

**Speziationsanalyse von proteingebundenen Elementen in Cytosolen
als biologische Marker für Lebensprozesse
unter besonderer Berücksichtigung der Metallothioneine im Gehirn**

vorgelegt von

Diplom-Chemikerin Andrea-Nicole Richarz
aus Berlin

Von der Fakultät II - Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuß:

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Gernot Renger

Berichter: Prof. Dr. rer. nat. Peter Brätter
Prof. Dr. rer. nat. Jörn Müller

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 17. April 2002

Berlin 2002

D 83

A b s t r a c t

Richarz, Andrea-Nicole

Speziationsanalyse von proteingebundenen Elementen in Cytosolen als biologische Marker für Lebensprozesse unter besonderer Berücksichtigung der Metallothioneine im Gehirn

Bei der Aufklärung der Rolle von Spurenelementen in komplexen physiologischen oder pathologischen Stoffwechselvorgängen erlaubt die Speziationsanalyse tiefere Einblicke in die im Organismus ablaufenden Prozesse als die Bestimmung von Gesamtelementgehalten. In der vorliegenden Arbeit wurden die an unterschiedliche Proteine im Cytosol von menschlichen Geweben gebundenen Elemente untersucht. Im Vordergrund standen dabei die Metallothioneine (MT) - niedermolekulare, cysteinreiche, metallbindende Proteine, welche als an zahlreichen vitalen Stoffwechselprozessen beteiligt angesehen werden. Die Isoform MT-3 wurde vor allem im Gehirn gefunden und seit ihrer Entdeckung in Zusammenhang mit Morbus Alzheimer (AD) diskutiert. Zur Speziationsanalyse wurden Verbundverfahren aus chromatographischer bzw. kapillarelektrophoretischer Trennung der Biomoleküle und on-line gekoppelter Elementdetektion mittels Plasmamassenspektrometrie (ICP-MS) eingesetzt. Die Abtrennung des MT-3 von den anderen Isoformen war dabei für eine gesonderte Betrachtung wichtig. Die einzelnen Signale wurden verschiedenen Proteinen mittels spezifischer Nachweise im Eluat der Trennungen zugeordnet. Die Identität des MT-3-Peaks konnte sicher bestätigt werden.

Neben der Größenausschlußchromatographie wurden weitere Trennverfahren verwendet, welche je nach dem Ziel der durchzuführenden Untersuchung ausgewählt werden müssen. In Kooperation mit dem GKSS Forschungszentrum, Geesthacht, wurde die dort entwickelte Kapillarzonenlektrophorese-ICP-MS-Kopplung für die Anwendung auf komplexe biologische Proben optimiert. Auftretende Probleme der Vergleichbarkeit von Signalen durch Variationen der Migrationszeiten wurden durch eine rechnerische Anpassung der Zeitachsen mittels mitlaufender Markersubstanzen gelöst. Zusätzliche Informationen wurden durch die Hintereinanderschaltung unterschiedlicher Trennmethoden erhalten.

Die Betrachtung der Elementprofile von verschiedenen Organen bestätigte die Hypothese, daß unterschiedliche Organe mit auf unterschiedliche Aufgaben spezialisierten Zellarten auch verschiedene Metalloprotein-Zusammensetzungen aufweisen. Die Verteilung der proteingebundenen Elemente in einem Organ von verschiedenen Patienten zeigte ebenfalls deutliche, auf unterschiedliche pathologische Prozesse zurückzuführende Unterschiede.

Um die in der Literatur uneinheitlichen Angaben zur Metallbeladung von MT-3 zu klären, wurde in einem Projekt am Center for Biochemical and Biophysical Sciences and Medicine an der Harvard Medical School, Boston, natives MT-3 aus Schweinegehirn untersucht. Es zeigte sich, daß im Cytosol mehrere, nicht trennbare Formen von MT-3 existieren, wobei es sich wahrscheinlich um unterschiedliche Metallbeladungen handelt, welche auch vom individuellen physiologischen Zustand abhängen. Die Betrachtung eines größeren Probenkollektives ist demnach aussagekräftiger.

Bei der Untersuchung eines Kollektives von AD- und Kontroll-Gehirnproben wurde ein signifikanter Unterschied von Elementgehalten in weißer und grauer Masse, jedoch nicht zwischen AD- und Kontrollproben gefunden. Das Hauptaugenmerk lag auf dem Vergleich der MT-Signale in den Elementprofilen, wobei die wenig variierenden Signale der Superoxid Dismutase sich als nützlicher Bezugspunkt erwiesen. Die MT-Metall-Signale waren bei den AD-Proben niedriger. Es zeigte sich jedoch, daß der größere Anteil an oxidierten MT im Cytosol der AD-Gehirne ein entscheidenderer Unterschied zu den Kontrollen war. Dies wies auf verstärkte oxidative Prozesse im Laufe der Erkrankung hin.

Danksagung

Diese Arbeit wurde von November 1998 bis Dezember 2001 in der Arbeitsgruppe „Spurenelemente in Gesundheit und Ernährung“ am Hahn-Meitner-Institut Berlin durchgeführt. Ein Teil der Arbeit war Gegenstand einer Kooperation mit der GKSS in Geesthacht. Ein anderer Teil der Versuche wurde während eines Forschungsaufenthaltes am Center for Biochemical and Biophysical Sciences and Medicine an der Harvard Medical School in Boston durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. P. Brätter danke ich für die Stellung des Themas und die Betreuung der Arbeit und vor allem für das immer große Interesse am Fortschritt der Versuche und die wertvollen Anregungen.

Herrn Prof. Dr. J. Müller danke ich für die Übernahme der Zweitberichterstattung.

Für die Bereitstellung von interessantem Probenmaterial bedanke ich mich bei Herrn Dr. S. Kösel, Herrn Dr. H.-J. Gramm, Frau Dr. Radtge und Herrn Dr. C. Köppel.

Herrn Prof. Dr. M. Vašák vom Institut für Biochemie der Universität Zürich danke ich für die Überlassung von rekombinantem humanen MT-3 sowie von Antikörpern gegen MT-3, welche beide für diese Arbeit sehr wertvoll waren.

Herrn Priv.-Doz. Dr. A. Prange von der GKSS danke ich für die Ermöglichung der Kooperation und der Untersuchung von Metallothioneinen mit der CZE-ICP-MS. Herrn Dr. D. Schaumlöffel sei ganz speziell für die interessante, produktive und besonders angenehme Zusammenarbeit gedankt.

Herrn Prof. B. L. Vallee, Herrn Dr. J. Riordan und Herrn Dr. W. Maret vom Center for Biochemical and Biophysical Sciences and Medicine danke ich für die Ermöglichung meines Forschungsaufenthaltes in ihrer Arbeitsgruppe, Herrn Dr. W. M. Keung für die Betreuung der Versuche. Und allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die stets gewährte Hilfe und das angenehme Arbeitsklima.

Frau Dr. D. Alber und Mitarbeitern danke ich für die Messung der Proben mittels INAA und Frau B. Stanik für die Hilfe bei der Probenvorbereitung. Bei Frau D. Melchert bedanke ich mich für die Hilfe mit den AAS-Messungen am HMI. Herrn Dr. A. Kyriakopoulos danke ich für die Hilfsbereitschaft bei auftretenden biochemischen Fragen.

Herrn Dr. U. Rösick sei besonders für die anregenden Kommentare beim Zusammenschreiben sowie für die Tips bei der statistischen Auswertung der Daten gedankt.

Vor allem möchte ich mich bei Herrn Dr. C. Wolf bedanken, für den unschätzbaren Beistand im Kampf gegen die Tücken der Technik, die unermüdlichen Diskussionen der Problematiken des Themas sowie die in jeder Beziehung gute Zusammenarbeit.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Übersicht zu Metallothioneinen	4
2.1	Metallothioneine.....	4
2.1.1	Isoformen	4
2.1.2	Eigenschaften	6
2.1.3	Mögliche Funktionen	7
2.1.4	Nachweismethoden	8
2.2	Metallothionein-3 (Growth Inhibitory Factor)	9
2.2.1	Entdeckung und Eigenschaften	9
2.2.2	Vorkommen	10
2.2.3	Struktur und inhibitorische Wirkung	11
2.2.4	Verminderte MT-3-Expression bei Morbus Alzheimer.....	12
3	Experimentelles	13
3.1	Verwendete Chemikalien	13
3.2	Verwendete Geräte	13
3.3	Herkunft der Gewebeproben	16
4	Methode: HPLC-ICP-MS-Kopplung	17
4.1	Kopplung von Chromatographie und ICP-MS-Detektion.....	17
4.2	Chromatographische Trennung	19
4.2.1	Größenausschlußchromatographie.....	19
4.2.2	Optimierung der Trennbedingungen.....	20
4.2.3	Kalibrierung der Trennsäule	21
4.2.4	Wahl eines Vorsäulenfilters.....	23
4.2.5	Meßparameter Chromatographie	24
4.3	ICP-MS-Detektion	25
4.3.1	Gemessene Isotope und Interferenzen	25
4.3.2	Optimierung der Intensitäten	28
4.3.3	Wahl der internen Standardelemente	30
4.3.4	Meßparameter ICP-MS	30
4.4	UV-Detektion.....	31

5	Probenvorbereitung: Cytosolextraktion	33
5.1	Extraktion des Cytosols aus Gewebeproben	33
5.2	Optimierung der Cytosolextraktion	34
5.3	Reproduzierbarkeit.....	36
5.4	Einfluß der Zentrifugationsbeschleunigung auf den gewonnenen Überstand.	38
5.4.1	Bestimmung von Leitenzymen	39
5.4.2	Chromatographische Trennung der verschiedenen Überstände.....	43
6	Identifizierung von Signalen in den Elementprofilen	46
6.1	Metallothioneine.....	46
6.1.1	Bindung von Metallen am Metallothionein	47
6.1.2	Hitzestabilität und Cadmiumbeladung.....	47
6.1.3	Metallothionein-3 im Gehirncytosol: Chromatographische Abtrennung von Metallothionein-1/-2	49
6.1.4	Einzelläufe von Metallothioneinen	50
6.1.5	Nachweis von MT-3 in Fraktionen der chromatographischen Trennung	51
6.1.5.1	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight – Massenspektrometrie	51
6.1.5.2	Aminosäurenanalyse	57
6.1.5.3	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot	59
6.2	Weitere Proteine in den Kupfer-, Zink-, Mangan-, Eisen-, Selen- und Iod-Profilen.....	61
6.2.1	Superoxid Dismutase (Kupfer/Zink, Mangan).....	62
6.2.2	Ferritin (Eisen)	64
6.2.3	Hämoglobin (Eisen)	66
6.2.4	Myoglobin (Eisen)	67
6.2.5	Transferrin (Eisen)	68
6.2.6	Glutathion Peroxidase (Selen)	69
6.2.7	Albumin (Zink)	72
6.2.8	Iodhaltige Substanzen	74
7	Vergleichende Untersuchungen von Cytosolproben mit verschiedenen analytischen Trennmethode	77
7.1	Größenausschlußchromatographie: Superdex 75 HR-Säule.....	77
7.2	Anionenaustauscherchromatographie	80
7.3	Kapillarzonenlektrophorese-ICP-SFMS: Kooperation mit dem GKSS-Forschungszentrum (Geesthacht).....	85
7.3.1	Kopplung von Kapillarzonenlektrophorese und ICP-SFMS.....	85
7.3.2	Optimierung der CZE-Trennung für Metallothioneine.....	88
7.3.3	Trennung von Cytosolen mit der Kapillarzonenlektrophorese	91

7.3.4	Einführung von Zeitmarkern	96
7.3.5	Kombination von SEC, AEC und Kapillarzonenoelektrophorese	99
7.4	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	103
7.5	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	104
7.6	Zusammenfassung	105
8	Ergebnisse der Untersuchungen der Organproben	107
8.1	Durchführung der Messungen der Gesamtgehalte.....	107
8.2	Untersuchungen der Gesamtelementgehalte in den Organproben.....	108
8.3	Elementprofile im Cytosol unterschiedlicher Organe.....	111
8.4	Elementprofile im Cytosol der Leber verschiedener Patienten.....	117
9	Verhalten der MT auf der verwendeten SEC-Säule	121
10	Redoxverhalten von Metallothioneinen im Gewebecytosol	125
11	Native Metallbeladung von Metallothionein-3: Projekt an der Harvard Medical School	128
11.1	Chromatographische Aufreinigung von MT-3 aus Gehirncytosol.....	129
11.2	Untersuchung der aufgereinigten Fraktionen.....	137
12	Ergebnisse der Untersuchungen der humanen Gehirnproben	140
12.1	Morbus Alzheimer	140
12.2	Vergleich von Elementen in weißer und grauer Masse der Gehirngewebe	141
12.2.1	Elementgehalte der Gewebeproben von weißer und grauer Masse	142
12.2.2	Elementprofile im Cytosol von weißer und grauer Masse	143
12.3	Vergleich der verschiedenen Gehirnregionen	145
12.4	Vergleich der AD- und der Kontrollproben.....	147
12.4.1	Gesamtelementgehalte in AD- und Kontrollgehirnen	147
12.4.2	Vergleich von Elementprofilen in Cytosolen von AD- und Kontrollgehirnen	150
12.4.3	SOD als Referenz für den Vergleich der MT-Signale	152
12.4.4	MT-Signale in Elementprofilen von AD- und Kontrollgehirnen	154
12.4.5	Oxidation der MT in AD-Gehirnen	156

12.5	Zusammenfassung.....	162
13	Zusammenfassung und Ausblick	163
14	Anhang	168
	Abkürzungsverzeichnis	168
	Probenbeschreibungen	170
	Ergänzungen zu Kapitel 4: HPLC-ICP-MS-Kopplung.....	172
15	Literaturverzeichnis	174

1 Einleitung und Problemstellung

Spurenelemente machen unter 0,01% der Körpermasse des menschlichen Organismus aus, die Konzentrationen liegen dabei im mikro- bis pikomolaren Bereich¹. Sie haben wichtige biologische Funktionen: Als Enzymaktivatoren oder als integraler Strukturbestandteil in Metalloenzymen sind sie an wichtigen katalytischen Vorgängen im Organismus beteiligt². Essentiell werden Elemente genannt, wenn ein Mangel physiologische Funktionen beeinträchtigt und durch Supplementierung diese Mangelercheinungen verhindert oder rückgängig gemacht werden können. Zu den essentiellen Elementen gehören Eisen, Zink, Kupfer, Iod, Selen, Mangan, Kobalt und Chrom². Bei anderen im Organismus vorkommenden Elementen, z.B. Quecksilber oder Cadmium, konnte die physiologische Funktion bis heute nicht geklärt werden, sie sind teilweise bisher nur als toxisch bekannt¹. Auch essentielle Elemente können im Übermaß toxisch sein. Für jedes Element gibt es eine Dosis-Wirkungs-Beziehung, für essentielle Elemente mit einem für normale physiologische Funktion optimalen Konzentrationsbereich. Der Organismus kann über die homöostatische Regulierung das Optimum der Dosis-Wirkungs-Kurve über einen weiten Bereich der Elementzufuhr aufrechterhalten². Bei einigen Elementen wie beispielsweise dem Selen ist das therapeutische Fenster zwischen Mangel und Vergiftungserscheinungen jedoch äußerst eng.

Bei der Untersuchung des Spurenelementstatus im Organismus liefern Körperflüssigkeiten wie Vollblut, Serum oder Urin nur Informationen über den aktuellen Zustand. Für eine Beurteilung des langzeitigen Elementstatus ist eine Untersuchung der Körperspeicher z.B. durch Biopsien von Muskel-, Lebergewebe oder Knochen notwendig¹.

Die Funktion der Spurenelemente im Körper hängt von ihrer Bindung an unterschiedliche Proteine bzw. Enzyme ab. Transportproteine wie Transferrin (Eisen) oder Albumin (Zink) übernehmen die Verteilung der Elemente im Organismus. Speicherproteine wie Ferritin (Eisen) binden die Elemente bei Überschuß und gleichen eine unzureichende Versorgung durch deren Remobilisierung aus. Metalloproteine nehmen spezielle Aufgaben z.B. als Antioxidantien zum Schutz vor reaktiven Sauerstoffverbindungen wahr: Superoxid Dismutase (Kupfer/Zink, Mangan), Glutathion Peroxidase (Selen), Katalase (Eisen), Metallothionein (Zink, Kupfer)¹. Eine Bestimmung des Gesamtelementgehaltes erfaßt nicht die möglichen Umverteilungen der Elemente zwischen den einzelnen Proteinen und hat somit nur eine eingeschränkte Aussagekraft. Die Untersuchung der verschiedenen Bindungsformen der Elemente, der Metall-Protein-Komplexe, ist für das Verständnis von physiologischen und pathologischen Prozessen im Organismus wichtig³. Die Auftrennung der Proteine und Bestimmung der an sie gebundenen Spurenelemente wird mittels einer Speziationsanalyse durchgeführt.

Folgende Beispiele veranschaulichen, daß die alleinige Bestimmung der Gesamtelementgehalte in biologischen Proben unzureichend ist und sogar irreführend sein kann⁴. Bei Untersuchungen im Hahn-Meitner-Institut⁵ an Seren von Sepsis-Patienten wurde gezeigt, daß die Abnahme von Schwefel, Zink und Eisen im Serum während des Sepsis-Ereignisses mit der Abnahme von Albumin (Schwefel, Zink) und Transferrin (Eisen) korreliert. Zusätzlich konnte jedoch eine neue, Zink und Cadmium enthaltende Spezies nachgewiesen werden, die dem während der Akuten Phase induzierten Metallothionein entsprach. Diese Umlagerung von Elementen zwischen unterschiedlichen Proteinen wurde über den Gesamtgehalt nicht erfaßt. Ein weiteres Beispiel für den zusätzlichen Informationserhalt ist die Zinkbestimmung bei einem Kind mit Symptomen schweren Zinkmangels⁶. Die Zinkkonzentration im Serum war im Gegensatz zu diesem Befund zehnmal höher als der Normalwert. Erst über eine Speziationsanalyse der zinkbindenden Proteine konnte gezeigt

werden, daß die Krankheitssymptome durch eine anomale Bindung des Zinks an ein hochmolekulares Protein statt an die normalerweise zinkbindenden Serumproteine (α -Makroglobulin, Albumin) ausgelöst wurden. Das Zink wurde dadurch seinen physiologischen Wirkorten entzogen.

Bei Krankheiten spielen demnach Umverteilungen der an Proteine gebundenen Spurenelemente eine wichtige Rolle. Die Metalloproteine können als Marker für pathologische Veränderungen verwendet werden. Dies war Gegenstand der in dieser Arbeit durchgeführten Speziationsanalysen.

Eine Speziationsanalyse ist - nach der neuesten IUPAC-Empfehlung - die Analytik zur Identifizierung und/oder Quantifizierung von einer oder mehreren chemischen Spezies in einer Probe. Unterschiedliche Spezies sind dabei Formen, die sich z.B. in ihrer Isotopenzusammensetzung, Oxidationsstufe oder in der Komplex- bzw. Molekularstruktur unterscheiden⁷. Die Definition einer Spezies kann nach der Relevanz der Speziesunterschiede für die durchgeführte Untersuchung enger oder weiter gefaßt werden, obwohl im engeren Sinn eine Abtrennung von Komponenten, die noch mehrere unterscheidbare Spezies enthalten, als Fraktionierung bezeichnet werden sollte⁷. Im Fall der vorliegenden Arbeit waren die untersuchten Spezies an unterschiedliche Proteine gebundene Elemente im Cytosol von Geweben. Dabei kann es sich um die kovalente Integration eines Elementes in die Struktur des Metalloproteins - wie im Falle der Selenocystein enthaltenden Selenoproteine - oder um die Komplexbildung des Elementes durch das Protein - wie im Fall der Metall-Thiolat-Bindungen der Metallothioneine - handeln. Es wurden auch einzelne Isoformen von Metalloproteinen, der Metallothioneine, betrachtet, nicht jedoch deren Subisoformen.

Die Speziationsanalyse umfaßte in diesem Fall die chromatographische bzw. kapillarelektrophoretische Trennung der Biomoleküle und die Detektion der an sie gebundenen Elemente im Eluat. Dabei muß darauf geachtet werden, daß keine Kontaminationen mit Elementen auftreten und die ursprüngliche Metall-Protein-Bindung nicht verändert wird³. Für die Detektion wird ein besonders nachweisstarkes Verfahren gebraucht, da sich die ohnehin niedrigen Gesamtgehalte der Elemente auf verschiedene Spezies in der Probe verteilen⁸ und durch den Elutionspuffer zusätzlich verdünnt werden. Die bis in den $\text{sub-ng}\cdot\text{L}^{-1}$ -Bereich nachweisstarke⁴ induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS) bietet sich für diese elementspezifische Detektion an. Sie weist außerdem die Vorteile der Multielementdetektion und der möglichen on-line Kopplung auf, wodurch die Detektion der Elemente erheblich beschleunigt wird. Dies ist für den Nachweis von labilen Spezies wie den oxidationsempfindlichen Metallothioneinen besonders wichtig.

Ziel dieser Arbeit war die Optimierung des Analyseverfahrens für die Untersuchung von Metalloproteinen in Cytosolen von Gewebeproben und die anschließende Zuordnung der Signale in den erhaltenen Elementprofilen der chromatographischen Trennungen zu einzelnen Proteinen. Dafür mußte neben der elementspezifischen eine proteinspezifische Detektion erfolgen. In den Fraktionen der Trennungen sollten für die zu identifizierenden Proteine jeweils spezifische Nachweise z.B. über Massenspektrometrie, Enzymaktivitäten oder immunochemische Verfahren durchgeführt werden.

Mit diesen Informationen sollte im nächsten Schritt der Vergleich der Elementbindungsmuster in unterschiedlichen Proben erfolgen, um physiologisch oder pathologisch bedingte Unterschiede feststellen zu können. Dabei sollten zum einen die Cytosole unterschiedlicher Organe untersucht werden, um organspezifische Metalloproteinverteilungen aufzuzeigen. Des weiteren sollten die Verschiebungen der

Spurenelementmuster während pathologischer Prozesse verfolgt werden. Dafür sollten die Cytosole eines Organs von unterschiedlichen Patienten betrachtet werden.

Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Untersuchung von Gehirnproben von Patienten, die an Morbus Alzheimer gelitten hatten, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. Besondere Aufmerksamkeit kam dabei den Metallothioneinen (MT) zu, niedermolekularen, cysteinreichen Proteinen, welche Metalle wie Zink, Kupfer und Cadmium binden⁹. Metallothioneine werden in mehreren Isoformen exprimiert, wovon die Isoform MT-3 vorwiegend im Gehirn nachgewiesen und im Zusammenhang mit der Alzheimer-Erkrankung (AD - Alzheimer's disease) diskutiert wird¹⁰. Die bei den ersten Untersuchungen gefundene verminderte Expression von MT-3 bei AD wurde als möglicher Grund für unkontrolliertes Nervenwachstum und damit für die typischen Neurofibrillen-Ansammlungen bei AD angeführt¹¹. Die Herunterregulierung von MT-3 wurde in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert und konnte nicht in allen Fällen bestätigt werden. Die Untersuchungen wurden mit verschiedenen Nachweismethoden ausgeführt, meist über Antikörperreaktionen oder indirekt über die MT-3 mRNA. Deswegen war es besonders interessant, einen Vergleich von AD- und Kontrollgehirnen über eine ganz andere Herangehensweise - die Metallprofile der Speziationsanalytik - durchzuführen. Die chromatographische Trennung des MT-3 von den anderen Isoformen spielte daher in dieser Arbeit eine wichtige Rolle.

Der Ansatz zum systematischen Vergleich von Elementprofilen in Gehirnproben sollte neue Erkenntnisse zur Rolle von Metallen in der Neurobiologie - besonders bei pathologischen Prozessen - beitragen, die in den letzten Jahren immer mehr in den Vordergrund getreten ist. So wird die Rolle von Eisen in der Neurobiologie diskutiert^{12,13,14,15}, Zink in Verbindung mit AD^{16,17,18}, ebenso wie Kupfer^{19,20,21,22}, bei dem auch ein Zusammenhang mit Prionen gefunden wurde¹⁹. Es wurde sogar eine Metall-Chelations-Therapie zur Behandlung der Alzheimer-Erkrankung vorgeschlagen²³. Die Metalle scheinen bei diesen Vorgängen vor allem an oxidativen Prozessen beteiligt zu sein^{24,25,26}, welche ebenfalls in Zusammenhang mit AD diskutiert werden^{27,28,29,30,31,32}. Deshalb wird in dieser Arbeit ebenfalls speziell auf die Oxidation von Proteinen eingegangen.

In der Arbeitsgruppe um Prof. B. L. Vallee - einem der Entdecker des MT - an der Harvard Medical School in Boston, die über eine lange Erfahrung bezüglich der MT, ihrer Eigenschaften und Funktionen verfügt, wurden während eines Forschungsaufenthaltes weiterführende Untersuchungen u.a. zur Detektion des MT-3 in chromatographischen Fraktionen mittels spezifischer Antikörper und zum Metallgehalt des aus Gehirngewebe isolierten MT-3 durchgeführt.

Die Kooperation mit dem GKSS-Forschungszentrum in Geesthacht ermöglichte die Anwendung der dort kürzlich entwickelten robusten Kopplung der Kapillarzonen-elektrophorese (CZE) mit der ICP-MS auf die untersuchten biologischen Proben. Die bisher selten durchgeführte Analyse von Biomolekülen mittels CZE-ICP-MS⁴ sollte hier unter Ausnutzung des hohen Auflösungsvermögens und der minimal benötigten Probenmenge zur Speziestrennung eingesetzt werden.

2 Übersicht zu Metallothioneinen

2.1 Metallothioneine

Metallothioneine sind Proteine mit niedriger Molmasse um $6000-7000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, die sich besonders durch ihren hohen Gehalt an der schwefelhaltigen Aminosäure Cystein - 20 Cysteine auf 61 bis 68 Aminosäuren - und die Fähigkeit, Metalle zu binden, auszeichnen⁹. Diesen beiden Eigenschaften verdanken sie auch ihren Namen³³.

MT wurde 1957 von Margoshes und Vallee zuerst beschrieben³⁴. Sie isolierten es aus der Pferdeniere auf der Suche nach möglichen cadmiumbindenden Proteinen. Inzwischen sind fast 200 Sequenzen von über 50 Spezies bekannt³⁵. MT wurden dabei nicht nur bei Wirbeltieren, sondern auch bei wirbellosen Tieren, Pflanzen, eukaryotischen Mikroorganismen und einigen Prokaryoten gefunden⁹. Als Metallothioneine werden dabei alle Polypeptide bezeichnet, die dem aus der Pferdeniere isolierten MT in mehreren Eigenschaften ähnlich sind (siehe Abschnitt 2.1.2)³⁵.

Ein internationales Nomenklatur-Komitee teilte die MT 1985 in drei Klassen ein^{36, 37}:

- Klasse I: Säugetier-MT mit 20 Cysteingruppen und nahe verwandte MT wie die 18 Cysteine enthaltenden MT der Krustentiere.
- Klasse II: Polypeptide wie Hefe-MT, bei denen die Positionen der Cysteingruppen nur entfernt mit denen bei den Säugetier-MT übereinstimmen
- Klasse III: enzymatisch synthetisierte Peptide wie Poly(γ -glutamylcysteinyl)glycine, die auch als Phytochelatine oder Cadystine bezeichnet werden und in Pflanzen vorkommen.

Im folgenden werden ausschließlich die Klasse I Metallothioneine behandelt.

Angesichts der steigenden Anzahl identifizierter MT wurde eine neue Klassifikation basierend auf Sequenzähnlichkeiten und phylogenetischen Verwandtschaften vorgeschlagen^{38, 39}. Dabei werden die MT in 16 Familien mit Unterfamilien eingeteilt, Familie 1 umfaßt die Wirbeltier-MT³⁹.

2.1.1 Isoformen

MT weisen genetischen Polymorphismus auf. Isometallothioneine bezeichnen die bei einer Spezies vorkommenden MT-Formen mit genetisch bestimmten Unterschieden in der Primärstruktur. Sie werden mit arabischen Zahlen gekennzeichnet und zusätzlich vorkommende Subisoformen mit einem Buchstabenzusatz³⁵.

Die Isoformen MT-1 und MT-2 weichen geringfügig in der Aminosäurezusammensetzung und damit in ihrem isoelektrischen Punkt und ihrer Hydrophobizität voneinander ab⁴⁰. Bei neutralem pH unterscheiden sie sich durch eine negative Ladung: Ein saurer Aminosäure-Rest in Position 10 oder 11 bei MT-2 ersetzt den neutralen Aminosäure-Rest bei MT-1³⁷. Deshalb können die Isoformen mit der Anionenaustauscherchromatographie getrennt werden. Die Numerierung erfolgte nach der dort auftretenden Elutionsreihenfolge³⁷. Die Isoformen können in verschiedenen Verhältnissen in den einzelnen Organen des selben Tieres vorkommen, die Verhältnisse können allgemein je nach physiologischen Bedingungen variieren⁴¹.

Isoformen mit sehr geringen Unterschieden - z.B. nur einer Aminosäure - treten als Subisoformen bei einigen Spezies auf^{41, 39}.

MT-1 und MT-2 wurden in allen Säugetier-Organen gefunden⁴². 1991 entdeckten Uchida et al. eine neue Isoform - MT-3 -, die vor allem im Gehirn exprimiert wird (siehe Abschnitt 2.2)¹⁰. 1994 wurde über die Isoform MT-4 berichtet, die in der Zunge gefunden wurde⁴³. Sie wurde nur über die Nukleinsäuresequenz (mRNA) charakterisiert und noch nicht weiter beschrieben⁴².

In **Tab. 2-1** sind die Molmassen und die Anzahl der Aminosäuren von verschiedenen MT-Isoformen vom Menschen, Schwein und Kaninchen aufgeführt, in **Tab. 2-2** die entsprechenden Aminosäuresequenzen. Es wird jeweils nur eine Subisoform als Beispiel angegeben. Beim Menschen wurden 10 MT-1-Subisoformen sowie jeweils eine MT-2-, MT-3- und MT-4-Form gefunden. Vom Schwein sind bisher nur die Aminosäuresequenzen der Isoformen MT-1 und MT-3 bekannt. Beim Kaninchen wurden bis jetzt eine MT-1- und fünf MT-2-Subisoformen charakterisiert³⁹.

Tab. 2-1 : Metallothionein-Isoformen: Molmassen der Apo-Formen und Anzahl der Aminosäuren⁴⁴

Isoform	Spezies	Molmasse [g·mol ⁻¹]	Anzahl der Aminosäuren
MT-1a	human	6133	61
MT-1	Schwein	5969	61
MT-1a	Kaninchen	6103	61
MT-2	human	6042	61
MT-2a	Kaninchen	6083	62
MT-3	human	6927	68
MT-3	Schwein	6927	68
MT-4	human	6419	62

Tab. 2-2 : Metallothionein-Isoformen: Aminosäuresequenzen⁴⁴

Isoform	Spezies	Aminosäuresequenz ^a			
MT-1a	human	MDPNCSCATG	GSCTCTGSCK	CKECKCNSCK	
		KSCCSCCPMS	CAKCAQGCIC	KGASEKCSCC	A
MT-1	Schwein	MDPNCSCPTG	GSCSCAGSCT	CKACRCTSCK	
		KSCCSCCPAG	CARCAQGCIC	KGASDKCSCC	A
MT-1a	Kaninchen	MDPNCSCATG	NSCTCASSCK	CKECKCTSCK	
		KSCCSCCPAG	CTKCAQGCIC	KGASDKCSCC	A
MT-2	human	MDPNCSCAAG	DSCTCAGSCK	CKECKCTSCK	
		KSCCSCCPVG	CAKCAQGCIC	KGASDKCSCC	A
MT-2a	Kaninchen	MDPNCSCAAA	GDSCTCANSC	TCKACKCTSC	
		KKSCCSCCPP	GCAKCAQGCIC	CKGASDKCSC	CA
MT-3 (GIF)	human	MDPETCPCPS	GGSCTCADSC	KCEGCKCTSC	
		KKSCCSCCPA	ECEKCAKDCV	CKGGEEAAEAE	AEKCSCCQ
MT-3 (GIF)	Schwein	MDPETCPCPT	GGSCTCAGSC	KCEGCKCTSC	
		KKSCCSCCPA	ECEKCAKDCV	CKGGEGAAEAE	EEKSCCQ
MT-4	human	MDPREVCMS	GGICMCGDNC	KCTTCNCKTC	
		RKSCCPCCPP	GCAKCAQGCIC	CKGGSDKCSC	CP

^a Für den Buchstabencode der Aminosäuren: siehe **Tab. 6-4**.

2.1.2 Eigenschaften

Metallothioneine haben charakteristische Eigenschaften³⁵:

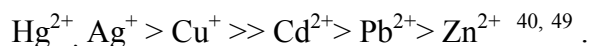
- niedrige Molmasse
- hoher Metallgehalt
- charakteristische Aminosäurezusammensetzung:
hoher Cystein-Anteil, keine aromatischen Aminosäuren, kein Histidin
- charakteristische Verteilung der Cysteingruppen in der Aminosäuresequenz
- Bildung von Metall-Thiolat-Clustern
- Hitzestabilität.

Diese Eigenschaften gehen auf die Aminosäuresequenz zurück (siehe **Tab. 2-2**). MT sind einkettige Proteine mit 61 oder 62 Aminosäuren, nur MT-3 hat 68 Aminosäuren (siehe **Tab. 2-1**). Das hervorstechendste Merkmal ist das Motiv Cys-X-Cys, wobei X eine von Cystein verschiedene Aminosäure ist⁹. Bemerkenswert ist die hohe Konservierung der Sequenz in der Evolution: Bei den bekannten Säugetier-MT sind 56% der Aminosäuren insgesamt konserviert, darunter alle 20 Cysteine und fast alle Lysine und Arginine. Die meisten Aminosäuresubstitutionen weisen ähnliche chemische und sterische Eigenschaften auf⁹. Aromatische Aminosäuren wie Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin sind nicht vorhanden⁴⁰. Dies bedingt das bei Proteinen seltene Fehlen einer Absorption bei 280 nm³³.

Eine weitere Eigenschaft der MT ist ihre große Hitzestabilität bis 100°C⁴⁵. Dagegen sind die cysteinreichen MT sehr empfindlich gegenüber Oxidation. Oxidierte MT binden aufgrund der gebildeten Disulfid-Brücken weniger Metalle⁴⁰.

Die Expression von MT-1 und MT-2 im Organismus wird durch verschiedene Faktoren induziert, z.B. durch Metallionen wie Cadmium, Zink und Kupfer, Glucocorticoide, Cytokine, Medikamente⁴⁶, chemischen sowie physischen Streß wie Entzündungen oder oxidativen Streß⁹. MT-3 und MT-4 dagegen werden kaum von diesen Faktoren induziert^{42, 47}.

Die Cysteine in der reduzierten Form koordinieren Metallionen über ihre SH-Gruppen⁹. Diese Metall-Thiolat-Bindungen weisen UV-Absorptionen im Bereich um 250 nm auf: Die Charge-Transfer-Bande liegt für Zn-MT bei 225 nm, für Cd-MT bei 250 nm und für Cu-MT bei 275 nm⁴⁸. Die Affinität zu verschiedenen Metallionen ist unterschiedlich, die Komplexstabilitätskonstanten nehmen in folgender Reihenfolge ab:



Die schwächer gebundenen Metalle können leicht durch stärker gebundene verdrängt werden⁴⁹. Auch weitere Metalle können gebunden werden, z.B. Au^{+} oder Pt^{2+} ³⁶. Der Metallgehalt ist unterschiedlich. MT binden bis zu 7 Zink- oder Cadmiumionen, bis zu 12 Kupferionen⁵⁰ und bis zu 20 Silberionen, wobei unter basischen Bedingungen nur 17 Silberionen gefunden werden⁴⁰. MT der gleichen Isoform können verschiedene, gemischte Metallbeladungen aufweisen⁴¹.

Beim voll besetzten MT nehmen alle Cysteingruppen als Thiolat-Liganden an der Metallbindung teil. Die Struktur der Koordination konnte mit verschiedenen spektroskopischen Methoden wie NMR (kernmagnetische Resonanz) und Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden³⁶. Die Metallionen werden in zwei getrennten

Metall-Thiolat-Clustern gebunden, bei denen die Cystein-Liganden teilweise von mehreren nebeneinanderliegenden Metallionen geteilt werden. Im Fall von (Cd/Zn)₇-MT besteht der erste Cluster im N-Terminus aus 9 Cysteingruppen und 3 Metallionen (β -Domäne), im zweiten Cluster im C-Terminus binden 11 Cystein-Liganden 4 Metallionen (α -Domäne)⁹. Bei gemischten MT bindet Cadmium bevorzugt in der α -Domäne, Zn in der β -Domäne³⁶. Die Metallbindungsstellen weisen spezifische Chiralität auf, welche die Messung von MT über Circular dichroismus erlaubt. Dabei handelt es sich nicht um die Chiralität einzelner Metallionen, sondern der dreidimensionalen Metall-Thiolat-Cluster-Strukturen³⁶.

Die koordinierten Metalle spielen eine wichtige Rolle in der Struktur der MT. Werden die Metallionen entfernt, geht die Cluster-Struktur verloren. Apo-MT (Thionein), die metallfreie Form von MT, ist ein strukturloses Polypeptid³⁶.

Die Metall-Thiolat-Cluster-Struktur wird auch bei MT von entfernt verwandten Spezies gefunden. Dies scheint auf die Wichtigkeit dieses Strukturmotives für die biologische Funktion hinzudeuten⁴². Die räumliche Struktur ist auch dann ähnlich, wenn über 25% der Aminosäuren verschieden sind. Sie wird also hauptsächlich von den konservierten Cysteinen bestimmt⁹.

MT sind keine starren Moleküle. Die kinetische Labilität der Metall-koordinierenden Bindungen bedingt strukturelle Flexibilität und eine leichte Austauschbarkeit der Metalle innerhalb der Cluster, mit Metallen in Lösung und auch zwischen verschiedenen MT-Molekülen, und zwar durch direkten intermolekularen Austausch. Diese Eigenschaft der MT wird als grundlegend für ihre biologische Funktion vermutet⁹.

2.1.3 Mögliche Funktionen

Die genauen Funktionen der MT sind bis heute nicht endgültig geklärt. Diskutiert werden⁴⁸:

- Detoxifikation von Schwermetallen
- Homöostase von Zink und Kupfer
- Funktion als Antioxidans und Radikalfänger
- Rolle als Akutphasenprotein .

Eine enzymatische Funktion ist nicht bekannt⁴¹.

Durch die Entdeckung der MT als cadmiumbindende Proteine³⁴, ihrer Induzierbarkeit durch Schwermetalle und die in Versuchen durch MT-1 und MT-2 erhöhte Resistenz gegenüber der toxischen Wirkung von Cadmium wurde die biologische Rolle der MT zunächst im Schutz gegen Schwermetalle vermutet⁵¹. Genauer betrachtet scheint es jedoch unwahrscheinlich, daß die starke Konservierung der MT in der Evolution, das ubiquitäre Vorkommen in den meisten Organismen und die Redundanz der Gene allein durch die Aufgabe zur Schwermetalldetoxifikation bewirkt wurde⁹. Denn vor allem im vorindustriellem Zeitalter dürften Schwermetalle kein dominantes Problem gewesen sein⁵². Die Induzierbarkeit durch Schwermetalle und die Metallakkumulierung werden als Biomarker in der Umwelttoxikologie genutzt⁴².

An nicht schwermetallinduzierte MT sind hauptsächlich die Metalle Zink und Kupfer gebunden, weswegen eine wichtige Rolle der MT im Metabolismus dieser Elemente angenommen wird⁹.

In vitro-Studien haben gezeigt, daß Zink⁵³ und Kupfer⁵⁴ von MT auf Apo-Proteine übertragen werden können. Dies hat zur Hypothese geführt, daß MT als Metallspeicher und Transportprotein für die Biosynthese von Metalloproteinen und -enzymen fungiert⁹. Andererseits kann Apo-MT z.B. Zink aus Zink-Finger-Transkriptions-Faktoren entfernen und damit die DNA-Bindung verändern⁴². Abhängig vom vorhandenen Verhältnis von MT zu Apo-MT könnte MT demnach als Zink-Donor oder -Akzeptor zinkabhängige Vorgänge im Stoffwechsel kontrollieren. Damit hätte MT eine regulatorische Funktion in den zahlreichen zinkabhängigen Prozessen der Replikation, Transkription und Translation⁹.

Es konnte gezeigt werden, daß der intermolekulare Zinktausch über Zink-MT wesentlich schneller ist als eine direkte Aufnahme von freiem Zink. MT kann Zink auf Proteine mit niedrigerer Affinität für das Metall übertragen⁵³. Die Cystein-Liganden können leicht durch milde zelluläre Oxidantien oxidiert werden und so die gebundenen Metalle freigeben. Das GSH/GSSG-System (reduziertes und oxidiertes Glutathion) scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen^{55, 56}.

Kupferbindende MT treten vor allem im Zusammenhang mit Kupfer-Stoffwechselstörungen wie der Menkes- oder Wilson-Krankheit auf. Hier spielen die MT offensichtlich eine Rolle bei der Bindung überschüssigen Kupfers⁵⁷.

Eine weitere vermutete Rolle der MT ist der Schutz des Organismus vor Oxidantien. Die Sulfhydryl-Gruppen der MT reagieren unter Oxidation mit freien Radikalen. Dabei gehen die Metallbindungseigenschaften verloren⁵⁸.

MT verhält sich auch als Akutphasenprotein⁵⁹. Die Konzentration im Serum steigt z.B. - ohne Korrelation zu den Zink- oder Kupferkonzentrationen - bei akutem Herzinfarkt⁶⁰ oder Sepsisereignissen⁵ signifikant an.

Des Weiteren wurden eine Beteiligung der MT an der Zellproliferation⁶¹ sowie anti-apoptotische Eigenschaften⁶² vorgeschlagen.

2.1.4 Nachweismethoden

Die Nachweismethoden basieren auf den charakteristischen Eigenschaften der MT. Diese schließen die UV-Detektion über die Wellenlänge 280 nm und den Nachweis über eine enzymatische Aktivität aus. Es kann das Protein an sich nachgewiesen werden oder eine indirekte Bestimmung der MT über ihre Metallbindungseigenschaften erfolgen⁴⁰. Zum Nachweis der Expression der verschiedenen Isoformen von MT in Geweben wird oft die Detektion der spezifischen mRNA (messenger RNA / Boten-Ribonukleinsäure) eingesetzt.

Folgende Bestimmungsmethoden werden verwendet:

- Nachweis des Proteins:
 - + immunochemisch: RIA, ELISA, Western Blot
 - + über die Thiolgruppen, wenn isoliert
 - + über die Aminosäurezusammensetzung, wenn isoliert
- Nachweis über die gebundenen Metalle:
 - + nach chromatographischer Trennung
 - + mit Metallsättigungsverfahren
- Nachweis über die biologische Aktivität (MT-3)
- Nachweis der mRNA .

Zum empfindlichen und spezifischen Nachweis von MT in Gewebeschnitten, Gewebe- oder anderen Körperflüssigkeiten eignen sich immunochemische Nachweismethoden. Sie nutzen die Spezifität der Reaktion mit einem Antikörper, der zur Detektion entweder radioaktiv markiert (Radioimmunoassay - RIA)⁶³ oder an ein Enzym gekoppelt ist, welches über seine enzymatische Reaktion gemessen wird (Enzyme linked immunosorbent assay - ELISA)⁶⁴. Beim Western Blot wird eine gelelektrophoretische Trennung der flüssigen Probe vorgeschaltet. Mittels Antikörpern können die einzelnen Isoformen der MT prinzipiell getrennt bestimmt werden⁴⁰. Zur Detektion von MT-3 werden Antikörper gegen ein Dodekapeptid (GGEAAEAEAEKC, MT-3-Positionen 53-64) verwendet, welches den für diese Isoform charakteristischen Aminosäureeinschub einschließt (siehe Abschnitt 2.2)¹⁰.

Isolierte MT, z.B. nach vorhergehenden chromatographischen Trennungen, können über den Schwefelgehalt bzw. die Thiolgruppen über das bekannte Verhältnis von 20 Cysteinen pro Molekül quantitativ bestimmt werden⁶⁵.

Die bekannten Stöchiometrien der gebundenen Metalle werden bei den Metallsättigungsverfahren genutzt. Bei der Cadmiumsättigung wird Cadmium - gegebenenfalls als radioaktiver Tracer - im Überschuß zur MT-Lösung zugegeben, um durch Verdrängung der gebundenen Zinkionen mit Cadmium abgesättigte MT zu erhalten. Nach Entfernung des Cadmiumüberschusses kann das Metall in der Lösung gemessen und auf den MT-Gehalt umgerechnet werden⁶⁶. Ein Nachteil des Verfahrens ist, daß z.B. Kupfer durch Cadmium nicht verdrängt wird. Deshalb wurde die Variante des Ammoniumtetrathiomolybdat-Assays entwickelt, bei der vor der Zugabe von Cadmium das gebundene Kupfer durch Ammoniumtetrathiomolybdat entfernt wird⁶⁷. Alternativ können Sättigungsverfahren mit stärker bindenden Metallen (Silber, Quecksilber) verwendet werden⁶⁸. Mit diesen Verfahren werden die Isoformen nicht unterschieden.

Eine elegantere Methode ist die Bestimmung der gebundenen Metalle durch Multielementdetektion nach chromatographischer Trennung. So können Metallgehalte und -verhältnisse auch der einzelnen Isoformen bestimmt werden⁶⁹. MT-1 und MT-2 werden dabei durch Anionenaustauscherchromatographie getrennt.

Subisoformen konnten mit der Reversed Phase (Umkehrphasen)-Chromatographie - nach Hydrophobizität - und der Kapillarzonenoelektrophorese - nach Masse zu Ladungsverhältnissen in einem elektrischen Feld - aufgetrennt werden⁴⁰.

Die Bestimmung über eine biologische Aktivität, nämlich mittels der Hemmung des Wachstums von Neuronen, ist nur für die Isoform MT-3 möglich, auf die im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird.

2.2 Metallothionein-3 (Growth Inhibitory Factor)

2.2.1 Entdeckung und Eigenschaften

Die hauptsächlich im Gehirn vorkommende Isoform Metallothionein-3 wird meistens in Verbindung mit Morbus Alzheimer genannt. Dies ist dadurch begründet, daß die Entdeckung dieser Isoform im Rahmen von Untersuchungen über AD stattfand.

Um die Hypothese zu überprüfen, daß ein Mangel an neurotrophischen Faktoren für das Absterben von Nervenzellen bei AD verantwortlich ist⁷⁰, hatten Uchida et al. die Wirkung von AD-Gehirnextrakt auf kortikale Neuronen in vitro untersucht⁷¹. Sie fanden jedoch, im Gegenteil, daß das Wachstum der Nervenzellen durch den AD-Gehirnextrakt stimuliert wurde. In weiteren Versuchen⁷² stellten sie fest, daß die neurotrophische Wirkung nicht auf einen Anstieg von wachstumsfördernden Faktoren, sondern das Fehlen von Inhibitoren zurückzuführen ist, die in normalem, nicht AD geschädigtem Gehirn vorhanden sind. Dies könnte das anomale Wachstum von Nervenzellen und damit die Bildung der für Alzheimer typischen Plaques und das Absterben von Nervenzellen erklären.

Uchida et al. isolierten daraufhin einen wachstumshemmenden Faktor (Growth Inhibitory Factor - GIF) aus normalem humanem Gehirn¹⁰. Als Bioassay zum Nachweis während der Isolierungsschritte wurde seine Eigenschaft genutzt, die neurotrophische Aktivität von AD-Gehirnextrakt auf kortikale Neuronen neonataler Ratten zu hemmen⁷². Die Aminosäuresequenz von GIF (siehe **Tab. 2-2**) weist keine aromatischen Aminosäuren auf, die Aminosäuren Histidin, Arginin, Asparagin, Isoleucin und Leucin fehlen ebenfalls. Dafür enthält GIF 20 Cysteine, welche im Vergleich mit Metallothioneinen die bekannten, konservierten Positionen einnehmen. Im Gegensatz zu MT-1 und MT-2 hat GIF jedoch 68 Aminosäuren: eine zusätzliche Aminosäure (Threonin) in Position 5 im N-Terminus und einen Peptideinschub (Glu-Ala-Ala-Glu-Ala-Glu) im C-Terminus an den Positionen 55-60¹⁰. Durch insgesamt 8 Glutamatgruppen hat GIF ungewöhnlich saure Eigenschaften. Die Nettoladung des Apo-Proteins ist -4, für Apo-MT dagegen +2 bis +5¹⁰. Isoliertes GIF hat Kupfer und Zink gebunden^{10, 73}.

Es wurde nachgewiesen, daß das GIF-kodierende Gen auf demselben humanen Chromosom 16 liegt wie die MT-kodierenden Gene^{11, 47}. Die insgesamt festgestellten Ähnlichkeiten zu MT wiesen darauf hin, daß es sich bei GIF um ein neues Mitglied der MT-Familie handelte¹¹. GIF wurde als MT-3 eingeordnet⁴⁷.

2.2.2 Vorkommen

Die Verteilung von MT-3 wurde in verschiedenen Organen untersucht. Zunächst wurde von mehreren Gruppen^{11, 47, 74} die mRNA ausschließlich im Gehirn und in keinem anderen untersuchten Organ gefunden. Dies unterscheidet MT-3 von den ubiquitär im Organismus verteilten Isoformen MT-1 und MT-2. Innerhalb des Gehirns konnte MT-3 in allen untersuchten Gehirnregionen nachgewiesen werden.

Über die genaue Lokalisation im Gehirn gibt es kontroverse Ergebnisse. Wurde MT-3 zuerst nur in Astrozyten gefunden^{10, 74}, berichteten inzwischen mehrere Gruppen über MT-3 in Neuronen^{75, 76}. Yu et al.⁷⁷ fanden schließlich MT-3 in beiden Zellarten.

Neuere Untersuchungen wiesen MT-3 als mRNA und teilweise als Protein auch in anderen Organen wie der Prostata und der Niere nach^{78, 79}.

MT-3 wird erst postnatal stärker exprimiert, während der Gehalt von MT-1/-2-mRNA am höchsten in der neonatalen Leber ist⁷⁴. Dies weist auf eine unterschiedliche Regulation und damit eine spezielle Funktion von MT-3 im Vergleich zu den anderen MT-Isoformen hin.

2.2.3 Struktur und inhibitorische Wirkung

Die genaue Funktion von MT-3 ist nicht geklärt. Die einzige nachgewiesene biologische Aktivität ist die Hemmung des Wachstums von Neuronen in Anwesenheit von Gehirnextrakt *in vitro*.

Die Struktur von MT-3 umfaßt, ähnlich wie bei MT-1 und MT-2, zwei Domänen mit je einem Metall-Thiolat-Cluster. Mittels NMR wurden bei humanem Cd₇-MT-3 neuartige dynamische Prozesse in den Metall-Thiolat-Clustern gefunden, die durch die andere Primärstruktur von MT-3 bedingt sein können. Es ist möglich, daß diese erhöhte Flexibilität der Struktur eine bedeutende Rolle für die biologische Funktion hat ⁴².

Da die Positionen der Cysteine auch bei MT-3 konserviert sind, sollten die Metall-Thiolat-Bindungen für die biologische Funktion wichtig sein ¹¹. Andererseits zeigen die anderen MT-Isoformen mit den gleichen Cysteingruppen keine wachstumshemmende Wirkung ¹⁰. Da die Metallbindungsstöchiometrie und Reaktivität der Metall-Thiolat-Cluster von MT-3 genau der von MT-1 und -2 entspricht ⁸⁰, scheinen die Metalle keine entscheidende Rolle zu spielen. Zink alleine hat keinen inhibitorischen Effekt ⁸¹.

Dies legt nahe, daß die zusätzlichen Aminosäuren an der besonderen Funktion beteiligt sind ¹¹. Das zusätzliche Hexapeptid ist bei Maus und Mensch nicht konserviert. Demnach ist dabei eher die durch die Aminosäuren bedingte Struktur wichtig als die genaue Sequenz ⁴⁷. Der N-Terminus hingegen ist stark konserviert (Mensch, Maus, Ratte) und unterscheidet sich am meisten von den anderen MT ⁷⁴. Deshalb spielt er möglicherweise eine besondere Rolle für die biologische Aktivität. Dies wurde durch Versuche mit mutiertem MT-3 bestätigt, bei dem die beiden stark konservierten Proline im N-Terminus (β -Domäne) durch andere, bei MT-1 und -2 häufige Aminosäuren ersetzt wurden. Die mutierte β -Domäne hatte die gleichen Metallbindungseigenschaften wie der Wildtyp, zeigte aber keine inhibitorischen Eigenschaften mehr im Bioassay ⁸⁰. Uchida et al. ⁸² zeigten, daß ein isoliertes MT-3-Peptid-Fragment (Aminosäuren 5-26) biologische Aktivität aufweist, nicht jedoch ein synthetisches. Auch das metallfreie Peptid (1-26) hatte die gleiche Aktivität wie das native, Kupfer und Zink enthaltende Fragment. Ein mit β -Mercaptoethanol behandeltes metallfreies Peptid, bei dem die geknüpften Sulfid-Bindungen sich änderten, wies jedoch keine biologische Aktivität auf ⁸². Daraus wurde geschlossen, daß die durch die Prolinegruppen und durch Metall-Thiolat-Bindungen bedingte Struktur für die biologische Aktivität von MT-3 - im *in vitro*-Versuch - essentiell ist ^{82, 80}.

Auch rekombinantes Zn₇-MT-3 übt eine wachstumshemmende Wirkung auf Neuronenkulturen mit AD- und normalem Gehirnextrakt aus, aber etwa 10% weniger als natives, isoliertes MT-3 ¹¹. Ohne den Zusatz von Gehirnextrakten hat MT-3 allerdings einen gegenteiligen, stimulierenden Effekt auf die Nervenzellen, genauso wie MT-1. MT-3 scheint demnach nicht direkt auf die Neuronen zu wirken, sondern mit anderen Faktoren im Gehirn wechselzuwirken ⁸¹. Die Frage bleibt offen, wie sich MT-3 *in vivo* verhält. Eine Studie von Yuguchi et al. ⁷⁶ scheint die inhibitorische Wirkung von MT-3 auf Nervenzellen auch *in vivo* zu bestätigen.

Die gleiche Stimulierung ohne Gehirnextrakt wird auch bei Zugabe von anderen, Sulfhydryl-Gruppen enthaltenden Substanzen erzielt. Demnach sind wahrscheinlich die antioxidativen Eigenschaften für das bessere Wachstum der Nervenzellen verantwortlich ⁸⁰.

2.2.4 Verminderte MT-3-Expression bei Morbus Alzheimer

Uchida et al.¹⁰ haben MT-3 mittels Antikörpern in verschiedenen Gehirnproben nachgewiesen und festgestellt, daß MT-3 in AD-Gehirnen gegenüber Kontrollgehirnen erheblich reduziert war. Dieses Ergebnis wurde mittels Northern Blot Hybridisierung bestätigt¹¹. Die Transkription des MT-3-Gens scheint demnach bei AD herunterreguliert zu sein. Dies führte zur Hypothese, daß die niedrigere Expression von MT-3 der primäre Grund für unkontrolliertes Nervenwachstum und damit die Akkumulation von Neurofibrillen bei AD ist¹¹.

Erickson et al.⁸¹ bestätigten den neurotrophischen Effekt von AD-Gehirnextrakten und den Hemmeffekt von MT-3, konnten jedoch die Abnahme von MT-3 und seiner mRNA nicht statistisch signifikant nachweisen. Allerdings wurde der MT-3-Nachweis mit einem Cadmiumsättigungsverfahren durchgeführt, das den nicht vernachlässigbaren Kupferanteil im MT-3 nicht berücksichtigte. Amoureux et al.⁸³ konnten die Abnahme von MT-3-mRNA ebenfalls nicht bestätigen. In der neuesten Arbeit auf diesem Gebiet von Yu et al.⁷⁷ wurden erneut MT-3 und seine mRNA mit verschiedenen Methoden (Western Blot, immunochemische Gewebefärbung, mRNA) in einem großen Probenkollektiv untersucht. Es wurde einheitlich ein niedrigerer Gehalt in den AD-Proben gefunden. Die bis dahin widersprüchlichen Ergebnisse wurden auf die unterschiedlichen Methoden und Variationen innerhalb der Proben zurückgeführt, welche auch dort auftraten⁷⁷.

3 Experimentelles

3.1 Verwendete Chemikalien

Es wurden grundsätzlich nur Chemikalien der Qualität „zur Analyse“ oder besser verwendet.

Das deionisierte Wasser stammte aus einer Milli-Q-Anlage der Firma Millipore (Eschborn, Deutschland bzw. Milford, USA) und hatte einen Leitwert $\geq 10 \text{ M}\Omega\text{-cm}^{-1}$.

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer, die Element-Standardlösungen (für ICP-MS), Salpetersäure (Suprapur), Kaliumhydroxid (Suprapur), 25% Ammoniak-Lösung (Suprapur), Acetonitril und Methanol kamen von Merck (Darmstadt, Deutschland).

Einzelne Proteine wurden von Sigma (Deisenhofen, Deutschland bzw. St. Louis, USA) bezogen. Dithiothreitol stammte von Roth (Karlsruhe, Deutschland), der Serumklärer Frigen von Karl Schindler & Co. GmbH (Köln, Deutschland) und Chelex 100 von Bio-Rad (München, Deutschland bzw. Hercules, USA) bzw. Fluka (Buchs, Schweiz). Die Herkunft weiterer verwendeter Chemikalien wird im Text angegeben.

Humanes MT-3 wurde von Prof. Milan Vašák, Institut für Biochemie, Universität Zürich, Schweiz zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um in *E. coli* exprimiertes, zinkbeladenes MT-3. Von der gleichen Arbeitsgruppe stammte auch der Antikörper gegen humanes MT-3, ein aus Kaninchenserum gewonnener Antikörper gegen das MT-3-spezifische Polypeptid im C-Terminus von humanem MT-3¹⁰.

Aus Einzelpoteinen von Sigma aufgereinigte und mit Zink beladene MT-1 und MT-2 wurden im Center for Biochemical and Biophysical Sciences and Medicine, Harvard Medical School, Boston, USA erhalten.

3.2 Verwendete Geräte

Homogenisierung und Ultrazentrifugation:

Zur Zerkleinerung der Gewebe und Homogenisierung wurden ein Haushaltsmixer (Typ 4142, Braun), ein Ultra-Turrax T8 mit Dispergierwerkzeug S8N-8G (IKA Works, Staufen, Deutschland), ein Potter-Elvehjem-Homogenisator (B. Braun, Melsungen, Deutschland) oder ein Polytron PCU-2-10 Homogenisator (Brinkman Instruments, Westbury, USA) benutzt. Die Ultrazentrifugation erfolgte in der Beckman Ultrazentrifuge L8-70 mit einem Ti60- oder Ti75-Festwinkel-Rotor (Beckman Instruments GmbH, München, Deutschland), der Beckman Optima MAX mit einem MLA-130 Festwinkel-Rotor oder der Beckman L8-80M (Beckman Instruments Inc., Fullerton, USA) mit einem Ti60-Rotor.

Chromatographie:

Hauptsächlich wurde das HPLC (Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie - High Performance Liquid Chromatography)-System HP 1100 der Firma Hewlett Packard/Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland) verwendet. Es umfaßt einen Degaser, eine quaternäre Pumpe, ein thermostatisierbares automatisches Probenaufgabe-

system (Autosampler) und einen UV (Ultraviolett)-Detektor für die gleichzeitige Aufnahme von bis zu vier verschiedenen Wellenlängen. Die Förderung der internen Standardelement-Lösung erfolgte über eine weitere Doppelkolbenpumpe (HPLC-Pump 2248, Pharmacia).

Die zweite verwendete HPLC-Anlage bestand aus einem thermostatisierbaren Autosampler AS-100 HRCL der Firma Bio-Rad, zwei Doppelkolbenpumpen 2150 HPLC PUMP (LKB Bromma), einem Degaser Degasys DG-1300 (Uniflows) und einem UV-Detektor Uvicord S II (Pharmacia LKB) für 280 nm.

Für die Kopplung mit der Atomemissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma als Anregungsquelle (ICP-AES) wurde ein Gradientensystem verwendet. Es bestand aus zwei HPLC-Pumpen Typ 64 (Knauer, Berlin, Deutschland), gesteuert über einen HPLC-Programmer 50 (Knauer), einem Hochdruckgradientenmischer und einem on-line Entgasungssystem (VDS Optilab Degasys 1300, Montabaur, Deutschland).

Für die an der Harvard Medical School durchgeführten chromatographischen Trennungen wurde eine Waters-HPLC-Anlage (Waters 600S controller, Waters Associates Inc., Milford, USA) mit thermostatisierbarem Autosampler (Waters 717plus autosampler) und ein UV-Detektor (Waters Associate Model 440 absorbance detector) für wahlweise 214 nm oder 254 nm eingesetzt. Zur Messung der UV-Absorption in chromatographischen Fraktionen wurde ein CARY 50Bio (Varian, Walnut Creek, USA) Spektrophotometer verwendet.

Folgende Trennsäulen bzw. Säulenmaterialien wurden verwendet: Superdex 75PG (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), Superdex 75HR (Amersham Pharmacia Biotech), Fractogel EMD DEAE (Merck), DEAE Sephacel (Pharmacia Biotech), TSK G2000SW (Tosohaas, USA), Prodigy 5 μ ODS-2 (Phenomenex, Torrance, USA), MonoQ HR 5/5 (Pharmacia Biotech).

ICP-MS:

Zur Elementdetektion wurde hauptsächlich die Quadrupol-ICP-MS HP 4500 der Firma Hewlett Packard/Agilent Technologies verwendet, deren Software mit der HP 1100-HPLC abgestimmt ist. Außerdem wurde mit der Quadrupol-ICP-MS ELAN 6000 der Firma Perkin Elmer Sciex (Überlingen, Deutschland) gemessen.

Für die Kopplung mit der Kapillarzonenlektrophorese wurde das Sektorfeld (SF)-ICP-MS-Gerät ELEMENT der Firma Finnigan MAT (Bremen, Deutschland) verwendet. Als Interface diente der Zerstäuber CEI-100 der Firma CETAC (Omaha, USA) bzw. der im GKSS Forschungszentrum entwickelte Prototyp.

Die Betriebsparameter sowie der schematische Aufbau der Kopplung von HPLC und ICP-MS sind in Kapitel 4 beschrieben, die CZE-ICP-MS-Kopplung in Kapitel 7.3.

ICP-AES:

Für die Kopplung mit der Anionenaustauscherchromatographie wurde das ICP-AES-Gerät Jobin Yvon JY70 Plus der Firma Instruments S.A. (Longjumeau, Frankreich) verwendet. Es besitzt zwei optische Systeme: Ein Sequenzspektrometer mit einem 1 m Czerny-Turner-Monochromator und ein Simultanspektrometer mit einem 0,5 m Paschen-Runge-Polychromator, welches die simultane Detektion von 20 festeingestellten Elementen ermöglicht. Das Auflösungsvermögen beträgt jeweils 0,009 nm bzw. je nach Ordnung zwischen 0,012 und 0,048 nm. Beide Spektrometer werden für Messungen bei

Wellenlängen unter 200 nm kontinuierlich mit Stickstoff gespült, um die UV-Absorption von Sauerstoff zu vermeiden.

Für die Aufnahme transients Signale der gekoppelten Chromatographie wurde das DCP-Programm Version 4.09 von Tomiak⁸⁴ verwendet.

Kapillarzonenoelektrophorese:

Die Kapillarzonenoelektrophorese wurde mit dem HP 3D CE-System der Firma Hewlett Packard/Agilent Technologies durchgeführt. Die Quarzkapillaren (Thermo Separation Products, Egelsbach, Deutschland) hatten eine Länge von 70 cm, einen inneren Durchmesser von 75 µm und einen äußeren Durchmesser von 360 µm.

