium-Aufbau der Firma Oxford benutzt. Flüssiges Helium der Firma Messer-Griesheim gelangte über einen mit Vakuum isolierten Helium-Heber in den vakuumisolierten Quarzfinger innerhalb der Cavity, umspülte und kühlte die im ESR-Quarzröhrchen enthaltene Probe und wurde dann über eine Rücklaufleitung wieder aufgefangen. Der Heliumfluss wurde durch eine Unterdruckpumpe und ein Nadelventil am Heber gesteuert. Durch die Variation des Heliumdurchflusses konnte so die Temperatur am Ort der Probe definiert verändert werden. Die aktuelle Temperatureinstellung wurde über den Temperatur-Controller ITC 502 der Firma Oxford bestimmt.

Die Messung erfolgte mit den X-Band-Spektrometern BER-420 und ESP-300E der Firma Bruker. Die Daten der Spektren wurden im ersten Fall auf Datenplatten eines ATARI- Rechners abgelegt, im zweiten Fall konnten sie über einen internen Rechner auf handelsüblichen 5 1/4 -Zoll Disketten gespeichert werden. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit speziellen Programmen, die vom Institut für Biophysik in Homburg der Universität des Saarlandes erstellt wurden und mit Microcal Origin[®] 5.0.

Das Ziel dieser Arbeit war in erster Linie die Darstellung der im nativen Blut vorkommenden ESR-Signale, deren Zuordnung sowie das Verfolgen der Signalveränderungen unter Einwirkung definierter Reaktionspartner. Obwohl der Versuchsaufbau primär auf eine qualitative Auswertung ausgerichtet war, wurde dennoch versucht, die Signalveränderungen auch quantitativ zu erfassen. Im folgenden Kapitel werden die Methoden näher beschrieben.

4.9 QUANTITATIVE AUSWERTUNG DER ESR-SIGNALE

Das registrierte ESR-Signal liefert wegen der Modulation des externen Magnetfeldes die erste Ableitung des Absorptionssignals. Die Anzahl der Spins, die zur Signalintensität beitragen, entspricht der Fläche unter der Absorptionskurve und kann damit über das zweite Integral des ESR-Signals berechnet werden. Möchte man zwei unterschiedliche Proben bezüglich ihrer Spin-Konzentration vergleichen, so ist eine Integration nur bei möglichst gleichen Aufnahmebedingungen (Probentyp, Füllhöhe und Probenposition; Spektrometer-Parameter, Messtemperatur) sinnvoll.

Bei biologischen Proben mit meist recht schwachen Signalen und zusammengesetzten Spektren unterschiedlicher Spin-Systeme gelingt die Integration der Signale oft nicht. Das bei schwachen Signalen verstärkte Rauschen der Baseline sowie der „Baseline drift“ führen zu fehlerhafter Bestimmung der Werte. Möchte man zudem Signale in zusammengesetzten Spektren isoliert betrachten, ergeben sich durch die Überlagerung der Signale Schwierigkeiten, die Integrationsgrenzen sinnvoll festzulegen ohne variable Beiträge anderer Signale einzuschließen. Entsprechend ist eine quantitative Auswertung der Signale über die Integration, abhängig vom gemessenen System häufig mit großen Fehlern behaftet.

Eine andere Möglichkeit, Signalintensitäten miteinander zu vergleichen, ist die Bestimmung der Maximalhöhe des ESR-Signals. Dies geschieht entweder über die Höhe des Maximal-Peaks von der Baseline oder als relative Signalhöhe durch Differenzbildung zwischen Maximum- und Minimum eines Peak. Diese Methode ist ausreichend, wenn man das Verhalten der Signalintensitäten zueinander vergleichen möchte, es kann aber nur bedingt eine Aussage über die Spin-Konzentration getroffen werden, da die Linienbreite nicht berücksichtigt werden kann. Im Vergleich zur Integration können Störfaktoren wie Rauschen und „Baseline drift“ besser ausgeglichen werden. Weiterhin gelingt es auch Signale in sich überlagernden Spektren isoliert zu betrachten.

Die in dieser Arbeit gemessenen ESR-Signale bestanden aus komplexen überlagerten Einzelsignalen sowie zum Teil starken Variationen der Baseline. Soweit möglich wurde auch eine quantitative Auswertung der Signale vorgenommen. Die dabei zu berücksichtigenden Probleme werden in den jeweiligen Kapiteln beschrieben.

4.10 HINTERGRUNDSIGNALE DES MESSYSTEMS

Die Hintergrundsignale des Cavity-Dewar (Kryostat)-Systems erschweren in beiden Temperaturbereichen (77K, 4K) die Auswertung der Probensignale durch Überlagerung. Um Hintergrundsignale von den Signalen der Probe unterscheiden zu können, erfolgten ESR-Messungen des Cavity-Dewar-Systems vor den eigentlichen Probemessungen in beiden Temperaturbereichen mit jeweils annähernd gleichen Aufnahmeparametern.

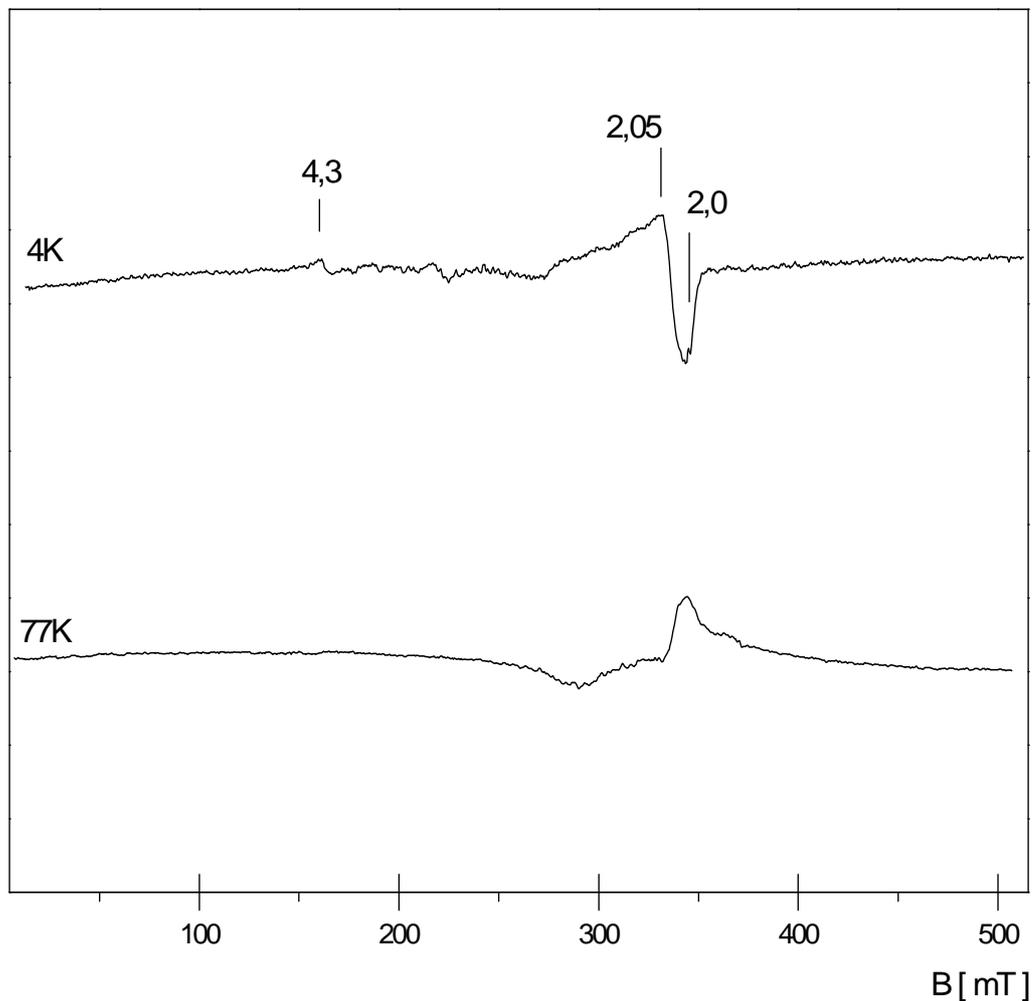


Abb.24: Cavity-Hintergrundsignale bei 4K und 77K, Sweep Time=671s, Time const.=327ms, Mod. Ampl.=0,8mT, 18,6mW

Bei 77K wurde die Cavity inklusive dem Finger-Dewar vermessen, bei 4K die Cavity mit dem Helium-Kryostaten ohne Proberöhrchen. In Abb.24 sind diese typischen Signale in beiden Temperaturbereichen im Vergleich dargestellt. Bei 77K erkennt man einen breiten Signalkomplex im Bereich $g=2$, der nicht weiter differenziert werden kann.

Die eigentlichen Probesignale in diesem Temperaturbereich waren insgesamt schwach, so dass bei hoher Verstärkung mit einer hohen Mikrowellenleistung gemessen werden musste. Dies führte häufig zu einem verstärkten „Rauschen“ und einem „Baseline drift“. Durch diese Artefakte und die Überlagerung der schwachen Probesignale durch die Eigensignale der Cavity war die Auswertung der ESR-Signale in diesem Temperaturbereich sehr oft nicht möglich.

Die Hintergrundsignale der Cavity bei 4K bestehen im oberem Feldstärkenbereich aus einem zusammengesetzten Signal mit einer breiten Schulter bei $g=2,05$ und einem scharfen Signal bei $g=2,0$. Das breite Signal bei $g=2,05$ könnte von einem Kupfer(II)-Komplex als Verunreinigung in der Cavity oder am Kryostat-System stammen. Das kleine scharfe Signal bei $g=2,0$ entspricht dem g -Faktor des freien Elektrons. Aufgrund der Nullfeld-Aufspaltung der Metalloproteine ist gerade in diesem Bereich um $g=2$ aber das korrespondierende Signal (g_z , $g_{||}$) zu erwarten, so dass hier Überlagerung des Cavity-Eigensignals die Auswertung stören. Das schwache Signal bei $g=4,3$ in Abb.24 entspricht dem g -Faktor des freien oder unspezifisch ligandierten Fe(III)-Ions. Auch dieses lag als Verunreinigung vor und überlagert mögliche Signale des Transferrin-Komplexes. Trotz sorgfältiger Säuberung des gesamten Systems und besonders der Cavity vor der jeweiligen Messreihe waren die Hintergrundsignale in unterschiedlicher Stärke immer vorhanden.

Auch die Bestrahlung des Quarzröhrchens erzeugt bereits nach kurzer Bestrahlungszeit (5min) ein scharfes Signal bei $g=2$, das in beiden Temperaturbereichen in unterschiedlicher Intensität nachzuweisen war. In Abb.25 ist das typische ESR-Spektrum des Quarzröhrchens bei 4K nach 60min Bestrahlung (bei 77K) unter Sättigungsbedingung gezeigt.

Prinzipiell besteht die Möglichkeit, die Hintergrundsignale vom eigentlichen Probesignal zu subtrahieren und das ESR-Spektrum so zu korrigieren. Dafür ist aber ein gut aufgelöstes Referenzsignal notwendig, um den Grad der Subtraktion zu

bestimmen. Da die vom Hintergrundsignal überlagerten Probensignale in den hier durchgeführten Messungen meist sehr schwach waren und recht starke „Baseline Drifts“, vor allem bei den weiten Feld-Sweeps auftraten, wurde auf die Subtraktion verzichtet. Damit sollten mögliche Verfälschungen der Signale vermieden werden. Stattdessen wurden die jeweiligen Hintergrundsignale zum Vergleich in den Abbildungen mit dargestellt und bei der Interpretation der Messergebnisse berücksichtigt

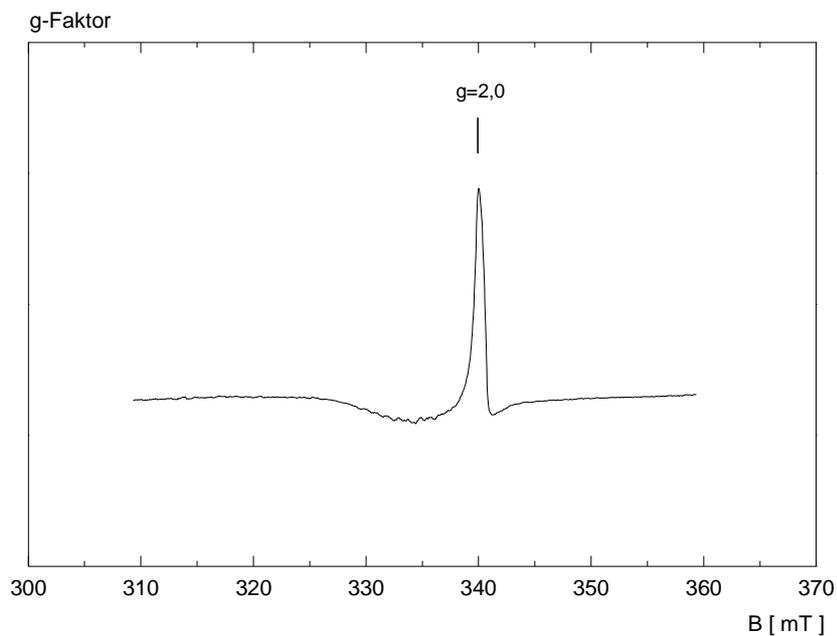


Abb.25: ESR-Signal vom Quarzröhrchen, nach 60 min Röntgenbestrahlung (bei 77K), Sweep Time=83s, Time const.=81ms, Mod. Ampl.= 0,5mT, 18,6mW, 4K

5. Ergebnisse

5.1 EINFÜHRUNG

Ziel dieser Arbeit war die möglichst vollständige Darstellung von vorhandenen bzw. erzeugbaren ESR-Signalen in den Bestandteilen des menschlichen Blutes. Nach Präparation und nach definierter chemischer Reaktion sowie Einwirkung ionisierender Strahlung sollten zusammengehörige spektrale Komponenten separiert und soweit möglich bestimmten Proteinkomplexen oder niedermolekularen Blutbestandteilen zugeordnet werden. Dazu wurden ihre ESR-Charakteristika bei systematischer Variation von Bedingungen untersucht. Nach der im Kapitel 4.2 beschriebenen Methode wurden die Blut- und Plasmaproben zunächst durch Zentrifugation in einzelne Fraktionen aufgetrennt. Diese wurden dann hinsichtlich vorhandener ESR-Signale untersucht und in ihrem Temperatur- und Sättigungsverhalten analysiert. Danach wurde den Proben ein Reduktionsmittel (Dithionit) bzw. ein Oxidationsmittel (Hexacyanoferrat(III)) in definierten Konzentrationen zugefügt und die Veränderung mit der ESR-Spektroskopie dargestellt. Abschließend erfolgte die Bestrahlung mit Röntgenstrahlung mit steigender Bestrahlungsdosis.

5.2 ERY-FRAKTION

Die Proben der ERY-Fraktion enthalten die Bestandteile aus dem Sediment der Erythrozytenkonzentrate nach Zentrifugation. Zunächst wurden Messungen bei einer Temperatur von 77K durchgeführt, die allerdings meist keine für die Auswertung brauchbaren Ergebnisse erbrachten und deshalb nur kurz vorgestellt werden. In Abb.26 ist das typische Spektrum der ERY-Fraktion bei 77K zweier unterschiedlicher Chargen gegenüber gestellt. In beiden Messungen erkennt man ein Signal bei $g=5,9$, das dem Eisen-„high-spin“-Signal des Ferri-Hämoglobins entspricht, sowie ein unspezifisches Signal bei $g=2$, das hauptsächlich von Hintergrundsignalen herrührt. Obwohl beide Chargen nach annähernd gleicher Präparation und unter gleichen

Aufnahmebedingungen vermessen wurden, zeigen sich deutliche Unterschiede in der Signalstärke und Qualität. Offensichtlich sind die Anteile an Ferri-Hämoglobin in Charge 1 sehr viel größer. Das relativ breite Signal bei $g=4,3$ ist ebenfalls in beiden Chargen in stark unterschiedlicher Intensität vorhanden. Es ist im Hintergrundsignal nicht enthalten und stammt entweder von unspezifischem Fe(III) oder, wegen der schwach aufgelösten Struktur in Abb.27, von geringen Anteilen des in der Präparation noch vorhandenen Transferrins.

Wegen der sehr kurzen Relaxationszeit vieler eisenhaltiger Metalloproteine und der damit einhergehenden Linienverbreiterung bei höheren Temperaturen liefern diese Systeme bei tiefen Temperaturen (4K) eine sehr viel bessere Signalauflösung und -intensität. Zum Vergleich ist in Abb.28 das Spektrum der Charge 2 aus Abb.26 gezeigt, das nun bei 4K gemessen wurde.

Der bei 77K sehr breite und schwache Peak des Ferri-Hämoglobins weist nun eine sehr viel höhere Intensität auf. Das Eisen des Hämoglobins liegt im dreiwertigem Zustand vor und besitzt wegen der fünf ungepaarten Elektronen der d-Orbitale ($3d^5$) einen Gesamtspin von $S=5/2$, aufgrund der Nullfeldaufspaltung aber einen „fiktiven Spin“ $S=1/2$. Dies führt zur Ausbildung des bekannten axialen Signals mit den g -Faktoren $g_{\perp}=5,9$ und $g_{\parallel}=2$ (siehe Kapitel 3.6.1), wobei die Komponente $g_{\parallel}=2$ von weiteren Signalen überlagert ist, die im Vergleich zur Messung bei 77K jetzt deutlicher aufgelöst werden können. Das überlagernde breite Signal bei $g=2,06$ sowie das scharfe Signal bei $g=2$ könnten zusätzlich von weiteren in der Probe enthaltenen Radikalen herrühren, da sie so nicht im Hintergrundsignal des Cavity-Dewar-Systems enthalten sind (Abb.28). Diese Signale können aber in dieser Messung trotz verbessertem Signal-Rausch-Verhältnis nicht weiter differenziert werden.

Im unteren Feldstärkenbereich zeigt sich bei 4K neben dem Ferri-Hämoglobin-Signal ($g_{\perp}=5,9$) ein zusätzlicher Signalkomplex aus mehreren Linien, der in den Spektren, die bei 77K gemessen wurden, nicht nachweisbar ist. Außerdem tritt diese Signalgruppe in gereinigtem Hämoglobin-A (HbA) nicht auf (Kap. 5.3). Nachdem viele Metalloproteine, insbesondere der Fe-Gruppe, im unteren Feldstärkenbereich (zwischen 80 und 170mT) gut aufgelöste Signale liefern, kann die folgende Betrachtung und Auswertung der Spektren hauptsächlich auf diesen Bereich beschränkt werden.

Abb.29 zeigt die Signalgruppe im unteren Feldstärkenbereich, wie sie an unterschiedlichen Chargen von Erythrozytenkonzentraten gemessen wurde. Zur Unterscheidung der Signale können die folgenden apparenten g-Faktoren herangezogen werden:

P1 mit $g=6,78$

P2 mit $g=6,46$

P3 mit $g=5,26$

P4 mit $g=5,02$

P5 mit $g=4,3$

Die einzelnen Signale P1-P4 zeigen Chargen-abhängig stark unterschiedliche Intensitäten. Allerdings verhalten sich die Signalaare P1/P4 und P2/P3 gleichsinnig zueinander, so dass man sie formal jeweils einem Zentrum zuordnen kann.

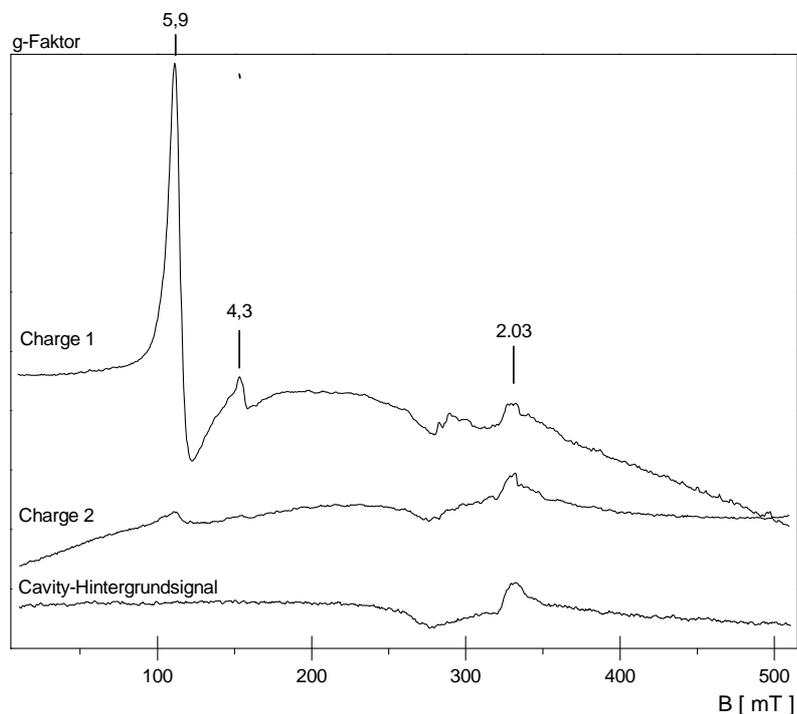


Abb.26: Unterschiedliche Chargen der ERY-Fraktion, im Vergleich zum Cavity-Hintergrundsignal: Sweep Time=335s, Time const.=655ms, 18mW, Mod. Ampl.=0,8mT, 77K

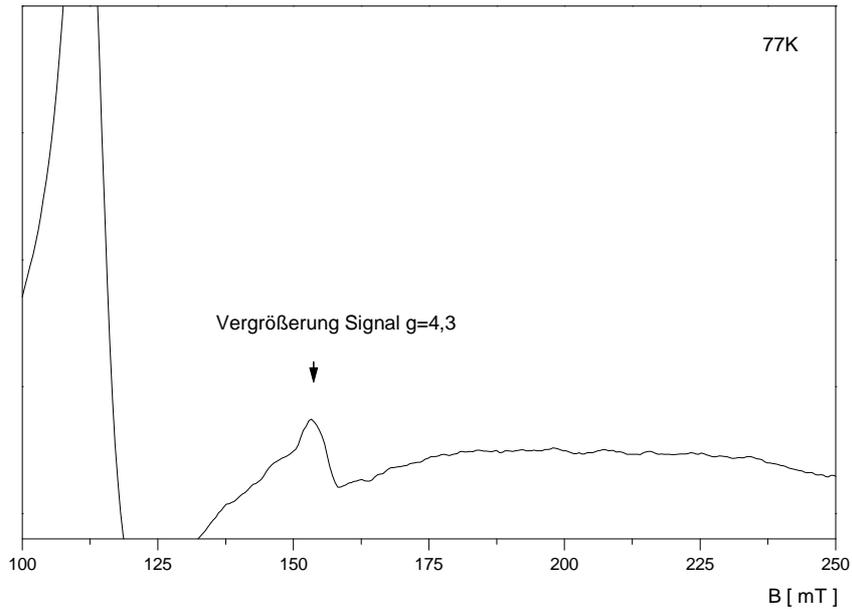


Abb.27: Gleiches Spektrum wie in Abb.26 (Charge 1) mit Vergrößerung im Bereich $g=4,3$, 77K

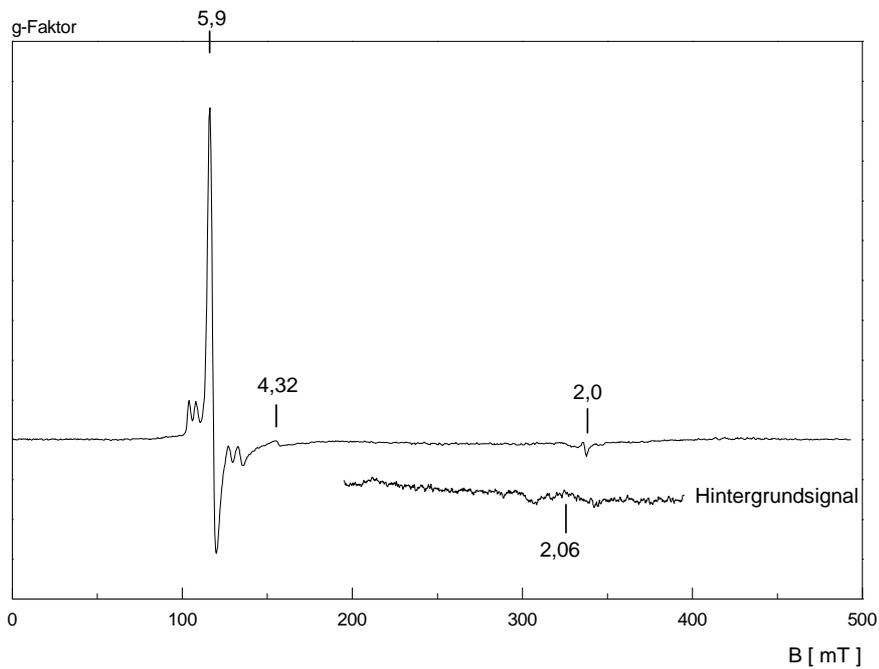


Abb.28: ERY-Fraktion der Charge 2 aus Abb.26, Sweep Time=335s, Time const.=655ms, Mod. Ampl.=0,8 mT, 18,6mW, Hintergrundsignal: Sweep Time=200s, Time const.=200ms, Mod. Ampl.=0,5mT, 18,6mW, stark vergrößert, 4K

Eine weitere Möglichkeit zusammengesetzte Signale zu trennen ist die Betrachtung des Sättigungsverhaltens der einzelnen Signale in Abhängigkeit von der Mikrowellenleistung. In Abb.30 sind die ESR-Spektren der Charge D aus Abb.29 bei steigender Mikrowellenleistung abgebildet. Man erkennt, dass die Signalintensität sowohl der Signale P1-P4 als auch des Ferri-Hämoglobin-Signals mit steigender Mikrowellenleistung zunimmt. Um eine genaue Aussage über das Sättigungsverhalten der einzelnen Zentren zu machen, werden die Signalintensitäten bestimmt und in Abhängigkeit von der eingestrahnten Mikrowellenleistung betrachtet. Das Ergebnis ist in Abb.31 für das Ferri-Hämoglobin-Signal und für die Signale P1-P4 aufgetragen. In beiden Fällen erfolgt bei der Temperatur von 4K eine Signalsättigung bei hohen Mikrowellenleistungen, jedoch wird das Signal $g=5,9$ weniger stark gesättigt als P1-P4. Die einzelnen Signale P1-P4 verhalten sich hierbei gleichsinnig und können somit nicht weiter differenziert werden.

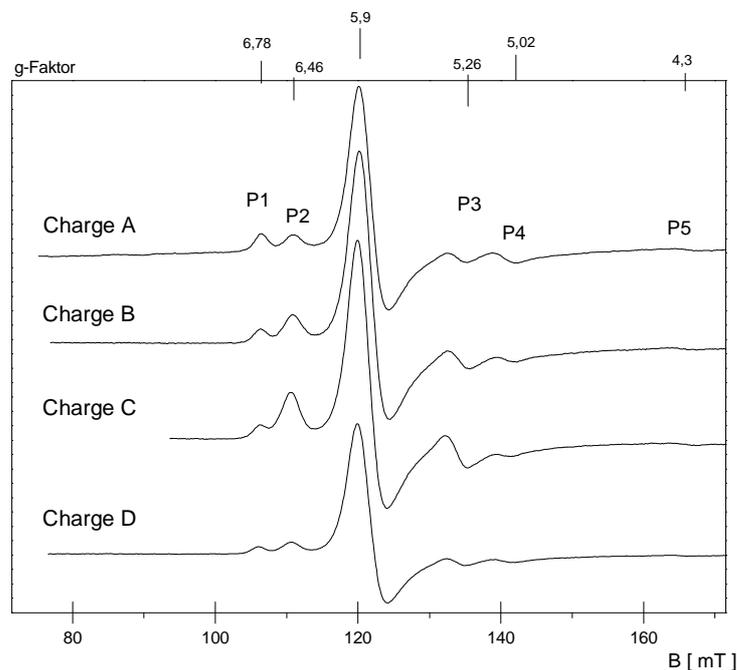


Abb.29: ERY-Fraktion, Sweep Time=200s, Time const.=0,2s, Mod. Ampl.=0,5mT, 18mW, 4K, unterschiedliche Chargen

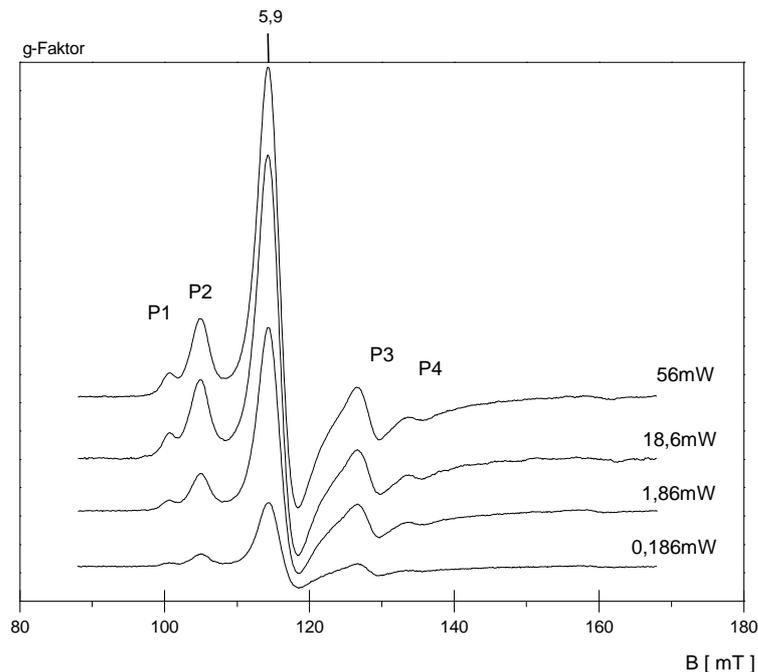


Abb.30: ESR-Spektren der ERY-Fraktion (Charge D) in Abhängigkeit der Mikrowellenleistung (56mW-0,186mW), Sweep Time=167s, Time const.=163ms, Mod. Ampl.=0,5m, 4K, auf gleiche Verstärkung normiert

Gemäß Kapitel 3.6.2 kann man die Signale P1-P4 dem Häm-Enzym Katalase mit dem typischen, aus zwei Komponenten zusammengesetzten rhombischen Signal des Fe(III)-„high-spin“-Systems der prosthetischen Gruppe zuordnen. Dabei entsprechen die Signalkomponente P1/P4 ($g=6,78; 5,02; 1,99(?)$) der breiten Signalkomponente (B) und die Signalkomponente P2/P3 ($g=6,46; 5,26; 1,99(?)$) der schmalen Signalkomponente (A) (vgl. Abb.11), wobei das entsprechende Signal $g_z=1,99$ auch hier von oben beschriebenen Signalen ($g=2,06, g=2,0$) überlagert ist und nicht weiter aufgetrennt werden kann.

Um weitere Signale nachzuweisen, die möglicherweise vom intensiven Signal des Ferri-Hämoglobins der Erythrozyten Probe überlagert sein könnten, wird das entsprechende Ferri-Hämoglobin-Signal vom gesamten Erythrozyten-Signal subtrahiert. Das isolierte Ferri-Hämoglobin-Signal erhält man dabei aus Messungen

an gereinigten und konzentrierten Hämoglobin A-Proben (Ferri-HbA). In Abb.32 ist das Ergebnis für die unterschiedlichen Chargen dargestellt. Wird das Ferri-HbA-Signal subtrahiert, bleibt in unterschiedlichen Ausmaß ein residuelles Signal mit dem g-Faktor $g=5,8$ zurück. Da jedoch die Linienbreite und Linienform des Ferri-HbA-Signals auch bei gleichen Bedingungen nicht völlig identisch zum entsprechenden Signal im Erythrozytenkonzentrat ist, kann das residuelle Signal keiner neuen Spezies oder einer zusätzlichen Komponente der P1-P4-Signale zugeordnet werden. Vielmehr erscheint es als Folge der Subtraktion (Abb.32).