Atomabsorptionsspektrometrie (AAS):

Die Bestimmung des Kupfer- und Cadmium-Gesamtgehaltes der Cytosolproben erfolgte mittels Graphitrohr-AAS mit dem Gerät 5100PC der Firma Perkin Elmer mit Zeemann-Untergrundkompensation und längsbeheiztem Graphitrohr HGA-600 (pyrolytisch beschichtet, mit L'vov-Plattform) sowie dem Autosampler AS 60.

Für die Messung von Kupfer- und Zinkkonzentrationen in den chromatographischen Fraktionen bei der Isolierung von MT-3 wurde das Graphitrohr-AAS-Gerät 4100ZL der Firma Perkin Elmer Analytical Instruments (Shelton, USA) mit invers longitudinaler Zeemann-Untergrundkorrektur verwendet.

Instrumentelle Neutronenaktivierungsanalyse:

Gesamtelementgehalte in festen Proben und Cytosolen wurden mittels Instrumenteller Neutronenaktivierungsanalyse (INAA) am Forschungsreaktor BER II am Hahn-Meitner-Institut bestimmt. Die Neutronenflußdichte in der DBVK-Bestrahlungsposition (Drehbare Bestrahlungsvorrichtung im Kern) betrug ca. $1,3 \cdot 10^{14}$ Neutronen·cm⁻²·s⁻¹, die Bestrahlungszeit etwa 48 Stunden. Zur Detektion wurden hochreine Germaniumdetektoren eingesetzt, die Messung erfolgte im Bohrloch und/oder am Vollkristall.

Spektrophotometrie:

Zur Bestimmung von Enzymaktivitäten und Proteinkonzentrationen sowie Gesamtproteingehalten wurden photometrische Messungen - kinetisch und bei fester Wellenlänge - am Spektralphotometer DU 650 der Firma Beckman durchgeführt.

Enzyme linked immunosorbent assay:

Die Bestimmung von Ferritin mittels ELISA wurde mit dem Mikrotiterplatten-Filterphotometer Opsys 50 der Firma Merck durchgeführt.

Gelelektrophorese und Western Blot:

Das Mini Electrophoresis System Mini PROTEAN der Firma Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA) wurde für gelelektrophoretische Trennungen verwendet und eine Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) für den anschließenden Transfer der Proteine auf die Western Blot-Membran benutzt.

Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation – Time of Flight Massenspektrometrie (SELDI -TOF-MS):

Mittels SELDI-TOF-MS wurden Molmassen von Proteinen bestimmt. Dafür wurde ein ProteinChip System-Gerät der Firma Ciphergen Biosystems, Inc. (Palo Alto, USA) verwendet. Es arbeitet mit einem gepulsten Stickstoff-Laser der Wellenlänge 337 nm. Die Flugröhre hat eine Länge von 0,8 m.

3.3 Herkunft der Gewebeproben

Tierorgane wurden aus dem Supermarkt bzw. von einem Großhandel für Innereien (Katz & Krüger GmbH, Innereien und Fleischwaren-Großhandel, Berlin, Deutschland) bezogen. Das Schweinegehirn für die Isolierung von MT-3 stammte von der Firma PelFreeze (Little Rock, USA).

Die humanen Gehirnproben verschiedener Gehirnregionen von AD- und Kontrollpatienten stammten aus dem Referenzzentrum für neurodegenerative Erkrankungen im Klinikum Großhadern, München, Deutschland.

Die Organproben von zwei Sepsispatienten wurden von der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin im Klinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin zur Verfügung gestellt.

Die Leberproben, die im Rahmen von Lebertransplantationen entnommen wurden, ebenso wie weitere humane Organproben stammten vom Institut für Pathologie im Virchow-Klinikum des Universitätsklinikums Charité Berlin.

Nähere Angaben zu den Gewebeproben befinden sich im Anhang (siehe **Tab. 14-1** und **Tab. 14-2**).

4 Methode: HPLC-ICP-MS-Kopplung

4.1 Kopplung von Chromatographie und ICP-MS-Detektion

Bei der Speziationsanalyse, d.h. der Analyse von Elementen getrennt nach ihren chemischen oder physikalischen Bindungs- oder Zustandsformen⁸, wird ein Trennverfahren mit einem Verfahren zur Elementanalytik kombiniert.

Als Trennverfahren kommen je nach Art der gewünschten Trennung verschiedene Chromatographieverfahren in Frage wie Ionenaustauscher-, Größenausschluß- oder Reversed Phase (Umkehrphasen)-Chromatographie. Das Verfahren zur Elementanalytik muß entsprechend nachweisstark sein, da sich der Gesamtgehalt der Probe auf die verschiedenen Spezies verteilt⁸ und die Konzentration in der Probenlösung durch Verdünnung mit dem Eluens der Säule zusätzlich herabgesetzt wird. Deshalb eignet sich die ICP-MS mit ihrer ausgezeichneten Nachweisstärke besonders gut als elementspezifischer Detektor. Weitere Vorteile sind der große lineare Bereich und die Multielementtauglichkeit⁸⁵.

Besondere Vorteile bringt die Möglichkeit der on-line Detektion durch eine direkte Kopplung der HPLC mit der ICP-MS:

- Erhalt der Auflösung der Chromatographie
- Geschwindigkeit
- Multielement- und gleichzeitige Detektion mit anderen Verfahren (z.B. UV)⁸⁶.

Im Gegensatz zur off-line Messung der Elemente in aufgefangenen Fraktionen des Säuleneluates ist die Auflösung der on-line aufgenommenen Elementprofile durch Aufnahme von mehr Meßpunkten wesentlich besser (siehe **Abb. 4-1**). So können auch kleinere Peaks detektiert werden. Die Zeitersparnis bei der Multielementdetektion mit gleichzeitiger UV-Aufnahme ist ein ebenfalls nicht zu vernachlässigender Faktor. Besonders bei zersetzungsempfindlichen Proben ist eine zügige Messung unerlässlich. Die Anzahl der aufgenommenen Elemente wird de facto nur durch die Zeit begrenzt, in der ein chromatographischer Peak eluiert⁸⁷.

Der Aufbau der HPLC-ICP-MS-Kopplung ist schematisch in **Abb. 4-2** dargestellt. Die Probenaufgabe und Elution erfolgten über das HPLC-System HP 1100. Der Elutionspuffer wurde vor der Verwendung über einen 0,42 µm Filter (Zapcap-CR, Schleicher & Schüll, Düren, Deutschland) filtriert. Gelöste Gase, die im Laufe der Trennung ausgasen und so die Säule beeinträchtigen und die UV-Detektion stören könnten, wurden über den Degaser des HPLC-Systems entfernt. Gefördert wurde das Eluens über eine quaternäre Pumpe.

Die Probenaufgabe erfolgte mittels des Autosamplers der HPLC-Anlage. Der Vorteil bei diesem System ist die direkte Aufgabe über die Nadel, so daß das gesamte aufgenommene Volumen injiziert wird und keine zusätzliche Probenmenge zur Überfüllung einer Probenschleife notwendig ist, was bei nur begrenzt vorhandener Probenmenge wichtig ist. Der Autosampler wurde auf 4 °C gekühlt. Die Probengefäße sind außerdem verschließbar - die Probenaufnahme erfolgt durch ein Septum -, so daß die Proben gegebenenfalls mit einem Inertgas überschichtet werden können. So wird bei größeren Probenserien eine Oxidation und Zersetzung der Proben so weit wie möglich minimiert.

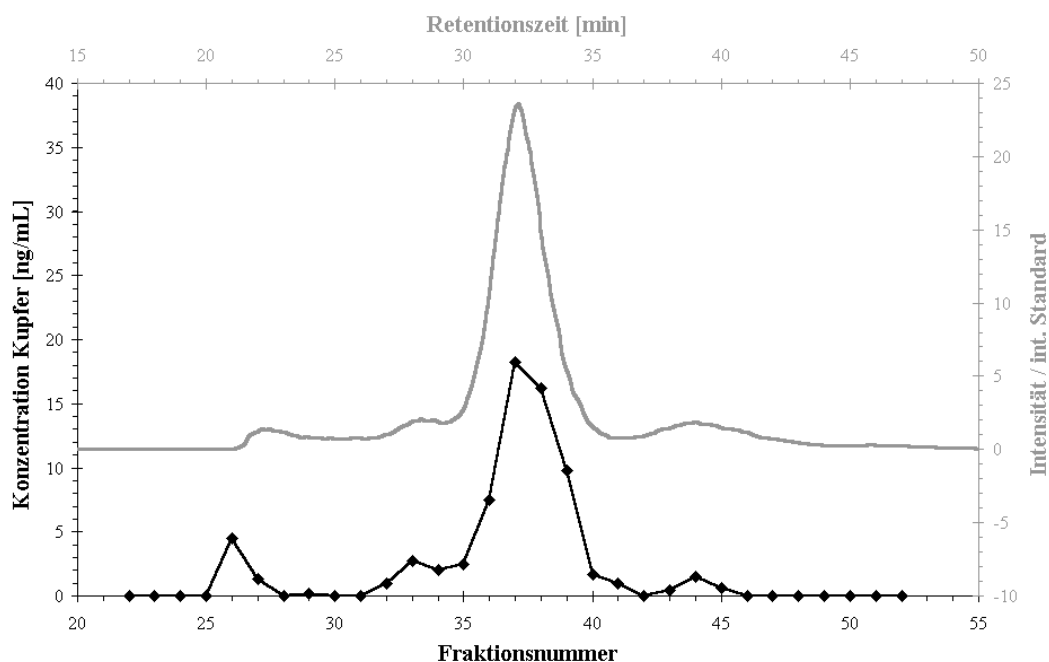


Abb. 4-1: Vergleich von on-line (—) und off-line (—) aufgenommenen Kupfer-Profilen der chromatographischen Trennung von Gehirncytosol (Schwein) über eine Superdex 75PG-Säule

Nach der chromatographischen Säule (siehe Abschnitt 4.2) gelangte das Eluat zur Durchflußzelle des UV-Detektors, der bis zu vier Wellenlängen gleichzeitig aufzeichnen kann. Über ein T-Stück wurde nach dem UV-Detektor die interne Standardelement-Lösung zur späteren Korrektur von Drift- und Matrixeffekten (siehe Abschnitt 4.3.3) zugeführt. Hierfür wurde ebenfalls eine Chromatographiepumpe verwendet, da diese im Gegensatz zu Schlauchpumpen über lange Zeiträume konstante Förderraten aufweist.

Das Eluat wurde anschließend mittels eines Babington-Zerstäubers in das Plasma der Quadrupol-ICP-MS HP 4500 zur Elementdetektion zerstäubt. Die verwendete Scott-Quarzsprühkammer wurde auf 2 °C temperiert.

Ein Vorteil dieses zur Kopplung verwendeten Systems ist die Möglichkeit einer direkten Abstimmung zwischen HPLC und ICP-MS über die Software. So wird zum Beispiel die Probeninjektion bei Ausfall des Plasmas gestoppt, was den Verlust wertvoller Proben vermeidet.

Ein Teil der Proben wurde mit einem anderen HPLC-ICP-MS-System gemessen. Der grundsätzliche Aufbau war der gleiche. Als Probeneinlaßsystem diente der Autosampler AS-100 HRLC mit Injektion über eine Probenschleife. Elutionspuffer und interne Standardelement-Lösung wurden über Doppelkolbenpumpen gefördert und die Lösungen mittels eines Degasers entgast. Nach der chromatographischen Säule wurde ein UV-Detektor mit einer Wellenlänge von 280 nm geschaltet und das Eluat anschließend über einen Cross-Flow-Zerstäuber mit Scott-Kammer ins Plasma der Quadrupol-ICP-MS ELAN 6000 zerstäubt.

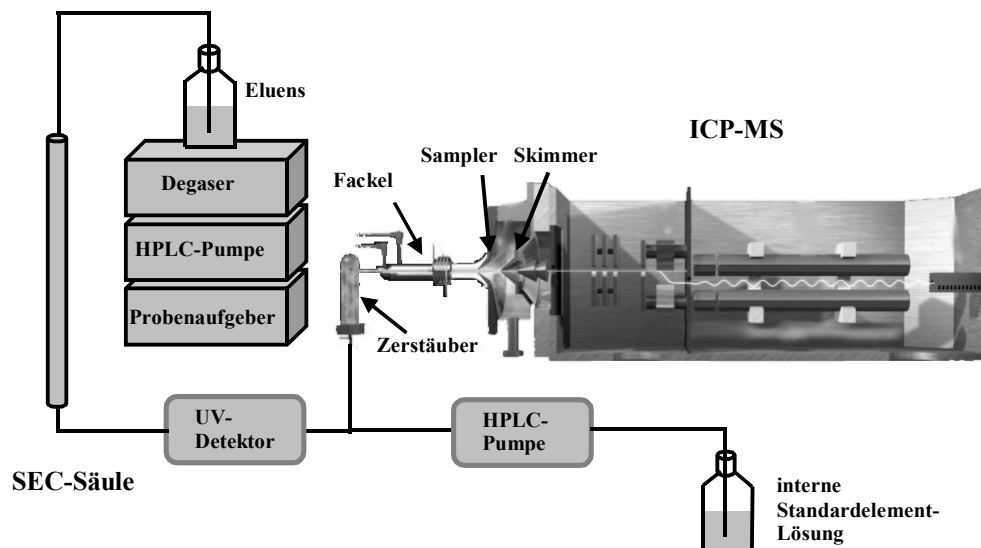


Abb. 4-2: Schematischer Aufbau der HPLC-ICP-MS-Kopplung
(Abbildung der ICP-MS-Einheit von Agilent Technologies)

4.2 Chromatographische Trennung

4.2.1 Größenausschlußchromatographie

In dieser Arbeit sollte eine Speziationsanalyse von Elementen hinsichtlich ihrer Bindung an verschiedene Proteine durchgeführt und die verschiedenen Metalloproteine über ihren Elementgehalt detektiert werden.

Besonders wichtig war dabei - soweit möglich - der Erhalt der ursprünglichen Metallkomplexe in den Proben bis zur Detektion. Dafür wurde eine besonders schonende Trennmethode benötigt, mit möglichst wenig Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial, die zu Metallverlusten führen können. Deshalb wurde die Größenausschlußchromatographie (SEC - Size Exclusion Chromatography) zur Trennung der Biomoleküle gewählt. Der Trenneffekt beruht dabei nicht auf chemischen oder physikalischen Wechselwirkungen mit der stationären Phase, sondern auf einem umgekehrten Siebeffekt. In der Theorie der SEC eluieren die zu trennenden Moleküle zwischen der Ausschlußgrenze und der Permeationsgrenze, bei der alle niedermolekularen Komponenten ausgespült werden. Die Retentionszeit ist dabei proportional zur Molekülgröße bzw. dem Volumen des solvatisierten Moleküls. Es können in der Praxis trotzdem ionische oder hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial auftreten, wodurch Substanzen auch erst nach der Permeationsgrenze eluieren. Das Säulenmaterial muß deshalb sorgfältig ausgewählt werden. So können z.B. im Fall von Kieselgel die Oberfläche durch Silanisierung deaktiviert und damit Adsorptionseffekte weitgehend vermieden werden.

Der Nachteil der SEC ist das begrenzte Auflösungsvermögen. Mehrere Substanzen ähnlicher Molekülgröße bzw. -form können nahezu gleichzeitig und damit nicht aufgetrennt eluieren. Durch die Kopplung mit einer elementspezifischen Detektion wird hier jedoch die Anzahl der betrachteten Proteine reduziert, da ausschließlich

Metalloproteine bzw. metallkomplexierende Substanzen erfaßt werden. Durch die Multielementdetektion können gegebenenfalls auch unterschiedliche, aber gleichzeitig eluierende Metalloproteine mit verschiedenen Metallen in den jeweiligen Elementprofilen getrennt betrachtet werden.

4.2.2 Optimierung der Trennbedingungen

Die chromatographischen Trennbedingungen wurden für die Trennung von Biomolekülen in Cytosolen optimiert. Es sollte eine maximale Auflösung bei möglichst geringen Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial erreicht werden. Die grundlegenden Untersuchungen hierfür fanden im Rahmen meiner Diplomarbeit am Hahn-Meitner-Institut statt und werden hier mit weiteren Ergebnissen zusammengefaßt⁵.

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) -Puffer wurde als Eluens verwendet, derselbe wie auch für die Cytosolgewinnung (siehe Kapitel 5.1). Es handelt sich um einen in der Proteinbiochemie weit verbreiteten und besonders für Cytosolextraktionen häufig benutzten Puffer für einen pH-Bereich von 7,3 bis 9,3⁸⁸.

Säulenmaterial

Es wurden drei verschiedene Säulenmaterialien getestet: Fractogel EMD Biosec (Merck), Superdex 75PG und Shodex Asahipak (Asahi Chemical Industry Co. Ltd). Letzteres wurde als Kombination aus zwei GS-520 HQ-Säulen mit vorgeschalteter Vorsäule GS-2G7B verwendet. Die Charakteristika der Säulen sind in **Tab. 14-3** im Anhang aufgeführt. Der Elutionspuffer hatte $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ und einen pH-Wert von 7,4. Auf die Fractogel- und Superdex-Säule wurden jeweils $500 \mu\text{L}$ der Cytosolprobe aufgegeben, auf die Asahipak-Säulenkombination $100 \mu\text{L}$.

Beim Vergleich der chromatographischen Trennungen von verschiedenen Cytosolproben mit den unterschiedlichen Säulen zeigte sich, daß die Auflösung bei der Superdex 75PG-Säule am besten war. Deshalb wurde diese Säule für die folgenden chromatographischen Trennungen gewählt.

Konzentration des Elutionspuffers

Verschiedene Konzentrationen des Elutionspuffers wurden getestet, um die Auswirkung auf die Trennung festzustellen. Dabei ist zu beachten, daß bei niedrigen Pufferkonzentrationen starke ionische Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial auftreten können⁸⁹ und dabei die Gefahr von Metallverlusten besteht. Eine zu hohe Pufferkonzentration ergibt jedoch Probleme bei der ICP-MS-Detektion: Hohe Salzfrachten können zu Ablagerungen und Zusetzung des Probeneinlaßsystems (Zerstäuber, Injektorrohr, Interface) führen. Durch Verstopfungen und Schwankungen im Zerstäubergasfluß werden die gemessenen Signale instabil und die Reproduzierbarkeit nimmt ab^{86,8}.

Die chromatographischen Trennungen wurden mit Tris-Puffer-Konzentrationen von 5, 10, 15, 20 und $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ durchgeführt. Der pH-Wert betrug jeweils 7,4.

Beim Vergleich der Elementprofile der Trennungen bei den unterschiedlichen Pufferkonzentrationen zeigte sich, daß die Profile bei einer Konzentration von $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ und besonders bei $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ signifikant von denen bei höheren Pufferkonzentrationen abwichen. Es scheint hier zu starken Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial zu

kommen, welche die Elution erheblich verzögern. Solche starken Wechselwirkungen sollen vermieden werden, um Veränderungen der Proben wie Metallverluste an den Proteinen vorzubeugen. Die Tris-Puffer-Konzentration, mit der die beste Auflösung erzielt wurde, war abhängig vom betrachteten Organ und Element. In den meisten Fällen jedoch ergab eine Konzentration von $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ eine gute Trennung.

Für die in dieser Arbeit im folgenden ausgeführten chromatographischen Trennungen wurde deshalb eine Konzentration des Tris-Puffer-Eluens von $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ gewählt. Diese Konzentration entspricht der des Homogenisierungspuffers bei der Cytosolextraktion (siehe Kapitel 5.1) und ist problemlos im Zusammenhang mit der ICP-MS-Detektion verwendbar.

pH-Wert des Elutionspuffers

Der Einfluß des pH-Wertes des Elutionspuffers auf die chromatographischen Trennungen der Biomoleküle wurde getestet. Der pH-Wert beeinflusst die Ladungen der Proteine und damit auch mögliche Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial.

Es wurden Trennungen mit pH-Werten des Tris-Puffers von 6,8 sowie 7,4 und 8,0 durchgeführt. Ein Einfluß des pH-Wertes auf die Auflösung der chromatographischen Trennungen war erkennbar. Besonders die bei pH=8,0 erhaltenen Elementprofile wichen von denen bei pH=6,8 und 7,4 ab. Die Auflösung bei pH=8,0 war schlechter. Bei pH=6,8 war das Verhältnis der Peakhöhen gegenüber dem Profil bei pH=7,4 verändert. Es besteht die Möglichkeit, daß Metallverluste aufgetreten sind. Besonders für Zink z.B. nimmt die Komplexstabilität bei Metallothioneinen im Sauren stark ab⁵¹.

Für die folgenden chromatographischen Trennungen von Cytosolproben wurde als Eluens Tris-Puffer mit pH=7,4 gewählt. Dies entspricht dem physiologischen pH-Wert. Es wird angenommen, daß unter diesen Bedingungen am wenigsten Abweichungen vom nativen Zustand der Proteine, besonders auch im Hinblick auf die Metallbeladung, auftreten. Außerdem wurde eine bestmögliche chromatographische Auflösung erreicht.

4.2.3 Kalibrierung der Trennsäule

Grundlage der Kalibrierung ist ein logarithmischer Zusammenhang zwischen dem Retentionsvolumen und der Molmasse eines Moleküls, für die in der Theorie der SEC eine direkte Beziehung zur Größe des Moleküls angenommen wird. Im mittleren Permeationsbereich kann er durch eine Gerade angenähert und zur Abschätzung unbekannter Molmassen verwendet werden.

Es muß dabei jedoch beachtet werden, daß bei der SEC-Trennung die räumliche Form des solvatisierten Moleküls eine Rolle spielt. Deshalb muß eine Kalibrierung mit Molekülen vorgenommen werden, die den zu untersuchenden Substanzen in der Struktur ähnlich sind. Außerdem ist die Trennung von pH-Wert und Ionenstärke des Eluens abhängig⁹⁰, was eine Zuordnung der Molmasse zusätzlich erschweren kann.

Durch Aufgabe von Substanzen bekannter Molmasse wurde die Korrelation zur Retentionszeit für die Superdex 75PG-Säule ermittelt. Die verwendeten Substanzen sind in **Tab. 4-1** aufgeführt, die Retentionszeiten in **Abb. 4-3** aufgetragen.

Als Ausschlußgrenze wurde mit Dextranblau eine Retentionszeit von 24,1 min bestimmt. Nach Herstellerangaben soll sie bei $70000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ liegen. Es zeigte sich, daß Transferrin und Albumin noch angetrennt werden konnten. Sie lagen jedoch nicht mehr im linearen

Bereich der Kalibrierung. Die Permeationsgrenze soll bei $3000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ liegen. Hier konnte sie etwa der Retentionszeit von Aprotinin ($6500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) bei 54,3 min zugeordnet werden. Der lineare Trennbereich lag etwa zwischen 6000 und $50000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Die Regressionsgerade für den linearen Bereich betrug:

$$\lg \text{ Molmasse } [\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}] = -0,0250 \cdot \text{ Retentionszeit } [\text{min}] + 5,3865$$

Tab. 4-1: Kalibrierung der Trennsäule Superdex 75PG: Molmassen und Retentionszeiten verschiedener Einzelsubstanzen

		Molmasse [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$]	Retentionszeit [min]
1	Dextranblau	2000000	24,1
2	Transferrin	80000	28,0
3	Albumin	67000	28,3
4	Ovalbumin	43000	29,9
5	Carboanhydrase	32000	35,3
6	Chymotrypsin	21600	42,5
7	Lysozym	15500	48,0
8	Cytochrom C	12300	51,5
9	Aprotinin	6500	54,3
10	Insulin	2500	54,2
11	Leucin Enkephalin	555	56,3
12	Aceton	58	55,6

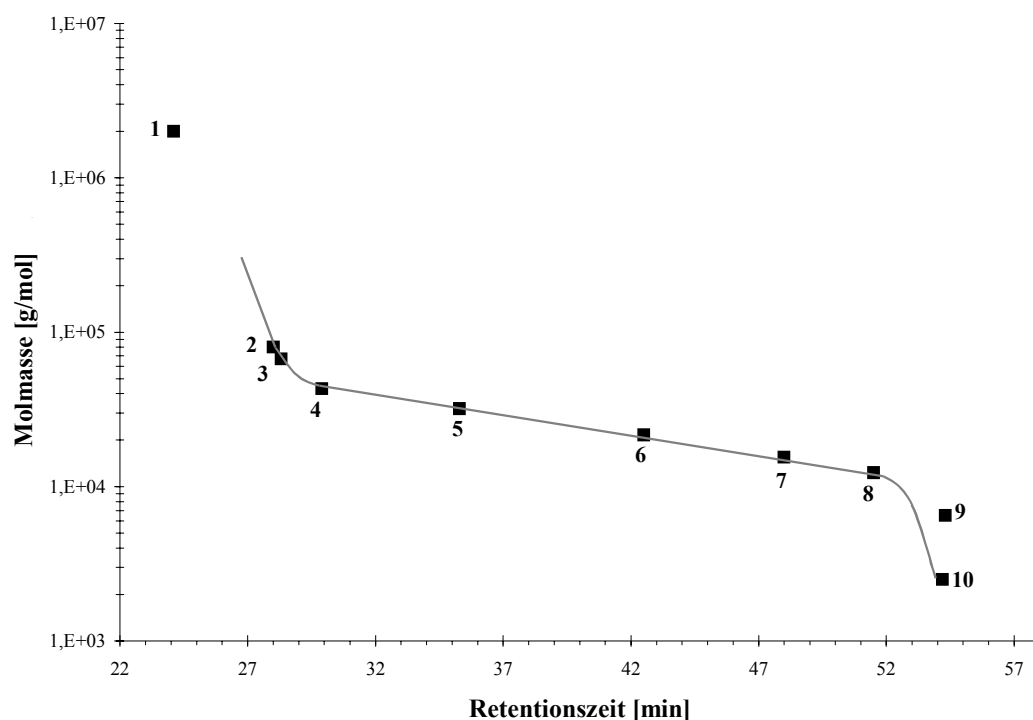


Abb. 4-3: Korrelation zwischen den Molmassen verschiedener Einzelsubstanzen (siehe **Tab. 4-1**) und ihren Retentionszeiten auf der Superdex 75PG-Säule

Da im Laufe der Arbeit verschiedene Superdex 75PG-Säulen verwendet wurden, weichen die Retentionszeiten für einzelne Proteine in den im folgenden gezeigten Darstellungen der Elementprofile teilweise voneinander ab. Auch geringfügige Änderungen im Versuchsaufbau (Länge der Leitungen) beeinflussten die Retentionszeiten.

4.2.4 Wahl eines Vorsäulenfilters

Das Gehirn hat einen sehr hohen Lipidanteil von etwa 50% der Trockensubstanz. Es handelt sich dabei um verschiedene Phospho-, Glyco- und Sphingolipide. Die Myelinscheiden der Nervenfortsätze machen den größten Anteil aus (siehe auch Kapitel 12.2)^{91, 92}. Bei der Probenvorbereitung wird das Fett durch die Ultrazentrifugation soweit wie möglich von den Cytosolproben abgetrennt (siehe Kapitel 5.1). Während der im Hahn-Meitner-Institut durchgeführten Diplomarbeit⁵ zeigte sich jedoch, daß dies nicht vollständig möglich ist und ein störender Fettanteil in den Proben verbleibt. Nach der Trennung von mehreren Gehirncytosolen auf der Superdex 75PG-Säule nahm die Trennleistung der Säule deutlich ab, die chromatographische Auflösung verschlechterte sich. Dies wurde darauf zurückgeführt, daß noch vorhandenes Fett die Poren des Trennmaterials zusetzte. Fett setzte sich außerdem an den Wandungen der Leitungen des Chromatographiesystems ab, wo es sich ansammeln und zu Verstopfungen führen konnte. Zur Vermeidung dieser die Analytik stark beeinträchtigenden Effekte wurden die Cytosolproben vor der Aufgabe auf die Säule mit dem Serumklärer Frigen als Entfettungsmittel behandelt. Nach Zentrifugation bei 14000 g (gekühlte Tischzentrifuge Z233MK, Hermle, Wehingen, Deutschland) konnte eine sichtbare Fettschicht abgetrennt werden. Frigen besteht aus fluorierten Chlorkohlenwasserstoffen. In Testläufen wurde sichergestellt, daß der Zusatz die erhaltenen Elementprofile nicht verändert. Es war nur ein zusätzlicher Chlorid-Peak bei einer Retentionszeit (RT) von 79,5 min zu erkennen, welcher durch polyatomare Interferenzen auch Peaks in anderen Elementprofilen erzeugen kann, z.B. bei ⁷⁷Se (⁴⁰Ar³⁷Cl, siehe Abschnitt 4.3.1).

Mittels der Probenvorbehandlung konnten die Fettablagerungen auf der Säule erheblich reduziert werden. Sie erwies sich langfristig jedoch als nicht ausreichend. Deshalb sollte zusätzlich eine Vorsäule vor die Trennsäule geschaltet werden. Sie mußte folgende Bedingungen erfüllen:

- keine Verschlechterung der Trennung
- keine Wechselwirkung mit der Probe / Veränderung der Metallgehalte
- Möglichkeit des einfachen und häufigen Auswechselns.

Vorsäulen mit dem gleichen Säulenmaterial wie das der präparativen Trennsäule waren nicht kommerziell erhältlich. Die eigene Herstellung kleiner Vorsäulen mit dem Superdex 75PG-Material, die häufig getauscht und neu befüllt werden mußten, war bei den großen Probenserien schwer realisierbar. Als geeignete Alternative erwies sich die Vorsäulenfilter-Kartusche Securityguard (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland), da sie problemlos vor jede Säule geschaltet werden kann und die Filtereinsätze einfach zu wechseln sind. Die Vorsäule besteht aus einer Edelstahlkartusche mit Filtereinsätzen aus dem Filtermaterial GFC-3000 (Durchmesser 3 mm, Schichtdicke 4 mm) für einen Trennbereich von ca. 5000–80000 g·mol⁻¹.

Durch Mehrfachinjektionen von Gehirncytosol (Schwein) wurde die grundsätzliche Eignung der Filter überprüft, nicht zu schnell zu verstopfen. Es mußte anschließend sichergestellt werden, daß durch die Verwendung der Vorfilter keine Veränderung der Elutionsprofile und Metallbeladung der Proben durch Wechselwirkungen oder Kontamination auftraten. Die Elementprofile der Trennung von Gehirncytosol (Schwein) über eine Superdex 75PG-Säule mit und ohne Vorfilter wurden verglichen. In **Abb. 4-4** sind als Beispiel die Zink- und Eisen-Profile dargestellt. Zink ist an viele Proteine gebunden und besonders im Zusammenhang mit den Metallothionein-Untersuchungen wichtig. Es zeigte sich, daß die betrachteten Elementprofile durch den Vorfilter nicht

wesentlich verändert wurden. Allgemein traten geringfügige Unterschiede in den Elementprofilen mitunter auch bei Trennungen der gleichen Probe unter gleichen Bedingungen auf.

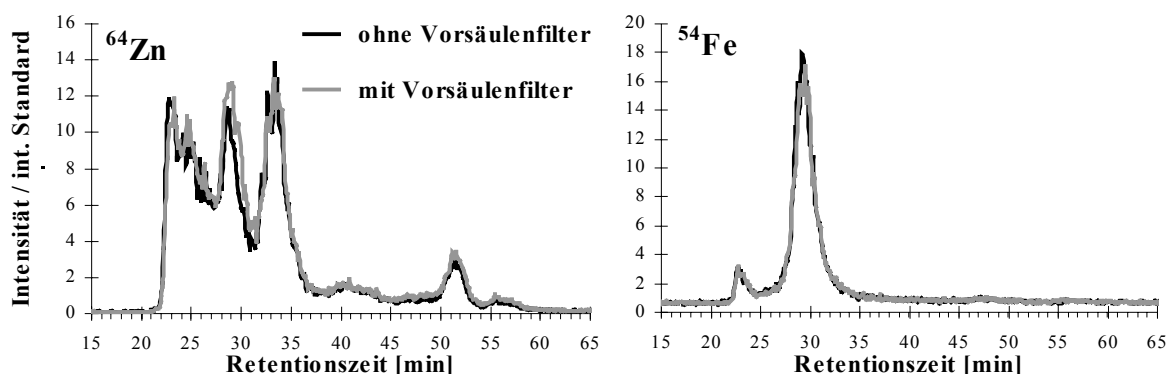


Abb. 4-4: Vergleich der Zink- und Eisen-Profile der chromatographischen Trennung von Gehirncytosol (Schwein) auf einer Superdex 75PG-Säule mit und ohne Vorsäulenfilter

Die Vorsäulenfilter wurden im folgenden bei allen chromatographischen Trennungen verwendet und nach 10 bis 15 Läufen gewechselt. Dadurch konnten die durch Fett in den Proben entstandenen Probleme weitestgehend beseitigt werden.

4.2.5 Meßparameter Chromatographie

In **Tab. 4-2** sind zur Übersicht die Parameter der verwendeten chromatographischen Trennung aufgeführt.

Tab. 4-2: Meßparameter Chromatographie

HPLC-System:	HP 1100
Säule:	Superdex 75PG (16·600 mm)
Vorsäule:	Securityguard mit GFC-3000 Filtereinsatz
Eluens:	20 mmol·L ⁻¹ Tris-Puffer, pH=7,4 (mit HNO ₃ eingestellt)
interne Standardelement-Lösung:	50 µg·L ⁻¹ Ge, Rh, Ir mit 20% MeOH, 0,33 % HNO ₃
Flußrate Eluens:	2 mL·min ⁻¹
Flußrate interner Standard:	0,2 mL·min ⁻¹
Druck:	drucklos, bis 0,3 MPa Druckaufbau durch System
Injektionsvolumen:	500 µL
Autosampler-Thermostat:	4 °C
Nadelspülung vor der Injektion mit	Wasser
UV-Detektion:	214 nm, 254 nm, 280 nm (Deuteriumlampe)

Die Meßparameter für die ebenfalls verwendete, an die ELAN 6000- ICP-MS gekoppelte HPLC finden sich in **Tab. 14-4** im Anhang.

4.3 ICP-MS-Detektion

4.3.1 Gemessene Isotope und Interferenzen

Das Eluat der chromatographischen Säule wird zerstäubt und als Aerosol ins Plasma eingebracht, wo die Moleküle atomisiert und anschließend ionisiert werden. Das Plasma dient als Ionenquelle des Massenspektrometers. Die Extraktion der Ionen und Überführung ins Hochvakuum des Massenspektrometers erfolgt über zwei konusförmige Lochblenden - Sampler und Skimmer -, zwischen denen ein Vorvakuum angelegt wird⁹³. Im Massenspektrometer werden die Analytionen schließlich nach ihren Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen getrennt und detektiert.

Durch verschiedene Reaktionen von Molekülen, Atomen und Ionen im Plasma und durch Stöße im Zwischenraum zwischen Sampler und Skimmer kann es zur Bildung unterschiedlicher Verbindungen kommen, sogenannten Clusterionen. Sie führen insbesondere im Massenbereich unter 80 Da im Massenspektrum zu spektralen Interferenzen⁹³. Clusterionen bilden sich als - chemisch nicht stabile - Kombinationen aus Probenbestandteilen, dem Plasmagas Argon sowie weiteren Gasen der umgebenden Atmosphäre (z.B. Bildung von Oxiden) und Bestandteilen des Lösungsmittels wie den darin enthaltenen Säuren^{8, 93, 85}. Diese polyatomaren Interferenzen sind besonders bei den verwendeten Quadrupol-Massenspektrometern störend, da deren Auflösung nicht viel mehr als 1 Masseneinheit beträgt.

Spektrale Interferenzen treten auch durch doppelt geladene Ionen auf, besonders von Elementen mit niedriger Ionisierungsenergie⁹³. Außerdem gibt es isobare Interferenzen durch natürlich vorkommende Isotope verschiedener Elemente mit gleicher Masse. Zu beachten ist auch der Beitrag durch Nachbarionen: Durch Peakverbreiterung kann ein in großem Überschuß vorliegendes Element das Signal des benachbarten Analytelementes stören⁸.

Da diese Interferenzen mit einem Quadrupol-Gerät schwer aufgelöst werden können, verschlechtern sie die Nachweisgrenzen einiger Elemente⁹³. Es muß auf Isotope mit geringerer natürlicher Häufigkeit ausgewichen werden.

Die während des chromatographischen Laufes detektierten Elemente mit ihren jeweils gemessenen Isotopen sind in **Tab. 4-3** aufgeführt. Im Laufe der Arbeit wurde die Anzahl der aufgenommenen Isotope verändert, maximal wurden 36 Isotope auf einmal detektiert. Um eine gute Empfindlichkeit zu erreichen, wurden möglichst die natürlich häufigsten Isotope gewählt. Dies war jedoch nicht in allen Fällen wegen Störungen durch polyatomare Interferenzen möglich. Die Interferenzen für diese gestörten Isotope sowie weitere mögliche Interferenzen der gemessenen Isotope sind ebenfalls in **Tab. 4-3** angegeben.

Besonders durch Interferenzen - auf allen Isotopen - gestört sind die Elemente Schwefel (Sauerstoff-Interferenzen), Selen (Argon-Interferenzen) und Eisen (Argon-Interferenzen, besonders Argonoxid). Die natürlich häufigsten Isotope können dadurch nicht gemessen werden. Es muß auf unempfindlichere Isotope ausgewichen werden, die aber ebenfalls noch einen störenden erhöhten Untergrund aufweisen.

Tab. 4-3: Gemessene Isotope, ihre natürliche Häufigkeit und Interferenzen^{a, b} 94, 8, 85

Element	Isotop	natürliche Häufigkeit [%]	Mögliche Interferenzen (Auswahl)			
Magnesium	²⁴ Mg	78,99	¹² C ¹² C	⁴⁸ Ca ²⁺		
Phosphor	³¹ P	100	¹⁴ N ¹⁶ O ¹ H	⁶³ Cu ²⁺	⁶² Ni ²⁺	
Schwefel	³² S	95,02	¹⁶ O ¹⁶ O			
	³⁴ S	4,21	¹⁸ O ¹⁶ O	¹⁶ O ¹⁶ O ¹ H ¹ H	⁶⁸ Zn ²⁺	
Chlorid	³⁵ Cl	75,77	¹⁸ O ¹⁶ O ¹ H	⁷⁰ Ge ²⁺		
Calcium	⁴⁰ Ca	96,94	Ar			
	⁴² Ca	0,65	²⁶ Mg ¹⁶ O	²³ Na ¹⁸ O ¹ H	⁸⁵ Rb ²⁺	⁴¹ K ¹ H
	⁴⁴ Ca	2,09	¹² C ¹⁶ O ¹⁶ O	¹⁴ N ¹⁴ N ¹⁶ O		
Chrom	⁵² Cr	83,79	¹² C ⁴⁰ Ar	³⁶ Ar ¹⁶ O	³⁵ Cl ¹⁶ OH	
	⁵³ Cr	9,50	¹³ C ⁴⁰ Ar	³⁶ Ar ¹⁶ O ¹ H	³⁵ Cl ¹⁸ O	¹⁰⁷ Ag ²⁺
Eisen	⁵⁴ Fe	5,80	¹⁴ N ⁴⁰ Ar	⁵⁴ Cr	¹⁰⁷ Ag ²⁺	
	⁵⁶ Fe	91,72	⁴⁰ Ar ¹⁶ O			
	⁵⁷ Fe	2,20	⁴⁰ Ar ¹⁶ O ¹ H	⁴¹ K ¹⁶ O	¹¹⁴ Cd ²⁺	
Mangan	⁵⁵ Mn	100	¹⁵ N ⁴⁰ Ar	¹² C ⁴⁰ Ar	³⁹ K ¹⁶ O	¹⁰⁹ Ag ²⁺
Kobalt	⁵⁹ Co	100	⁴⁰ Ar ¹⁸ O ¹ H	²³ Na ³⁶ Ar	⁴³ Ca ¹⁶ O	
Nickel	⁵⁸ Ni	68,27	⁴⁰ Ar ¹⁸ O	⁴² Ca ¹⁶ O	⁵⁸ Fe	
	⁶⁰ Ni	26,10	⁴⁴ Ca ¹⁶ O	²⁴ Mg ³⁶ Ar		
Kupfer	⁶³ Cu	69,17	²³ Na ⁴⁰ Ar	¹⁵ N ¹⁶ O ¹⁶ O ¹⁶ O	¹²⁷ I ²⁺	
	⁶⁵ Cu	30,83	²⁵ Mg ⁴⁰ Ar	²³ Na ²³ Na ¹⁸ O ¹ H	³² S ¹⁶ O ¹⁶ O ¹ H	
Zink	⁶⁴ Zn	48,60	³² S ³² S	¹⁴ N ¹⁸ O ¹⁶ O ¹⁶ O	⁴⁰ Ar ¹² C ¹² C	
	⁶⁶ Zn	27,90	³⁶ Ar ¹⁴ N ¹⁶ O	⁵⁰ Cr ¹⁶ O	²⁶ Mg ⁴⁰ Ar	
	⁶⁷ Zn	4,10	³² S ³⁵ Cl	²⁷ Al ⁴⁰ Ar	³¹ P ³⁶ Ar	¹³⁵ Ba ²⁺
	⁶⁸ Zn	18,80	⁵² Cr ¹⁶ O	³² S ³⁶ Ar	⁵⁴ Fe ¹⁴ N	¹³⁷ Ba ²⁺
Germanium	⁷² Ge	27,40	⁵⁶ Fe ¹⁶ O	⁴⁰ Ar ¹⁴ N ¹⁸ O	³² S ⁴⁰ Ar	
Arsen	⁷⁵ As	100	³⁵ Cl ⁴⁰ Ar	³⁹ K ³⁶ Ar	⁵⁹ Co ¹⁶ O	
Selen	⁷⁶ Se	9,00	³⁶ Ar ⁴⁰ Ar			
	⁷⁷ Se	7,60	³⁷ Cl ⁴⁰ Ar	⁴⁰ Ar ³⁶ Ar ¹ H	⁵⁹ Co ¹⁸ O	⁶¹ Ni ¹⁶ O
	⁷⁸ Se	23,60	³⁸ Ar ⁴⁰ Ar			
	⁸⁰ Se	49,70	⁴⁰ Ar ⁴⁰ Ar			
	⁸² Se	9,20	⁴² Ca ⁴⁰ Ar	⁴⁰ Ar ⁴⁰ Ar ² H	⁶⁶ Zn ¹⁶ O	⁸² Kr
Bromid	⁷⁹ Br	50,69	⁴⁰ Ar ³⁸ Ar ¹ H	³⁹ K ⁴⁰ Ar	⁶³ Cu ¹⁶ O	
Strontium	⁸⁶ Sr	9,86	⁷⁰ Zn ¹⁶ O	⁷⁰ Ge ¹⁶ O	⁸⁶ Kr	
	⁸⁸ Sr	82,58	⁴⁸ Ca ⁴⁰ Ar	⁵² Cr ³⁶ Ar	⁷² Ge ¹⁶ O	
Molybdän	⁹⁸ Mo	24,13	⁵⁸ Fe ⁴⁰ Ar	⁵⁸ Ni ⁴⁰ Ar	⁸² Se ¹⁶ O	
Rhodium	¹⁰³ Rh	100	⁶³ Cu ⁴⁰ Ar	⁸⁷ Sr ¹⁶ O	⁸⁷ Rb ¹⁶ O	²⁰⁶ Pb ²⁺
Silber	¹⁰⁷ Ag	51,84	¹⁰⁶ Cd ¹ H	⁶⁷ Zn ⁴⁰ Ar	⁷² Ge ³⁵ Cl	
	¹⁰⁹ Ag	48,16	¹⁰⁸ Cd ¹ H	⁷⁴ Ge ³⁵ Cl		
Cadmium	¹¹¹ Cd	12,80	⁹⁵ Mo ¹⁶ O	⁷⁶ Se ³⁵ Cl	⁷⁴ Ge ³⁷ Cl	
	¹¹⁴ Cd	28,73	⁷⁴ Ge ⁴⁰ Ar	⁷⁴ Se ⁴⁰ Ar	⁹⁸ Mo ¹⁶ O	
Iodid	¹²⁷ I	100	⁸⁷ Sr ⁴⁰ Ar	⁸⁷ Rb ⁴⁰ Ar	¹¹¹ Cd ¹⁶ O	
Barium	¹³⁸ Ba	71,70	⁹⁸ Mo ⁴⁰ Ar			
Iridium	¹⁹³ Ir	62,70				
Quecksilber	²⁰⁰ Hg	23,13				
Blei	²⁰⁸ Pb	52,40				

^a Es werden die Interferenzen der gemessenen Isotope angegeben sowie die der natürlich häufigsten Isotope, welche wegen dieser Interferenzen nicht zur Detektion benutzt wurden.

^b Alle Ionen und Clusterionen sind - soweit nicht anders angegeben - einfach positiv geladen.

Von den für die Detektion von Metalloproteinen besonders interessanten Elementen (Cu, Zn, Cd, Fe, Se, Ag) wurden die Elutionsprofile mehrerer Isotope aufgenommen. Durch den Vergleich der Profile der Isotope eines Elementes konnten Interferenzen, die nur bei einem Isotop vorkommen, erkannt bzw. die störungsfreie Detektion überprüft werden. So stimmen die Profile der Eisenisotope ^{54}Fe und ^{57}Fe , der Cadmiumisotope ^{111}Cd und ^{114}Cd sowie der Silberisotope ^{107}Ag und ^{109}Ag genau überein, so daß Artefakte durch interferierende Peaks anderer Elemente ausgeschlossen werden konnten. ^{63}Cu hingegen wird durch $^{23}\text{Na}^{40}\text{Ar}$ gestört. In **Abb. 4-5 a** ist bei einer Retentionszeit von 65,5 min ein Peak im ^{63}Cu -Profil, jedoch nicht im ^{65}Cu -Profil zu erkennen. ^{77}Se weist eine $^{37}\text{Cl}^{40}\text{Ar}$ -Interferenz auf, das Profil zeigt Signale bei den Retentionszeiten der beiden Chlorid-Peaks bei $\text{RT}=79,5$ und $\text{RT}=51,5$ min, wobei letzterer sehr schwach ist. Auch ^{67}Zn wird durch Chlorid gestört ($^{32}\text{S}^{35}\text{Cl}$), aber in geringerem Maße als bei der Argon-Interferenz. Es ist ein kleiner Peak bei ca. $\text{RT}=80$ min zu erkennen, der zweite Peak ($\text{RT}=51,5$ min) ist zu schwach und im ^{67}Zn -Profil nicht auszumachen. Ansonsten stimmen die Profile der Zink-Isotope ^{64}Zn , ^{66}Zn und ^{67}Zn genau überein (siehe **Abb. 4-5 b**). Das Profil des monoisotopischen Elementes Arsen weist zwei deutliche Peaks bei den dem Chlorid entsprechenden Retentionszeiten auf. Sie entstehen durch eine $^{35}\text{Cl}^{40}\text{Ar}$ -Interferenz. Es kann nicht auf ein anderes Isotop ausgewichen werden. Arsen-Profile wurden nicht weiter betrachtet.

Viele bei quantitativen ICP-MS-Messungen störende Interferenzen durch freie Ionen wie Natrium und Chlorid sind bei der chromatographischen SEC-ICP-MS-Kopplung weniger problematisch. Freie Ionen werden von den Proteinen abgetrennt und eluieren im Bereich des Permeationspeaks. Gelfiltration wird deshalb allgemein zum Entsalzen als Probenvorbereitung für ICP-MS-Messungen vorgeschlagen⁸⁵. Wie in den eben genannten Beispielen gezeigt, treten die durch Natrium und Chlorid erzeugten Artefakte bei hohen Retentionszeiten in den Elementprofilen auf. Sie stören demnach die Betrachtung der Metalloproteine nicht.

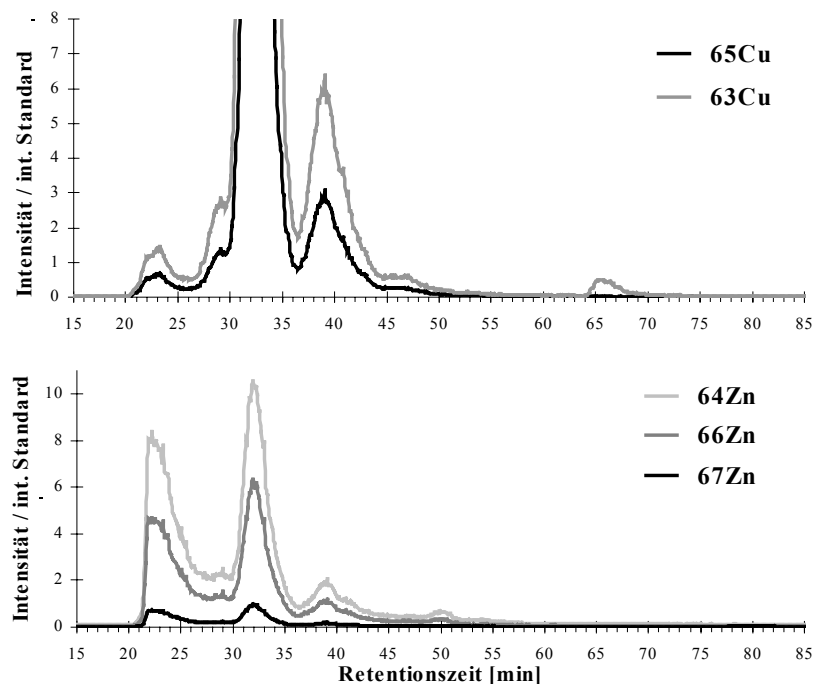


Abb. 4-5: Elementprofile der chromatographischen Trennung von Gehirncytosol (Schwein): **a)** ^{63}Cu und ^{65}Cu , **b)** ^{64}Zn , ^{66}Zn und ^{67}Zn

Zu den Proben oder dem Eluens zugesetzte Säuren wie HCl, HClO₄, H₂SO₄ oder H₃PO₄ verursachen polyatomare Interferenzen. Sie sollten für Messungen mit der ICP-MS deshalb vermieden und wenn möglich immer durch HNO₃ ersetzt werden. H, N und O geben keine zusätzlichen Interferenzen, die nicht auch schon mit reinem Wasser auftreten^{85,93}. Deshalb wurde in dieser Arbeit der pH-Wert des Puffers mit HNO₃ eingestellt.

Die Bildung von Oxiden und doppelt geladenen Ionen ist unter anderem von den Gasströmen und der Plasmaleistung abhängig⁸. Sie lassen sich durch Optimierung dieser Parameter weitestgehend minimieren (<1%) und spielen hier bei den Messungen eine untergeordnete Rolle.

Eine andere Möglichkeit, Interferenzen durch ähnliche Massen zu umgehen, wäre die Verwendung eines hochauflösenden, doppelfokussierenden ICP-MS-Gerätes. Dies gilt aber nicht für alle Interferenzen. Es würden dafür auch andere Probleme auftreten. Hochauflösende Geräte neigen z.B. zu Massendriften. Außerdem können weniger Elemente gleichzeitig gemessen werden, was eine Verwendung für die vorliegende Problemstellung ausschloß. Durch den Einsatz von Kollisionszellen in ICP-MS-Geräten lassen sich einzelne Interferenzen ausschalten. So wird zum Beispiel die Detektion von Selen auf dem Isotop ⁸⁰Se ermöglicht. Allerdings müssen die Meßparameter speziell darauf abgestimmt werden, und die Messung einer größeren Bandbreite von Elementen wird damit verhindert.

4.3.2 Optimierung der Intensitäten

Die Gasströme - insbesondere der Zerstäubergasfluß -, die Plasmaleistung, die Entfernung zwischen Plasmafackel und Sampler und die Spannungen der Ionenoptik beeinflussen das Verhältnis der Signale der Analytione zu den Clusterionen, da sie die Ionenausbeuten und Transmissionen bestimmen^{93, 8}. Diese Parameter müssen am ICP-MS-Gerät optimiert werden, um maximale Intensitäten für die detektierten Isotope zu erreichen. Dabei werden störende Interferenzen wie Oxide und doppelt geladene Ionen unterdrückt. Für die vorliegende Problemstellung sollten viele Elemente im gesamten Massenbereich gemessen werden (siehe **Tab. 4-3**). Die Optimierung konnte deshalb nicht auf ein bestimmtes Element ausgerichtet werden, sondern mußte ein Kompromiß für den großen Massenbereich sein. Dabei sollten insgesamt die höchstmöglichen Intensitäten erreicht werden, um auch Elemente mit schlechter Nachweisgrenze wie Selen und Quecksilber noch erfassen zu können.

Bei der Einstellung des Zerstäubergases gibt es zwei gegenläufige Effekte, die ein Optimum der Intensitäten bei einem bestimmten Gasfluß bewirken: Mit zunehmendem Gasfluß gelangt mehr Probensubstanz in Form von feinerem Aerosol ins Plasma, wodurch die Signalintensität zunimmt. Andererseits nimmt die Aufenthaltsdauer der Tröpfchen im Plasma und die Temperatur des Plasmas ab, was zu geringerer Ionisierung und damit niedrigeren Signalen führt. Der Zerstäubergasfluß beeinflusst auch Bildung und Zerfall von Clusterionen⁹³. Mit höherem Gasfluß nehmen z.B. die Signale von Oxiden zu, da sie weniger Zeit haben, auf dem Weg zum Massenspektrometer zu zerfallen. Dies gilt auch für einen abnehmenden Abstand zwischen Fackel und Sampler. Die doppelt geladenen Ionen verhalten sich gegenläufig. Es wurde täglich auf maximale Intensitäten, geringe Standardabweichungen und niedrige Oxidraten sowie doppelt geladene Ionen optimiert.

Ein Problem bei der Kopplung von HPLC und ICP-MS ist die Notwendigkeit der gleichzeitigen Optimierung des Trennverfahrens und der ICP-MS⁸. Wie schon in Abschnitt 4.2.2 beschrieben, mußte für die Wahl der Konzentration des Elutionspuffers die ICP-MS-Detektion berücksichtigt werden. Für die chromatographische Trennung wurde in dieser Arbeit eine präparative SEC-Säule mit einer Flußrate von 2 mL·min⁻¹ verwendet. Der Babington-Zerstäuber der ICP toleriert diese hohe Flußrate problemlos, sie entspricht jedoch nicht dem optimalen Bereich. Die Flußrate, welche den Zerstäuber erreicht, sollte deshalb für maximale Signalintensitäten optimiert werden.

Zu diesem Zweck wurde der Eluentenstrom nach der Säule über ein T-Stück geteilt und nur ein Teil dem Zerstäuber der ICP-MS zugeführt. Der Rest wurde über eine Schlauchpumpe abgepumpt. Die Abpumpgeschwindigkeit wurde im Hinblick auf maximale Signalintensitäten optimiert. **Abb. 4-6** zeigt die erreichten Intensitätssteigerungen durch den Split am Beispiel von Zink und Selen. Bei niedrigeren Flußraten nimmt die Transporteffizienz ins Plasma zu⁹⁵. Eine geringere Probenzuführung hat zusätzlich den Vorteil, daß sie den Materialeintrag ins Plasma und ins ICP-MS-System reduziert. Gerade biologische Proben mit hohen Konzentrationen an gelösten Salzen und Kohlenstoff können schnell zu Ablagerungen im Probeneinführungssystem und an den Konen führen und Instabilitäten und Drifteffekte bei den Messungen bedingen⁹⁶.

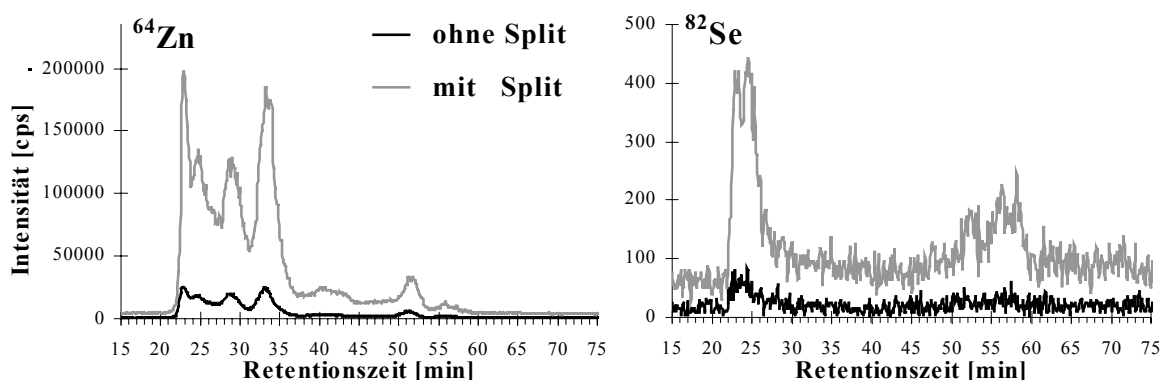


Abb. 4-6: Intensitätssteigerungen durch Reduktion der Flußrate vor dem Zerstäuber mittels Split des Eluentenstromes am Beispiel der Zink- und Selen-Profile

Der Ionisierungsgrad für Selen ist sehr gering (etwa 33%)⁹⁷. Dies wirkt sich ungünstig auf die Detektion aus, da alle Selenisotope ohnehin durch Argoninterferenzen gestört sind und nur die weniger häufigen Isotope überhaupt mit einer Quadrupol-ICP-MS (außer bei Verwendung von Kollisionszellen) detektiert werden können. Durch den schlechten Ionisierungsgrad ist das Signal-Rausch-Verhältnis noch weiter beeinträchtigt.

Allain et al.⁹⁸ haben festgestellt, daß kohlenstoffhaltige Substanzen die Signalintensitäten einiger Elemente, besonders Selen, erheblich steigern können. Es wird vermutet, daß dies durch einen Energietransfer von C⁺ zum neutralen Selen im Plasma bedingt ist⁹⁹.

Um diesen Effekt zu nutzen, wurde dem Eluens mit der internen Standardelement-Lösung nach der Säule Methanol zugeführt. Die Methanolkonzentration in der Lösung des internen Standards betrug 20%, die Endkonzentration im Eluat etwa 2%. Diese Konzentration war für die ICP-MS noch vertretbar und reichte nach Literaturangaben⁹⁷ für die Signalsteigerung aus.

4.3.3 Wahl der internen Standardelemente

Matrixinterferenzen, meistens durch hohe Salzkonzentrationen bedingt, machen sich durch verschiedene Effekte bemerkbar. Es können sich Ablagerungen im Zerstäuber, an der Fackel, auf den Konen und auf den Ionenlinsen bilden. Dies führt zu Instabilitäten, Drifterscheinungen und einer Abnahme der Signalintensitäten z.B. durch Änderung des Durchmessers der Sampleröffnung. Hohe Salzkonzentrationen bedingen außerdem Unterdrückungen oder Verstärkungen von Ionensignalen⁸⁵.

Bei den betrachteten Messungen ändert sich die Matrix - z.B. in der Proteinkonzentration - im Laufe der chromatographischen Trennung. Durch Matrixeffekte und Instrumentinstabilitäten können die detektierten Signale zeitabhängig - während eines chromatographischen Laufes und bei längeren Probenserien - variieren⁸⁷. Um dies auszugleichen, wird ein interner Standard mitgemessen, auf welchen das Signal des Analytens bezogen werden kann. Die Massenzahl des internen Standards muß der des Analytelementes möglichst ähnlich sein, da die Effekte massenabhängig sind⁸⁵. Die Ionisierungsenergien sollten ebenfalls sehr ähnlich sein. Für eine Multielementanalyse müssen demnach mehrere Standardelemente verwendet werden, die außerdem in der Probe nicht vorkommen dürfen⁸.

Dem Eluentenstrom wurde nach der Säule eine interne Standardelement-Lösung zugefügt, welche die Elemente Germanium, Rhodium⁹⁶ und Iridium enthielt. Die EPA-Methode 200.8 für Trinkwasser z.B. empfiehlt Germanium als internen Standard, da es für Arsen, Selen und Zink besser geeignet ist als Rhodium. Die Ionisierungsenergien sind ähnlicher¹⁰⁰.

Tab. 14-5 (im Anhang) zeigt die Massen und Ionisierungsenergien der gemessenen Elemente sowie der internen Standardelemente und gibt an, welches Analytelement auf welchen internen Standard bezogen wurde. Die Auswahl erfolgte nach den Kriterien von ähnlicher Masse und Ionisierungsenergie.

Bei einigen Messungen wurde festgestellt, daß das Germanium-Profil einen Peak bei der Retentionszeit $RT=22$ min aufwies, der durch eine $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}$ -Interferenz bedingt war. Diese trat jedoch nur bei Lebercytosolproben mit besonders hohen Eisen (Ferritin)-Werten auf. Für diese wenigen Proben wurde bei der Berechnung Germanium als interner Standard durch Rhodium ersetzt. Ansonsten wurde die Verwendung von Germanium als interner Standard nicht beeinträchtigt.

4.3.4 Meßparameter ICP-MS

In **Tab. 4-4** sind die verwendeten Parameter der ICP-MS aufgeführt.

Tab. 4-4: Meßparameter der Quadrupol-ICP-MS

ICP-MS:	HP 4500
Zerstäuber:	Babington mit Quarz-Scott-Sprühkammer (gekühlt)
Fackel und Injektorrohr:	Quarzglas
Konen (Sampler, Skimmer):	Nickel
Plasmagas-Fluß:	15,2 L·min ⁻¹ (Argon)
Hilfsgas-Fluß:	1 L·min ⁻¹ (Argon)
Zerstäubergas-Fluß:	0,9-1,1 L·min ⁻¹ (Argon) (jeweils optimiert)
Blend Gas-Fluß:	0,1-0,25 L·min ⁻¹ (Argon) (jeweils optimiert)

Abpumpgeschwindigkeit:	optimiert auf maximale Intensitäten
Plasmaleistung:	ca. 1200 W (jeweils optimiert)
Aufnahmezeit für alle Elemente: ^a	8,5505 s
Aufnahmezeit Chromatographielauf: ^a	5994 s (100 min)
Gemessene Isotope:	⁷ Li, ²⁴ Mg, ²⁷ Al, ³¹ P, ³⁴ S, ³⁵ Cl, ⁴² Ca, ⁵³ Cr, ⁵⁴ Fe, ⁵⁵ Mn, ⁵⁷ Fe, ⁵⁹ Co, ⁶⁰ Ni, ⁶³ Cu, ⁶⁴ Zn, ⁶⁵ Cu, ⁶⁶ Zn, ⁶⁷ Zn, ⁷² Ge, ⁷⁵ As, ⁷⁷ Se, ⁷⁹ Br, ⁸² Se, ⁸⁵ Rb, ⁸⁶ Sr, ⁹⁸ Mo, ¹⁰³ Rh, ¹⁰⁷ Ag, ¹⁰⁹ Ag, ¹¹¹ Cd, ¹¹⁴ Cd, ¹²⁷ I, ¹³³ Cs, ¹³⁸ Ba, ¹⁹³ Ir, ²⁰⁰ Hg, ²⁰⁸ Pb
Integrationszeit:	0,25 s per point (Pulsmodus) 0,1 s per point (Analogmodus) → für ³¹ P, ³⁵ Cl

^a Die Anzahl der gemessenen Isotope variierte im Laufe der Arbeit und damit auch die Zeit für die Aufnahme der Elemente. Die genannte Aufnahmezeit entspricht einer Methode mit der maximalen Anzahl gemessener Isotope (36).

Die Meßparameter der für einige Messungen verwendeten ELAN 6000- ICP-MS finden sich in **Tab. 14-6** im Anhang.

4.4 UV-Detektion

Für die UV-Detektion im Eluat nach der chromatographischen Trennung wurden die für die Detektion von Biomolekülen üblichen Wellenlängen 214 nm, 254 nm und 280 nm gewählt. 214 nm entspricht der Absorption von Peptidbindungen, 280 nm der Absorption von aromatischen Aminosäuren in Proteinen (Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin) ¹⁰¹.