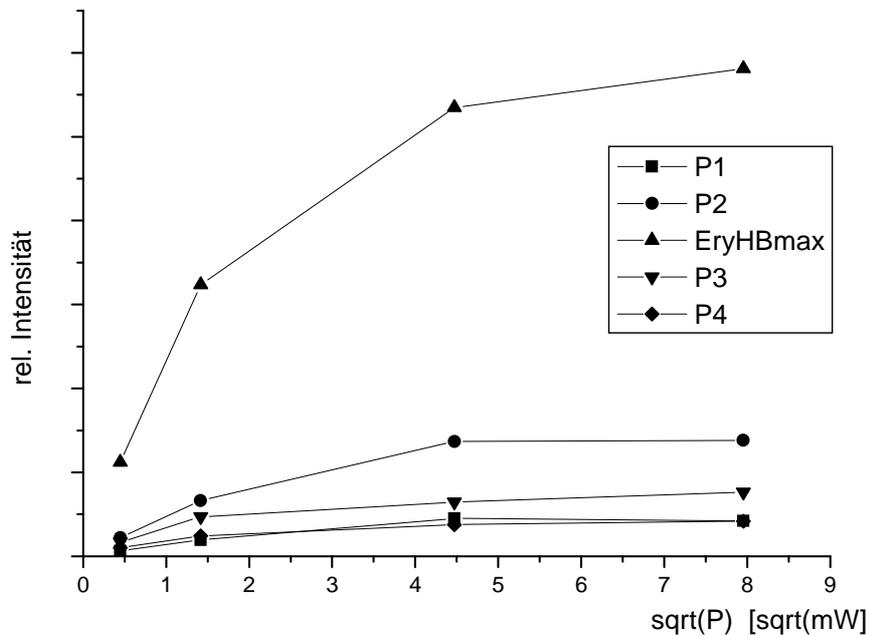


Abb.31: Signalverhalten des Ferri-Hämoglobin-Signals ($g=5,9$) und der Signale P1-P4 aus Abb.29

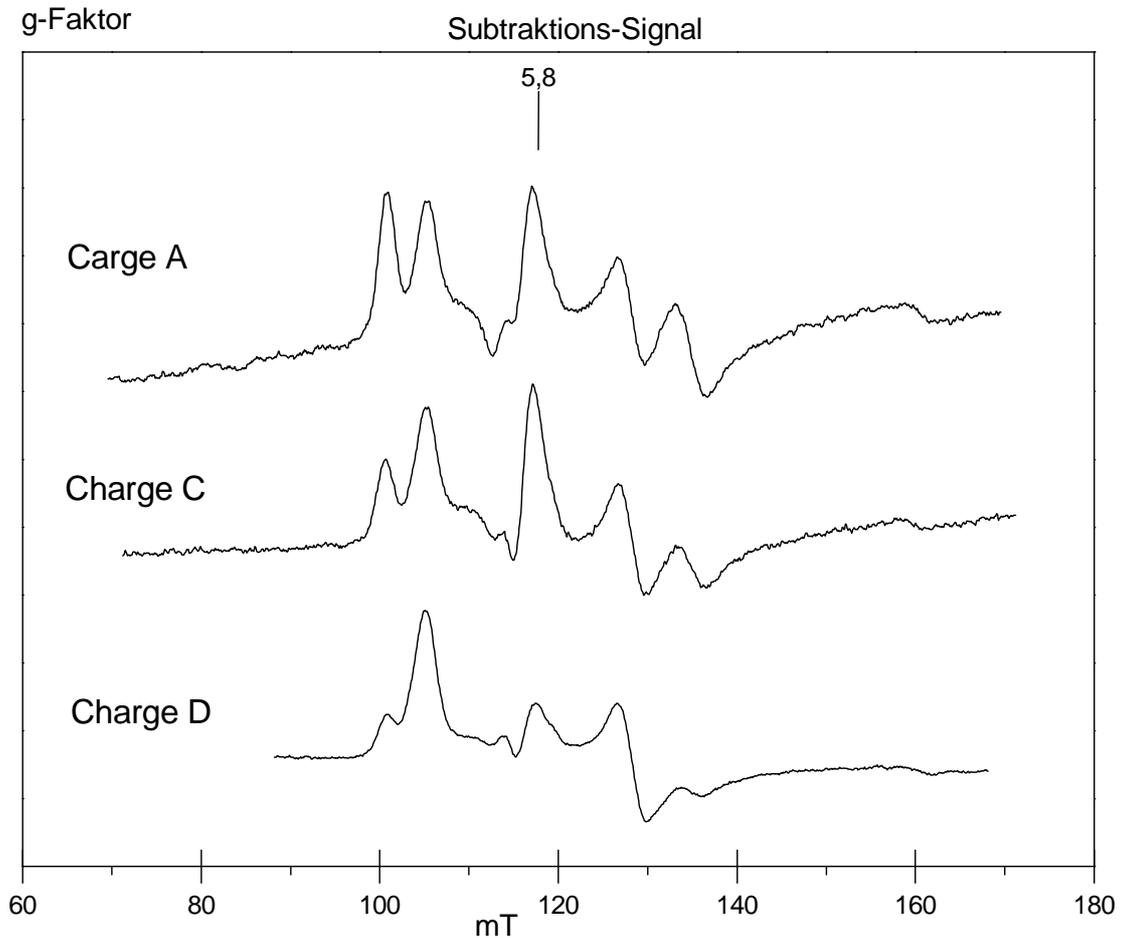


Abb.32: Subtraktion des Ferri-Hämoglobin-Signals (Ferri-HbA) vom Erythrozyten-Signal, unterschiedliche Chargen, residuelles Signal (Subtraktions-Signal) bei $g=5,8$, 4K

5.2.1 PLASMA >30KDA, PLASMA 30-10KDA, PLASMA <10KDA

Die Proben der hier untersuchten Fraktionen wurden aus dem Überstand der Erythrozytenkonzentrate nach Zentrifugation gewonnen und nach der in Kapitel 4.2 beschriebenen Methode weiter nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Die so erhaltenen Plasma-Fractionen enthalten Bestandteile mit einem Molekulargewicht größer 30kDa (EP>30), zwischen 30 und 10kDa (EP30/10) und kleiner 10kDa (EP<10).

Die einzelnen Fraktionen wurden auf ihre Signale hin untersucht. Messungen bei 77K waren von Hintergrundsignalen stark überlagert und erbrachten keine

verwertbaren Informationen, die Spektren sind hier nicht gezeigt. Abb.33 zeigt die Spektren der Fraktionen EP>30, EP30/10 und EP<10 gemessen bei 4K im Vergleich mit den Signalen der ERY-Fraktion. Zur Unterscheidung zwischen Eigensignalen der Probe und Hintergrundsignalen ist das ESR-Spektrum des Cavity-Dewar-Systems gegenüber gestellt. Das axiale Signal des Ferri-Hämoglobins ist in der Fraktion EP>30 deutlich sichtbar. Hämoglobin tritt im Rahmen der Präparation in geringen Konzentrationen durch Hämolyse aus und kann durch weitere Zentrifugation nicht vollständig aus der plasmatischen Fraktion abgetrennt werden. Es liegt somit als „Verunreinigung“ im Überstand vor und liefert das typische Ferri-Hämoglobin-Signal. Nachdem Hämoglobin ein Molekulargewicht über 64kDa besitzt, kommt es aber in den weiter nach Molekulargewichten aufgetrennten Fraktionen (EP30/10 und EP<10) nicht mehr vor. Im Gegensatz dazu ist das rhombische Signal der Katalase in den Plasma-Fraktionen nicht nachweisbar. Katalase ist ein intrazelluläres Enzym der Erythrozyten und in Peroxisomen angereichert. Diese werden offensichtlich bei der Zentrifugation mit den Erythrozyten aus dem plasmatischen Überstand abgetrennt. In der Fraktion EP>30 ist im Bereich $g=4,3$ eine schwache Struktur aufgelöst, die möglicherweise vom Fe(III)-Transferrin stammt. Transferrin kann als Bestandteil des Plasmas in unterschiedlicher Konzentration in den Erythrozytenkonzentraten vorhanden sein. Aufgrund seines Molekulargewichts von ca. 79,5kDa ist es aber in den weiter aufgetrennten Fraktionen nicht mehr nachweisbar. Weiterhin ist in Abb.32 insbesondere in der Fraktion EP30/10 ein relativ breites Signal bei $g=4,3$ dargestellt, das bereits in der ERY-Fraktion (Abb.28) vorkommt und möglicherweise von unspezifischem Fe(III) herrührt. Eine genaue Zuordnung zur Probe gelingt allerdings auch hier nicht, weil das Signal in unterschiedlicher Intensität auch als Hintergrundsignal vorhanden ist.

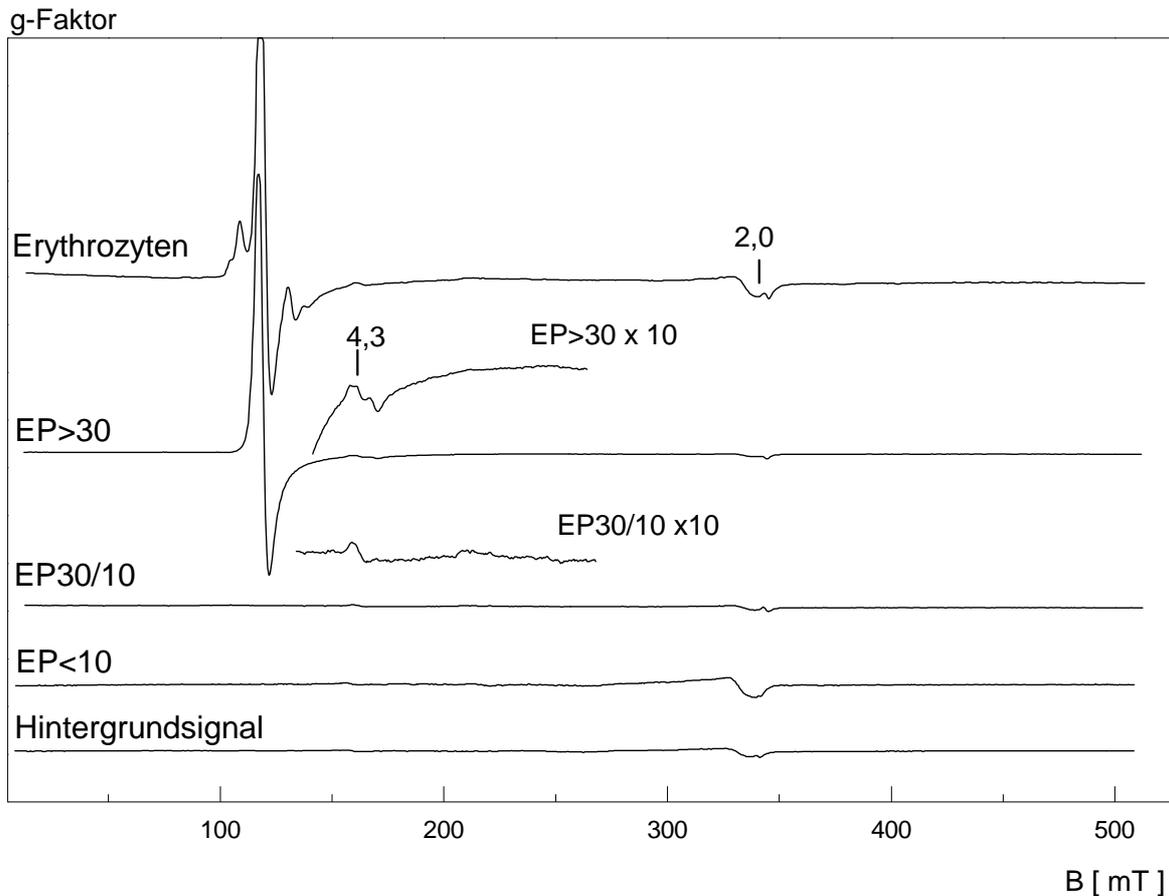


Abb.33: ESR-Signale der zentrifugierten Fraktionen im Vergleich zur Erythrozyten-Fraktion und Cavity-Dewar-Systems (Hintergrundsignal), Sweep Time=335s, Time const.=655ms, Mod. Ampl.=0,824mT,18,6mW, 4K

5.2.2 ERY-FRAKTION / DITHIONIT-TITRATIONSREIHE

Nachdem die ESR-Signale der einzelnen Fraktionen der unbehandelten Erythrozytenkonserve beschrieben und einzelnen Metalloproteinen zugeordnet wurden, kann ihr Verhalten nach Einwirkung des starken Reduktionsmittels Dithionit untersucht werden. Bei der Reaktion mit Dithionit werden zwei Elektronen an den Reaktionspartner abgegeben, die durch den Elektronentransfer verbundenen

Valenzänderungen sollten sich in einer Veränderung des ESR-Signals bemerkbar machen.

Die Proben der ERY-Fraktion wurden nativ und nach Zusatz unterschiedlicher Dithionit-Konzentrationen auf ihre Signale hin untersucht. Die Messungen bei 77K lieferten auch in dieser Versuchsreihe keine weiter verwertbaren Signale, die folgende Beschreibung beschränkt sich daher auf Messungen bei 4K. In Abb.34 und Abb.35 sind die Spektren der ERY-Fraktion gleicher Charge bei steigender Dithionit-Konzentration über den gesamten Feldstärkenbereich von 500mT gezeigt. Die Spektren sind zur besseren Darstellung nicht auf die gleiche Verstärkung normiert.

In der nativen ERY-Fraktion erkennt man im unteren Feldstärkenbereich den Signalkomplex der Katalase und das starke Signal des Ferri-Hämoglobins. Beide Signalkomponenten verändern sich deutlich bei steigender Dithionit-Konzentration. Im oberen Feldstärkenbereich sind eine Linie bei $g=2$ sowie das breite Hintergrundsignal des Cavity-Dewar-Systems aufgelöst. Letzteres ist zur besseren Darstellung in der Abb.34 noch einmal vergrößert und bleibt durch Dithionit Zugabe unbeeinflusst. Das scharfe Signal bei $g=2$ ist auch im Hintergrundsignal enthalten, allerdings ist es bei einer Konzentration von 0,166M Dithionit deutlich intensiver aufgelöst.

Nachdem die hauptsächlichen Effekte in dieser Versuchsreihe bei niedrigen Feldstärken erfolgen, sind die Signale in diesem Bereich (70-170mT) daher gesondert vermessen worden (Abb.36). Dabei ist vor allem die Veränderung der Katalase-Signale von Interesse, so dass die Spektren in Abb.36 zur besseren Übersicht nicht auf eine Verstärkung normiert sind.

Sowohl das Signal des Ferri-Hämoglobins als auch der Signalkomplex der Katalase zeigen bei steigenden Dithionit-Konzentrationen deutliche Veränderungen. Um das Verhalten des Ferri-Hämoglobin-Signals ($g_{\perp}=5,9$) genauer zu untersuchen, wird die relative Signalintensität bestimmt. Dabei werden die Differenzen der jeweiligen Maximalwerte (P_{max}) und die Minimalwerte (P_{min}) des auf einen Verstärkungsfaktor normierten Ferri-Hämoglobin-Signals ($g_{\perp}=5,9$) berechnet und können so grob zur quantitativen Darstellung der Signalveränderungen herangezogen werden. Die so bestimmten relativen Werte korrelieren mit der Anzahl der Spins (vergleiche Kapitel 4.9). Eine Integration der Signalkurve kann wegen der Überlagerung mit den Signalen der Katalase, die zur Verschiebung der Funktionswerte an den

Integrationsgrenzen führt, nicht gut ausgeführt werden. In Abb.37 ist diese relative Signalintensität in Abhängigkeit der Dithionit-Konzentration für das Ferri-Hämoglobin-Signal aufgetragen.

Man erkennt, dass bei niedrigeren Dithionit-Konzentrationen die relativen Intensitäten in einem Bereich von ca. 20% streuen. Erst bei hohen Konzentrationen verschwindet das Ferri-Hämoglobin-Signal vollständig, wie es für den Datenpunkt bei 0.166M Dithionit-Konzentration der Fall ist. Da keine weiteren Zwischenwerte vermessen wurden, kann die Abnahme nicht genauer beschrieben werden. Dithionit ist also in der Lage das Fe(III) des Ferri-Hämoglobin zu Fe(II) zu reduzieren, so dass das charakteristische $g_{\perp}=5,9$ Signal nicht mehr beobachtbar ist.

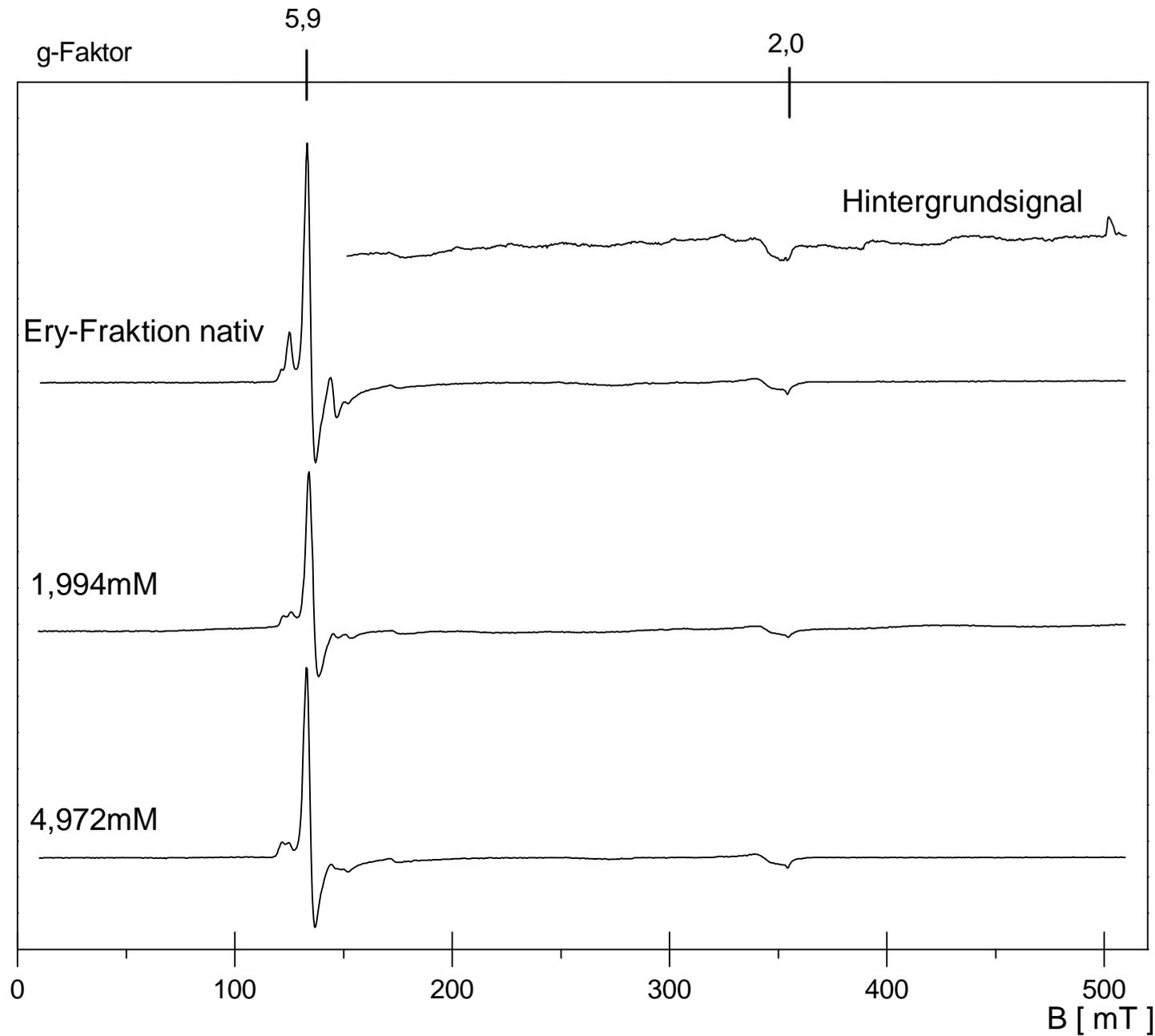


Abb.34:

ERY-Fraktion mit steigender Dithionit-Konzentration (0-4,972mM), Sweep Time=500s, Time const.=200ms, Mod. Ampl.=0,8mT, 4K, nicht auf gleiche Verstärkung normiert;

Hintergrundsignal: Cavity-Dewar-System ohne Probe, gleiche Parameter, stark verstärkt

(in Abb.35 Fortsetzung der Messreihe)

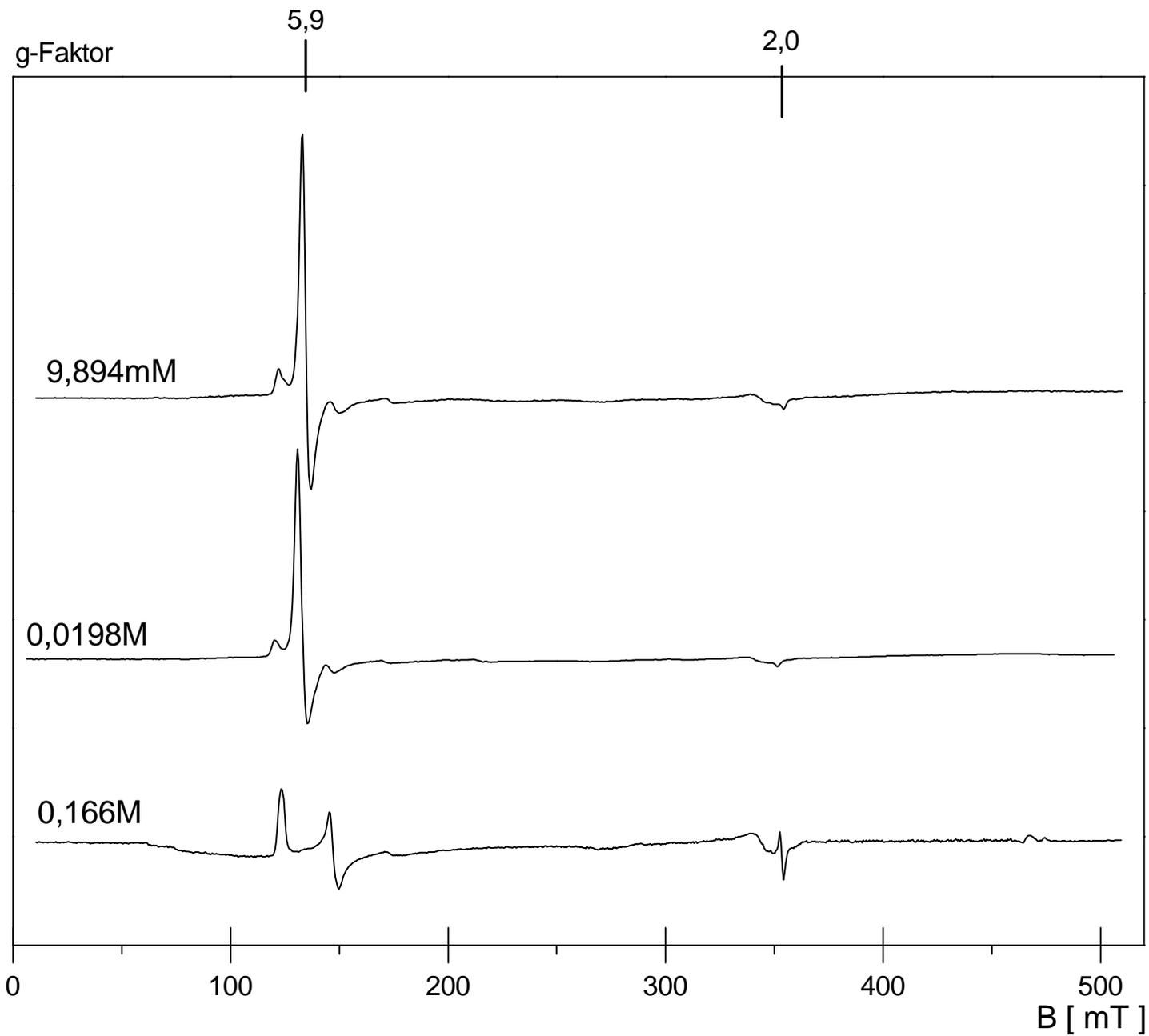


Abb.35:

Fortsetzung der
Messreihe von Abb.34:

ERY-Fraktion mit
steigender Dithionit-
Konzentration
(9,894mM - 0,166M),
Sweep Time=500s,
Time const.=200ms,
Mod. Ampl.=0,8mT,
4K, nicht auf gleiche
Verstärkung normiert

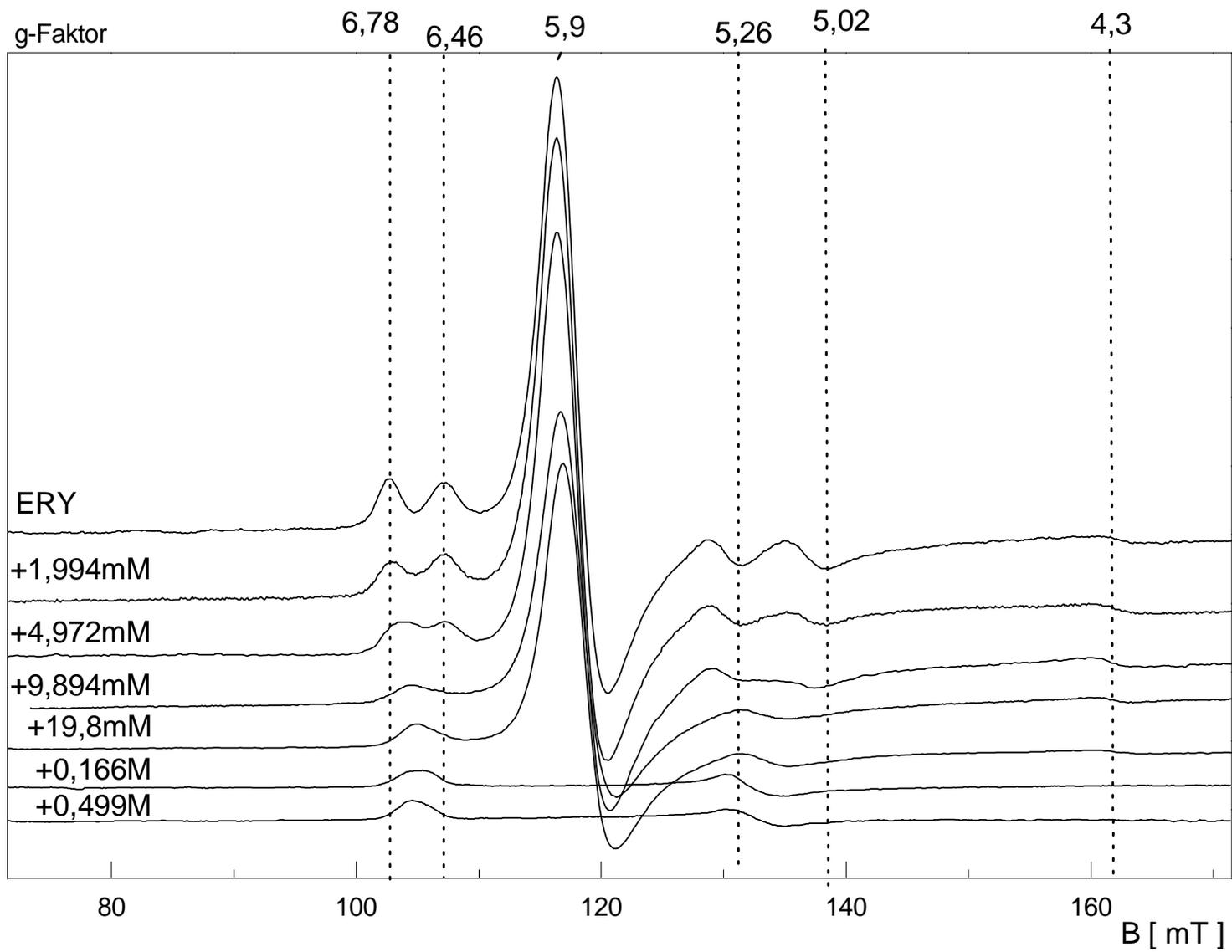


Abb.36:

ERY-Fraktion mit steigender Dithionit-Konzentration (0-0,499M), unterer Feldstärkenbereich (71,5-171,5mT), Sweep Time=200s, Time const.=200ms, Mod. Ampl.=0,5mT, 4K, nicht auf eine Verstärkung normiert

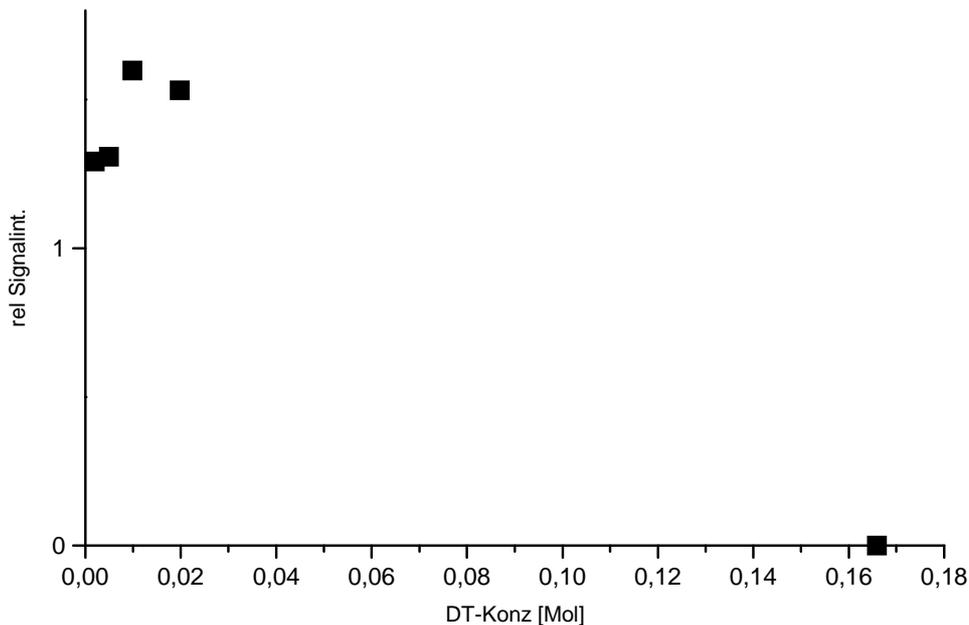


Abb.37: Ferri-Hämoglobin-Signal in Abhängigkeit der Dithionit-Konzentration (Mol), relative Signalintensität ($P_{max}-P_{min}$), 4K

Die Veränderungen der Signalpaare der Katalase sind komplexer. Um eine bessere Auflösung der Signale zu bekommen, wird das überlagernde Signal des Ferri-Hämoglobins vom Signalkomplex subtrahiert (Abb.38). Zur besseren Übersicht sind die Spektren in Abb.38 nicht auf gleiche Verstärkung normiert. Die beiden Signalkomponenten der Katalase ($P1/P4$) $g=(6,78/5,02/1,99(?))$ und ($P2/P3$) $g=(6,46/5,26/1,99(?))$ können mit steigender Dithionit-Konzentration in ein einzelnes rhombisches Signal mit g-Faktoren von $g=(6,67/5,22/1,99?)$ konvertiert werden. Das neue Signal liegt damit zwischen den beiden Signalkomponenten des Ausgangssignals der nativen Katalase. Ein Vergleich der Signalintensitäten deutet dabei nur auf eine geringe Abnahme der Gesamtkonzentration der Katalase-Signale hin, so dass die Reaktion mit Dithionit nicht zu einer Reduktion des Fe(III)-Ions der prosthetischen Gruppe führt, sondern eine Änderung dessen paramagnetischer Eigenschaften bewirkt.

In der ERY-Fraktion ist zusätzlich zu den bereits beschriebenen Signalen ein schwaches Signal im Bereich $g=4,3$ vorhanden (Abb.38), das durch Dithionit reduziert wird. Die Signalintensitäten sind hierbei aber so gering, dass eine weitere Interpretation nicht möglich ist. Insgesamt ist festzuhalten, dass neben den bereits vorhandenen Signalen durch die Reaktion der ERY-Fraktion mit Dithionit keine zusätzlichen Signale erzeugt werden konnten, die auf weitere Metalloproteinspezies hindeuten.

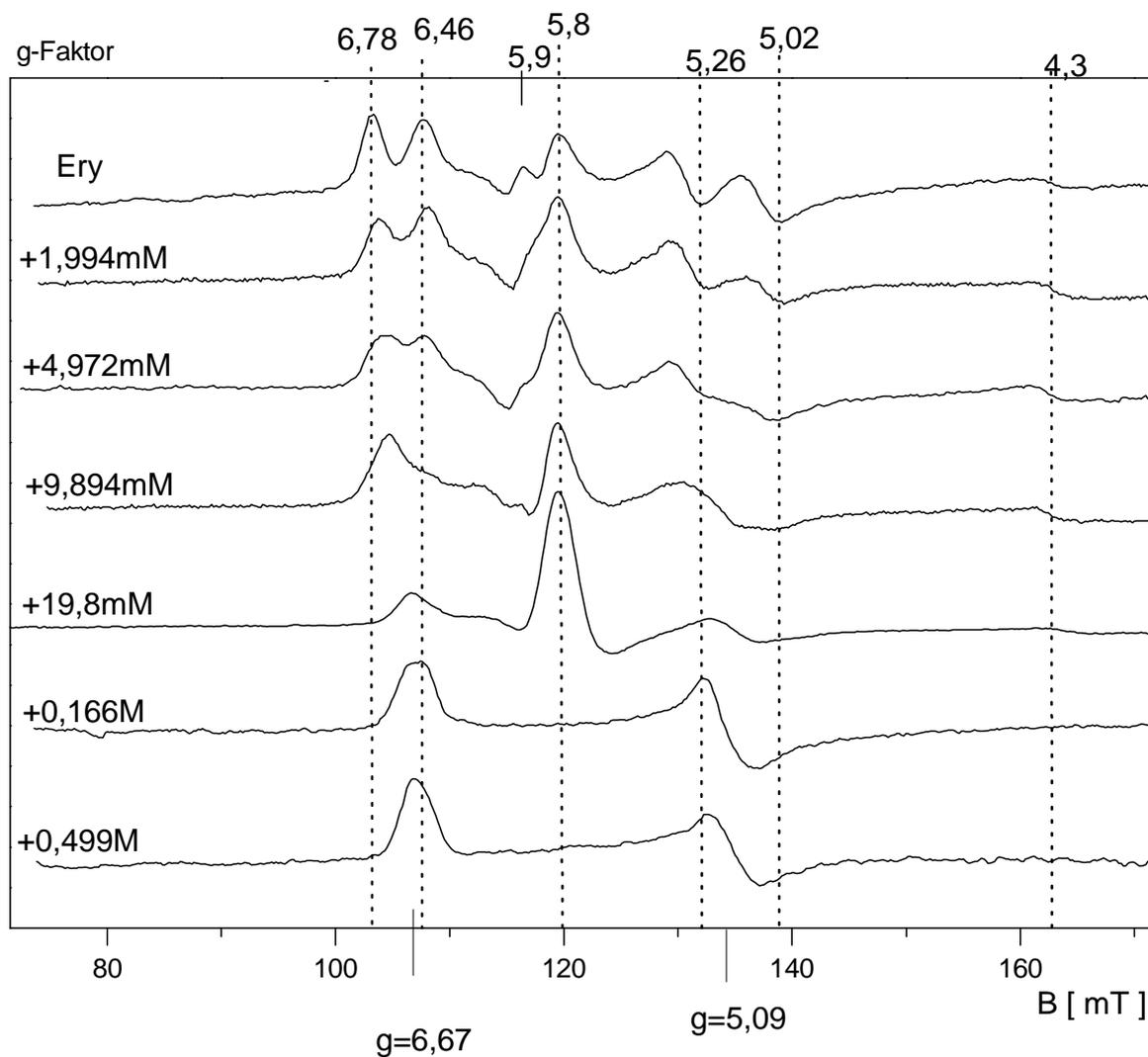


Abb.38: ERY-Fraktion mit steigender Dithionit-Konzentration (0-0,499M), Ferri-Hb-Signal ($g=5,9$) subtrahiert, 4K, nicht auf eine Verstärkung normiert

5.2.3 ERY-FRAKTION / HEXACYANOFERRAT-TITRATIONSREIHE

Im Gegensatz zu Dithionit führt Hexacyanoferrat(III) (Hcf) als starkes Oxidationsmittel über eine Elektronenaufnahme zur Oxidation des Reaktionspartners. In dieser Versuchsreihe sollte die Veränderung der ERY-Fraktion (ERY-Fraktion) und deren Bestandteile in Anwesenheit eines starken Oxidationsmittels untersucht werden. Messungen bei 77K haben auch in dieser Versuchsreihe keine verwertbaren Signale geliefert, so dass nur die bei 4K gemessenen Spektren dargestellt werden. Die Spektren der ERY-Fraktion bei steigender Hexacyanoferrat(III)-Konzentration sind in Abb.39 und Abb.40 abgebildet. In der nativen Probe sind das starke Signal des Ferri-Hämoglobins, sowie die Signalpaare der Katalase erkennbar, deren Veränderungen mit steigender Hexacyanoferrat(III)-Konzentration in diesem Scan über 500mT nicht genau ausgewertet werden können. Im mittleren Feldstärkenbereich bildet sich dagegen mit steigender Hexacyanoferrat(III)-Konzentration (ab 3,33mM) ein breites Signal (über 150mT) um $g=2,72$ aus, das dem Eigensignal des Hexacyanoferrat(III) entspricht (Kapitel 4.5). Da in dieser Versuchsreihe die Veränderungen des Ferri-Hämoglobins und der Katalase genauer untersucht werden sollten, erfolgten zusätzlich Messungen im unteren Feldstärkenbereich (60-180mT). Die Spektren sind in Abb.41 dargestellt und zum besseren Vergleich auf eine Verstärkung normiert. Wie in Abb.41 erkennbar, kommt es mit steigender Hexacyanoferrat(III)-Konzentration zu einer Zunahme der Signalintensität des Ferri-Hämoglobin Signals. Dabei bleiben die Signalform und der g -Faktor unverändert. Um die Signalveränderung grob quantitativ zu erfassen, wird die relative Signalintensität wiederum durch die Differenzbildung der Peak-Extrema bestimmt und gegen die Hexacyanoferrat(III)-Konzentration aufgetragen. Das Ergebnis ist in Abb.42 gezeigt.