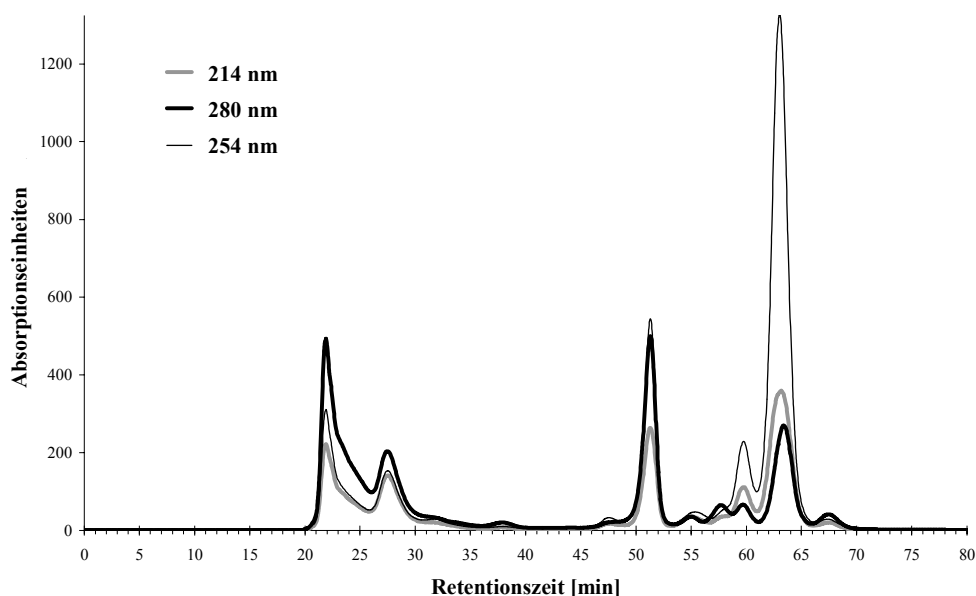


Abb. 4-7: UV-Profile bei 214 nm, 254 nm und 280 nm der chromatographischen Trennung von Gehirncytosol (Schwein)

Metallothioneine sind wegen Abwesenheit von aromatischen Aminosäuren und damit ohne Absorption bei 280 nm in einem Gemisch schwer über UV zu detektieren. Die Metall-Thiolat-Bindungen der MT weisen Charge-Transfer-Banden mit Absorptionen im Bereich von 220 bis 280 nm auf: für Zink-MT bei 225 nm, für Cadmium-MT bei 250 nm und für

Kupfer-MT bei 275 nm⁴⁸. Da die MT in natürlichen Cytosolen eine gemischte Beladung von Metallen haben, verschmieren die Banden über einen größeren Wellenlängenbereich, die Detektion wird somit zu unempfindlich. Ein großes 214 nm/280 nm-Verhältnis ist ein Hinweis auf MT, kann jedoch in einer komplexen Mischung aus UV-aktiven Substanzen meist schwer ausgemacht werden. Da die Größenausschlußchromatographie eine beschränkte Auflösung hat, können mehrere Substanzen in einem Peak eluieren und schwächer absorbierende Substanzen verdeckt werden.

Abb. 4-7 zeigt als Beispiel die UV-Profile der chromatographischen Trennung von Gehirncytosol bei 214 nm, 254 nm und 280 nm. Metallothioneine eluieren bei Retentionszeiten von 32 und 38 min (siehe Kapitel 6.1). Dies ist in den UV-Profilen ein Bereich ohne besonders starke Absorptionen. Es treten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Profilen bei den verschiedenen Wellenlängen auf. Die Anzahl der Peaks ist identisch. Nur die Intensitätsverhältnisse der Signale variieren bei den verschiedenen Wellenlängen, je nach Zusammensetzung und entsprechender UV-Aktivität der eluierenden Substanzen.

Die Untersuchung der getrennten Biomoleküle - Metalloproteine - konzentriert sich im folgenden hauptsächlich auf die Elementprofile. Die UV-Absorptionen wurden aber zur Kontrolle immer mitgemessen.

5 Probenvorbereitung: Cytosolextraktion

Der Innenraum einer eukaryotischen Zelle, die nach außen durch die Plasmamembran abgegrenzt ist, besteht aus dem Cytoplasma, welches das Cytoskelett und die Zellorganellen enthält⁹¹. Die verschiedenen Zellorganellen sind von intrazellulären Membranen umgeben und bilden damit unterschiedliche Kompartimente - abgeschlossene Reaktionsräume - in der Zelle, in denen z.B. Stoffwechselreaktionen wie die Zellatmung oder die Synthese und Reifung von mRNA und Proteinen stattfinden¹⁰². Als Cytosol wird der lösliche Teil des Cytoplasmas bezeichnet⁹¹.

In dieser Arbeit sollten Metalloproteine im Cytosol verschiedener Gewebe untersucht werden. Dafür mußte das Cytosol extrahiert und die übrigen Zellbestandteile abgetrennt werden.

5.1 Extraktion des Cytosols aus Gewebeproben

Zur Cytosolextraktion müssen zuerst die Zellen aufgeschlossen werden. Dazu wird nach der Zerkleinerung des Gewebes dieses in einem geeigneten Puffer homogenisiert, wobei die Zellen mechanisch zerstört werden. Werden dabei auch Lysosomen aufgebrochen, verschiebt sich der pH-Wert der Lösung ins Saure. Dies fördert die Aktivität der freigesetzten Proteasen, deren pH-Optimum im Säuren liegt^{103, 102}. Deshalb muß das Zell-Lysat ausreichend gepuffert sein. Der Puffer verhindert auch eine bei niedrigen Ionenstärken mögliche Proteinstabilisierung¹⁰³.

Als Homogenisierungspuffer diente Tris-Puffer. Der pH-Wert wurde mit Salpetersäure auf den physiologischen Wert von 7,4 eingestellt, da die Proteine unter möglichst nativen Bedingungen extrahiert werden sollten, um Veränderungen des natürlichen Zustandes einschließlich der Metallbeladung zu vermeiden. Salpetersäure wurde anstelle der sonst üblichen Salzsäure wegen der Anfälligkeit der ICP-MS-Detektion gegenüber Interferenzen durch Chlorid (siehe Kapitel 4.3.1)⁹³ verwendet.

Um die Oxidation von Proteinen - besonders die MT sind oxidationsempfindlich - durch im Puffer gelösten Sauerstoff zu minimieren, wurde der Puffer mit Argon entgast. Gegen Oxidation und damit Aggregation und Denaturierung der Proteine wird dem Puffer oftmals ein Reduktionsmittel zugegeben. Bei diesen Untersuchungen wurde jedoch darauf verzichtet, da der Redoxzustand der Proteine ebenfalls nicht verändert werden sollte (siehe Abschnitt 5.2 und Kapitel 10). Die Cytosolextraktion wurde zügig und unter ständiger Eiskühlung durchgeführt, um die Zersetzung der Proben durch Proteasen¹⁰² zu minimieren und eine Proteindenaturierung durch Überhitzung während des Homogenisierens¹⁰³ zu vermeiden.

Mittels Ultrazentrifugation werden die Zellmembranen und Zellorganellen bei hoher Beschleunigung sedimentiert. Der Überstand enthält das im Puffer gelöste Cytosol mit den löslichen Komponenten der Zelle (siehe Abschnitt 5.4).

Praktische Durchführung

Die Gewebeproben wurden mit einem Skalpell zerteilt. Die Gehirnproben wurden sorgfältig von der Hirnhaut und soweit wie möglich von Blutgefäßen befreit, um Kontaminationen durch im Blut befindliche Metalloproteine zu minimieren. Bei den

verschiedenen Organen war dies nicht immer durchführbar. Das Spülen der Organgewebe mit einer physiologischen Kochsalzlösung brachte keine weitere Verbesserung, da ebenfalls nur äußerlich anhaftendes Blut entfernt werden konnte. Auch längeres Einlegen in diese Lösung konnte Blutreste aus dem Inneren der Gewebestücke nicht herauslösen. Zusätzlich bestand durch längere Handhabung die Gefahr der Alterung der Proben und damit Oxidation und Denaturierung der Proteine.

Die Verdünnung durch den Homogenisierungspuffer sollte nicht zu groß sein, damit die Konzentration der Metalle für die Detektion ausreichend hoch blieb. Bei zu hoher Proteinkonzentration besteht andererseits die Gefahr des Ausfallens der Proteine¹⁰³. Außerdem können die Lösungen durch zu hohe Viskosität schlecht handhabbar sein. Zur Homogenisierung wurde 1 Massenteil Gewebe mit 2 Volumenteilen Tris-Puffer versetzt.

Die Vor-Homogenisierung von tierischen Geweben, von denen größere Mengen vorhanden waren, erfolgte in einem Haushaltsmixer. Die humanen Gewebeproben, von denen nur begrenzt Material zur Verfügung stand, wurden mittels eines Ultra-Turrax - mit einer rotierenden Schneide - vorzerkleinert. Dieses Vorgehen hatte sich besonders für zähes Gewebe wie Herzmuskel bewährt⁵. Zur Homogenisierung diente anschließend ein Potter-Elvehjem-Homogenisator - ein rotierender Teflonstempel in einem Glaszylinder. Später wurden dieser Homogenisator nur für große Gewebemengen verwendet und die humanen Proben ausschließlich mit dem Ultra-Turrax homogenisiert (siehe Abschnitt 5.2).

Die Ultrazentrifugation erfolgte bei 100000 g und 4°C für 80 min. Je nach vorhandener Menge an Homogenat wurden Ultrazentrifugationsröhrchen mit einer Kapazität von 38,5 oder 13,5 mL verwendet. Da die Röhrchen für einen Ultrazentrifugationsvorgang nahezu vollständig gefüllt sein müssen, war es notwendig, das nur in begrenzter Menge vorhandene Homogenat gegebenenfalls mit Puffer aufzufüllen. Dadurch variierte bei verschiedenen Proben die Konzentration der Proteine im Puffer durch die unterschiedlichen Verdünnungen. Für sehr kleine Mengen an Homogenat konnte die Ultrazentrifuge Beckman Optima MAX mit einem MLA-130 Rotor eingesetzt werden. Die entsprechenden Ultrazentrifugationsröhrchen hatten eine Kapazität von etwa 2 mL. Damit war die kleinste verarbeitbare Menge an Gewebe für eine noch genügend empfindliche Detektion der Metalloproteine im Cytosol mit der ICP-MS etwa 0,2 g.

Nach der Ultrazentrifugation wurde der Überstand abgenommen, wobei das oben schwimmende Fett möglichst nicht mit aufgenommen wurde. Das Cytosol wurde in 1 mL-Portionen aliquotiert, mit Argon überschichtet und bis zur Verwendung bei -25°C tiefgefroren. Vor der Messung wurde jeweils eine frische Probe aufgetaut, zur Entfettung mit Frigen versetzt (siehe Abschnitt 4.2.4) und in einer Tischzentrifuge bei 14000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die chromatographische Säule injiziert.

Da es sich bei den humanen Gewebeproben um potentiell infektiöses Material handelte, wurden entsprechende Personenschutzmaßnahmen getroffen, die verwendeten Gefäße und Geräte nach Gebrauch desinfiziert sowie der Abfall gesondert als Bioabfall entsorgt.

5.2 Optimierung der Cytosolextraktion

Die zunächst als Probenvorzerkleinerung bei zähem Gewebe durchgeführte Vor-Homogenisierung mit dem Ultra-Turrax erwies sich als ausreichend effektiv, so daß ein anschließender Homogenisierungsschritt mit dem Potter-Elvehjem-Homogenisator nicht mehr notwendig war. Um zu überprüfen, daß die erhaltenen Elementprofile sich bei den beiden Homogenisierungsverfahren nicht unterschieden, wurden verschiedene Gewebe zur Hälfte nur mit dem Ultra-Turrax und zur anderen Hälfte mit Ultra-Turrax und Potter-

Elvehjem-Homogenisator homogenisiert. Die genaue Vergleichbarkeit der erhaltenen Homogenate wurde dadurch gewährleistet, daß ein großes Stück Gewebe (6 g) verwendet, mit Tris-Puffer (12 mL) versetzt und mit dem Ultra-Turrax homogenisiert wurde. Anschließend wurde dieses Homogenat geteilt und ein Teil zusätzlich mit dem Potter-Elvehjem-Homogenisator behandelt. Beide Homogenate wurden unter den gleichen Bedingungen ultrazentrifugiert. Die erhaltenen Cytosole wurden hintereinander auf die Superdex 75PG-Säule injiziert. Wie **Abb. 5-1** am Beispiel von Kupfer und Zink zeigt, erwiesen sich die verschiedenen Elementprofile als in nahezu allen Fällen identisch. Damit wurde die Gleichwertigkeit der Homogenisierung mit dem Ultra-Turrax bestätigt. Der Vorteil dieser Probenvorbereitung sind einfachere Handhabung und schnellere Durchführbarkeit, was zur Minimierung von proteolytischen Prozessen beiträgt.

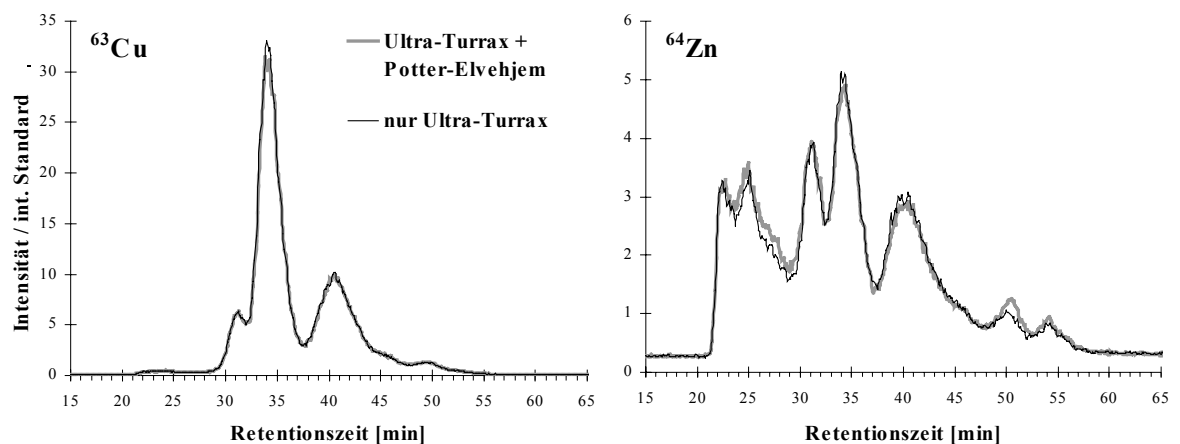


Abb. 5-1: Kupfer- und Zink-Profile der chromatographischen Trennung von humanem Gehirncytosol (frontale Region, Kontrolle) nach der Homogenisierung mit Ultra-Turrax und Potter-Elvehjem-Homogenisator bzw. ausschließlich mit dem Ultra-Turrax

Dem Homogenisierungspuffer werden oft Thiole oder Komplexbildner zugesetzt, um funktionelle SH-Gruppen vor Oxidation zu schützen^{102, 103}. Komplexbildner sollen Metallatome abfangen, welche die Oxidation von Proteinen beschleunigen können¹⁰³. Dies war mit der Zielsetzung der Untersuchung von Metalloproteinen nicht vereinbar, da eine wesentliche Veränderung der Metallbeladung zu befürchten war. Thiole wie z.B. Dithiothreitol (DTT) werden häufig bei der Cytosolgewinnung zur Untersuchung der oxidationsempfindlichen Metallothioneine verwendet. Die native Metallzusammensetzung der MT kann dabei verändert werden^{104, 57}.

In **Abb. 5-2** ist der Vergleich der Kupfer- und Zink-Profile der Trennung auf der Superdex 75PG-Säule von humanem Gehirncytosol gezeigt, welches in Tris-Puffer mit und ohne DTT homogenisiert wurde. Zur genauen Vergleichbarkeit wurde zunächst das Gehirngewebe mit wenig Puffer versetzt und mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Dieses Rohhomogenat wurde anschließend in zwei Hälften geteilt und jeweils mit Tris-Puffer aufgefüllt, so daß das übliche Verdünnungsverhältnis von 1+2 erreicht war. Dabei enthielt der Tris-Puffer der einen Hälfte einen Zusatz von DTT in einer Endkonzentration von $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Beide Hälften wurden weiter mit dem Ultra-Turrax homogenisiert, um die endgültigen Homogenate für die Ultrazentrifugation zu erhalten, welche in beiden Fällen identisch durchgeführt wurde. Ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Homogenaten ist besonders bei den Metallothionein-Peaks (siehe Kapitel 6.1) zu sehen. Mit DTT-Zusatz sind die Kupfer- und Zink-Signale erhöht. Im Zink-Profil ist außerdem

ein Signal bei einer Retentionszeit von etwa 59 min zu sehen, das dem DTT zugeordnet werden kann. DTT bindet ebenfalls Zink.

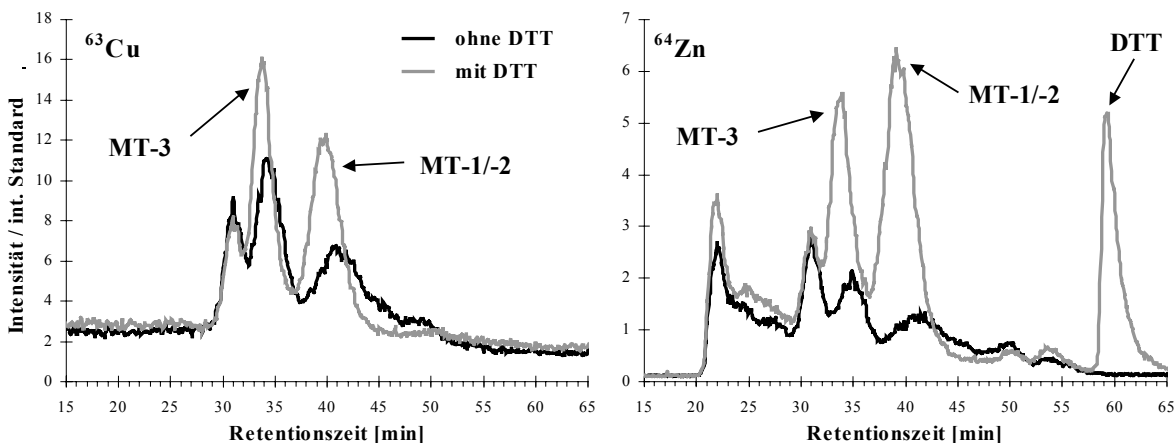


Abb. 5-2: Kupfer- und Zink-Profile der chromatographischen Trennung von humanem Gehirncytosol (frontale Region, Morbus Alzheimer), extrahiert mit und ohne DTT im Homogenisierungspuffer

Da die Metalloproteine während der Untersuchung nicht verändert werden sollten, wurde vom Zusatz von DTT zum Homogenisierungspuffer Abstand genommen. Es zeigte sich auch, daß ein Zusatz von DTT zum Cytosol nach der Extraktion den gleichen Effekt erzielte. Vergleiche zwischen den Metallbindungszuständen der Proteine mit und ohne DTT konnten demnach durchgeführt werden, ohne die Probe von vornherein endgültig zu verändern. Auf diese Untersuchungen wird in Kapitel 10 und 12.4.5 näher eingegangen.

5.3 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der Cytosolextraktion aus dem Gewebe sowie der chromatographischen Trennung bzw. Detektion der Elemente wurde überprüft. Die chromatographische Trennung an sich, gemessen an den Retentionszeiten der einzelnen Komponenten, variiert leicht mit der individuellen verwendeten Säule und dem Versuchsaufbau, d.h. der Länge der verwendeten Leitungen. **Abb. 5-1** zeigte bereits am Beispiel von Kupfer- und Zink-Profilen die Reproduzierbarkeit der Trennung und Detektion auf der gleichen Superdex 75PG-Säule.

In **Abb. 5-3** sind die Elementprofile der SEC-Trennung von Gehirncytosolen, die aus verschiedenen Schweinegehirnen gewonnen wurden, dargestellt. Dabei sind Nummer 1 und 2 am selben Tag auf der selben Säule getrennt worden, Cytosol Nummer 3 jedoch später auf einer anderen Superdex 75PG-Säule. Hier machen sich zum einen die durch die verschiedenen Säulen bedingten etwas verschobenen Retentionszeiten bemerkbar. Zum anderen wurde die zweite Säule vor der Injektion der hier betrachteten Probe schon für zahlreiche Trennungen von Cytosolen verwendet. Eine Alterung des Säulenmaterials, vermutlich durch Verstopfung der Poren, zeigt sich in einer verminderten Auflösung. Auch dadurch kann die Verschiebung der Retentionszeiten im mittleren Massenbereich bedingt sein. Dieser Effekt ist besonders im Zink-Profil zu erkennen.

Die Schwefel- und Phosphor-Profile mit Peaks im vorderen und hinteren Molmassenbereich stimmen bei den verschiedenen extrahierten Cytosolen sehr gut überein. Bei den

Eisen-Profilen sind Unterschiede in den Signalhöhen vor allem beim Hämoglobin-Peak (siehe Kapitel 6.2.3) zu sehen. Dies ist durch den bei den verschiedenen Geweben unterschiedlichen Anteil von Blutresten bedingt, welcher nicht reproduzierbar ist. Unterschiede in den Signalhöhen der Kupfer- und Zink-Profile sind auf Konzentrationsunterschiede der Proteine in den unterschiedlichen Cytosolen zurückzuführen. Die Signalmuster sind jedoch in allen Fällen vergleichbar.

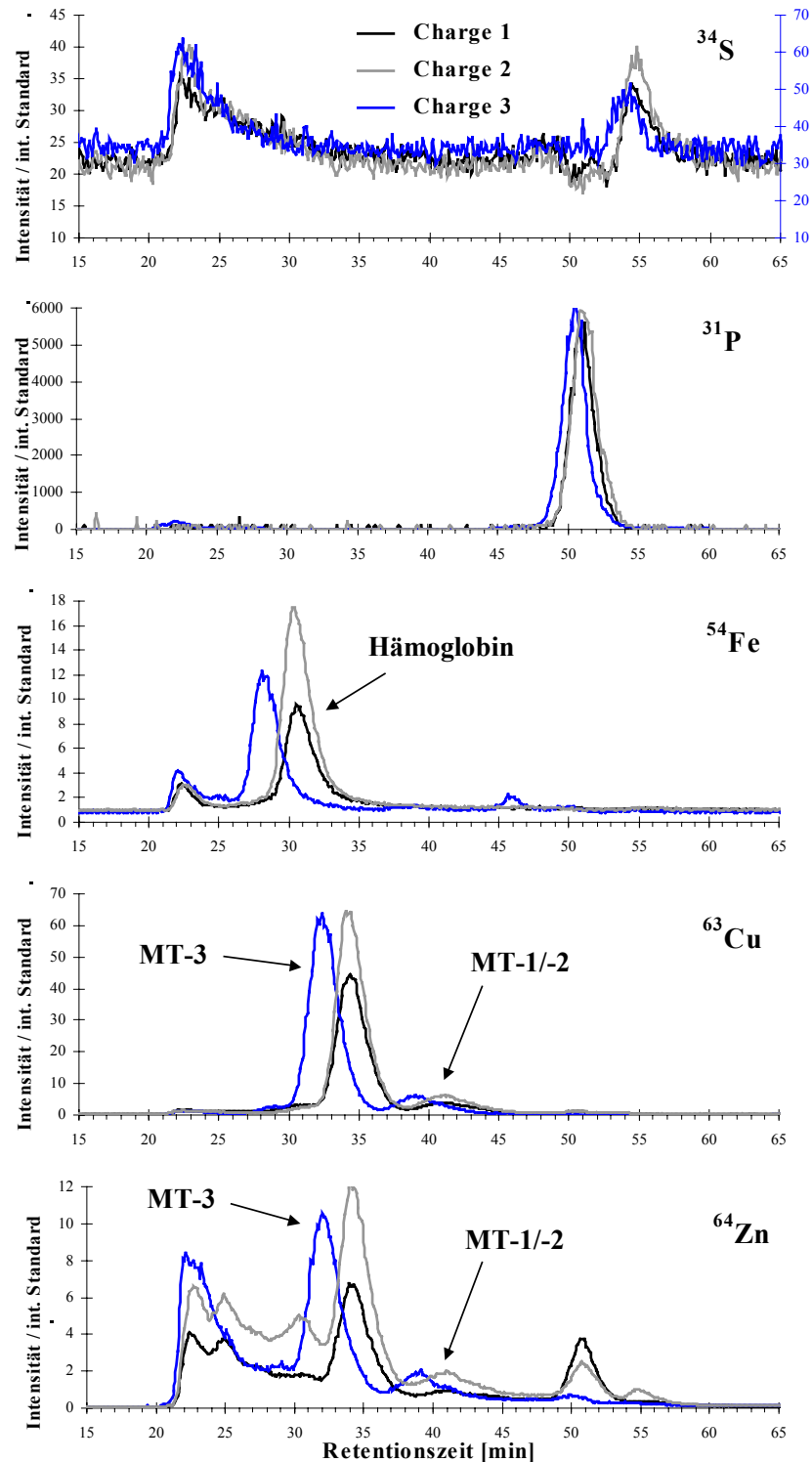


Abb. 5-3: Elementprofile der chromatographischen Trennung von Gehirncytosolen vom Schwein, extrahiert aus unterschiedlichen Gewebeproben

Die Probenalterung wurde durch sofortiges Einfrieren nach der Herstellung bei -25°C, Auftauen erst kurz vor der Messung und Kühlung der Proben während der Meßserien im Autosampler so gering wie möglich gehalten. Auch wurden einmal aufgetaute Proben nicht wiederverwendet. Proben, deren Elementprofile miteinander verglichen werden sollten, wurden am selben Tag direkt hintereinander gemessen.

5.4 Einfluß der Zentrifugationsbeschleunigung auf den gewonnenen Überstand

Die von einer Plasmamembran umgebenen eukaryotischen Zellen enthalten neben dem Zellkern eine Vielzahl von Organellen, welche wiederum durch intrazelluläre Membranen abgetrennt sind und verschiedene Funktionen wahrnehmen¹⁰²:

- der Zellkern enthält die genetische Information
- die Mitochondrien liefern durch oxidativen Abbau von Nährstoffen Energie
- das (rauhe) Endoplasmatische Retikulum - welches mit der äußeren Membran des Zellkerns verbunden ist - mit den Ribosomen und der Golgi-Apparat sind an der Proteinsynthese bzw. Proteinreifung beteiligt
- Lysosomen dienen zum Abbau beispielsweise von Makromolekülen und gealterten Zellorganellen
- Peroxisomen spielen eine wichtige Rolle bei Oxidationsprozessen im Organismus, z.B. beim Abbau von langkettigen Fettsäuren⁹¹.

Auch im Cytosol laufen eine Vielzahl von Stoffwechselreaktionen ab.

Wegen ihrer spezifischen Rollen in der Zellfunktion unterscheiden sich die verschiedenen Organellen auch in der Zusammensetzung ihrer Enzyme. Deshalb können charakteristische Enzymaktivitäten zur Bestimmung des Vorhandenseins einzelner Organellen im Sediment oder Überstand der Zentrifugation von Gewebehomogenaten herangezogen werden¹⁰⁵. Durch ihre verschiedene Gestalt und Dichte werden die Zellorganellen bei der Zentrifugation bei unterschiedlichen Beschleunigungen sedimentiert¹⁰².

Das nach der in Abschnitt 5.1 beschriebenen Extraktionsprozedur erhaltene Cytosol der zu untersuchenden Gewebe sollte näher charakterisiert werden. Bei der verwendeten Beschleunigung der Ultrazentrifuge von 100000 g wurde nur das Cytosol mit löslichen Substanzen im Überstand erwartet. Durch Zentrifugation von Gewebehomogenaten bei verschiedenen Beschleunigungen sollte geklärt werden:

- ob sich nach Zentrifugation bei 100000 g noch Zellorganellen im Überstand befanden
- ob sich durch höhere Beschleunigungen die Zusammensetzung des Überstandes änderte
- ob eine Zentrifugation bei niedrigeren, mit einer Tischzentrifuge erreichbaren Beschleunigungen ausreichend war.

Für diese Untersuchung wurden Gewebehomogenate vom Schwein bei Beschleunigungen von 100000 g und 150000 g in einer Ultrazentrifuge und von 14000 g und 20000 g in einer Zentrifuge bei 4°C für jeweils 80 min zentrifugiert. Ein weiterer Teil der Homogenate wurde bei 250000 g für 5 Stunden ultrazentrifugiert, um extreme Bedingungen zu testen. Die erhaltenen Überstände sollten mit dem Homogenat bzw. zur besseren Handhabbarkeit mit dem Überstand von bei 600 g und 4°C zentrifugiertem Homogenat verglichen werden. Vier verschiedene Gewebe wurden gewählt, um mögliche gewebebedingte Unterschiede feststellen zu können: Gehirn, Leber, Niere und Herzmuskel.

5.4.1 Bestimmung von Leitenzymen

Leitmoleküle der einzelnen Zellorganellen sind in **Tab. 5-1** aufgeführt. Bei folgenden Zentrifugalbeschleunigungen ist die Abtrennung folgender Zellorganellen zu erwarten¹⁰²:

- 600 g : Zellkerne, Cytoskelett
- 15000 g : Mitochondrien, Lysosomen, Peroxisomen
- 100000 g : Plasmamembran, Endoplasmatisches Retikulum (Fragmente), Mikrosomen
- 300000 g : Ribosomen, Viren, Makromoleküle .

Es handelt sich dabei um Richtwerte, da auch innerhalb der Organellen verschiedene Dichteverteilungen vorkommen und sie somit bei unterschiedlichen Beschleunigungen sedimentieren können¹⁰⁶.

Tab. 5-1: Leitmoleküle der verschiedenen Zellorganellen

Zellorganelle	Leitmoleküle	
Cytosol	Lactat Dehydrogenase ¹⁰²	
Lysosomen	N-Acetyl- β -D-glucoseaminidase ¹⁰²	Saure Phosphatase ¹⁰⁷
Peroxisomen	Katalase ^{102, 106}	Ureat Oxidase ¹⁰⁷
Mitochondrien	Succinat Dehydrogenase ^{102, 106}	Cytochrom C Oxidase ¹⁰²
Plasmamembran	5'-Nucleotidase ¹⁰⁶	γ -Glutamyltransferase ¹⁰⁸
Endoplasmatisches Retikulum, Mikrosomen	NADPH Cytochrom C Reduktase ¹⁰⁶	Glucose-6-Phosphatase ¹⁰²
Golgi-Apparat	α -Mannosidase II ¹⁰²	Galactosyltransferase ¹⁰⁶
Ribosomen	rRNA ^{102, 106}	
Zellkern	DNA ^{102, 106}	

In den nach unterschiedlichen Beschleunigungen gewonnenen Überständen der verschiedenen Gewebe wurden exemplarisch die Enzymaktivitäten der Sauren Phosphatase (Lysosomen), der γ -Glutamyltransferase (Plasmamembran), der Katalase (Peroxisomen) und der Lactat Dehydrogenase (Cytosol) gemessen. Außerdem wurde jeweils der Proteingehalt bestimmt. Die photometrischen Messungen wurden nach den Vorschriften der verwendeten Enzymtests der Firma Sigma durchgeführt. Katalase wurde entsprechend dem Verfahren von H. Aebi¹⁰⁹ gemessen.

In **Abb. 5-4** sind die erhaltenen Enzymaktivitäten bzw. Proteingehalte bezogen auf den Wert im 600 g-Überstand dargestellt. Das reine Homogenat hatte sich für die Messung der Enzymaktivitäten wegen schlechter Handhabbarkeit als ungeeignet erwiesen.

Wie erwartet nahm der Proteingehalt in den Überständen mit höheren Beschleunigungen ab, wobei die stärkste Abnahme bei der Beschleunigung von 250000 g erfolgte, bei der auch Makromoleküle abgetrennt werden¹⁰² (siehe **Abb. 5-4 a**).

Die Lysosomen sollten schon bei 14000 g abgetrennt sein. In **Abb. 5-4 b** sind jedoch bei den Überständen von 14000 g bis 150000 g die Aktivitäten des Leitenzyms Saure Phosphatase (Enzyme Commission number system EC 3.1.3.2) vergleichbar und gegenüber dem Überstand bei 600 g nicht wesentlich erniedrigt. Beim Gehirn ist noch der größte Unterschied erkennbar. Dies kann zum einen an Minderbefunden durch Ungenauigkeit der Messung im 600 g-Überstand liegen. Dieser wies noch Inhomogenitäten und feste Strukturen auf und ließ sich in den kleinen benötigten Volumina nur ungenau pipettieren. Zudem ist die Bestimmung von Enzymaktivitäten in

Homogenaten durch die Anwesenheit von zahlreichen Enzymen wie den Hydrolasen allgemein problematisch¹⁰⁵.

Es ist anzunehmen, daß ein Teil der empfindlichen Lysosomen bei der Gewebeaufarbeitung geplatzt ist¹¹⁰ und die enthaltenen Enzyme in die Zellflüssigkeit abgegeben wurden. Diese Enzyme wurden dann nicht sedimentiert und sind deshalb in allen Überständen in gleicher Konzentration nachweisbar. Zumindest ein Teil der Lysosomen wurde aber durch Zentrifugation wie erwartet ab einer Beschleunigung von 14000 g abgetrennt. Die besonders niedrigen Aktivitäten in den Überständen von 250000 g zeigen, daß bei dieser Beschleunigung der Ultrazentrifuge auch schon Proteine sedimentieren.

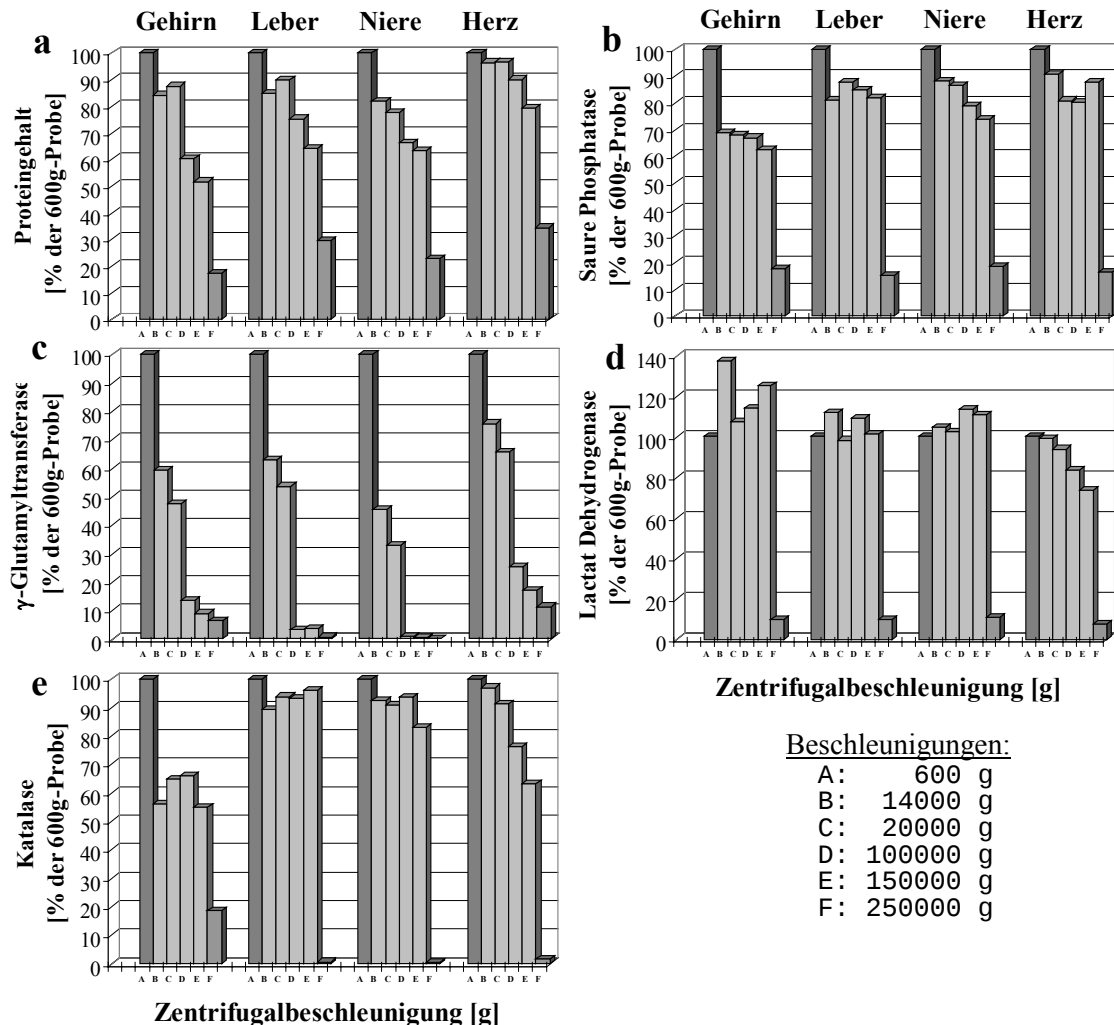


Abb. 5-4: Leitenzyme für verschiedene Zellorganellen in den Überständen der Zentrifugation von Homogenaten aus Gehirn, Leber, Niere und Herzmuskel vom Schwein bei unterschiedlichen Beschleunigungen, **a)** Proteingehalt, **b)** Saure Phosphatase (Lysosomen), **c)** γ -Glutamyltransferase (Plasmamembran), **d)** Lactat Dehydrogenase (Cytosol), **e)** Katalase (Peroxisomen)

Die γ -Glutamyltransferase (EC 2.3.2.2) ist ein Leitenzym der Plasmamembran. **Abb. 5-4 c** zeigt die gemessenen Aktivitäten in den verschiedenen Überständen. Wie erwartet erfolgt die größte Abnahme der Aktivität in den Überständen ab einer Beschleunigung von 100000 g, bei der die Plasmamembranen sedimentieren. Die relative Abnahme der

Enzymaktivität macht sich besonders deutlich bei Leber und Niere bemerkbar. Allerdings wird eine niedrigere Aktivität auch schon in den Überständen der Beschleunigungen von 14000 g und 20000 g gemessen. Wahrscheinlich sedimentieren bei diesen Zentrifugalbeschleunigungen ganze Plasmamembranen, bei höheren Beschleunigungen dagegen kleinere Bruchstücke. Beim Gehirn und Herzmuskel fällt auf, daß ein relativ großer Anteil der Enzymaktivität auch bei Beschleunigungen von 100000 g und höher erhalten bleibt. Dies kann auf eine andere Beschaffenheit der Membranen hinweisen, bei denen sich kleinere Bruchstücke bilden, welche schwerer sedimentieren.

Es ist bekannt, daß die Sedimentationseigenschaften von Plasmamembranen sehr unterschiedlich sind. Die Größe der Fragmente in unterschiedlichen Geweben aber auch innerhalb eines Homogenates weist eine breite Variation auf. Diese sedimentieren deshalb bei verschiedenen Beschleunigungen - zusammen mit den Zellkernen, mit den Mikrosomen oder irgendwo dazwischen ¹⁰⁶.

Schließlich wurde die Aktivität des Leitenzyms des Cytosols, der Lactat Dehydrogenase (EC 1.1.1.27, ca. 145000 g·mol⁻¹), gemessen. **Abb. 5-4 d** zeigt, daß die Aktivität in den Überständen der Zentrifugationen bei 600 g bis 150000 g - im Rahmen der Meßgenauigkeit - wie erwartet vergleichbar ist. Nur bei 250000 g wird wieder eine deutliche Abnahme der Aktivität verzeichnet, da bei dieser Beschleunigung auch die Lactat Dehydrogenase sedimentiert.

Die Katalase (EC 1.11.1.6) ist ein wichtiges Antioxidans im Organismus. Sie zersetzt das bei aeroben Stoffwechselprozessen, vor allem unter Beteiligung von Oxidasen in den Peroxisomen, gebildete Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff⁹¹. Die Katalase befindet sich in den Geweben deshalb in den Peroxisomen, für die sie als Leitenzym verwendet wird. Sie hat eine Molmasse von 240000 g·mol⁻¹ und ist ein Häm-Protein mit 4 Ferriprotoporphyrin-Gruppen. Sie kommt in den Geweben in den höchsten Konzentrationen in Leber und Niere vor. Erythrozyten enthalten Katalase in sehr hoher Konzentration. Hier liegt sie in freier Form vor und schützt - zusammen mit der Glutathion Peroxidase - das Hämoglobin vor Oxidation ¹⁰⁹.

Bei der Zentrifugation der Gewebehomogenate wurde eine Abtrennung der Katalase mit den Peroxisomen ab einer Beschleunigung von 14000 g erwartet. Die gemessene Aktivität war hier jedoch in den verschiedenen Überständen gleich hoch - mit Ausnahme des 250000 g-Überstandes, der wieder eine sehr niedrige Aktivität aufwies (siehe **Abb. 5-4 e**). Nur beim Gehirn war ein deutlicherer Unterschied im Vergleich zum 600 g-Überstand zu erkennen. Diese Effekte können möglicherweise - wie bei der Sauren Phosphatase - auf Minderbefunde im 600 g-Überstand zurückgehen. Sie könnten auch durch aus geplatzten Peroxisomen in die Zellflüssigkeit freigesetzte Katalase verursacht werden, obwohl Peroxisomen stabiler als Lysosomen sind, zumindest gegenüber Einfrieren und Auftauen ¹⁰⁵. Die Katalase ist andererseits stark konzentriert und frei in den Erythrozyten zu finden. In den untersuchten Geweben befanden sich immer Blutreste. Deshalb besteht die Möglichkeit, daß die vorhandene oder nicht vorhandene Aktivität der Gewebe-Katalase durch höhere Konzentrationen der Erythrozyten-Katalase verdeckt wird. Dafür spricht, daß sich am Gehirngewebe weniger Blutreste befanden als an den anderen Geweben. In den Überständen der Zentrifugationen des Gehirngewebes sollte demnach die Gewebe-Katalase in geringerem Maße durch Erythrozyten-Katalase verdeckt werden. Dies entspricht dem Ergebnis der Messungen, bei denen eine deutlichere Abnahme der Katalase-Aktivität ab 14000 g bei den Gehirn-Überständen zu verzeichnen war, was auf eine Abtrennung der katalasehaltigen Peroxisomen hinweist.

Da sich in jedem Fall Katalase - aus Gewebe oder Erythrozyten - im 100000 g-Cytosol befände, wurde in den Fraktionen der chromatographischen Trennung auf der Superdex 75PG-Säule ebenfalls die Katalase-Aktivität gemessen (siehe auch Kapitel 6.2). Ein Katalase-Aktivitätsmaximum sollte dann mit einem Eisen-Peak im Elementprofil übereinstimmen. Dies war jedoch nicht der Fall. Das gemessene Aktivitätsmaximum bei einer Retentionszeit von etwa 23 min entsprach keinem definierten Eisen-Signal (**Abb. 5-5**). Dafür stimmte dieses Maximum genau mit einem Selen-Peak überein, und zwar mit dem Peak, der als Glutathion Peroxidase identifiziert wurde (siehe Kapitel 6.2.6). Glutathion Peroxidase reduziert Peroxide und setzt somit das für den Katalase-Nachweis verwendete Wasserstoffperoxid um. Die Katalase-Aktivität scheint demnach durch die Glutathion Peroxidase-Aktivität überdeckt zu werden, welche löslich im Cytosol vorkommt. Im gemessenen Enzymaktivitätsprofil in **Abb. 5-5** tritt auch eine Schulter bei einer Retentionszeit von etwa 24 min auf. Dies entspricht der Retentionszeit eines Einzellaufes von Katalase (siehe **Abb. 6-14**). Der im Eisen-Profil zu erwartende Katalase-Peak wird jedoch anscheinend vom stark eisenhaltigen Ferritin-Signal überlagert. Insgesamt kann angenommen werden, daß die Katalase enthaltenden Peroxisomen - zumindest teilweise - bei der Zentrifugation ab 14000 g abgetrennt wurden. Durch Überlagerung der Messungen mit aus Erythrozyten stammender Katalase und der Glutathion Peroxidase können jedoch keine genauen Aussagen getroffen werden. In den Eisen-Profilen ist kein getrennter Katalase-Peak sichtbar.

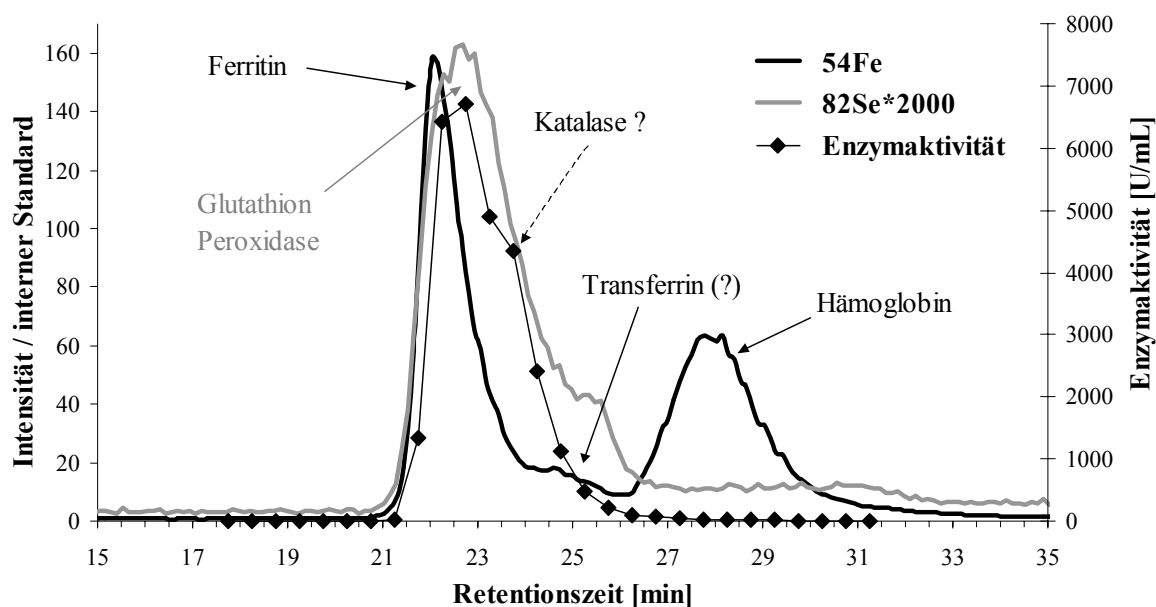


Abb. 5-5: Bestimmung der Katalase-Aktivität in Fraktionen der chromatographischen Trennung von Lebercytosol (Schwein) auf der Superdex 75PG-Säule und Vergleich mit den Eisen- und Selen-Profilen

In **Tab. 5-2** sind die gemessenen Enzymaktivitäten in den Überständen der Zentrifugation bei 600 g aufgeführt. An der Beschaffenheit der Überstände war zu erkennen, daß sich bei Leber und Niere mehr suspendierte Feststoffe im Überstand befanden.

Leber und Niere enthalten besonders viele Lysosomen¹⁰⁷, wie auch die gemessene Aktivität der Sauren Phosphatase zeigte. Für die Plasmamembranen wurde anhand der γ -Glutamyltransferase für die Niere ein besonders hoher Wert festgestellt, was den Literaturangaben entspricht¹¹¹. Auch der Leber-Überstand wies eine deutlich höhere

Aktivität als Gehirn und Herzmuskel auf. Der Cytosolmarker Lactat Dehydrogenase zeigte nur im Überstand des Herzmuskelgewebes eine höhere Aktivität als bei den anderen Organen. Die gemessene Katalase-Aktivität, bzw. die diese überdeckende Glutathion Peroxidase-Aktivität, war in der Leber besonders ausgeprägt, gefolgt von der Niere. Die niedrigste Aktivität wurde im Gehirn nachgewiesen.

Insgesamt zeigen sich demnach deutliche Unterschiede in den Enzymaktivitäten unterschiedlicher Organe. Höhere Aktivitäten finden sich vor allem in Leber und Niere.

Tab. 5-2: Gemessene Leitenzymaktivitäten und Proteingehalt in den Überständen der Zentrifugation von verschiedenen Gewebehomogenaten (Schwein) bei 600 g

		Gehirn	Leber	Niere	Herzmuskel
Proteingehalt	[g·L ⁻¹]	18	68	43	21
Saure Phosphatase ^a	[U·L ⁻¹]	80	780	560	180
γ-Glutamyltransferase ^b	[U·L ⁻¹]	120	2000	18000	70
Lactat Dehydrogenase ^c	[U·mL ⁻¹]	30	28	52	210
Katalase ^{d, e}	[U·mL ⁻¹]	220	106000	17000	1030

Leitenzyme für: ^a Lysosomen, ^b Plasmamembranen, ^c Cytosol, ^d Peroxisomen;

^e Werte überlagert von der Glutathion Peroxidase

Durch die Bestimmung der Leitenzyme konnten die Überstände, welche durch Zentrifugation der Gewebehomogenate bei unterschiedlichen Beschleunigungen gewonnen wurden, bezüglich der enthaltenen Zellorganellen charakterisiert werden. Der nächste Schritt war die Ermittlung der in den verschiedenen Überständen enthaltenen Metalloproteine mittels SEC-ICP-MS-Messungen.

5.4.2 Chromatographische Trennung der verschiedenen Überstände

Die aus den verschiedenen Gewebehomogenaten durch Zentrifugation bei unterschiedlichen Beschleunigungen erhaltenen Überstände wurden zur chromatographischen Trennung auf die Superdex 75PG-Säule aufgegeben. Die dabei erhaltenen Elementprofile sollten verglichen werden, um mögliche Unterschiede in Art und Gehalt der in den Überständen vorhandenen Metalloproteine festzustellen.

In **Abb. 5-6** sind die Profile von Schwefel, Kupfer, Zink und Eisen für Gehirnproben bzw. die Überstände des Herzmuskelgewebes verglichen. Die reinen Homogenate sowie die Überstände der 600 g-Zentrifugation konnten wegen des hohen Feststoffanteils nicht auf die Säule injiziert werden. Die 14000 g- und 20000 g-Überstände mußten vor der chromatographischen Trennung filtriert werden (0,45 oder 0,2 µm Spritzenfilter, Chromafil Typ A-20/25, Machery & Nagel, Düren, Deutschland), um die Säule bzw. den Vorsäulenfilter nicht zu verstopfen. Eine dadurch bedingte mögliche Veränderung der Proben konnte nicht verhindert werden. Es war technisch nicht möglich, die noch suspendierten Organellen/Bruchstücke mittels SEC-ICP-MS auf gebundene Elemente zu untersuchen.

Besonders deutlich war in allen Elementprofilen die Abnahme der Signale von höhermolekularen Peaks im Überstand der Ultrazentrifugation bei 250000 g zu erkennen. Wie schon bei der Messung des Proteingehaltes und der Leitenzymaktivitäten festgestellt, wurden bei dieser Beschleunigung einzelne Makromoleküle sedimentiert. Dabei handelt es sich um höhermolekulare Proteine ab einer Molmasse von ungefähr 30000 g·mol⁻¹, wie eine Abschätzung über die Retentionszeiten in den Elementprofilen ergab.

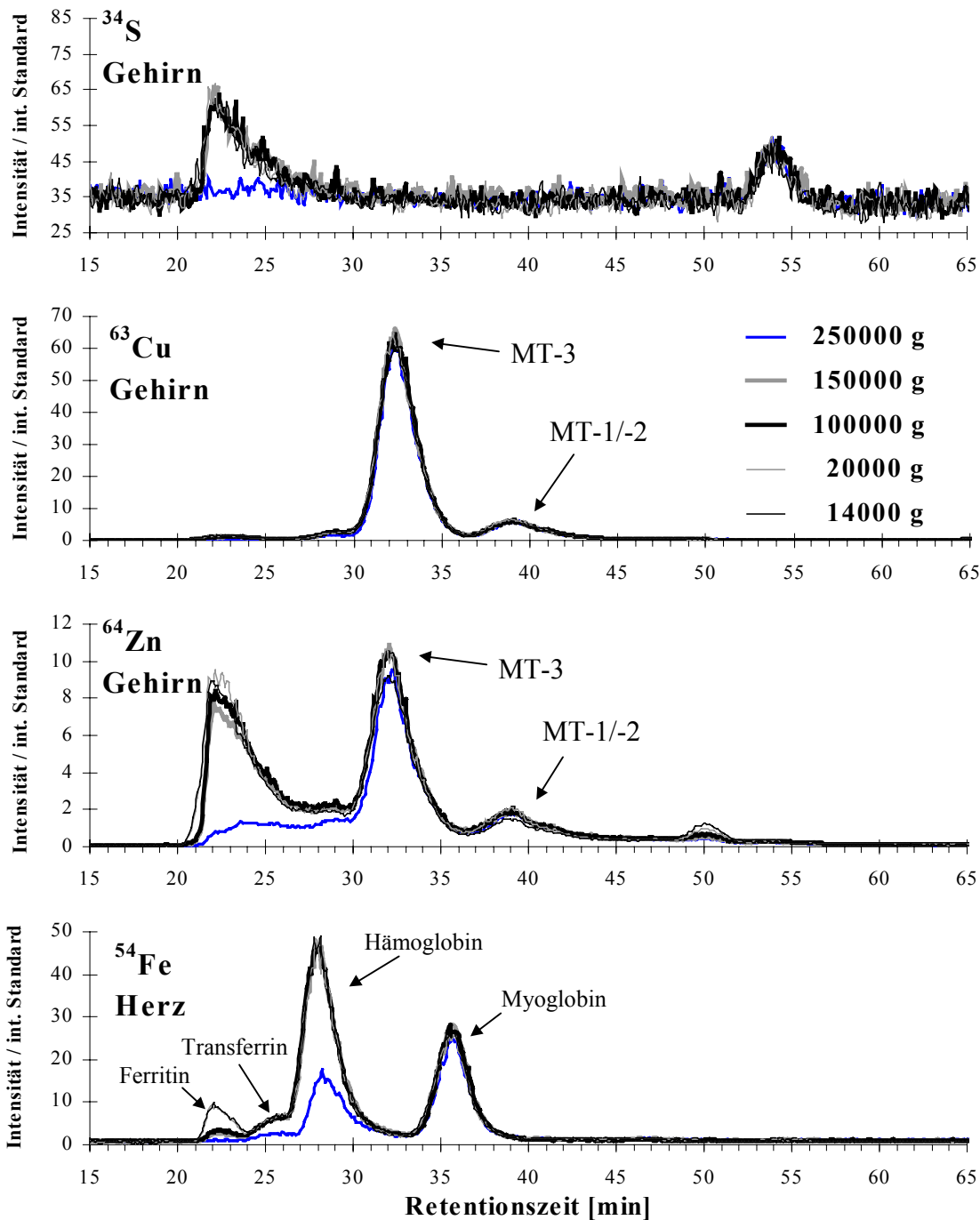


Abb. 5-6: Elementprofile der chromatographischen Trennung der Überstände der Zentrifugation von Homogenaten aus Gehirn und Herzmuskel vom Schwein bei unterschiedlichen Beschleunigungen

Des weiteren war eine Abnahme von Signalen abgestuft nach den eingesetzten Beschleunigungen zu beobachten. In **Abb. 5-6** wird dies am Eisen-Profil deutlich: Der Ausschlußpeak bei einer Retentionszeit von etwa 22 min, der Ferritin enthält (siehe Kapitel 6.2.2), ist bei den 14000 g und 20000 g-Überständen am höchsten. Bei 100000 g und 150000 g ist das Signal deutlich niedriger. Bei diesen Beschleunigungen wurden einige Zellorganellen mit anhaftenden Proteinen und Metallen abgetrennt. Beim 250000 g-

Überstand wurden schließlich die im Ausschlußpeak befindlichen, eisenhaltigen hochmolekularen Proteine fast vollständig sedimentiert.

Die Signale im Eisen-Profil bei etwa $RT=25,5$ min und $RT=28,5$ min, die Transferrin und Hämoglobin entsprechen (siehe Kapitel 6.2.5 und 6.2.3), sind nur bei einer Zentrifugalbeschleunigung von 250000 g erniedrigt. Dabei handelt es sich demnach um nicht an Organellen gebundene einzelne Proteine, die nur bei sehr hohen Beschleunigungen sedimentieren. Das Eisen-Signal bei $RT=36$ min - Myoglobin (siehe Kapitel 6.2.4) - ist in allen Überständen gleich hoch. Selbst eine Beschleunigung von 250000 g reichte nicht aus, um dieses Protein mit einer Molmasse von $17000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ abzutrennen.

Die Kupfer- und Zink-Signale der Metallothioneine - MT-3 bei $RT=32$ min und MT-1/-2 bei $RT=39$ min (siehe Kapitel 6.1.3) - waren bei allen untersuchten Überständen nahezu unbeeinflusst.

Die Elementprofile der Überstände der Zentrifugationen bei 100000 g und 150000 g sowie bei 14000 g und 20000 g waren jeweils gleich.

Für die Untersuchung des Cytosols ist demnach eine Ultrazentrifugation bei 100000 g ausreichend. Die Zentrifugation bei 250000 g wurde getestet, um zu sehen, ob erst bei dieser Beschleunigung alle vorhandenen Organellen abgetrennt werden. Sie erwies sich jedoch für die Untersuchung von Metalloproteinen als ungeeignet, da in diesem Fall auch höhermolekulare Proteine sedimentierten.

Die Überstände bei Beschleunigungen von 14000 g und 20000 g, die auch schon mit einer einfachen Tischzentrifuge erreicht werden können, waren ebenfalls nicht geeignet. Durch den noch vorhandenen suspendierten Feststoffanteil war eine chromatographische Trennung nicht möglich. Um die Trennsäule nicht zu verstopfen, mußte die Lösung erst filtriert werden, was besonders bei den hohen Feststoffanteilen von Leber und Niere nicht unproblematisch war.

Insgesamt hat sich demnach für die Untersuchung von Metalloproteinen mittels HPLC-ICP-MS das nach einer Ultrazentrifugation von Gewebehomogenaten bei einer Beschleunigung von 100000 g erhaltene Cytosol als geeignet erwiesen. Es konnte durch die Messung von Leitenzymen charakterisiert werden. Der Cytosolmarker war in den unterschiedlichen untersuchten Geweben in vergleichbarer Konzentration vorhanden, nur beim Herzmuskel war die Konzentration geringfügig höher. Plasmamembranen wurden bei 100000 g abgetrennt. Auch die Lysosomen sollten abgetrennt sein. Das im Cytosol nachgewiesene Leitenzym Saure Phosphatase wies jedoch auf bei der Cytosolextraktion zerstörte Lysosomen hin. Die freigesetzten Hydrolasen können die Haltbarkeit der Proben beeinträchtigen. Sie sind besonders bei niedrigen pH-Werten aktiv. Dem wurde durch Pufferung des Cytosols entgegengewirkt. Auch wurden die Proben sofort nach der Cytosolextraktion bei -25°C eingefroren. Über das Vorhandensein von Peroxisomen bzw. von Peroxisomen-Enzymen im Cytosol konnte wegen der Störung des Katalase-Nachweises durch Glutathion Peroxidase und Erythrozyten-Katalase keine genau Aussage getroffen werden. In den Eisen-Profilen konnte die Katalase auf jeden Fall nicht ausgemacht werden, sie wurde deshalb bei den durchgeführten Untersuchungen von Metalloproteinen mittels ICP-MS-Detektion nicht weiter betrachtet.

Die verwendete Methode der chromatographischen Trennung mit on-line-Elementdetektion schränkt die Untersuchung von Metalloproteinen auf im Cytosol lösliche Proteine ein und zeigt nur einen Ausschnitt der in einer Zelle vorhandenen Proteine. Die Vergleichbarkeit der Elementprofile verschiedener Proben ist jedoch durch die Durchführung einer einheitlichen Probenaufarbeitung sichergestellt.

6 Identifizierung von Signalen in den Elementprofilen

Für einen Vergleich der Elementverteilungen zwischen unterschiedlichen Proteinen in Gewebecytosolen und um Rückschlüsse auf physiologische Prozesse zu ermöglichen, mußten zunächst die Signale in den Elementprofilen der chromatographischen Trennung identifiziert und einzelnen metallbindenden Proteinen zugeordnet werden. Dafür wurden folgende Herangehensweisen verwendet:

- Betrachtung der gebundenen Metalle
- Ausnutzung charakteristischer Eigenschaften:
Hitzestabilität und Metallbindungskapazität der MT
- Vergleich mit Referenzproteinen
- Bestimmung der Molmasse
- Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung
- Enzymaktivität
- Antikörper-Antigen-Reaktion.

Der erste Schritt war die Betrachtung der einzelnen Elementprofile und die Recherche von in den Organen in Frage kommenden Metalloproteinen. Besondere Eigenschaften der Proteine wie z.B. die Hitzestabilität der Metallothioneine wurden für eine Identifizierung herangezogen. Kommerziell erhältliche, einzelne Metalloproteine wurden im folgenden unter den gleichen Bedingungen wie die Cytosolproben auf der verwendeten Superdex 75PG-Säule getrennt. Die Retentionszeiten der Einzelläufe wurden mit den Signalen in den Elementprofilen der Cytosole verglichen, um einen Hinweis auf die Identität der Peaks zu bekommen. Wegen der verschiedenen Matrices oder der Verwendung von Einzelproteinen, die von unterschiedlichen Spezies stammten, mußten mögliche Abweichungen der Retentionszeiten in Betracht gezogen werden. Die Bestimmung der Molmasse der Proteine durch massenspektrometrische Verfahren oder die Analyse der Aminosäurezusammensetzung in aufgefundenen Fraktionen der chromatographischen Trennung der Cytosolproben waren weitere wichtige Hinweise zur Identität. Für eine sichere Identifizierung sollten die Metalloproteine in den Fraktionen der chromatographischen Trennungen mit spezifischen Methoden bestimmt werden. Dafür eignete sich im Fall von Enzymen die Bestimmung der Enzymaktivität und allgemein der Nachweis mit immunochemischen Methoden - über ELISA, Western Blot oder turbidimetrisch -, welche die höchst spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion nutzen.

6.1 Metallothioneine

MT existieren in verschiedenen Isoformen - MT-1, MT-2, MT-3 und MT-4 - und Subisoformen. MT-3 wurde speziell aus dem Gehirn isoliert. Charakteristische Eigenschaften der Metallothioneine (siehe Kapitel 2.1.2) können zur Identifizierung der MT-Peaks in den Elementprofilen der chromatographischen Trennungen herangezogen werden: Metallothioneine binden die Metallionen von Zink, Kupfer, Cadmium, Blei, Silber und Quecksilber, wobei die verschiedenen Metalle unterschiedlich stark gebunden werden und z.B. Zink leicht durch Cadmium verdrängt wird. MT sind hitzestabil. Sie haben jedoch

keine bekannte enzymatische Funktion, so daß sie nicht über eine Enzymaktivität nachgewiesen werden können^{48, 41}.

Im folgenden werden die einzelnen Schritte zur Identifizierung der MT-Signale in den Elementprofilen beschrieben. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf MT-3.

6.1.1 Bindung von Metallen am Metallothionein

Der erste Schritt zur Identifizierung von MT-Signalen in den Elementprofilen der chromatographischen Trennungen von Cytosolproben war die Suche nach koelutierenden Peaks der Metalle Zink, Kupfer, Cadmium, Blei, Silber und Quecksilber. Quecksilber lag bei der Elementdetektion mittels ICP-MS nahe der Nachweisgrenze, so daß nur bei einigen Proben erkennbare Signale ausgemacht werden konnten.

Abb. 6-1 zeigt die Elementprofile von humanem Gehirncytosol. Es treten zwei Peaks auf, welche die Elemente Zink, Kupfer, Cadmium, Blei und Silber enthalten: bei 32 min und 38 min. Dies kann als erster Hinweis auf die Identität dieser Peaks als MT gewertet werden¹¹².