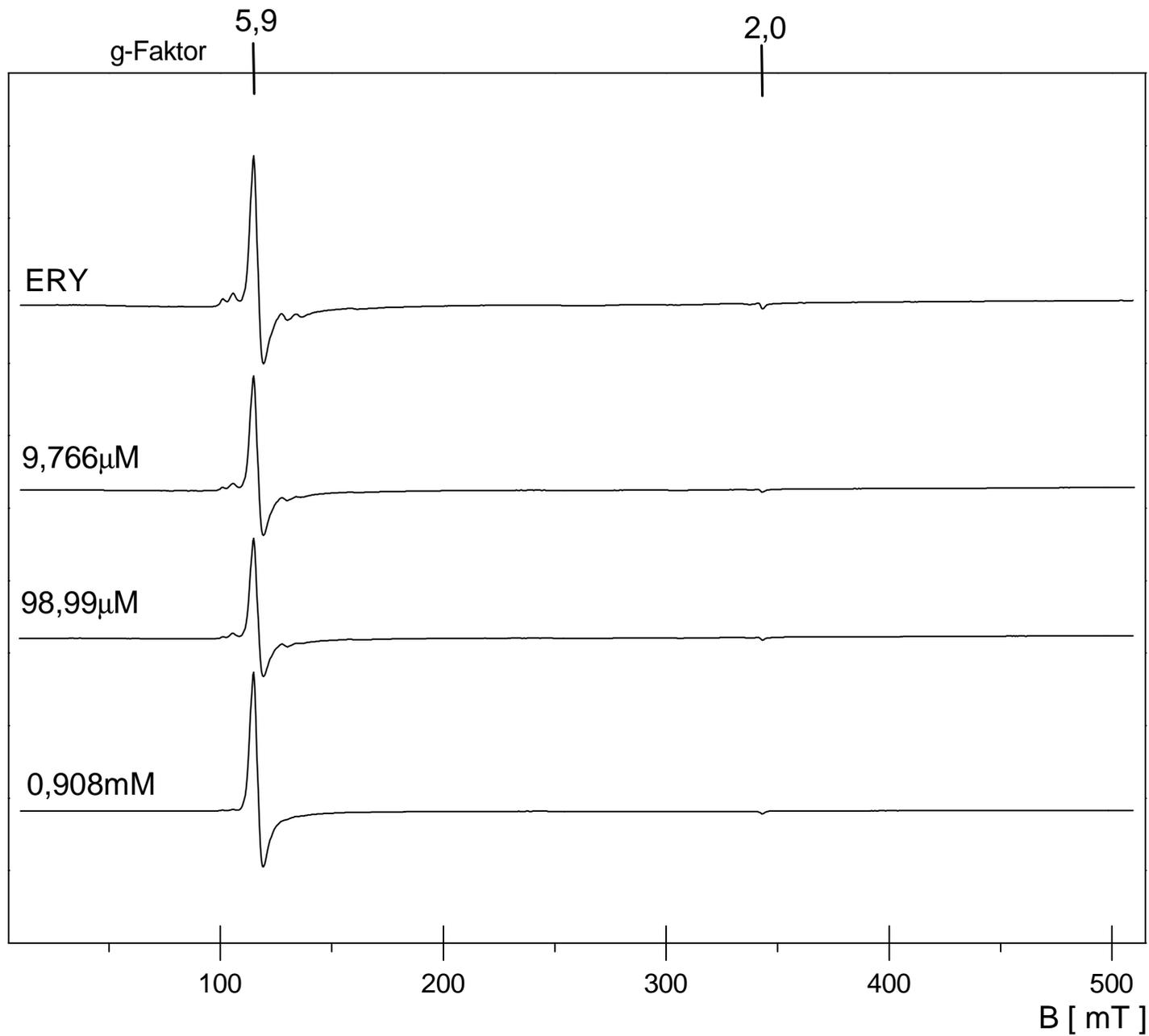


Abb.39:

ERY-Fraktion mit steigender Hexacyanoferrat(III)-Konzentration (0-0,908mM), Sweep Time=671s, Time const.=655ms, Mod. Ampl.=0,8mT, 18,6mW, 4K, nicht auf gleiche Verstärkung normiert

(in Abb.40: Fortsetzung der Messreihe)

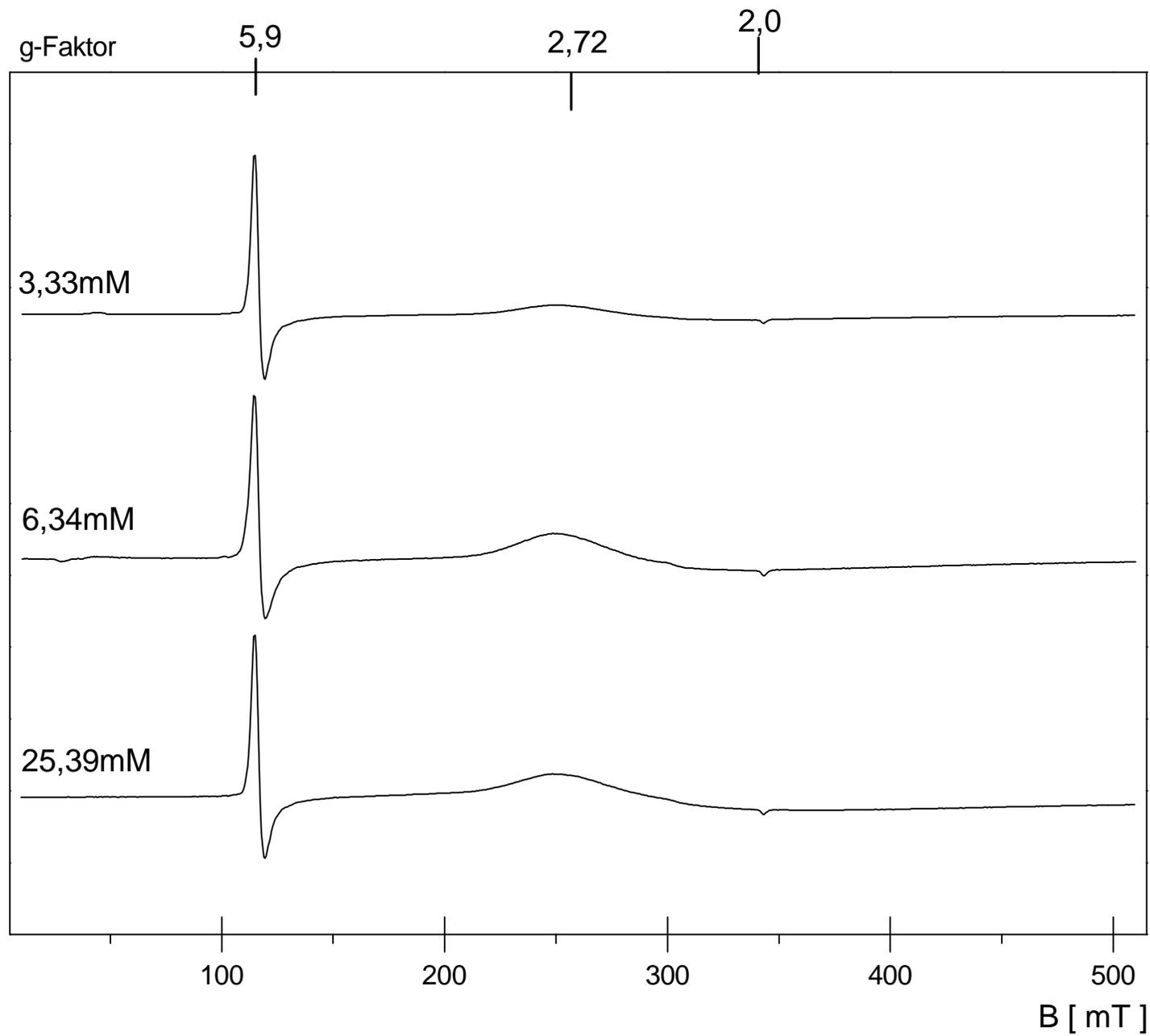


Abb.40:

ERY-Fraktion mit steigender Hexacyanoferrat(III)-Konzentration (3,33-25,39mM), Sweep Time=671s, Time const.=655ms, Mod. Ampl.=0,8mT, 4K, nicht auf gleiche Verstärkung normiert

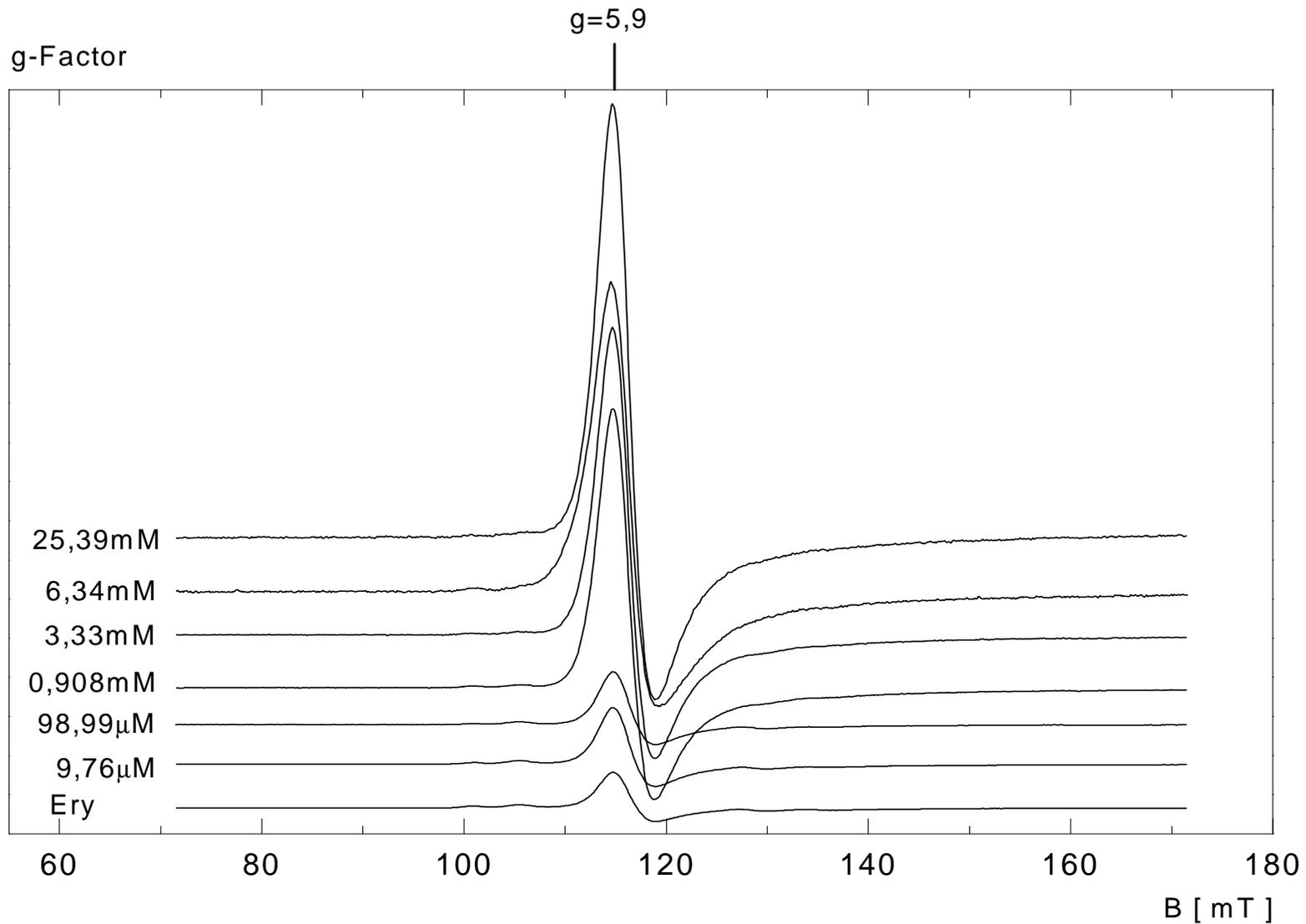


Abb.41:

ERY-Fraktion mit steigender Hexacyanoferrat(III)-Konzentration (0-25,39mM), unterer Feldstärkenbereich (55-180mT), Sweep Time=167s, Time const.=163s, Mod. Ampl.=0,5mT, 18mW, 4K, auf eine Verstärkung normiert

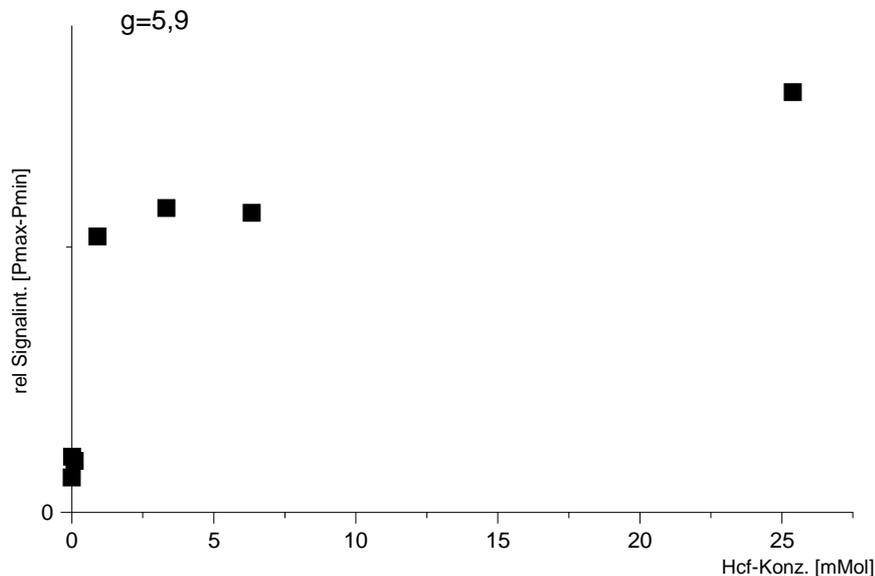
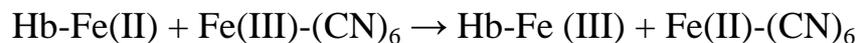


Abb.42: Ferri-Hämoglobin-Signal ($g=5,9$), relative Signalintensität in Abhängigkeit der Hexacyanoferrat(III)-Konzentration (0-25.39mM), 4K

Bereits bei niedrigen Hexacyanoferrat(III)-Konzentrationen kommt es zu einer raschen Zunahme der Signalintensität des Ferri-Hämoglobin Signals. Hexacyanoferrat(III) führt zu einer Oxidation des in der ERY-Fraktion vorhandenen Fe(II)-Hämoglobins. Die Reaktionsgleichung ist im Folgenden vereinfacht dargestellt:



Die Reaktion scheint dabei schnell und vollständig abzulaufen. Bei höheren Konzentrationen des Hexacyanoferrat(III) bildet sich das Eigensignal aus und zeigt damit die vorhandene Menge des Oxidationsmittels an. Gleichzeitig scheint das Ferri-Hämoglobin-Signal dabei einem Grenzwert zuzustreben. Im Extremfall, d.h. bei ausreichender Hexacyanoferrat(III)-Konzentration und Reaktionsdauer wird die Signalstärke des Ferri-Hämoglobin-Signals von der Gesamtmenge des in der Probe enthaltenen Fe(II)-Hämoglobins bestimmt. Dabei wird der in der Probe enthaltene Anteil an Fe(II)-Hämoglobin vollständig in Ferri-Hämoglobin überführt.

Um den Signalkomplex der Katalase detaillierter darstellen zu können, werden die Spektren in Abb.43 im unteren Feldstärkenbereich für die beiden Linien P1 und P2 separat und auf gleiche Verstärkung normiert aufgetragen. Es zeigt sich, dass sich die Signalintensität der beiden Katalase-Signale nicht wesentlich verändert, während das Ferri-Hämoglobin-Signal (am rechten Figurrand) stark zunimmt, sich verbreitert und sich zunehmend auch mit den Linien P1, P2 überlagert. Bei hohen Konzentrationen an Hexacyanoferrat(III) scheinen sich die Katalase-Signale zusätzlich zu verbreitern, was aber wegen der starken Beeinflussung durch das Ferri-Hämoglobin-Signal nicht klar zu erkennen ist. Das Fe-Ion der Häm-Gruppe der Katalase liegt bereits im dreiwertigen Zustand vor, das Redox-Potential des Hexacyanoferrat reicht offensichtlich nicht aus, um einen Übergang in den vierwertigen Zustand zu bedingen. Diese Beobachtung ist bereits aus der Literatur bekannt [WILLIAMS-SMITH und PATEL, 1975]. Die Signalverbreiterung sowohl des Ferri-Hämoglobin-Signals als auch ansatzweise der Katalase-Signale könnte Ausdruck einer Wechselwirkung mit dem paramagnetischen Hexacyanoferrat(III) bei hohen Konzentrationen ($>3,33\text{mM}$) sein. Insgesamt konnten durch Titration mit Hexacyanoferrat(III) keine zusätzlichen ESR-Signale in der ERY-Fraktion generiert werden.

Untersucht wurden auch die vom Erythrozytenkonzentrat abzentrifugierten Fraktionen EP >30 , EP $30/10$ und EP <10 . Nur die Fraktion EP >30 enthielt das Ferri-Hämoglobin-Signal, das nach Reaktion mit Hexacyanoferrat(III) weiter an Intensität zunahm, ähnlich wie bereits für die ERY-Fraktion beschrieben. Die übrigen Fraktionen lieferten keine weiteren Signale. Bei hoher Hexacyanoferrat(III)-Konzentration war nur das Eigensignal nachweisbar. Die Spektren sind hier nicht gezeigt.

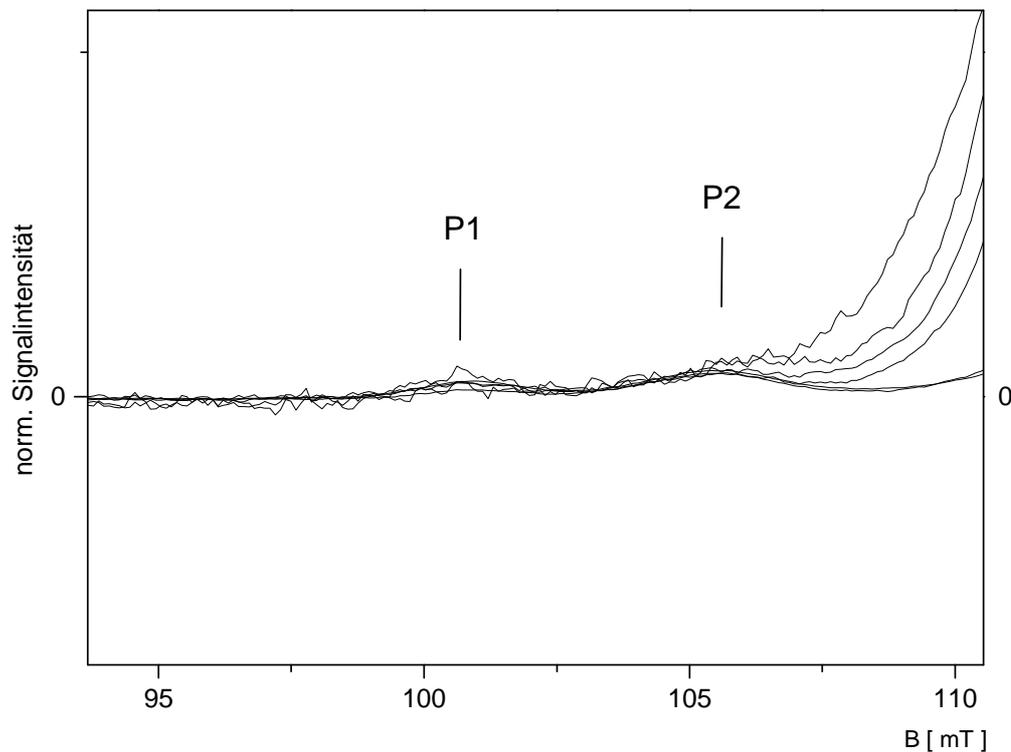


Abb.43: Signale der Katalase mit steigender Hexacyanoferrat(III)-Konzentration, normiert auf das Signal des Ferri-Hb. Sweep Time=500s, Time const.=200ms, Mod. Ampl.=0,8mT, 18mW, 4K

5.2.4 ERY-FRAKTION-BESTRAHLUNGSREIHE

Die Bestrahlung einer organischen Substanz bringt freie Radikale hervor. Dabei kann es entweder zu einer direkten Radikalbildung an den untersuchten organischen Molekülen kommen, oder es werden Radikale in der Lösung oder Matrix generiert, die dann sekundär mit organischen Molekülen reagieren können. Die Radikalentstehung kann mit der ESR-Spektroskopie nachgewiesen werden und liefert Informationen über das Verhalten der organischen Substanz gegenüber ionisierenden Strahlen, ihrer Stabilität und mögliche Folgeprodukte. Aus spektralen Informationen (g-Tensor, Hyperfein-WW) kann auch auf die Radikalstruktur geschlossen werden. Die Lebensdauer der bei Raumtemperatur in

Lösung sehr kurzlebigen Radikale kann durch eine genügend niedrige Temperatur verlängert werden, so dass sie stabilisiert und mittels ESR-Spektroskopie nachweisbar werden. Die hier untersuchten Proben wurden bei einer Temperatur von 77K bestrahlt.

Die Bestrahlung von Blut mit Röntgenstrahlen führt primär zu einer massiven Freisetzung von Elektronen aus den Proteinen und aus der Matrix des Lösungsmittels. Die Häm-Gruppe wirkt dabei als eine Senke für Elektronen, die in der Umgebung erzeugt wurden. An oxigenierten Häm-Gruppen von Hämoglobin oder Myoglobin wurde die Bildung von ESR-aktiven $(\text{FeO}_2)^-$ Zentren nach Anlagerung eines strahlungsinduzierten Elektrons an die (FeO_2) Einheit mit den typischen ESR-Spektren für die α - und β -Untereinheiten beobachtet, die sich bei höheren Temperaturen auch weiter umwandeln können [DAVIDOV, 2004; KAPPL, 1985; KAPPL, 1988]. Daneben können auch mobile Bestrahlungsprodukte in der gefrorenen Matrix zur Radikalbildung beitragen.

Im Rahmen der folgenden Versuche ist das Verhalten der bereits charakterisierten Bestandteile des Blutes auf ionisierende Strahlung untersucht worden. Die Proben der ERY-Fraktion wurden bei 4K vermessen und anschließend bei 77K im ESR-Quarzröhrchen (Finger-Dewar) mit Röntgenstrahlen (X-Ray) bestrahlt. Die Bestrahlungszeiten wurden nach jeder Messreihe jeweils gesteigert, die Gesamtbestrahlungszeit dadurch aufaddiert. Die ESR-Messung erfolgte nach jeder Bestrahlungsepisode bei 77K und 4K.

Die Spektren der Bestrahlungsversuche der ERY-Fraktion sind in Abb.44 über den gesamten Feldstärkenbereich von 500mT dargestellt.

Bereits nach kurzer Bestrahlungsdauer bilden sich im oberen Feldstärkenbereich starke, zusammengesetzte Signale aus, die in diesem Scan nicht weiter differenziert werden können. Im unteren Feldstärkenbereich sind die Veränderungen des Ferri-Hämoglobin-Signals und des Katalase-Signals dagegen nicht so auffällig, so dass dieser Bereich zur besseren Darstellung getrennt betrachtet wird. Die Spektren sind in Abb.45 abgebildet, auf gleiche Verstärkung normiert.

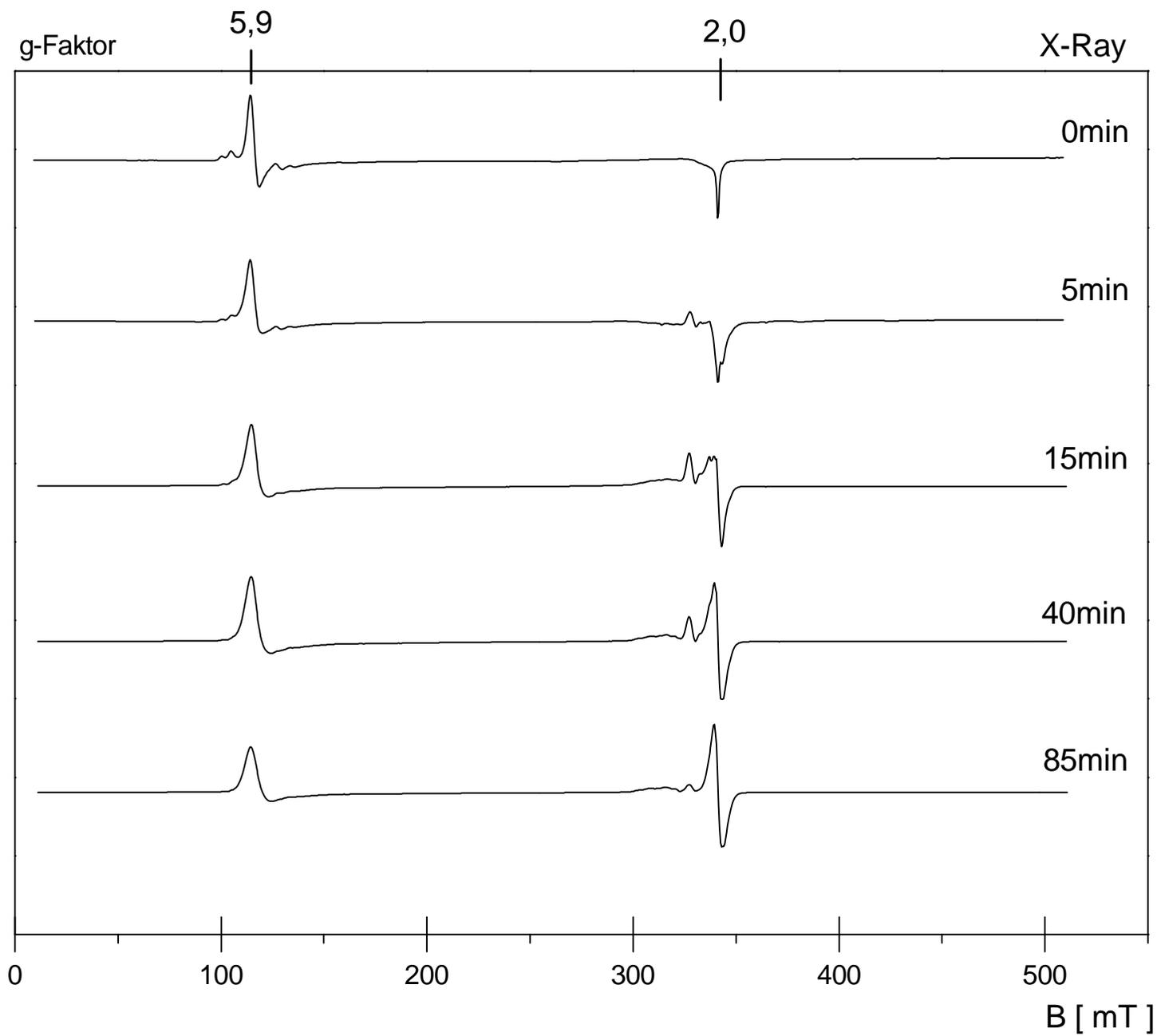


Abb.44:

ERY-Fraktion mit steigender Bestrahlungsdauer (Gesamtbestrahlungszeit der Probe), Sweep Time=671s, Time const.=655s, Mod. Ampl.=0,8mT, 18,6mW, 4K, nicht auf eine Verstärkung normiert

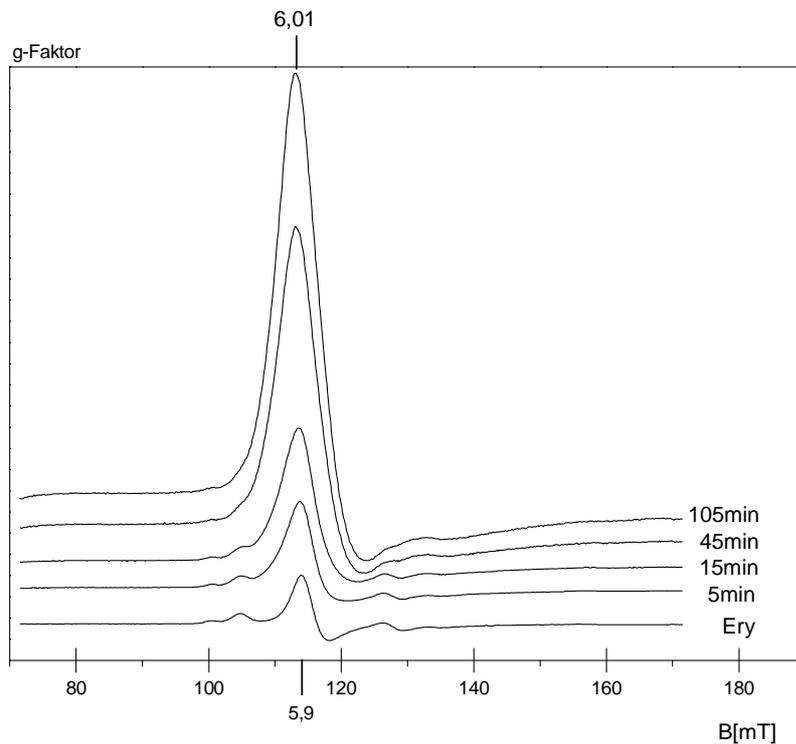


Abb.45: ERY-Fraktion mit steigender Bestrahlungsdauer (Gesamtbestrahlungszeit der Probe), Sweep Time=167s, Time const.=163ms, Mod. Ampl.=0,5mT,18,6mW, 4K, auf gleiche Verstärkung normiert

Betrachtet man das Ferri-Hämoglobin-Signal, dann zeigt sich mit steigender Bestrahlungszeit eine deutliche Zunahme der Signalintensität. Dabei wird das Signal breiter und überlagert zunehmend die Signalaare der Katalase. Bei hohen Bestrahlungsdosen bilden sich an beiden Seiten des Ferri-Hämoglobin-Signals (bei etwa 80 mT bis 140 mT in Abb.45) breite, wenig intensive Signale aus, die mit den Katalase-Signalen überlagern (in Abb.46 mit (*) markiert). Zusätzlich kommt es zu einer geringen g-Faktor-Verschiebung von $g=5,9$ nach $g=6,01$. Zur Verdeutlichung sind die Spektren in Abb.46 aufgetragen, auf eine Verstärkung normiert und übereinander gelegt.