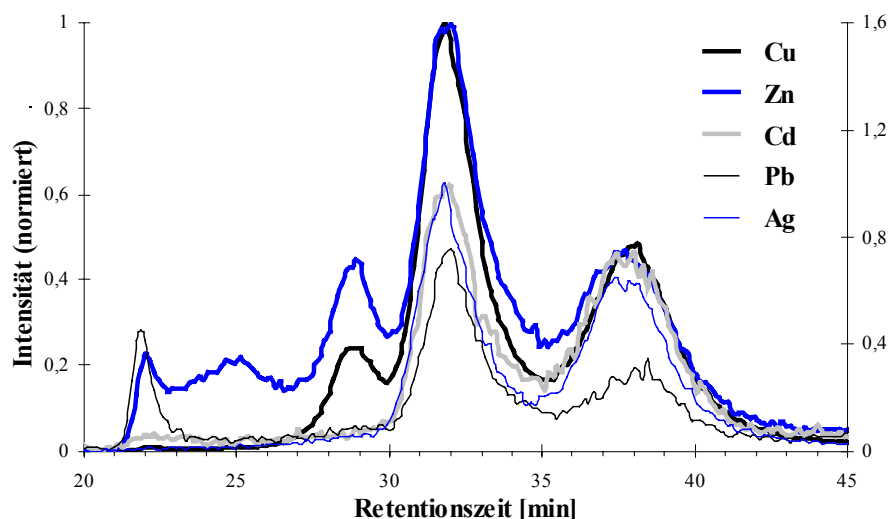


Abb. 6-1 : Koelution von Signalen in den Kupfer-, Zink-, Cadmium-, Blei- und Silber-Profilen der chromatographischen Trennung von humanem Gehirncytosol (Kleinhirn, Kontrolle, Zusatz von DTT); linke Ordinate: Kupfer, Zink, rechte Ordinate: Cadmium, Blei, Silber

6.1.2 Hitzestabilität und Cadmiumbeladung

Cytosolproben vom Gehirn wurden einer Hitzedenaturierung im Wasserbad bei 95 °C für 5 min unterzogen. Anschließend wurden die Proben bei 14000 g zentrifugiert, um ausgefallene Proteine abzutrennen. Der Überstand wurde unter den gleichen Bedingungen wie zuvor ohne Hitzedenaturierung auf der Superdex 75PG-Säule chromatographisch aufgetrennt. Da Metallothioneine hitzestabil sind, sollten die vermuteten MT-Peaks an gleicher Stelle in den Elementprofilen zu finden sein.

Abb. 6-2 zeigt den Vergleich der Kupfer- (a), Zink- (b) und Cadmium-Profile (c) von humanem Gehirncytosol mit und ohne Hitzedenaturierung. Die vermuteten MT-Peaks befinden sich hier bei Retentionszeiten von ca. 36 min und 41,5 min. Abweichungen der Retentionszeiten bei den dargestellten Trennungen - z.B. im Vergleich zu **Abb. 6-1** - sind durch die Verwendung unterschiedlicher Superdex 75PG-Säulen sowie kleiner Veränderungen beim Versuchsaufbau bedingt.

Die fraglichen MT-Peaks erwiesen sich tatsächlich als hitzestabil, ein weiterer Hinweis auf ihre Identität ¹¹².

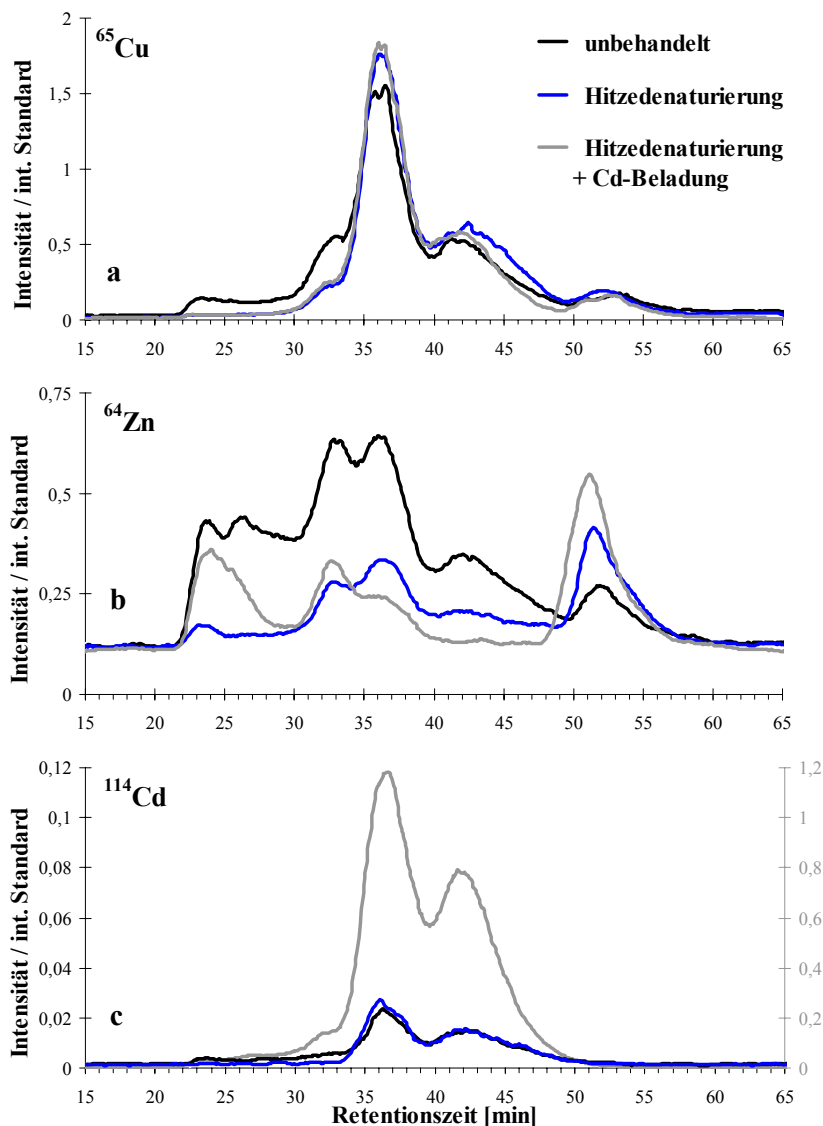


Abb. 6-2 : Hitzestabilität und Cadmiumbeladung von Metallothioneinen in humanem Gehirncytosol (Kleinhirn, Kontrolle), **a)** Kupfer-, **b)** Zink-, **c)** Cadmium-Profile der chromatographischen Trennung (geglättet)

Höher molekulare Komponenten hingegen nahmen bei der Hitzedenaturierung ab (siehe **Abb. 6-2 a** und **b**). Das bei der Denaturierung dieser Komponenten - z.B. der Superoxid Dismutase bei RT=32,5 min (siehe Kapitel 6.2.1), die nur bis etwa 75 °C hitzestabil ist ¹¹³ - freigesetzte Kupfer wird von den MT offensichtlich unter Verdrängung von gebundenem Zink aufgenommen. Dies bedingt die Abnahme der Zink-MT-Signale nach der Hitzedenaturierung (**Abb. 6-2 b**) ^{104, 69}. Das dort freigesetzte Zink scheint in dem Peak

einer niedermolekularen, unspezifisch metallbindenden Verbindung bei RT=51 min zu eluieren.

Zur weiteren Identifizierung wurde ein Schwermetallsättigungsverfahren durchgeführt⁶⁶. Die hitzedenaturierten Proben wurden mit einer $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ CdCl_2 -Lösung (Merck) 5-10 min inkubiert ($800 \mu\text{L}$ Cytosol + $15 \mu\text{L}$ Cd-Lösung). Das Cadmium sollte gebundenes Zink aus den MT verdrängen. Anschließend wurden $150 \mu\text{L}$ einer 60%igen Chelex 100-Aufschlammung in Tris-Puffer ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, äquilibriert auf $\text{pH}=7,4$) zugegeben, um überschüssiges und damit nicht von den MT gebundenes Cadmium zu entfernen. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde das Chelex 100 bei 14000 g abzentrifugiert und der Überstand wieder auf die Superdex 75PG-Säule aufgegeben^{69,66}. Da nach dem Lauf mit cadmiumbeladenem Cytosol Cadmiumkontaminationen auf der Säule zurückbleiben können, muß diese anschließend zur Reinigung mit Zitronensäure gespült und erneut mit Tris-Puffer äquilibriert werden.

Abb. 6-2 c zeigt die Cadmium-Profile vor und nach der Cadmiumbeladung von Gehirncytosol. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden alle Proben in der gleichen Verdünnung von 1+9 gemessen. Die vermuteten MT-Peaks weisen tatsächlich eine etwa fünfzigfach höhere Cadmiumbeladung auf als vor der Zugabe von Cadmium zum Cytosol. Das aus den MT-Peaks verdrängte Zink eluiert bei RT=51 min (**Abb. 6-2 b**).

Die festgestellte Cadmiumzunahme der Signale bei RT=36 und 42 min ist eine weitere Bestätigung der Identität der Metallothioneine¹¹².

6.1.3 Metallothionein-3 im Gehirncytosol: Chromatographische Abtrennung von Metallothionein-1/-2

Abb. 6-3 zeigt den Vergleich der Kupfer-Profile von humanen Cytosolen verschiedener Organe: Gehirn, Leber, Niere, Herzmuskel und Skelettmuskel.

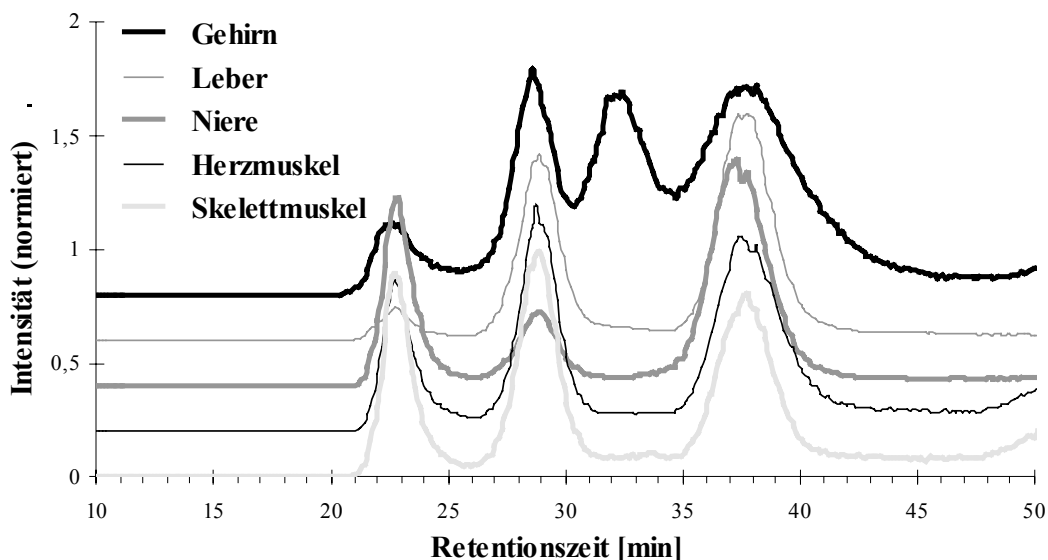


Abb. 6-3 : Vergleich der Kupfer-Profile von humanen Organcytosolen: Gehirn, Leber, Niere, Herzmuskel, Skelettmuskel (Sepsis-Patient); Trennung der Isoform MT-3 von den Isoformen MT-1 und MT-2

Die fraglichen MT-Peaks haben hier Retentionszeiten von 32 min und 38 min. Das Signal bei RT=38 min ist bei allen Organen feststellbar, der Peak bei RT=32 min ist jedoch nur im Gehirncytosol zu erkennen. Da MT-3 bis jetzt hauptsächlich im Gehirn nachgewiesen wurde, deutete dies darauf hin, daß der Peak bei 32 min der Isoform MT-3 zuzuordnen ist. Die Isoformen MT-1 und MT-2 wurden folglich dem Peak bei 38 min zugewiesen. Sie können mit der Superdex 75PG-Säule nicht aufgelöst werden¹¹².

Für die Untersuchung von Gehirncytosolproben ist die in dieser Arbeit realisierte Abtrennung von MT-3 mit der Superdex 75PG-Säule (siehe auch Kapitel 9) von großem Vorteil.

6.1.4 Einzelläufe von Metallothioneinen

Zur Bestätigung der Identität der MT-Signale wurden chromatographische Läufe mit einzelnen MT durchgeführt, um die Retentionszeiten der Signale mit denen in den Elementprofilen der Cytosolproben zu vergleichen. MT-1 und MT-2 vom Kaninchen sind als zink- und cadmiumbeladene Mischung kommerziell erhältlich. Beim MT-3 handelte es sich um rekombinantes humanes, zinkbeladenes MT-3.

Abb. 6-4 zeigt den Vergleich der Kupfer- und Zink-Profile des MT-1/-2-Einzellaufes mit denen der chromatographischen Trennung von humanem Gehirn- und Lebercytosol. Die Einzelsubstanzen eluieren bei einer Retentionszeit von etwa 37 min, der angenommene MT-1/-2-Peak im Gehirncytosol bei etwa 38 min. Auf die leicht verschobenen Retentionszeiten der Kupfer- und Zink-Signale wird im Kapitel 9 näher eingegangen.

Die Kupfer- und Zink-Profile des MT-3-Einzellaufes sind ebenfalls in **Abb. 6-4** dargestellt. Die Einzelsubstanz eluiert bei RT=32,5 min, der fragliche MT-3-Peak im Gehirncytosol hat eine Retentionszeit von 32,1 min.

Damit wird die Identität der MT-Peaks in den Cytosolproben zusätzlich bestätigt¹¹².

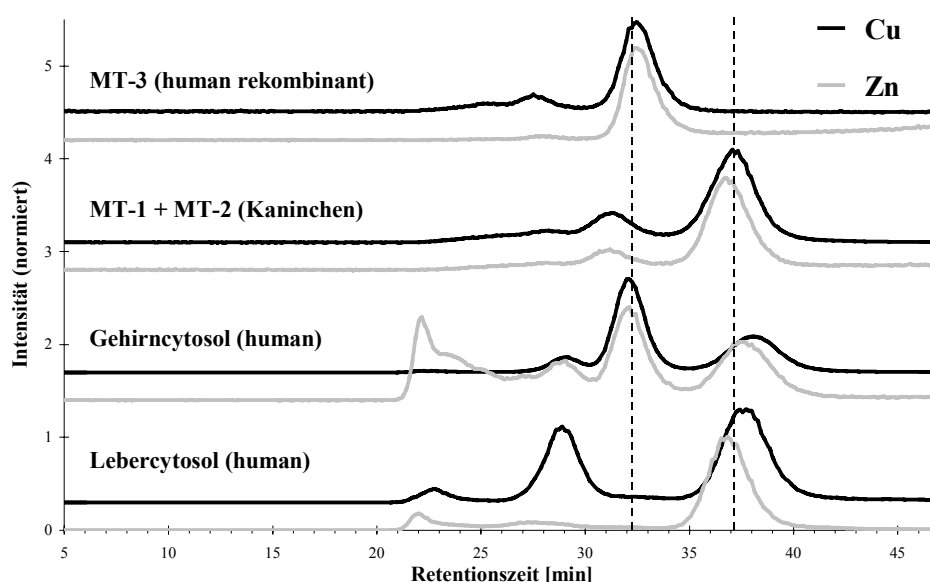


Abb. 6-4 : Vergleich der Retentionszeit eines Einzellaufes von MT-3 (human, rekombinant, Zusatz von DTT) sowie von MT-1 und MT-2 (Gemisch, Kaninchen, Zusatz von DTT) mit den Kupfer- und Zink-Profilen der chromatographischen Trennung von humanem Gehirn- und Lebercytosol (frontale Region, Kontrolle bzw. Sepsis-Patient, Zusatz von DTT)

6.1.5 Nachweis von MT-3 in Fraktionen der chromatographischen Trennung

Zur abschließenden Bestätigung der Identifizierung des MT-3-Peaks sollte MT-3 in den Fraktionen der chromatographischen Trennung von Gehirncytosol nachgewiesen werden. Die Versuche konnten während eines Forschungsaufenthaltes im Center for Biochemical and Biophysical Sciences and Medicine an der Harvard Medical School in Boston, USA, im Rahmen eines Projektes zur Charakterisierung der Metallbeladung von nativem MT-3 vom Schwein durchgeführt werden (siehe Kapitel 11). Bei diesen Versuchen erfolgte eine chromatographische Vorreinigung der Cytosolproben durch Trennung auf einer Anionenaustauschersäule und einem ersten Lauf auf der Superdex 75PG-Säule. Dabei wurden mehrere Einzelläufe durchgeführt, die entsprechenden Fraktionen zusammengefaßt und aufkonzentriert. 1 mL-Fraktionen des Eluates einer erneuten Trennung dieser Fraktionen auf der Superdex 75PG-Säule wurden schließlich zur Analyse aufgefangen. Da die gleichen Trennbedingungen (Tris-Puffer $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH=7,4; Flußrate $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) verwendet wurden wie im Hahn-Meitner-Institut, war die Vergleichbarkeit mit den vorher dort aufgenommenen Elementprofilen der Superdex 75PG-Trennung gewährleistet.

6.1.5.1 Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight – Massenspektrometrie

Metallothionein-3 sollte anhand seiner Molmasse nachgewiesen werden. Dafür wurden Massenspektren mittels Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI) - Time of Flight (TOF) - Massenspektrometrie (MS) aufgenommen.

MALDI-MS, meist in Verbindung mit einem TOF-Massenanalysator genutzt, ist seit der Entwicklung der Methode 1985 und Anwendbarkeit auf hohe Massen 1988¹¹⁴ zu einem wichtigen Instrument der Bioanalytik geworden. Die Vorteile sind die Schnelligkeit der Analyse, eine hohe Sensitivität für sehr kleine Probenmengen und eine breite Anwendbarkeit auf komplexe Probenmischungen. Die Anwendungen reichen von der Screening-Analyse großer Proteine zur Reinheitsüberprüfung und der Analyse von Peptid-Fragmenten bis hin zur DNA-Sequenzierung¹¹⁵.

Die Probe wird zu einer Matrix gegeben, die in einem organischen Solvenz gelöst ist. Bei der Evaporation des Lösungsmittels kristallisieren die Analyten der Probe mit der Matrix gemeinsam aus. Die Matrixmoleküle absorbieren die eingestrahlte Laserenergie. Es kommt dabei auch zur Verdampfung und Ionisation der Analyten, die dann über TOF-MS detektiert werden^{115, 116}. Dabei werden die erzeugten Ionen durch einen kurzen Spannungsstoß in eine feldfreie Flugstrecke beschleunigt und treffen nach unterschiedlich langer Flugzeit auf den Detektor⁹¹. Die Flugzeit entspricht einem bestimmten Masse-zu-Ladungs-Verhältnis und wird über eine interne oder externe Kalibrierung der entsprechenden Molmasse zugeordnet.

Hauptsächlich wurde in dieser Arbeit das System der Firma Ciphergen Biosystems Inc. (in der Abteilung Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology im Brigham and Women's Hospital, Boston, USA) verwendet. Es nennt sich Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation (SELDI) - TOF-MS, wobei das Prinzip der Ionisierung und Detektion dem der MALDI-TOF-MS entspricht. Ein spezielles ProteinChip-System dient der Bindung, Aufreinigung und gegebenenfalls weiteren chemischen Umsetzung der Proben. Kleine Mengen biologischer Proben mit Analyten einer Masse von 1000 bis über 250000 Da werden mit einer Sensitivität im Femtomolbereich detektiert¹¹⁷. Die Proteinchips haben verschiedene Oberflächen, auf denen die Analyten - wie bei der

Chromatographie - möglichst spezifisch gebunden werden, z.B. kationische oder anionische Ionenaustauscher, hydrophobe oder hydrophile Oberflächen sowie spezielle Affinitätsbindungen. Störende Substanzen wie der Probenpuffer können nach Bindung des Analyten gewaschen werden¹¹⁶.

In dieser Arbeit wurden hydrophobe Oberflächen (C16 Reversed Phase) und Anionenaustauscher (quaternäre Ammoniumgruppen) eingesetzt. Als Matrix diente α -Cyano-4-hydroxymethylsäure. Letztere wird üblicherweise für Analyten mit einer Molmasse kleiner als 15000 Da verwendet und wurde als gesättigte wässrige Lösung mit 50% Acetonitril und mit bzw. ohne 0,5% Trifluoressigsäure (TFA) aufgegeben¹¹⁷. α -Cyano-4-hydroxymethylsäure wurde auch in der Literatur zur MALDI-TOF-Analyse von MT verwendet¹¹⁸. Die externe Kalibrierung erfolgte mit einem Peptidgemisch aus ARG-8-Vasopressin (1084,3 Da), Rinder-Insulin B-Kette (3495,9 Da), humanem Insulin (5807,7 Da) und Hirudin BHVK (7033,6 Da), das den interessierenden Molmassenbereich abdeckte.

Es wurde jeweils 1 μ L der unverdünnten Probe auf einen Probenbereich des Chips aufgegeben und getrocknet. Ein Teil der Proben wurden anschließend mehrfach mit Wasser gespült. Dann wurden jeweils 0,5 μ L der Ionisierungsmatrix aufgegeben und getrocknet. Die Matrix ist lichtempfindlich, die Proteinchips müssen daher bis zur Messung lichtgeschützt gelagert werden.

Gemessen wurden verschiedene MT-3-Fraktionen der chromatographischen Trennungen von Gehirncytosol (Schwein), wobei einige Fraktionen aufkonzentriert und zum Teil mit DTT versetzt wurden (siehe Kapitel 11.1). Zur Kontrolle wurden die Einzelsubstanzen MT-1, MT-2 und MT-3 mitgemessen. Die gefundenen Molmassen sind in **Tab. 6-1** im Vergleich zu den theoretischen Molmassen (Apo-Formen) aufgeführt.

Tab. 6-1 : Mittels SELDI-TOF-MS bestimmte Molmassen einzelner Metallothioneine

	Theoretische Molmasse (Apo-Form) [Da] ⁴⁴	Molmasse mit Acetylierung [Da]	Gefundene Molmasse [Da]
MT-1 ^a	6103 (MT-1a)	6145	6159,8 ^c
MT-2 ^a	6083 (MT-2a)	6125	6131,2 ^c
MT-3 ^b	6927	6969	6932,3 ^d

^a Kaninchen; ^b rekombinant, human; ^c Anionenaustauscher-Chip, ohne TFA, ^d Hydrophober Chip, mit TFA

In **Abb. 6-5** ist ein typisches erhaltenes SELDI-TOF-Massenspektrum über einen großen Massenbereich gezeigt. Folgende Ionen sind zu erkennen: der Molekülion-Peak M^+ bei etwa 7000 Da, doppelt geladene Ionen M^{2+} im Bereich um 3600 Da, Dimere $2M^+$ um 14300 Da und ein Ion $(3M)^{2+}$ bei etwa 10700 Da. Die gemessenen Ionen erhalten ihre Ladung wahrscheinlich durch Protonierungsreaktionen beim Laserbeschuss¹¹⁹. Entsprechende Ionen wurden für andere untersuchte Proteine auch in der Literatur gefunden¹¹⁴. Die gehäuft auftretenden Signale im Bereich um 2000 bis 4000 Da stammen vermutlich von mehrfach ionisierten Molekülen. Massenspektren von Proteinen mit α -Cyano-4-hydroxymethylsäure weisen eine erhöhte Tendenz von Mehrfachprotonierungen auf. Matrixionen treten im sehr niedrigen Massenbereich unter 1000 Da, meist unter 500 Da auf. α -Cyano-4-hydroxymethylsäure erzeugt im Vergleich zu anderen Matrices wie Sinapinsäure niedrige Untergrundsignale¹¹⁹.

Der Molekülion-Peak entspricht dem Apo-MT. Auch in der Literatur wurde bei der Untersuchung von MT mittels MALDI-TOF-MS das metallfreie MT gefunden^{45, 120}. Die gefundene Molmasse (6967,9 Da - siehe **Abb. 6-6**) ist in diesem Fall etwas höher als die theoretisch erwartete⁴⁴ für Apo-MT, jedoch kleiner als für metallhaltiges MT. Dies traf

auch auf die anderen gemessenen Proben zu. Diese Tatsache konnte darauf zurückgeführt werden, daß die theoretischen Werte aus den Aminosäuresequenzen berechnet wurden, MT in natürlichem Zustand in der Zelle jedoch oft acetyliert vorliegen, wobei sich die Molmasse um 42 Da erhöht: Säugetier-MT-1 und MT-2 sind wie über 50% der löslichen Zellproteine am N-Terminus acetyliert^{121, 118}. Es handelt sich bei den cytosolischen Proteinen um eine kotranslationale Acetylierung. Sie findet statt, wenn die Polypeptidkette eine Länge von 40-45 Aminosäuren erreicht und soll vermutlich vor proteolytischem Abbau schützen. U.a. werden Proteine, deren Sequenz mit Met-Asp beginnt - was auf die MT zutrifft - mit besonders großer Wahrscheinlichkeit acetyliert^{121, 118}.

Uchida et al.¹⁰ stellten bei der Sequenzierung von isoliertem humanem MT-3 fest, daß der N-Terminus blockiert war und Pountney et al.⁷³ fanden eine Acetylierung des N-Terminus von isoliertem Rinder- und Pferde-MT-3 wie bei den anderen MT. Das Pferde-MT-3 enthielt allerdings auch einen variierenden Anteil von nicht-acetyliertem Protein⁷³. Für in *E. coli* exprimiertes humanes und Maus-MT-3 fanden Sewell et al.⁸⁰ einen nicht-blockierten N-Terminus. Demnach kann vermutet werden, daß die Acetylierung bei rekombinanten MT nicht stattfindet^{121, 120}. Die gefundene Molmasse stimmt somit gut mit der theoretischen Molmasse von acetyliertem MT-3 (6969 Da) überein.

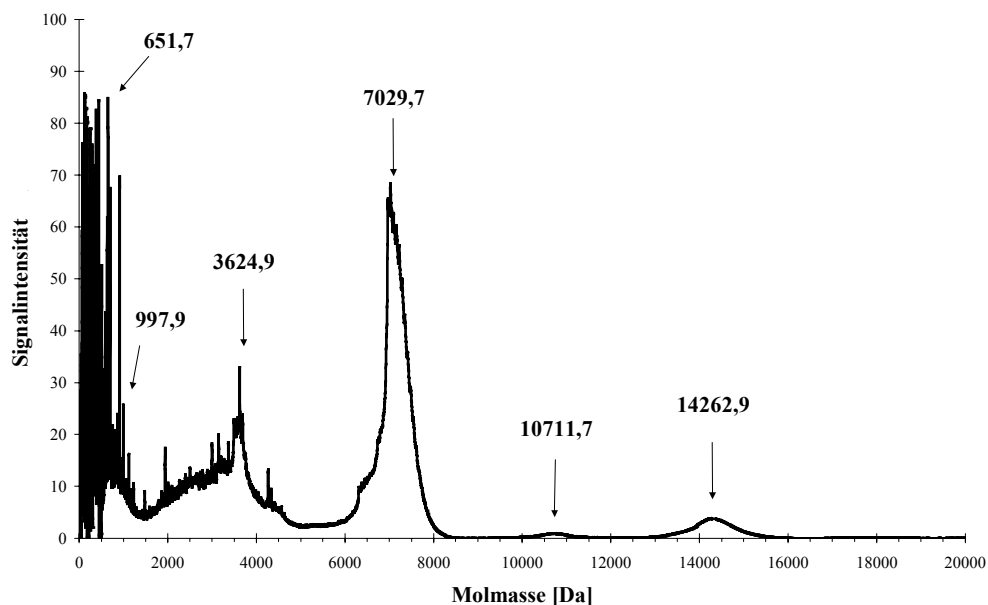


Abb. 6-5: SELDI-TOF-Massenspektrum einer MT-3 enthaltenden Superdex 75PG-Fraktion (Gehirn Schwein, Zusatz von DTT)

Ein weiteres auffälliges Merkmal der Massenspektren war die Breite der MT-3-Peaks. Bei genauerer Betrachtung der Signale bei gespreizter Massenachse (siehe **Abb. 6-6**) zeigte sich, daß der Peak aus vielen einzelnen Unterpeaks besteht und deshalb zu höheren Massen hin langgezogen ist. Die Massen der verschiedenen Peaks sind in **Abb. 6-6** ebenfalls angegeben. Die Massendifferenz zwischen den regelmäßigen Unterpeaks war jeweils etwa 64 Da, was der Masse von einem Zink- bzw. Kupferatom entspricht¹²². Die Massenauflösung der SELDI-TOF-MS-Messung betrug im Bereich um 7000 Da etwa 1,5 Da, so daß eine genauere Bestimmung der Identität der Metallatome nicht möglich war. Neben dem Apo-MT ohne Metalle wurden demnach auch MT-3-Formen mit gebundenen Metallen bis zur Absättigung des MT gefunden. Es wird vermutet, daß MT-3 die gebundenen Metalle während der Desorption und Ionisation verliert. Es besteht jedoch eine gewisse - mit zunehmendem Metallgehalt geringer werdende - Wahrscheinlichkeit, daß Metallatome gebunden bleiben. Das charakteristische Tailing zu höheren Massen bei MT-

Spektren haben auch Beattie et al. beschrieben und ebenfalls auf das Vorhandensein von teilweise metallierten Spezies zurückgeführt⁴⁵. Der MT-3-Peak ohne Zusatz von DTT war schmaler als bei den DTT enthaltenden Fraktionen. Ohne DTT sind mehr SH-Gruppen oxidiert und bilden Disulfid-Bindungen, so daß der Anteil von komplexierten Metallatomen von vornherein geringer ist und die Apo-MT-Form im Massenspektrum somit überwiegt. Das Tailing durch verschieden metallierte Spezies tritt dann nur schwach ausgeprägt auf.

Weiter fiel auf, daß jeder dieser Unterpeaks wiederum zwei „Satellitenpeaks“ aufwies, die zu höheren Massen mit niedrigerer Intensität schlechter aufgelöst waren. Die Massendifferenz betrug etwa 14 bis 15 Da. Es könnte sich dabei um die Methylierung z.B. von SH-Gruppen handeln, wobei ein Wasserstoffatom durch eine Methylgruppe ersetzt wird, was gerade die Massendifferenz von 14 Da ergibt. Es könnte sich auch um Oxidationsreaktionen handeln, was eine Massendifferenz von 16 ergäbe. Des weiteren könnten Addukte mit der Matrix (+189,2 Da) oder DTT (+154,3 Da) auftreten oder gemischte Addukte, die zusätzlich wiederum eine unterschiedliche Anzahl von Metallatomen enthalten können. Diese Massen würden ebenfalls zur Breite des Molekülion-Peaks beitragen. Außerdem könnten entsprechende Verbindungen oder Addukte mit eventuell vorhandenem unacetyliertem MT-3 auftreten. Beattie et al. ordneten einen im Massenspektrum von MT beobachteten Peak dem Matrixaddukt von MT zu⁴⁵. Allerdings war die verwendete Matrix in diesem Fall Sinapinsäure, die wesentlich stärker zu Adduktbildung neigt als die hier benutzte α -Cyano-4-hydroxymizinsäure¹¹⁹.

Die Gesamtheit der genannten möglichen, sich überlagernden Effekte kann als Erklärung der beobachteten leichten Abweichung der Molmasse des jeweils intensitätsstärksten Peaks der einzelnen gemessenen Proben dienen, die zwischen 6959 Da und 6995 Da schwankte. Dabei muß auch berücksichtigt werden, daß es sich um unterschiedliche Fraktionen handelte. Außerdem fanden die im folgenden beschriebenen unterschiedlichen Probenvorbehandlungen statt.

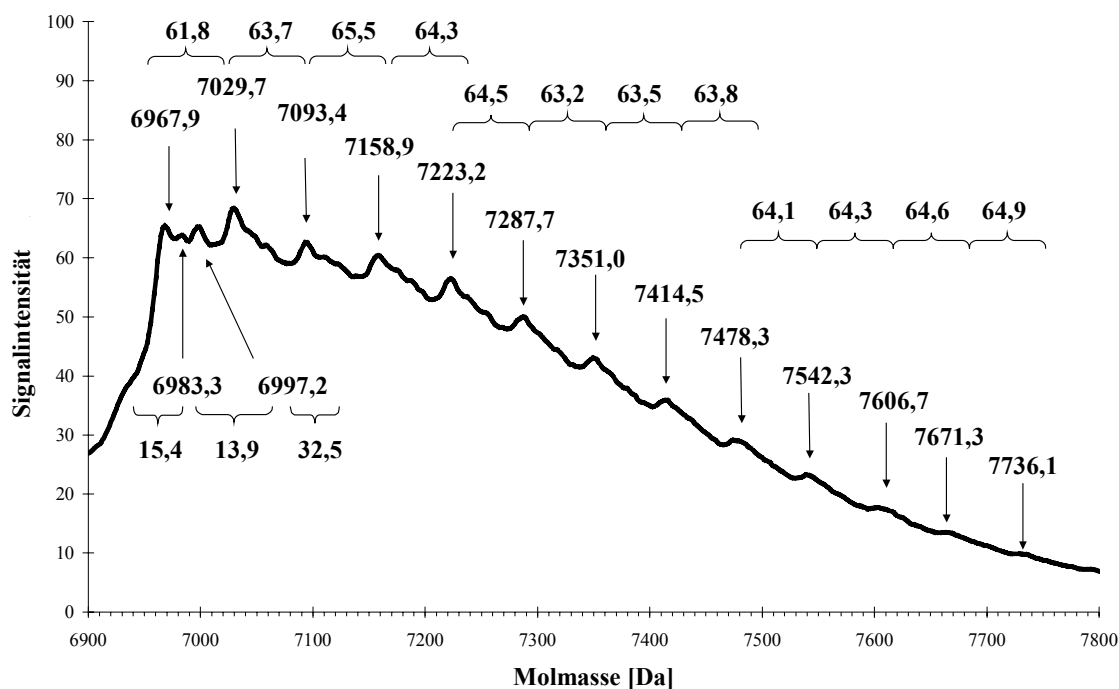


Abb. 6-6: Ausschnitt des Molekülion-Peaks im SELDI-TOF-Massenspektrum einer MT-3 enthaltenden Superdex 75PG-Fraktion (Gehirn Schwein, Zusatz von DTT)

Es sollten die günstigsten Bedingungen für die Detektion von MT-3 ermittelt und speziell der Metallverlust während der Messung näher untersucht bzw. vermieden werden. Dafür wurden verschiedene Versuchsbedingungen bei der Probenvorbereitung getestet:

- Verwendung von hydrophoben oder Anionenaustauscher-Oberflächen
- Waschen nach der Probenaufgabe
- Waschen mit konzentrierter Zinklösung
- Verwendung einer Matrixlösung ohne TFA zur Vermeidung einer sauren Umgebung.

Das Waschen mit Wasser nach der Probenaufgabe sollte das Signal-Rausch-Verhältnis verbessern, indem Probenpuffer und darin enthaltene weitere Substanzen entfernt werden. Möglicherweise waren Metallverluste durch die saure Matrix bedingt. Es wurde geprüft, ob sie durch Verwendung einer α -Cyano-4-hydroxymethylsäure-Lösung in 50% Acetonitril ohne TFA vermieden werden konnten. Das Waschen mit einer Zinklösung nach der Probenaufgabe sollte zeigen, ob durch einen großen Zinküberschuß ein zusätzlicher Peak von zinkbeladenem MT auftritt bzw. die vorhandenen Signale verstärkt werden.

Die gefundenen Molmassen für die verschiedenen Proben und Bedingungen sind in **Tab. 6-2** aufgeführt.

Tab. 6-2 : Mittels SELDI-TOF-MS^a bestimmte Molmassen in den MT-3-Fractionen der Superdex 75PG-Trennung

	mit TFA, mit Waschen	mit TFA, Zinklösung	mit TFA, ohne Waschen	ohne TFA, ohne Waschen
Ansatz 3 ^b	6961,6	6971,3	6956,0	6961,5
Ansatz4, 36 ^b	6995,7		6974,2	6974,6
Ansatz4, 37 ^b	6992,6		6967,9	6991,6
Ansatz4, 38 ^b	6969,4		6978,2	6958,1

^a Anionenaustauscher-Chip; ^b siehe Kapitel 11

Die hydrophoben Oberflächen waren für einen Waschschriff nicht geeignet, da das hydrophile MT-3¹⁰ nicht an die Oberfläche bindet und dadurch leicht weggespült wird. Dies machte sich durch stärker verrauschte Signale bemerkbar. Das Waschen schien auch bei den Anionenaustauscheroberflächen Peakverbreiterungen zu verursachen. Eine direkte Messung ohne Waschschriff schien deshalb für die Analyse der MT-Fractionen ausreichend und geeignet zu sein.

Bei Verwendung der Matrix ohne TFA verschob sich der Moleküllion-Peak zu höheren Massen (siehe **Abb. 6-7**): Das höchste Signal war nicht mehr Apo-MT-3 bzw. MT-3 mit einem Metall, sondern das Molekül mit 4 Metallen und einer Masse von 7225 Da. Bei dieser Interpretation der Spektren muß jedoch auch die Möglichkeit berücksichtigt werden, daß diese Masse dem Addukt aus Apo-MT, Matrix und einem Metall entsprechen kann. Die saure Matrix scheint demnach zum Metallverlust des MT beizutragen. Allerdings wurde auch ohne TFA nicht hauptsächlich vollständig metallbeladenes MT-3 gefunden. Es besteht die Möglichkeit, daß in der untersuchten Probe trotz Zusatz von DTT nur unvollständig metallbeladenes MT-3 vorhanden war. Vermutlich wird aber der Metallverlust hauptsächlich durch den Desorptions- bzw. Ionisierungsprozeß hervorgerufen. Für die Probe ohne DTT traten ohne TFA keine deutlichen Unterschiede im Vergleich zur Messung mit TFA auf. MT-3 lag vorwiegend in der Apo-Form vor oder wurde ohne DTT leichter bei der Ionisierung demetalliert.

Ohne TFA war die Feinstruktur des MT-3-Peaks nicht mehr deutlich zu erkennen (siehe **Abb. 6-7**). Die Signale schienen allgemein breiter zu werden. In einem Fall waren die Intensitäten im Verhältnis zur Messung mit TFA auch deutlich niedriger.

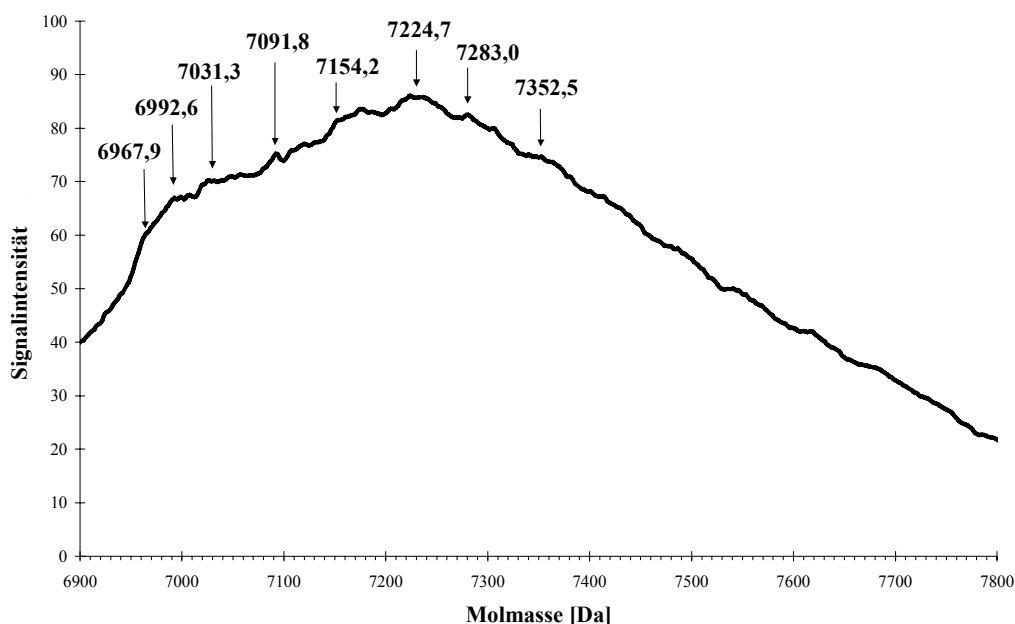


Abb. 6-7: Ausschnitt des Molekülion-Peaks im SELDI-TOF-Massenspektrum einer MT-3 enthaltenden Superdex 75PG-Fraktion (Gehirn Schwein, Zusatz von DTT), Messung mit einer Matrix ohne TFA

Um die erhaltenen Ergebnisse zu überprüfen, wurde der Versuch mit einer hochauflösenden MALDI-TOF-MS wiederholt (Mass Spectrometry Facility, Department of Chemistry and Chemical Biology, Harvard Medical School, Boston, USA). Es wurde die gleiche Matrix α -Cyano-4-hydroxymethylsäure verwendet, ohne Zusatz von TFA. Die gefundenen Molmassen sind in **Tab. 6-3** wiedergegeben, Beispiele für die erhaltenen Spektren in **Abb. 6-8**.

Die Molmassen stimmten mit den mittels SELDI-TOF-MS gemessenen Massen überein (**Tab. 6-2** und **Tab. 6-3**). Es traten breite Peaks auf, die in diesem Fall nicht näher aufgelöst wurden. Die angegebenen Massen entsprechen daher Mittelwerten der verschiedenen Unterpeaks. Entsprechende Massen - auch zusätzliche Peaks - wurden bei nicht aufgelösten Spektren der SELDI-TOF-MS-Messung angezeigt.

Tab. 6-3 : Mittels MALDI-TOF-MS bestimmte Molmassen in den MT-3-Fraktionen der Superdex 75PG-Trennung

	erster Peak	zusätzlicher Peak
Ansatz 3	6955,3	
Ansatz 4, 36	6978,6	7206,9
Ansatz 4, 37	7003,8	7153,3

Insgesamt konnte die Molmasse des acetylierten MT-3 in den SEC-Fraktionen bestätigt werden. Insbesondere wies die zusätzlich deutlich sichtbare Reihe der Metallbeladungen auf MT hin. Dies war ein weiterer wichtiger Beitrag zur Identifizierung von MT-3 in den Elementprofilen der chromatographischen Trennung.

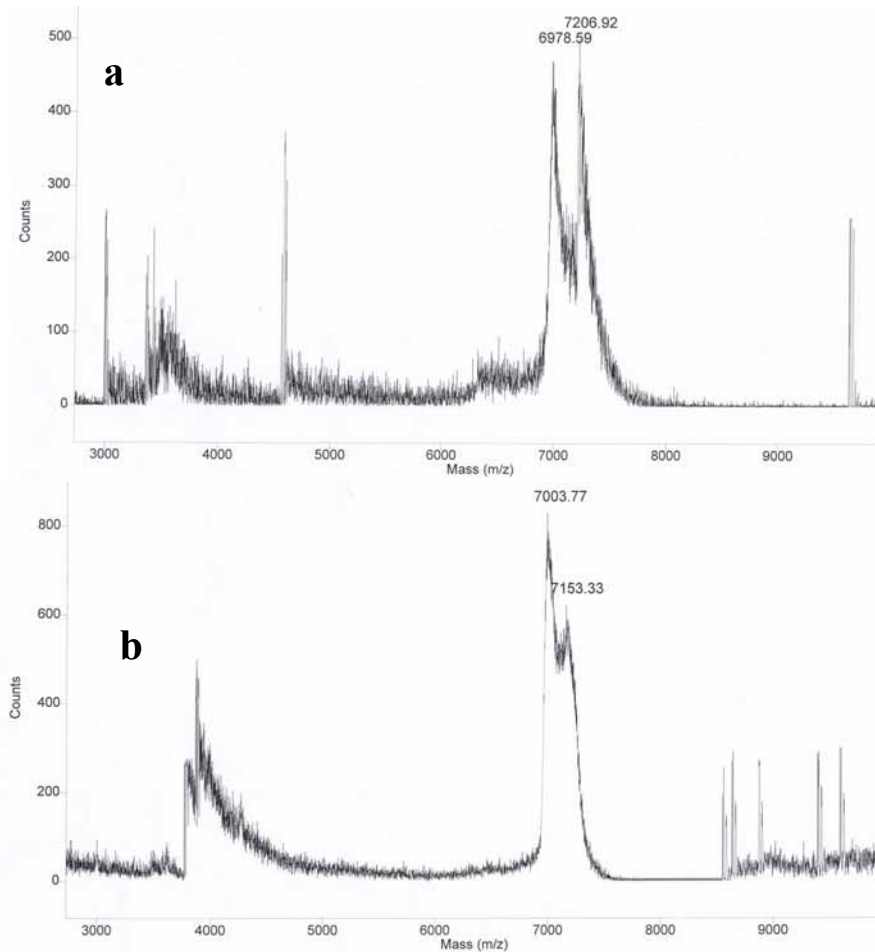


Abb. 6-8 : MALDI-TOF-Massenspektren von MT-3 enthaltenden Superdex 75PG-Fraktionen (Gehirn Schwein, Zusatz von DTT)

6.1.5.2 Aminosäurenanalyse

Eine weitere Bestätigung von MT-3 in den Fraktionen der chromatographischen Trennung auf der Superdex 75PG-Säule sollte anhand der Aminosäurezusammensetzung erhalten werden. Die Analysen wurden vom Dana Farber Cancer Institute, Molecular Biology Core Facilities, Boston, USA, ausgeführt.

Zunächst mußten die Aminosäuren proteolytisch aus den Proteinen/Peptiden freigesetzt werden. Die Fraktionen wurden 20 Stunden bei 110 °C in 6 mol·L⁻¹ Salzsäure unter Zusatz von Phenol chemisch hydrolysiert, um die Peptidbindungen zu spalten. Danach wurden die Aminosäuren chromatographisch aufgetrennt und detektiert. Es wurde auch eine Analyse des Tris-Puffers vorgenommen und die gefundenen Aminosäuren jeweils als Blindwert von den Analyseergebnissen der Proben abgezogen. Von den (eingengten) Fraktionen stand nur sehr wenig Material für die Analyse zur Verfügung. Wegen der niedrigen Proteinkonzentration in den Proben ergab sich ein schlechtes Signal/Rausch-Verhältnis, was bei der automatischen Zuordnung der Peaks zu Ungenauigkeiten und möglicherweise zu Artefakten führen konnte.

Als Beispiel ist die gefundene Aminosäurezusammensetzung einer einzelnen Fraktion in **Abb. 6-9** gezeigt. Sie wird mit der theoretischen Verteilung der Aminosäuren im MT-3 verglichen (siehe **Tab. 6-4**). Es scheinen noch kleine Verunreinigungen in der Fraktion vorhanden zu sein. Insgesamt läßt sich jedoch eine Übereinstimmung mit der theoretischen Verteilung feststellen.

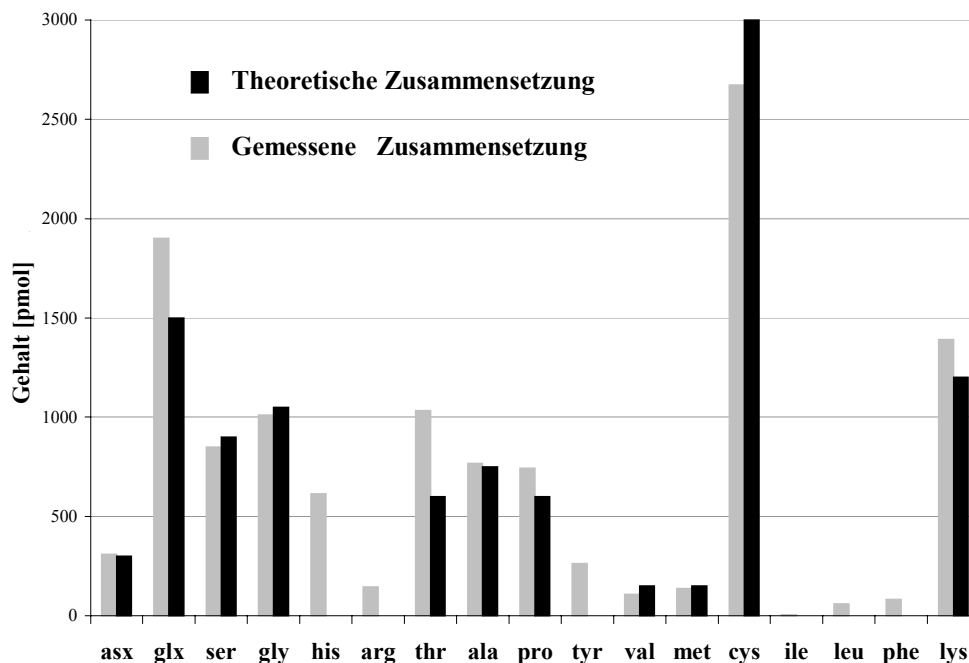


Abb. 6-9 : Aminosäurezusammensetzung einer MT-3 enthaltenden Superdex 75PG-Fraktion (Gehirn Schwein, Zusatz von DTT)

Tab. 6-4 : Aminosäurezusammensetzung von MT-3 (Schwein) ¹²³

Aminosäure	Buchstabencode		Anzahl
Alanin	Ala	(A)	5
Arginin	Arg	(R)	0
Asparagin	Asn	(N)	0
Asparat	Asp	(D)	2
Cystein	Cys	(C)	20
Glutamin	Gln	(Q)	1
Glutamat	Glu	(E)	9
Glycin	Gly	(G)	7
Histidin	His	(H)	0
Isoleucin	Ile	(I)	0
Leucin	Leu	(L)	0
Lysin	Lys	(K)	8
Methionin	Met	(M)	1
Phenylalanin	Phe	(F)	0
Prolin	Pro	(P)	4
Serin	Ser	(S)	6
Threonin	Thr	(T)	4
Tryptophan	Trp	W	0
Tyrosin	Tyr	Y	0
Valin	Val	V	1

6.1.5.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Bei der Sodiumdodecylsulfat (SDS) - Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) werden die Proteine eines Gemisches durch ihre unterschiedliche Laufgeschwindigkeit im elektrischen Feld in einem quervernetzten Polyacrylamid-Gel getrennt. Damit nicht Größe, Form oder verschiedene elektrische Ladung der Proteine, sondern nur ihre unterschiedlichen Massen für die Wanderungsgeschwindigkeit ausschlaggebend sind, werden die Proben einer entsprechenden Vorbehandlung unterzogen: Durch Zugabe des Detergens SDS werden die Proteine denaturiert, in ihre Untereinheiten aufgespalten und zur völligen Entfaltung gebracht. Um eine vollständige Denaturierung zu erhalten, wird außerdem ein Reduktionsmittel zur Spaltung der Disulfid-Brücken zugesetzt (DTT oder β -Mercaptoethanol). Die SDS-Moleküle binden an die entfalteten Peptidketten (etwa 0,4 g SDS pro g Protein) und verleihen ihnen eine stark negative Ladung, so daß sich die einzelnen Proteine nicht mehr durch ihre Ladung unterscheiden. Die getrennten Proteine werden auf dem Gel angefärbt und die Molmassen durch Vergleich mit Standardproteinen bekannter Molmasse zugeordnet¹⁰².

Ein spezifischer Nachweis von Proteinen in einem Gel ist durch das Western Blot-Verfahren möglich. Die mit der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine werden unter Beibehaltung des Trennungsmusters vom Gel auf eine Trägermembran (Nitrocellulose) übertragen. Die Übertragung erfolgt durch einen zweiten Elektrophoreselauf senkrecht zum ersten. Auf der Membran werden die adsorbierten Proteine immunochemisch mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen und mit Hilfe von sekundären Antikörpern detektiert⁹¹.

Zur Durchführung der SDS-PAGE wurden die Proben zunächst mit dem Probenpuffer ($125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH=6,8, 10%(v/v) Glycerol, 0,01% (m/v) Bromphenolblau, $0,25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ CdCl_2 , 1% (m/v) SDS) sowie DTT versetzt¹²⁴. Bromphenolblau dient zum Sichtbarmachen der Proben auf dem Gel während des Laufes. Vor der Aufgabe auf das Gel wurden die Proben zur Denaturierung 5 min im Wasserbad auf 100°C erhitzt.

Die Elektrophorese wurde mit einem Mini Electrophoresis System mit einem 10-20% Polyacrylamid-Gradienten-Gel nach Schagger und von Jagow¹²⁵ (Ready Gel, Bio-Rad) durchgeführt. Dieses Gel ist besonders geeignet für Peptide und kleine Proteine im Molmassenbereich von 5-40 kDa, da ein Zwischengel vorgeschaltet ist, das höhermolekulare Proteine festhält. Die Molmassen wurden durch mitlaufende Markerproteine (Kaleidoscope Prestained Standards, Bio-Rad) ermittelt. Zur Anfärbung der Proteine wurde eine Silberfärbung ausgeführt (Silver Stain Plus Kit, Bio-Rad), welche für Metallothioneine besonders geeignet und empfindlich ist¹²⁶. Es wurde auch humanes MT-3 (rekombinant) als Standard aufgegeben.

Abb. 6-10 zeigt die SDS-PAGE von verschiedenen Fraktionen eines chromatographischen Laufes auf der Superdex 75PG-Säule (nach vorhergehenden Aufreinigungen) sowie des MT-3-Standards. Bei Verwendung des Tris-Tricine-Gradienten-Gels wurde auch ohne aufgegebene Probe eine Bande bei ca. 33 kDa gefunden und diese deshalb als Artefakt eingeordnet. Das humane MT-3 erscheint bei einer Molmasse zwischen 20 und 30 kDa, d.h. wie bei der Größenausschlußchromatographie bei einer zu hohen Molmasse (siehe Kapitel 9). In den fraglichen MT-3-Fractionen ist jeweils eine Bande bei gleicher Molmasse zu erkennen. MT-3 scheint demnach in den Fraktionen vorhanden zu sein.

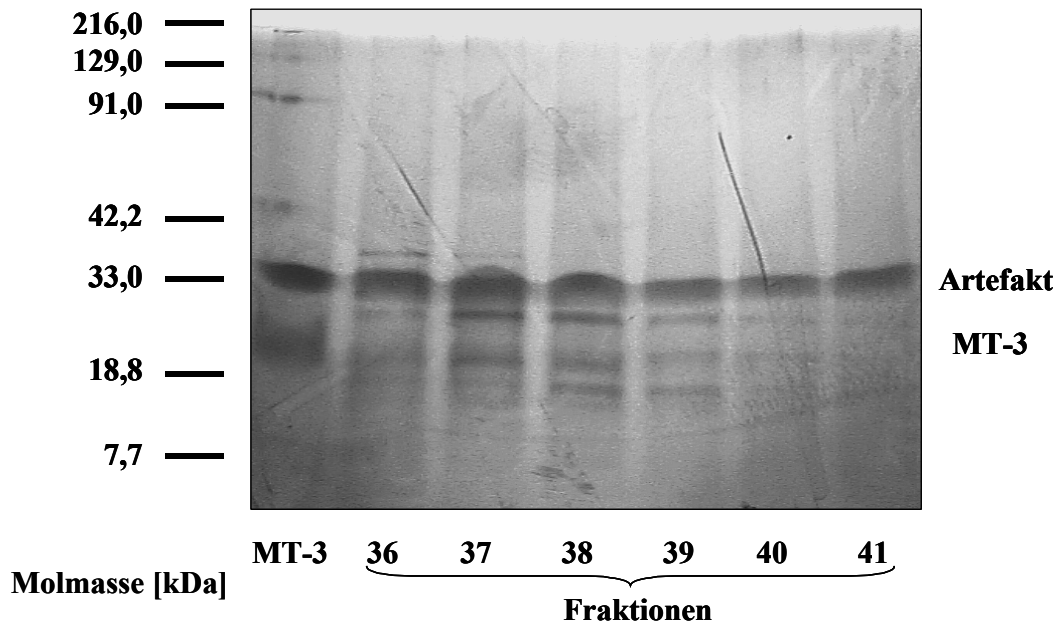


Abb. 6-10 : SDS-PAGE von MT-3 enthaltenden Superdex 75PG-Fractionen (Gehirn Schwein)

Um MT-3 spezifisch nachzuweisen, wurde ein Western Blot durchgeführt. Das Gel einer SDS-PAGE wurde nach dem Lauf für 30 min in einem Transferpuffer ($192 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Glycine, $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH=8,3, 20% (v/v) Methanol, $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2) inkubiert^{127, 124} und in einer Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell zwei Stunden bei 200 mA und 4 °C auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schüll) geblottet. Die Membran wurde 3 Stunden bei Raumtemperatur mit 5% (m/v) fettfreies Milchpulver enthaltendem TBST-Puffer ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH=7,5, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 0,1% (v/v) Tween-20)¹²⁴ inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde dreimal mit TBST-Puffer gewaschen, jeweils für 15 min.

Bei dem anti-MT-3-Antikörper handelte es sich um ein Kaninchen-Antiserum gegen das MT-3-spezifische Polypeptid im C-Terminus von humanem MT-3. Da dieses Polypeptid beim Schwein sehr ähnlich ist (siehe **Tab. 2-2**), reagiert der Antikörper auch mit MT-3 vom Schwein. Der anti-MT-3-Antikörper wurde in einer 1:5000 Verdünnung in TBST-Puffer mit 2,5% (m/v) Rinderserum-Albumin und 2,5% (m/v) fettfreiem Milchpulver zur Membran gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert¹²⁴.

Nach dreimaligem Waschen mit TBST-Puffer wurde der sekundäre Antikörper - Ziegen-anti-Kaninchen-Immunglobulin G konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (Bio-Rad) - in TBST-Puffer zugegeben und etwa 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen erfolgte die Detektion über Chemilumineszenz (Enhanced Chemiluminescence ECLTM, Amersham Pharmacia Biotech) auf einem photographischen Film.

Abb. 6-11 zeigt den Western Blot verschiedener chromatographischer Fractionen von Trennungen über die Superdex 75PG-Säule. Der MT-3-Standard in unterschiedlichen Aufgabemengen ist deutlich zu erkennen. MT-3 ist auch in der aufkonzentrierten fraglichen MT-3-Fraktion deutlich vorhanden. In den nicht aufkonzentrierten Fractionen sind die Banden nur schwach zu erkennen, die MT-3-Konzentration war für den Nachweis mittels Western Blot zu gering. In nicht aufgereinigten Fractionen der Trennung des Gehirncytosols nur über die Superdex 75PG-Säule war der Nachweis gar nicht möglich.

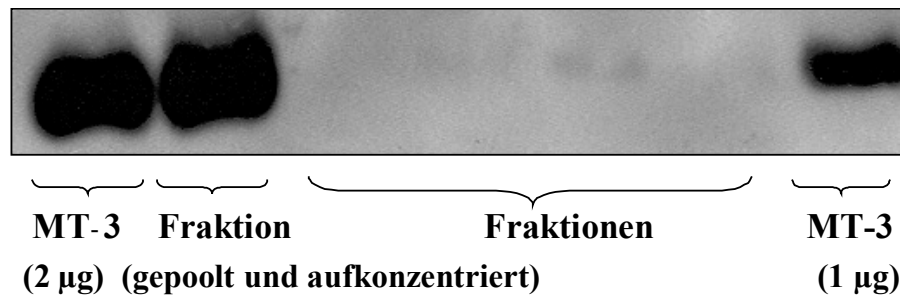


Abb. 6-11 : Western Blot von MT-3 enthaltenden Superdex 75PG-Fraktionen (Gehirn Schwein)

Mit diesem spezifischen Nachweis über Antikörper konnte definitiv bestätigt werden, daß der betrachtete Peak in den Elementprofilen der chromatographischen Trennung von Gehirncytosol auf der Superdex 75PG-Säule dem Metallothionein-3 entspricht¹¹².

6.2 Weitere Proteine in den Kupfer-, Zink-, Mangan-, Eisen-, Selen- und Iod-Profilen

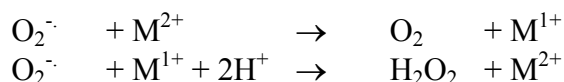
Zur Identifizierung von Proteinen in den Elementprofilen wurden zunächst chromatographische Trennungen von kommerziell erhältlichen Einzelproteinen (**Tab. 6-5**) über eine Superdex 75PG-Säule unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, wie sie für die Cytosolproben verwendet wurden. Ein Vergleich der Retentionszeiten der Einzelsubstanzen mit den Elementprofilen der Cytosolproben lieferte erste Hinweise auf die Identität der Signale in den Elementprofilen. Zur Bestätigung wurden die vermuteten Proteine - soweit möglich - in den gesammelten Fraktionen der chromatographischen Läufe mit spezifischen Nachweismethoden bestimmt, z.B. über ihre Enzymaktivitäten oder mit immunochemischen Methoden.

Tab. 6-5: Für Einzelläufe verwendete Metalloproteine bzw. iodhaltige Substanzen

Substanz	Element	Molmasse [g·mol ⁻¹]	Spezies
Superoxid Dismutase	Cu, Zn, Mn	32000	human
Ferritin	Fe	450000	Pferd
Katalase	Fe	245000	Rind
Transferrin	Fe	80000	human
Hämoglobin	Fe	64500	human
Myoglobin	Fe	17000	Pferd
Glutathion Peroxidase	Se	84000	Rind
Albumin	Zn	67000	human
Thyroglobulin	I	660000	Schwein
Thyroxinbindendes Globulin	I	58000	human
L-Thyroxin	I	777	
3, 3', 5-Triiod-L-thyronin	I	651	
Kaliumiodid	I	166	
Kaliumiodat	I	214	

6.2.1 Superoxid Dismutase (Kupfer/Zink, Mangan)

Die Superoxid Dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) trägt zum Schutz des Organismus vor schädlichen Superoxid-Radikalen bei. Hierbei handelt es sich um ein Radikalanion, das bei vielen biologischen Reaktionen als reaktives Zwischenprodukt bei der Sauerstoffreduktion gebildet wird. Es disproportioniert zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff. Die SOD katalysiert diese Reaktion in zwei diffusionskontrollierten Teilschritten^{128, 113}:



mit M: Zn, Cu, Fe oder Mn. Die Gesamtreaktion ist:



Das entstehende Zerfallsprodukt Wasserstoffperoxid wird von der Katalase (siehe Kapitel 5.4.1) entfernt.

SOD tritt in mehreren Isoformen auf, die sich in ihrer Metallbeladung unterscheiden¹²⁸. So kommt die Kupfer/Zink-abhängige SOD vorwiegend im Cytosol eukaryotischer Zellen vor. Sie hat eine Molmasse von 32000 g·mol⁻¹ und besteht aus zwei identischen Untereinheiten, die jeweils ein Kupfer- und ein Zinkatom im aktiven Zentrum binden. Sie wird in der Leber synthetisiert⁵⁴. Bakterien enthalten dagegen eine manganabhängige SOD von etwa 46000 g·mol⁻¹, bestehend aus zwei Untereinheiten mit je einem Manganatom. Auch in eukaryotischen Zellen kommt eine manganabhängige SOD vor, und zwar in der mitochondrialen Matrix. Sie ist im Gegensatz zur prokaryotischen Mangan-SOD tetramer mit einer Molmasse von ca. 100000 g·mol⁻¹. Sie ist empfindlicher gegenüber Denaturierung durch Hitze oder Chemikalien als die cytosolische Kupfer/Zink-SOD¹²⁸. Eine aus zwei Untereinheiten mit je einem Eisenatom bestehende eisenabhängige SOD (ca. 43000 g·mol⁻¹) wurde nur aus Bakterien und aus einigen Pflanzen isoliert. Außerdem wurde eine hybride SOD mit je einem Mangan- und einem Eisenatom beschrieben. Die extrazelluläre Kupfer/Zink-abhängige SOD ist ein tetrameres Glykoprotein (etwa 104000 g·mol⁻¹) und kommt in extrazellulären Flüssigkeiten wie Plasma, Lymphe und synovialer Flüssigkeit vor. Die Isoformen werden durch verschiedene Substanzen in ihrer Wirkung inhibiert und können so unterschieden werden (Kupfer/Zink-SOD durch Cyanid und H₂O₂, Mangan-SOD durch SDS, Eisen-SOD durch H₂O₂)¹²⁸.

Kommerziell erhältliche humane cytosolische Kupfer/Zink-SOD hat auf der Superdex 75PG-Säule eine Retentionszeit von 29 min. An dieser Stelle tritt auch in den Kupfer- und Zink-Profilen von Gehirncytosol ein Peak auf (siehe **Abb. 6-12**). Es wird deshalb vermutet, daß es sich bei diesem Peak um Kupfer/Zink-SOD handelt. Mit der manganabhängigen SOD konnte kein Einzellauf durchgeführt werden, da humane Mangan-SOD kommerziell nicht erhältlich ist und die prokaryotische Mangan-SOD eine niedrigere Molmasse hat.

Zur Bestätigung der Identität wurde die SOD-Enzymaktivität in aufgefundenen Fraktionen der chromatographischen Trennung von humanem Gehirncytosol bestimmt. Eine direkte Messung der SOD-Aktivität ist wegen der Instabilität des Superoxid-Radikals als Substrat schwierig. Deshalb wird auf indirekte Methoden zurückgegriffen, bei denen O₂^{·-} in einer Reaktionsmischung erzeugt wird, die einen Indikator für das Superoxid-Radikal enthält¹²⁸. Die SOD-Aktivität wurde mit einem Ransod-Kit der Firma Radox Laboratories GmbH (Krefeld, Deutschland) gemessen. Diese Methode benutzt Xanthin und Xanthin Oxidase (XOD), um Superoxid-Radikale zu produzieren, die mit 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium-chlorid (INT) reagieren und einen roten Formazan-

Farbstoff bilden. Die SOD-Aktivität wird durch den Grad der Hemmung dieser Reaktion bestimmt. Die Zunahme der Absorption des Farbstoffes wurde bei 505 nm und 37°C kinetisch verfolgt. Die Methode wurde mittels Referenzproben bekannter SOD-Konzentration (Vollblut, Rind) überprüft.

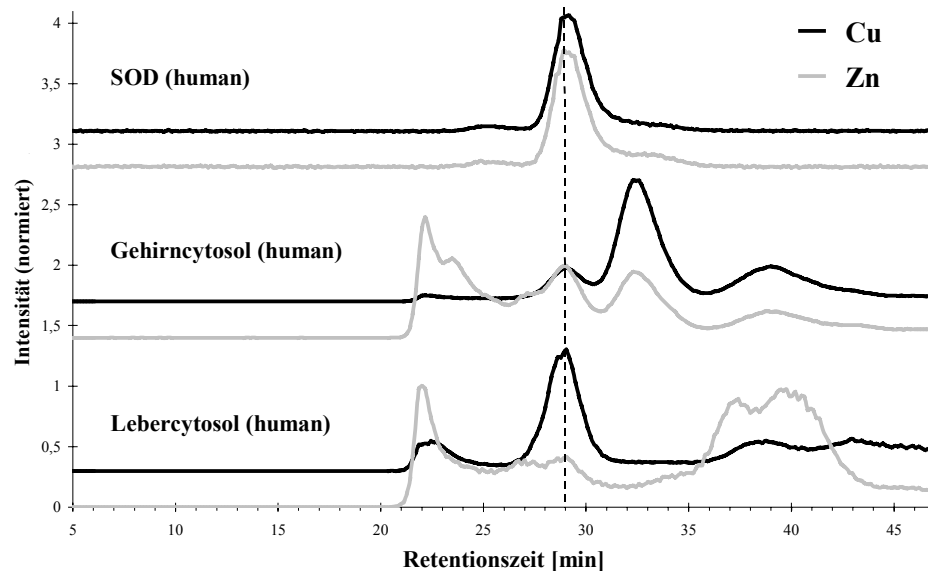


Abb. 6-12 : Vergleich der Retentionszeit eines SOD-Einzellaufes mit den Kupfer- und Zink-Profilen von humanem Gehirn- und Lebercytosol (frontale Region, Kontrolle bzw. Sepsis-Patient)

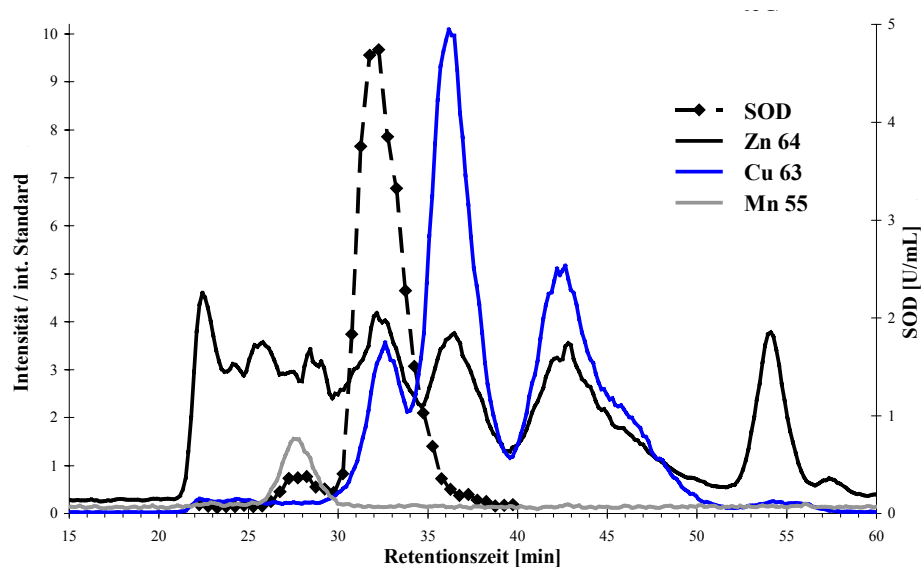


Abb. 6-13 Vergleich der SOD-Aktivität in den Fraktionen von humanem Gehirncytosol (frontobasale Region, Kontrolle) mit den Kupfer-, Zink- und Mangan-Profilen der chromatographischen Trennung

Abb. 6-13 zeigt den Vergleich der SOD-Aktivitäten in den Fraktionen mit den Kupfer-, Zink- und Mangan-Profilen des humanen Gehirncytosols. Das Maximum der SOD-Aktivität stimmt mit dem vermuteten, Kupfer und Zink enthaltenden SOD-Signal überein.

Es kann daraus geschlossen werden, daß es sich bei diesem Peak um die Kupfer/Zink-abhängige SOD handelt ¹²⁹.

Ein weiteres SOD-Aktivitätsmaximum stimmt mit einem Signal im Mangan-Profil überein. Dieses wird deshalb der manganabhängigen SOD zugeordnet. Die Molmasse ist wie erwartet höher als bei der Kupfer/-Zink-abhängigen SOD. Die manganabhängige SOD kommt eigentlich vorwiegend in den Mitochondrien vor, durch Zerstörung dieser Organellen bei der Homogenisierung kann sie jedoch auch ins Cytosol gelangen.

6.2.2 Ferritin (Eisen)

Ferritin ist der wichtigste Eisenspeicher im menschlichen Organismus, der 20% des Eisens intrazellulär bindet. Dadurch wird das in ungebundener Form potentiell schädliche Eisen dem Organismus entzogen und ist trotzdem in einer leicht bioverfügbaren Form schnell wieder mobilisierbar. Die Gefahr, die von Eisen für den Organismus ausgeht, liegt in mit Eisen verbundenen Redoxreaktionen. Fe^{2+} kann Sauerstoff zum Superoxid-Radikal reduzieren, welches wiederum in der Haber-Weiss-Fenton-Reaktionssequenz zur Bildung des Hydroxyl-Radikals führt, das ein aggressives Oxidans ist und Proteine und Nukleinsäuren angreift sowie Lipidperoxidation auslöst ¹³⁰.

Ferritin hat eine Molmasse von $450000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und wird aus 24 Untereinheiten zweier in verschiedenen Geweben unterschiedlich verteilten Isoformen gebildet: H Ferritin (ca. $21000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) und L Ferritin (ca. $19500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Sie formen eine Proteinhohlkugel, in der bis zu 4500 Eisenatome in einer Ferrihydrit-ähnlichen Verbindung mit Phosphaten eingelagert werden können. Ferritin kommt besonders in Leber, Milz, Knochenmark und Darmschleimhaut vor ^{130, 131}.

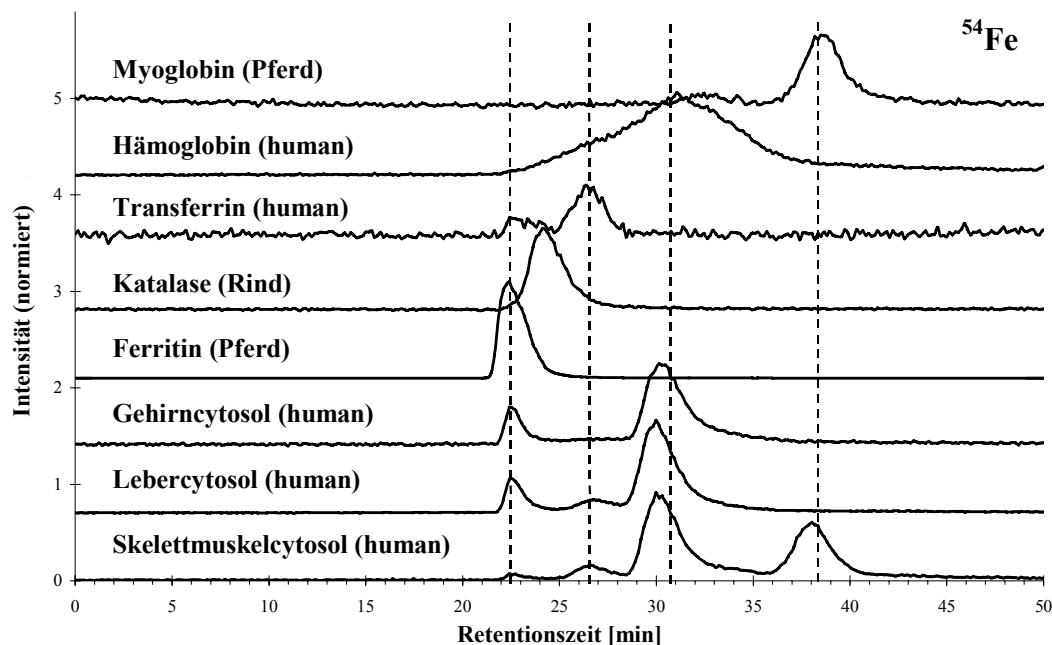


Abb. 6-14 : Vergleich der Retentionszeiten von Eisenprotein-Einzelläufen (Ferritin, Katalase, Transferrin, Hämoglobin, Myoglobin) mit den Eisen-Profilen unterschiedlicher humaner Organe (Gehirn, Leber, Skelettmuskel; Sepsis-Patient)

Abb. 6-14 zeigt den Vergleich eines Einzellaufes von Ferritin (Pferd) mit den Eisen-Profilen chromatographischer Trennungen von Cytosolen humaner Organe: Gehirn, Leber und Skelettmuskel. Ferritin sollte durch seine hohe Molmasse im Ausschlußpeak eluieren, was sich für die Einzelsubstanz mit einer Retentionszeit von 22,5 min bestätigt. Ein Eisen-Signal mit der gleichen Retentionszeit findet sich auch bei den betrachteten Organen. Zur Überprüfung der Identität des vermuteten Ferritin-Peaks wurde die Ferritin-Konzentration in den aufgefundenen Fraktionen von humanem Gehirn- und Skelettmuskelcytosol bestimmt. Der Nachweis erfolgte mit einem ELISA-Kit der Firma Orgentec Diagnostika GmbH (Mainz, Deutschland) mit hochspezifischen anti-human-Ferritin Antikörpern. Ein ELISA nutzt die Spezifität der Antigen-Antikörper-Reaktion aus, welche an eine enzymatische Reaktion gekoppelt ist, durch deren katalytische Wirkung der Meßeffect verstärkt wird⁹¹. Ferritin in der Probe wird spezifisch von einem in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte immobilisierten Antikörper gebunden. Es sind keine Kreuzreaktionen zu anderen Proteinen bekannt¹³¹. Die Antikörper-Ferritin-Komplexe werden wiederum spezifisch durch das danach zugegebene Enzymkonjugat von anti-human-Ferritin-Antikörpern und Meerrettich-Peroxidase erkannt und binden an dieses. Das zugegebene Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) wird durch die Meerrettich-Peroxidase in ein gefärbtes Produkt umgesetzt, welches photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm bei Raumtemperatur gemessen wird. Die Farbentwicklung ist direkt proportional zur Ferritin-Konzentration in der Probe¹³¹. Die Richtigkeit der Messungen wurde anhand einer positiven und negativen Kontrollprobe überprüft.

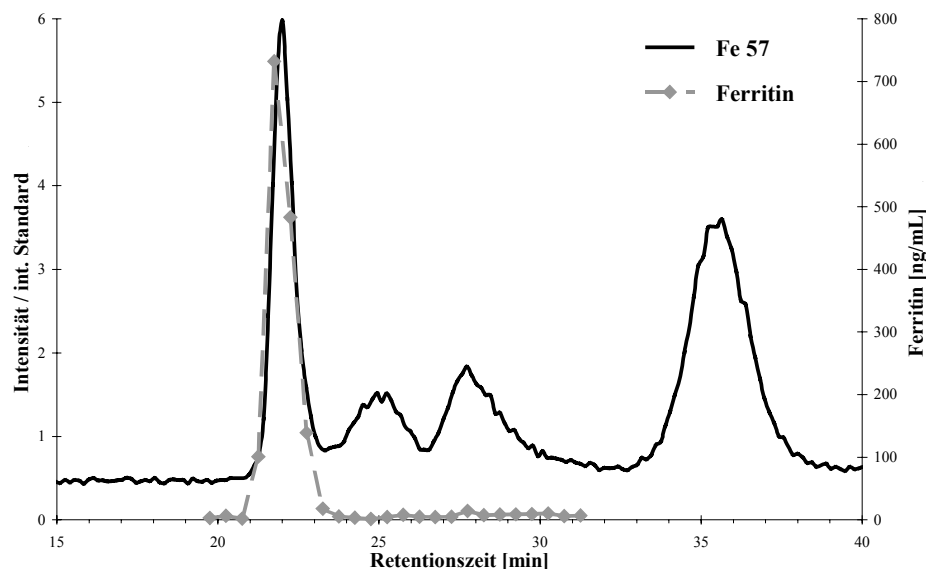


Abb. 6-15 Vergleich der Ferritin-Konzentration in den Fraktionen von humanem Skelettmuskelcytosol (Sepsis-Patient) mit dem Eisen-Profil der chromatographischen Trennung

Abb. 6-15 zeigt die Ferritin-Konzentration in den Fraktionen von humanem Skelettmuskelcytosol verglichen mit dem Eisen-Profil der chromatographischen Trennung. Die höchste Ferritin-Konzentration stimmt tatsächlich mit dem vermuteten Ferritin-Eisen-Peak überein. Das Vorhandensein von Ferritin im Ausschlußpeak wurde somit bestätigt. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß gegebenenfalls noch weitere hochmolekulare Substanzen, welche auch Eisen binden, in diesem Peak eluieren. Die gleiche Übereinstimmung wurde auch für die Fraktionen des Gehirncytosols gefunden. Der Nachweis von Ferritin in den Fraktionen von Schweinelebercytosol war nur

eingeschränkt möglich, vermutlich weil die anti-human-Ferritin-Antikörper kaum mit Ferritin einer anderen Spezies reagieren.

6.2.3 Hämoglobin (Eisen)

Hämoglobin ist der rote Blutfarbstoff in den Erythrozyten der Wirbeltiere. Er wird in den blutbildenden Zellen synthetisiert (Erythropoese). Es handelt sich um ein tetrameres Eisenprotein, dessen Untereinheiten aus je einer Globinkette mit einer prosthetischen Hämgruppe bestehen, deren Fe^{2+} -Ion reversibel Sauerstoff binden kann. Je zwei Globinketten sind einander gleich. Zusammen bilden sie ein globuläres Molekül mit einer Molmasse von $64500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Die Aufgabe des Hämoglobins besteht im Sauerstofftransport von der Lunge zu den peripheren Organen sowie auch dem Abtransport von Kohlendioxid zur Lunge⁹¹.

In den untersuchten Gewebecytosolen erscheint Hämoglobin als Verunreinigung durch Blut, welches nicht vollständig aus den Gewebeproben entfernt werden konnte.

In **Abb. 6-14** ist das Eisen-Profil eines Einzellaufes von humanem Hämoglobin im Vergleich zur chromatographischen Trennung von humanem Gehirn-, Leber- und Skelettmuskelcytosol gezeigt. Hämoglobin hat eine Retentionszeit von etwa 31 min. In den Organcytosolen findet sich ein Eisen-Peak bei einer ähnlichen Retentionszeit. Die Elution der Einzelsubstanz Hämoglobin ist durch eine wesentlich höhere Konzentration etwas verschoben.

Zum Nachweis des Hämoglobins wurden Fraktionen eines chromatographischen Laufes von Lebercytosol vom Schwein aufgefangen. Die dem fraglichen Hämoglobin-Peak entsprechenden Fraktionen wiesen eine rotbraune Färbung auf, ein weiterer Hinweis auf Hämoglobin.

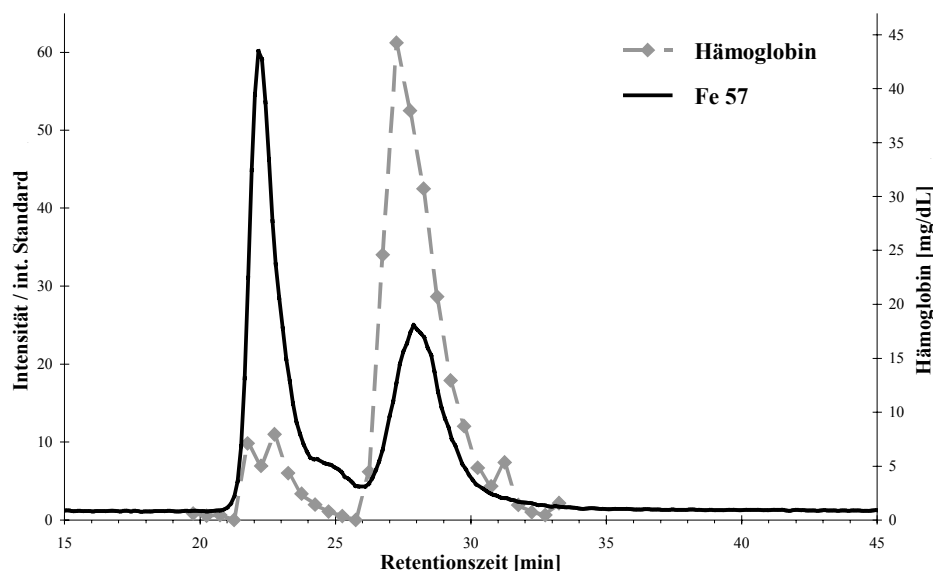


Abb. 6-16 Vergleich der Hämoglobin-Konzentration in den Fraktionen von Lebercytosol (Schwein) mit dem Eisen-Profil der chromatographischen Trennung

Die Hämoglobin-Konzentration wurde mit dem Sigma Diagnostics Kit Plasma Hämoglobin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) gemessen. Es

handelt sich um eine photometrische Bestimmung bei 600 nm (Raumtemperatur). Hämoglobin wirkt katalytisch auf die Benzidinoxidation durch Wasserstoffperoxid. Die Menge des gebildeten Farbstoffes ist der Hämoglobin-Konzentration in der Probe proportional. Der genaue Reaktionsmechanismus ist nicht endgültig geklärt. Da Benzidin kanzerogen ist, wird es durch das ungefährlichere, aber ähnlich effektive Benzidinderivat TMB ersetzt¹³². Zur Überprüfung der Messungen wurden zwei Kontrollen verschiedener Hämoglobin-Konzentration mitgemessen.

Die Hämoglobin-Konzentrationen in den Fraktionen von Lebercytosol (Schwein) sind in **Abb. 6-16** im Vergleich zum Eisen-Profil der chromatographischen Trennung aufgetragen. Im humanen Muskelcytosol lag Hämoglobin unter der Nachweisgrenze. Der photometrische Nachweis scheint in geringem Maße auch mit Ferritin in der Probe zu reagieren. Die maximale Hämoglobin-Konzentration stimmt jedoch mit dem vermuteten Hämoglobin-Peak im Eisen-Profil überein, der somit Hämoglobin zugeordnet wird.

6.2.4 Myoglobin (Eisen)

Myoglobin ist wie Hämoglobin und Katalase ein hämhaltiges Protein. Es kommt vorwiegend in den Zellen der quergestreiften Muskulatur (Skelettmuskel) sowie im Herzmuskel vor¹³³. Die Struktur ist dem Hämoglobin ähnlich, enthält jedoch nur eine Globinkette und hat eine Molmasse von $17000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Myoglobin dient der Sauerstoffversorgung der Muskeln. Die Affinität zum Sauerstoff ist größer als beim Hämoglobin, so daß der Sauerstoff vom Blut ins Myoglobin wandert und dort gespeichert wird⁹¹.

Myoglobin (Pferd) hat als Einzelsubstanz eine Retentionszeit von 38,5 min auf der Superdex 75PG-Säule (siehe **Abb. 6-14**). Der Vergleich mit den Eisen-Profilen von humanem Gehirn-, Leber- und Skelettmuskelcytosol zeigt, daß ein Peak entsprechender Retentionszeit nur im Muskelcytosol vorkommt. Dies spricht für dessen Identität als Myoglobin.

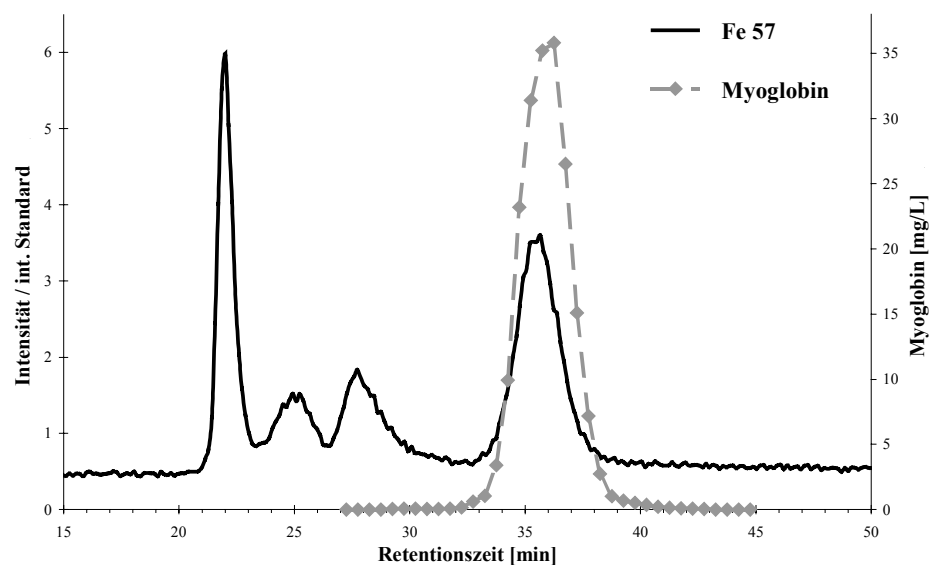


Abb. 6-17 Vergleich der Myoglobin-Konzentration in den Fraktionen von humanem Skelettmuskelcytosol (Sepsis-Patient) mit dem Eisen-Profil der chromatographischen Trennung

Zur Überprüfung wurde die Myoglobin-Konzentration in den Fraktionen der chromatographischen Trennung von humanem Skelettmuskelcytosol gemessen. Die Bestimmung erfolgte immunochemisch mit dem Turbidimetriesystem der Firma Dade Behring Marburg GmbH (Marburg, Deutschland). Die Turbidimetrie ist eine kinetische Trübungsmessung, welche die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen nutzt. Die entstehenden Agglutinate von Myoglobin und den Antikörpern im Reagenz erzeugen eine Trübung, die photometrisch gemessen wird¹³³. Anhand von Standards mit bekannter Konzentration wurden die Messungen überprüft.

In **Abb. 6-17** sind die erhaltenen Myoglobin-Konzentrationen in den Fraktionen von humanem Muskelcytosol zusammen mit dem Eisen-Profil des chromatographischen Laufes aufgetragen. Das Konzentrationsmaximum stimmt mit dem vermuteten Myoglobin-Peak im Eisen-Profil gut überein, der somit identifiziert werden konnte.

6.2.5 Transferrin (Eisen)

Transferrin ist ein in der Leber gebildetes einkettiges Glykoprotein mit einer Molmasse von etwa $80000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ¹³⁰. Es dient im Serum dem Transport von Eisen, welches für die Erythropoese gebraucht oder beim Hämoglobinabbau freigesetzt wird. Transferrin wird durch rezeptorvermittelte Endocytose in die Zielzellen aufgenommen und das Eisen dort freigesetzt. Apo-Transferrin gelangt durch Exocytose wieder in die extrazelluläre Flüssigkeit⁹¹. Normalerweise ist das gesamte nicht-Häm-Eisen im Serum an Transferrin gebunden, wobei das transferringebundene Eisen nur 0,1% des Gesamteisenbestandes des Organismus darstellt¹³⁴.

Transferrin bindet reversibel zwei Mol Fe^{3+} pro Mol an zwei strukturell gleichen, aber funktionell unterschiedlichen Bindungsplätzen¹³⁰. Die Affinität zu anderen Metallen, wie Kupfer und Chrom, ist weitaus geringer als zu Eisen¹³⁴. Die Eisenbindung hängt von der Mitbindung eines synergistischen Anions, meist Carbonat, ab. Nur etwa 30 % der Eisenbindungsstellen im Transferrin sind normalerweise besetzt¹³⁰.

Kommerziell erhältliches humanes Transferrin hat auf der Superdex 75PG-Säule eine Retentionszeit von 26,5 min (siehe **Abb. 6-14**). Der Vergleich mit den Eisen-Profilen der chromatographischen Trennung von humanem Gehirn-, Leber- und Skelettmuskelcytosol zeigt ein Eisen-Signal bei gleicher Retentionszeit.

Zur Überprüfung, ob dieser Eisen-Peak in den Profilen der Cytosolproben Transferrin entspricht, sollte die Transferrin-Konzentration in den aufgefangenen Fraktionen von humanem Skelettmuskelcytosol gemessen werden. Die immunochemische Bestimmung wurde wie beim Myoglobin mit dem Turbitime-System der Firma Behring Diagnostics GmbH (Marburg, Deutschland) durchgeführt. Das Verfahren wurde mit einem Standard überprüft.

Transferrin konnte weder in den Fraktionen des untersuchten Muskelcytosols, noch im nicht chromatographisch aufgetrennten Gesamtcytosol einer Niere - beide von einem Sepsis-Patienten stammend - nachgewiesen werden. Die Frage ist demnach, ob Transferrin in den Fraktionen nicht vorhanden ist, oder ob es unter der Nachweisgrenze der verwendeten Methode liegt. Transferrin ist hauptsächlich ein Serumprotein, gelangt im Rahmen des Eisentransportes jedoch auch in die Zellen. Und da sich an den Gewebeproben immer noch Restblut befindet, können auch Serumproteine bei der Cytosolextraktion als Kontamination mit ins erhaltene Cytosol gelangen. Deshalb wird es als wahrscheinlich angenommen, daß auch Transferrin in den Cytosolproben vorhanden ist. Es stellt sich

damit die Frage nach der Konzentration des Transferrins in den Fraktionen. Es wurde folgende Abschätzung vorgenommen:

Im Eisen-Profil des Muskelcytosols kann der Höhe des Myoglobin-Eisen-Signals die gemessene Myoglobin-Konzentration zugeordnet werden (siehe Abschnitt 6.2.4). Damit wird über die bekannte Stöchiometrie (1 Eisen pro Molekül) eine ungefähre Eisenkonzentration für die Intensität des Peaks abgeleitet. Daraus läßt sich die Eisenkonzentration des vermuteten Transferrin-Peaks abschätzen. Über die Stöchiometrie von 2 Eisen pro Molekül Transferrin und mit einer angenommenen 30%igen Beladung des Moleküls¹³⁰ wird eine ungefähre Transferrin-Konzentration berechnet. Sie beträgt im vorliegenden Fall etwa $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Allerdings liegt durch das unbekannte tatsächliche Beladungsverhältnis eine relativ große Ungenauigkeit vor, vor allem im Fall eines Sepsis-Patienten. Da der Meßbereich des Turbiquant-Verfahrens bei $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ anfängt - als nicht mehr meßbarer Wert wird $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ angegeben -, liegen die abgeschätzten Werte für die höchstens vorhandene Transferrin-Konzentration in den Fraktionen genau im Bereich der Nachweisgrenze.

Um auszuschließen, daß alleine durch Sepsis bedingte pathologische Effekte die Transferrin-Konzentration unter die Nachweisgrenze drücken, wurden ebenfalls Messungen in Cytosolfractionen von Nicht-Sepsis-Patienten durchgeführt (humanes Gehirncytosol - Kontrolle und Alzheimer - sowie Lebercytosol - Zystenleber). Es konnte hier ebenfalls kein Transferrin gefunden werden. Damit wird angenommen, daß Transferrin in den Cytosolfractionen mit dem verwendeten, für normale Transferrinkonzentrationen im Serum ausgelegten Verfahren nicht nachgewiesen werden kann. Es ist ein klarer Nachteil dieser automatisierten Messung, daß der Kalibrierungsbereich nicht angepaßt werden kann, obwohl der immunochemische Nachweis an sich eine höhere Empfindlichkeit haben sollte. Andere, empfindlichere Nachweismethoden standen nicht zur Verfügung.

Im Eisen-Profil einer auf der Superdex 75PG getrennten Serumprobe, die Transferrin als größtes Eisen-Signal enthalten sollte¹³⁴, tritt ebenfalls ein Peak bei einer Retentionszeit von etwa 27 min auf. Deshalb liegt trotz allem die Vermutung nahe, daß es sich bei dem fraglichen Eisen-Peak auch in den Cytosolproben um Transferrin handelt.

6.2.6 Glutathion Peroxidase (Selen)

Glutathion Peroxidasen (GPx) (EC 1.11.1.9 und 1.11.1.12) sind Selenoenzyme, die Selenocystein im aktiven Zentrum enthalten. Sie katalysieren die Reduktion von Peroxiden durch Oxidation von Glutathion (GSH) und tragen damit zum Schutz des Organismus vor Oxidantien bei¹³⁵.

Bis heute sind fünf verschiedene GPx bekannt¹³⁶. Die cytosolische GPx ist ubiquitär im Organismus verbreitet. Besonders hohe Konzentrationen finden sich in Organen mit hoher Peroxidproduktion wie Leber, Niere, Lunge oder Erythrozyten¹³⁵. Sie besteht aus vier identischen Untereinheiten, die jeweils ein Selenocystein enthalten, und hat eine Molmasse von etwa $88000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ¹³⁶. Die Plasma GPx, ein tetrameres Glykoprotein von ca. $100000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ¹³⁷, wurde zuerst im Blutplasma entdeckt. Sie kommt in extrazellulären Flüssigkeiten vor und wird in verschiedenen Geweben in Kontakt mit diesen Flüssigkeiten exprimiert, hauptsächlich in der Niere. Die gastrointestinale GPx ist ebenfalls ein Tetramer, mit einer Molmasse von etwa $88000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ¹³⁶. Sie wird nur im Verdauungstrakt - beim Menschen auch in der Leber - exprimiert und schützt vor mit der Nahrung aufgenommenen Hydroperoxiden. Die Tatsache, daß sie auch bei Selenmangel

stark exprimiert wird, weist auf weitere vitale Funktionen hin¹³⁵. Die hydrophobe Phospholipid Hydroperoxid GPx, ein Monomer mit einer Molmasse von etwa 20000 g·mol⁻¹, trat zuerst durch ihre Fähigkeit hervor, komplexe peroxidierte Lipide umsetzen zu können, selbst wenn diese in Biomembranen integriert sind¹³⁸. Sie spielt auch eine wichtige Rolle in der Spermatogenese¹³⁶. Die erst kürzlich von Pfeifer et al. beschriebene fünfte Gpx, die Spermienkern GPx, ist ein 34000 g·mol⁻¹ Selenoprotein, das spezifisch in Spermakernen vorkommt und Gemeinsamkeiten mit der Phospholipid Hydroperoxid GPx aufweist. Sie ist als Protamin-Thiol-Peroxidase für die Disulfidvernetzung während der Chromatinkondensation notwendig¹³⁹.

Allen GPx ist die Eigenschaft gemeinsam, Hydroperoxide unter gleichzeitiger Oxidation von Glutathion zu reduzieren, wobei auch andere Substrate in Frage kommen können¹³⁵. Sie unterscheiden sich in ihrer Spezifität für verschiedene Peroxide: Die cytosolische und die gastrointestinale GPx reduzieren Hydroperoxide wie Wasserstoffperoxid und einige lösliche organische Peroxide (z.B. von Fettsäuren oder Cumen Peroxid). Die Phospholipid Hydroperoxid GPx und teilweise die Plasma GPx können auch Hydroperoxide komplexerer Lipide umsetzen¹³⁵.

GSH wird bei der Reduktion von Peroxiden in die oxidierte Form (GSSG) überführt. GSSG wird anschließend in Anwesenheit von Glutathion Reduktase und Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) zurück in die reduzierte Form umgewandelt und steht damit wieder zum Abbau von Peroxiden zur Verfügung. Dabei wird NADPH zu NADP⁺ oxidiert¹⁴⁰:

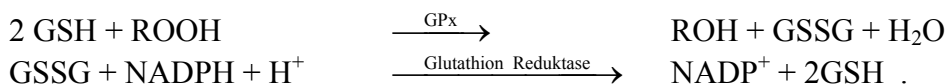


Abb. 6-18 zeigt den Vergleich eines Einzellaufes von cytosolischer GPx (Rind) mit den Selen-Profilen der chromatographischen Trennung von humanem Gehirn- und Lebercytosol. Die Einzelsubstanz hat eine Retentionszeit von 26 min auf der Superdex 75PG-Säule. Ein Selen-Peak mit vergleichbarer Retentionszeit findet sich auch bei den Cytosolproben.

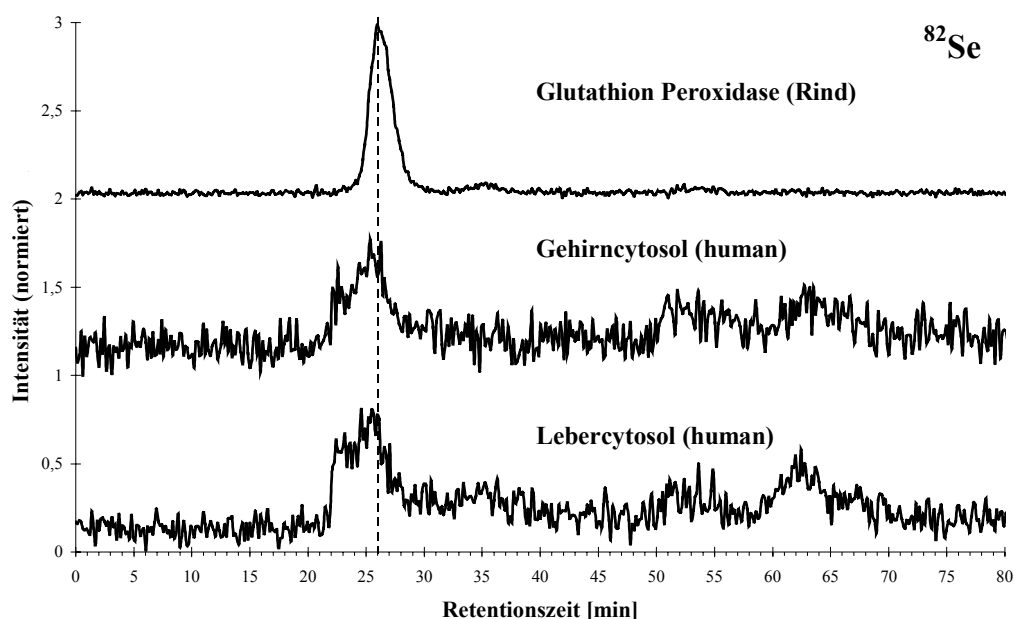


Abb. 6-18 : Vergleich der Retentionszeit eines GPx-Einzellaufes (cytosolische Gpx, Rind) mit dem Selen-Profil der chromatographischen Trennung von humanem Gehirn- und Lebercytosol (Sepsis-Patient)

Zur Überprüfung der Identität des vermuteten GPx-Peaks wurde die GPx-Aktivität in den Fraktionen einer chromatographischen Trennung von Lebercytosol (Schwein) gemessen. Die Bestimmung der GPx-Aktivität erfolgte mit dem Ransel-Kit der Firma Randox Laboratories GmbH. Die Messung basiert auf der Methode von Paglia und Valentine¹⁴¹. GSH wird in diesem Fall, katalysiert durch GPx, durch Cumen Peroxid oxidiert, GSSG in Anwesenheit von Glutathion Reduktase und NADPH wieder reduziert. Die dabei erfolgende Oxidation von NADPH zu NADP⁺ wird über die Abnahme der Absorption bei 340 nm und 37°C verfolgt¹⁴⁰. Zur Kontrolle der Messungen wurde eine Probe bekannter GPx-Konzentration mitgemessen.

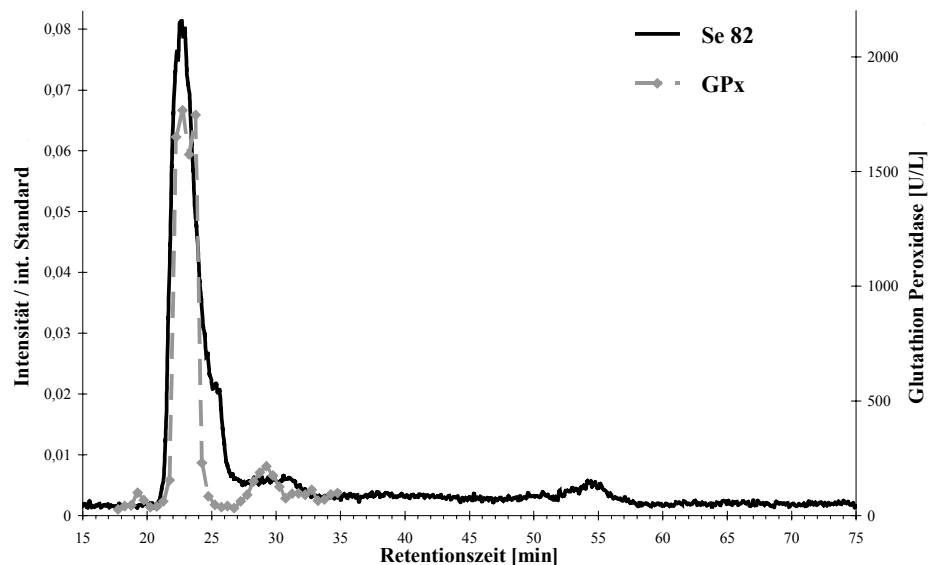


Abb. 6-19 Vergleich der GPx-Konzentration in den Fraktionen von Lebercytosol (Schwein) mit dem Selen-Profil der chromatographischen Trennung

Abb. 6-19 zeigt die in den einzelnen Fraktionen bestimmte GPx-Aktivität im Vergleich zum Selen-Profil der chromatographischen Trennung. Der Aktivitätspeak stimmt mit dem Hauptpeak im Selen-Profil überein, der somit der GPx zugeordnet wird.

Der GPx-Hauptpeak in **Abb. 6-19** ist ein Doppelpeak, der reproduzierbar gemessen wurde. In den Selen-Profilen von Cytosolproben wurden teilweise auch Doppelpeaks gefunden, was bei der Messung nahe der Nachweisgrenze nicht immer leicht zu erkennen ist (siehe **Abb. 6-18**). Es kann sich dabei um verschiedene Isoformen der GPx handeln. Neben der cytosolischen GPx wird auch die Plasma GPx in einigen Organen exprimiert¹³⁵ oder kann über Blutreste an den Geweben in die Cytosole gelangen. Die Plasma GPx hat eine höhere Molmasse als die cytosolische GPx und sollte deshalb tatsächlich bei einer etwas kürzeren Retentionszeit eluieren. Selen kann natürlich auch nur unspezifisch an große Proteine im Ausschlußpeak gebunden sein. Der Doppelpeak der GPx-Aktivität würde für das Vorhandensein von verschiedenen Isoformen der GPx sprechen. Es besteht allerdings auch die Möglichkeit einer Interferenz der GPx-Bestimmung durch Katalase: Diese hat neben der katalatischen Aktivität der Zerlegung von Wasserstoffperoxid auch eine peroxidatische Aktivität der Oxidation von H-Donoren unter Verbrauch von Peroxiden¹⁰⁹. Peroxide geben fälschlich erhöhte GPx-Werte im Ransel-Test¹⁴⁰. Die Katalase hat im Einzellauf eine Retentionszeit von etwa 24 min (siehe **Abb. 6-14**) und würde somit genau dem zweiten Aktivitätspeak in **Abb. 6-19** entsprechen.

Es treten weitere kleinere Aktivitätsmaxima auf. Der Peak bei $RT=19$ min kann vernachlässigt werden, da er sich noch vor dem Ausschlußpeak der Säule befindet. Eine weitere gemessene Aktivität entspricht einer Retentionszeit von 29 min (**Abb. 6-19**). Es wurde überprüft, ob eine unspezifische Oxidation des NADPH ohne Cumen Peroxid stattfindet. Dies war nicht der Fall. Es besteht die Möglichkeit, daß eine andere NADPH-umsetzende Reaktion stattfindet, die möglicherweise mit der bei $RT=29$ min eluierenden SOD im Zusammenhang steht. Im Selen-Profil ist jedoch ebenfalls ein kleiner Peak vorhanden. Es könnte sich daher um Selenoprotein P handeln, ein extrazelluläres, monomeres Glykoprotein, welches bis zu 10 Selenocysteine enthält¹⁴². Es wird hauptsächlich in der Leber gebildet, ist ubiquitär in verschiedenen Geweben verteilt und hat einen Anteil von mindestens 40% der Selenkonzentration im Serum. Bei unterschiedlichen Formen wurden Molmassen von 45000 bis 57000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ bestimmt. Dies würde mit einer Retentionszeit von 28-29 min übereinstimmen. Neben einer Funktion als Transportprotein wird auch eine Rolle als Antioxidans vermutet. Eine der Phospholipid Hydroperoxid GPx vergleichbare enzymatische Aktivität von Selenoprotein P wurde in vitro nachgewiesen¹⁴².

Andere in den Elementprofilen auftretende Selen-Peaks können Selenoproteinen wie Selenoprotein W, der Phospholipid Hydroperoxid GPx oder Deiodasen (siehe Kapitel 8) entsprechen. Selenoprotein W hat eine Molmasse von etwa 10000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ¹⁴³, was einer Retentionszeit von ca. 54 min entspricht. Im Selen-Profil (**Abb. 6-19**) ist tatsächlich ein Signal zwischen $RT=53$ und 55 min zu erkennen. Die höchste Konzentration an Selenoprotein W wurde in Skelettmuskel, Herzmuskel und Gehirn gefunden. Die Funktion ist bis heute unbekannt, eine antioxidative Rolle wird vermutet¹⁴³.

6.2.7 Albumin (Zink)

Albumin ist das Hauptprotein im Serum. Es trägt zur Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks des Blutes bei und dient dem Organismus als Aminosäurenreserve. Albumin fungiert als Transportprotein für Ionen (Magnesium, Calcium) und Spurenelemente sowie für lipophile Substanzen wie langkettige Fettsäuren, Bilirubin, Pharmaka, einige Steroidhormone und Vitamine^{102, 144}. Es hat eine Molmasse von 67000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ¹⁰². Die Proteinkette unterteilt sich in verschiedene, durch Disulfid-Brücken gebildete Domänen^{145, 144}. Albumin wird in der Leber synthetisiert, dort verbleibt jedoch weniger als 1% des Albumins im Organismus. Neben dem Albumin-Gehalt im Serum befindet sich ein Großteil in Haut und Skelettmuskel¹⁴⁵.

Humanes Albumin hat als Einzelsubstanz eine Retentionszeit von etwa 26,5 min auf der Superdex 75PG-Säule (siehe **Abb. 6-20**). Neben Zink werden auch Kupfer und Eisen gebunden. Im Zink-Profil der chromatographischen Trennung von humanem Gehirn- und Lebercytosol treten im entsprechenden Retentionszeitbereich ebenfalls andeutungsweise Zink-Peaks auf. Eine leichte Verschiebung der Retentionszeiten im Vergleich zur Einzelsubstanz kann durch einen abweichenden Versuchsaufbau bedingt sein.

Es sollte geprüft werden, ob Albumin im Cytosol nachgewiesen werden kann. Die Messung der Albumin-Konzentration in den Fraktionen eines chromatographischen Laufes von humanem Skelettmuskelcytosol wurde turbidimetrisch mit einem Turbiquant-Reagenz der Firma Behring Diagnostics GmbH durchgeführt. Es wurde die Bestimmung für Albumin in Urin gewählt, da die interne Kalibrierung hierfür die beste Nachweisempfindlichkeit aufweist, die an die sehr kleinen Normalwerte von Albumin im

Urin angepaßt ist. Zur Kontrolle der Messungen wurden verdünnte Proben bekannter Konzentration mitbestimmt.

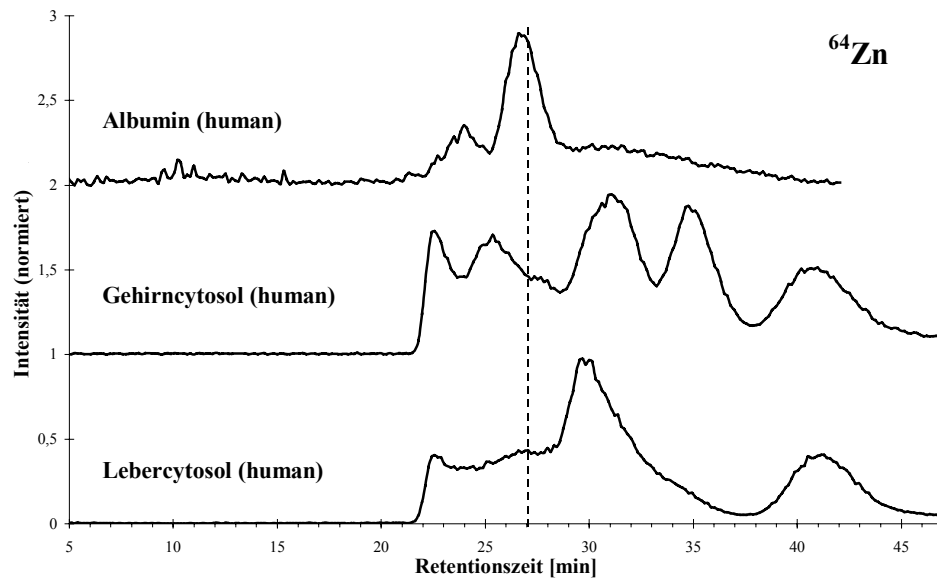


Abb. 6-20 : Vergleich der Retentionszeit eines Albumin-Einzellaufes mit den Zink-Profilen der chromatographischen Trennung von humanem Gehirn- und Lebercytosol (Sepsis-Patient)

Abb. 6-21 zeigt den Vergleich der gemessenen Albumin-Konzentrationen in den Fraktionen von humanem Skelettmuskelcytosol mit dem Zink-Profil der chromatographischen Trennung. Albumin kann in den Cytosolfractionen nachgewiesen werden, wobei die Konzentration gerade über der Nachweisgrenze der sehr empfindlichen Methode liegt. Die maximale Albumin-Konzentration stimmt mit einem schwachen Zink-Peak bei einer Retentionszeit von ca. 24,5 min im Zink-Profil überein. Dieser Peak wird somit dem Albumin zugeordnet.

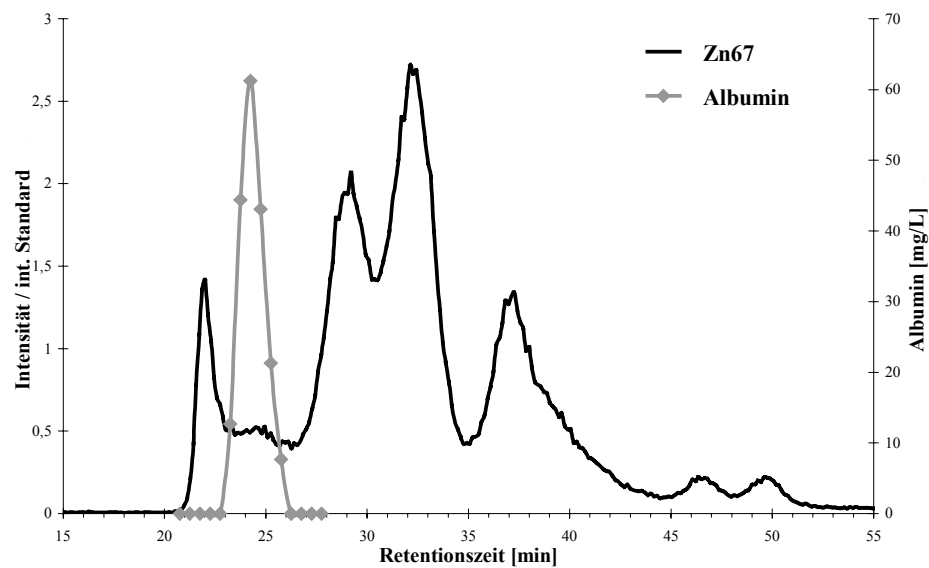


Abb. 6-21 : Vergleich der Albumin-Konzentration in den Fraktionen von humanem Skelettmuskelcytosol mit dem Zink-Profil der chromatographischen Trennung

6.2.8 Iodhaltige Substanzen

Iod kommt im menschlichen Organismus vor allem in Zusammenhang mit der Schilddrüse und den dort produzierten Hormonen vor: 99% des Iods im menschlichen Organismus befinden sich in der Schilddrüse⁹¹. Thyroglobulin, ein hochmolekulares, aus vier Untereinheiten bestehendes¹⁴⁴ Glykoprotein (Molmasse $660000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), macht ca. 75% der Trockenmasse der Schilddrüse aus. Es enthält 90% des organisch gebundenen Iods. Es ist das Trägermolekül für die Thyroidhormone. Das mit der Nahrung aufgenommene Iodid wird in die Tyrosinreste des Thyroglobulins eingebaut, über die Zwischenstufen Mono- und Diiod-L-tyrosin werden die Thyroidhormone (Iodaminosäuren) L-Thyroxin (3, 3', 5, 5'-Tetraiod-L-thyronin, T_4) (Molmasse $777 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) und 3, 3', 5-Triiod-L-thyronin (T_3) (Molmasse $651 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) gebildet, wobei letzteres auch durch Monodeiodierung aus T_4 entsteht⁹¹. Von etwa 120 Tyrosinresten pro Untereinheit¹⁴⁴ des Thyroglobulins sind normalerweise 10 bis 25 iodiert.

Die Thyroidhormone verbleiben zunächst in der Polypeptidkette des Thyroglobulins gebunden. T_3 ist in viel geringeren Mengen als T_4 vorhanden, ist jedoch biologisch fünfmal wirksamer. Das Thyreoidea-stimulierende Hormon (Thyrotropin) des Hypophysenvorderlappens, vom im Hypothalamus gebildeten Thyrotropin-Releasing-Hormon angeregt, steuert die Bildung und Freisetzung der Thyroidhormone ins Blut. Dort werden sie von Proteinen wie vor allem dem Thyroxinbindenden Globulin (TBG) (Molmasse $58000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) sowie dem Thyroxinbindenden Präalbumin (Molmasse $55000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) und Albumin transportiert. Biologisch aktiv sind nur die freien Hormone. Die Umwandlung von T_4 in T_3 sowie die Inaktivierung und der Abbau der Thyroidhormone erfolgt durch selenhaltige Isoenzyme, die Deiodasen, in verschiedenen Geweben¹⁴⁶.

Um die in den Iod-Profilen der chromatographischen Trennungen von Cytosolen auftretenden Peaks einordnen zu können, wurden Einzelläufe mit kommerziell erhältlichen iodhaltigen Substanzen (Thyroglobulin, TBG, T_3 , T_4) auf der Superdex 75PG-Säule durchgeführt. Um die Retentionszeit von niedermolekularen anorganischen Iodverbindungen festzustellen, wurden außerdem Kaliumiodid und Kaliumiodat auf die Säule aufgegeben. **Abb. 6-22** zeigt den Vergleich der Retentionszeiten der Einzelläufe mit den Iod-Profilen der chromatographischen Trennungen von verschiedenen Organcytosolen (human und Schwein).

Thyroglobulin eluiert - seiner hohen Molmasse entsprechend - im Ausschlußpeak bei etwa $RT=22 \text{ min}$, TBG bei etwa $RT=24 \text{ min}$. Diese Peaks sind auch in den Iod-Profilen von Gehirn 143, Gehirn Schwein, Leber und Schilddrüse zu finden, der Peak bei $RT=24 \text{ min}$ auch beim Gehirn des Sepsis-Patienten. Allerdings sind diese Signale im Verhältnis zu den anderen in den Profilen auftretenden Iod-Peaks sehr klein und deswegen in der **Abb. 6-22** schwer zu erkennen. Im Schilddrüsen-cytosol ist der vermutete Thyroglobulin-Peak bei $RT=22 \text{ min}$ wie zu erwarten der weitaus größte Peak im Iod-Profil. Es tritt hier auch die größte Anzahl verschiedener Iod-Peaks auf, die nicht-proteingebundenem Iod, den Thyroidhormonen sowie ihren Vorstufen entsprechen sollten.

Kaliumiodid, Kaliumiodat und T_4 eluieren bei etwa $RT=57,5 \text{ min}$. Dies entspricht von der Retentionszeit dem Permeationspeak für kleine Substanzen. Es scheint jedoch auch Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial zu geben, da Signale bei längeren Retentionszeiten auftreten. Dies scheint der Fall für T_3 mit einer Retentionszeit von $61,5 \text{ min}$ zu sein, wenn angenommen wird, daß der höchste Iod-Peak des Einzellaufes von T_3 der eigentlich gesuchten Substanz entspricht. In den Iod-Profilen der humanen und Schweinegehirncytosole sowie der verschiedenen humanen Organcytosole tritt jeweils ein Peak bei etwa $RT=58-59 \text{ min}$ auf. Bei tierischen Cytosolen ist es der einzige Peak. Auch

bei dem betrachteten Alzheimer-Patienten (siehe auch Kapitel 12.4.2) ist es der einzige Peak im Iod-Profil, wobei hier Iod nahe an der Nachweisgrenze liegt. Dies scheint dem nicht-proteingebundenen Iodanteil bzw. T_4 zu entsprechen. Beim Gehirncytosol 143, dem Gehirn - in **Abb. 6-22** wegen der Größenverhältnisse nicht zu erkennen - und der Schilddrüse des Sepsis-Patienten tritt ein Iod-Signal bei ca. RT=63 min auf, der dem T_3 entsprechen kann.

Bei den Organen des Sepsis-Patienten, einschließlich dem Gehirn, ist ein Peak bei RT=51 min, bei den Gehirnen 140 und 143 bei ca. RT=54 min erkennbar. Hier könnte es sich um weitere Bindungsformen der Thyroidhormone handeln. Es muß jedoch auch die Möglichkeit berücksichtigt werden, daß den Patienten iodhaltige Kontrastmittel verabreicht worden sein können. Dadurch kann die relative Intensität des dem anorganischen Iod-Peak bei RT=57,5 min entsprechenden Signals verändert werden. Durch unterschiedliche Metaboliten oder Bindungen an verschiedene Proteine können auch weitere Iod-Signale auftreten.

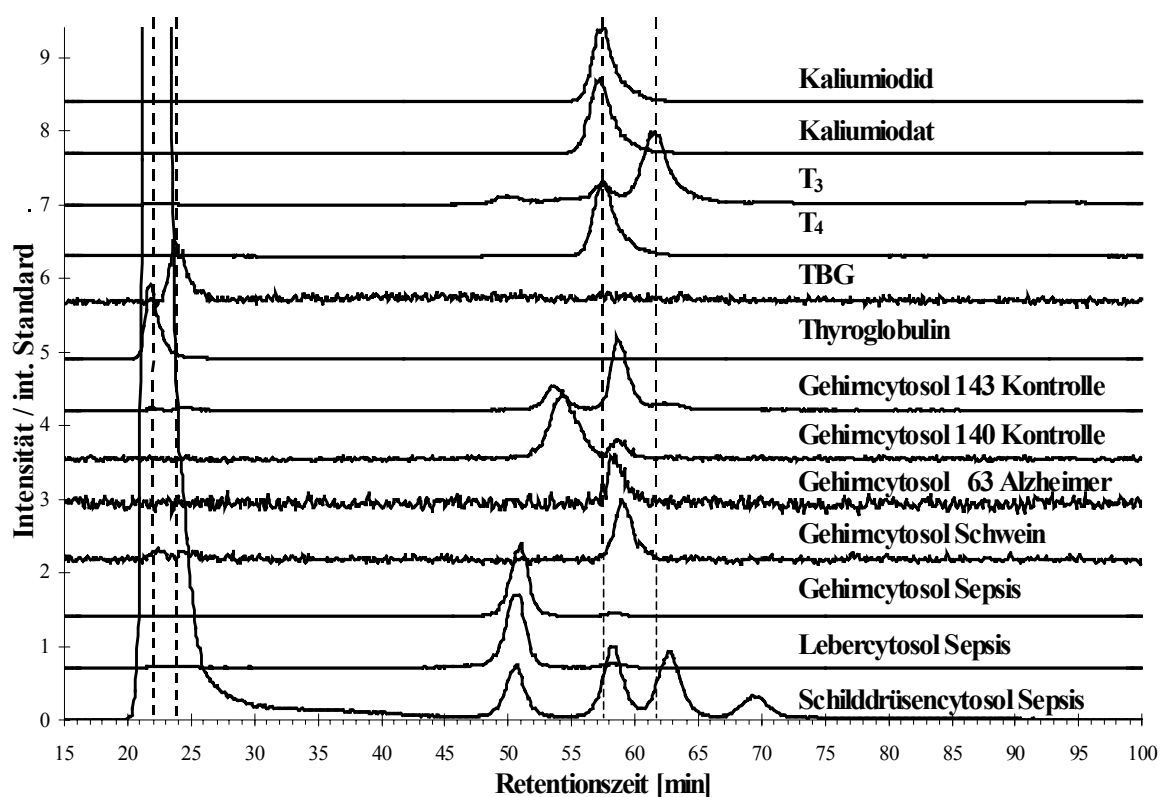


Abb. 6-22 : Vergleich der Retentionszeiten von iodhaltigen Substanzen (Thyroglobulin, TBG, T_3 , T_4 , Iodat, Iodid) mit den Iod-Profilen der chromatographischen Trennung der Cytosole verschiedener Organe: Gehirn (human - Kontrolle, Alzheimer, Sepsis-Patient - und Schwein), Leber, Schilddrüse (human, Sepsis-Patient)

Die vielfältigen Iod-Profile sind ein weiteres Beispiel für die Vielzahl der Informationen, die über die Kopplung von SEC mit ICP-MS gewonnen werden können. Jedes Elementprofil steht im Zusammenhang mit einer bestimmten Gruppe von Proteinen und kann zur Interpretation unterschiedlicher pathologischer Effekte herangezogen werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß über die Multielementdetektion der ICP-MS vielfältige Informationen on-line aus den chromatographischen Trennungen der cytosolischen Proteine gewonnen werden können. Jedes Elementprofil zeigt die Trennung verschiedener Proteine. Selbst wenn die Auflösung der Chromatographie nicht ausreicht, können Proteine getrennt betrachtet werden, wenn sie unterschiedliche Elemente binden.

In diesem Kapitel wurde gezeigt, wie Proteine anhand ihrer charakteristischen Eigenschaften und spezifisch über immunochemische Reaktionen in den Fraktionen der chromatographischen Trennungen nachgewiesen und somit den Elementsignalen zugeordnet werden konnten.

Sind die Proteine bekannt, können Vergleiche des Anteils bestimmter Proteine bzw. ihrer Elementgehalte im Cytosol bei verschiedenen pathologischen Zuständen gezogen werden. Dabei eröffnet jede Proteingruppe ein eigenes Untersuchungsfeld im Zusammenhang mit bestimmten Krankheiten.

Diese Arbeit konzentriert sich besonders auf die Metallothioneine. Im folgenden Kapitel werden - neben der Größenausschlußchromatographie - weitere Trennmethode betrachtet, die ergänzende Informationen über die Metallothioneine in den Cytosolproben liefern können.

7 Vergleichende Untersuchungen von Cytosolproben mit verschiedenen analytischen Trennmethode

Neben der Größenausschlußchromatographie kommen auch andere Trennmethode für die Auftrennung von Proteinen in Cytosolproben in Frage. Unterschiedliche Trennmechanismen liefern unterschiedliche Informationen über die Probenzusammensetzung.

Die SEC trennt die Probenmoleküle nach ihrer Größe bzw. dem Stoke'schen Radius. Deshalb können Analytmoleküle mit ähnlicher Größe - wie z.B. MT-1 und MT-2 - nicht unterschieden werden. Es können jedoch unterschiedliche Auflösungen in Abhängigkeit vom verwendeten Säulenmaterial erreicht werden.

Die Anionenaustauscherchromatographie trennt die Proteine nach ihrer Ladung. Die MT-Isoformen eluieren demnach getrennt voneinander. Diese Trennung kann somit Informationen über den unterschiedlichen Gehalt von MT-1 und MT-2 in einer Probe liefern. Dasselbe gilt für die Kapillarzonenoelektrophorese, deren Trennmechanismus auf einer Kombination von Unterschieden in Ladung und Größe der Probenmoleküle beruht. Als Vorteil kommt hier außerdem die geringe benötigte Probenmenge hinzu.

Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese kann eine Abschätzung der Probenzusammensetzung nach den Molmassen der Proteine erfolgen. Im Gegensatz zu den oben erwähnten Methoden, die in dieser Arbeit vor allem mit Elementdetektion durchgeführt wurden, zeigt die SDS-PAGE alle in der Probe vorhandenen Proteine, auch Nicht-Metalloproteine. Die Proteine werden für die Trennung denaturiert und verlieren zum größten Teil die gebundenen Metalle. Auch die MALDI-TOF-Massenspektrometrie kann einen Überblick über die in einer Probe vorhandenen Molmassen geben. Dabei verlieren die MT ebenfalls die gebundenen Metalle.

7.1 Größenausschlußchromatographie: Superdex 75 HR-Säule

In Kapitel 4.2.2 wurden verschiedene Säulenmaterialien für die Größenausschlußchromatographie getestet. Das Superdex 75-Material hat sich zur Trennung von Metalloproteinen in Cytosolen als besonders geeignet erwiesen. Dieses Packungsmaterial ist in unterschiedlichen Korngrößen und in verschiedenen große Säulen gepackt erhältlich. Zur Überprüfung, ob mit kleinerer Korngröße eine noch bessere Trennung erreicht werden kann, wurde die chromatographische Trennung von Cytosolproben über eine Superdex 75HR-Säule getestet. Diese Säule unterscheidet sich von der Superdex 75PG-Säule durch ihre Dimension sowie die kleinere Korngröße des ansonsten gleichen Säulenmaterials mit gleichem Trennbereich. Die unterschiedlichen Parameter der verwendeten Superdex-Säulen sind in **Tab. 7-1** aufgeführt. Die Regressionsgerade des linearen Trennbereiches betrug für die Superdex 75HR-Säule:

$$\log \text{Molmasse} [\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}] = -0,1066 \cdot \text{Retentionszeit} [\text{min}] + 5,5613 .$$

Die Detektion der verschiedenen Elemente im Eluat wurde wie in Kapitel 4.1 beschrieben mit der on-line gekoppelten ICP-MS durchgeführt. Die Meßparameter der chromatographischen Trennung auf der Superdex 75HR-Säule sind in **Tab. 7-2** aufgeführt.