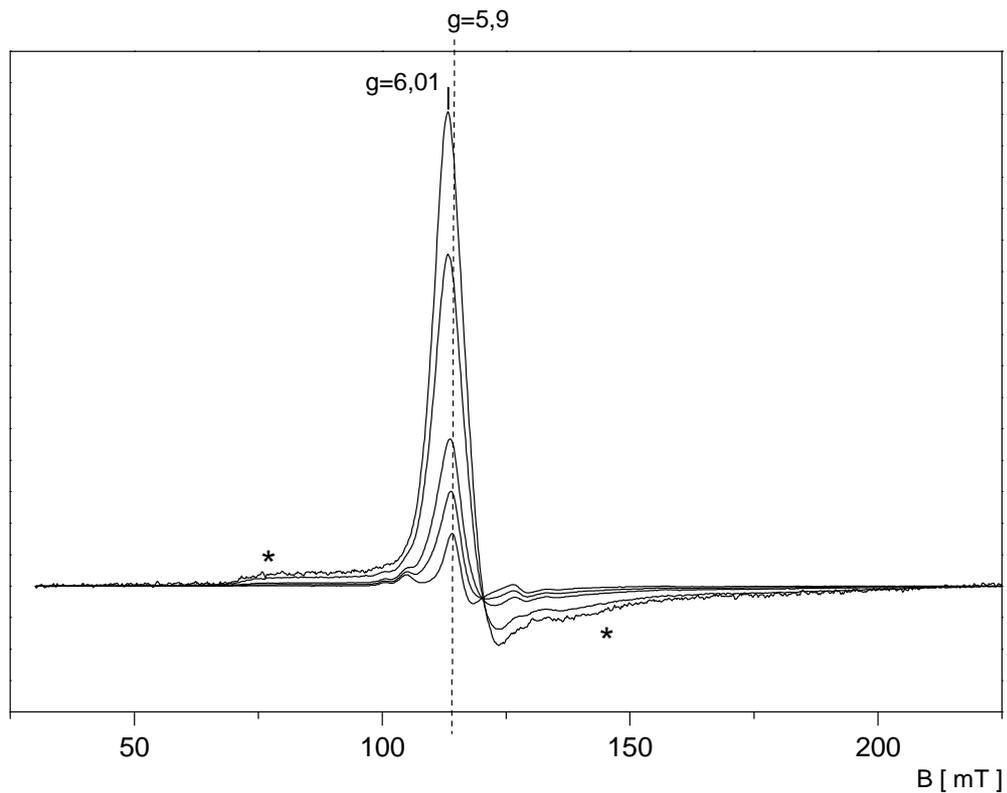


Abb.46: Ery-Hb mit steigender Bestrahlungsdauer, gleiche Probe wie in Abb.45, zur besseren Übersicht übereinander gelegt, auf eine Verstärkung normiert. Das neu entstandene breite Signal ist mit (*) markiert, die gestrichelte Linie ($g=5,9$) verdeutlicht den g -Faktor-Shift

Um das Signalverhalten semiquantitativ zu erfassen, ist die relative Signalintensität als Differenz des Maximal-Peaks und des Minimal-Peaks des Ferri-Hämoglobin-Signals bestimmt und gegen die Bestrahlungszeit aufgetragen worden. Das Ergebnis ist in Abb.47 gezeigt. Mit steigender Bestrahlungsdauer nimmt die Signalintensität bei $g=5,9$ zu. Das Eisen der Häm-Gruppe wird offensichtlich durch die Bestrahlung von Fe(II) zu Fe(III) oxidiert. Ob dabei ein „Grenzwert“ ausgebildet wird, der die vollständige Oxidation des in der Probe enthaltenen Fe(II)-Hämoglobins anzeigt, kann anhand der wenigen Messwerte nicht entschieden werden. Das Ferri-Hämoglobin-Signal wird zusätzlich bei hohen Bestrahlungsdosen breiter, so dass sich der apparente g -Faktor zu etwas höheren

Werten verschiebt. Diese Signaländerung kann durch eine magnetischen Wechselwirkung der Fe(III)-Zentren untereinander oder auch mit benachbarten Radikalen (die z. B. im $g=2$ Bereich einen spektralen Beitrag ergeben) bei ausreichend hoher Konzentration herrühren.

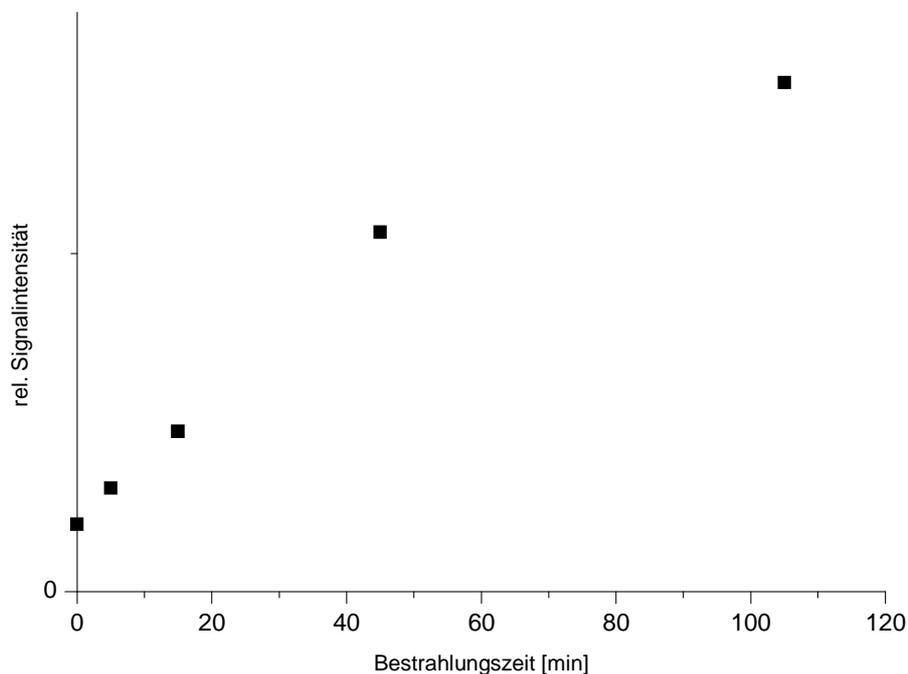


Abb.47: Ferri-Hämoglobin-Signal ($g=5,9$) der ERY-Probe mit steigender Bestrahlungsdauer, relative Signalintensität ($P_{max}-P_{min}$), 4K

Das Verhalten der Katalase-Signale nach Bestrahlung ist schwierig zu beurteilen, da sie mit steigender Bestrahlungsdauer zunehmend vom Ferri-Hämoglobin-Signal und dem sich ausbildenden breiten Signal überlagert werden. In Abb.45 kann man jedoch erkennen, dass sich die Signalintensität und die Lage der Linien zumindest für die kürzeren Bestrahlungszeiten kaum ändern. Zur Verdeutlichung werden die beiden Spektren ohne Bestrahlung und nach 15 min Exposition, auf eine Verstärkung normiert, verglichen (Abb.48). Die markierten Signale P1 und P4 sind vom verbreiterten $g=5,9$ Signal des Ferri-Hämoglobins noch weitgehend

ungestört und zeigen gleiche Intensität, während die inneren Linien (P2, P3) bereits stark überlappt werden. Dies weist darauf hin, dass die Katalase bei diesen applizierten Strahlendosen nicht oder nur wenig beeinflusst wird. Der Anstieg des breiten Signals bei etwa $g=9,4$ ist in Abb.46 und Abb.48 mit einem Stern markiert. Sein Ursprung ist unklar, aber es kann vermutet werden, dass es von, durch die Bestrahlung veränderten Häm-Gruppen des Ferri-Hämoglobins verursacht wird.

Im oberen Feldstärkenbereich um $g=2$ bilden sich bereits nach kurzen Bestrahlungszeiten komplexe, zusammengesetzte Signale aus, wie sie in Abb.49 gesondert gezeigt sind.

Das komplexe Muster bei $g=2$ wird von organischen Radikalen und OH^\bullet -Radikalen verursacht, die durch Sättigung verbreitert sind. Daneben sind strahlungsgenerierte H^\bullet -Radikale (H-Atome) durch ein typisches Dublett von 50,5 mT Aufspaltung charakterisiert (mit (*) in Abb.49 markiert) und erscheinen unter den Aufnahmebedingung (4K und 18mW Leistung) ebenfalls durch partielle Sättigung verzerrt. Zwischen 300 und 320 mT ist eine breite Struktur (g -Faktoren: 2,25; 2,21; 2,14; 2,12) zu sehen, die bei längerer Bestrahlungszeit und etwas höheren Messtemperaturen das typische Muster des $(\text{FeO}_2)^-$ Komplexes zeigt. Aufgrund der günstigen Potentialmulde werden bei Bestrahlung Elektronen an der oxigenierten Häm-Gruppe des Hämoglobins eingefangen und $(\text{FeO}_2)^-$ Zentren gebildet. Die Bildung dieser Zentren ist temperaturabhängig und erfolgt erst bei höheren Temperaturen ab 35K. Auch die Signalintensität der $(\text{FeO}_2)^-$ Zentren ist temperaturabhängig. Sie nimmt mit fallenden Temperaturen stark ab [KAPPL, 1988].

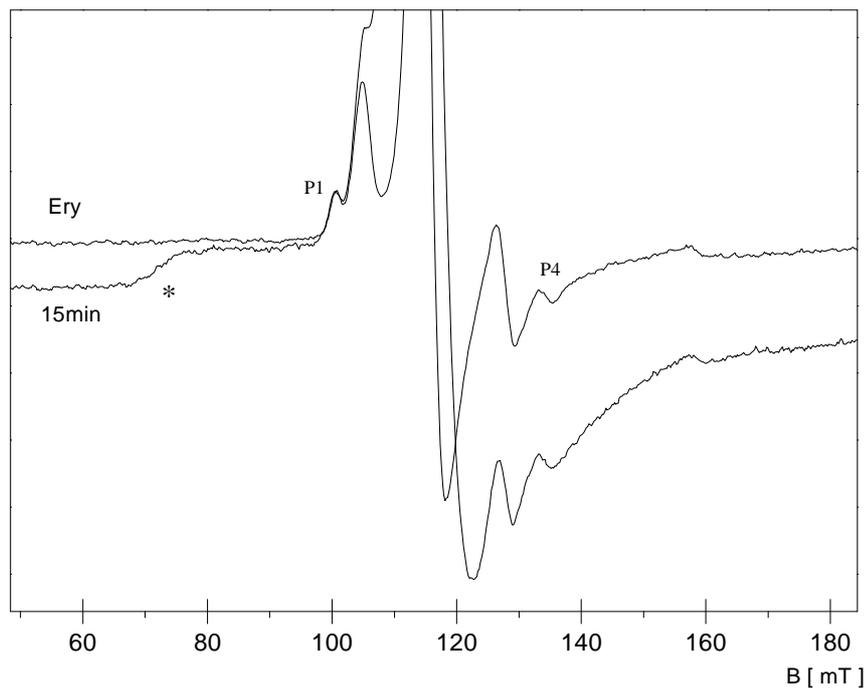


Abb.48: Katalase-Signale (ERY-Fraktion) ohne und nach 15 min Röntgen-Bestrahlung. P1 und P4 zeigen gleiche Intensität. Signalanstieg bei $g=9,4$ ist mit (*) markiert. Sweep Time=167s, Time const.=163ms, Mod. Ampl.=0,5mT, 18mW, 4K

Um die bei tiefen Temperaturen auftretende Sättigung zu vermeiden, ist die ERY-Fraktion auch bei 77K vermessen worden (Abb.50). Man erkennt nun sehr gut aufgelöst die unterschiedlichen $(\text{FeO}_2)^{\cdot-}$ -Zentren der α - und β -Untereinheiten des oxigenierten Hämoglobins sowie H^{\cdot} - und OH^{\cdot} -Signale. Zwischen den Hyperfeinlinien des Hydroxylradikals (in Abb.50 mit (*) markiert) ist eine weitere Linie im 77K-Spektrum zu sehen, die möglicherweise von weiteren organischen Radikalen verursacht wird.

In Abb.49 erkennt man bereits nach kurzer Bestrahlungszeit ein intensives Signal bei $g=2,09$, das bei Temperaturen von 77K nicht mehr vorhanden ist (Abb.50). Dies weist auf eine schnell relaxierende Spezies hin. Der g-Faktor dieser Spezies weist auf das Vorhandensein eines Peroxidradikals (ROO^{\cdot}) hin. Allerdings ist das Relaxationsverhalten dafür eher ungewöhnlich, so dass auch ein Metall-Peroxid

als Möglichkeit in Frage kommt. Zudem werden durch Bestrahlung Radikale im Quarzröhrchen gebildet, die ein scharfes Signal bei $g=2,0$ liefern (Abb.49). Zum Vergleich ist in Abb.51 das im Quarzröhrchen generierte Signal dem Probensignal nach annähernd gleicher Bestrahlungsdauer gegenübergestellt. Dieses wird allerdings bei höheren Modulations-Amplituden ($>0,5\text{mT}$) „geglättet“ und ist daher in den Abb.50 und Abb.52 nicht so scharf abgebildet.

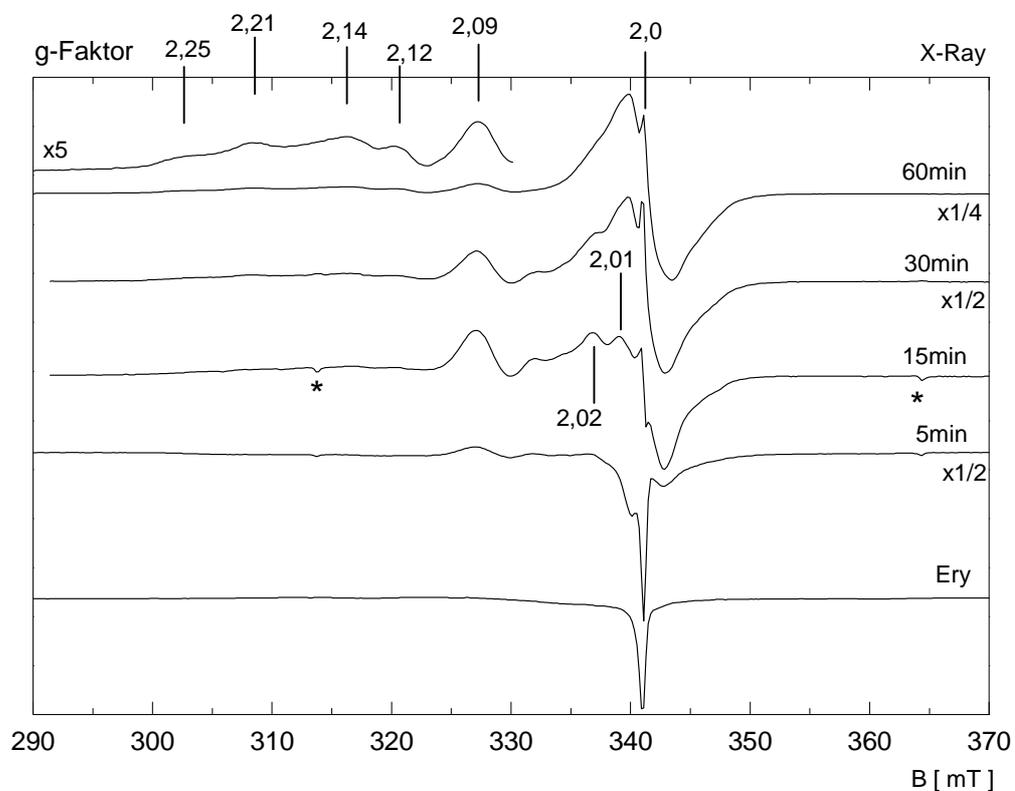


Abb.49: ERY-Fraktion mit steigender Bestrahlungsdauer, Sweep Time=167s, Time const.=163ms, Mod. Ampl.=0,5mT, 18,6mW, 4K, Bestrahlung bei 77K, Signalintensität zur besseren Übersicht angepasst (Multiplikator im Bild angegeben); Beschreibung im Text

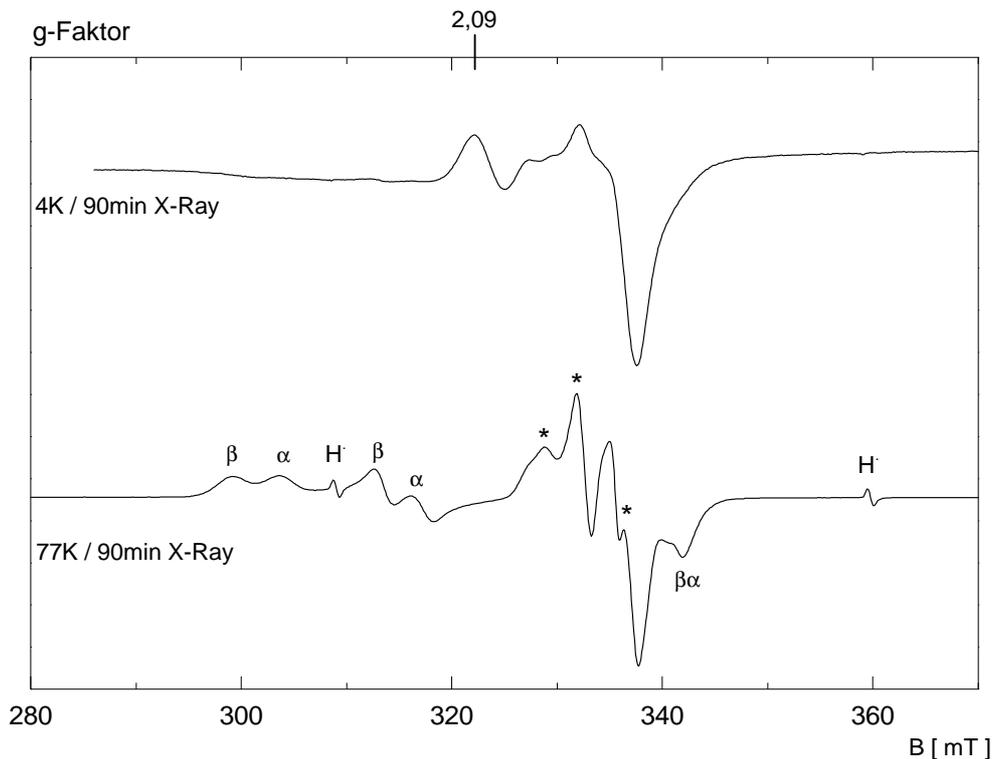


Abb.50: ERY-Fraktion, gemessen bei unterschiedlichen Temperaturen (4K und 77K). Linien der OH^\bullet -Radikale mit (*) gekennzeichnet, Sweep Time=167s, Time const.=163ms, Mod. Ampl.=0,8mT, 18,6mW; Bestrahlung erfolgte bei 77K

Von besonderem Interesse ist die Frage, ob bei der Bestrahlung der ERY-Fraktion nur für diese Fraktion charakteristische Signale in diesem Feldstärkenbereich generiert werden können. Dazu wurden die aufgetrennten Fraktionen EP>30, EP30/10 und EP<10 bei 77K bestrahlt und anschließend bei 4K vermessen. Wie in Abb.52 erkennbar, können bis auf die $(\text{FeO}_2)^-$ -Signale die übrigen spektralen Komponenten in unterschiedlicher Intensität auch in den Plasma-Fraktionen nachgewiesen werden.

Eine weitere Möglichkeit Radikale zu trennen, ist die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Signale (Abb.53). Bereits nach geringem Temperaturanstieg (21K) ist das Signal bei $g=2,09$ nicht mehr nachweisbar. Im weiteren Verlauf bilden sich die typischen Signale der $(\text{FeO}_2)^-$ -Zentren sowie die

H^\bullet - und OH^\bullet -Signale (mit * markiert) aus. Ab einer Temperatur von ca. 103K bildet sich das OH^\bullet -Signal vollständig zurück, bei Temperaturen von 130K bleibt ein zusammengesetztes komplexes Signal übrig, das neben den Bestandteilen der $(\text{FeO}_2)^\ominus$ -Zentren Komponenten von stabilen organischen Radikalen und Radikalen im Lösungsmittel beinhaltet, die im Rahmen dieser Versuche nicht weiter aufgetrennt werden können.

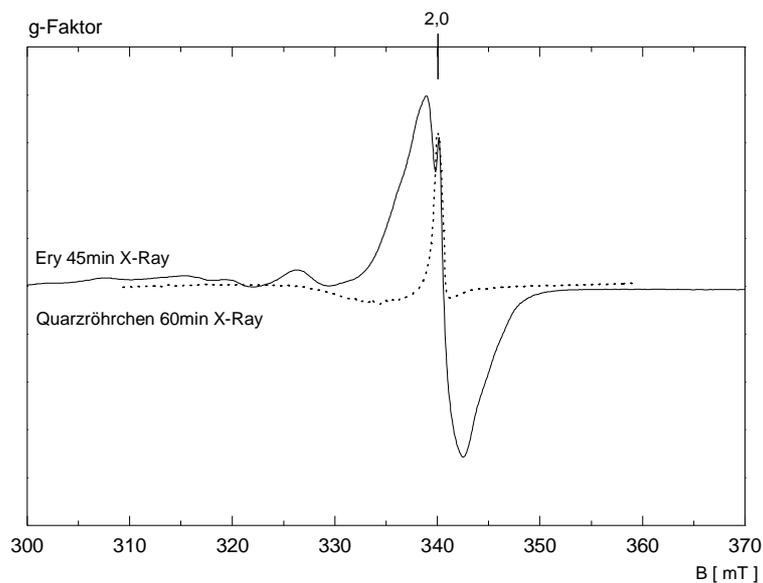


Abb.51: Vergleich Ery-Fraktion (45min X-Ray), Sweep Time=167s, Time const.=163ms, und Quarzröhrchen (gestrichelte Linie, 60min X-Ray), Sweep Time=83s, Time const.=81ms, Mod. Ampl.=0,5mT, 18,6mW, 4K

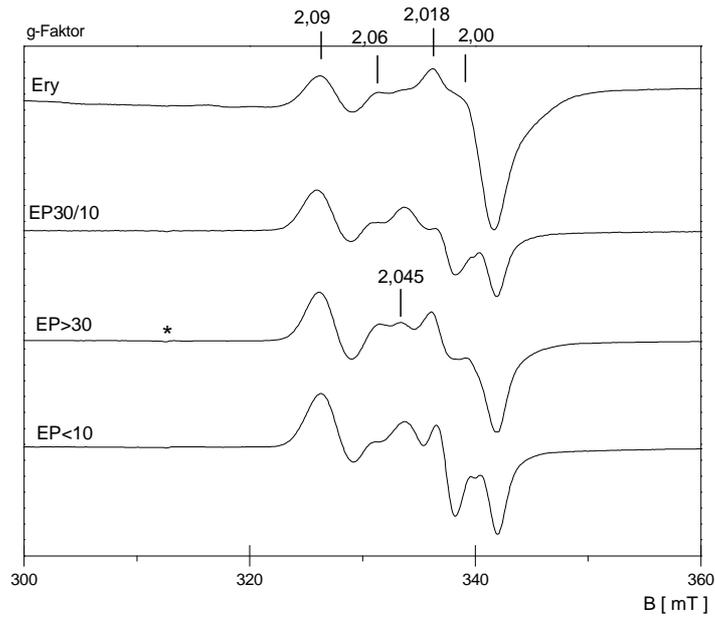


Abb.52: Vergleich der ESR-Signale der ERY-Fraktion mit den Plasma-Fraktionen (EP>30, EP30/10, EP<10), Bestrahlungszeit 90min, Sweep Time=167s, Time const.=163ms, Mod. Ampl.=0,8mT, 18,6mW, 4; \dot{H} -Radikal mit (*) markiert

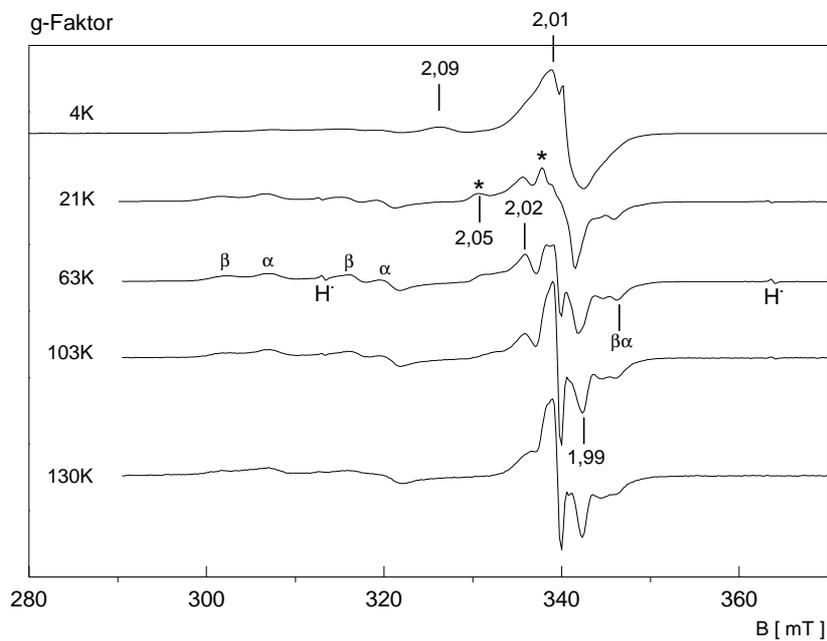


Abb.53: Ery-Fraktion, 60min bestrahlt bei 77K, Temperatur-Variation (4-130K), Sweep Time=41s, Time const.=41ms, Mod. Ampl.=0,5mT, 18,6mW; OH^\bullet -Anteile mit (*) markiert

5.3 HÄMOGLOBIN(A)-FRAKTION

Das ESR-Signal der ERY-Fraktion bei 4K setzt sich hauptsächlich aus den Signalen der Katalase und des Ferri-Hämoglobins zusammen, die in einer komplexen intrazellulären Umgebung vorliegen. Von besonderem Interesse ist dabei das Verhalten des Hämoglobins als Hauptbestandteil der Erythrozyten. In dieser Versuchsreihe wurden Messungen mit aufgereinigtem Hämoglobin(A) (HbA) durchgeführt, um mögliche Unterschiede im Verhalten des intrazellulären und des frei gelösten Hämoglobins heraus zu arbeiten. Nachdem die Zugabe von Hexacyanoferrat(III) in der ERY-Fraktion lediglich zu einer Signalzunahme des Ferri-Hämoglobin-Signals, d.h. zu dem hinreichend bekannten Oxidationsprozess führte, wurden Untersuchungen mit Hexacyanoferrat(III) nicht durchgeführt.

5.3.1 HÄMOGLOBIN(A) / DITHIONIT-TITRATIONSREIHE

Aufgereinigtes, freies Hämoglobin(A) wurde mit steigender Konzentration an Dithionit versetzt. Nachdem die Auswertung der Signale der ERY-Fraktion hauptsächlich bei Temperaturen von 4K erfolgte, beschränkt sich die Untersuchung der HbA Signale auch nur auf diesen Temperaturbereich. Die Messungen bei 77K erbrachten ähnlich den Versuchen der ERY-Fraktion nur schwache, von Artefakten überlagerte Signale (Spektren nicht gezeigt). In Abb.54 sind die ESR-Spektren der Hämoglobin(A)-Probe bei steigender Dithionit-Konzentration über den gesamten Feldstärkenbereich von 500mT dargestellt.

Als natives Signal erkennt man in Abb.54 das Ferri-Hämoglobin-Signal mit $g_{\perp}=5,9$ und $g_{\parallel}=2$, das bei steigender Dithionit-Konzentrationen abnimmt bis es schließlich bei hohen Konzentrationen nicht mehr nachweisbar ist. Das Linienmuster der Katalase fehlt vollständig. In Abb.55 ist das Verhalten der Signalintensität bei $g=5,9$ quantitativ erfasst. Ähnlich den Ergebnissen der ERY-Fraktion führt Dithionit auch hier erwartungsgemäß zu einer Reduktion des Häm-Eisens von Fe(III) zu Fe(II).

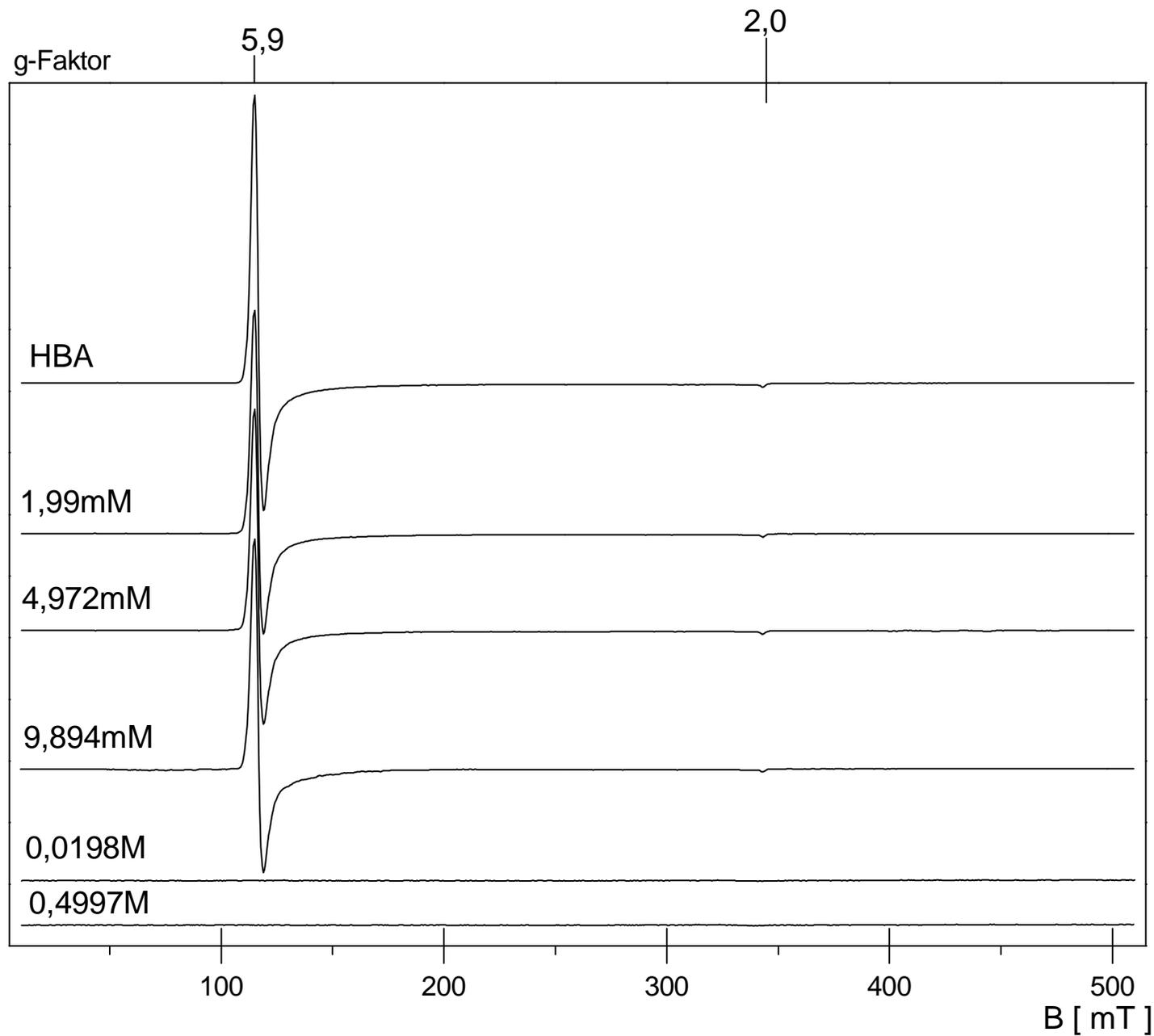


Abb.54

*Aufgereinigtes
Hämoglobin(A) mit
steigender Dithionit-
Konzentration,
Sweep-Time=671s,
Time const.=655ms,
Mod. Ampl.=0,8mT,
18,6mW, 4K*

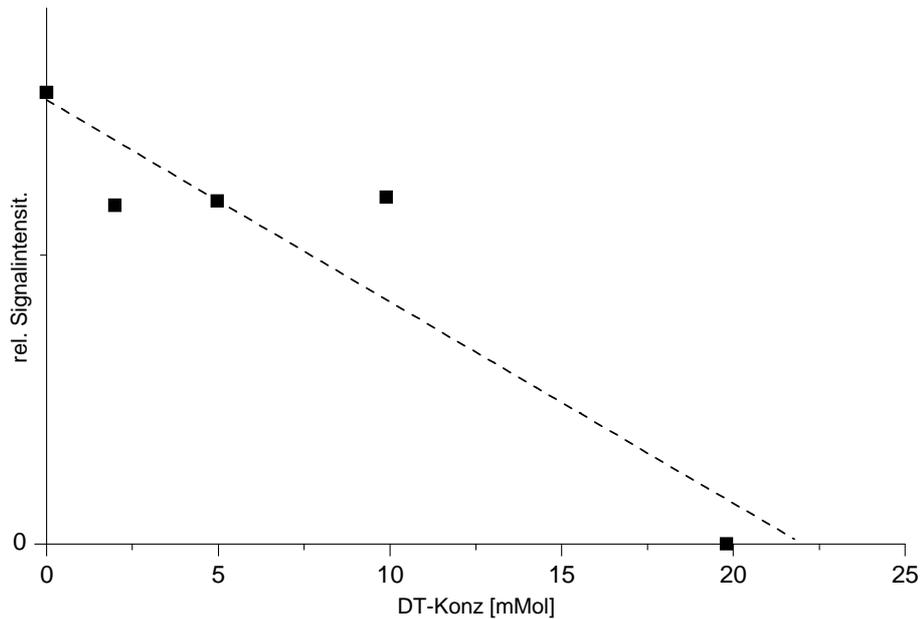


Abb.55: relative Signalintensität des Ferri-Hämoglobin-Signals ($g=5,9$) in Abhängigkeit der Dithionit-Konzentration, 4K

5.3.2 HÄMOGLOBIN(A)–BESTRAHLUNGSREIHE

Die Veränderungen der Signale der ERY-Fraktion nach Bestrahlung sind komplex. Um auch hier eine weitere Separation der Signale zu erhalten, ist analog den Versuchen der ERY-Fraktion aufgereinigtes Hämoglobin(A) mit unterschiedlicher Dauer bei 77K bestrahlt worden. Die ESR-Messung erfolgte auch hier bei 4K jeweils zwischen den einzelnen Bestrahlungseinheiten. In Abb.56 sind die Spektren der Hämoglobin(A)-Probe mit steigender Bestrahlungsdauer über den gesamten Feldstärkenbereich (500mT) dargestellt.

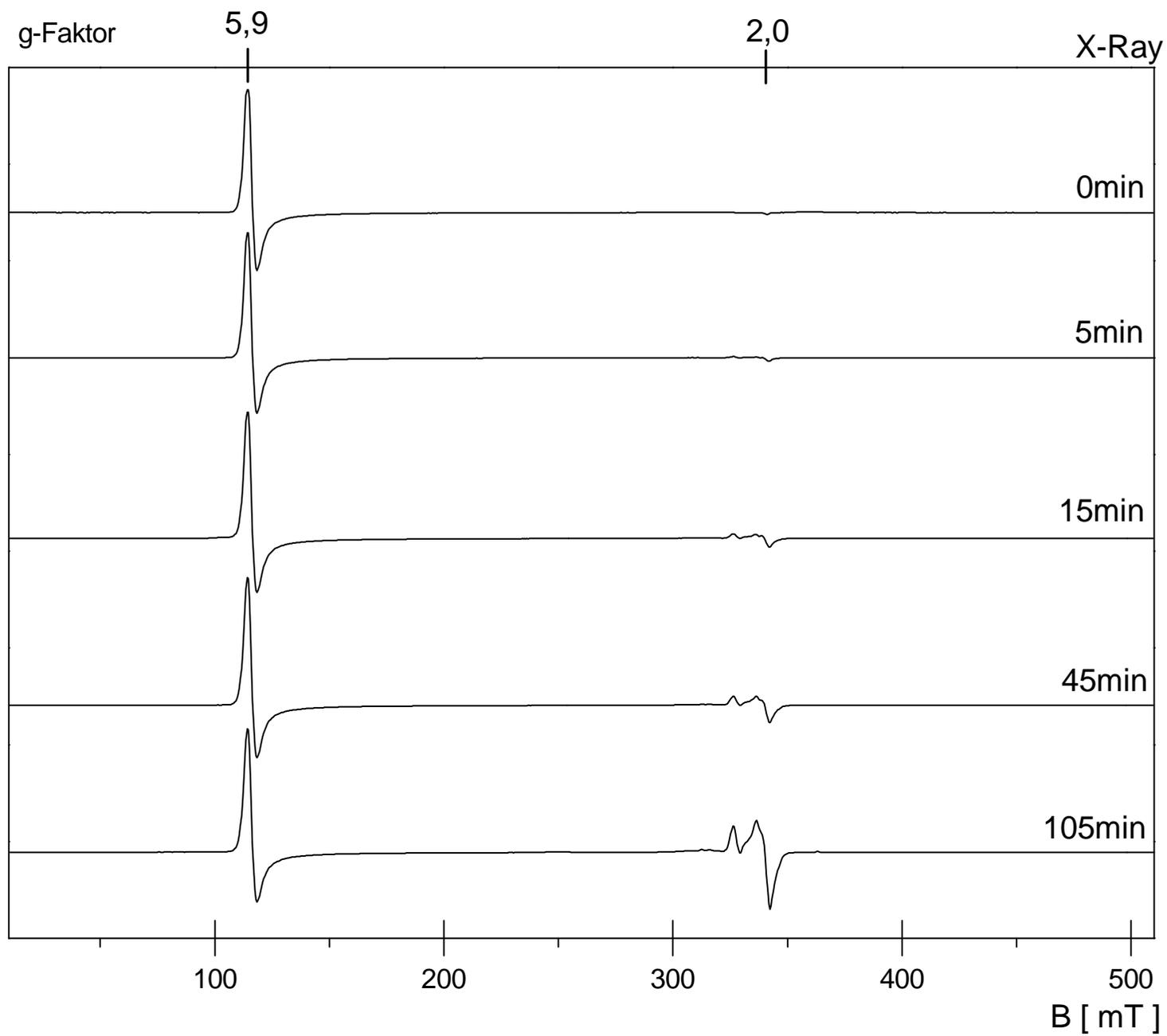


Abb.56:

Hämoglobin A (HbA) mit steigender Bestrahlungsdauer, Sweep Time=671s, Time const.=655ms, Mod. Ampl.=0,8mT, 4K, nicht auf eine Verstärkung normiert

Zur besseren Übersicht sind die Spektren nicht auf eine Verstärkung normiert. Ähnlich den Versuchen der ERY-Fraktion werden im oberen Feldstärkenbereich komplexe, zusammengesetzte Signale generiert, während die Veränderung des Ferri-Hämoglobin-Signals im unteren Feldstärkenbereich scheinbar nur geringfügig ist.

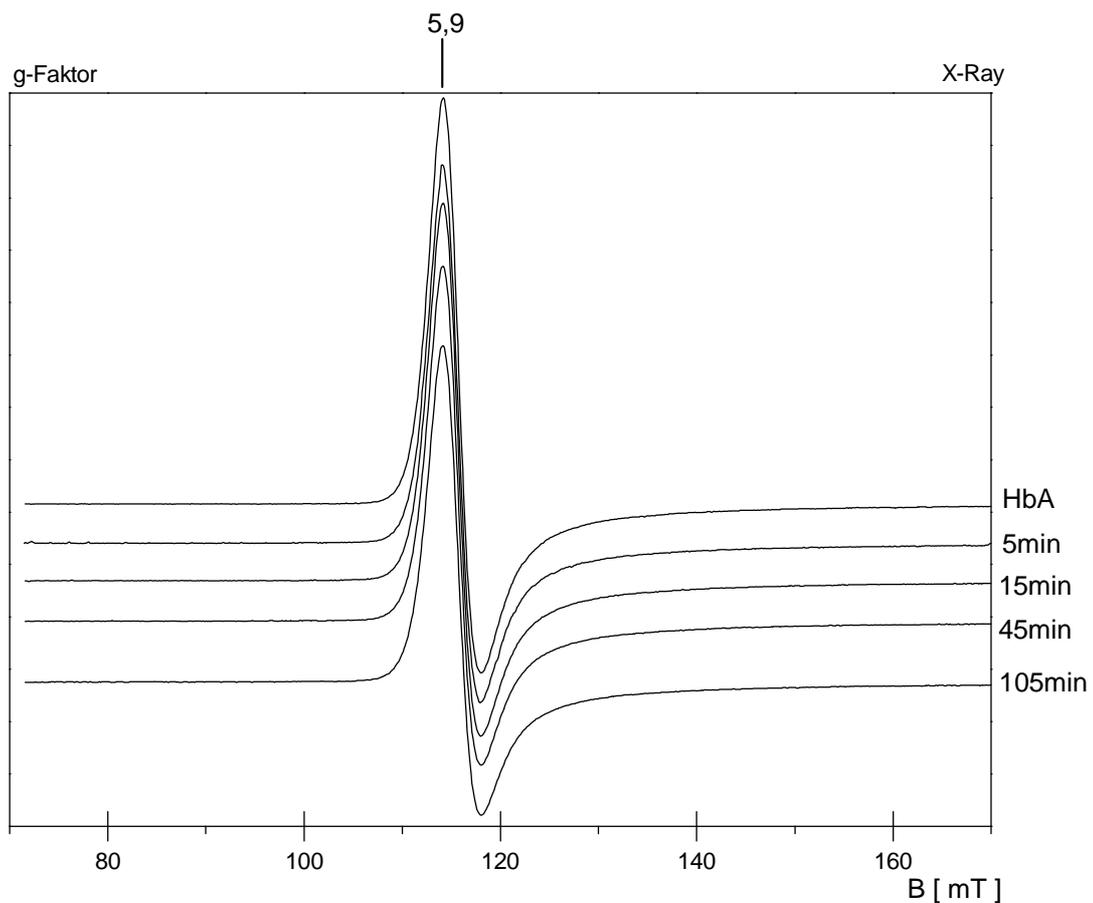


Abb.57: Hämoglobin A (HbA) mit steigender Bestrahlungsdauer, unterer Feldstärkenbereich, Sweep Time=167s, Time const.=163ms, Mod. Ampl.=0,5mT, 4K, 18,5mW, auf eine Verstärkung normiert

Zur besseren Darstellung des Signalverhaltens des Ferri-Hämoglobins erfolgten Messungen im unteren Feldstärkenbereich. Die Spektren sind in Abb.57 abgebildet und auf eine Verstärkung normiert. Man erkennt, dass das Signal in

seiner Form mit steigender Bestrahlungsdauer unverändert bleibt, während sich das Ferri-Hämoglobin-Signal der ERY-Fraktion mit steigender Bestrahlungsdauer deutlich verbreitert hat. Auch lässt sich eine Verschiebung des g-Faktors, wie sie in der ERY-Fraktion beobachtet wurde nicht nachweisen.

Trägt man die relative Signalintensität der Peak-Maxima gegen die Bestrahlungszeit auf, so nimmt das Signal des Ferri-Hämoglobins mit steigender Bestrahlungszeit allmählich ab (Abb.58), ohne dass es zu einer vollständigen Reduktion kommt. Die Bestrahlung führt zu einer Reduktion des Ferri-Hämoglobins von Fe(III) zu Fe(II). Die in dieser Versuchsreihe angewandte Bestrahlungsdosis reicht aber für eine vollständige Reduktion des Ferri-Hämoglobin-Signals nicht aus. Hier zeigt sich der entscheidende Unterschied zum Verhalten der ERY-Fraktion (Kap. 5.2.4), bei der im gleichen Dosisbereich eine deutliche Zunahme der $g=5,9$ „high-spin“ Ferri-Hämoglobin Species beobachtet wurde.

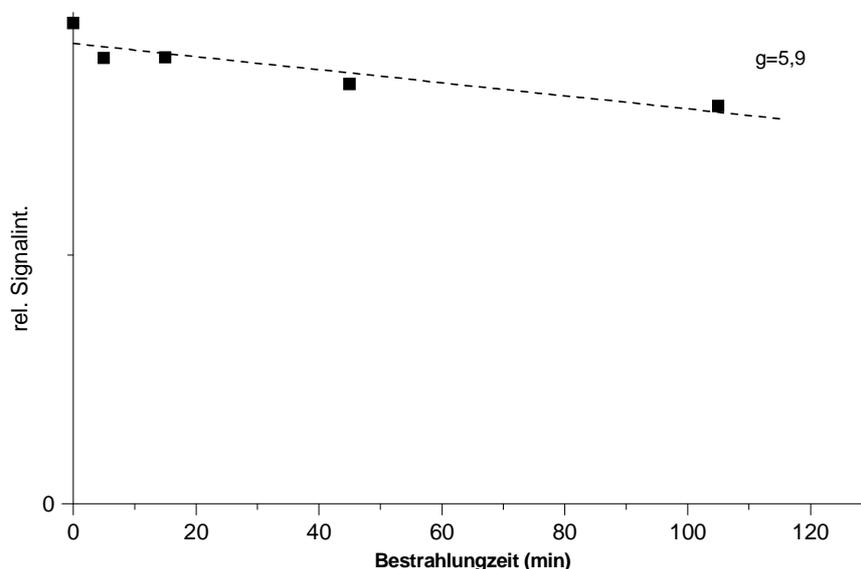


Abb.58: Signalintensität des Ferri-Hämoglobin-Signals (HbA) bei $g=5,9$ in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer, 4K

Die Veränderungen im oberen Feldstärkenbereich sind auch in diesen Versuchen komplex und zur besseren Übersicht in Abb.59 gesondert dargestellt. Auch hier erkennt man bereits nach geringer Bestrahlungzeit die charakteristischen Signale der H^\bullet -Radikale. Mit zunehmender Bestrahlungsdauer bilden sich zusätzlich die rhombischen Anteile der α - und β -Ketten des $(\text{FeO}_2)^-$ des oxigenierten Hämoglobins aus, die zur Verdeutlichung vergrößert dargestellt sind. Auch hier ist die g-Tensorkomponente bei $g_z = 1.969$ der α - und β -Kette von den intensiven Signalen des Hydroxyl-Radikals und der nicht weiter differenzierbaren Radikale bei $g=2$ überlagert. Im Gegensatz zum $g=5,9$ -Signal ist das Verhalten in diesem Bereich praktisch identisch zu den Beobachtungen der ERY-Fraktion nach Bestrahlung.

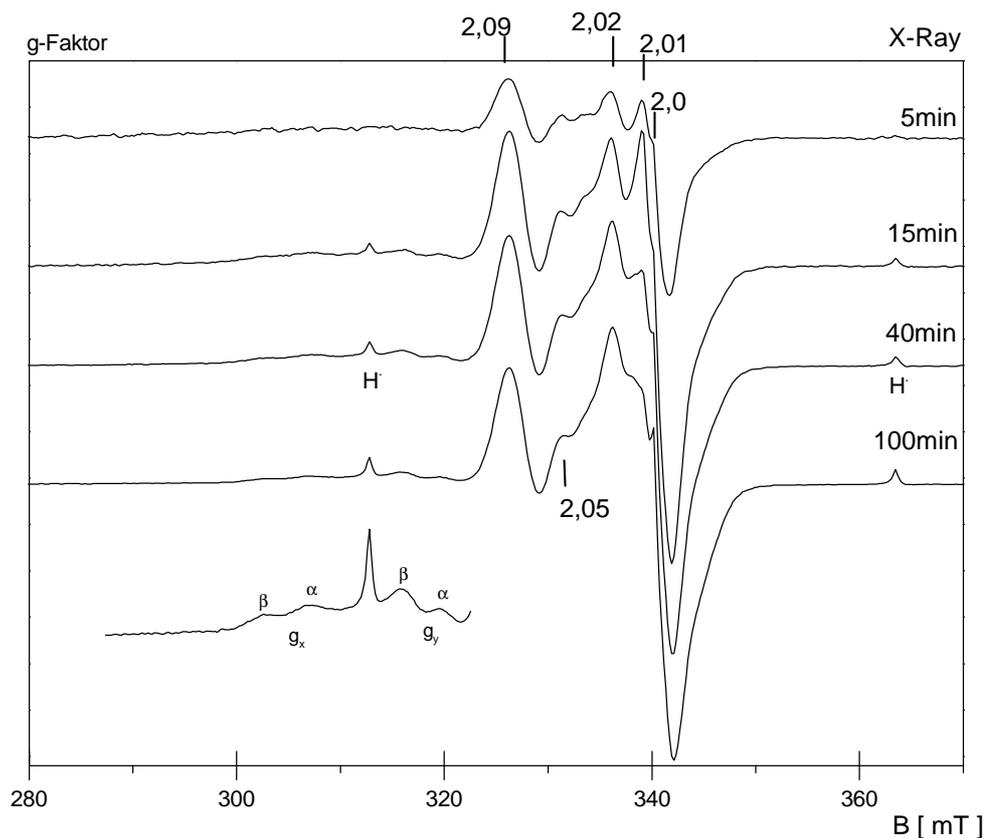


Abb.59: HbA mit steigender Bestrahlungsdauer, oberer Feldstärkenbereich (280-370mT), Sweep Time=167s, Time const.=163ms, Mod. Ampl.=0,5mT, 18mW, 4K, nicht auf gleiche Verstärkung normiert, Signalanteil der $(\text{FeO}_2)^-$ - Zentren vergrößert dargestellt

5.4 PLASMA-FRAKTION

Blut besteht aus zellulären und plasmatischen Anteilen, die beide paramagnetische Komponenten enthalten und damit einen Beitrag zum ESR-Spektrum liefern können. Um eine bestmögliche Trennung und Zuordnung der sich überlagernden Signale zu den Bestandteilen des Blutes zu erreichen, wurden neben Messungen an Erythrozytenkonzentraten auch Messungen an Plasmakonserven (FFP="Fresh-Frozen-Plasma") durchgeführt. Während die Erythrozytenkonzentrate hauptsächlich Erythrozyten und nur wenig Plasma beinhalten, bestehen die Plasmakonserven aus Blutserum und sind weitgehend frei von Erythrozyten und anderen zellulären Bestandteilen. Analog den Versuchen der Erythrozytenkonserven erfolgte auch hier die weitere Auftrennung der Plasmakonserven durch Zentrifugation gegen eine semipermeable Membran, um Fraktionen mit unterschiedlichen Molekulargewichten zu separieren ($P > 30$, $P_{30/10}$ und $P < 10$). Die Methode ist im Kapitel 4.3 beschrieben.

Abb.60 zeigt die ESR-Spektren der Plasma-Fraktion ($P > 30$) bei Temperaturen von 77K und 4K im Vergleich mit dem Hintergrundsignal des Cavity-Dewar-Systems im jeweiligem Temperaturbereich. In beiden Temperaturbereichen erkennt man ein charakteristisches Triplett bei $g=4,3$, das dem Fe(III)-Transferrin zugeordnet werden kann (Kapitel 3.6.3). Im Gegensatz zu den Messungen der ERY-Fraktion ist das Transferrin-Signal bereits bei 77K gut darstellbar und die Intensität zwischen den einzelnen Chargen schwankt nicht so stark (Spektren nicht gezeigt). Allerdings sind die Signale bei 4K deutlich intensiver und weniger von Artefakten überlagert, so dass auch im Bereich $g=9,3$ das typische Signal des unteren Kramer-Dubletts des Fe(III)-Transferrins deutlich besser aufgelöst ist (Kapitel 3.6.3).

Im oberen Feldstärkenbereich lässt sich bei 77K ein Signal mit einer breiten Schulter bei $g=2,06$ darstellen, das vom Hintergrundsignal abgegrenzt werden kann. Es könnte von dem im Plasma vorhandenem kupferhaltigem Protein Caeruloplasmin stammen [FEE, 1975; ONORI, 1981].

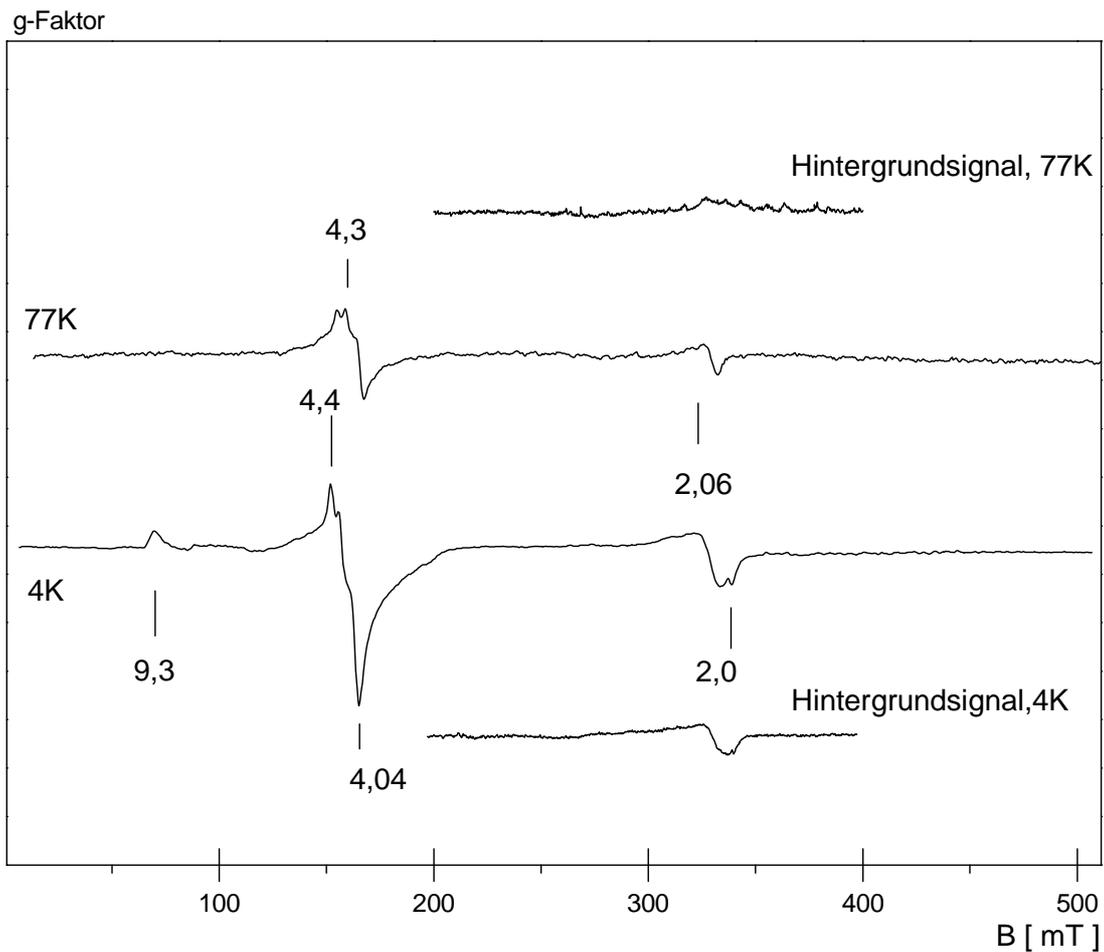


Abb.60: ESR-Spektrum der Plasma-Fraktion ($P > 30$) bei 77K und 4K, Sweep Time=335s, Time const.=655ms, Mod. Ampl.=0,8mT, 18,6mW

Bei Temperaturen von 4K ist dieses Signal deutlich stärker vom Hintergrundsignal überlagert (Abb.60). Zudem erkennt man ein schmales Signal bei $g=2$, das in den Proben der ERY-Fraktion (Abb.33) in dieser Form nicht nachweisbar ist und somit möglicherweise von einer, nur im Plasma vorkommenden Spezies herrühren könnte. Dieses Signal kommt in den einzelnen Chargen in unterschiedlicher Intensität vor. Vergleicht man Ergebnisse aus der Literatur, so wird ein ähnliches Signal beschrieben, das allerdings nicht im Blutplasma, sondern in der zellreichen Erythrozyten-Fraktion menschlichen Blutes vorkommt und als zellgebundenes Radikal interpretiert wird [DIMITRI, 1997]. Eine eindeutige Zuordnung dieses Signals zu einer Radikalspezies gelingt im Rahmen dieser Versuche nicht.

Nachdem die Signale, vor allem im unteren Feldbereich, bei 4K deutlich besser zu beobachten sind, erfolgten die weiteren Messungen im Wesentlichen in diesem Temperaturbereich.

Zur Charakterisierung des Fe(III)-Transferrin-Signals wurden zunächst Messungen bei unterschiedlichen Mikrowellen-Leistungen durchgeführt. Die Spektren sind in Abb.61 gezeigt.

Mit steigender Mikrowellenleistung nimmt die Intensität der einzelnen Komponenten des Fe(III)-Transferrin-Signals zunächst zu, um bei hohen Mikrowellenleistungen (56mW) deutlich verzerrt zu werden. Zur genaueren Auswertung können die Maximalwerte der einzelnen Signale (Abs. Peaks) bestimmt und gegen die Mikrowellenleistung aufgetragen werden. Das Ergebnis für die Signale $g=9$, $g=4,4$ und $g=4,3$ ist in Abb.62 dargestellt. Dabei zeigt sich, dass mit steigender Mikrowellenleistung die Signale des mittleren Kramer-Dubletts abgesättigt werden, wohingegen das Signal des unteren Kramer-Dubletts ($g=9,3$) weiter an Intensität zunimmt. Bei hohen Mikrowellenleistungen werden dann beide Signalgruppen verzerrt, eine genaue Bestimmung der Peak-Maxima der Signale der mittleren Kramer-Dubletts gelingt nicht mehr.

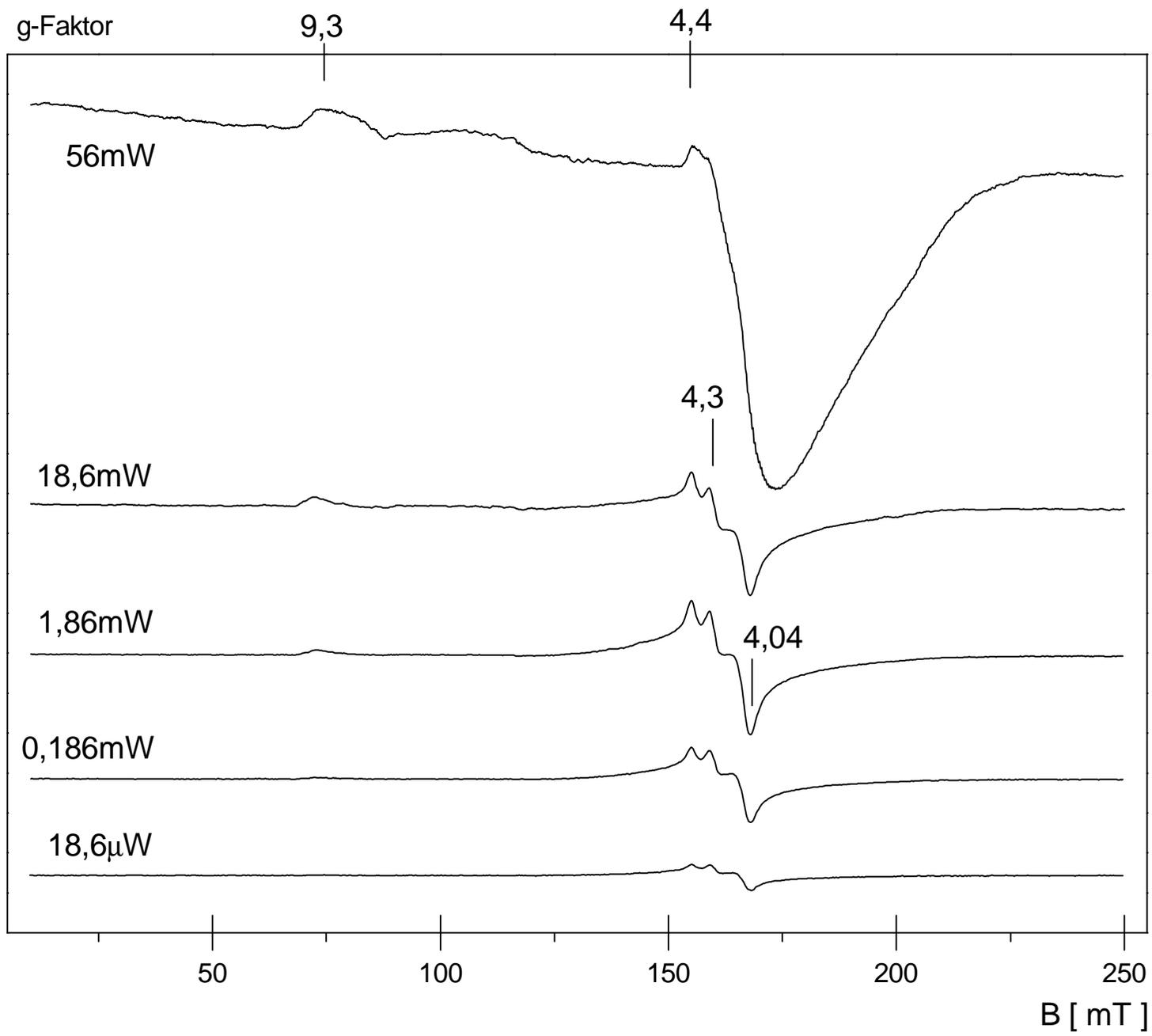


Abb.61:

Plasma-Fraktion mit steigender Mikrowellenleistung, Sweep Time=167s, Time const.=163ms, Mod. Ampl.=0,84mT, 4K, auf eine Verstärkung normiert

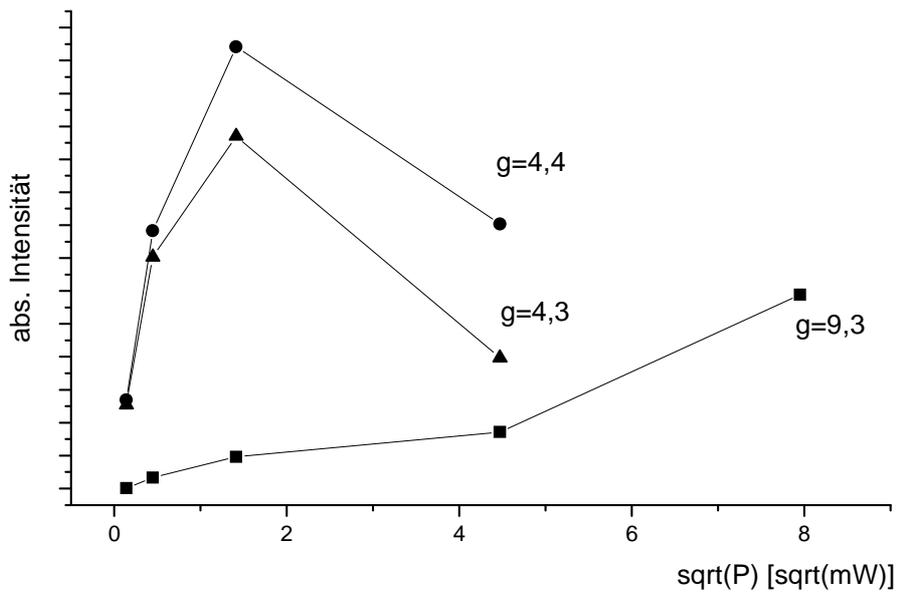


Abb.62: Signalverhalten des mittleren ($g=4,4$ und $4,3$) und unteren ($g=9,3$) Kramer-Dubletts des Fe(III)-Transferrins, in Abhängigkeit der eingestrahlt Mikrowellenleistung 4K. Aufgetragen sind die Peak-Höhen an den Signalmaxima

5.4.1 PLASMA-FRAKTION / DITHIONIT-TITRATIONSREIHE

Nachdem die ESR-aktiven Bestandteile des „Fresh-Frozen-Plasma“ bestimmt waren, sollte deren Verhalten nach Reaktion mit einem Reduktionsmittel untersucht werden. Analog der Versuche mit Erythrozytenkonzentraten wurde Dithionit als Reduktionsmittel verwendet. Wegen der besseren Signalauflösung werden die Ergebnisse der Messungen bei 4K aufgezeigt. Messungen bei 77K erbrachten keine zusätzlichen ESR-Signale, die Spektren sind nicht gezeigt. In Abb.63 sind die Spektren bei steigender Dithionit-Konzentration im gesamten Feldstärkenbereich aufgetragen. Neben dem bereits bekanntem Fe(III)-Transferrin-Signal mit den Komponenten des unteren Kramer-Dubletts ($g=9,3$) und dem Triplett des mittleren Kramer-Dubletts ($g=4,3$) ist in dieser Charge auch das Signal des Ferri-Hämoglobins bei $g=5,9$ nachweisbar. Bedingt durch die Herstellung ist das „Fresh-Frozen-Plasma“ (FFP) nicht ganz frei von zellulären Bestandteilen (Nach den Qualitätskriterien sollte die Erythrozytenkonzentration unter $6000/\mu\text{l}$ liegen), so dass Hämoglobin (freies oder intrazelluläres) in den

einzelnen Chargen als „Verunreinigung“ in unterschiedlicher Konzentration vorliegen kann.

Im oberen Feldstärkenbereich erkennt man in Abb.63 in der unbehandelten P>30-Fraktion wieder ein zusammengesetztes Signal mit einer breiten Schulter bei $g=2,06$ sowie ein scharfes Signal bei $g=2,0$. Beide Signale sind in dieser Charge besonders stark ausgeprägt.

Auch hier könnte das breite Signal vom kupferhaltigen Protein Caeruloplasmin herrühren, das aber bereits bei kleinen Dithionit-Konzentrationen reduziert wird. Die Betrachtung des $g=2$ -Signals ist wegen der Überlagerung mit dem Hintergrundsignal erschwert, allerdings scheint auch dieses Signal mit steigender Dithionit-Konzentration geringfügig abzunehmen.

Um die Veränderungen der Signalintensität genauer betrachten zu können, sind die Spektren aus Abb.63 im unteren Feldstärkenbereich in Abb.64 noch einmal dargestellt. Bei gleicher Verstärkung sind die Intensitäten der einzelnen Signale miteinander vergleichbar. Das Signal des Ferri-Hämoglobins ist bereits bei geringen Dithionit-Konzentrationen nicht mehr nachweisbar, analog dem Verhalten der ERY-Fraktion erfolgt die Reduktion von Ferri-Hämoglobin zu Fe(II)-Hämoglobin. Von besonderem Interesse sind die Veränderungen des Fe(III)-Transferrin-Signals, die aus dem alleinigen Vergleich der Spektren in Abb.64 nicht klar sichtbar sind. Dazu werden die Signalintensitäten semiquantitativ bestimmt und zur Dithionit-Konzentration in Beziehung gesetzt (Abb.65 und Abb.66). Beim Signal des unteren Kramer-Dubletts ($g=9,3$) konnte die Bestimmung der Absolutwerte durchgeführt werden (Abb.65), während sich beim mittleren Kramer-Dublett die relative Signalintensität als Differenz des Maximal-Peaks bei $g=4,4$ und des Minimal-Peaks bei $g=4,06$ als genauer erwies (Abb.66).

Dithionit führt in hinreichender Menge zu einer vollständigen Reduktion des Transferrins von Fe(III) zu Fe(II). Die Signale des unteren und des mittleren Kramer-Dubletts verhalten sich hierbei erwartungsgemäß gleichsinnig.