Tab. 7-1: Vergleich der Superdex 75HR- und Superdex 75PG-Säulen

	Superdex 75HR	Superdex 75PG
Dimension der Säule [mm·mm]	10·300	16·600
Korngröße [µm]	13	24-44
Trennbereich [Da] ^a	3000-70000	3000-70000
Flußrate Eluens [mL·min ⁻¹]	1	2
Aufgabemenge [µL]	250	500
Bodenzahl [m ⁻¹] ^b	30300	17100

^a Herstellerangaben; ^b ermittelt mit Aceton

Tab. 7-2: Meßparameter der Superdex 75HR-Säule

HPLC-System:	HP 1100
Säule:	Superdex 75HR (10·300 mm)
Eluens:	20 mmol·L ⁻¹ Tris-Puffer, pH=7,4 (mit HNO ₃ eingestellt)
interne Standardelement-Lösung:	50 µg·L ⁻¹ Ge, Rh, Ir mit 10% MeOH, 0,33 %HNO ₃
Flußrate Eluens:	1 mL·min ⁻¹
Flußrate interner Standard:	0,2 mL·min ⁻¹
Druck:	1,2 MPa
Injektionsvolumen:	250 µL
Autosampler-Thermostat:	4 °C
Nadelspülung vor der Injektion mit Wasser	
UV-Detektion:	214 nm, 254 nm, 280 nm (Deuteriumlampe)

Abb. 7-1 und **Abb. 7-2** zeigen den Vergleich der SEC-Trennungen von Gehirncytosol (Schwein) mit der Superdex 75HR- und der Superdex 75PG-Säule. Dabei ist die Zeitachse des Superdex 75PG-Laufes zur besseren Vergleichbarkeit auf jene der kleinen Säule umgerechnet.

Die Vorteile der Superdex 75HR-Säule sind:

- größere Empfindlichkeit der Elementdetektion (Signal/Rausch-Verhältnis)
- schnellere Trennung
- geringeres Probenvolumen
- bessere Trennung für niedrige Molmassen.

Bei der großen Säule eluieren die Analytmoleküle in einem größeren Eluenvolumen, was eine stärkere Verdünnung der Probe und damit niedrigere gemessene Intensitäten und eine schlechtere Empfindlichkeit bedingt. Mit der Superdex 75HR-Säule dagegen werden bei Elementen, die nur in geringen Konzentrationen vorhanden sind - z.B. die MT-gebundenen Metalle Quecksilber und Blei - oder deren Detektion mit der ICP-MS unempfindlich ist wie z.B. Selen, bessere Signale erzielt als mit der Superdex 75PG-Säule (siehe **Abb. 7-1**). Beim Quecksilber sind damit statt nur Rauschen gerade noch erkennbare Signale vorhanden. Auch die Blei-Signale sind deutlich intensiver.

Obwohl im niedrigen Molmassenbereich eine höhere Auflösung erreicht wird, ist diese gerade für den besonders interessierenden mittleren bis hohen Molmassenbereich schlechter. **Abb. 7-2** zeigt die Kupfer- und Zink-Profile der verschiedenen Trennungen. Während die Superdex 75PG-Säule MT-1/-2, MT-3 und SOD auflöst, wird MT-3 (RT=10,7 min) auf der Superdex 75HR-Säule zwar von MT-1/-2 (RT=13,2 min) getrennt, eluiert jedoch mit der SOD in einem Peak, wie durch Läufe der Einzelsubstanzen bestätigt wurde. Auch der erste Zink-Peak der Superdex 75HR- ist bei der Superdex 75PG-Säule in mehrere Peaks aufgelöst.

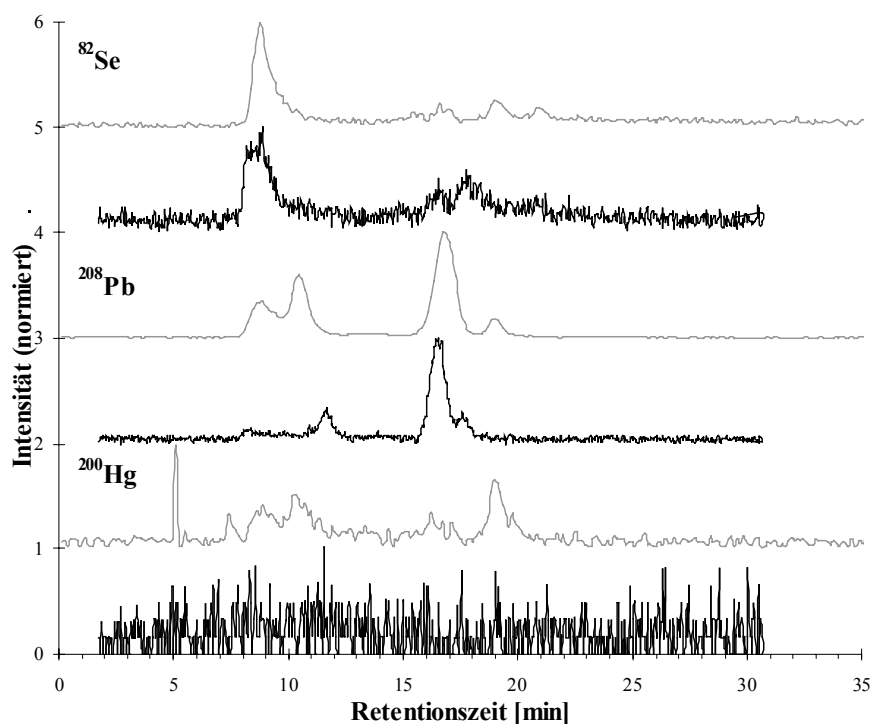


Abb. 7-1: Selen-, Blei- und Quecksilber-Profile der chromatographischen Trennungen von Gehirncytosol (Schwein) auf der Superdex 75HR- (—) und der Superdex 75PG-Säule (---); die Zeitachse ist dem Lauf der Superdex 75HR-Säule angepaßt

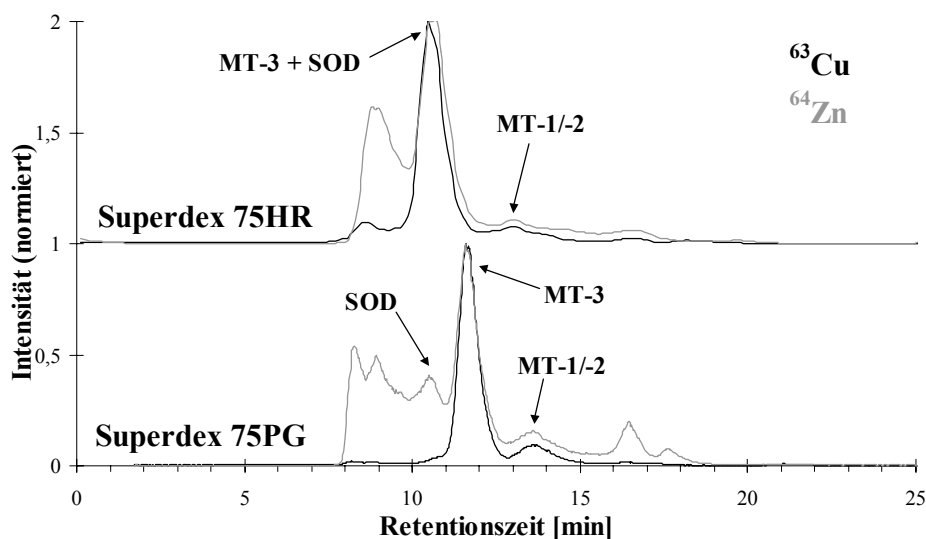


Abb. 7-2: Kupfer- und Zink-Profile der chromatographischen Trennungen von Gehirncytosol (Schwein) auf der Superdex 75HR- und der Superdex 75PG-Säule; die Zeitachse ist dem Lauf der Superdex 75HR-Säule angepaßt

Für die Anwendung auf die Trennung von Metalloproteinen in Cytosolen mit Hinblick besonders auf die Abtrennung von MT-3 in Gehirnprouben ist die Superdex 75PG-Säule demnach besser geeignet.

7.2 Anionenaustauscherchromatographie

Die Anionenaustauscherchromatographie (Anion Exchange Chromatography - AEC) trennt die Analyten nach Ladungsunterschieden. Anionische Komponenten werden durch Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial stärker retardiert als neutrale oder kationische Substanzen und mit steigender Salzkonzentration im Puffer eluiert.

Als Eluens diente wie bei der SEC Tris-Puffer mit dem physiologischen pH-Wert 7,4. Damit sind alle Proteine mit einem isoelektrischen Punkt $pI < 7,4$ - wie die MT⁴⁵ - negativ geladen. Die Isoformen MT-1 und MT-2 unterscheiden sich bei neutralem pH durch eine negative Ladung (siehe Kapitel 2.1.1)⁹ und können mittels Anionenaustauscherchromatographie voneinander und vom noch stärker negativ geladenen MT-3⁴⁵ getrennt werden. Durch den unterschiedlichen Trennmechanismus der AEC können demnach andere Informationen bei der Trennung von Cytosolproben gewonnen werden als mit der Superdex 75PG-Säule.

Ein schwacher Anionenaustauscher mit Diethylaminoethyl (DEAE)-Gruppen wurde verwendet. Das Austauschermaterial der Fractogel EMD DEAE-Säule besteht aus einer Polymerbasis mit Tentakelarmen, an deren Enden die DEAE-Gruppen gebunden sind. Das Material hat eine Ausschlußgrenze von 1000 kDa und ist für den pH-Bereich von 6,0 bis 8,5 geeignet. Es wurde ebenfalls eine Vorsäule mit austauschbaren Filtern eingesetzt (siehe Kapitel 4.2.4). Die AEC wurde mit Gradientenelution betrieben, wobei eine steigende Ammoniumchloridkonzentration bis $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ zur Elution verwendet wurde. Durch den hohen Salzgehalt war die Kopplung mit der ICP-MS als on-line Elementdetektion problematisch, da hohe Salzfrachten zu Ablagerungen auf den Konen führen können und dadurch die Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit der Messungen beeinträchtigen⁸⁶ (siehe Kapitel 4.2.2). Deshalb wurde zur Multielementdetektion die Kopplung mit der Atomemissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma als Anregungsquelle (ICP-AES) gewählt. Hierbei wird die von den im Plasma angeregten Atomen und Ionen der Analyten emittierte Energie in Form von Licht bei charakteristischen Wellenlängen detektiert. Die ICP-AES hat sich bei hohen Salzfrachten als robuster im Vergleich zur ICP-MS erwiesen.

Die Meßparameter der HPLC-ICP-AES-Kopplung und der verwendete Gradient sind in **Tab. 7-3** und **Tab. 7-4** aufgeführt. Die Cytosolproben wurden vor der Messung mit Frigen entfettet und 1+1 mit dem Puffer A verdünnt. Die Injektion erfolgte manuell über eine 1 mL-Probenschleife. Für die Aufnahme der transienten Signale der Chromatographie wurde eine speziell entwickelte Software verwendet, das Meß- und Auswerteprogramm „DCP“ von Tomiak^{84, 147}. Das Programm steuert auch den Eintrittspalt des Simultanspektrometers an und ermöglicht dadurch Kompensationsmessungen neben dem Peakmaximum zur spektralen Untergrundkorrektur. Die Integrationszeiten des Signals und des Untergrundes betrugen jeweils 2 s. Das Signalmaximum wurde vor der Messung durch einen Wellenlängenscan mit einer Multielementlösung ermittelt. Die Untergrundmessung erfolgte ca. +0,040 nm neben dem Signalmaximum.

Um die Retentionszeit des Metalloproteins SOD und der Isoformen MT-1, MT-2 und MT-3 auf der DEAE-Säule auszumachen, wurden Läufe mit den entsprechenden Proteinlösungen durchgeführt. In **Abb. 7-3** sind die erhaltenen Elementprofile von Kupfer, Zink und Cadmium gezeigt. SOD hat eine Retentionszeit von 29,7 min, MT-1 von 24,5 min und MT-2 von 26,5 min. MT-3 weist eine Retentionszeit von 40 min auf, wobei dies der aus den Profilen von Zink und Kupfer gebildete Mittelwert ist. Ein Unterschied der

Retentionszeiten der Kupfer- und Zink-Signale wurde bei Metallothioneinen wiederholt beobachtet¹⁴⁸ (siehe auch Kapitel 9).

In **Abb. 7-4** sind die Kupfer- und Zink-Profile der Trennung auf der DEAE-Säule eines humanen Gehirncytosols gezeigt. Die ICP-AES ist für Zink wenig empfindlich. Es ist zu erkennen, daß die einzelnen Isoformen MT-1, MT-2 und MT-3 getrennt werden konnten. Auch das Kupfer und Zink enthaltende Metalloprotein SOD eluiert getrennt von den MT. Die Retentionszeiten stimmen mit denen der Einzelläufe (**Abb. 7-3**) gut überein. Leichte Abweichungen - MT-1 eluiert bei RT=22,0 min - können durch die Matrixabhängigkeit der DEAE-Trennung oder Unterschiede bei den verschiedenen Spezies bedingt sein.

Tab. 7-3: Meßparameter der Anionenaustauscherchromatographie

HPLC-System	
HPLC-Pumpen:	Typ 64 (Knauer)
Steuerung:	HPLC-Programmer 50 (Knauer)
Hochdruckgradientenmischer	
VDS Optilab Degasys 1300 on-line Entgasungssystem	
Säule:	Merck Fractogel EMD DEAE (10·150 mm)
Vorsäule:	Securityguard mit GFC-3000 Filtereinsatz
Eluens A:	20 mmol·L ⁻¹ Tris, 5 mmol·L ⁻¹ DTT, pH=7,4 (mit HNO ₃ eingestellt)
Eluens B:	20 mmol·L ⁻¹ Tris, 5 mmol·L ⁻¹ DTT, 1 mol·L ⁻¹ NH ₄ Cl, pH=7,4 (mit HNO ₃ eingestellt)
Flußrate:	1 mL·min ⁻¹
Injektionsvolumen:	1 mL (manuell über Probenschleife)
Gradient	
Zeit [min]	% Eluens B
0-10	0
10-40	0-50
40-50	50
50-51	50-0

Tab. 7-4: Meßparameter der ICP-AES

ICP-AES:	Jobin Yvon JY70 Plus	
Zerstäuber:	Cross-Flow mit temperierter Scott-Kammer	
Fackel und Injektorrohr:	Demontierbare Torch mit Quarzrohren und Keramikinjektorrohr	
Plasmagas-Fluß:	12,50 L·min ⁻¹ (Argon)	
Coater-Gas-Fluß:	0,20 L·min ⁻¹ (Argon)	
Zerstäubergas-Fluß:	0,66 L·min ⁻¹ (Argon)	
Plasmaleistung:	ca. 960 Watt	
Scandauer mit Untergrundmessung:	ca. 10 s	
Detektierte Elemente	Emissionslinie [nm]	Art der Linie
Cu	324,754	Atomlinie
Zn	213,856	Atomlinie
Cd	226,502	Ionenlinie
S	180,676	Atomlinie
Fe	259,940	Ionenlinie
Mn	257,610	Ionenlinie

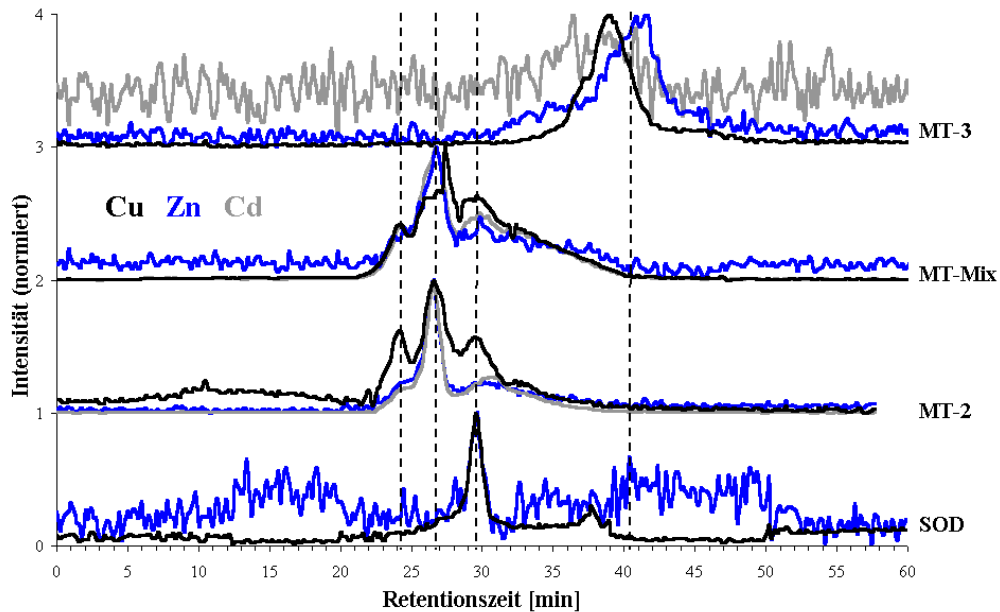


Abb. 7-3: Kupfer-, Zink- und Cadmium-Profile, die bei Einzelläufen von SOD (human), MT-2 (Kaninchen), einem MT-1 + MT-2-Gemisch (Kaninchen) und MT-3 (rekombinant, human) über die DEAE-Säule erhalten wurden (Zusatz von DTT zum Elutionspuffer)

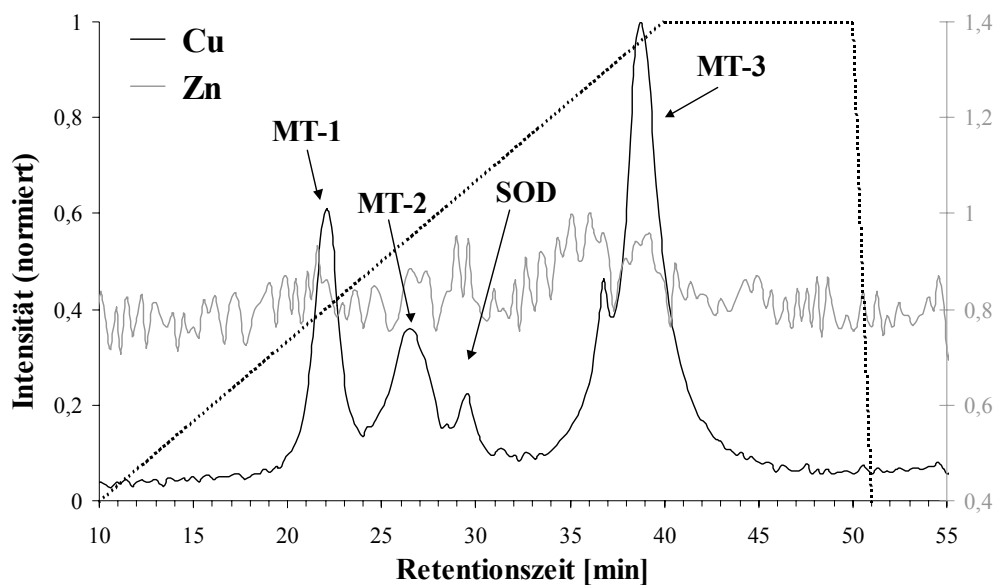


Abb. 7-4: Kupfer- und Zink-Profile der Trennung eines humanen Gehirncytosols (frontale Region, Kontrolle, Zusatz von DTT zum Elutionspuffer) auf der DEAE-Säule; der zeitliche Verlauf des Ammoniumchloridgradienten von 0 bis 500 mmol·L⁻¹ ist durch die gestrichelte Linie wiedergegeben

Neben den Einzelläufen der MT-Isoformen sowie SOD und dem Vergleich der Retentionszeiten wurde zur Bestätigung der Identifizierung der Peaks in den Elementprofilen der AEC-Trennung der Vergleich mit der SEC-Trennung herangezogen. Aufgefängene Fraktionen der AEC-Trennung wurden in „zweiter Dimension“ über die

SEC getrennt und die auftretenden Signale mit den bekannten Signalen (siehe Kapitel 6.1 und 6.2.1) der fraglichen Proteine verglichen. Dafür wurden 1 mL Fraktionen der DEAE-Trennung von Gehirncytosol (Schwein) aufgefangen und die der Elution der Metalloproteine entsprechenden Fraktionen jeweils zusammengefaßt und über Ultrafiltrationsmembranen mit einer Ausschlußgrenze von 3000 Da (Microcon, Amicon, Millipore) in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge bei 14000 g aufkonzentriert. Die Trennungen wurden mit 5 mmol·L⁻¹ DTT im Eluens durchgeführt, um Oxidation während der Fraktionierung und der folgenden Aufkonzentrierung zu vermeiden. Die konzentrierten DEAE-Fraktionen wurden anschließend auf die Superdex 75PG-Säule aufgegeben.

Die erhaltenen Elementprofile sind in **Abb. 7-5** dargestellt. Es ist anzumerken, daß trotz DTT-Zugabe die MT schwächer gebundenes Zink¹⁴⁹ während der Fraktionierung bzw. Einengung zu verlieren scheinen (siehe auch Kapitel 11.2). Die Betrachtung konzentriert sich deshalb auf die Kupfer- sowie zusätzlich die Silber- und Cadmium-Profile. Es ist deutlich zu erkennen, daß die fragliche MT-3 Fraktion der DEAE-Trennung auf der Superdex 75PG-Säule die gleiche Retentionszeit wie MT-3 im Gehirncytosol hat, die Identität des DEAE-Peaks wird somit bestätigt. Auch der MT-1-Peak der DEAE-Trennung stimmt mit dem SEC-MT-1/-2-Peak überein. Das Gehirncytosol vom Schwein enthält weniger SOD und MT-2 als humanes Gehirncytosol (siehe auch **Abb. 7-6**). In **Abb. 7-5** ist jedoch noch ein schwacher Peak mit der MT-1/-2 entsprechenden Retentionszeit in den Kupfer- und Silber-Profilen der SEC-Trennung zu erkennen, der demnach dem MT-2 der DEAE-Trennung entspricht.

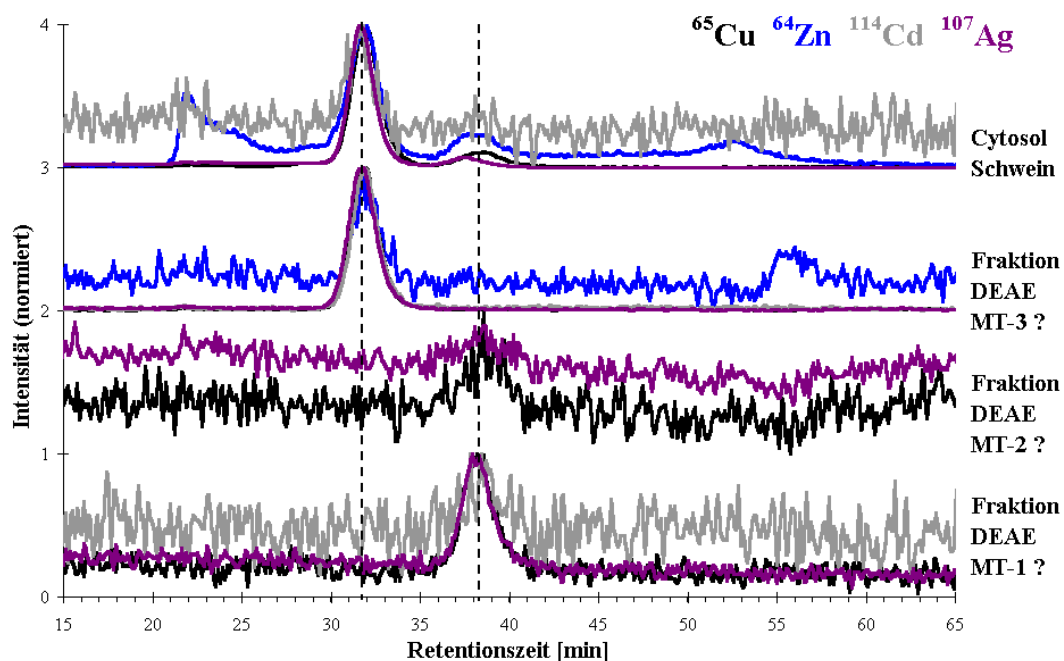


Abb. 7-5: Elementprofile der aufgefangenen Fraktionen der AEC-Trennung (DEAE-Säule) von Gehirncytosol (Schwein) nach der chromatographischen Trennung auf der Superdex 75PG-Säule im Vergleich zur Trennung von Gehirncytosol (Schwein) (Zusatz von DTT zum Elutionspuffer)

Nachdem die Zuordnung der Peaks der AEC-Trennung mit der SEC bestätigt wurde, sollten umgekehrt die entsprechenden SEC-Fraktionen mit der AEC betrachtet werden. Hierzu wurden von der chromatographischen Trennung eines Gehirncytosols (Schwein) mit der Superdex 75PG-Säule 2 mL Fraktionen aufgefangen und die der Elution von

MT-1/-2, MT-3 sowie SOD entsprechenden Fraktionen jeweils zusammengefaßt und über Ultrafiltrationsmembranen eingengt. Die SEC-Trennung wurde hier ebenfalls mit $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT im Eluens zur Minimierung der Oxidation durchgeführt. Die konzentrierten SEC-Fraktionen wurden anschließend auf die DEAE-Säule aufgegeben.

Abb. 7-6 zeigt die erhaltenen Elementprofile im Vergleich zur DEAE-Trennung eines unfraktionierten Gehirncytosols (Schwein). Wegen der Unempfindlichkeit der ICP-AES für Zink werden im folgenden nur die Kupfer-Profile betrachtet. Auch bei diesem Vergleich konnte die Übereinstimmung der MT-Peaks von Superdex 75PG- und DEAE-Trennung festgestellt werden.

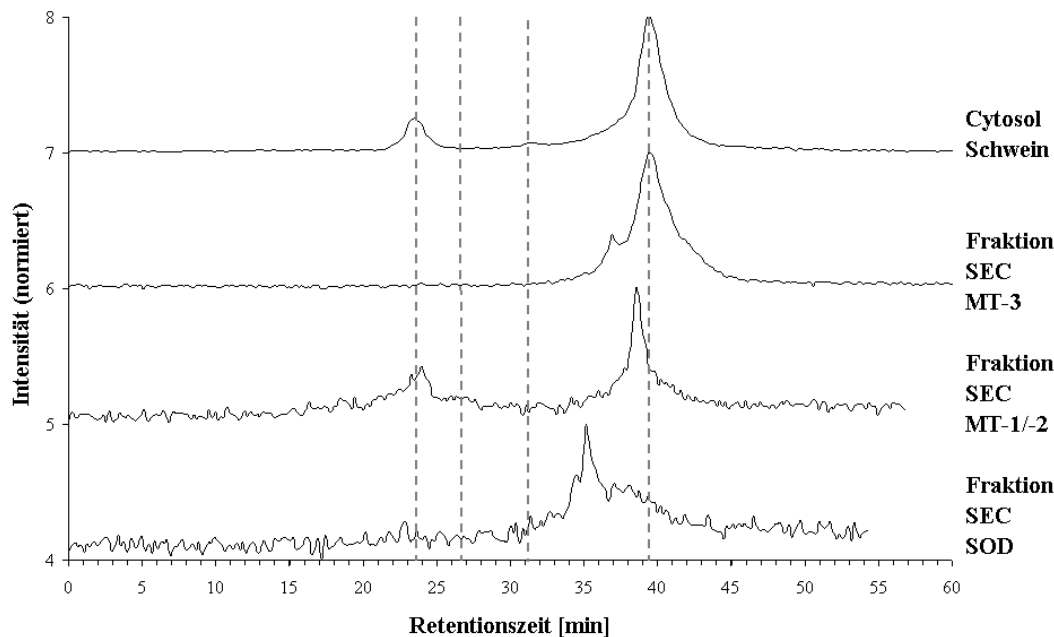


Abb. 7-6: Kupfer-Profile der aufgefundenen Fraktionen der SEC-Trennung (Superdex 75PG-Säule) von Gehirncytosol (Schwein) nach der chromatographischen Trennung auf der DEAE-Säule im Vergleich zur Trennung von Gehirncytosol (Schwein) (Zusatz von DTT zum Elutionspuffer)

Der bei der MT-3-Fraktion zu sehende kleine Vorpeak trat teilweise auch bei der Trennung von Gehirncytosolen auf (siehe **Abb. 7-4**) und kann entweder als MT-3-fremde Komponente oder als mögliches Oxidationsprodukt bzw. MT-3-Form mit anderer Metallbeladung und damit anderer, auf der DEAE-Säule trennbaren Ladung gedeutet werden. Auch das Vorhandensein und die Abtrennung von nicht-acetyliertem MT-3 ist eine Möglichkeit.

Bei der Trennung der SOD-Fraktion ist ein Kupfer-Signal bei einer Retentionszeit von 35 min zu sehen. Der SOD-Peak wurde bei einer Retentionszeit von etwa 30 min erwartet. Es kann sich hierbei um eine durch die unterschiedliche Probenzusammensetzung bedingte Verschiebung der bei der AEC matrixabhängigen Retentionszeit handeln. Eine weitere Möglichkeit sind Unterschiede in der Ladung der Proteine, da bei diesem Versuch eine andere Spezies vorlag als bei den bisher beschriebenen SOD-Trennungen. Auch ein Artefakt kann nicht ausgeschlossen werden. In der SOD-Fraktion ist zusätzlich MT-3 zu sehen, das nicht vollständig abgetrennt werden konnte.

Auch die MT-1/-2-Fraktion enthält noch etwas MT-3, obwohl der Peak bei der SEC besser vom MT-3 getrennt ist als der SOD-Peak (siehe **Abb. 7-5**). Dies ist wiederum durch den

wesentlich höheren Gehalt an MT-3 bedingt. Der MT-1 Peak ist im Kupfer-Profil der DEAE-Trennung zu erkennen. Das MT-2-Signal ist hier nicht auszumachen.

Insgesamt kann zusammengefaßt werden, daß die MT-Isoformen auf der verwendeten DEAE-Säule wie erwartet deutlich voneinander und auch von der SOD getrennt werden konnten.

Aufgrund des nur begrenzt zur Verfügung stehenden humanen Probenmaterials konnten diese Versuche nur mit Cytosol vom Schwein durchgeführt werden. Auf den Nachweis von MT-1 und MT-2 im entsprechenden Peak der Superdex 75PG-Säule wird in Abschnitt 7.3.5 näher eingegangen.

7.3 Kapillarzonenelektrophorese-ICP-SFMS: Kooperation mit dem GKSS-Forschungszentrum (Geesthacht)

Die Trennungen von Proteinen in Cytosolen mit der Kapillarzonenelektrophorese (CZE), gekoppelt an ein ICP-Sektorfeld (SF)-Massenspektrometer zur on-line-Elementdetektion, wurden im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Küstenforschung des GKSS-Forschungszentrums, Geesthacht, Deutschland, durchgeführt.

Die Vorteile der Kapillarzonenelektrophorese sind ^{150, 151}:

- hohe Effizienz der Trennung
- kurze Analysenzeiten
- geringe Probenmengen (Injektion im nL-Bereich bei Vorlagen von ca. 30 µL)
- kein Packungsmaterial, das mit der Probe wechselwirkt.

Daher sollte die CZE besonders zur Untersuchung von Biomolekülen und speziell von Metalloproteinen geeignet sein.

Schaumlöffel et al. ¹⁵² entwickelten kürzlich im GKSS-Forschungszentrum ein effizientes und robustes Interface zur Kopplung der CZE mit der ICP-MS. Diese Kombination eröffnet neue Möglichkeiten zur Trennung mit Elementdetektion für die Untersuchung von biologischen Proben. Vor allem die geringe benötigte Probenmenge ist z.B. für die Analyse von Cytosolen aus Biopsieproben günstig.

Die Anwendung der CZE-ICP-MS-Kopplung auf komplexe, biologische Proben war das Ziel des Kooperationsprojektes. Die Kopplung sollte auf die Messung von Cytosolproben angepaßt und optimiert werden, besonders im Hinblick auf Metallothioneine. Während mit der SEC möglichst viele Proteine und damit relevante Parameter für die Aufklärung von Mechanismen bei pathologischen Prozessen erfaßt werden sollten, lag bei der CZE der Schwerpunkt auf der Trennung der einzelnen MT-Isoformen.

7.3.1 Kopplung von Kapillarzonenelektrophorese und ICP-SFMS

Bei der Kapillarzonenelektrophorese, die instrumentell seit den 80er Jahren eingesetzt wird, beruht die Trennung auf Unterschieden in den elektrischen Eigenschaften der Analyten. Der Trennmechanismus unterscheidet sich dadurch von dem der Chromatographie, der auf verschiedenen Retentionszeiten durch unterschiedliche

Gleichgewichte bzw. Aufenthaltszeiten der Analyten zwischen mobiler und stationärer Phase basiert¹⁵³. Die elektrophoretische Beweglichkeit ist der Ladung der gelösten Teilchen direkt proportional. Außerdem spielt die Größe bzw. Form der Analyten sowie die Viskosität des Laufpuffers eine Rolle: die Migrationsgeschwindigkeit ist umgekehrt proportional zur Reibung des Analytmoleküls im Laufpuffer. Faktoren wie die Ionenstärke und der pH-Wert des Puffers sowie der Probe beeinflussen die Trennung, da sie die Ladung und Form der Analyten verändern¹⁵³. Neben Art und Länge der Kapillare können diese Parameter, wie auch die Temperatur und die angelegte Spannung¹⁵⁴, zum Erreichen einer optimalen Trennung variiert werden.

Der Transport durch die Quarzkapillare erfolgt durch eine über die Länge der Kapillare angelegte Gleichstromhochspannung, wobei die Probe im vorliegenden Fall am positiven Ende injiziert wird (siehe auch **Abb. 7-7**). Die Oberfläche der Kapillare ist durch Dissoziation der Silanolgruppen der Quarzoberfläche negativ geladen und zieht positive Ionen der Pufferlösung an, es bildet sich eine elektrische Doppelschicht. Die positiven Ionen sind jedoch beweglich und wandern zur negativen Elektrode, wobei sie Lösungsmittelmoleküle mit sich reißen. Dadurch entsteht der elektroosmotische Fluß (EOF) des Lösungsmittels, der - bei nichtmodifizierten Quarzkapillaren - zur Kathode gerichtet ist¹⁵³. Der EOF weist im Gegensatz zur Chromatographie kein laminares Strömungsprofil, sondern ein flaches, stempelförmiges Fließprofil auf, das keine Peakverbreiterung verursacht. Wenn keine Bandenverbreiterung durch thermische Konvektion auftritt, können die theoretisch nur durch longitudinale Diffusion begrenzten Peakbreiten erreicht werden und damit Trennleistungen von einigen hunderttausend Böden¹⁵³.

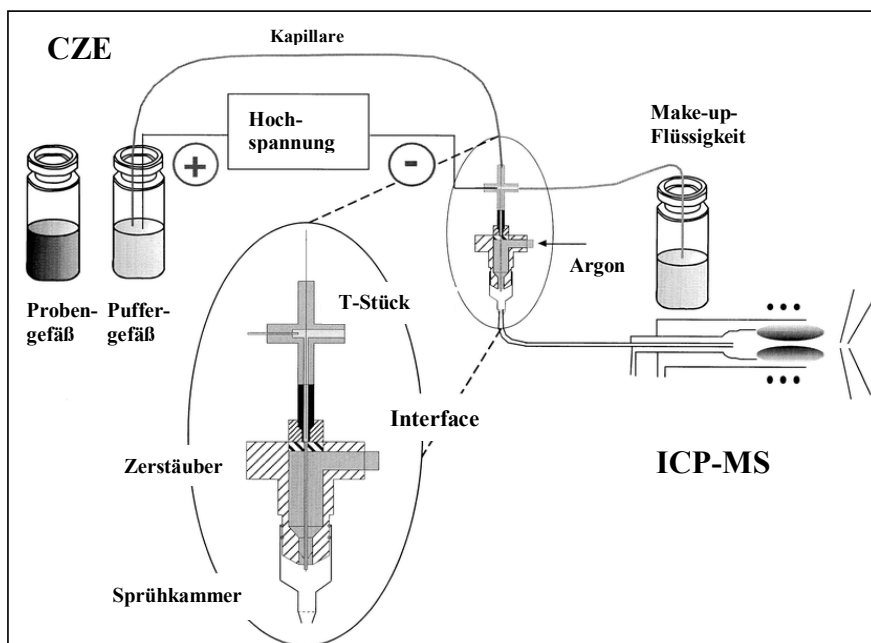


Abb. 7-7: Schematischer Aufbau der CZE-ICP-SFMS-Kopplung (aus¹⁵⁵)

Die CZE wurde mit der ICP-MS als Multielementdetektor gekoppelt. Es handelte sich um ein ICP-Sektorfeld-MS-Gerät, das für die durchgeführten Messungen in einer Auflösung von 300 betrieben wurde, um möglichst viele Elemente gleichzeitig aufnehmen zu können. Durch die im Vergleich zur SEC wesentlich geringeren Peakbreiten muß ein Scan über alle zu messenden Isotope entsprechend weniger Zeit beanspruchen, was zum einen die Anzahl der meßbaren Isotope einschränkt, zum anderen die Auflösung. Je höher diese ist, desto

länger dauert ein Scan, da bei höherer Auflösung der magnetische Sektor eine längere Zeit zur Stabilisierung braucht.

Die Kopplung wurde mittels des von Schaumlöffel et al. entwickelten und inzwischen durch CETAC (Omaha, USA) vertriebenen Interfaces durchgeführt. Es erfüllt folgende Anforderungen an ein Interface zwischen CZE und ICP-MS:

- Herstellung der elektrischen Verbindung für die elektrophoretische Trennung
- Anpassung der Flußrate des EOF an die Flußrate des Zerstäubers
- Vermeidung eines laminaren Flusses durch vom Zerstäuber verursachten Unterdruck in der CZE-Kapillare, welcher die Auflösung beeinträchtigt
- geringe Verdünnung des Probenstroms der Kapillare ¹⁵².

Der konstruierte Zerstäuber basiert auf einem mikrokonzentrischen Zerstäuber. Die Zerstäuberkapillare hat einen kleineren Innendurchmesser, wodurch ein stabiles selbstansaugendes Arbeiten des Zerstäubers gewährleistet ist ¹⁵⁰. Die experimentellen Parameter des Interfaces sind in **Tab. 7-5** aufgeführt. **Abb. 7-7** zeigt schematisch den Aufbau der Kopplung.

Tab. 7-5: Parameter des Interfaces der CZE-ICP-SFMS-Kopplung

Interface:	CEI-100 (CETAC)
Flußrate EOF:	0,1-0,9 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
Flußrate Zerstäuber:	8,0 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
Make-up-Flüssigkeit:	Ammoniumnitrat 15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH=7,4 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Rubidium bzw. 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Germanium
Sprühkammer:	Quarz
Sprühkammervolumen:	5 mL

Vor Benutzung wurden die verwendeten Kapillaren durch Spülen mit 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KOH für 5 min vorkonditioniert. Zum Konditionieren zwischen den Trennungen wurde mit 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KOH bei 0,1 kPa Druck für 5 min gespült und mit Tris-Puffer für 15 min äquilibriert. Da die Lauge die Wände der Quarzkapillare angreift und somit zu einer Beeinträchtigung der Quarzkapillare führt, wurden diese Konditionierungen immer erst nach einigen Läufen bei sichtbarer Verschlechterung der Trennung durchgeführt. Zwischen den einzelnen Läufen wurde ansonsten mit Tris-Puffer gespült. Diese Spülzeiten und notwendigen Konditionierungsschritte relativierten den Vorteil der kurzen Analysenzeiten der CZE gegenüber der SEC, vor allem da noch keine automatisierte Messung längerer Probenserien möglich war.

Die Proben wurden hydrodynamisch injiziert, das Probenvolumen betrug zwischen 2,2 nL (2 kPa·s) und 22 nL (20 kPa·s). Trotz des geringen Probenvolumens mußten aus technischen Gründen im Probengefäß mindestens 30 μL der Probenlösung vorgelegt werden. Als Make-up-Flüssigkeit des Zerstäubers wurde eine 15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ammoniumnitratlösung (pH=7,4) verwendet, welche zusätzlich Rubidium zur Kontrolle einer gleichmäßigen Zerstäubung und als internen Standard enthielt. Rubidium wurde gewählt, da es als Alkaliion keine unlöslichen Hydroxide bei pH=7,4 bildet und die Lösung deshalb stabil ist ¹⁵⁵. Später wurde Germanium als interner Standard verwendet (siehe Kapitel 4.3.3), das sich durch stabilere Signale auszeichnete.

Der Laufpuffer sollte dem Puffer der Cytosolproben entsprechen, es wurde folglich Tris-Puffer eingesetzt. Mit organischen Zwitterionenpuffern wie Tris wurden in der Literatur bisher gute Trennungen von ladungsverschiedenen MT-Isoformen beschrieben ⁴⁵. Vorteile sind die niedrige Konduktivität im Bereich des pI-Wertes und die dadurch niedrige Joule-Erwärmung ⁴⁵.

7.3.2 Optimierung der CZE-Trennung für Metallothioneine

Die CZE-Parameter sollten hinsichtlich der Trennung von MT-Isoformen optimiert werden. Dazu wurden kommerziell erhältliches MT-1, MT-2 und ein MT-1/-2-Gemisch (Kaninchenleber) verwendet.

Blindwerte

Um Blindwerte gering zu halten, wurden ausschließlich Reagenzien und Wasser mit hohem Reinheitsgrad verwendet. Statt NaOH wurde KOH eingesetzt, um den durch eine $^{23}\text{Na}^{40}\text{Ar}^+$ -Interferenz verursachten hohen Untergrund beim ^{63}Cu -Signal zu vermeiden, welches wegen höherer Intensitäten als ^{65}Cu aufgenommen wurde. Die verwendete Salpetersäure wurde durch sub-boiling in einer Quarz-Apparatur zusätzlich gereinigt. Der Tris-Laufpuffer wurde über eine Chelex 100-Säule gereinigt und nach jedem Lauf ausgetauscht.

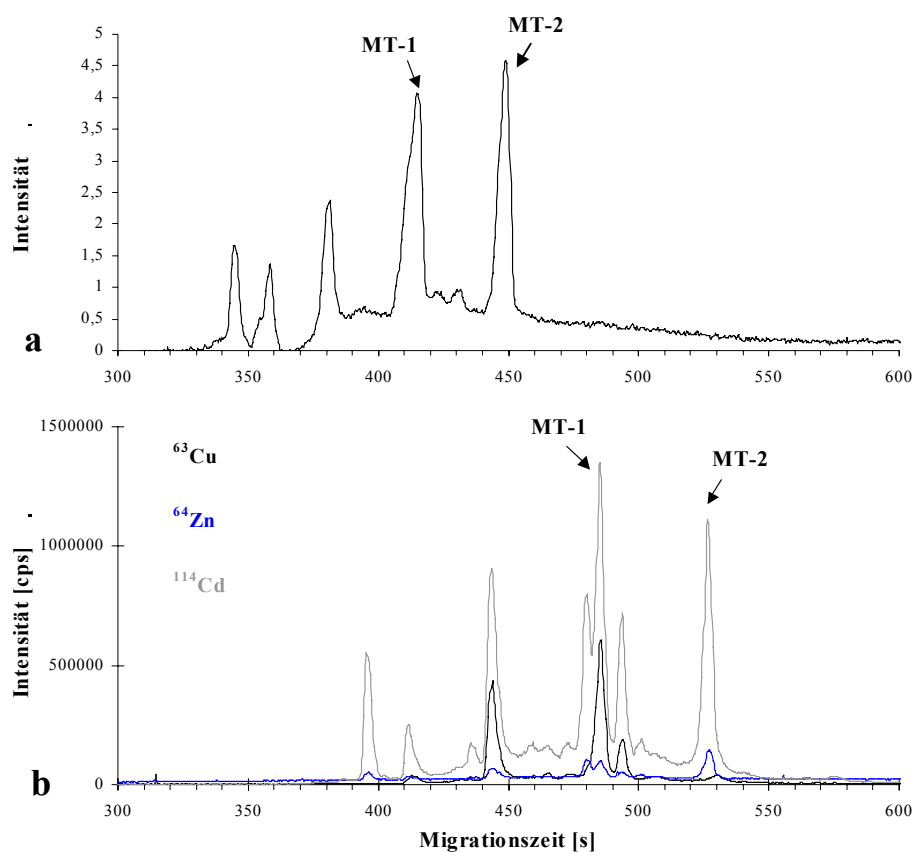


Abb. 7-8: Vergleich der **a)** UV-Detektion bei 250 nm ($1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 22 nL Probe) und **b)** ICP-MS-Detektion von Kupfer, Zink und Cadmium ($0,1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 2,2 nL Probe) der CZE-Trennung (MT-1/-2-Gemisch); Unterschiede in den Migrationszeiten sind durch verschiedene effektive Längen der CZE-Kapillare bedingt

Detektion

Abb. 7-8 zeigt den Vergleich der Elektropherogramme eines MT-1/-2-Gemisches mit UV-Detektion und ICP-MS-Detektion. Unterschiede in den Migrationszeiten sind hier vor allem durch die verschiedene effektive Länge der Kapillaren bedingt: Die UV-Detektion erfolgt 8,5 cm vor dem Ende der CZE-Kapillare. Eine gleichzeitige Detektion mit UV und

ICP-MS war bisher nicht möglich, da die gesamte Energie der UV-Strahlung, welche bei einem Diodenarraydetektor gleichzeitig die Probe erreicht, diese zerstörte. Damit wurde die Trennung am Ende der Kapillare verändert, möglicherweise durch andere Migrationsgeschwindigkeiten von freigesetzten Metallionen. Der Vergleich von UV- und ICP-MS-Elektropherogrammen macht die Vorteile der ICP-MS-Detektion deutlich. Es ist zwar jeweils ein ähnliches Peakmuster zu erkennen, neben Elementspezifität und Multielementdetektion der ICP-MS ist jedoch die höhere Empfindlichkeit ein Vorteil. Dadurch kann eine hundertfach kleinere Menge an MT injiziert werden, was eine bessere Auflösung im Vergleich zur UV-Detektion ermöglicht ¹⁵⁵.

Die höchsten Peaks wurden, auch durch Vergleich mit Einzelläufen von MT-1 und MT-2 (siehe **Abb. 7-11**), den Isoformen MT-1 und MT-2 zugeordnet. Möglicherweise konnten verschiedene Metallbeladungsformen oder Subisoformen getrennt werden, eine genaue Identifizierung war jedoch nicht möglich.

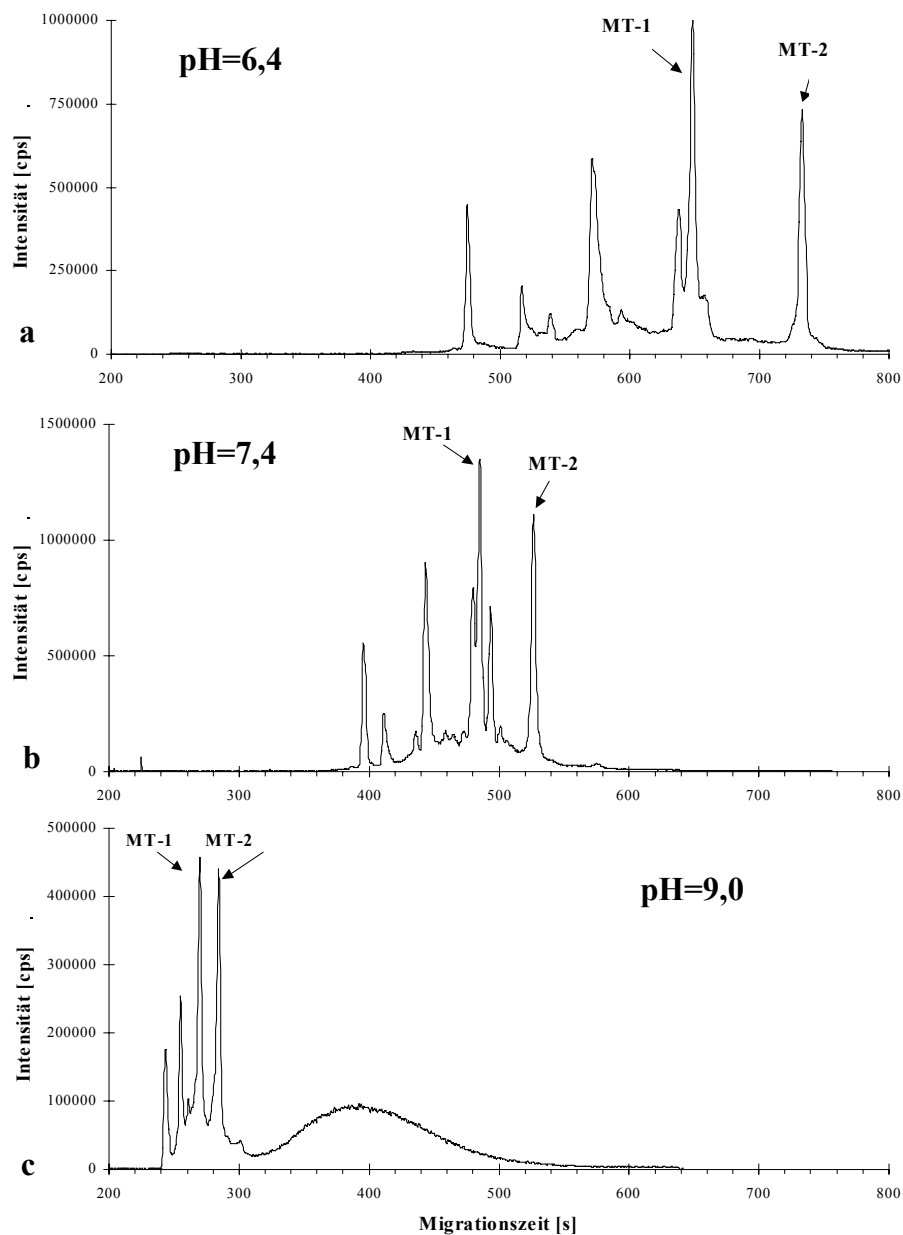


Abb. 7-9: Einfluß des pH-Wertes des Puffers auf die Trennung eines MT-1/MT-2-Gemisches, Cadmium-Elektropherogramme bei **a)** pH=6,9 , **b)** pH=7,4 und **c)** pH=9,0 des Tris-Puffers

pH-Wert des Laufpuffers

Der pH-Wert des Laufpuffers hat einen entscheidenden Einfluß auf die Migrationszeiten und die Trennung bei der CZE. Neben dem Einfluß auf die Beweglichkeit der Analytionen hängt auch der EOF, welcher die Trennung in der Kapillare überlagert, vom pH-Wert ab. Der Dissoziationsgrad der Silanolgruppen der Kapillarwand und somit der EOF nehmen mit steigendem pH-Wert zu¹⁵⁴.

In **Abb. 7-9** ist die Trennung eines MT-1/MT-2-Gemisches bei verschiedenen pH-Werten dargestellt. Es zeigte sich, daß der pH-Wert 7,4 - der dem Puffer der zu trennenden Cytosolproben und dem physiologischen pH-Wert entspricht - für die CZE-Trennung gut geeignet ist¹⁵⁵.

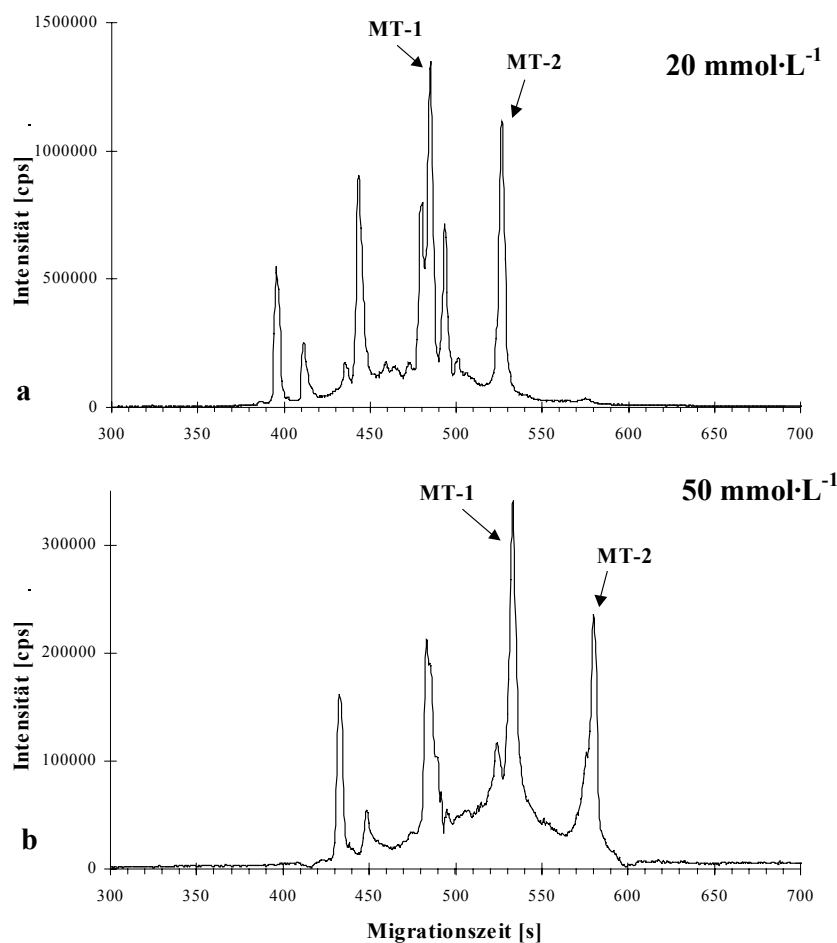


Abb. 7-10: Einfluß der Konzentration des Puffers auf die CZE-Trennung eines MT-1/MT-2-Gemisches, Cadmium-Elektropherogramme bei **a)** $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ und **b)** $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-Puffer-Konzentration

Konzentration des Laufpuffers

Die Konzentration des Puffers beeinflusst ebenfalls die Trennung, bedingt durch Änderung des EOF und der elektrischen Feldstärken. Hohe Konzentrationen führen zu hohen Stromstärken und damit zu Joule'scher Wärmeentwicklung, welche Peakverbreiterung verursacht¹⁵⁴. Dieser Effekt wird bei der Kopplung mit der ICP-MS dadurch verstärkt, daß

das Ende der Kapillare, welche ins Interface führt, nicht gekühlt werden kann. Es sollte demnach eine möglichst niedrige Pufferkonzentration gewählt werden.

Abb. 7-10 zeigt den Vergleich der Trennung eines MT-1/MT-2-Gemisches bei verschiedenen Pufferkonzentrationen. Mit dem niedriger konzentrierten 20 mmol·L⁻¹ Tris-Puffer, der dem Probenpuffer der Cytosole entspricht, wird wie erwartet eine bessere Trennung erzielt ¹⁵⁵.

Die verschiedenen Meßparameter der Kopplung nach der Optimierung sind in **Tab. 7-6** zusammengefaßt.

Tab. 7-6: Meßparameter der CZE-ICP-SFMS-Kopplung

Kapillarzonenelektrophorese			
CZE-System:	HP 3D CE		
Kapillare:	Quarzkapillare		
Länge der Kapillare:	70 cm		
Innendurchmesser der Kapillare:	75 µm		
Puffer:	Tris-Puffer 20 mmol·L ⁻¹ , pH=7,4 (mit HNO ₃ eingestellt)		
Temperatur:	15°C		
Spannung:	30 kV		
Injektion:	hydrodynamisch		
	MT-Lösungen:	2 kPa·s (1 kPa·2s)	≡ 2,2 nL
	Cytosolproben:	20 kPa·s (5 kPa·4s)	≡ 22 nL
ICP-SFMS			
ICP-SFMS:	ELEMENT		
Plasmagas-Fluß:	15 L·min ⁻¹		
Hilfsgas-Fluß:	0,9 L·min ⁻¹		
Zerstäubergas-Fluß:	1,0-1,1 L·min ⁻¹		
Leistung:	1075-1100 W		
Massenauflösung:	300		
Scandauer:	600 ms		
gemessene Isotope:	⁶³ Cu, ⁶⁴ Zn, ¹¹⁴ Cd, ¹³³ Cs, ⁸⁵ Rb/ ⁷⁴ Ge, ⁷⁵ As		

7.3.3 Trennung von Cytosolen mit der Kapillarzonenelektrophorese

Versuche zur CZE-Trennung von MT in Cytosolen und damit in einer komplexen Matrix wurden mit Kaninchen- und Rinderlebercytosol sowie humanem und Schweinegehirncytosol durchgeführt.

Die Messungen zeigten, daß die Trennung von komplexen biologischen Proben und die Zuordnung der Signale mit Schwierigkeiten behaftet waren, vor allem wegen:

- schlecht reproduzierbarer Migrationszeiten
- Matrixeffekten
- ungenügender Reinheit der MT-Referenzlösungen
- Instabilität der Proben.

Die MT-Schwefel-Signale konnten in der benutzten niedrigen Auflösung (300) wegen des hohen Untergrundes durch Sauerstoffdimer-Interferenzen nicht gemessen werden und

konnten deshalb nicht zur Charakterisierung der MT-Peaks herangezogen werden. Erst bei höherer Auflösung (3000) werden die interferierenden Sauerstoffdimere ausreichend abgetrennt. In diesem Modus reicht die Empfindlichkeit jedoch nicht mehr zum Nachweis von MT in nativen Cytosolproben aus.

Die Identifikation von MT-3 war besonders problematisch. Es konnte zunächst kein entsprechender Peak zugeordnet werden. Unter Berücksichtigung der von den Isoformen MT-1 und MT-2 stark abweichenden, negativeren Ladung^{10, 45, 156} wurde bei wesentlich längerer Aufnahmezeit schließlich ein Peak zugeordnet. MT-3 tritt von den anderen MT weit getrennt auf. **Abb. 7-11** zeigt die Elektropherogramme der Einzelsubstanzen MT-1, MT-2 (Kaninchenleber) und des rekombinanten humanen MT-3.

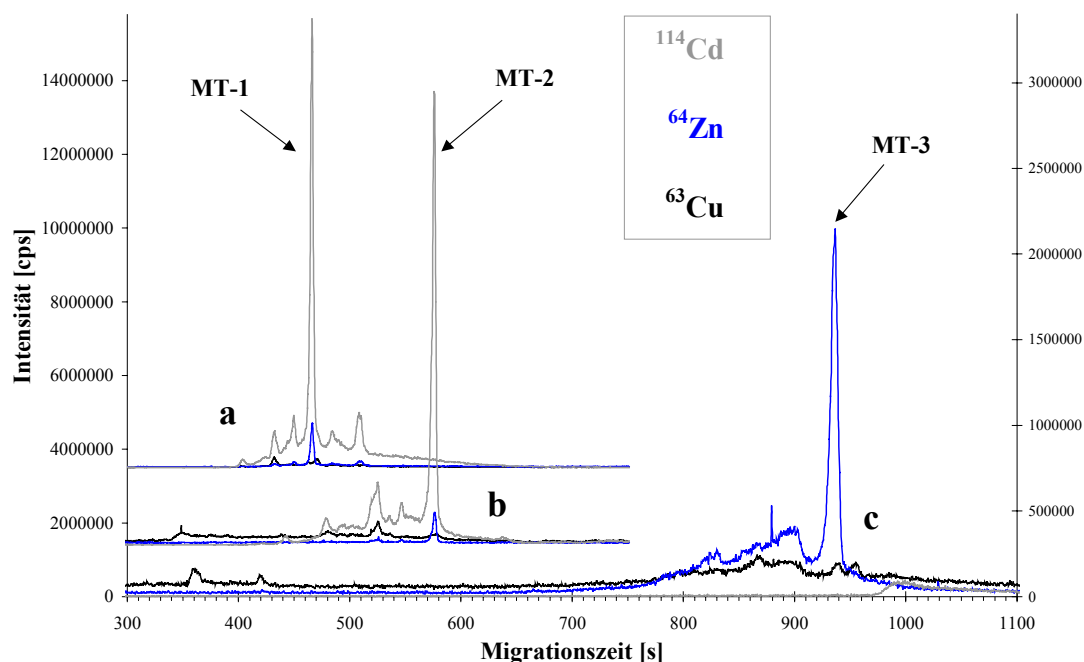


Abb. 7-11: CZE-Einzelläufe von **a)** MT-1, **b)** MT-2 (Kaninchenleber) und **c)** rekombinanten humanen MT-3, Kupfer-, Zink- und Cadmium-Elektropherogramme; linke Ordinate: MT-1, rechte Ordinate: MT-2 und MT-3*10; zur besseren Übersicht werden die Läufe versetzt dargestellt

Abb. 7-11 macht auch das Problem der Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten¹⁵¹ deutlich. MT-1 hat in **Abb. 7-11 a** eine Migrationszeit von 465 s. Die kommerziell erhältlichen MT sind nicht rein, sie enthalten immer auch einen Anteil der jeweils anderen Isoform⁴⁵. Bei der elektrophoretischen Trennung der MT-2-Lösung ist deshalb auch ein MT-1-Peak zu sehen, und umgekehrt, wobei es sich jeweils um den zweithöchsten Peak handelt. Die Migrationszeit von MT-1 in **Abb. 7-11 b** ist demnach 525 s und bei der elektrophoretischen Trennung des Gemisches (**Abb. 7-8 b**) 485 s. Die entsprechenden Migrationszeiten von MT-2 sind: 510 s (**Abb. 7-11 a**), 575 s (**Abb. 7-11 b**) und 526 s (**Abb. 7-8 b**). Diese Variation erschwert die Identifizierung der entsprechenden Peaks in komplexen Proben. Der Abstand zwischen dem MT-1- und dem MT-2-Signal in einem Lauf war jedoch immer vergleichbar und betrug zwischen 40 und 50 s.

Deshalb konnten Zuordnungen der MT in Elektropherogrammen von Cytosolen nur relativ zueinander erfolgen. Einige Proben wurden mit einzelnen MT (Isoformen MT-1 und MT-2 vom Kaninchen und rekombinanten humanen MT-3) versetzt, um die MT-Peaks in den erhaltenen Elektropherogrammen zu identifizieren. Das Fehlen von reinen MT-

Referenzsubstanzen und der Austausch von Metallen führte jedoch nur zu noch komplexeren und schwer interpretierbaren Elektropherogrammen, und der Informationsgewinn der Versuche war gering.

Bei den Cytosolproben machte sich die Variation der Migrationszeiten der MT noch stärker bemerkbar. Dies war vor allem durch die Probenmatrix bedingt. Hohe Proteinkonzentrationen in den Proben können die CZE-Trennung stören, da durch Adsorption von Proteinen an die Kapillarwände zunehmend mehr Silanolgruppen blockiert werden. Damit wird der EOF und somit die Wanderungsgeschwindigkeit der Analyten verlangsamt¹⁵⁴. Die gemessenen Migrationszeiten werden im Vergleich zu gereinigten MT und mit zunehmender Anzahl der Läufe länger und sind nicht reproduzierbar.

Deshalb sollten die Cytosolproben zur Reduzierung der störenden Matrix vorbehandelt werden. Grundsätzlich wurden auch hier alle Cytosolproben mit dem Serumklärer Frigen entfettet (siehe Kapitel 4.2.4). Eine Vorbehandlung sollte möglichst viele Matrixproteine abtrennen, ohne den MT-Gehalt zu reduzieren oder die Metallbeladung zu verändern.

Zum einen wurde die Hitzestabilität der MT für eine Hitzedenaturierung störender Proteine genutzt. Allerdings kann dabei die Metallbeladung geändert werden (siehe Kapitel 6.1.2). Eine weitere geeignete Behandlung zur Proteinabreicherung ist die Acetonitrilfällung, welche die MT⁴⁵ und deren Metallbeladung nicht beeinflusst¹⁴⁸. Dabei werden die Probe im Verhältnis 1+1 mit Acetonitril gemischt und die ausgefallenen Proteine bei 14000 g abzentrifugiert. Dieses Verfahren ist für die Kopplung von HPLC und ICP-MS nicht geeignet, da Acetonitril im Säuleneluat die Stabilität des Plasmas beeinträchtigt¹⁴⁸. Bei der CZE-Kopplung stört jedoch Acetonitril in den geringen injizierten Mengen nicht. Außerdem wurde die Effektivität einer einfachen Verdünnung der Cytosolprobe zur Reduktion der Proteinkonzentration getestet. In **Tab. 7-7** sind die verschiedenen Probenvorbehandlungen zusammengefaßt.