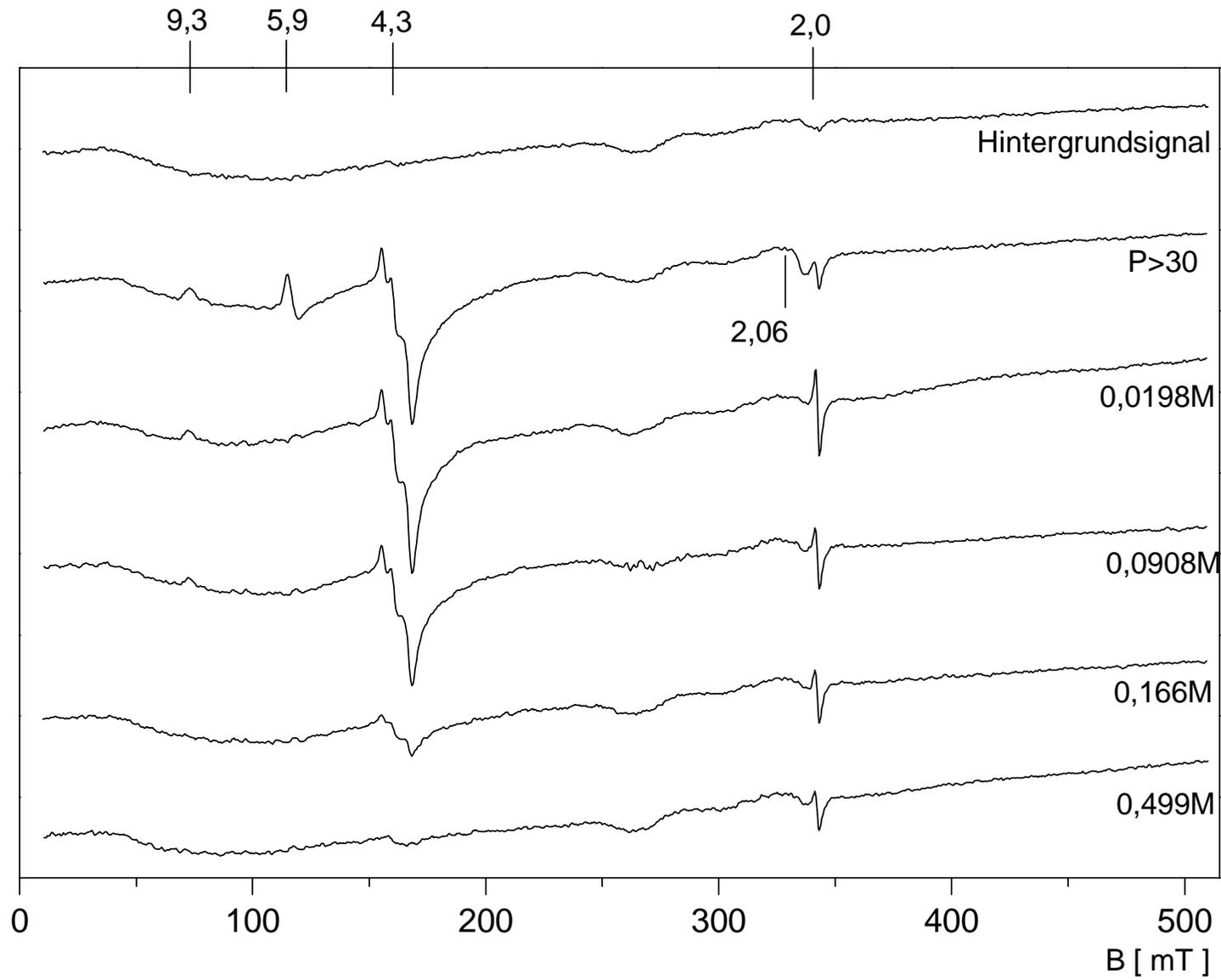


Abb.63:

Plasma-Fraktion mit steigender Dithionit-Konzentration, Sweep-Time = 671s, Time const. = 655s, Mod. Ampl. = 0,8mT, 4K. gleiche Verstärkung,

Hintergrundsignal: Signal des Cavity-Dewar-Systems gleiche Aufnahmeparameter

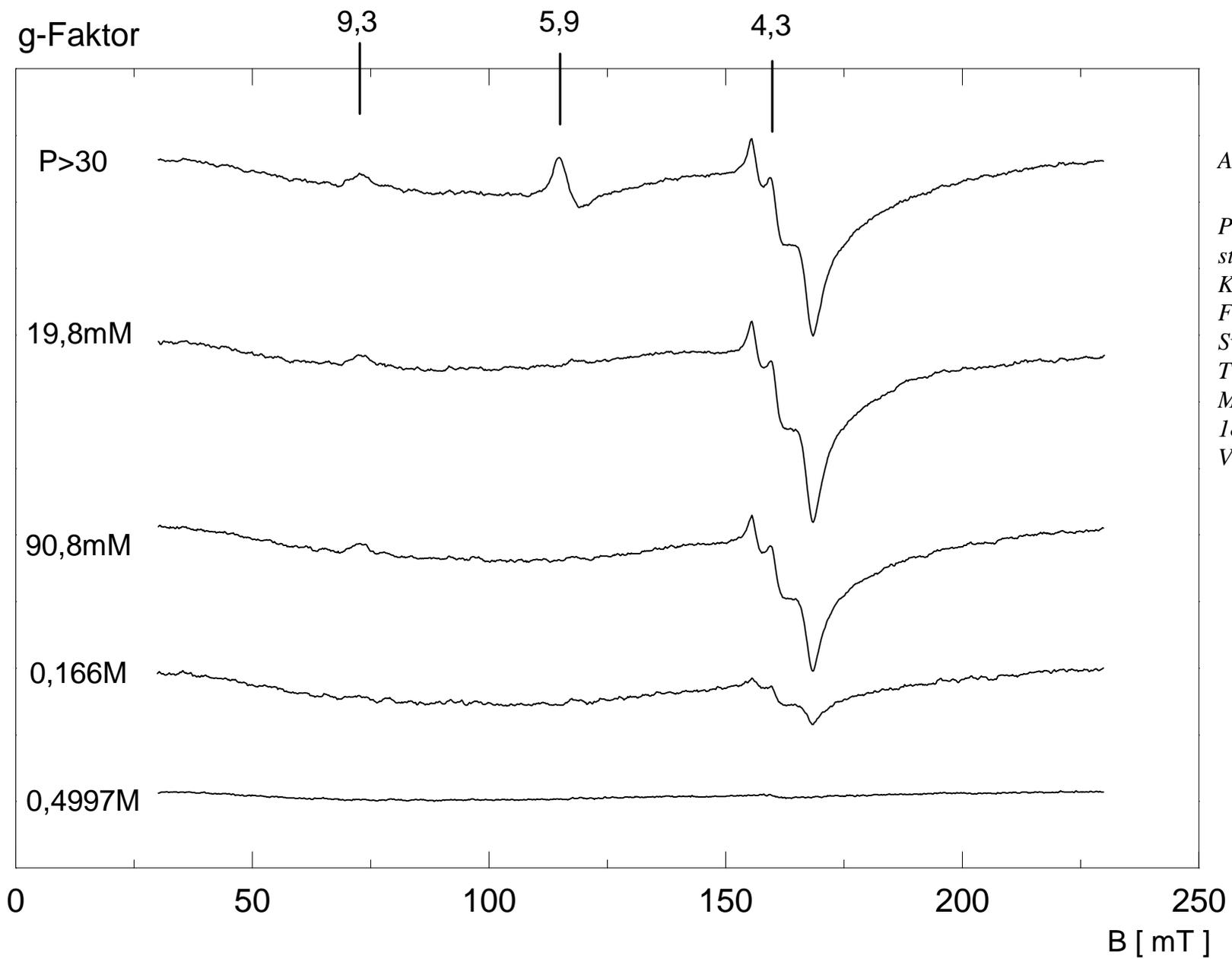


Abb.64:

Plasma-Fraktion mit steigender Dithionit-Konzentration, unterer Feldstärkenbereich, Sweep-Time=167s, Time const.=163s, Mod. Ampl.=0,8mT, 18,6mW, 4K, auf eine Verstärkung normiert

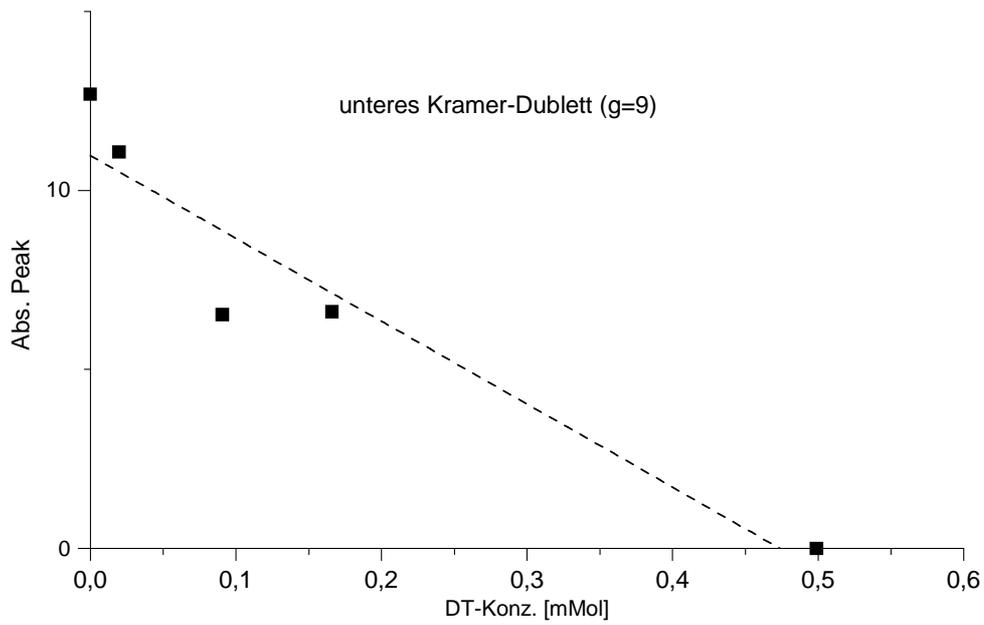


Abb.65: Signalverhalten des unteren Kramer-Dubletts mit steigender Dithionit-Konzentration, Absolute Signalintensität (Abs. Peak), 4K

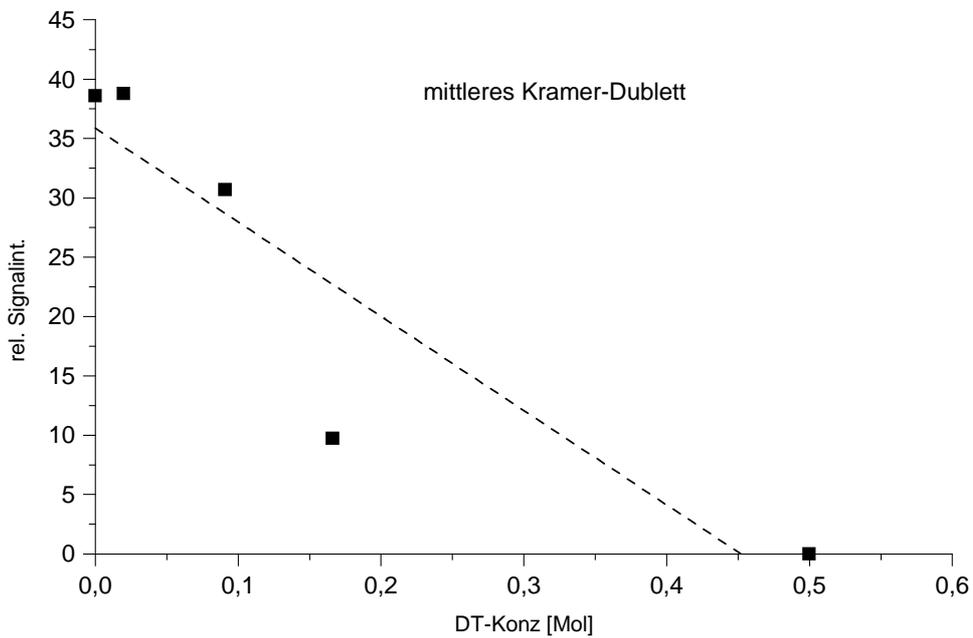


Abb.66: Signalverhalten des mittleren Kramer-Dubletts in Abhängigkeit der Dithionit-Konzentration, relative Signalintensität ($P_{max}(g=4,4) - P_{min}(g=4,06)$), 4K

5.4.2 PLASMA (30/10)KDA, PLASMA < 10KDA

Nachdem im vorherigen Kapitel Plasmabestandteile mit Molekulargewichten größer 30kDa untersucht wurden, werden nun die Plasmakomponenten mit Molekulargewicht zwischen 30 und 10kDa (P30/10) sowie kleiner 10kDa (P<10) betrachtet. Bei 77K zeigten diese Fraktionen keine verwertbaren Signale, weder bei nativen Proben noch durch Zugabe von Dithionit oder Hexacyanoferrat(III) in verschiedenen Konzentrationen (Spektren nicht gezeigt). In Abb.67 sind Spektren der beiden Fraktionen „P 30/10“ und „P<10“ bei 4K zusammen mit den Hintergrundsignalen gegenübergestellt.

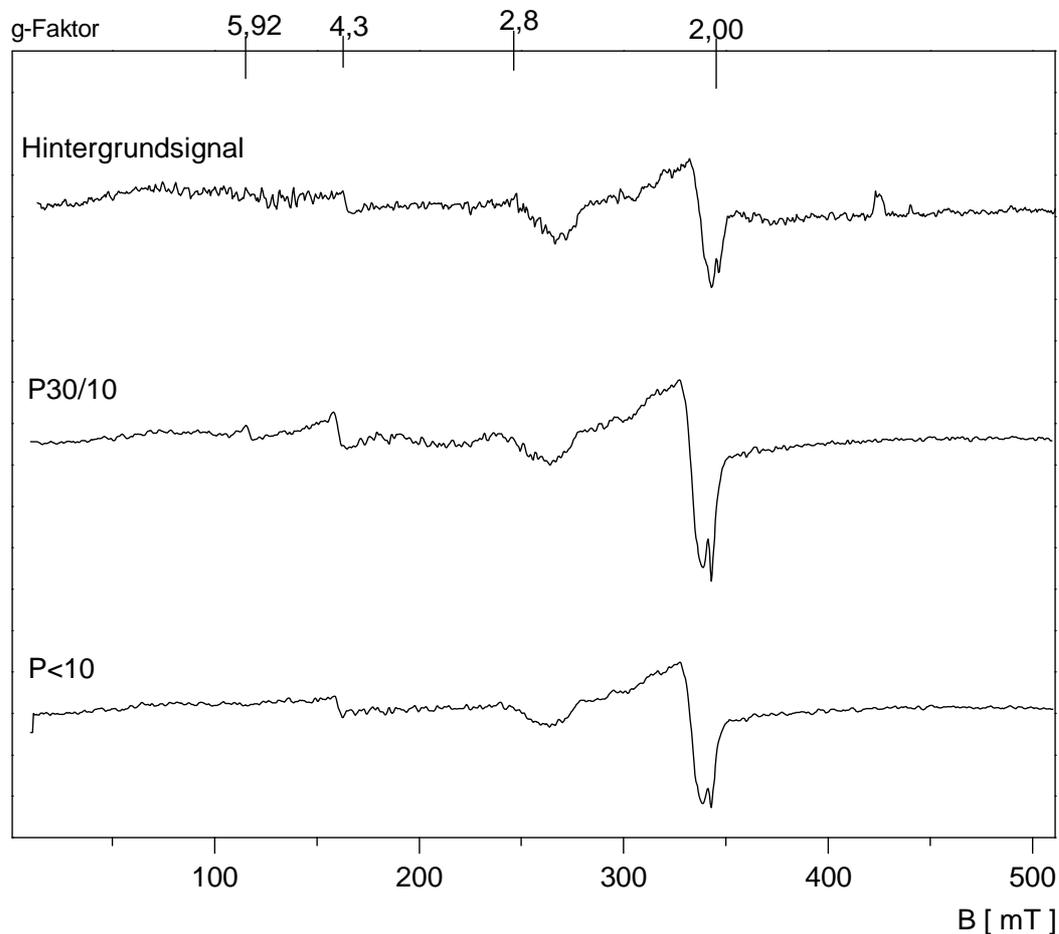


Abb.67: ESR-Signale der Fraktionen "P30/10" und "P<10", Sweep Time=671s, Time const.=655ms, Mod. Ampl.=0,8mT, 18,6mW, 4K; Hintergrundsignal: gleiche Aufnahmeparameter, nicht auf gleiche Verstärkung normiert

In beiden Proben werden die schwachen Signale durch das Cavity-Hintergrundsignal im Bereich $g=2$ und deutliche Artefakte der „Baseline“ überlagert. (Kapitel 4.10) Das Signal bei $g=4,3$ könnte durch freies Fe(III) verursacht sein, da es keine Struktur, wie z.B. das Transferrin-Signal zeigt. Das schwache Signal bei $g=6$ in der Fraktion mit Molekulargewichten zwischen 30 und 10kDa („P30/10“) stammt wahrscheinlich von einem Fe(III)-Häm-Protein. Möglicherweise sind hier einzelne Häm-Ketten als Verunreinigung nachweisbar, Hämoglobin selbst ist wegen seines Molekulargewichts in dieser Fraktion nicht mehr vorhanden. Im oberen Feldstärkenbereich werden mögliche Probensignale vom Hintergrundsignal überlagert, das sich aus einem Signalkomplex mit einer breiten Schulter um $g=2$ zusammensetzt. Auch die Reaktionen mit Dithionit und Hexacyanoferrat(III) ergaben keine weiteren Signalveränderungen (Spektren nicht gezeigt).

5.4.3 PLASMA / HEXACYANOFERRAT-TITRATIONSREIHE

Analog den Versuchen der Erythrozytenkonzentrate erfolgte die Untersuchung der Plasma-Fraktion unter Einwirkung von Hexacyanoferrat(III) als starkes Oxidationsmittel. Von Interesse war hierbei das Verhalten des Fe(III)-Transferrins unter Einwirkung eines starken Oxidationsmittels, aber auch die Frage, ob weitere Signale durch die Reaktion generiert werden können. Auch hier erfolgten die ESR-Messungen bei 77K und 4K, wegen des besseren Signalverhaltens werden die Messungen bei 4K dargestellt. Die Signale bei 77K erbrachten keine zusätzlichen Informationen. Abb.68 zeigt Spektren der Plasma-Fraktion ($P>30$) bei steigender Hexacyanoferrat(III)-Konzentration bei 4K. Auch in dieser Charge ist zunächst das Ferri-Hämoglobin-Signal als „Verunreinigung“ vorhanden. Daneben erkennt man das bekannte Signal des Fe(III)-Transferrins mit den Anteilen des unteren Kramer-Dubletts und des mittleren Kramer-Dubletts. Mit steigender Hexacyanoferrat(III)-Konzentration nimmt das Ferri-Hämoglobin-Signal stark zu, bei hohen Hexacyanoferrat(III)-Konzentrationen (ab 3,33M in Abb.68) lässt sich das Hexacyanoferrat(III)-Eigensignal als breites Signal nachweisen. Zur genaueren Auswertung des Fe(III)-Transferrin-Signals erfolgte die Messung im unteren Feldstärkenbereich. Die auf eine Verstärkung normierten Spektren sind in Abb.69 gezeigt.

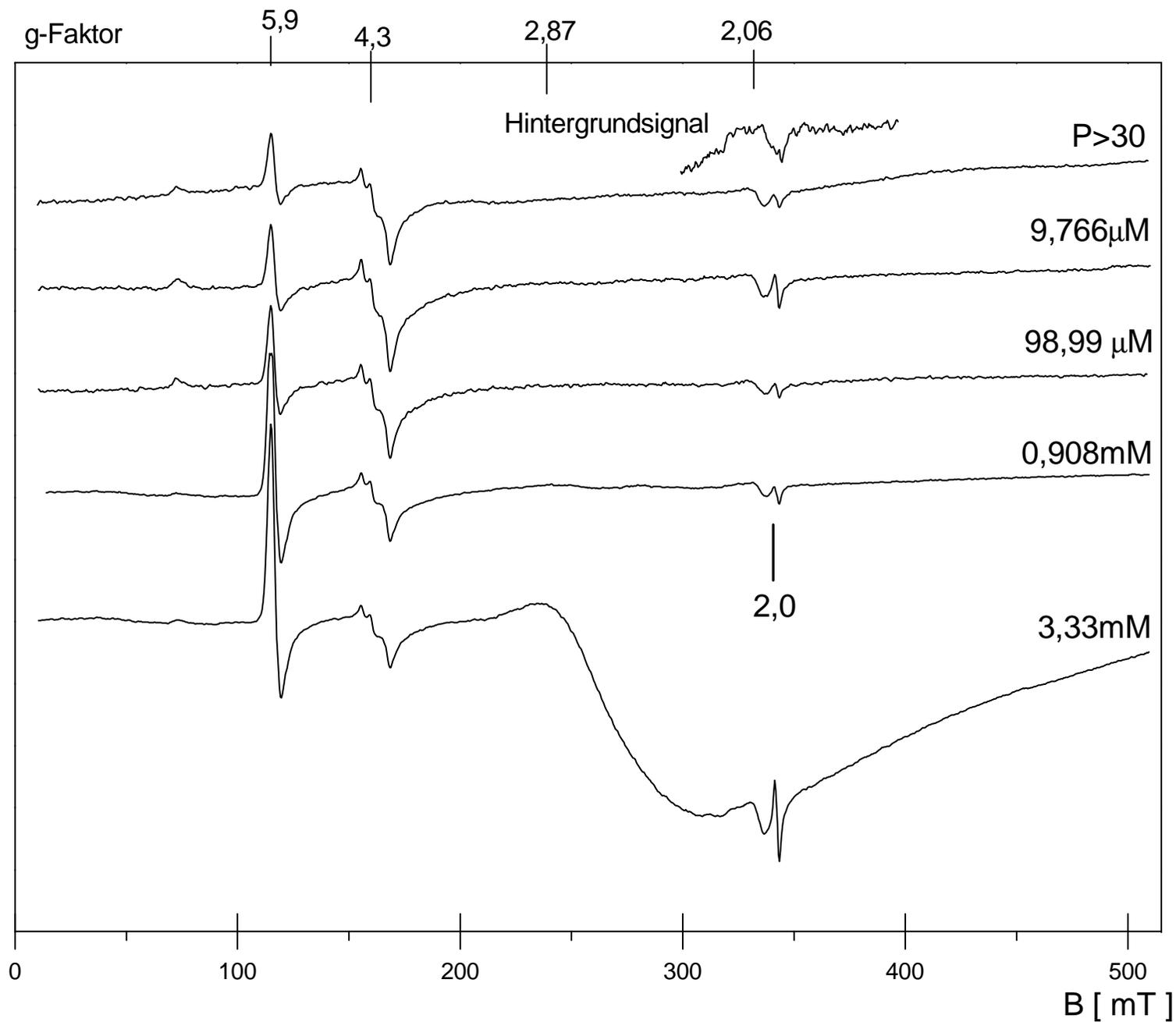


Abb.68:

Plasma-Fraktion ($P > 30$) mit steigender Hexacyanoferrat(III)-Konzentration, Sweep Time = 671 s, Time const. = 655 ms, Mod. Amp. = 0,8 mT, 18,6 mW, 4 K, auf gleiche Verstärkung normiert
Hintergrundsignal: gleiche Aufnahmeparameter, stark vergrößert

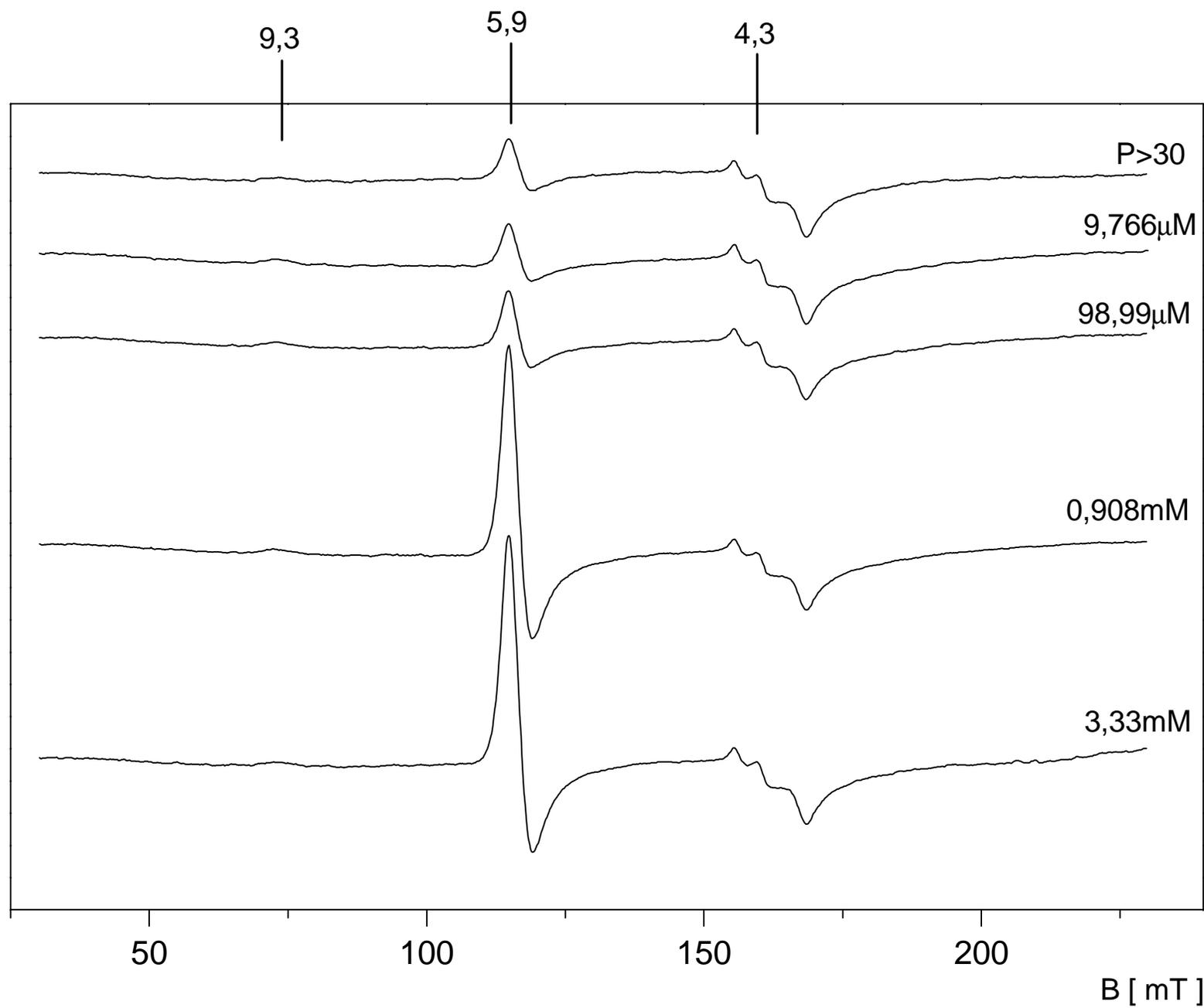


Abb.69:

Plasma-Fraktion mit steigender Hexacyanoferrat(III)-Konzentration, Sweep Time=671s, Time const.=655ms, Mod. Ampl.=0,8mT, 4K, nicht auf gleiche Verstärkung normiert

Durch Bestimmung der relativen Signalintensitäten lässt sich das Verhalten der Signale in Abhängigkeit der Hexacyanoferrat(III)-Konzentration betrachten (Abb.70 und Abb.71). Während mit steigender Hexacyanoferrat(III)-Konzentration die Intensität des Ferri-Hämoglobin-Signals zunimmt und scheinbar einem Grenzwert entgegen strebt, verändert sich die Signalintensität des Transferrins in der angewandten Hexacyanoferrat(III)-Konzentration kaum. Betrachtet man die Veränderung des Ferri-Hämoglobin-Signals, so führt Hexacyanoferrat im Extremfall ähnlich den Ergebnissen der ERY-Fraktion zu einer vollständigen Oxidation des in der Plasma-Fraktion vorhandenen Fe(II)-Hämoglobins zu Fe(III)-Hämoglobin.

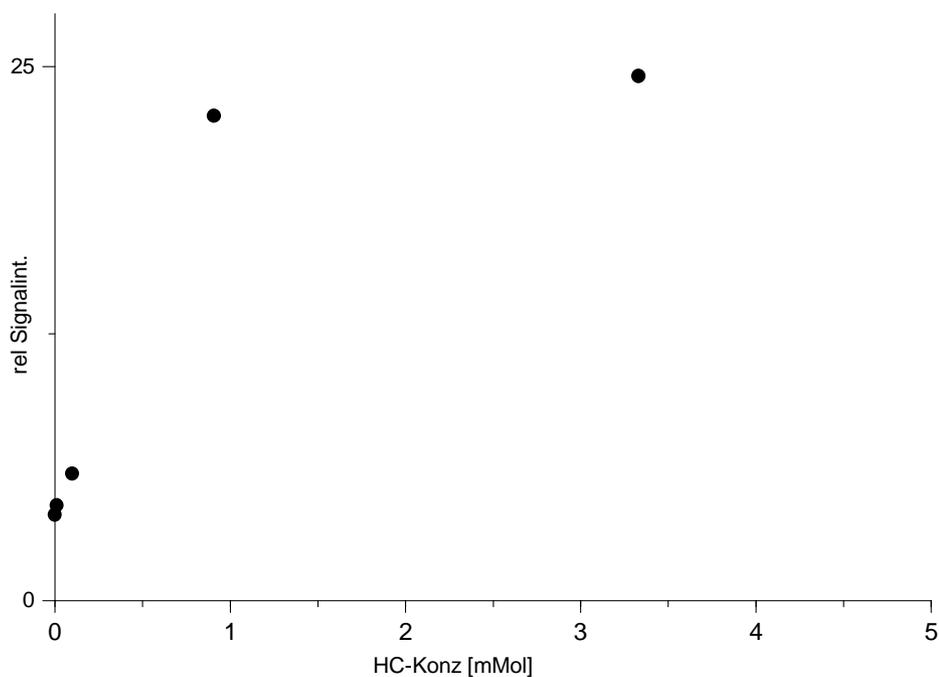


Abb.70: Signalverhalten des Ferri-Hämoglobins ($g=5,9$) mit steigender Hexacyanoferrat-Konzentration, 4K

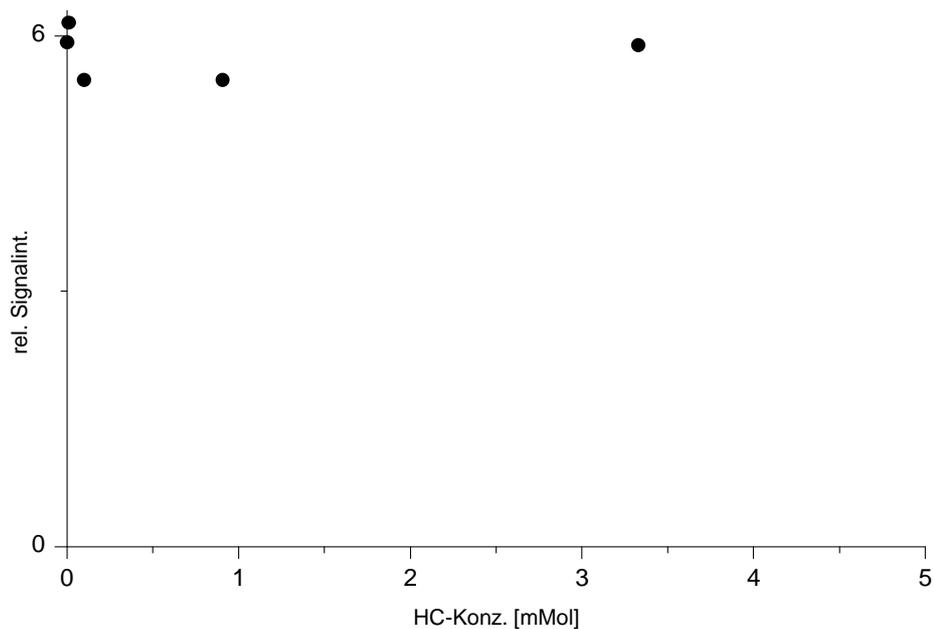


Abb.71: Signalverhalten des mittleren Kramer-Dubletts bei steigender Hexacyanoferrat (III)-Konzentration, 4K

Die Veränderungen im oberen Feldstärkenbereich sind in Abb.72 gesondert aufgezeigt. Erneut erkennt man das möglicherweise von Caeruloplasmin verursachte breite Signal bei $g=2,06$ das sich aber unter Einwirkung von Hexacyanoferrat(III) kaum verändert, während es unter Einwirkung von Dithionit rasch reduziert wurde. Auch das scharfe, gut aufgelöste Signal bei $g=2,0$ scheint kaum verändert, die Schwankungen der Signalintensität sind wahrscheinlich Folge der Messungenauigkeit. Zudem kommt es bei hohen Hexacyanoferrat(III)-Konzentrationen (ab 3,33mM in Abb.68) zu einer deutlichen Überlagerung mit dem Hexacyanoferrat(III)-Eigensignal, daher ist diese Messung in Abb.72 zur besseren Übersicht herausgenommen.

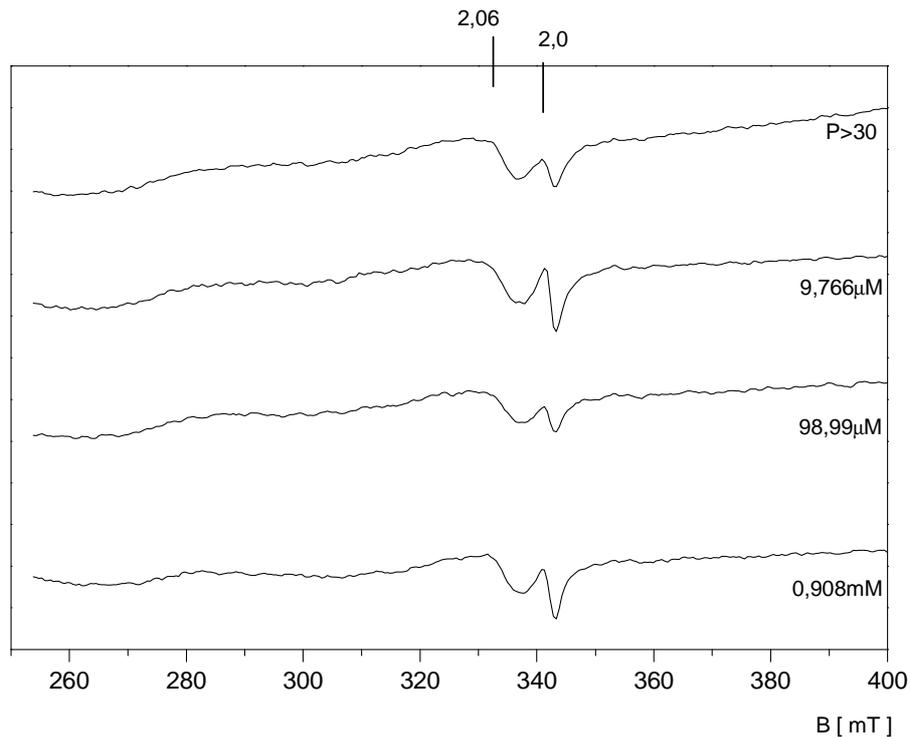


Abb.72: $P > 30$ mit steigender Hcf-Konzentration, oberer Feldstärkenbereich (250-400mT), Sweep Time=671s, Time const.=655s, Mod. Ampl.=0,8mT, 18,6mW, 4K, auf gleiche Verstärkung normiert. Messung mit 3,33mM Hcf zur besseren Übersicht herausgenommen

5.4.4 PLASMA-FRAKTION-BESTRAHLUNGSREIHE

Um die Einwirkung ionisierender Strahlung auf Transferrin und weitere Plasmabestandteile des Blutes zu untersuchen, wurden die Plasma-Fractionen analog der Versuchsreihe der ERY-Fraktion bei 77K bestrahlt und anschließend bei 77K und 4K auf ESR-Signale untersucht. Nachdem die Signalauflösung vor allem des Transferrin-Signals bei Temperaturen von 4K deutlich besser war, erfolgt die Auswertung der Signale nur in diesem Temperaturbereich. Messungen bei 77K erbrachten keine für die Fragestellung zusätzlichen Informationen, Aufwärmversuche wurden hier nicht durchgeführt. In Abb.72 sind die Spektren der Bestrahlungsreihe über den gesamten Feldstärkenbereich von 500mT mit der jeweiligen Bestrahlungszeit aufgetragen.

In der unbestrahlten Probe erkennt man in Abb.73 das Fe(III)-Transferrin-Signal mit den Anteilen des oberen und unteren Kramer-Dubletts, sowie das Ferri-

Hämoglobin-Signal bei $g=5,9$. Im oberen Bereich liegt wieder ein breites Signal um $g=2$ vor, das diesmal dem Cavity-Hintergrundsignal entspricht und weitere Signale überlagert. In dieser Charge ist weder das breite Signal bei $g=2,06$, noch das scharfe Signal bei $g=2,0$ nachweisbar (vergleiche Abb.63). Bereits nach kurzer Bestrahlungsdauer werden auch hier im oberen Feldstärkenbereich um 320mT starke Signale ausgebildet, während die Veränderungen im unteren Feldstärkenbereich nicht so eindeutig zu erkennen sind. Zur besseren Übersicht sind die Spektren in Abb.73 nicht auf eine Signalintensität normiert. Das Hintergrundsignal, das native P>30-Signal und die jeweiligen Signale im unteren Feldstärkenbereich (50-250mT) sind zusätzlich stark vergrößert wiedergegeben. Um das Verhalten der Signale im unteren Feldstärkenbereich (50-250mT) besser untersuchen zu können, wurden auch hier gesondert Messungen durchgeführt. Die Spektren sind in der folgenden Abb.74 gezeigt, die Signale sind auf eine Verstärkung normiert und damit direkt vergleichbar. Man erkennt, dass das Ferri-Hämoglobin-Signal mit steigender Bestrahlungsdauer abnimmt und damit dem Verhalten des frei gelösten Hämoglobins, mit Reduktion der Häm-Gruppe von Fe(III) zu Fe(II) entspricht. Durch Betrachtung der relativen Signalintensitäten in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer kann die Signalabnahme nachgewiesen werden (Abb.75).

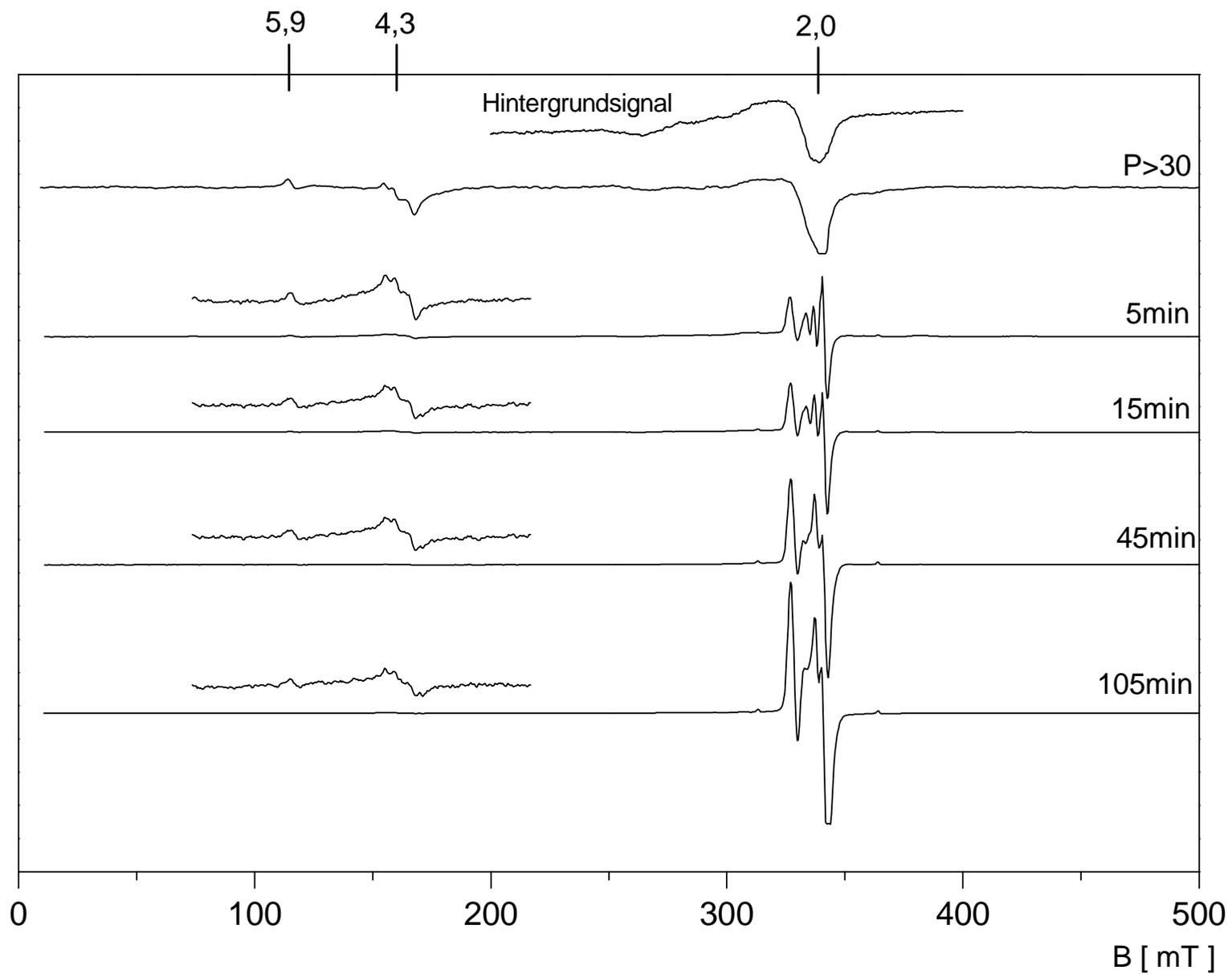


Abb.73:
 Plasma-Fraktion mit
 steigender
 Bestrahlungsdauer,
 Sweep Time=671s,
 Time const.=655ms,
 Mod. Ampl.=0,8mT,
 18,6mW, 4K.
 Hintergrundsignal und
 P>30-Signal
 vergrößert

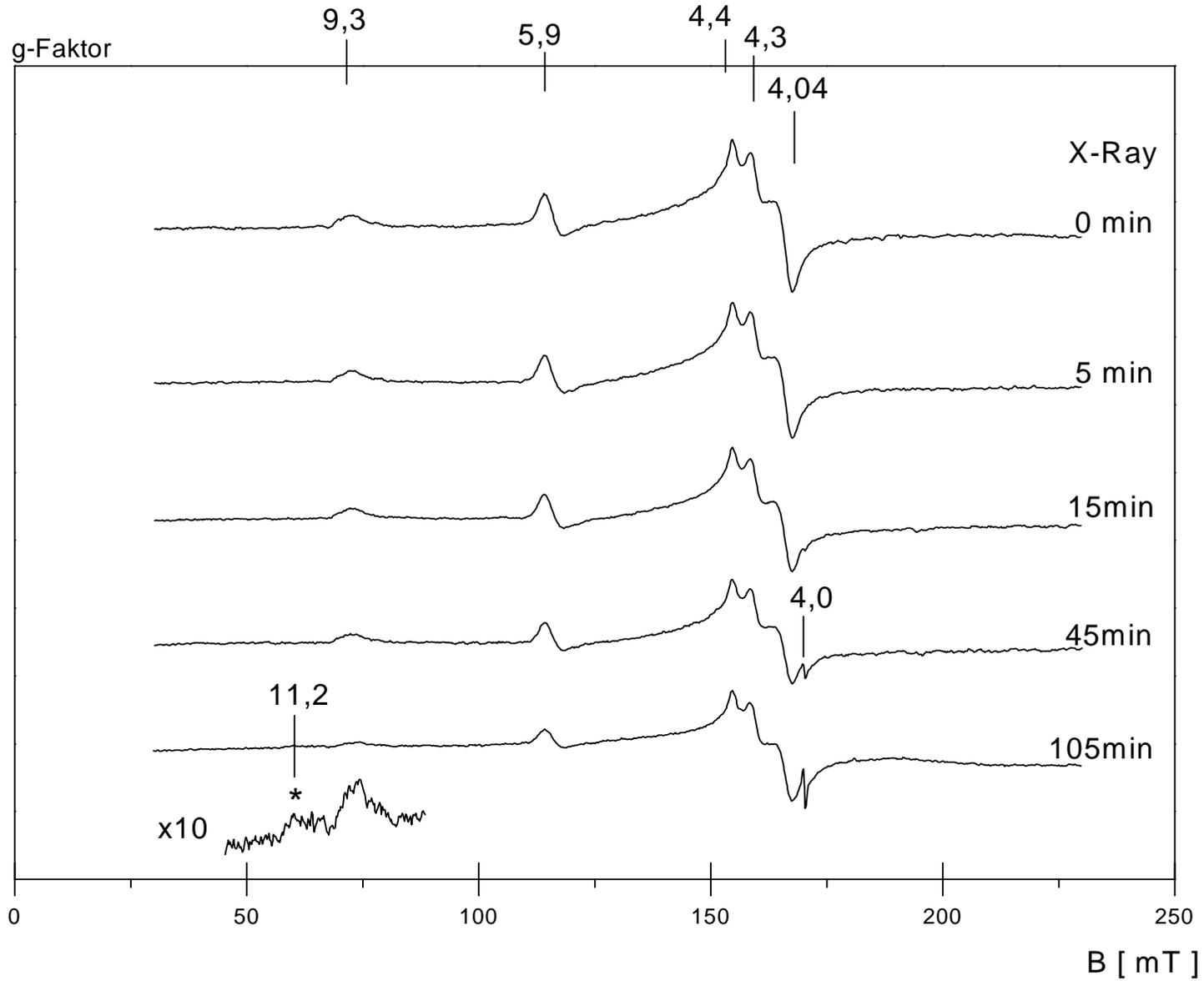


Abb.74:

Plasma-Fraktion
 ($P > 30$), mit steigender
 Bestrahlungsdauer,
 Sweep Time=167s,
 Time const.=655ms,
 Mod. Ampl.=0,8mT,
 4K, (*) markiert ein
 zusätzliches Signal bei
 $g=11,2$ (vergrößert)

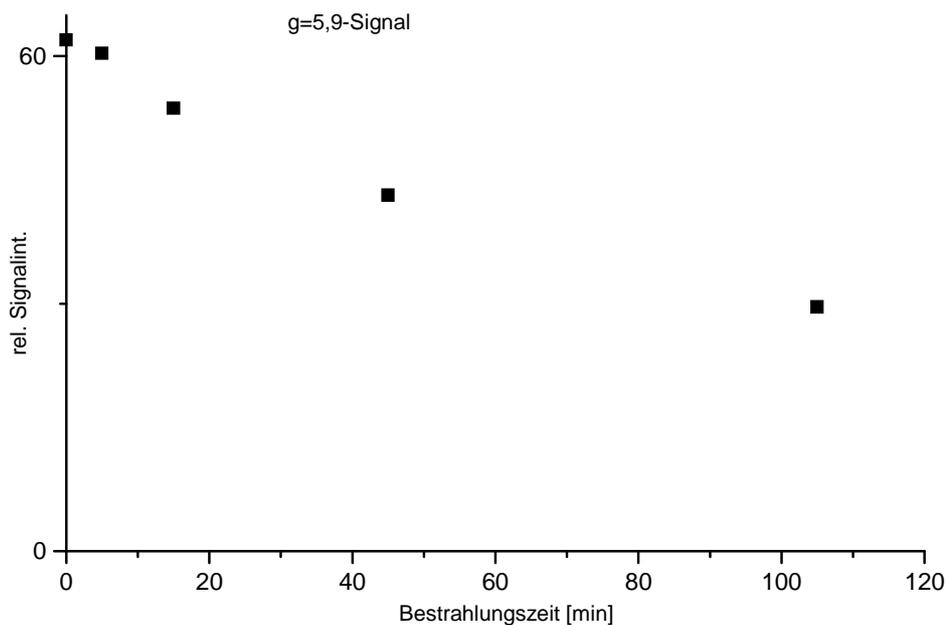


Abb.75 : (frei gelöstes) Ferri-Hämoglobin-Signal ($g=5,9$) als „Verunreinigung“ der Plasmakonzerve, mit steigender Bestrahlungsdauer, 4K

Auch das Fe(III)-Transferrin Signal nimmt mit steigender Bestrahlungsdauer ab, wobei wegen der geringen Konzentration die Auswertung des unteren Kramer-Dubletts nur ungenau möglich ist. In Abb.76 ist die Abnahme der Signalintensität als Differenz des Peak($g=4,4$) und Peak($g=4,04$) in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer aufgetragen. Man erkennt die Abnahme der Signalintensität mit steigender Bestrahlungsdauer, die geringe relative Intensitätszunahme für den Messpunkt nach 105min Bestrahlungszeit („Y“ in Abb.76) könnte durch kleine Abweichungen in der Probenpositionierung und der Temperatur-Stabilität verursacht sein. Interessant ist zudem, dass sich gleichzeitig im Verlauf der Bestrahlungsreihe im Bereich von $g=4,0$ ein scharfer Peak zeigt, welcher an der Flanke des Triplets überlagert und mit steigender Bestrahlungszeit an Intensität zunimmt. Unterhalb des $g=9,3$ Signals bildet sich eine breite nur schwache Linie aus ($g=11,2$), die nur in weiterer Verstärkung zu erkennen ist und möglicherweise mit dem Peak bei 4,0 korreliert (Fig.74). Offenbar kommt es durch die Bestrahlung zu einer Reduktion des an Transferrin gebundenen Eisens von seinem dreiwertigen in seinen zweiwertigen Valenzzustand. Hohe Bestrahlungsdosen

könnten dann zusätzlich zur Freisetzung von Fe(III) aus dem Transferrin-Molekül führen, was zur Ausbildung eines Singlets bei $g=4$ und der Linie bei $g=11,2$ führt. Im oberen Feldstärkenbereich bilden sich analog der vorherigen Bestrahlungsversuche komplexe zusammengesetzte Signale aus den bereits bekannten Signalen der (H^\bullet) - und (OH^\bullet) -Radikale, sowie anderer organischer Radikale und Radikale des Lösungsmittels. Das scharfe Signal bei $g=2$, das bei höheren Bestrahlungszeiten zunehmend überlagert wird, stammt erneut von einem im Quarzröhrchen gebildetem Radikal. Die weitere Differenzierung der Signale ist auch in dieser Versuchsreihe nicht möglich (Abb.77).

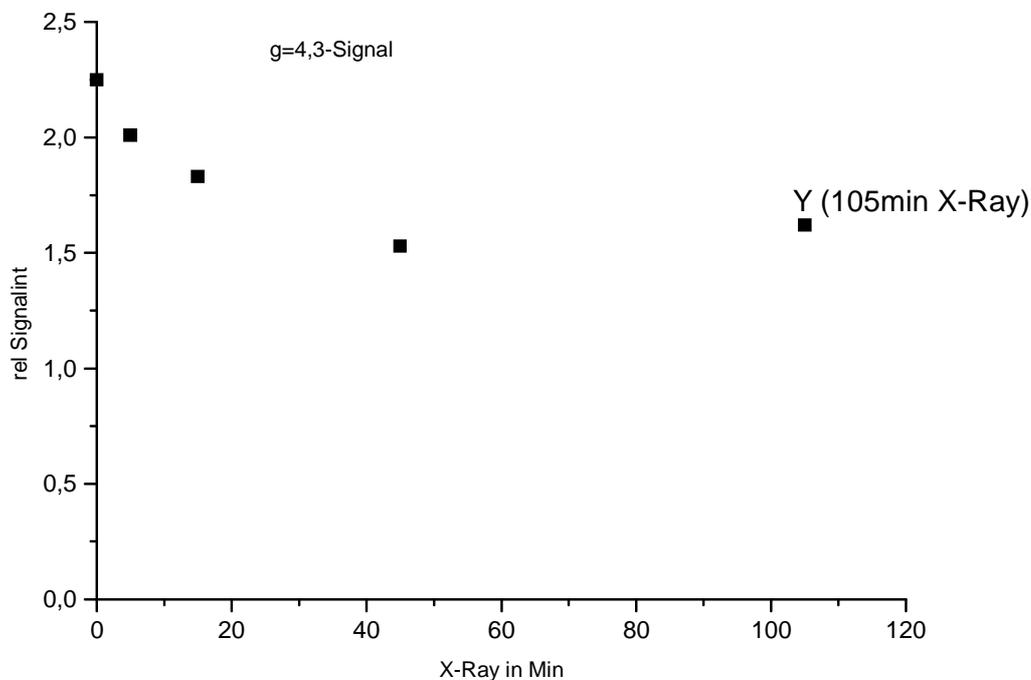


Abb.76: Relative Signalintensität des Transferrin-Signals Peak ($g=4,4$)-Peak ($g=4,04$) mit steigender Bestrahlungsdauer, 4K

Betrachtet man die Ergebnisse der Bestrahlungsversuche aller untersuchten Proben, so sind die durch Bestrahlung generierten Signale in allen Fraktionen in unterschiedlicher Intensität nachweisbar. Eine Gegenüberstellung der ESR-Signale der einzelnen Fraktionen ist in Abb.78 gezeigt.

Zur besseren Übersicht ist in der folgenden Tabelle (Tabelle 4) das Vorhandensein „X“ oder das Fehlen „0“ der Signale (charakterisiert durch die g-Faktoren) in den untersuchten Proben zusammengestellt. Die Signale mit „(X)“ können wegen Überlagerung nicht sicher differenziert werden, sind aber wahrscheinlich vorhanden.

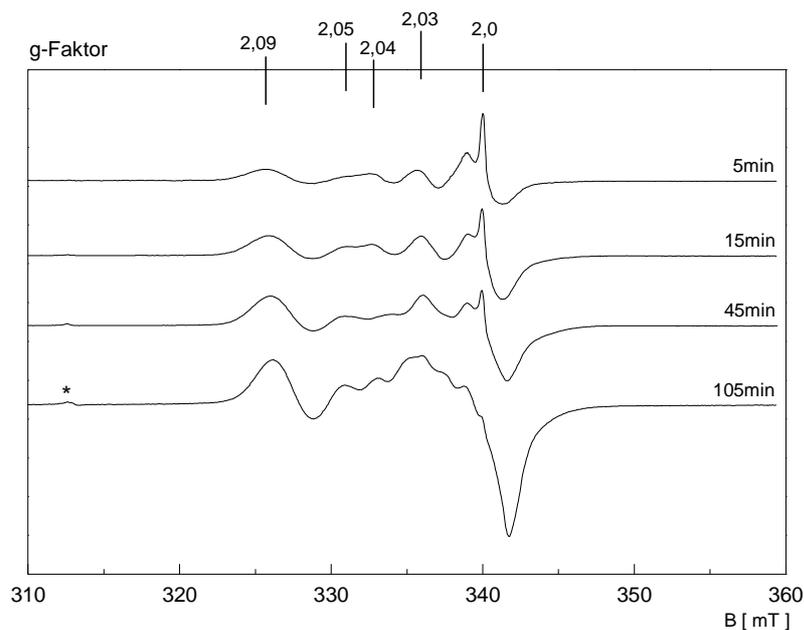


Abb.77: $P>30$ -Fraktion mit steigender Bestrahlungsdauer, Sweep Time=83s, Time const.=81ms, Mod. Ampl.=0,5mT, 18,6mW, 4K; (\dot{H})-Anteil mit (*) markiert, nicht auf eine Verstärkung normiert

Bis auf die Anteile der α - und β -Ketten der (FeO₂)-Zentren des oxygenierten Hämoglobins können durch Bestrahlung offensichtlich keine, für eine Fraktion charakteristischen Signale erzeugt werden. Die meisten durch Bestrahlung erzeugten Signale sind in allen untersuchten Proben enthalten. Neben den (\dot{H})- und ($\text{OH}\dot{\text{O}}$)-Radikalen werden Radikale im Lösungsmittel oder organische Radikale gebildet, deren weitere Auftrennung und Identifizierung im Rahmen dieser Versuche nicht gelingt.

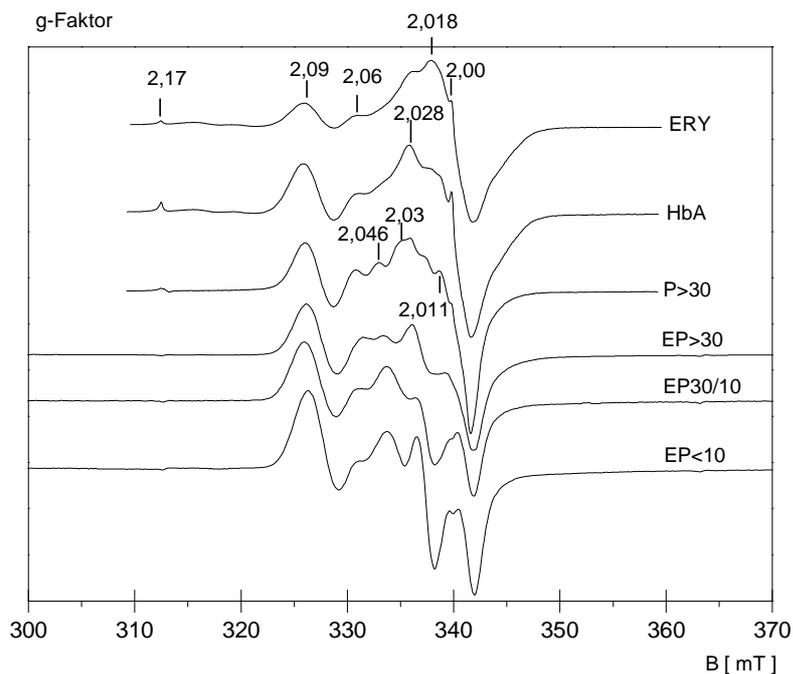


Abb.78: ESR-Signale unterschiedlicher Fraktionen; Ery, HbA, P>30: Sweep Time=83s, Time const.=81ms, Mod. Ampl.=0,5mT, 18,6mW, X-Ray 105min; EP>30, EP30/10, EP<10: Sweep Time=167s, Time const.=163ms, Mod. Ampl.=0,8mT, 18,6mW, X-Ray 90min, 4K

g-Faktor	ERY	HBA	P>30	EP>30	EP30/10
2,09	X	X	X	X	X
2,06	X	X	X	X	X
2,046	X	X	X	X	X
2,03	X	(x)	X	0	0
2,028	(X)	X	X	X	X
2,018	0	0	X	0	0
2,011	X	X	X	X	X
2,00	0	X	X	X	0

Tabelle 4: Zusammenstellung der Signale der unterschiedlichen Fraktionen nach Bestrahlung (90-105min X-Ray)

6. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, die verschiedenen Komponenten menschlichen Blutes, wie zelluläre Bestandteile oder Fraktionen des Plasmas, systematisch auf vorhandene ESR-Signale zu untersuchen, diese Signale zu charakterisieren und sie natürlich vorkommenden Molekülsystemen zuzuordnen. Wegen der Bedeutung von Redox-Reaktionen auch im Organsystem Blut, war dabei das Verhalten dieser spektralen Spezies in Hinsicht auf unterschiedliche Redox-Bedingungen der Probe von besonderem Interesse. Durch Zugabe von Dithionit als Reduktionsmittel und Hexacyanoferrat als Oxidationsmittel wurde modellmäßig das Verhalten dieser Molekülsysteme in den verschiedenen Komponenten des Blutes unter veränderten Redox-Bedingungen untersucht. Dazu wurden die Proben in zwei Temperaturbereichen (4K und 77K) vermessen, um möglichst alle spektralen Spezies zu erfassen und zu charakterisieren.

Auch ionisierende Strahlung kann über Radikalbildung deutliche, auch pathologische Veränderungen in Zellen bewirken. Um die Wirkung auf Bestandteile des Blutes zu untersuchen, wurden die Blutfraktionen mit Röntgenstrahlen variabler Dosis bei 77K bestrahlt und anschließend in beiden Temperaturbereichen (4K und 77K) vermessen.

Der Hauptbestandteil der in den Blutkomponenten nachgewiesenen ESR-Signale stammt von drei eisenhaltigen Metalloproteinen, dem Ferri-Hämoglobin, der Katalase, sowie dem Fe(III)-Transferrin, deren ESR-Eigenschaften in der Literatur bereits beschrieben sind. Ferri-Hämoglobin und Katalase sind Bestandteile der Erythrozyten und liegen intrazellulär vor, Fe(III)-Transferrin hingegen ist frei im Blutplasma gelöst.

Obwohl in der Vergangenheit wiederholt ESR-Messungen an biologischen Systemen bei 77K durchgeführt wurden [BENEDETTO, 1981; LOHMANN, 1979, 1981, 1986], sind aufgrund der kurzen Relaxationszeit dieser Metalloproteine ESR-Messungen bei Temperaturen von 4K notwendig, was mit einem deutlich erhöhten technischen Aufwand verbunden ist. Denn erst bei diesen tiefen Temperaturen sind die „high-spin“ Eisensignale dieser Metalloproteine gut

aufgelöst. Das Katalase-Signal kann erst bei Temperaturen von 4K gut beobachtet werden, bei Temperaturen von 77K ist es nicht nachweisbar.

Alle drei Proteine bilden jeweils ein Fe(III)-„high-spin“ System. Allerdings unterscheiden sich die ESR-Signale aufgrund der verschiedenen Molekülstrukturen und damit einhergehenden paramagnetischen Eigenschaften erheblich voneinander.

Ferri-Hämoglobin bildet ein stark axiales Signal mit $g_{\perp}=5,9$ und $g_{\parallel}=2$. Wie bereits in der Literatur beschrieben [CAMMACK, 1993], führt Dithionit als Reduktionsmittel zur vollständigen Reduktion des Signals, dabei wird Ferri-Hämoglobin in Fe(II)-Hämoglobin umgewandelt.

Durch Hexacyanoferrat(III) hingegen erfolgt eine Oxidation von vorhandenem, ESR-inaktiven Fe(II)-Hämoglobin zu Ferri-Hämoglobin, womit das ESR-Signal zunimmt, bei hohen Hexacyanoferrat(III)-Konzentrationen scheinbar ein Grenzwert ausbildet und damit bei vollständiger Oxidation die in der Probe enthaltene Gesamtmenge an Fe(II)-Hämoglobin widerspiegelt. Hämoglobin ist somit in der Lage, an seiner Häm-Gruppe mit Redox-Partnern mit entsprechendem Redox-Potential zu reagieren. Insbesondere die Oxidation von Fe(II)-Hämoglobin zu Ferri-Hämoglobin ist hier von besonderem Interesse, da diese Reaktion zu einem Funktionsverlust des Hämoglobins als Sauerstofftransporter führt.

Bei den hier untersuchten Ery-Konzentraten, wie sie für die klinische Routine verwendet werden, ist auffällig, dass bereits in den nativen und unbehandelten Proben das Ferri-Hämoglobin-Signal sehr intensiv ableitbar ist und damit eine unphysiologisch hohe Konzentration an Ferri-Hämoglobin anzeigt. Somit muss schon während der Lagerung ein erheblicher Auto-Oxidations-Prozess stattfinden, geringe Mengen eines Oxidationsmittels mit ähnlicher oder höherer oxidativer Potenz wie Hexacyanoferrat(III) führen dann zu einer weiteren Zunahme an Ferri-Hämoglobin. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die in den Ery-Konzentraten zum Oxidationsschutz vorhandene Methämoglobinreduktase nicht ausreichend aktiv ist und eine Oxidation des Fe(II)-Hämoglobins nicht verhindern kann. Bisher wird die Konzentration von Ferri-Hämoglobin als aktuelles Qualitätskriterium von Ery-Konzentraten nicht berücksichtigt. Es wäre zu untersuchen, ob neben den laborchemischen Bestimmungen auch die Konzentration von Ferri-Hämoglobin Aussagen über die Qualität einer

Blutkonserve vor allem in Hinsicht auf eine Optimierung der Konservierung und Lagerung erbringen würde. Dabei ist notwendig, die während der Lagerung der ERY-Konzentrate stattfindenden Oxidationsprozesse des Fe(II)-Hämoglobins detailliert zu untersuchen.

Bei der Auto-Oxidation von molekularem Sauerstoff entstehen hochreaktive Radikale und Radikalprodukte (O_2^- , H_2O_2 , OH^\bullet), wobei vor allem durch H_2O_2 die Bildung des Fe(IV)-Hämoglobin-Radikals und weiterer stabiler Radikalprodukte eine Schädigung des Erythrozyten verursacht [KANNER, 1984; McBRIEN, 1982; SVISTUNENKO, 1997]. Diese Radikale werden daher unter physiologischen Bedingungen durch spezielle Enzyme (Superoxiddismutase, Katalase, Peroxidase) abgebaut [LÖFFLER, 1988]. Die Entstehung von Sauerstoffradikalen und Radikalfolgeprodukten konnte in den hier untersuchten nativen und mit Hexacyanoferrat(III) behandelten Proben nicht beobachtet werden. Unter physiologischen Bedingungen ist aber durch Anwesenheit geeigneter Oxidationsmittel (durch Bildung im Rahmen pathologischer Prozesse oder durch Aufnahme von Substanzen mit entsprechender oxidativer Potenz) neben dem Funktionsverlust des Hämoglobins auch die Anhäufung von reaktiven Sauerstoffradikalen mit nachfolgender Schädigung der Zellen vorstellbar.

Das ESR-Signal der Katalase ist aufgrund der kurzen Relaxationszeit erst bei Temperaturen unter 10K gut detektierbar. Es besteht aus zwei sich überlagernden rhombischen Signalkomponenten mit $g=(6,78/5,02/1,99)$ und $g=(6,46/5,26/1,99)$. Die beiden Signalgruppen werden durch ungleiche paramagnetische Eigenschaften ansonsten identischer Häm-Gruppen verursacht [WILLIAMS-SMITH und PATEL, 1975; BLUM, 1978; JACOB, 1979]. In der Literatur wird eine „breite“ (B) von einer „schmalen“ (A) Signalkomponente unterschieden [BLUM 1978]. Die in der Literatur beschriebenen ESR-Spektren an frischem menschlichem Blut bestehen im Wesentlichen aus der schmalen Signalkomponente [WILLIAMS-SMITH und MORRISON, 1975, WILLIAMS-SMITH und PATEL, 1975], und verändern sich unter anaeroben Bedingungen wie einer Lagerung bei 4°C nicht. Diese Stabilität der Signale ist allerdings nur bis zu einer Zeitdauer von 48h getestet worden [WILLIAMS-SMITH und MORRISON, 1975]. Die reversible Konversion der Signalkomponenten ist von den äußeren Bedingungen (pH-Wert, Reduktionsmittel, anaerobe Bedingungen) abhängig und führt nicht zu einem Funktionsverlust der Katalase [WILLIAMS-SMITH und

MORRISON, 1975; JACOB, 1979]. Im Gegensatz dazu fällt bei den hier durchgeführten Messungen an menschlichen Erythrozyten ein deutlich stärkerer Beitrag der breiten Signalkomponente auf, wobei sich die Anteile der Signalkomponenten in ihrer Intensität deutlich zwischen den einzelnen Chargen unterscheiden. Die genauen Zusammenhänge dieser unterschiedlichen Signalausbildung sind im Rahmen dieser Arbeit nicht im Detail untersucht worden. Neben wechselnden pH-Werten der Konserven, Signalveränderungen durch die Präparation ist auch die unterschiedlich lange Lagerungsdauer (alle hier verwendeten Konserven hatten eine Lagerungsdauer von mehreren Wochen) der einzelnen Chargen als mögliche Ursache denkbar. Ob die Konversion der Signalkomponenten besonders im Falle der Lagerungsdauer als Marker für die Haltbarkeit der Erythrozytenkonserve verwendet werden kann, müsste durch weitere Versuche untersucht werden.

Weiter konnte gezeigt werden, dass die Katalase ein streng intrazellulär gebundenes Enzym ist, das durch Präparation und Hämolyse der Erythrozyten nicht in den plasmatischen Überstand übertritt.

Dithionit als Reduktionsmittel reagiert mit beiden Signalkomponenten der Katalase und führt bei ausreichend hoher Konzentration zur Ausbildung einer einzelnen Spezies mit leicht abweichendem g-Faktoren ($g=6,67/5,22/1,99$). Eine Reduktion des Fe(III)-Ions findet dabei nicht statt. Dieses Verhalten ist auch in der Literatur beschrieben [JACOB, 1979], der genaue Mechanismus der Signalkonversion ist aber nicht bekannt und kann auch im Rahmen dieser Arbeit nicht näher geklärt werden.

Demgegenüber kann durch Hexacyanoferrat in der hier angewandten Konzentration keine Veränderung der Katalase-Signale erreicht werden. Offensichtlich reicht das Redox-Potential von Hexacyanoferrat nicht aus, das in der Katalase enthaltene Fe(III)-Häm weiter zu oxidieren, obwohl in der unter physiologischen Bedingungen ablaufenden Reaktion mit H_2O_2 ein Oxoferryl-Radikal mit Fe(IV) als Zwischenprodukt gebildet werden kann [HEWSON, 1979; JOUVE, 1997].