Tab. 7-7: Verschiedene Probenvorbehandlungsmethoden zur Trennung von MT in Cytosolen mit der CZE

Cytosol (entfettet)			
a) unbehandelt	b) Verdünnung	c) Hitzedenaturierung	d) Acetonitrilfällung
	1+1 Tris-Puffer	95 °C, 5 min 14000 g	1+1 Acetonitril 14000 g
Injektion: 20 kPa·s			

Abb. 7-12 zeigt den Vergleich der Elektropherogramme der CZE-Trennung von humanem Gehirncytosol ohne weitere Vorbehandlung, verdünnt, nach Hitzedenaturierung und nach Acetonitrilfällung. Die Migrationszeiten nehmen bei den vorbehandelten Proben durch Reduktion der störenden Matrixproteine im Vergleich zur unbehandelten Probe (**a**) ab. Die Peakmuster sind bei allen Proben etwa gleich. Die Peakintensitäten sind nicht vergleichbar, da eine Änderung der Matrix auch unterschiedliche Viskositäten erzeugt und sich damit die injizierten Probenmengen verändern¹⁵⁵. Das bei der Hitzedenaturierung geänderte Peakverhältnis der MT ist auf die Ausfällung der SOD, deren Migrationszeit mit der von MT-2 übereinstimmt (siehe Abschnitt 7.3.5), und die bei der Hitzedenaturierung von Cytosolen beobachtete geänderte Metallbeladung (siehe Kapitel 6.1.2) zurückzuführen. Hitzedenaturierung wurde zur Matrixabtrennung nicht weiter eingesetzt. Die beste Trennung - bezüglich Auflösung, Geschwindigkeit und Reproduzierbarkeit - wird mit der Acetonitril-Proteinabreicherung erzielt¹⁵⁵.

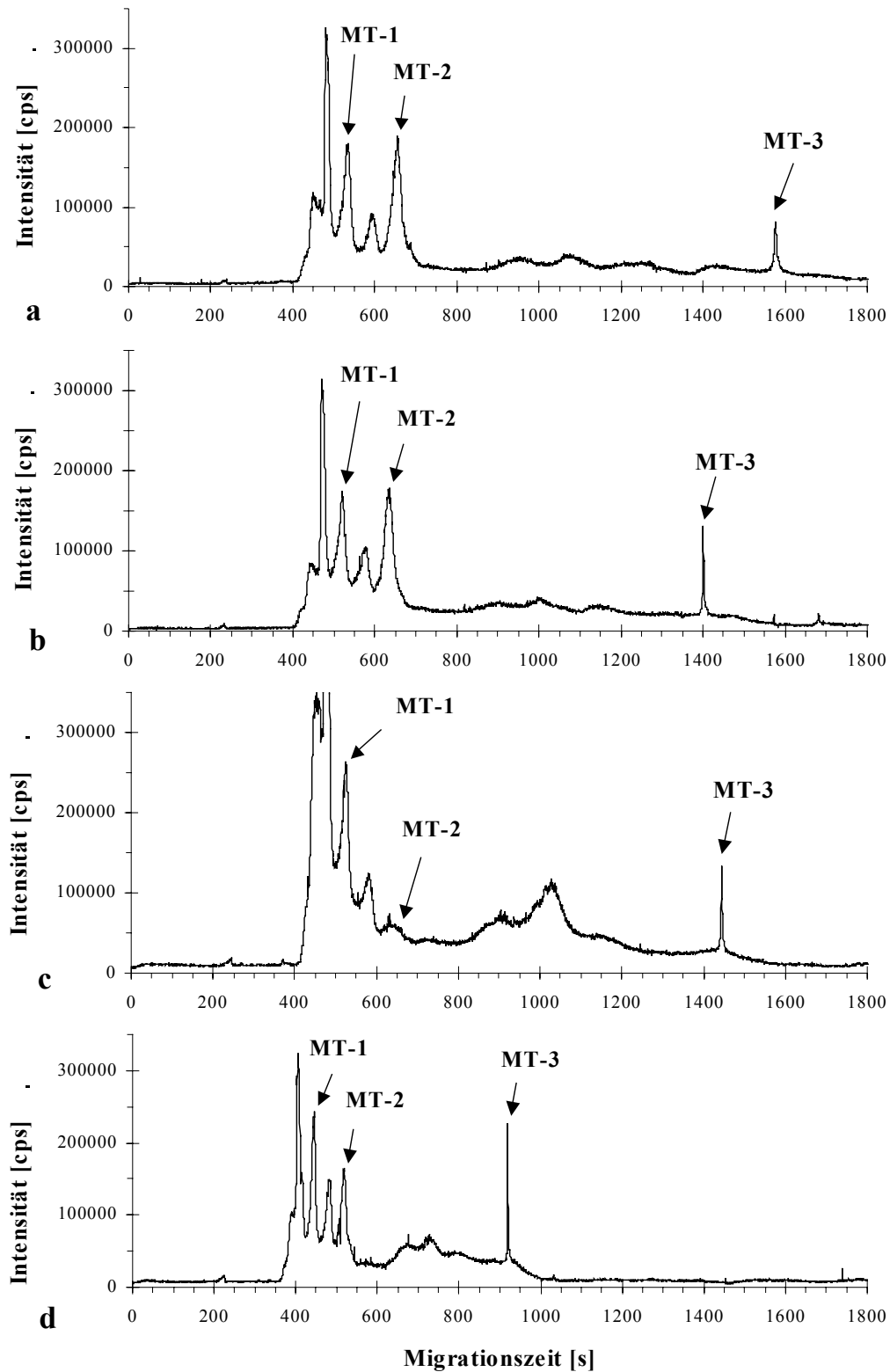


Abb. 7-12: Vergleich verschiedener Probenvorbereitungsmethoden (siehe **Tab. 7-7**): Kupfer-Elektropherogramme von **a)** unbehandeltem (entfettetem), **b)** verdünntem, **c)** hitzedenaturiertem und **d)** acetonitrilgefälltem humanen Gehirncytosol (temporale Region, Kontrolle)

Abb. 7-13 zeigt das Beispiel der elektrophoretischen Trennung von humanem Gehirncytosol (Kleinhirn) nach Acetonitrilfällung. MT-1, MT-2 und MT-3 wurden durch Vergleich mit den Einzelläufen (**Abb. 7-11**) verschiedenen Peaks zugeordnet¹⁵⁵. Diese Peaks enthalten Kupfer, Zink und Cadmium in unterschiedlichen Anteilen, bei MT-2 ist in diesem Fall kein Cadmium zu erkennen.

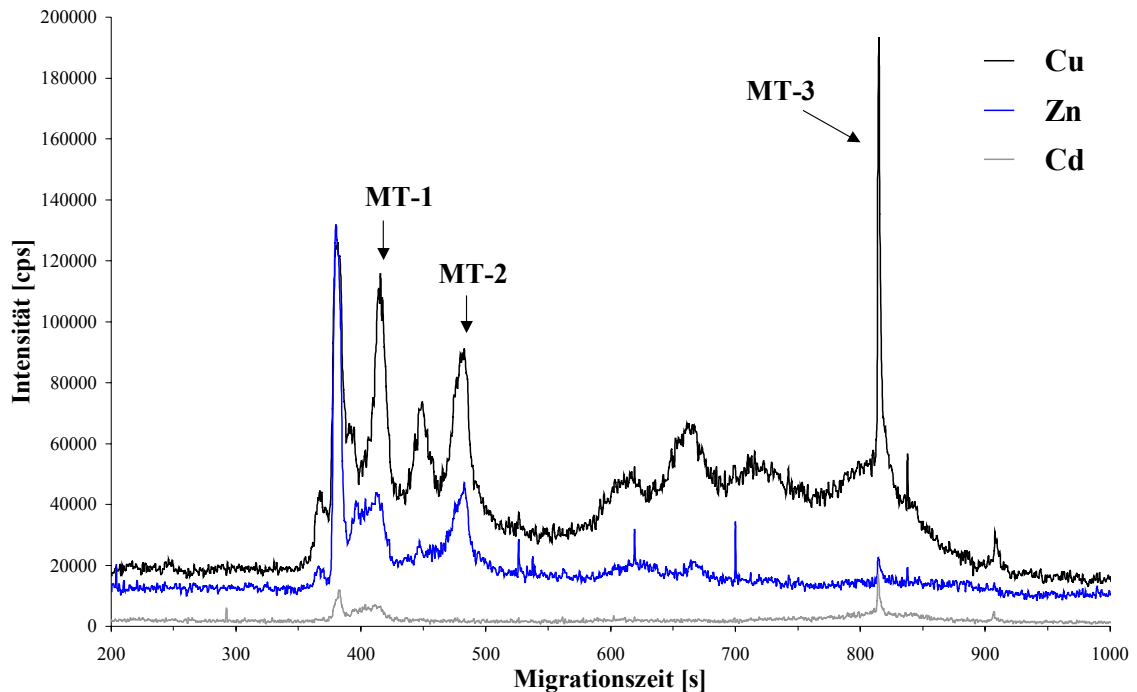


Abb. 7-13: Kupfer-, Zink- und Cadmium-Elektropherogramme von humanem Gehirncytosol (Kleinhirn, Kontrolle) nach Acetonitrilfällung

Eine genauere Aussage kann jedoch erst bei gewährleisteter Vergleichbarkeit der Migrationszeiten bei verschiedenen Proben gemacht werden, die trotz der durch Proteinabreicherung erzielten Verbesserung nicht gegeben war. Dabei ist auch die Betrachtung von unterschiedlichen Spezies (Mensch, Kaninchen, Schwein) und rekombinantem MT problematisch. Die geringen Abweichungen in der Aminosäuresequenz können Ladungsunterschiede und/oder Unterschiede in der Konformation und damit Beweglichkeit verursachen.

Weiterhin spielte die Instabilität der Proben eine Rolle. Bei mehrmaligem Auftauen und Einfrieren der Cytosolproben oder längerer Lagerung besteht die Gefahr der Zersetzung bzw. Oxidation der oxidationsempfindlichen MT. Durch diese Veränderungen der Proben bzw. der verwendeten Referenz-MT-Lösungen wiesen auch die Elektropherogramme Unterschiede auf, welche die Vergleichbarkeit und Zuordnung der MT zusätzlich erschwerten. Es war deshalb wichtig, mit möglichst frisch angesetzten Lösungen zu arbeiten bzw. die Proben bei mindestens -18°C und unter Argon zu lagern, um Oxidation zu verhindern, sowie nach dem Auftauen nur einmal zu verwenden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die einzelnen Isoformen MT-1, MT-2 und MT-3 im Cytosol von Gehirnprouben mit der CZE aufgetrennt werden konnten. Durch Proteinabreicherung mittels Acetonitrilfällung wurde die Messung bzw. Interpretation der Verteilungsmuster von komplexen Proben vereinfacht. Eine vorläufige Zuordnung der MT-Peaks wurde vorgenommen. Diese mußte jedoch durch weiterführende Untersuchungen noch bestätigt werden.

7.3.4 Einführung von Zeitmarkern

Ein Problem bei den elektrophoretischen Trennungen von Chromatographiefraktionen und dem Vergleich mit unbehandeltem oder acetonitrilgefälltem Gehirncytosol waren die Variationen der Migrationszeiten. Dadurch konnten z.B. einzelne MT-1- und MT-2-Fraktionen nicht deutlich unterschieden werden. Die größten Schwankungen traten am Ende der elektrophoretischen Läufe auf.

Die Variationen waren vermutlich auf Matrixeffekte zurückzuführen und konnten durch Proteinabreicherung mittels Acetonitril (ACN)- Fällung vor der CZE-Trennung vermindert werden (siehe Abschnitt 7.3.3). Auch mit den im nächsten Abschnitt beschriebenen vorgeschalteten chromatographischen Trennungen konnte eine Matrixabreicherung erzielt werden. Insgesamt wurden jedoch trotz dieser Probenvorbehandlungen weiterhin Variationen der Migrationszeiten beobachtet. Dies galt besonders für die MT-3 Fraktionen, wie in **Abb. 7-14** am Beispiel der elektrophoretischen Trennungen verschiedener MT-3-haltiger Proben deutlich zu sehen ist. Die MT-3-Fraktionen schienen immer noch einen relativ großen Matrixanteil zu enthalten. Außerdem sammelten sich wahrscheinlich Proteine an den Kapillarwandungen an, da mit weiteren Probentrennungen immer längere Verzögerungen beobachtet wurden. Eine Konditionierung der Kapillare mit KOH nach jedem Lauf war wegen der Empfindlichkeit der Kapillaroberfläche nicht möglich.

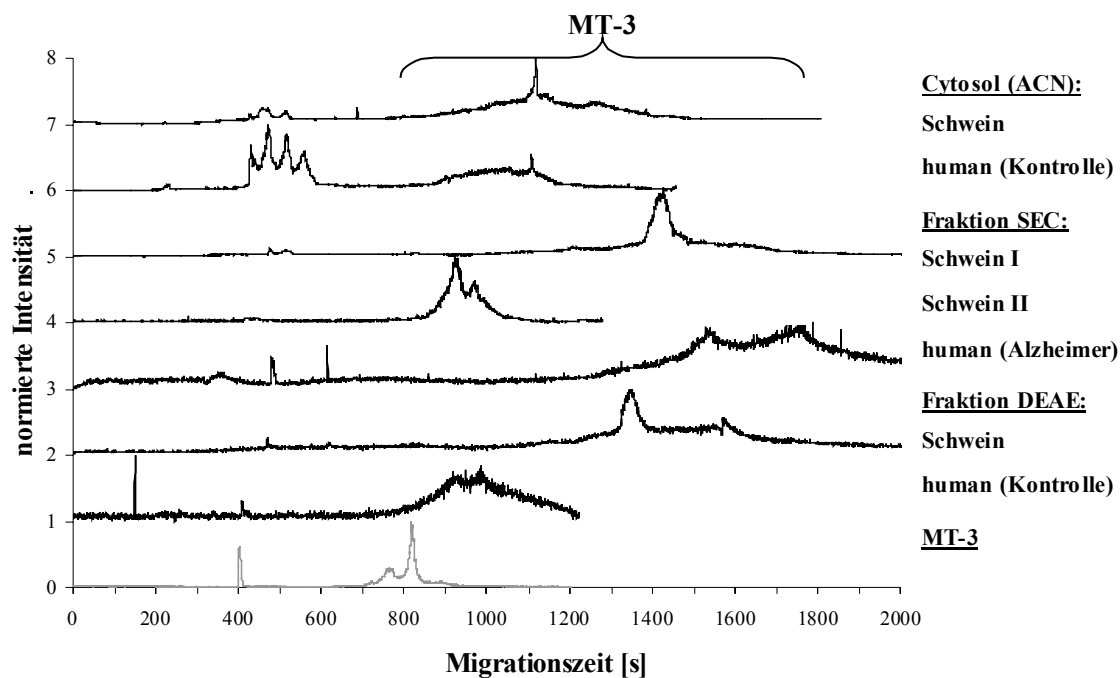


Abb. 7-14: Vergleich der Elektropherogramme (^{63}Cu , ^{64}Zn) von MT-3 enthaltenden Fraktionen (human und Schwein) vor der Zeitnormierung

Die Vergleichbarkeit der Elektropherogramme sollte durch einen Ausgleich der Variationen der Migrationszeiten mit Hilfe von Zeitmarkern erreicht werden.

Die Zeitmarker mußten scharfe Peaks ergeben und über den gesamten interessierenden Zeitbereich verteilt sein. Außerdem durften sie nicht mit den MT wechselwirken. Folgende Substanzen wurden als Marker gewählt:

- Cäsiumchlorid (20 µg·L⁻¹ Cs)
- Arsenocholin (200 µg·L⁻¹ As)
- Arsenobetain (200 µg·L⁻¹ As)
- Dimethylarsinsäure (200 µg·L⁻¹ As)
- Monomethylarsonsäure (200 µg·L⁻¹ As) .

Cäsium eluiert als Kation am Anfang des Elektropherogramms, die anderen Marker sind über den interessierenden Zeitbereich der aufgenommenen Elektropherogramme verteilt. Zuerst wurden Versuche mit nur zwei Zeitmarkern durchgeführt. Dies ergab eine Verbesserung der Vergleichbarkeit. Es stellte sich jedoch heraus, daß zwei Zeitmarker für eine Anpassung über den gesamten Bereich nicht ausreichend waren.

Zur rechnerischen Anpassung der Migrationszeiten wurde ein Elektropherogramm als Referenz gewählt. Die Migrationszeiten der Zeitmarker dieses Elektropherogramms sowie aller anzupassenden Elektropherogramme wurden bestimmt.

Zur Ermittlung des Zusammenhangs zwischen den Migrationszeiten der Referenz und des betrachteten Elektropherogramms wurden zunächst die Migrationszeiten der jeweiligen Zeitmarker gegeneinander aufgetragen. Für alle betrachteten Läufe ergaben sich lineare Zusammenhänge der Regressionsgeraden mit Korrelationskoeffizienten um 0,99 und höher. Auch waren nach der Anpassung der Zeitachsen die relativen Standardabweichungen der Migrationszeiten der Markersubstanzen - betrachtet über mehrere verschiedene Elektropherogramme - im hinteren Bereich der Zeitachse wesentlich geringer als ohne Korrektur (siehe **Tab. 7-8**). Es zeigte sich jedoch, daß die Migrationszeiten im vorderen Bereich der Zeitachse überkorrigiert wurden: Die Migrationszeiten von Cäsiumchlorid wiesen eine wesentlich höhere Standardabweichung auf als ohne Zeitnormierung.

Eine polynomische Anpassung lieferte schon bei der Betrachtung der Regressionsgeraden nicht in allen Fällen befriedigende Ergebnisse.

Deshalb wurde schließlich eine andere Auftragung gewählt: Das Verhältnis der Migrationszeiten des betrachteten Laufes zu denen des Referenzlaufes wurde gegen die Migrationszeiten der Zeitmarker des betrachteten Elektropherogramms aufgetragen. Hier ergab sich in allen Fällen ein linearer Zusammenhang. Die Steigung m und der Achsenabschnitt b wurden bestimmt und die angepaßten Zeiten mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zeit}_{\text{angepaßt}} = \frac{\text{Zeit}_{\text{Messung}}}{m \cdot \text{Zeit}_{\text{Messung}} + b}$$

Tab. 7-8: Mittelwerte der Migrationszeiten der einzelnen Zeitmarker vor und nach der rechnerischen Anpassung der Zeitachsen mittels verschiedener Berechnungen

Mittelwerte der Migrationszeiten							
Zeitmarker	Anzahl	original		lineare Anpassung		Anpassung über Verhältnis	
		[s]	rel. Stabw ^a	[s]	rel. Stabw ^a	[s]	rel. Stabw ^a
Cäsiumchlorid	48	185,9 ± 12,1 %		169,2 ± 22,9 %		185,3 ± 5,4 %	
Arsenocholin	48	268,2 ± 5,8 %		264,6 ± 4,3 %		269,2 ± 3,5 %	
Arsenobetain	48	454,5 ± 14,7 %		468,0 ± 6,8 %		454,0 ± 3,5 %	
Dimethylarsinsäure	39 ^b	1046,1 ± 24,9 %		1156,3 ± 5,4 %		1128,5 ± 2,6 %	
Monomethylarsonsäure	33 ^b	1433,5 ± 32,6 %		1646,3 ± 2,8 %		1664,3 ± 2,1 %	

^a relative Standardabweichung; ^b Die Migrationszeiten dieser Zeitmarker waren wegen des Abbruchs einiger Läufe vor ihrer Elution nicht für alle Elektropherogramme vorhanden.

Abb. 7-15 zeigt die Zeitmarker der elektrophoretischen Trennungen aus **Abb. 7-14** vor (a) und nach (b) dieser rechnerischen Anpassung der Zeitachsen. Die vorher weit auseinanderliegenden Zeitmarker konnten durch die Anpassung der Migrationszeiten zusammengeführt werden und liegen nun alle nahezu bei der gleichen Migrationszeit. In **Tab. 7-8** sind die Mittelwerte der Migrationszeiten für die einzelnen Markersubstanzen vor und nach der Zeitnormierung für alle durchgeführten elektrophoretischen Trennungen aufgeführt. Die relativen Standardabweichungen sind bei dieser Berechnung für alle Zeitmarker wesentlich geringer als vor der Anpassung der Zeitachsen. Auch im hinteren - wegen der großen Migrationszeitschwankungen von MT-3 besonders interessierenden - Zeitachsenbereich sind die Standardabweichungen noch geringer als bei linearer Anpassung. Die verwendete Anpassung der Zeitachsen über Verhältnisse der Migrationszeiten der Zeitmarker hat sich somit als geeignet erwiesen.

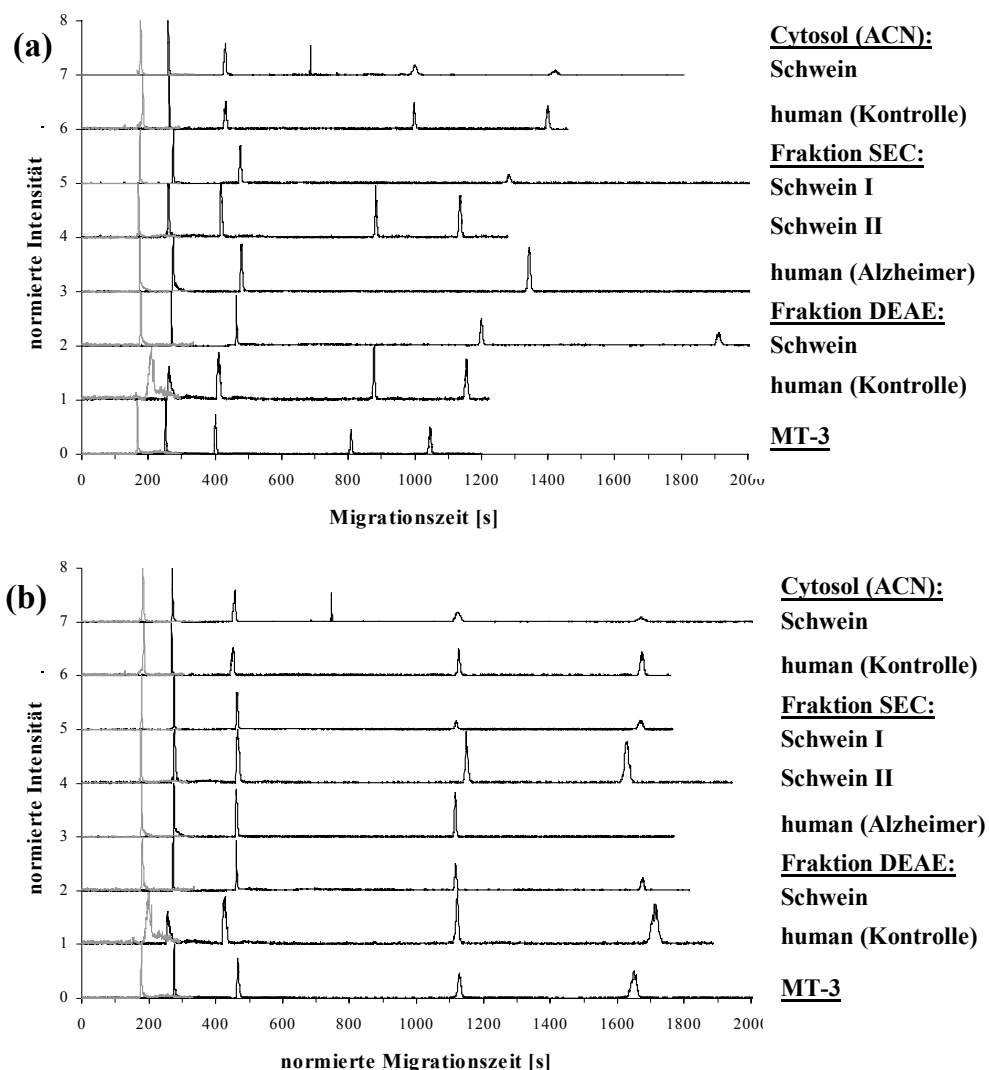


Abb. 7-15: Elektropherogramme (^{133}Cs , ^{75}As) der Zeitmarker von MT-3 enthaltenden Fraktionen (human und Schwein) **a)** vor und **b)** nach der rechnerischen Anpassung der Zeitachsen

In **Abb. 7-16** sind die selben elektrophoretischen Trennungen wie in **Abb. 7-14** dargestellt, diesmal jedoch nach der Zeitnormierung mit Hilfe der Zeitmarker. Die Migrationszeiten der einzelnen Peaks stimmen nun gut überein, selbst bei den vorher weit auseinandergezogenen MT-3-Signalen.

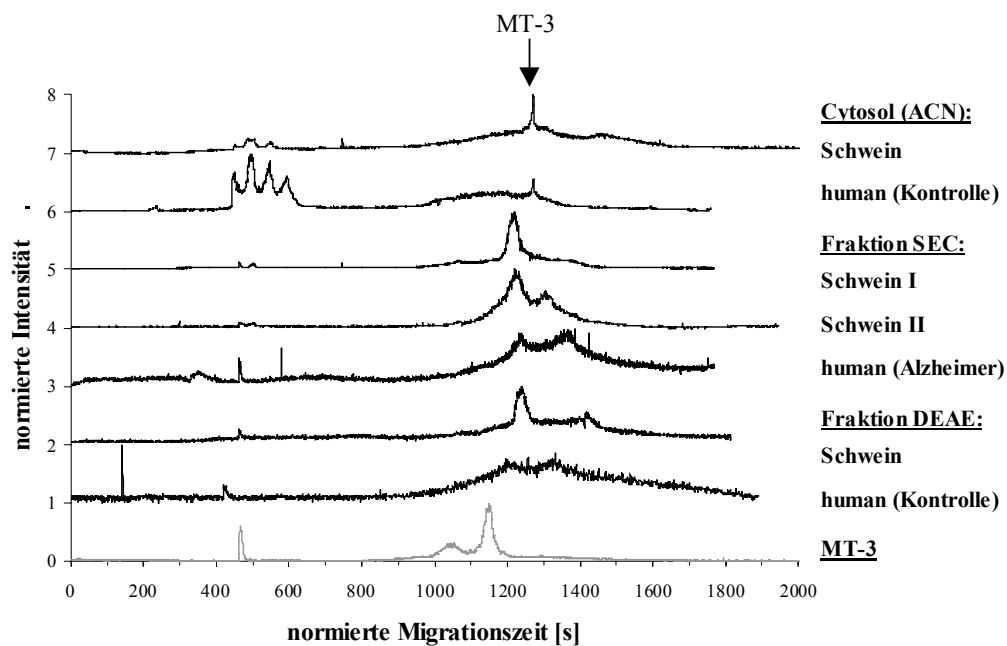


Abb. 7-16: Vergleich der Elektropherogramme (^{63}Cu , ^{64}Zn) von MT-3 enthaltenden Fraktionen (human und Schwein) nach der Zeitnormierung

Die Anpassung funktioniert im allgemeinen im vorderen Bereich der Zeitachse gut, bei längeren Migrationszeiten können Schwankungen nicht immer völlig ausgeglichen werden. Dies ist auf Unregelmäßigkeiten der Elution zurückzuführen. Es wurden insbesondere Verzögerungen im Bereich der Migrationszeit des MT-3 beobachtet. An dieser Stelle brachen einige Elektropherogramme - von unbehandeltem Cytosol - teilweise ganz ab (siehe **Abb. 7-17**), was auf eine Störung wie z.B. durch einen großen Proteingehalt hinweist. Während der Elution eines in hoher Konzentration vorkommenden Matrixbestandteils wird die elektrische Feldstärke in der Probenzone in der Kapillare verändert, was zu geänderten Migrationsgeschwindigkeiten führt¹⁵⁴. Solche unregelmäßigen Verzögerungen können nur schwer ausgeglichen werden. Insgesamt ist jedoch durch Einbeziehung der Zeitmarker eine ausreichende Vergleichbarkeit der Migrationszeiten gewährleistet.

7.3.5 Kombination von SEC, AEC und Kapillarzonelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung von MT in Gehirncytosol wurde mit der chromatographischen Trennung mittels Größenausschlusschromatographie und Anionenaustauscherchromatographie kombiniert. Die Kombination dieser verschiedenen Trennmechanismen ermöglicht:

- die Überprüfung der Reinheit der mit einer Methode erhaltenen Fraktionen mit einem anderen Verfahren bzw. eine weitere Auftrennung der enthaltenen Proteine
- die Nutzung der präparativen HPLC-Techniken als Matrix-Reduktionsschritt vor der gegenüber Matrixeffekten empfindlichen CZE-Trennung
- die Bestätigung der Identität von Peaks in den Elementprofilen mit Hilfe von Fraktionen bekannter Identität einer anderen Trennung.

Gehirncytosole - human und vom Schwein - wurden chromatographisch mittels SEC auf der Superdex 75PG-Säule und mittels AEC auf der DEAE-Säule getrennt. Es wurden jeweils die den MT-Isoformen MT-1, MT-2 und MT-3 sowie der SOD entsprechenden Fraktionen zusammengefaßt und mit Ultrafiltrationsmembranen aufkonzentriert (siehe Abschnitt 7.2). Bei ersten Versuchen war die Vergleichbarkeit der einzelnen Peaks in den Elementprofilen der elektrophoretisch getrennten Proben durch Zersetzung bzw. Oxidation und Verluste während Fraktionierung und Einengung beeinträchtigt worden. Dem wurde daraufhin durch Zusatz von DTT in den Elutionspuffern der chromatographischen Trennungen vorgebeugt. Des weiteren wurden die Fraktionen unter Kühlung eingeeengt, anschließend sofort mit Argon überschichtet tiefgefroren und bis zur CZE-Trennung bei -18°C gelagert.

Mit der Zeitnormierung der Elektropherogramme war ein genauerer Vergleich der elektrophoretischen Trennungen der Cytosolproben mit den Einzelläufen von MT-1, MT-2, MT-3 und SOD möglich. In **Abb. 7-18** ist das Elektropherogramm der Trennung von humanem Gehirncytosol (acetonitrilgefällt) im Vergleich zu den Einzelläufen zu sehen. In den beiden Läufen der kommerziell erhältlichen MT, welche jeweils auch die andere Isoform aufweisen, haben MT-1 und MT-2 durch die zeitnormierte Achse nun jeweils eine einheitliche Migrationszeit. Es zeigte sich, daß die SOD zusammen mit MT-2 eluiert. Der Vergleich mit den Migrationszeiten der Peaks des Gehirncytosols bestätigte die vorherige Zuordnung der entsprechenden Signale.

Der Einzellauf von MT-3 hatte jedoch trotz Zeitnormierung nicht die gleiche Migrationszeit wie das fragliche MT-3-Signal im Elektropherogramm des humanen Gehirns. Speziesunterschiede können hier ausgeschlossen werden, da es sich auch bei dem Einzellauf um humanes MT-3 handelt. Außerdem wiesen die MT-1- und MT-2-Signale trotz unterschiedlicher Spezies die gleiche normierte Migrationszeit auf.

Als sichere Bestätigung der Identität der Peaks konnten die Fraktionen der SEC-Trennung herangezogen werden, da dort die entsprechenden Proteine nachgewiesen worden waren (siehe Kapitel 6.1 und 6.2.1). **Abb. 7-17** zeigt die Elektropherogramme der aufkonzentrierten MT-1/-2-, MT-3- und SOD-Fraktionen im Vergleich zur elektrophoretischen Trennung von unbehandeltem Gehirncytosol und zu den Einzelläufen. Der Lauf des unbehandelten Cytosols ist - vermutlich wegen des hohen Proteingehaltes an dieser Stelle des Laufes - kurz vor dem MT-3-Signal abgebrochen. Die Peaks mit einer normierten Migrationszeit von etwa 470 s sind auf das in den Proben vorhandene DTT zurückzuführen. Die MT-1/-2 entsprechende SEC-Fraktion weist nach der CZE-Trennung zwei Peaks auf, die genau mit den MT-1- und MT-2-Signalen der Einzelläufe übereinstimmen. Auch die SOD-Fraktion zeigt im Elektropherogramm einen Peak, der dem des SOD-Einzellaufes entspricht und die gleiche Migrationszeit wie MT-2 hat. Die Zuordnung dieser Peaks in den Elektropherogrammen kann deshalb als gesichert gelten.

Zusätzlich wurde durch die CZE-Trennung der MT-1/-2-Fraktion aus der SEC-Trennung über die Superdex 75PG-Säule bestätigt, daß in dem betrachteten SEC-Peak tatsächlich beide MT-Isoformen eluieren. Die Elektropherogramme der MT-1 und MT-2 enthaltenden DEAE-Fraktionen in **Abb. 7-18** weisen ebenfalls Signale bei den entsprechenden zeitnormierten Migrationszeiten auf. Umgekehrt kann durch diese Übereinstimmung mit den vorher ermittelten MT-CZE-Signalen auch wiederum die Identität der DEAE-Peaks bestätigt werden.

Das Signal im Elektropherogramm der SEC-MT-3-Fraktion weist auch in **Abb. 7-17** eine andere Migrationszeit auf als der Einzellauf. Es handelt sich außerdem um einen breiten Doppelpeak.

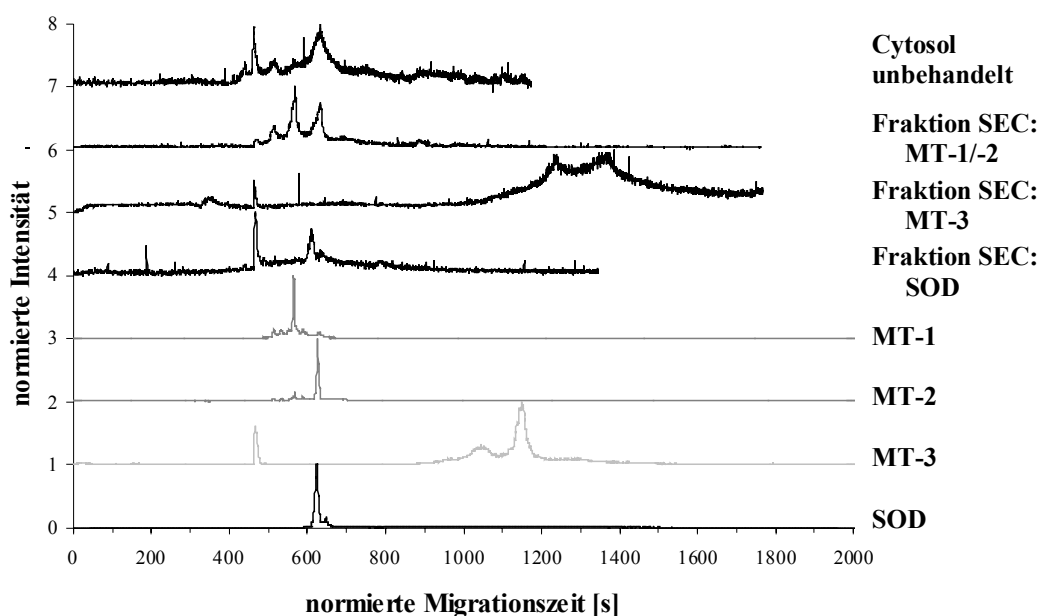


Abb. 7-17: MT- und SOD-Peaks in den zeitnormierten Elektropherogrammen (— ^{63}Cu , — ^{114}Cd , — ^{64}Zn) der Fraktionen der SEC-Trennung von humanem Gehirncytosol (Alzheimer, Zusatz von DTT), des entsprechenden unbehandelten Cytosols sowie der CZE-Einzelläufe von MT-1 (Kaninchen), MT-2 (Kaninchen), MT-3 (rekombinant human) und SOD (human)

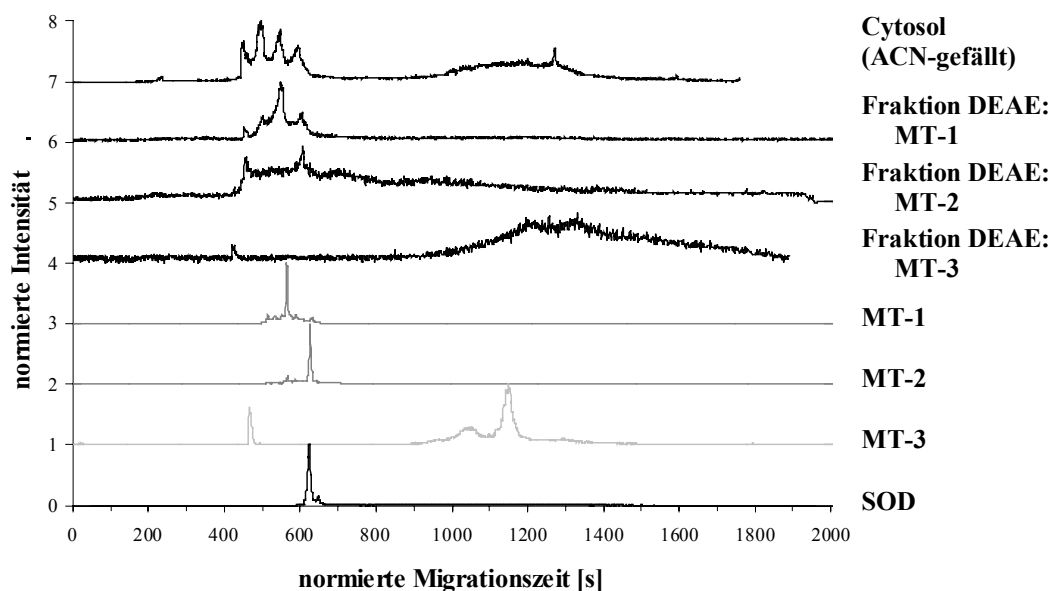


Abb. 7-18: MT- und SOD-Peaks in den zeitnormierten Elektropherogrammen (— ^{63}Cu , — ^{114}Cd , — ^{64}Zn) der Fraktionen der DEAE-Trennung von humanem Gehirncytosol (Kontrolle, Zusatz von DTT), des entsprechenden acetonitrilgefällten Cytosols sowie der CZE-Einzelläufe von MT-1 (Kaninchen), MT-2 (Kaninchen), MT-3 (rekombinant human) und SOD (human)

Abb. 7-16 zeigt die zeitnormierten Elektropherogramme der MT-3-Fractionen von SEC und DEAE sowie die CZE-Trennungen der acetonitrilbehandelten Gehirncytosole, jeweils human und vom Schwein, im Vergleich zum Einzellauf von MT-3. Es fällt auf, daß die Migrationszeiten der MT-3-Signale bei allen Proben gut übereinstimmen, mit Ausnahme des Einzellaufes. Dabei handelt es sich bei den Proben um unabhängig voneinander, mit verschiedenen Methoden vorbereitete und von verschiedenen Spezies stammende Proben. Deshalb wird angenommen, daß sich die Einzelsubstanz - humanes rekombinantes MT-3 - von dem im Gehirncytosol vorkommenden Protein unterscheiden muß. Möglicherweise verursacht die bei rekombinanten Proteinen oft fehlende Acetylierung einen Ladungsunterschied, der sich bei der CZE stärker auf die Trennung auswirkt als bei der DEAE. Durch die Übereinstimmung mit der SEC-MT-3-Fraktion wurde das Signal in den Elektropherogrammen der Gehirncytosole jedoch sicher bestätigt.

Nicht geklärt werden konnte, warum das MT-3-Signal in den Elektropherogrammen oft als breiter Doppelpeak auftritt, manchmal aber auch ein sehr scharfes Signal ergibt. Außerdem wurde ein breites Triplett-Signal vor der MT-3-Elution wiederholt in verschiedenen, auch acetonitrilbehandelten Cytosolproben ausgemacht (siehe **Abb. 7-13**). Die Breite der Peaks ist wahrscheinlich durch eine hohe, koeluierende Proteinkonzentration bedingt. Der Doppelpeak trat in verschiedenen, mit DTT versetzten Proben auf. Es sollte sich demnach nicht um eine oxidierte Form des MT-3 handeln. Möglicherweise existieren voneinander getrennt eluierende verschiedene Metallbeladungsformen des MT-3, acetylierte und unacetylierte Formen. Zur Aufklärung dieses Problems müssen bei zukünftigen Untersuchungen weitere Methoden wie z.B. die Elektrospray Ionisations-Massenspektrometrie zur Molekülidentifizierung herangezogen werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die durchgeführten Versuche die Eignung der CZE-ICP-SFMS-Kopplung für die Trennung und elementspezifische Detektion der MT-Isoformen aus kleinen Probenvolumina bestätigen. Insbesondere konnte die Anwendbarkeit der Trennung auf komplexe biologische Proben - am Beispiel der Trennung der MT in Gehirncytosolen - gezeigt werden. Allerdings wurde der Zeitvorteil der Trennung durch aufwendige Spülzeiten eingeschränkt.

Es wurde wieder deutlich, daß die Trennung von Realproben andere und mehr Probleme aufwirft als die Trennung von Einzelsubstanzen. Die Vergleichbarkeit der Elektropherogramme konnte durch den Ausgleich der Variationen der Migrationszeiten durch eine Zeitnormierung mittels Zeitmarkern erreicht werden. Es zeigte sich ebenfalls wieder, daß auf die Probenvorbereitung und -handhabung - besonders im Hinblick auf die Vermeidung von Zersetzung und Oxidation - besonders geachtet werden muß.

Ein Einfluß von Speziesunterschieden zwischen den MT von Kaninchen, Schwein und Mensch auf die CZE-Trennung wurde nicht festgestellt. Dagegen wies das rekombinante humane MT-3 ein unterschiedliches Migrationsverhalten auf, was vermutlich an der fehlenden Acetylierung des exprimierten Proteins lag. Für den Vergleich von Probenbestandteilen mit Einzelsubstanzen ist demnach eine genaue Überprüfung der Eignung der gewählten Referenzsubstanzen notwendig.

Die den Isoformen MT-1, MT-2 und MT-3 sowie SOD entsprechenden Signale in den Elektropherogrammen konnten zugeordnet werden. Dazu wurden neben Einzelsubstanzen die Fraktionen der SEC-Trennung verwendet, deren Identität bereits vorher bekannt war.

Schließlich konnte mit Hilfe des anderen Trennmechanismus der CZE das Vorhandensein von beiden Isoformen MT-1 und MT-2 in der MT-Fraktion der chromatographischen Trennung über die Superdex 75PG-Säule bestätigt werden.

7.4 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit der SDS-PAGE können Proteine nach ihrer Größe getrennt werden. Das Prinzip wurde bereits in Kapitel 6.1.5.3 beschrieben. Mit Hilfe dieser Methode sollte festgestellt werden, wie viele Proteine - auch Nicht-Metalloproteine - sich in den MT-3-Fractionen befinden. Dafür wurden bei einer chromatographischen Trennung von Gehirncytosol (Schwein) auf der Superdex 75PG-Säule die entsprechenden Fraktionen zu je 1 mL aufgefangen und anschließend mittels Ultrafiltrationsmembranen (Centricon) aufkonzentriert.

Die einzelnen Fraktionen sowie rekombinantes humanes MT-3 wurden auf ein Gradientengel (Tris-Tricine, 10-20%) aufgegeben und geleelektrophoretisch getrennt. Das Gel wurde mit einer Silberfärbung angefärbt, die für MT besonders gut geeignet ist¹²⁶. Einzelheiten der experimentellen Durchführung wurden in Kapitel 6.1.5.3 beschrieben.

Abb. 7-19 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese. Die Molmassen der den einzelnen Banden entsprechenden Proteine können über den Vergleich mit den Molmassenmarkern abgeschätzt werden. Die Bande bei etwa 30 kDa konnte durch einen Leerlauf auf dem Tris-Tricine-Gel als Artefakt eingeordnet werden. Das als Referenz dienende humane MT-3 weist hier eine Molmasse von etwa 20 kDa auf. Bei der Größenausschlußchromatographie wurde für MT-3 ebenfalls eine größere als die theoretische Molmasse gefunden (siehe Kapitel 9). Die dem MT-3 zuzuordnende Bande tritt auch in den entsprechenden Fraktionen der SEC-Trennung auf, besonders stark in den Fraktionen 36 bis 38.

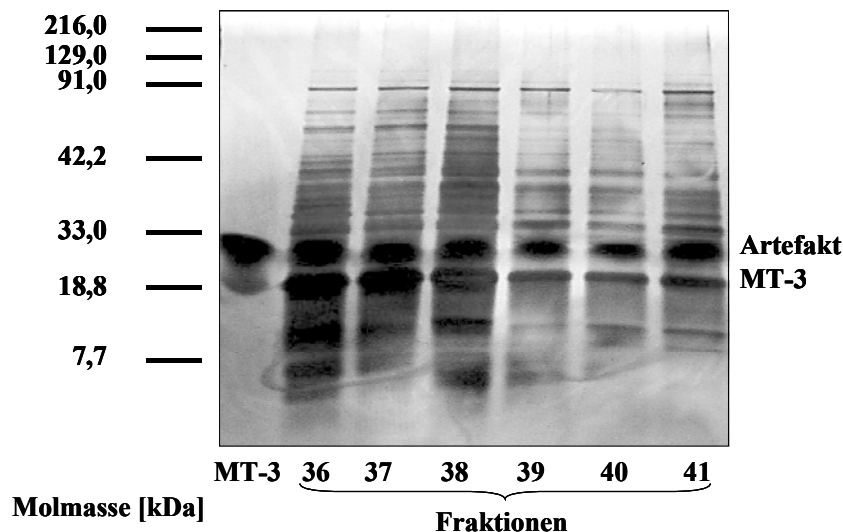


Abb. 7-19: SDS-PAGE von gesammelten Fraktionen der SEC-Trennung von Gehirncytosol (Schwein) über die Superdex 75PG-Säule

Außer MT-3 wurden jedoch auch mehrere andere Proteinbanden gefunden. Die SEC ist wie zu erwarten nicht für die alleinige Aufreinigung von Proteinen geeignet. Die Auflösung reicht nicht zur Auftrennung aller Proteine aus. Es müssen jeweils verschiedene Verfahren mit unterschiedlichen Trennmechanismen hintereinander angewendet werden, um z.B. eine Auftrennung von Proteinen mit ähnlicher Molmasse zu erreichen (siehe auch Kapitel 11.1).

Es wird jedoch angenommen, daß nur wenige oder keine anderen Metalloproteine im MT-3-Peak eluieren und somit bei der Betrachtung der Elementprofile mit dem entsprechenden Peak hauptsächlich MT-3 erfaßt wird.

7.5 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Mit der in Kapitel 6.1.5.1 beschriebenen SELDI-TOF-Massenspektrometrie wurde die Zusammensetzung der Proben untersucht. Die dabei erhaltenen Massenspektren geben einen Überblick über die in der Probe vorhandenen Proteine bezüglich ihrer Molmassen.

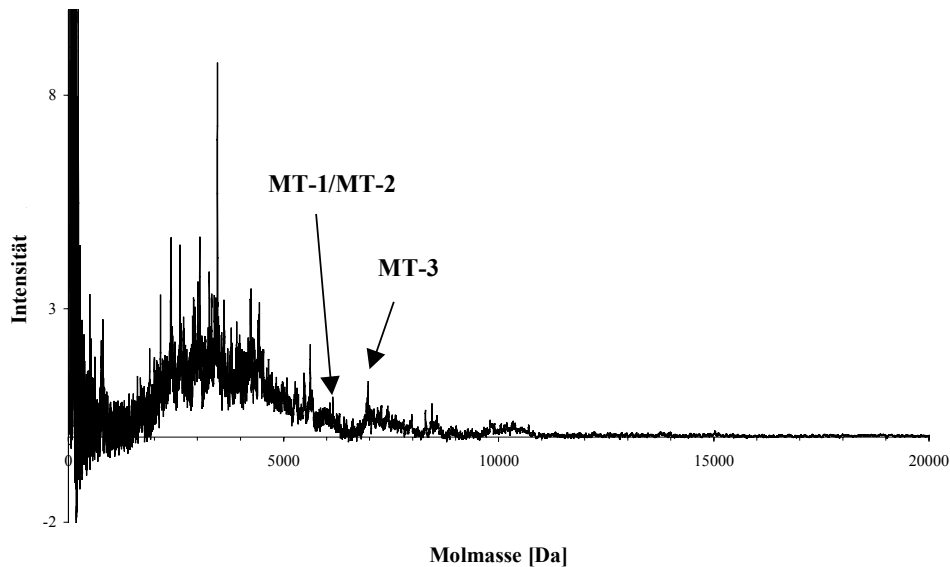


Abb. 7-20: SELDI-TOF-Massenspektrum von Gehirnhomogenat (Schwein)

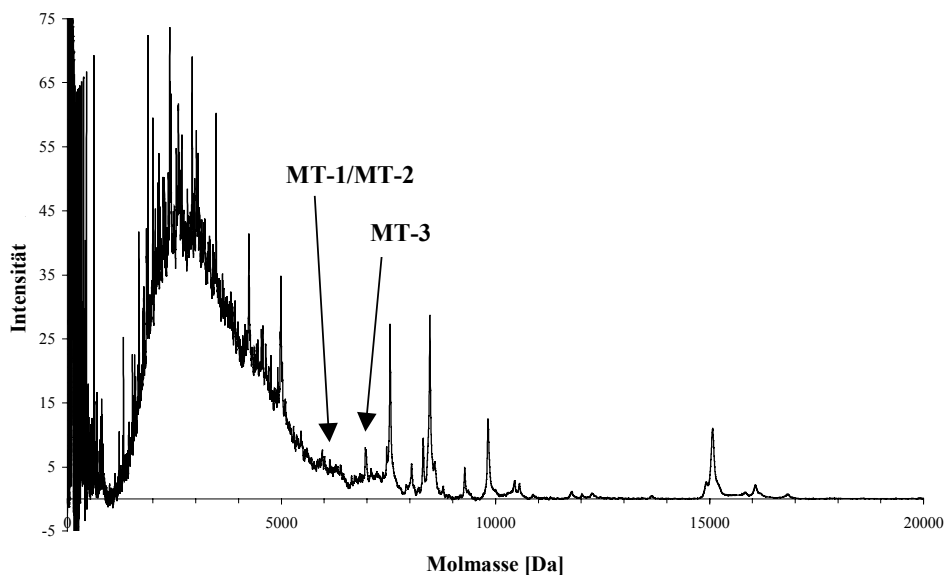


Abb. 7-21: SELDI-TOF-Massenspektrum von Gehirncytosol (Schwein) nach der Ultrazentrifugation

Abb. 7-20 zeigt das Massenspektrum von Gehirnhomogenat (Schwein), d.h. dem in Tris-Puffer homogenisierten Gewebe vor der Ultrazentrifugation. In diesem Fall wurde nach der Probenaufgabe auf den Proteinchip ein Waschschritt durchgeführt (siehe Kapitel 6.1.5.1). Bei der Laserablation von konzentrierten Gemischen wie dem Homogenat, das auch noch

Zellbestandteile wie Membranen enthält, wurden niedrigere Intensitäten beobachtet, nicht alle Proteine können ionisiert werden. Die den Molmassen von MT-1/-2 und MT-3 entsprechenden „Peaks“ sind in der Abbildung markiert. Sie heben sich schwach vom Untergrund ab.

Das Massenspektrum des Überstandes nach der Ultrazentrifugation, des Gehirncytosols (Schwein), ist in **Abb. 7-21** dargestellt. Hier ist das dem MT-3 entsprechende Signal deutlicher zu erkennen. Wie zu erwarten befinden sich eine Vielzahl weiterer Proteine in hohen Konzentrationen im Cytosol.

Abb. 7-22 zeigt das Massenspektrum einer dem MT-3 entsprechenden Fraktion der chromatographischen Trennung über die Superdex 75PG-Säule. Das MT-3-Signal hat deutlich an Intensität im Vergleich zu anderen noch vorhandenen Proteinen gewonnen. Diese konnten mit der SEC jedoch nicht vollständig abgetrennt werden, wie auch die SDS-PAGE der Fraktionen gezeigt hat (siehe Abschnitt 7.4).

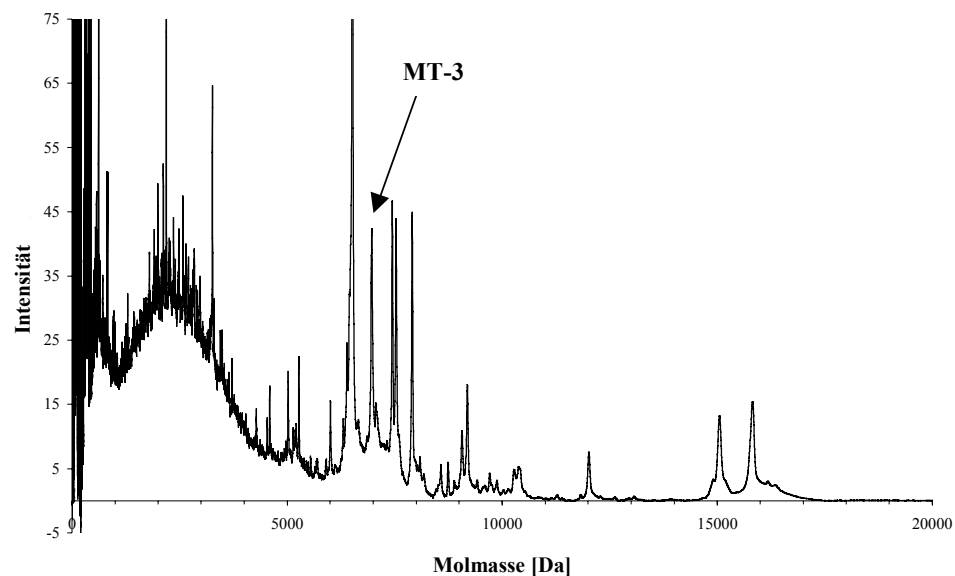


Abb. 7-22: SELDI-TOF-Massenspektrum einer MT-3 enthaltenden Fraktion der chromatographischen Trennung von Gehirncytosol (Schwein) auf der Superdex 75PG-Säule

Da die MALDI-TOF-MS ebenso wie die SDS-PAGE die Proteine nach ihren Molmassen trennt, wurden die dort erhaltenen Ergebnisse bestätigt.

Vom Homogenat zur SEC-Fraktion wurde eine deutliche Abreicherung von Proteinen über das Massenspektrum verfolgt. Ein einzelner chromatographischer Trennschritt reichte jedoch nicht zur vollständigen Aufreinigung des Proteins aus. Die Isolierung von MT-3 aus dem Gehirngewebe über mehrere Trennschritte wird in Kapitel 11.1 behandelt.

7.6 Zusammenfassung

Die unterschiedlichen Trennmethoden mit on-line gekoppelter Elementdetektion, die zur Auftrennung von Biomolekülen in Gewebecytosolen verwendet wurden, haben jeweils unterschiedliche Stärken. Je nach Probenmaterial, Probenmenge und Zielsetzung der

durchzuführenden Untersuchungen muß die geeignetste Trennmethode ausgewählt werden. Eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Verfahren ist in **Tab. 7-9** gegeben.

Tab. 7-9: Übersicht der verwendeten Trennverfahren zur Untersuchung von Metalloproteinen in Gewebecytosolen

Trennverfahren	Eigenschaften	Anwendungen
SEC ^a (Superdex 75PG)	+ Abtrennung des MT-3 von den anderen MT-Isoformen + Auftrennung über einen weiten Molmassenbereich - MT-1/-2 nicht getrennt	→ Betrachtung von MT-3 → Untersuchung eines breiten Spektrums von Metalloproteinen
SEC ^a (Superdex 75HR)	Vergleich mit der Superdex 75PG: + größere Empfindlichkeit der Elementdetektion + bessere Trennung bei niedrigen Molmassen + schnellere Trennung - keine Trennung von MT-3	→ Untersuchung von Molekülen mit niedrigen Molmassen (MT-1/-2)
AEC ^b (Fractogel EMD DEAE)	+ Trennung der Isoformen MT-1, MT-2 und MT-3 - hohe Salzfrachten bei Gradientenelution, ungeeignet für ICP-MS	→ Betrachtung der einzelnen MT-Isoformen
CZE ^c (unbeschichtete Kapillare)	+ hohe Auflösung + Trennung der Isoformen MT-1, MT-2, MT-3 + sehr geringer Probenbedarf - in Entwicklung - matrixempfindlich	→ Betrachtung der einzelnen MT-Isoformen → sehr kleine Probenvolumina
SDS-PAGE	+ Trennung und Detektion auch von Nicht-Metalloproteinen - Metalle nicht detektierbar (bei Denaturierung verloren)	→ Übersicht über in einer Probe enthaltene Proteine → Untersuchung der Reinheit einer Fraktion
MALDI-TOF-MS	+ Trennung und Detektion auch von Nicht-Metalloproteinen - Metalle gehen bei Ablation/Ionisierung zum Teil verloren	→ Bestimmung von Molmassen → Übersicht über in einer Probe enthaltene Proteine → Untersuchung der Reinheit einer Fraktion

on-line gekoppelte Multielementdetektion mit: ^a ICP-QMS, ^b ICP-AES, ^c ICP-SFMS

Für den Vergleich der Elementverteilungen in Gewebecytosolen und ihrer Abhängigkeit von physiologischen und pathologischen Prozessen sollte ein möglichst breites Spektrum an Metalloproteinen erfaßt und ein großes Probenkollektiv untersucht werden. Ein wichtiger Aspekt war dabei die Betrachtung des MT-3 in Gehirnprouben. Die Speziationsanalysen wurden deshalb mit der Superdex 75PG-Säule mit on-line gekoppelter ICP-MS durchgeführt.

8 Ergebnisse der Untersuchungen der Organproben

Im menschlichen Organismus gibt es mindestens 200 verschiedene Zellarten. Eukaryotische Organismen (Tiere, Pflanzen) umfassen allgemein eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen, die sich in Größe und Struktur unterscheiden und auf unterschiedliche Aufgaben spezialisiert sind¹⁰². Deshalb kann davon ausgegangen werden, daß die Zellen zur Ausübung der verschiedenen Funktionen auch unterschiedliche Arten oder Konzentrationen von Proteinen und Enzymen enthalten. Dies wurde bereits bei der Untersuchung der Leitenzyme der Zellorganellen im Cytosol von Zellen unterschiedlicher Organe bestätigt (siehe Kapitel 5.4.1).

Im folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchung verschiedener Organe auf ihre Elementgehalte sowie deren Verteilung auf die Metalloproteine in den Cytosolen diskutiert und Unterschiede zwischen den Organen aufgezeigt. Des weiteren wurden die Elementprofile im Cytosol eines bestimmten Organs - der Leber - von verschiedenen Patienten verglichen, um festzustellen, ob pathologisch bedingte Unterschiede zu erkennen sind.

8.1 Durchführung der Messungen der Gesamtgehalte

Die humanen Organproben mußten als potentiell infektiös angesehen und mit entsprechender Vorsicht gehandhabt werden. Eine effektive Methode zur Sterilisierung der Proben und damit sichereren Handhabung ist die intensive Gammabestrahlung mit einer Kobalt-Quelle. Diese konnte jedoch nicht bei den Geweben und den daraus extrahierten Cytosolen angewendet werden, welche für die Trennung der Proteine und die Detektion der gebundenen Elemente vorgesehen waren. Durch die Bestrahlung werden viele Proteine denaturiert und verlieren damit ihre gebundenen Metalle, so daß eine Untersuchung des nativen Zustands der Metalloproteine im Cytosol danach nicht mehr möglich ist. Die Untersuchung der Gesamtgehalte der Metalle wird durch eine Proteindenaturierung jedoch nicht beeinflusst. Die hierfür vorgesehenen Cytosolproben und Gewebe wurden demnach einer Bestrahlung in der ⁶⁰Co-Quelle am Hahn-Meitner-Institut mit einer Dosis >30 kGray unterzogen.

Die Gehalte von Zink, Selen und Eisen in Geweben und Cytosolen wurden mittels der Instrumentellen Neutronenaktivierungsanalyse (INAA) im Forschungsreaktor BER II des Hahn-Meitner-Institutes bestimmt. Dieses Verfahren beruht auf der Aktivierung der Elemente durch Neutronen. Zur Quantifizierung werden anschließend die charakteristischen emittierten γ -Emissionslinien der neu gebildeten Radioisotope in hochreinen Germanium-Detektoren gemessen. Die INAA ist besonders nachweisstark und kontaminationsunempfindlich, da nur eine geringe Probenvorbereitung notwendig ist.

Die Gewebeproben wurden einer Gefriertrocknung unterzogen und die lyophilisierten Proben anschließend in Quarzampullen eingeschmolzen. Die Cytosolproben wurden direkt in die Quarzampullen eingefüllt und bei 50°C eingetrocknet. Die Gehalte der untersuchten Elemente im Homogenisierungspuffer (Tris) wurden als Blindwert für die Cytosolproben ebenfalls bestimmt. Sie befanden sich unter der Nachweisgrenze bzw. waren für die in den Proben befindlichen Puffermengen vernachlässigbar.

Die Konzentrationen von Kupfer und Cadmium in den Cytosolproben wurden mittels Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) bestimmt. Die Meßparameter sind in **Tab. 8-1** aufgeführt. Für Kupfer und Cadmium traten ebenfalls keine Blindwerte im Tris-Puffer auf.

Tab. 8-1: Meßparameter der Graphitrohr-AAS

	Kupfer	Cadmium
Strahlungsquelle:	HKL ^a (15 mA)	EDL-2 ^b (170 mA)
Wellenlänge:	324,8 nm	228,8 nm
Matrixmodifizierung:	-	5 µg Pd (als Nitrat)
Präatomisierungstemperatur:	1000°C	500°C
Atomisierungstemperatur:	2300°C	1700°C
Kalibrierung:	Standardaddition	Standardaddition

^a HKL: Hohlkathodenlampe, ^b EDL: elektrodenlose Entladungslampe

Zur Vergleichbarkeit der Elementgehalte der verschiedenen Proben können die Ergebnisse für die Gewebe- und Cytosolproben jeweils auf die Trockenmasse bezogen werden. Die Trockenmasse des Tris-Puffers muß dabei bei den Cytosolproben vorher abgezogen werden. Andere Möglichkeiten für den Vergleich der Cytosolproben sind der Bezug auf den Proteingehalt bzw. die Einberechnung der unterschiedlichen Probenverdünnungen bei der Homogenisierung.

8.2 Untersuchungen der Gesamtelementgehalte in den Organproben

Die Gewebe von 12 verschiedenen Organen - Gehirn, Leber, Niere, Herzmuskel, Skelettmuskel, Milz, Schilddrüse, Lunge, Pankreas, Dünndarm, Dickdarm, Haut - sowie Knochenmark und Knochen eines Sepsis-Patienten wurden auf ihre Zink-, Selen- und Eisengehalte untersucht. Die Proben wurden lyophilisiert und die Elemente mittels INAA bestimmt. Die auf die Trockenmasse bezogenen Elementgehalte sind in **Abb. 8-1** dargestellt.

Eine im Vergleich zu den andern Organen hohe Zinkkonzentration ist in der Leber zu erkennen, was auch Literaturangaben entspricht¹⁵⁷. Da die Leber einen hohen MT-Gehalt aufweist, ist eine Korrelation zwischen dem hohen Zinkgehalt und dem MT-Gehalt wahrscheinlich¹⁵⁸.

Der Selengehalt ist am größten in Niere und Schilddrüse. Der auch in der Literatur beschriebene hohe Selengehalt in der Schilddrüse ist auf mehrere für deren Funktion wichtige Selenoproteine zurückzuführen: drei Formen der Glutathion Peroxidase, die Typ I-Diodase, Thioredoxin Reduktase und Selenoprotein P¹⁵⁹. Deiodasen sind am Schilddrüsenhormon-Stoffwechsel beteiligt (siehe auch Kapitel 6.2.8). Sie werden auch in anderen Organen wie Leber und Niere exprimiert¹⁴⁶. Da in der Schilddrüse kontinuierlich Wasserstoffperoxid gebildet wird, ist ein effektives Schutzsystem gegen H₂O₂ und reaktive Sauerstoffzwischenprodukte notwendig, wofür vorwiegend die GPx dienen¹⁵⁹.