Das Signal des Eisen-Transferrins ist sowohl bei 77K als auch bei 4K gut aufgelöst. Auch Eisen-Transferrin bildet ein Fe(III)-„high-spin“ System, die Symmetrie wird aber im Wesentlichen durch die Art der bindenden „synergistischen Anionen“ bestimmt. Unter physiologischen Bedingungen dient

Bicarbonat als „synergistisches Anion“, wobei die Symmetrie der Spektren zwischen einem rein axialen und einem rein rhombischen System liegt [AISEN, 1972]. Das Transferrin-Spektrum setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen, die durch unterschiedliche Konformation der beiden Domänen des Transferrin hervorgerufen werden [FOLAJTAR, 1982; YANG, 1987]. Durch die Molekülstruktur in Anwesenheit von Bicarbonat werden Resonanzübergänge sowohl im unteren Kramer-Dublett bei $g=9$, als auch im mittlerem Kramer-Dublett bei $g=4,3$ möglich. Durch Dithionit kann Fe(III)-Transferrin vollständig zu Fe(II)-Transferrin reduziert werden. Aufgrund der starken Streuung der Messwerte kann über die Kinetik der Reaktion aber keine sichere Aussage gemacht werden. Allerdings ist schon lange bekannt, dass Transferrin mit Fe(III) einen Komplex bildet, der gegen chemische Einwirkung, Proteolyse und Denaturierung sehr stabil ist [WINDLE, 1963; FLETCHER; 1968]. Transferrin bindet Eisen unter physiologischen Bedingungen in der dreiwertigen Form. Ob bei der Reduktion mit Dithionit das Fe(II) dann vom Transferrin-Komplex dissoziiert, kann im Rahmen dieser Versuche nicht beantwortet werden, denn freies Fe(II) liefert aufgrund der Elektronenverteilung keinen spektralen Beitrag. Demgegenüber verändert sich das ESR-Signal des Fe(III)-Transferrin unter Einwirkung von Hexacyanoferrat nicht, eine Reaktion mit Hexacyanoferrat findet unter diesen Bedingungen nicht statt.

Ionisierende Strahlung kann direkte Schädigung an organischen Molekülen verursachen oder über die Bildung von Radikalen weitere Reaktionen auslösen. Im Rahmen dieser Versuche wurde Röntgen-Strahlung mit definierter Dosis eingesetzt, um Veränderungen an den bereits beschriebenen Metalloproteinen zu untersuchen. Zudem sollte geprüft werden, ob durch ionisierende Strahlung neue ESR-Signale erzeugt werden können.

Die größten Veränderungen können dabei bei der Bestrahlung von Ferri-Hämoglobin beobachtet werden. Wird isoliertes Ferri-Hämoglobin (HbA) oder frei im Plasma gelöstes Ferri-Hämoglobin bestrahlt, so kommt es zu einer Abnahme der Signalintensität, die die Reduktion des vorhandenen Ferri-Hämoglobins zu Fe(II)-Hämoglobin anzeigt. Eine Reduktion von Ferri-Hämoglobin durch Bestrahlung ist durch Bildung von im Lösungsmittel generierten mobilen Elektronen als auch durch direkte Strahlenwirkung am Protein beschrieben [KAPPL, 1981]. Der genaue Mechanismus der im Rahmen dieser Versuche zur

Reduktion führt kann allerdings alleine durch die hier durchgeführten ESR-Messungen nicht geklärt werden.

Durch die Bestrahlung intakter Erythrozyten wird demgegenüber eine Oxidation des Fe(II)-Hämoglobin beobachtet. Dabei kommt es zusätzlich zu einer deutlichen Veränderung des ESR-Signals mit Verbreiterung und Verschiebung des g -Faktors. Mit steigender Bestrahlungsdauer bilden sich zudem breite Signale an beiden Seiten des Ferri-Hämoglobin-Signals aus. Diese Veränderungen sind im Rahmen dieser Versuche nur schwer zu interpretieren. In der ERY-Fraktion liegt das Hämoglobin intrazellulär vor und ist im Vergleich mit dem frei gelösten Hämoglobin deutlich höher konzentriert und weniger von wässrigem Lösungsmittel umgeben. Durch die Bestrahlung wird scheinbar ein oxidierendes Äquivalent generiert, das möglicherweise einen Bestandteil des Erythrozyten darstellt, das über eine Oxidation mit Fe(II)-Hämoglobin weiter reagiert. Denkbar, aber wenig wahrscheinlich, ist auch ein direkter Strahlungseffekt am Hämoglobin-Molekül mit nachfolgender Oxidation der Fe(II)-Häm-Gruppe. Dies könnte die Ursache der beobachteten Strukturveränderung des ESR-Signals und/oder der Ausbildung des breiten Signals an den beiden Flanken darstellen. Allerdings kann die Veränderung des Ferri-Hämoglobin-Signals auch durch Wechselwirkung der Fe(III)-Zentren untereinander oder aber mit generierten Radikalen, die einen spektralen Beitrag im Bereich $g=2$ haben, einhergehen. Diese Vorgänge können im Rahmen dieser Versuche nicht genau getrennt werden.

Die Veränderungen der Katalase-Signale in Erythrozyten nach Bestrahlung lassen sich wegen der zunehmenden Überlagerung des Ferri-Hämoglobin-Signals nicht genau beobachten. Geringe Bestrahlungsdosen führen aber zunächst zu keiner Reaktion am Fe(III)-Häm-Zentrum der Katalase.

Die Bestrahlung des Fe(III)-Transferrins verursacht eine nur allmähliche Abnahme der Signalintensität, ohne dass das Signal durch die in dieser Versuchsreihe verwendeten Bestrahlungsdosen vollständig reduziert werden kann. Das mit steigender Bestrahlungsdosis im Bereich von $g=4,0$ zunehmende scharfe Singlet wird durch eine Fe(III) basierte Spezies verursacht, die möglicherweise im Bereich $g=11,2$ ein Korrelat besitzt. Diese Veränderungen hängen mit dem Fe(III)-Transferrin zusammen. Allerdings kann alleine durch die Messungen nicht geklärt werden, ob die Bestrahlung zu einer Freisetzung des Fe(III) führt oder ob die neue paramagnetische Spezies noch mit dem Transferrin assoziiert ist.

Neben den beschriebenen Hauptsignalen der Fe(III)-„high-spin“-Moleküle Hämoglobin, Katalase und Transferrin sind in unterschiedlichem Maße schwache Signale besonders im oberen Feldstärkenbereich bei 4K detektierbar. Diese Signale sind aber nicht konstant in den Fraktionen unterschiedlicher Chargen zu beobachten und zudem häufig von Hintergrundsignalen überlagert. Alleine das kupferhaltige Protein Caeruloplasmin mit dem typischen Linienmuster konnte in manchen Chargen der „FFP“-Konzentrate nachgewiesen werden. Die nicht konstante Detektion der Signale ist wahrscheinlich auch hier durch die unterschiedliche Lagerungsdauer der einzelnen Chargen verursacht [ONORI, 1981]. Die Reaktion mit Dithionit führt zu einer Reduktion des Caeruloplasmin-Signals, während unter Einwirkung von Hexacyanoferrat keine Veränderung erfolgt. Durch Bestrahlung wird das Caeruloplasmin-Signal stark von strahlungsgenerierten Signalen überlagert, so dass es nicht weiter klar beobachtbar ist.

Bei der Bestrahlung der Proben werden besonders im oberen Feldbereich starke, komplex zusammengesetzte Signale gebildet. In der Hämoglobin-Fraktion können bei 77K FeO_2^- -Zentren mit den typischen Anteilen der α - und β -Ketten differenziert werden [KAPPL, 1981]. Die Intensität dieser Signale ist temperaturabhängig, sie sind bei 4K nur schwach aufgelöst [KAPPL, 1988]. In den übrigen Fraktionen konnten durch Bestrahlung keine für eine Fraktion typischen Signale erzeugt werden. Neben den Signalen der H^\bullet - und OH^\bullet -Radikale kann ein offensichtlich schnell relaxierendes, strahlungsgeneriertes Signal mit $g=2,09$ beobachtet werden, das im Temperaturbereich von 77K nicht nachweisbar ist und möglicherweise von organischen oder metallgebundenen Peroxidradikalen herrührt.

Die hier durchgeführten systematischen ESR-Untersuchungen zeigten, dass die bereits bekannten Signale der eisenhaltigen Proteine (Ferri-Hämoglobin, Katalase, Fe(III)-Transferrin) erwartungsgemäß vorhanden sind. Die Fe(III)-Komponenten von Ferri-Hämoglobin und Fe(III)-Transferrin konnten durch Dithionit in allen Fällen reduziert werden, wohingegen das Signal der Katalase deutliche spektrale Änderungen zeigte, ohne dass das Signal vollständig verloren ging. Unter oxidativen Bedingungen konnte alleine Fe(II)-Hämoglobin zu Ferri-

Hämoglobin oxidiert werden. Weder durch Oxidation noch durch Reduktion konnten in den untersuchten Fraktionen neuen Signale generiert werden.

Im Gegensatz dazu führte die Bestrahlung von ERY-Konzentraten, freiem Hämoglobin und Plasma-Fractionen teilweise zu neuen Signalen. Intrazelluläres Hämoglobin zeigte eine Zunahme des Fe(III)-Signals und damit eine Oxidation von Fe(II)-Hämoglobin, während die Bestrahlung von freiem Hämoglobin(A) und frei im Plasma vorliegendem Ferri-Hämoglobin zu einer Reduktion führt. Ebenso konnte im oberem Feldstärkenbereich ein schnell relaxierendes Signal bei $g=2,09$ nachgewiesen werden, dessen Herkunft ungeklärt ist. Durch die Bestrahlung von Fe(III)-Transferrin wird ein neues Singlet-Signal bei $g=4,0$ generiert, bei gleichzeitiger Abnahme des Transferrin-Signals. Ob dabei das Eisen aus dem Transferrin gelöst wird oder ob eine strukturelle Änderung der Bindungstasche induziert wird, kann mit den hier durchgeführten Versuchen nicht beantwortet werden.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sind allerdings nicht ohne weiteres auf physiologische Vorgänge übertragbar. Die Messungen sind bei sehr tiefen, unphysiologischen Temperaturen durchgeführt worden, so dass mögliche temperaturabhängige Veränderung der Struktur und damit der Eigenschaften der Proteine in der Interpretation berücksichtigt werden müssen. Zudem sind die Molekülsysteme unter physiologischen Bedingungen Teil einer dynamischen und regulierenden Umgebung und können in ihren Reaktionen nicht isoliert betrachtet werden. Auch bestand die Zielsetzung dieser Arbeit in einer qualitativen Untersuchung der Proben, Parameter wie Alter der Blutproben, exakte Lagerung, konstanter pH-Wert der Fraktionen und Signalveränderungen durch die Präparation wurden nicht systematisch untersucht. Dennoch können die Ergebnisse als Grundlage für weitere Versuche mit spezieller Fragestellung genutzt werden. Dabei ist insbesondere die systematische Untersuchung von Blut und dessen Bestandteilen von besonderem Interesse, weil es im Rahmen von generalisierten Krankheitsbildern (Sepsis, Ischämie, Neoplasie) oder äußeren Einflüssen (Medikamenten-Wirkung, therapeutische Bestrahlung, Dialysebehandlung) immer mit beteiligt ist. Neben der Aufklärung von pathologischen Prozessen könnten auch spezielle „Marker-Signale“ definiert werden, die dann zum frühzeitigen Nachweis von pathologischen Veränderungen dienen könnten. Wegen der Detektion kleinster Radikalkonzentrationen und der

Möglichkeit, paramagnetische Zentren und deren nächste Umgebung isoliert betrachten zu können eignet sich die ESR-Spektroskopie dabei besonders gut als sensitive Methode. Aufgrund der oft nicht bekannten und komplexen Abläufe innerhalb zellulärer Systeme ist aber die genaue Festlegung der Untersuchungsparameter notwendig. Insbesondere muss vor einer Interpretation der Signale die Auswirkung der Lagerung und Verarbeitung der Proben genau untersucht und definiert werden. Nur unter standardisierten Bedingungen kann die ESR-Spektroskopie dann zum Nachweis und der Aufklärung pathologischer Veränderung in komplexen biologischen Systemen eingesetzt werden.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Aasa R., Malmström B.G., Saltman P.: „The Specific Binding of Iron (III) and Copper (II) to Transferrin and Conalbumin“, *Biochemica et Biophysica Acta*, 75, 203-222, 1963
- (2) Aisen P., E. B. Brown : “The Iron-binding Function of Transferrin in Iron Metabolism“, *Semin Hematol* 14, 31-53, 1977
- (3) Aisen P., Pinkowitz R. A., Leibman A.: “EPR and other Studies of the Anion-Binding Sites of Transferrin“, *Annals New Yourk Academy of Sciences*, 337-345, 1972
- (4) Alberts B., Bray D., Lewis J.: „Molekularbiologie der Zelle“, VCH, 1986
- (5) Aust S.D., Chingnell C.F.: “Contemporary Issues in Toxicology, Free Radicals in Toxicology“, *Toxicology and applied Pharmacology* 120, 168-178, 1993
- (6) Bär F., Berndt A., Dimroth K.: „ESR-Spektroskopie organischer Radikale“, *Chemie in unserer Zeit*, 1975
- (7) Bates G. W., Schlabach, M. R.: “The Nonspecific Binding of Fe(III+) to Transferrin in the Absence of Synergistic Anions“, *The journal of Biological Chemistry*, 250, 2177-2181, 1975
- (8) Bates G. W., Wernicke J.: “The Kinetics and Mechanism of Iron(III) Exchange between Chelates and Transferrin“, *The Journal of Biol. Chemistry*, 246, 3679-3685, 1971
- (9) Benedetto C.: “Electron Spin Resonance Studies on Normal Human Uterus and Cervix and on Benign and Malignant Uterine Tumours“, *Cancer Research* 41, 2936-2942, 1981
- (10) Beutler E.: “Blood Cells as Markers for Metabolic Disorders“ *Blut* 51, 371-376, 1985
- (11) Bloom L. M., Benkovic S. J.: “Characterization of Phenylalanine Hydroxylase“, *Biochemistry*, 25, 4204-4210, 1986
- (12) Blum, H.; Chance, B.: ”Effect of pH on Bovine Liver Catalase as Determined by Electron Paramagnetic Resonance“, *Biochimica et Biophysica Acta*, 534: 317-321; 1978
- (13) Blumberg, W; Peisach, J.: “Oxidases and Related Redox Systems“, *University Park Press*, 229-310, 1971
- (14) Bolton J. R., Mataga N., McLendon G.: “Electron transfer in Inorganic, Organic and Biologic Systems“, *American Chemical Society*, 1991

- (15) Bulkley G. B.: "The Role of Oxygen Free Radicals in Human Disease Processes", *Surgery*, 94, 407-411, 1983
- (16) Bundesgesundheitsblatt: „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)“ Springer-Verlag, 43, 555-589, 2000
- (17) Cadenas E.: "Basic Mechanisms of Antioxidant Activity", *BioFactors* 6, 391-397, 1997
- (18) Cammack R., Ce. Cooper,: "Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy of Iron Complexes and Iron Containing Proteins", *Methods-Enzymology*, 227, 353-84, 1993
- (19) Campbell Iain, Dwek Raymond A.: "Biological Spectroscopy", The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1984
- (20) Cheston W.: "Elementary Theory of Electric and Magnetic Fields", John White & Sons INC. New York, 1964
- (21) Christen: „Grundlagen der allgemeinen und anorganischen Chemie – Wellenmechanik“, Salle, Ffm, 1988
- (22) Davydov R., Kofman V., Nocek JM., Noble RW., Hui H., Hoffman BM.: "Conformational substates of the oxyheme centers in alpha and beta subunits of hemoglobin as disclosed by EPR and ENDOR studies of cryoreduced protein", *Biochemistry* 43, 6330-6338, (2004)
- (23) Dubach J., Gaffney, B. J.: "Effects of the Synergistic Anion on Electron Paramagnetic Resonance Spectra of Iron-Transferrin Anion Complex is Consistent with Bidentate Binding of the Anion", *Biophys. J.* 59, 1091-1100, 1991
- (24) Fee J.A.: "Copper Protein Systems Containing the "Blue" Copper Centre", *Structure and Bonding* 23, 1-60, 1975
- (25) Fiege R., Schreiber U.: "Study of Heme Fe(III) Ligated by OH⁻ in Cytochrom b-559 and its Low Temperature Photochemistry in Intact Chloroplasts", *FEBS letter* 377, 325-329, 1995
- (26) Finkelburg W.: „Einführung in die Atomphysik“, Springer Verlag Berlin, 1976.
- (27) Fitzky H.G.: „Elektronen-Spin-Resonanz: Anwendung und Verfahrensweisen“, Springer-Verlag, 1984
- (28) Fletcher J, Huehns E.R.: "Function of Transferrin" *Nature* 218, 1211-1214, 1968
- (29) Folajtar, Chasteen: "Measurment of Nonsynergist Anion Binding to Transferrin by EPR-Difference-Spectroscopy", *J. Am. Chem. Soc.* 104; 5775-5780, 1982

- (30) Fujii H., Kakinuma K.: "Electron Paramagnetic Resonance Studies on Cytochrom b-558 and Peroxidase of Pig Blood Granulocytes", *Biochemica et Biophysika Acta*, 1136, 239-246, 1992
- (31) Gaffney B. J., Dimitros V.: "Access of Ligands to the Ferric Centre in Lipoxygenase-1", *Biophys. J.*, 64, 773-783, 1993
- (32) Gaffney B. J., Silverstone Harris J.: "Simulation of the EMR Spectra of High-Spin Iron in Proteins" *Biological Magnetic Resonance*, Plenum Press, New York, 13, 1-57, 1993
- (33) Galla H-J.: „Spektroskopische Methoden in der Biochemie“, G. Thieme Verlag Stuttgart, 1988
- (34) Gary S., Jacob G.S., Orme-Johnson W.H: "Catalase of *Neurospora crassa*, Electron Paramagnetic Resonance and Chemical Properties of the Prosthetic Group", *Biochemistry*, 18, 1979
- (35) Gersonde K., Netter H.: „Elektronenstruktur der prosthetischen Gruppe und Tertiärstruktur in Hämoproteinen“, *J. Mol. Biol.*, 10, 475-487, 1964
- (36) Giulivi C., Davies K. J.: "A Novel Antioxidant Role for Hemoglobin", *The Journal of Biological Chemistry*, 265, 19453-19460, 1990
- (37) Goldberg I., Hochman A.: "Three Different Types of Catalases in *Klebsiella Pneumonie*", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 268, 124-128, 1989
- (38) Gordy W.: "Theory and Application of ESR", *Techniques of Chemistry*, John Wiley & Sons, 1980
- (39) Hagen W.R.: "Electron Paramagnetic Resonance of Metalloproteins", Lecture notes for the EEC-ESF Advanced Course on Chemistry of Metals in Biological Systems, Louvain-la-Nueve, Belgium, May 1993
- (40) Halliwell B, Grootveld M.: "The Measurement of Free Radical Reaction in Humans", *FEB letters* 213, 9-14, 1987
- (41) Hewson W.D., Hager L.P.: "The Porphyrins Biochemistry–Catalase", VII, Academic Press, NY 1979
- (42) Ho Chien: "Hemoglobin and Oxygen Binding", The Macmillan Press, 1982
- (43) Hollocher T. C.: "Electron Spin Resonance Studies of the Denaturation of Oxy- and Methemoglobin", *the Journ. of Biolog. Chemistry*, 241, 1958-1968, 1966
- (44) Hongze Sun, Cox, M. C., Hongyan L., Sadler P. J.: "Rationalisation of Metal Binding to Transferrin: Prediction of Metal-Protein Stability Constants", *Metal Sites in Proteins and Models, Iron Centres*, Springer Verlag, 71-102, 1997

- (45) Hoppe W. , Lohmann W. :“Biophysik – ein Lehrbuch“, Springer Verlag, 1977
- (46) Huebers H. A., Finch C. A.: “Transferrin: Physiologic Behaviour and Clinical Implication“, *Blood*, 64, 763-767, 1984
- (47) Ingram D. J. E.: “Biological and Biochemical Application of Electron Spin Resonance“, Adam Hilger LTD, 1969
- (48) Jacob G.S., Orme-Johnson W.H.: “Prosthetic group of N. Crassa Catalase“, *Biochemistry*, 18, 2975-2980, 1979
- (49) Jouve H.M., Andreoletti P.: “Structural Analysis of Compound I in Hemoproteins: Study on Proteus Mirabilis Catalase“, *Biochimie* 79, 667-671, 1997
- (50) Kanner J., S. Harel: “Initiation of the Membranal Lipid Peroxidation by Activated Methmyoglobin and Methhemoglobin“, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 237, 314-321, 1985
- (51) Kappl R., Höhn-Berlage M, Hüttermann J, Bartlett N, Symons M.C.R.: “Electron spin and electron nuclear double resonance of the FeO₂-centre from irradiated oxyhemo- and oxymyoglobin“, *Biochimica et Biophysica Acta* 827, 327-343 (1985)
- (52) Kappl R.: “Elektronen-Spin-Resonanz-Untersuchungen strahlen-induzierter FeO₂⁻-Zentren in Hämoglobin“, Diplomarbeit Universität Regensburg, 1981
- (53) Kappl R.: “Häm-Globin Wechselwirkung in paramagnetischen Ligandierungsformen von Myoglobin und Hämoglobin: Elektron-Kern-Doppelresonanz Untersuchungen in gefrorenen Lösungen und im Einkristall“, Dissertation Universität Regensburg, 1988
- (54) Kretchmar, R.: "Effects of Ionic Strength on Iron Removal from Monoferric Transferrins", *Inorg. Chem.* 27, 1436-1441, 1988
- (55) Lassmann G., Leirmann B., Langen P.: “Stability and Reactivation of Tyrosine Radicals from Ribonucleotide Reductase in Tumor Cells Studied by ESR“, *Free Radicl Biology & Medicine*, 6, 9-14, 1989
- (56) Lloyd E., Hildebrand D. P., Tu M. K., Mauk A. G.: “Conversion of Myoglobin into a Reversible Electron Transfer Protein that maintains Bishistidine Axila Ligation“, *Journal of the American Chemical Society*, 117, 6434-6438, 1995
- (57) Löffler, Petrides: „Physiologische Chemie“, Springer-Lehrbuch, 4. Auflage, 1988
- (58) Lohmann W, Lange R.: “On the Possible Involment of Ascorbic Acid and Copper Proteins in Leukemia: ESR Investigation on the Interaction between Ascorbic Acid and Some Transition metal Ions“, *Z. Naturforsch.* 34c, 546-549, 1979

- (59) Lohmann W. Schreiber J: "Electron Spin Resonanz (ESR) Investigations on Blood of Patients with Leukemia", Blut 39, 147-151, 1979
- (60) Lohmann W., Schreiber J., Greulich W.: "On the Possible Involvement of Ascorbic Acid and Copper Proteins in Leukemia" Blut 39, 317-326, 327-332, 1979
- (61) Lohmann W: "ESR Investigation on Blood Treats Intra Venously with Ascorbic Acid", Z. Naturforsch. 36c, 1-4, 1981
- (62) Lohmann W.: „Vitamin C und Krebs“, Berichtsband Medicenale XVI. Iserlohn, Sonderdruck, 1986
- (63) Mandon D. Weiss R.: "Models for Compound I: Generation and Spectroscopic Characterization of New Oxoferryl Porphyrin π Cation Radical Species", Inorganic Chemistry, 31, 4404-4409, 1992
- (64) Maruyama T., Kataoka N., Nagase S.: "Identification of the Three-Line Electron Spin Resonance Signal and its Relationship to Ascites Tumors", Cancer Research 31, 179-184, 1971
- (65) McBrien D.C.H., Slater T.F.: "Free Radiclas, Lipid Peroxidation and Cancer", Academic Press, 1982
- (66) McCord J. M.: "Oxygen-Derived Free Radicals in Post ischemic Tissue Injury", The New England Journal of Medicine, 312, 159-163, 1985
- (67) McCord J. M.: "The Superoxide Free Radical: Its Biochemistry and Pathophysiology", Surgery, 94, 412-414, 1983
- (68) Michal G. :Biochemical Pathways", Spektrum Akademischer Verlag, 1999
- (69) Musci G., Fraterrigo T.Z.L., Calabrese L, and. McMillin D.R.: "On the Lability and Functional Significance of the Type 1 Copper Pool in Ceruloplasmin." JBIC, 4, 441-446, 1999
- (70) Onori S., Rosati A.: „Electron Paramagnetic Resonance Study of Storage Effects on Ceruloplasmin in Human Serum Compared with Purified Ceruloplasmin in Aqueous Solution", Physiol. Chem & Physics 13, 439-446, 1981
- (71) Palmer G.: „Electron Paramagnetic Resonance of Hemoproteins“, in *Iron porphyrins part two*, Addison-Wesley Publishing Company, London, 43-88, 1983
- (72) Parks D. A., Bukley G. B., Granger D. N.: "Role of Oxygen Free Radicals in Shock, Ischemia, and Organ Preservation", Surgery, 94, 428-432, 1983
- (73) Peisach J. Blumberg W.E.: "The Effects of Protein Conformation on the Heme Symmetry in High Spin Ferric Heme Proteins as Studied by

- Electron Paramagnetic Resonance“, The Journal of Biological Chemistry, 246, 3342-3355, 1971
- (74) Perussi J. R., Costa F.: “An ESR Study of Pathologic Red Blood Cell Membranes“, Magnetic Resonance in Medicine 16, 132-138, 1990
- (75) Price E. M., Gibson J. F.: " Electron Paramagnetic Resonance Evidence for a Distinction between the Two Iron-Binding Sites in Transferrin and in Conalbumin", J. Biol. Chem. 247, 8031-8035 , 1972
- (76) Princiotto J. V., Zapolski E. J.: “Difference between the Two Iron-Binding Sites of Transferrin“, Nature, 255, 87-88, 1975,
- (77) Pulatova M. K.: “Analyses of the EPR Spectra of Irradiated Samples of Liver and a Hepatoma“, Biofizika 23, 852-858, 1978
- (78) Que L.: “Mössbauer and EPR Spectroscopy on Protocatechuate 3,4-dioxygenase from Pseudomonas Aeruginosa“, Biochimica et Biophysica Acta, 452, 320-334, 1976
- (79) Rachmilewitz E.A., Peisach J., Blumberg W.E.: “Studies on the Stability of Oxyhemoglobin A and its Consistent Chains and their Derivatives“, The Journal of Biological Chemistry, 246, 3356-3366, 1971
- (80) Rikhireva G.T., Pulatova M.K.: “Study of Reaction of Tumour and Normal Tissues to the Action of Ionizing Radiation s by the EPR Method – I. Comparison of Low Temperature EPR Spectra of Irradiated Tumours and Normal Tissue“, Biofizika 23, 396-397, 1978
- (81) Sadler P.J.: „Metal Sites in Proteins and Models: Iron Center“, Springer-Verlag 1997
- (82) Scheider F. Plato M.: „Elektronenspin-Resonanz“, Thieme-Taschenbücher Verlag Thieme KG, Band 40, 1971
- (83) Schimdt R.F., Thews G.: „Pathophysiologie des Menschen“, Springer-Verlag 23. Auflage, 1987
- (84) Svistunenko D. A.: “The Globin-Based Free Radical of Feryl Hemoglobin is Detected in Normal Human Blood“, The Journal of Biological Chemistry, 272, 7114-7121, 1997
- (85) Swartz H. M., Bolton J. R., Borg D. C.: “Biological Applikations of Electron Spin Resonance“, Wiley-Interscience, 1972
- (86) Symons M. C. R.: “Radiation Processes in Frozen Aqueous Systems“, Ultramicroscopy 10, 97-104, 1982
- (87) Tomasi A., Benedetto C.: “Studies on Human Uterin Cervix and Rat Uterus using S-, X-. Q-band Electron-Spin-Resonance Spectroscopy“, Biochem. J. 224, 431-436, 1984

- (88) Ukei T., Monden M.: "Electron Spin Resonance Signals of Non-Heme Iron as an Indicator of Ischemia-Reperfusion Injury of the Liver", *Transplantation* 58, 287-292, 1994
- (89) Vainshtein B. K., Melik-Adamyany W. R.: "Three-dimensional Struktur of Catalase from *Penicillium vitale* at 2.0 Å Resolution" *J. Mol. Biol.* 188, 49-61; 1986
- (90) van der Kraaij A. M.M. , Koster J. F. Hagen W. R.: Appraisal of the EPR Signals in (post)-ischemic cardiac tissue" *Biochem. J.* 264, 678-694, 1989
- (91) Voggenreiter B.: „ESR-Spektroskopische Untersuchungen der Sauerstoffkonzentration in Erythrocyten“, Dissertation 1991
- (92) Wajnberg E., Bemski G.: "Electron Spin Resonanz Measurements of Erythrocytes and Haemoglobin Stored at 77K" *Naturwissenschaften* 80, 472-473, 1993
- (93) Wallic D. E., Bloom L. M., Gaffney B. J., S. J. Benkovic: "Reductive Activation of Phenylalanine Hydroxylase and its Effect on the Redox State of the Non-Heme Iron", *Biochemistry*, 23, 1295-1302, 1984
- (94) Wertz J. E., Bolton J, R.: „Electron Spin Resonance: Elementary Theory and Practical Application“New York: McGraw-Hill Book Company, 1972
- (95) Wickens D. G., Davies M. J., Fairbank J.: "Studies on Cervical Intraepithelial Neoplasia: The level of Octadeca-9,11-dienoic Acid and Measurement of the Free Radical Content by Electron Spin Resonance Spectroscopy“, *Am-J-Obstet-Gynecol.*, 162, 854-8, 1990
- (96) Williams-Smith D.L, Patel K.: „Induced Changes in the Elektron Paramagnetic Resonance Spectra of Mammalian Catalases“, *Biochimica et Biophysica Acta*, 243-252, 1975
- (97) Williams-Smith D.L., Morrison P.J.: „Electron Paramagnetic Resonance Spectra of Catalase in Mammalian Tissues“, *Biochimica et Biophysica Acta*, 253-261, 1975
- (98) Windle J.J., Wiersema A. K.: "Investigation of the Iron and Copper Complexes of Avian Conalbumins and Human Transferrins by Electron Paramagnetic Resonance" *Biochemistry*, 2, 1341-1345, 1963
- (99) Yang A.-S., Gaffney B. J.: "Determination of Relative Spin Concentration in some High-Spin Ferric Proteins using E/D-Distribution in Electronic Paramagnetic Resonance Simulation“, *Biophys. J.*, 55-67, 1987
- (100) Zivin J. A., Choi D. W.: „Neue Ansätze zur Schlaganfall-Therapie“, *Spektrum der Wissenschaft*, 58-66, 1991

ANHANG I

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. J. Hüttermann danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und die Aufnahme am Institut für Biophysik. Er hat den Fortgang der Arbeit stets aufmerksam verfolgt und stand als kooperativer und anregender Gesprächspartner immer zur Verfügung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. R. Kappl. Er hat mich all die Jahre begleitet, führte mich in die Technik der ESR-Spektroskopie ein und vermittelte mir grundlegende Kenntnisse in der Durchführung wissenschaftlicher Versuche. Nur mit seiner Hilfe und unendlicher Geduld konnte ich mich in das für mich fachfremde, komplexe Thema einarbeiten. Mir ist sehr bewusst, dass ich ihm immer wieder zusätzliche Zeit abverlangte, die er eigentlich für seine Arbeit aber auch für seine Familie gebraucht hätte. Die geopferten Wochenenden werde ich nie wiedergutmachen können, möchte mich aber auch ausdrücklich bei seiner Frau bedanken, dass sie diese Wochenendeinsätze zugelassen und uns sogar mit Häppchen versorgt hat.

Danken möchte ich auch stellvertretend für die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe insbesondere Andrea Schäfer und Thomas Heck. Sie alle sorgten für eine äußerst angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und waren immer hilfsbereite Ansprechpartner.

Für die Überlassung der Proben danke ich der Blutbank der Abteilung für klinische Haemostasiologie und Transfusionsmedizin der Universität des Saarlandes.

Meine tiefste Dankbarkeit gebührt meinen Eltern, die mich während meines Studiums und meiner Ausbildung bedingungslos unterstützt haben.

Meiner Schwester danke ich für wiederholtes Korrekturlesen.

Mein besonderer Dank gilt aber auch meiner Familie, meiner Frau und meinen beiden Söhnen, die mich in dieser Zeit häufig entbehren mussten.

ANHANG II

TABELLARISCHER LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name:	Hunsdorfer
Vorname:	Emmerich
Geburtsdatum:	31.08.1966
Praxis Adresse:	Loristraße 4, 80 335 München
Geburtsort:	Großsteffelsdorf (SK)
Nationalität:	Deutscher
Familienstand:	verheiratet seit 1999, 2 Kinder (Jahrgang 2000 und 2002)

Schul Ausbildung:

1978-1983:	Besuch des staatlichen Otto-Hahn-Gymnasiums in Saarbrücken
1983-1986:	Besuch des Gymnasiums Philippinum in Weilburg
1986:	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium:

Okt. 1988:	Aufnahme des Medizinstudiums an der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar
Okt. 1990:	Ärztliche Vorprüfung
März 1992:	1. Staatsexamen
März 1994:	2. Staatsexamen
April 1994 - Mai 1995:	Praktisches Jahr in der Caritasklinik St. Theresia in Saarbrücken
Mai 1995:	3. Staatsexamen
Dez. 1996:	Approbation

Beruflicher Werdegang

Juni 1995 - Nov. 1996:	AiP am Klinikum Freising
Dez. 1996 - Juli 2004:	Assistenzarzt am Klinikum Freising
April 2004:	Anerkennung als Facharzt für Innere Medizin
Aug. 2004 - Sept. 2006:	Assistenzarzt am Zentralklinikum Augsburg (Weiterbildung Nephrologie)
Okt. 2006:	Anerkennung der Schwerpunktbezeichnung Nephrologie
seit Jan. 2007:	Niederlassung als Internist in München