Die Eisengehalte liefern keine genauen Angaben über die Konzentration in den Zellen, da mit den Geweben auch die Restblutgehalte der umgebenden Blutgefäße gemessen werden. Sie lassen damit jedoch auch Rückschlüsse auf die Durchblutung der betreffenden Gewebe zu. Wie in **Abb. 8-1** zu sehen ist, weisen Milz und Leber die höchsten Eisengehalte auf,

was wiederum Literaturangaben entspricht¹⁵⁷. Eisenhaltiges Hämoglobin wird in der Leber aus den Erythrozyten abgebaut und das Eisen zur Blutbildung wiederverwendet¹⁶⁰. Ferritin ist der Haupt-Eisenspeicher im Organismus und kommt hauptsächlich in Leber, Milz, Knochenmark und Darmschleimhaut vor¹⁶⁰.

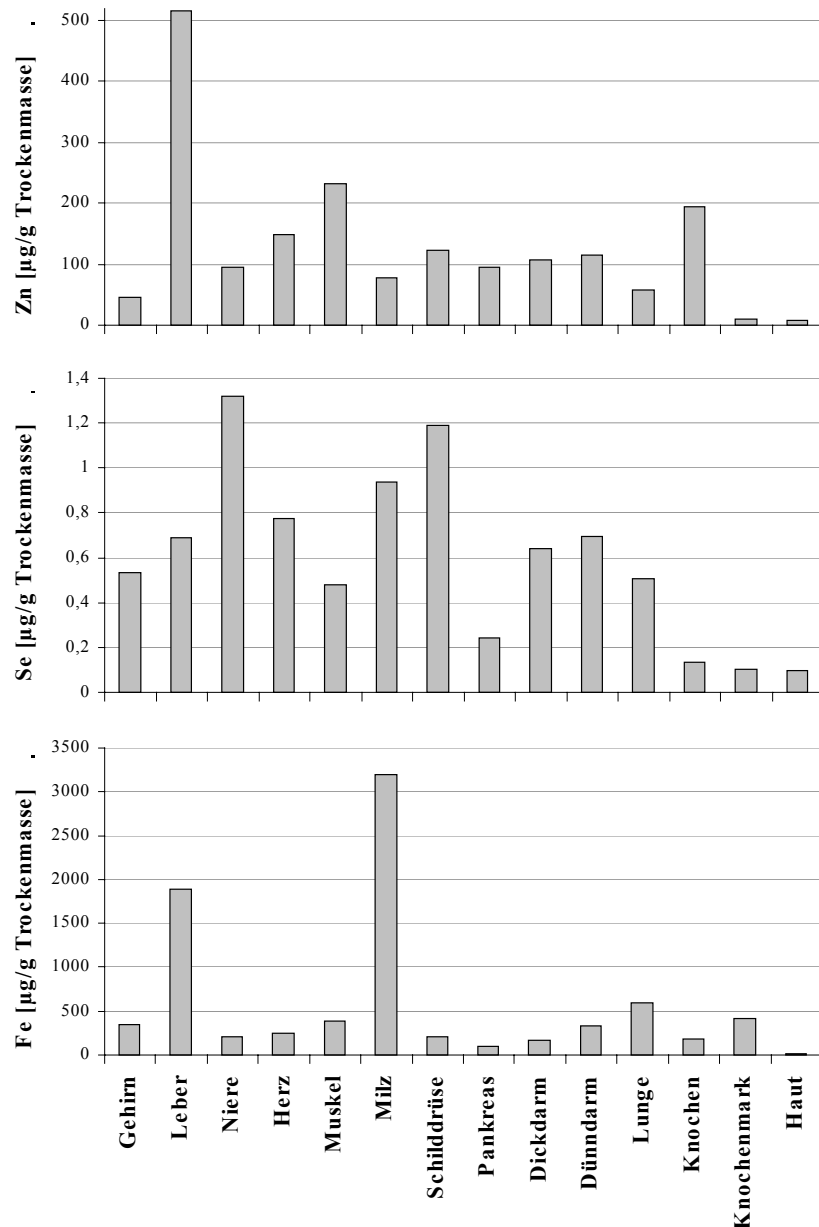


Abb. 8-1: Vergleich der Zink-, Selen- und Eisengehalte im Gewebe unterschiedlicher Organe eines Sepsis-Patienten, bezogen auf die Trockenmasse

Gesamtelementgehalte wurden außerdem in den Cytosolen unterschiedlicher Organe bestimmt. **Tab. 8-2** zeigt die Ergebnisse für Gehirn, Leber, Niere und Herzmuskel. Dabei ist zu berücksichtigen, daß es sich bei den Proben um Organe mit jeweils verschiedener Pathologie handelt, die auch die Spurenelementgehalte bzw. Metalloproteingehalte in den Geweben beeinflusst haben konnte. Aus den Bestimmungen in Cytosolen von Organen mehrerer Patienten wurden die Mittelwerte gebildet. Die Werte sind auf die Trockenmasse bezogen.

Tab. 8-2: Vergleich der Kupfer-, Cadmium-, Zink- und Selengehalte sowie der SOD-Aktivität im Cytosol verschiedener humaner Organe

	Cu [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{ TM}^{\text{a}}$] (Patientenanzahl)	Cd [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{ TM}$] (Patientenanzahl)	Zn [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{ TM}$] (Patientenanzahl)	Se [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{ TM}$] (Patientenanzahl)	SOD [$\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\text{ TM}$] (Patientenanzahl)
Gehirn ^b	95±14 (14) ^b	0,5±0,2 (14)	132±36 (14)	0,9±0,2 (14)	9000±2000 (14)
Leber ^c	24± 9 (2)	1,1±0,7 (2)	66 (1)	0,5 (1)	6000±5000 (2)
Niere ^c	16± 3 (2)	26,8±0,8 (2)	116±27 (2)	1,1±0,7 (2)	5000± 600 (2)
Herzmuskel ^d	17± 5 (2)	0,5±0,3 (2)	105±34 (2)	0,6±0,1 (2)	6000±4000 (2)

^a TM: Trockenmasse,

^b keine Alzheimer-Patienten; ^c Patienten Nr. 18, 19 bzw. nur Nr. 19; ^d Patienten Nr. 1, 8 (siehe Anhang)

Der Kupfergehalt ist im Vergleich im Gehirn am höchsten. Nach Literaturangaben wird ein Drittel des im menschlichen Organismus enthaltenen Kupfers in Leber und Gehirn gefunden¹⁶¹.

Ein besonders hoher Cadmiumgehalt wurde in der Niere nachgewiesen¹⁶¹. In diesem Organ wird das von MT im Organismus abgefangene Cadmium mit sehr hoher biologischer Halbwertszeit eingelagert⁴⁸.

Die Zinkgehalte sind im Cytosol der Organe etwa gleich hoch, für die Leber kann anhand nur eines Patienten (Leberzirrhose) - mit relativ niedrigem Zinkgehalt - keine Aussage getroffen werden. Es ist möglich, daß der im Gegensatz zum Zinkgehalt im Gewebe (**Abb. 8-1**) niedrige Wert durch die jeweils von einem anderen Patienten gemessenen individuellen Proben bedingt ist. Es können jedoch auch im Cytosol weniger Zinkproteine vorhanden sein, da in diesem Fall nur der lösliche Anteil betrachtet wird.

Die Selengehalte sind im Rahmen der Standardabweichungen vergleichbar hoch. Durch die hohen Schwankungen kann der gegenüber den anderen drei Organen höhere Selen-Gesamtgehalt in der Niere im Cytosol nicht mit Sicherheit bestätigt werden.

Auch die auf die Trockenmasse bezogene SOD-Aktivität war in den Organen in der gleichen Größenordnung zu finden.

Wie aus den Standardabweichungen ersichtlich ist, gibt es große Schwankungen zwischen verschiedenen Patienten, die Elementgehalte werden höchstwahrscheinlich durch unterschiedliche Krankheitsbilder verschiedentlich beeinflusst. Es war jedoch nicht möglich, Gewebe von Kontrollen ohne pathologischen Einfluß zu erhalten.

Einige bei humanen Gewebecytosolen festgestellte Tendenzen konnten in den Cytosolen von Geweben vom Schwein bestätigt werden. **Tab. 8-3** zeigt die Kupfer- und Cadmiumgehalte sowie die SOD-Aktivitäten.

Tab. 8-3: Vergleich von Kupfer- und Cadmiumgehalten sowie der SOD-Aktivität im Cytosol verschiedener Organe vom Schwein (jeweils 1 Probe)

	Cu [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{ Gesamtprotein}$]	Cd [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{ Gesamtprotein}$]	SOD [$\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\text{ Gesamtprotein}$]
Gehirn	119	0,1	12000
Leber	37	1,4	18000
Niere	66	2,0	19000
Herzmuskel	9	0,4	8000

Die Kupferkonzentration ist im Gehirncytosol am höchsten. Der im Vergleich größte Cadmiumgehalt wurde auch beim Schwein in der Niere gefunden, gefolgt von der Leber. In der Leber wird Cadmium von den MT gebunden, bevor die Cd-MT in die Nieren gelangen⁵¹. Die SOD-Aktivität war in den gemessenen Cytosolen vom Schwein in Niere und Leber höher als in Gehirn und Herzmuskel.

8.3 Elementprofile im Cytosol unterschiedlicher Organe

Aus den in Abschnitt 8.2 auf ihren Gesamtelementgehalt untersuchten Geweben des Sepsis-Patienten wurde das Cytosol extrahiert: Gehirn, Leber, Niere, Herzmuskel, Skelettmuskel, Milz, Schilddrüse, Lunge, Pankreas, Dünndarm, Dickdarm und Knochenmark. Die enthaltenen Makromoleküle wurden über die Superdex 75PG-Säule chromatographisch nach ihrer Größe aufgetrennt und die Metalle on-line mittels ICP-MS detektiert. Die erhaltenen Elementprofile von Eisen, Kupfer, Zink und Iod sind in **Abb. 8-2**, **Abb. 8-4** und **Abb. 8-5** zum Vergleich normiert aufgetragen. In **Abb. 8-3** werden die Signalintensitäten der Eisen-, Cadmium-, Zink-, Kupfer- und Selen-Profile verglichen.

Beim Vergleich der Eisenmuster (**Abb. 8-2**) fällt besonders das Myoglobin auf, welches sich wie erwartet nur in Muskelgewebe - im Herzmuskel und Skelettmuskel - befindet. Die dem Ferritin, Transferrin und Hämoglobin zugeordneten Peaks kommen im Cytosol aller untersuchten Organe vor, jedoch in unterschiedlichen Verhältnissen. So überwiegt das Ferritin gegenüber den beiden anderen eisenhaltigen Proteinen im Gehirn, in der Leber, im Skelettmuskel, in der Milz und im Pankreas. Dagegen ist ein ausgeprägter Hämoglobin-Peak in Niere, Herzmuskel, Schilddrüse, Lunge, Dün- und Dickdarm sowie im Knochenmark vorhanden. Damit wird die These von unterschiedlichen Metalloproteinmustern in unterschiedlichen Organen bestätigt.

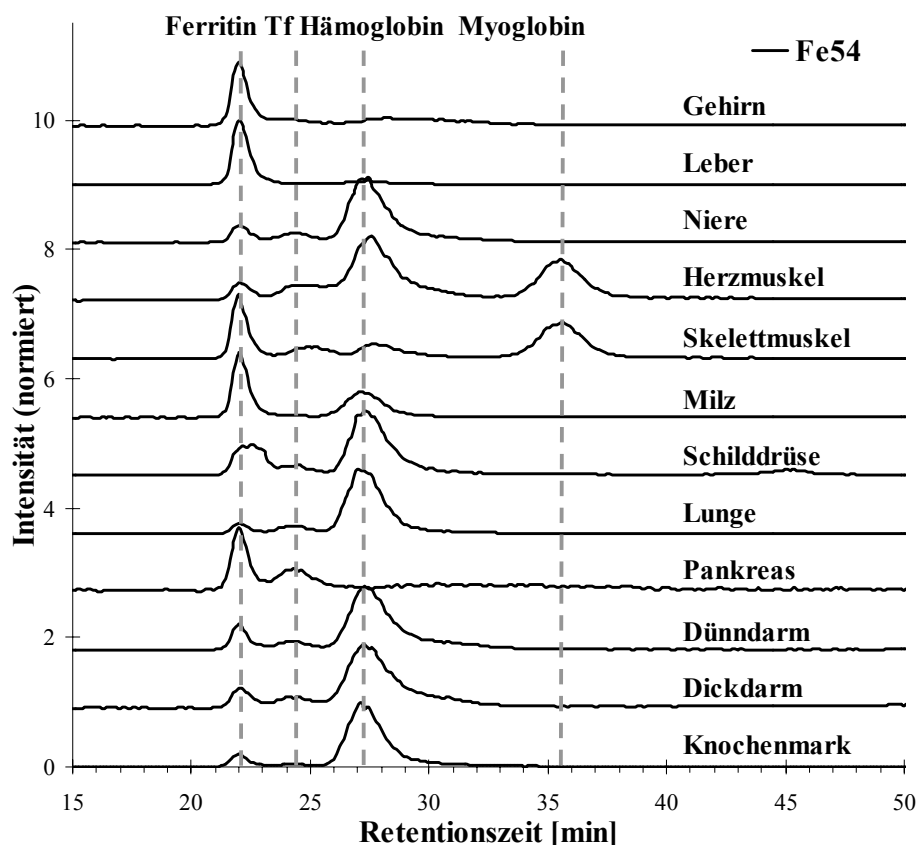


Abb. 8-2: Vergleich der Eisen-Profile der chromatographischen Trennung von Cytosolen unterschiedlicher humaner Organe (Sepsis-Patient); Tf: Transferrin

Für genauere Aussagen müssen auch die Intensitäten der Signale zwischen den verschiedenen Organen verglichen werden (siehe **Abb. 8-3**). Die bei weitem größten

Ferritin-Signale finden sich bei Leber und Milz. Das eisenspeichernde Ferritin kommt tatsächlich in hoher Konzentration in Leber, Milz und Knochenmark vor¹⁶⁰. Auch das Signal von Ferritin im Knochenmark ist in **Abb. 8-3** zu erkennen. Bei den Ferritin-Signalen von Leber und Milz handelt es sich insgesamt um die größten gemessenen Eisen-Signale in den untersuchten Cytosolen. Dies stimmt mit den im Gesamtgewebe bestimmten Eisengehalten überein, die für Milz und Leber am höchsten waren (siehe **Abb. 8-1**). Dabei ist in der Milz der Hämoglobin-Anteil größer als in der Leber und entspricht etwa dem in Lunge und Knochenmark (**Abb. 8-3**). Im Knochenmark werden die hämoglobinhaltigen Erythrozyten gebildet¹⁶⁰, die Lunge und Milz sind stark durchblutete Organe, wodurch sich der hohe Hämoglobin-Anteil erklären läßt.

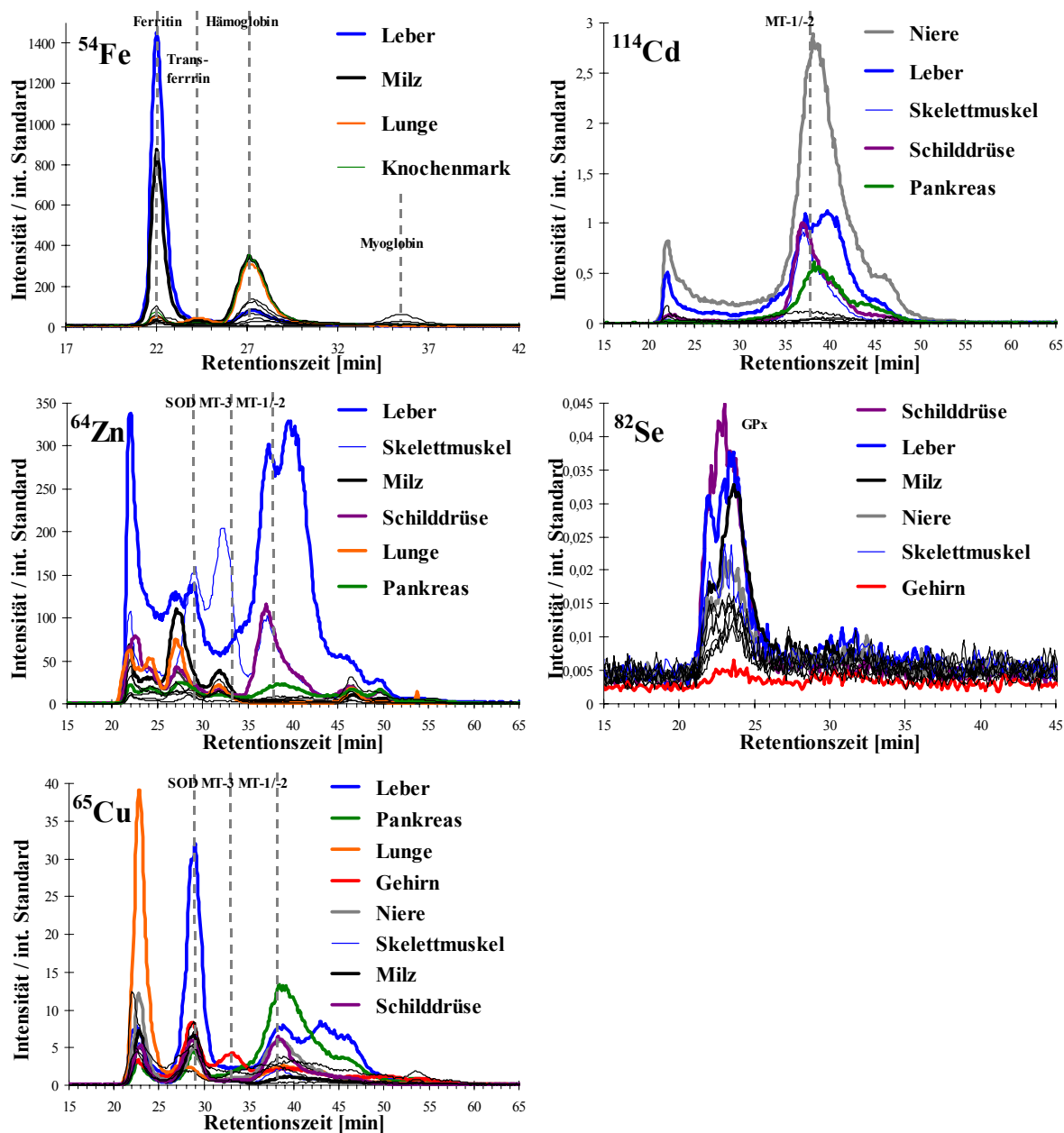


Abb. 8-3: Vergleich der Signalintensitäten der Eisen-, Cadmium-, Zink-, Selen- und Kupfer-Profile der chromatographischen Trennung von Cytosolen unterschiedlicher humaner Organe (Sepsis-Patient); die Reihenfolge der Organe in den Legenden entspricht ungefähr der Intensitätsverteilung

Die unterschiedlichen Elementprofilmuster der Organe werden auch bei der Kombination der Kupfer- und Zink-Profile deutlich (siehe **Abb. 8-4**). Vor allem die Zink-Profile weisen in den verschiedenen Organen eine unterschiedliche Anzahl an Peaks mit unterschiedlicher Intensitätsverteilung auf. Die Cytosole von Pankreas und Herzmuskel beispielsweise enthalten besonders viele Zinkproteine. Bei den Kupfer-Profilen sind weniger Peaks vorhanden, die Muster unterscheiden sich jedoch in der relativen Höhe der Signale.

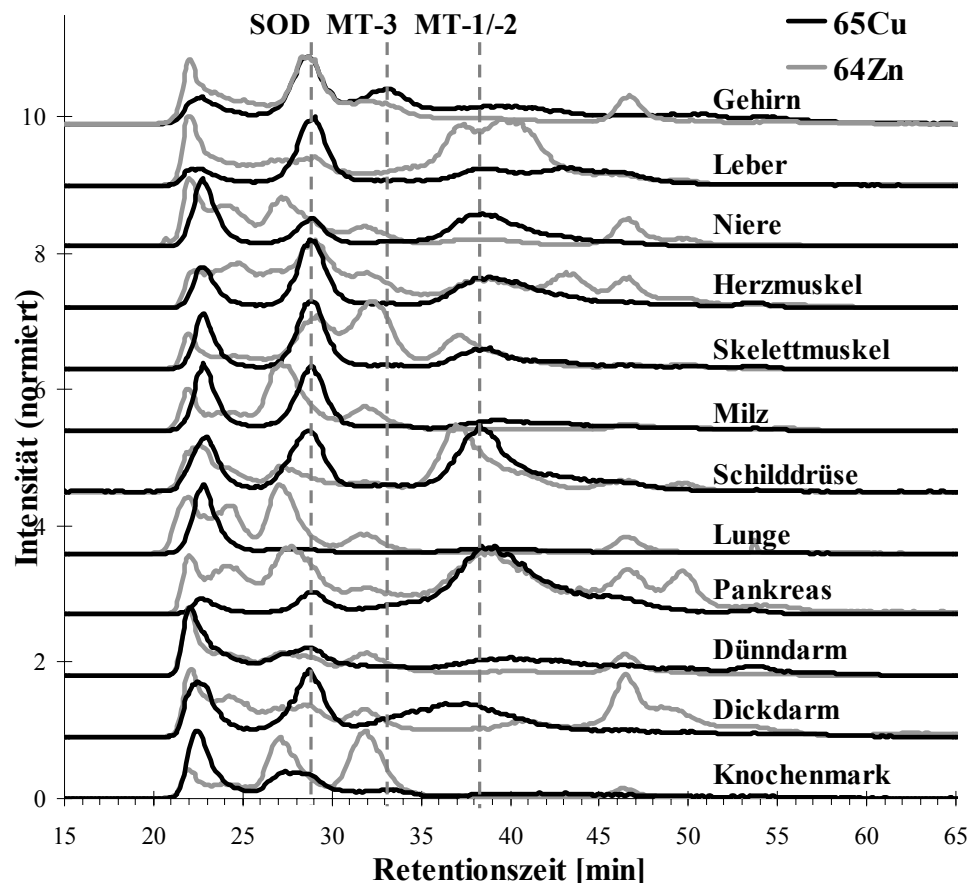


Abb. 8-4: Vergleich der Kupfer- und Zink-Profile der chromatographischen Trennung von Cytosolen unterschiedlicher humaner Organe (Sepsis-Patient)

Das Kupfer und Zink enthaltende MT-3 tritt nur im Gehirncytosol auf. Ein in einigen Profilen vorkommender, auch Kupfer und Zink enthaltender Peak mit einem Retentionszeitunterschied von nur 1 min zum MT-3 wurde durch Hitzeausfällung und nicht stattfindende Cadmiumbeladung als nicht-MT eingeordnet. Die Signale der MT im Gehirn des Sepsis-Patienten im Vergleich zur SOD weisen ein ähnliches Muster auf wie bei den AD-Gehirnen (siehe Kapitel 12.4.4): Die MT-Metall-Peaks sind erniedrigt. Es spielen sich demnach möglicherweise bei Entzündungen ähnliche oxidative Prozesse ab wie bei der Alzheimer'schen Krankheit (siehe Kapitel 12.4.5). AD wurde in der Literatur ebenfalls als entzündlicher Prozeß diskutiert¹⁶². Da in einem anderen untersuchten Gehirncytosol eines Sepsis-Patienten⁵ keine erniedrigten MT-Metall-Peaks in den Elementprofilen gefunden wurden, kann der Vorgang nicht für Sepsis-Patienten verallgemeinert werden. Es scheint auf die genauen Auswirkungen der Entzündungsvorgänge anzukommen.

Die Signale der kupfer- und zinkhaltigen Proteine SOD und MT-1/MT-2 sind in den meisten Elementprofilen in **Abb. 8-4** zu erkennen. Die Intensitäten relativ zu den anderen

in den jeweiligen Organcytosolen vorhandenen Kupfer- oder Zinkproteinen variieren jedoch. Beim MT-1/-2-Peak ist die unterschiedliche Verschiebung der Kupfer- und Zink-Signale interessant: Bei Leber, Skelettmuskel und Schilddrüse z.B. weisen die Kupfer- und Zink-Signale verschiedene Retentionszeiten auf, bei Herzmuskel und Pankreas stimmt die Retentionszeit genau überein. Wie in Kapitel 9 diskutiert wird, handelt es sich um eine geringe Auftrennung der Isoformen auf der Superdex 75PG-Säule. Sie wird nur dann in einem Elementprofil erkennbar, wenn die Isoformen MT-1 und MT-2 das Element in stark unterschiedlichem Verhältnis gebunden haben. Dabei eluiert MT-2 vor MT-1. MT-2 scheint mehr Zink, MT-1 mehr Kupfer zu binden, wie die hier untersuchten Beispiele zeigen. Die Retentionszeiten der MT werden insgesamt auch durch partielle Oxidation beeinflusst (siehe Kapitel 10).

Die Intensität des MT-Zink-Signals war im Cytosol der Leber am höchsten (siehe **Abb. 8-3**). Auch der Ausschlußpeak hatte im Profil des Lebercytosols den größten Zinkgehalt. Damit ist der besonders hohe Zinkgesamtgehalt der Leber (**Abb. 8-1**) korreliert. Relativ hohe Zink-MT-Signale wiesen auch Skelettmuskel und Schilddrüse auf.

Das von der Retentionszeit Zink-SOD entsprechende Signal ist besonders bei Leber und Skelettmuskel ausgeprägt. Das entsprechende Kupfer-Signal ist bei der Leber bei weitem am größten. Die SOD sollte Kupfer und Zink in gleichem Verhältnis enthalten. Demnach müßten die Verhältnisse der Zink-SOD-Signale der verschiedenen Gewebe zueinander identisch mit denen der Kupfer-SOD-Signale sein. Dies ist hier nicht der Fall, was Grund zu der Annahme gibt, daß sich unter dem SOD-Peak in der Leber ein weiteres Kupferprotein verbirgt oder entsprechend ein Zinkprotein beim Skelettmuskel. Eine weitere Möglichkeit ist eine abweichende Stöchiometrie der SOD-gebundenen Metalle.

Die Kupfer-Profile in **Abb. 8-3** zeigen noch einmal deutlich, daß der MT-3-Peak nur im Gehirncytosol auftritt.

Erkennbare Quecksilber-Signale waren an den MT bei Leber und Schilddrüse und im Ausschlußpeak bei der Leber zu erkennen. MT-Silber-Peaks traten bei Gehirn, Leber, Niere, Herz- und Skelettmuskel sowie Schilddrüse und Pankreas auf.

Cadmium war in den Profilen vor allem an MT gebunden, im Gehirn mehr an MT-3 als an MT-1/-2. Der Vergleich der Intensitäten des MT-Cadmium-Peaks (siehe **Abb. 8-3**) zeigte das größte Signal im Cytosol der Niere. Höhere Intensitäten traten außerdem bei der Leber sowie bei Skelettmuskel, Schilddrüse und Pankreas auf. Dies korreliert mit dem bei der Bestimmung der Gesamtgehalte (**Tab. 8-2** und **Tab. 8-3**) festgestellten hohen Cadmiumgehalt der Niere. Das Cadmium-Profil des Gehirncytosols wies mit die niedrigsten Intensitäten auf. Dies kann an der Blut-Hirn-Schranke liegen, welche den Stoffaustausch zwischen Blut und Hirnsubstanz aktiv kontrolliert und dadurch schädliche Stoffe von den Nervenzellen fernhalten soll¹⁶⁰. Dadurch würde sich auch die fehlende Induzierbarkeit von MT-1, MT-2 und MT-3 durch Cadmium im Gehirn erklären⁴⁷.

Die Muster der Selen-Profile wiesen in der Anzahl der Peaks beim Vergleich der verschiedenen Organcytosole kaum Unterschiede auf. Es ist hauptsächlich ein Peak zu erkennen, welcher Glutathion Peroxidase enthält (siehe auch Kapitel 6.2.6). In **Abb. 8-3** werden die Signal-Intensitäten verglichen. Daraus wird ersichtlich, daß dieser Selen-Peak in Schilddrüse, Leber und Milz am größten ist. Bei Leber und Milz weist er eine deutliche Doppelpeakstruktur auf. Im Gehirncytosol ist er am wenigsten ausgeprägt, was ein Hinweis auf den schwachen Antioxidantien-Schutz des Gehirns sein kann¹⁶³. Nach den im Gewebe gemessenen Selengesamtgehalten sollten Schilddrüse und Niere die größten

Signale aufweisen, gefolgt von der Milz (siehe **Abb. 8-1**). Dies ist in den Selen-Profilen für die Niere nicht der Fall.

Außerdem sollten gerade im Schilddrüsen-cytosol mehrere Selen-Peaks von verschiedenen, in der Schilddrüse vorkommenden Selenoproteinen auftreten¹⁵⁹. Die Typ I Deiodase z.B. mit einer Molmasse von $54000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ¹⁴⁶ sollte bei einer Retentionszeit von etwa 28 min eluieren. Die relativ hohe Nachweisgrenze für Selen mit der ICP-QMS (ohne Kollisionszelle) ist wahrscheinlich dafür verantwortlich, daß in kleinen Konzentrationen vorkommende Selenoproteine in den Profilen nicht erkennbar sind. Nur besonders intensive Signale sind vom Untergrund zu unterscheiden. Es besteht auch keine genaue Korrelation zwischen den gemessenen Elementgehalten im Gewebe und im Cytosol. In letzterem werden nur die löslichen Proteine erfaßt. Da einige Selenoproteine wie z.B. die Typ I-Deiodase membrangebunden sind¹⁴⁶, wurden diese bei der Ultrazentrifugation abgetrennt, so daß sie in den Selen-Profilen des Cytosols nicht mehr auftauchen. Die lösliche cytosolische GPx, die auch in der Schilddrüse eine wichtige Rolle zum Schutz vor H_2O_2 spielt¹⁵⁹, stellt in den Selen-Profilen den höchsten Peak dar.

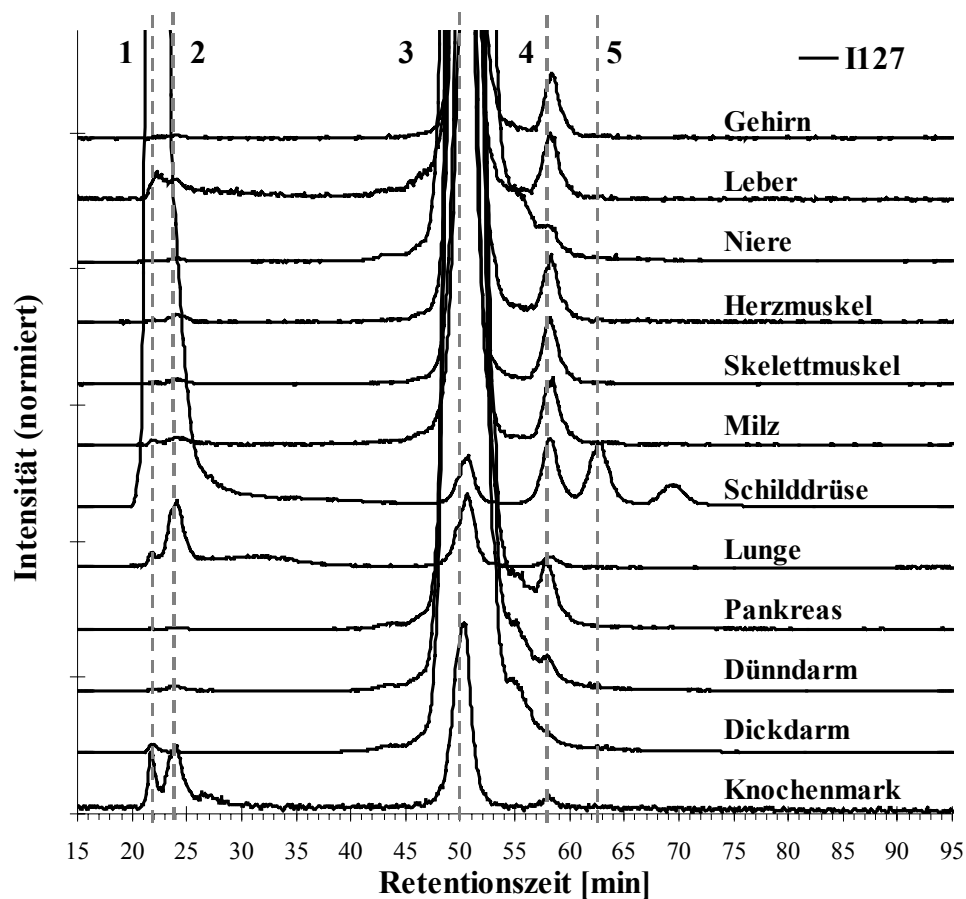


Abb. 8-5: Vergleich der Iod-Profile der chromatographischen Trennung von Cytosolen unterschiedlicher humaner Organe (Sepsis-Patient); die Normierungen der Intensitäten der verschiedenen Profile sind unterschiedlich

In den Iod-Profilen (siehe **Abb. 8-5**) eluiert - außer bei der Schilddrüse - das höchste Signal (3) bei einer Retentionszeit von 50,5 min. Die Normierung der Profile schließt diesen Peak aus, damit auch die weitaus kleineren Signale in der Darstellung zu erkennen sind. Anhand von Einzelläufen wurde der Peak bei $\text{RT}=58 \text{ min}$ (4) anorganischem Iod und T_4 , der Peak bei $\text{RT}=62,5 \text{ min}$ (5) T_3 zugeordnet (siehe Kapitel 6.2.8). Peak 4 tritt in den

Profilen von allen untersuchten Organcytosolen auf, allerdings mit etwa zwei Größenordnungen niedrigerer Intensität als in der Schilddrüse. Peak 5 ist nur im Schilddrüsen-cytosol deutlich erkennbar. Das Iod-Profil der Schilddrüse weist einen weiteren Peak bei 69,5 min auf, der jedoch nicht genau identifiziert werden konnte, ebenso wie Peak 3. Letzterer hat in fast allen Organcytosolen die höchste relative Intensität und weist auch im absoluten Vergleich die weitaus größte Intensität auf, und zwar im Dickdarm. Er übertrifft sogar die Intensität des Thyroglobulin enthaltenden Peaks (1) der Schilddrüse. Die Verhältnisse der Peakhöhen von Peak 3 bei den verschiedenen Organen sind wie folgt:

1300	:	150	:	30	:	15	:	4	:	1
Dickdarm		Dünndarm		Niere		Pankreas		Schilddrüse		restliche Organe.

Die hohen Intensitäten lassen vermuten, daß ein iodhaltiges Kontrastmittel zur Diagnostik bzw. dessen Metaboliten an dieser Stelle in den Iod-Profilen eluieren. Aus den Patientendaten war eine solche Untersuchung nicht ersichtlich. Auch könnte es sich um eine Kontamination mit iodhaltigen Desinfektionsmitteln handeln, wie sie bei einer Operation verwendet werden.

Thyroglobulin (1), das 75% der Trockenmasse der Schilddrüse bildet⁹¹, ist im Iod-Profil des Schilddrüsen-cytosols wie erwartet das mit Abstand größte Signal. Dieser bei einer Retentionszeit von 22 min eluierende Peak tritt auch in den anderen Organcytosolen auf, jedoch mit wesentlich niedrigerer Intensität. Der dem Thyroxin bindenden Globulin entsprechende Peak (2) bei einer Retentionszeit von 24 min ist ebenfalls in allen Iod-Profilen zu finden. Die Verhältnisse der Peakhöhen sind dabei etwa:

480000	:	2000	:	500	:	150	:	100	:	10	:	1
Schild- drüse (1)		Dick- darm (1)		Dickdarm/ Lunge (2)		Lunge (1)		Knochenmark/ Dünndarm (1, 2)		Leber/Niere/Milz/ Pankreas/Herzmuskel /Skelettmuskel (1, 2)		Gehirn. (1, 2)

Die aufgenommenen Iod-Profile der Cytosole der untersuchten Organe zeigen insgesamt wie erwartet in der Schilddrüse die größte Vielfalt an Peaks mit den jeweils höchsten Intensitäten, wenn man von Peak 3 absieht, welcher nicht identifiziert werden konnte. Allgemein ist auch in diesem Fall zu erkennen, daß die unterschiedlichen Organe unterschiedliche Peakmuster bzw. Intensitätsverhältnisse aufweisen.

Dies gilt für alle untersuchten Elementprofile der verschiedenen Organe. Damit wird die Vermutung bestätigt, daß unterschiedliche Organe mit unterschiedlichen Zelltypen auch andere Metalloproteinzusammensetzungen aufweisen.

Eine Einschränkung der durchgeführten Speziationsanalyse ist die Beschränkung auf lösliche Proteine. Ansonsten liefert die Auftrennung der Spurenelemente nach den sie bindenden Proteinen vielfältigere Informationen als aus der Messung der Gesamtgehalte zu erhalten sind. So können einzelne Metalloproteine mit ihren gebundenen Elementen in verschiedenen Organen verglichen werden. Die höchsten MT-1/-2-Signale wiesen z.B. bei den untersuchten Organen Niere, Leber, Skelettmuskel, Schilddrüse und Pankreas auf. Dabei waren die Verhältnisse der gebundenen Metalle verschieden: In der Niere befand sich im Vergleich zu den anderen Organen die höchste Konzentration an Cadmium-MT, in der Leber an Zink-MT.

Die Untersuchung von Elementprofilen, die in diesem Abschnitt zum Vergleich verschiedener Organe eines Patienten angewendet wurde, dient im folgenden zum Vergleich der Verteilung der Metalloproteine in einem Organ von unterschiedlichen Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsbildern.

8.4 Elementprofile im Cytosol der Leber verschiedener Patienten

Verschiedene pathologische Prozesse wirken sich auch auf die Spurenelementverteilung im Organismus und ihre Bindung an unterschiedliche Proteine aus. Die bei der Gesamtelementbestimmung bei unterschiedlichen Patienten gefundenen differierenden Elementgehalte in Geweben (siehe Abschnitt 8.2) waren vermutlich ebenfalls auf die verschiedenen Krankheitsbilder zurückzuführen.

Um die Auswirkung unterschiedlicher Pathologien auf die detektierten Elementprofile zu vergleichen, wurden die Elementverteilungen im Cytosol eines Organs - der Leber - von verschiedenen Patienten untersucht. Die Lebern waren im Rahmen von Transplantationen entnommen worden. Die Cytosole wurden mit Zusatz von DTT im Homogenisierungspuffer gewonnen. Es handelte sich um drei unterschiedliche Fälle von Leberzirrhose - kryptogene Zirrhose (A), Zirrhose durch Alkoholabusus (B), primäre biliäre Zirrhose (D) - und eine Zystenleber (C). Eine Zirrhose ist eine Umwandlung von Gewebe mit Verhärtung und Aufhebung der normalen Organstruktur. Infolge einer chronischen Entzündung oder des Absterbens von Zellen kommt es zu Bindegewebswucherungen mit nachfolgender narbiger Schrumpfung des Organs¹⁶⁰. Eine Leberzirrhose aus unbekannter Ursache wird als kryptogene Zirrhose bezeichnet. Die primäre biliäre Zirrhose ist eine wahrscheinlich autoimmun bedingte, von den Gallengängen ausgehende Leberzirrhose¹⁶⁰. Sie geht mit einer verminderten Kupferausscheidung einher, was dementsprechend zu einer Akkumulation von Kupfer in der Leber führt⁵⁷.

In **Abb. 8-6** sind die Kupfer-, Zink-, Cadmium- und Quecksilber-Profile im Cytosol der vier Lebern dargestellt. Die Elementprofile der unterschiedlichen Proben weisen vergleichbare Muster - Anzahl an Signalen - auf. Die Intensitätsverhältnisse der Signale unterscheiden sich jedoch deutlich.

Bei der primären biliären Zirrhose ist der größte MT-Peak (RT=39,5) mit dem höchsten Kupferanteil erkennbar. Dies entspricht der gestörten Kupferexkretion mit Ansammlung von Kupfer in der Leber, welches von den MT gebunden wird⁵⁷.

Die relativen Metallverhältnisse sind bei allen untersuchten Proben unterschiedlich. Probe A weist den zweitgrößten Kupfer-MT-Peak auf. Probe C hat das höchste Cadmium-MT-Signal. Der MT-Peak der Alkoholleber weist insgesamt weniger gebundene Metalle auf als die anderen Proben. In den Elementprofilen der Lebercytosole sind - im Gegensatz zu anderen untersuchten Organen (siehe Abschnitt 8.3) - auch Quecksilber-Signale zu erkennen, und zwar im Ausschlußpeak und beim MT-Peak. Der Quecksilber-Ausschlußpeak ist bei der Alkoholleber am höchsten, der Quecksilber-MT-Peak wiederum bei der Leber mit primärer biliärer Zirrhose.

Das der SOD entsprechende Zink-Signal (RT=31 min) ist bei der primären biliären Zirrhose deutlich am niedrigsten. Das Kupfer-Signal jedoch ist im Vergleich zu den anderen Proben erhöht.

In den Elementprofilen sind Retentionszeitunterschiede der Kupfer- und Zink-MT-Peaks erkennbar: Bei Probe A und D haben die Kupfer- und Zink-MT-Signale die gleiche Retentionszeit, bei Leber A liegen sie jedoch bei RT=40 min, bei Leber D bei RT 39 min. Bei den Lebern B und C hat der Zink-Peak jeweils eine Retentionszeit von etwa 39 min, der Kupfer-Peak von etwa 40 min. Daraus kann geschlossen werden, daß bei den untersuchten Lebern eine unterschiedliche Verteilung der beiden Isoformen MT-1 und MT-2 bzw. der Metalle zwischen den Isoformen besteht. MT-2 eluiert auf der verwendeten Säule vor MT-1 (siehe Kapitel 9).

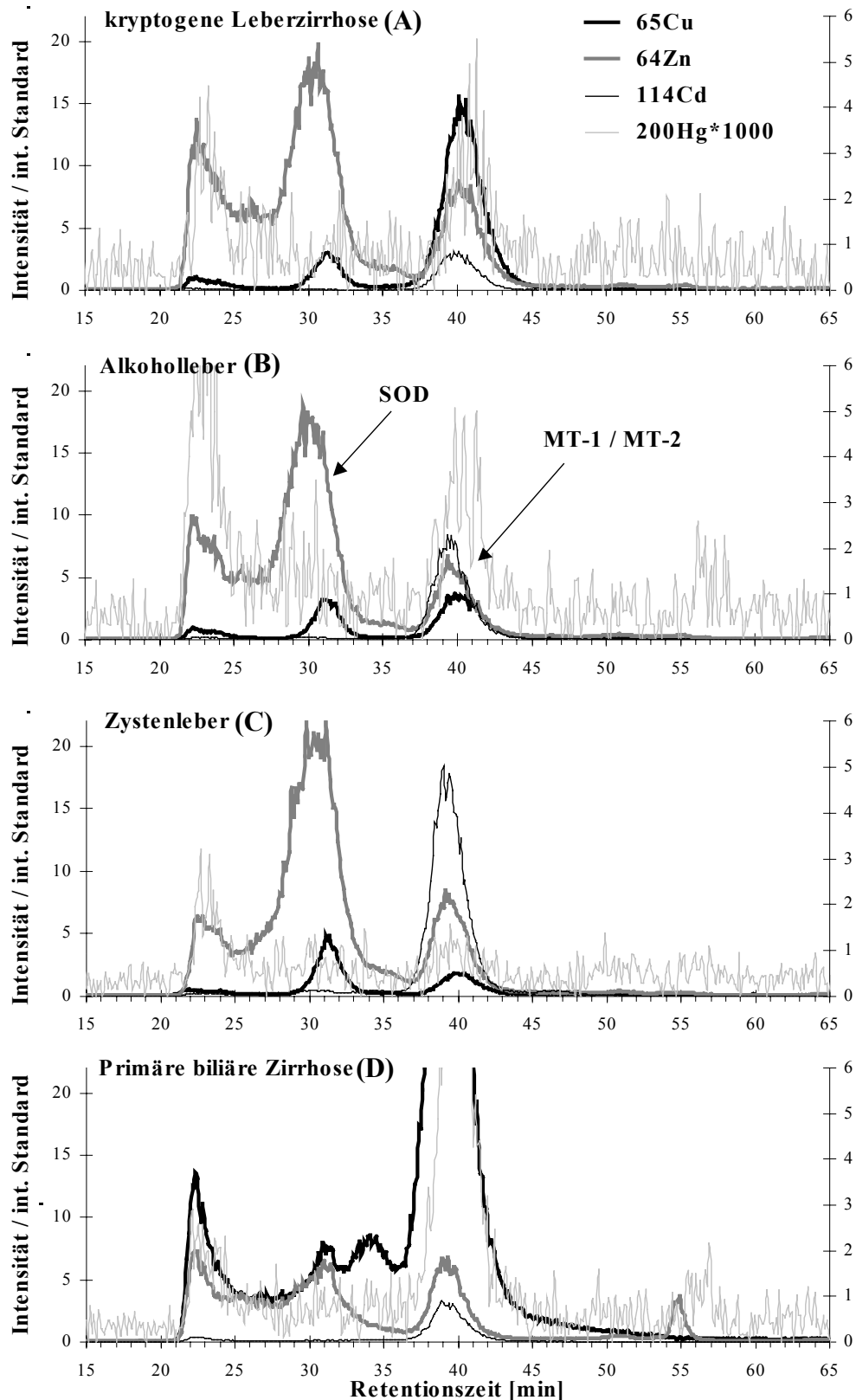


Abb. 8-6: Vergleich der Kupfer-, Zink-, Cadmium und Quecksilber-Profile der chromatographischen Trennung der Cytosole von Lebern unterschiedlicher Pathologie: kryptogene Zirrhose (A), Alkoholleber (B), Zystenleber (C) und primäre biliäre Zirrhose (D); linke Ordinate: Kupfer, Zink, rechte Ordinate: Cadmium, Quecksilber

Abb. 8-7 zeigt den Vergleich der Eisen-, Selen- und Mangan-Profile der vier untersuchten Lebercytosole.

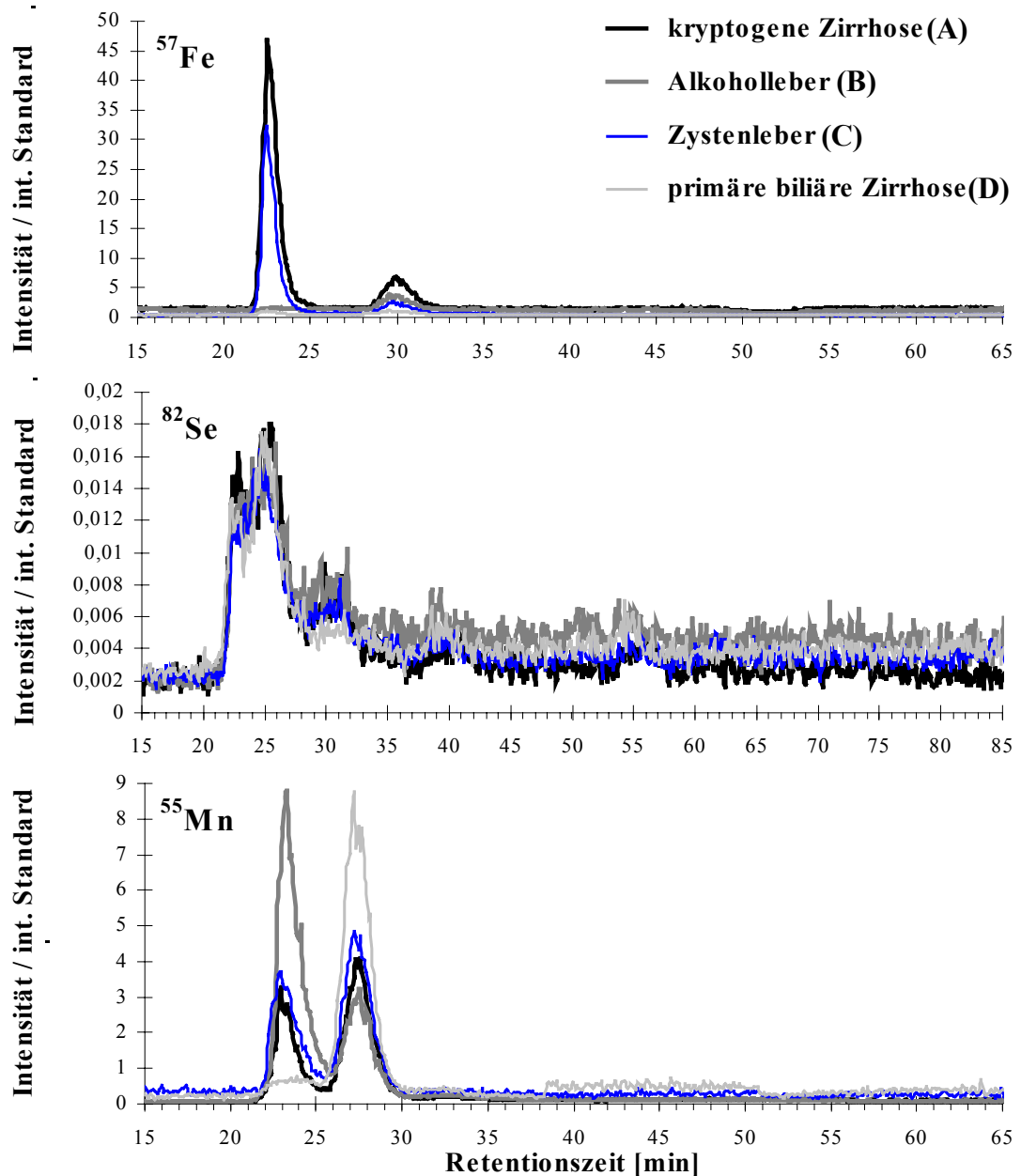


Abb. 8-7: Vergleich der Eisen-, Selen- und Mangan-Profile der chromatographischen Trennung der Cytosole von Lebern unterschiedlicher Pathologie

Die Selen-Profile weisen im Muster und in der Intensitätsverteilung keine signifikanten Unterschiede auf.

Bei den Eisen-Profilen weichen die Ferritin-Peaks ($\text{RT}=22,5 \text{ min}$) deutlich voneinander ab. Im Gegensatz zur Leber mit kryptogener Zirrhose und der Zystenleber ist in den Cytosolen der Alkoholleber und der Leber mit der primären biliären Zirrhose ein Ferritin-Peak kaum erkennbar. Dies weist auf einen gestörten Eisenstoffwechsel bzw. Eisenmangel hin, die Körperspeicher sind geleert.

Auch die Mangan-Profile unterscheiden sich. Von den beiden erkennbaren Mangan-Signalen sind bei den Lebern A und C beide Signale etwa gleich stark ausgeprägt. Bei der Alkoholleber ist der Mangan-Ausschlußpeak deutlich intensiver als der Mangan-Peak bei $RT=27,5$ min, welcher die manganabhängige SOD enthält (siehe Kapitel 6.2.1). Der erste Mangan-Peak fehlt fast vollständig im Elementprofil der Leber mit primärer biliärer Zirrhose, der zweite Peak ist bei dieser Probe dagegen im Vergleich am stärksten ausgeprägt. Es kann die Vermutung angestellt werden, daß durch den hohen Kupfergehalt dieser Leber das Kupfer-zu-Zink-Verhältnis in der Kupfer/Zink-abhängigen SOD stark zum Kupfer hin verschoben ist (siehe **Abb. 8-6**). Die Aktivität dieser SOD ist möglicherweise eingeschränkt, und zum Ausgleich wird deshalb mehr manganabhängige SOD gebildet.

Insgesamt wird deutlich, daß sich pathologische Zustände auf die Element- und Proteinverteilung in einem Organ auswirken und sich dadurch in den aufgenommenen Elementprofilen bemerkbar machen. Dabei müssen natürlich auch individuelle Unterschiede der Proben berücksichtigt werden. Es kann jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß die festgestellten Unterschiede vor allem auf unterschiedliche physiologische bzw. pathologische Prozesse zurückzuführen sind. Bei den untersuchten verschiedenen Leberproben konnten deutliche Unterschiede der Metallbeladungsverhältnisse der Metallothioneine gezeigt werden.

Im folgenden sollten die Elementverteilungen in den Cytosolen eines Kollektives von post mortem-Gehirnproben verschiedener Pathologie untersucht werden: eine Gruppe, bei der Morbus Alzheimer diagnostiziert worden war, im Vergleich zu Proben einer Kontrollgruppe, die nicht an AD gelitten hatte.

Das Hauptaugenmerk des Vergleiches der Elementverteilungen lag bei den Metallothioneinen und besonders der Isoform MT-3. Deshalb werden zunächst spezielle Untersuchungen zum Verhalten der MT auf der verwendeten SEC-Säule, dem Redoxverhalten der MT sowie der nativen Metallbeladung von MT-3 beschrieben.

9 Verhalten der MT auf der verwendeten SEC-Säule

Im folgenden wird das Verhalten der MT auf der verwendeten SEC-Säule näher betrachtet, welches sich von dem anderer Proteine unterscheidet. Die MT eluieren bei zu kurzen Retentionszeiten, was einer deutlich höheren Molmasse für globuläre Proteine als ihrer tatsächlichen entspräche. Auch die differierenden Retentionszeiten der einzelnen an MT gebundenen Metalle warfen Fragen auf.

Wie aus der Kalibrierung der Superdex 75PG-Säule hervorgeht (siehe **Abb. 9-1**), haben MT-1 und -2 eine scheinbare Molmasse von etwa 24000 Da und MT-3 sogar von etwa 29600 Da. Diese Molmassen sind somit annähernd viermal größer als die tatsächlichen Molmassen (siehe **Tab. 2-1**). Auch in der Literatur^{57, 164} wurde beschrieben, daß MT bei zu hohen scheinbaren Molmassen eluieren. Dies könnte zunächst darauf zurückgeführt werden, daß die Größenausschlußchromatographie Moleküle nach ihrer Form - dem Stoke'schen Radius - trennt und unterschiedlich geformte Moleküle nicht über eine Kalibrierung zuzuordnen sind, für welche Moleküle anderer Form verwendet wurden.

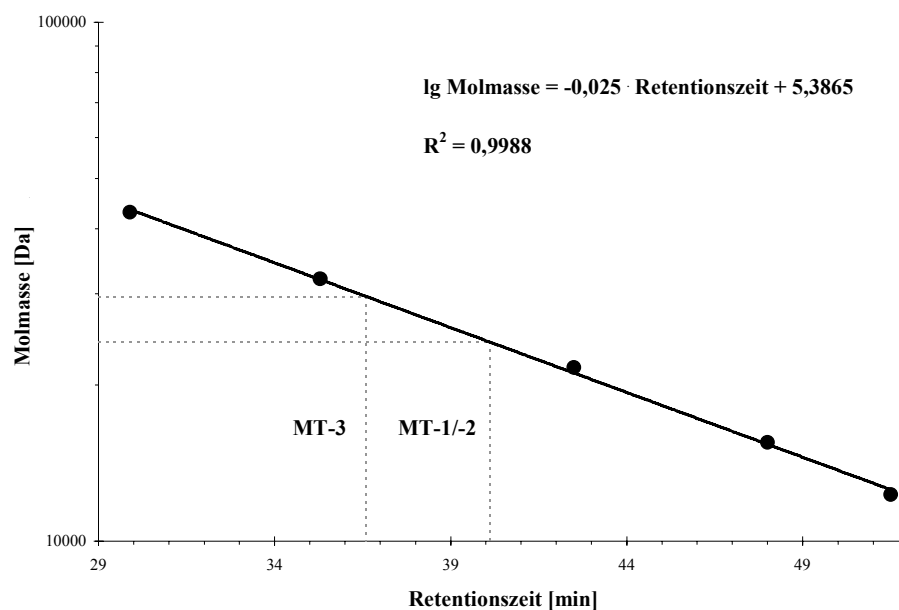


Abb. 9-1: Kalibrierung der Superdex 75PG-Säule und scheinbare Molmassen der MT

Es ist jedoch erstaunlich, daß MT-3 signifikant von MT-1 und MT-2 getrennt wird, welche wie bei der SEC zu erwarten zu annähernd gleicher Retentionszeit eluieren. Da MT-3 sich nur um 6-7 Aminosäuren von den anderen MT unterscheidet, kann der Größenunterschied dabei vernachlässigt werden. MT-3 könnte durch den Einschub der zusätzlichen Aminosäuren eine andere sterische Anordnung einnehmen (siehe auch Kapitel 2.2.3)⁸⁰.

Eine andere Erklärung sind jedoch verschiedene Wechselwirkungen von MT-1/-2 und MT-3 mit dem Säulenmaterial, da MT-3 wesentlich negativer geladen ist als MT-1 und MT-2^{45, 156}. Bei dem verwendeten pH-Wert und der Konzentration des Puffers ist das Säulenmaterial möglicherweise leicht negativ geladenen⁹⁰. Ein dadurch bedingter „Abstoßungseffekt“, der zu früherer Elution führt, würde sich beim MT-3 besonders stark

auswirken. Höhere Ionenstärken des verwendeten Puffers schirmen Ladungen ab und verringern so ionische Wechselwirkungen mit dem Packungsmaterial⁸⁹. Die Einzelsubstanz MT-3 eluiert mit 20 mmol·L⁻¹ Tris-Puffer mit 100 mmol·L⁻¹ KCl (pH=8,6) ca. 6,5 min später als mit dem üblicherweise verwendeten Tris-Puffer ohne Salzzusatz. Über eine diesem Puffer entsprechende Kalibrierung wurde dabei eine scheinbare Molmasse von 14400 Da ermittelt. Dies weist deutlich auf ladungsbedingte Wechselwirkungen hin, die durch höhere Ionenstärke unterdrückt werden¹⁶⁴. Das Elutionsverhalten von Proteinen auf SEC-Säulen und der Übergang zur „nichtidealen“ SEC hängt neben der Ionenstärke und dem pH-Wert des Puffers vom pI-Wert der Proteine und damit ihrer tatsächlichen Ladung beim jeweiligen pH-Wert des Eluens ab⁸⁹. Kopaciewicz et al. haben darauf hingewiesen, daß diese Effekte zur Erhöhung der Trenneffektivität von SEC-Säulen genutzt werden können, deren Auflösung unter idealen Bedingungen begrenzt ist. Damit ist sogar die Trennung von Proteinen gleicher Molmasse, aber mit unterschiedlichem pI möglich⁸⁹, was für die MT zutrifft. Diese Effekte wurden auch für eine Superdex 75HR-Säule beschrieben⁹⁰.

Die festgestellte Trennung des MT-3 von den anderen MT ist für die Untersuchung von Gehirnproben von Bedeutung, da sie eine gesonderte Betrachtung des im Gehirn eine besondere Rolle spielenden MT-3 ermöglicht.

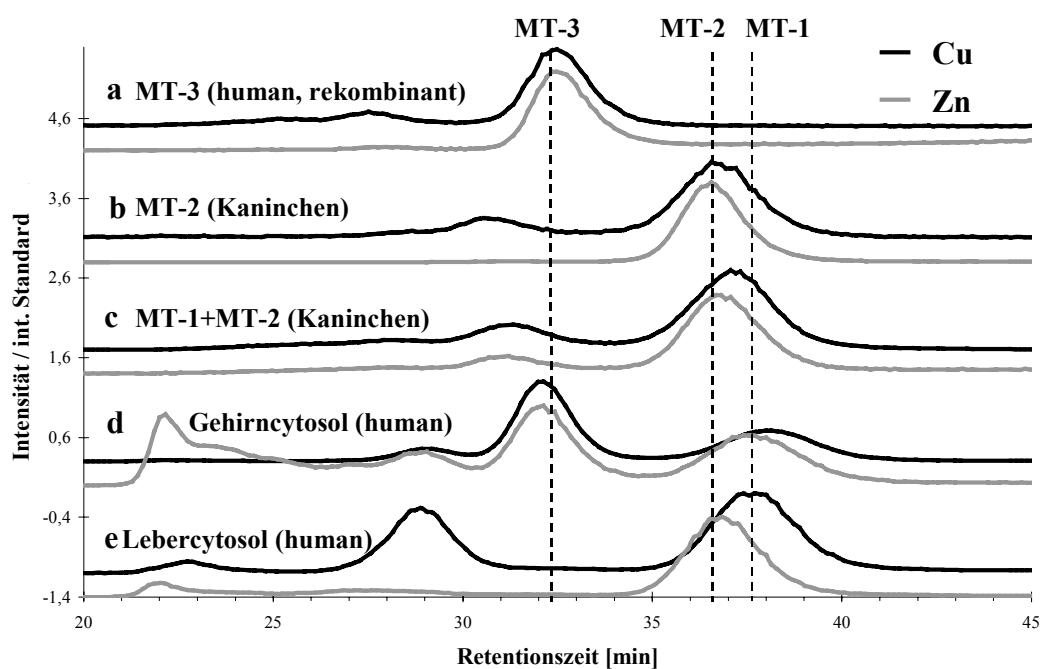


Abb. 9-2: Abweichende Retentionszeiten der MT-Kupfer- und -Zink-Signale bei der SEC-Trennung auf der Superdex 75PG-Säule, Einzelläufe von **a)** MT-3 (human, rekombinant), **b)** MT-2 (Kaninchen), **c)** MT-1 und MT-2 (Gemisch, Kaninchen) sowie chromatographische Trennung von **d)** humanem Gehirncytosol und **e)** humanem Lebercytosol, jeweils mit Zusatz von DTT

Beim Vergleich der Kupfer- und Zink-Profile der SEC-Trennungen fiel auf, daß die MT entsprechenden Signale teilweise zeitlich bis zu 1 min versetzt auftraten. In **Abb. 9-2** wird dies am Beispiel von MT-Einzelläufen bzw. der chromatographischen Trennung von

humanem Gehirn- und Lebercytosol deutlich. Beim MT-3 ist kein zeitlicher Unterschied zwischen Kupfer- und Zink-Peak feststellbar, weder beim Einzellauf noch im Cytosol (**Abb. 9-2 a** und **d**). Die Retentionszeiten des Kupfer- und Zink-Signals des MT-1/-2-Peaks jedoch weichen beim MT-Mix-Einzellauf (**c**), im Gehirn- (**d**) und besonders deutlich im Lebercytosol (**e**) voneinander ab. Beim reinen MT-2-Einzellauf (**b**) stimmen Zink- und Kupfer-Peak wieder überein.

Die einzelnen Retentionszeiten sind in **Tab. 9-1** aufgeführt. Beim MT-3 stimmen die Retentionszeiten des Gehirncytosols vom Menschen und vom Schwein genau überein. Es ist - wie auch bei der CZE-Trennung (siehe Kapitel 7.3.5) - kein Speziesunterschied festzustellen. Die geringe Abweichung - 0,4 min - zum humanen rekombinanten MT-3 kann durch Matrix- bzw. Konzentrationsunterschiede bedingt sein. Möglicherweise beeinflusst eine Acetylierung der MT (siehe auch Kapitel 6.1.5.1) ihre Ladung und/oder räumliche Anordnung und verursacht dadurch eine zeitliche Änderung der Elution auf der SEC-Säule.

Tab. 9-1: Retentionszeiten der Kupfer- und Zink-Signale von MT-3, MT-1/-2 und MT-2 auf der Superdex 75PG-Säule (mit Zusatz von DTT)

Isoform	Spezies	Cu-Signal [RT in min]	Zn-Signal [RT in min]
MT-3	Gehirncytosol Schwein	32,1	32,1
MT-3	Gehirncytosol human	32,1	32,1
MT-3	human rekombinant	32,5	32,5
MT-1/-2	Gehirncytosol Schwein	38,7	37,8
MT-1/-2	Gehirncytosol human	38,0	37,4
MT-1/-2	Lebercytosol human	37,7	36,8
MT-1/-2	Kaninchen	37,1	36,7
MT-2	Kaninchen	36,6	36,6

Der Unterschied der Retentionszeiten zwischen Kupfer- und Zink-Signal im MT-1/-2 Peak ist mit 1 min beim humanen Lebercytosol und Gehirncytosol vom Schwein (Beispiele in **Tab. 9-1**) größer als beim humanen Gehirncytosol und dem MT-1/-2-Gemisch.

Die Retentionszeiten der Zink-Peaks stimmen beim Lebercytosol, beim MT-2 und MT-1/-2-Gemisch überein. Die Zink-Peaks eluieren bei allen Proben vor den Kupfer-Peaks. Wegen der Übereinstimmung mit dem reinen MT-2 kann vermutet werden, daß es sich bei diesem Zink-Peak um an MT-2 gebundenes Zink handelt und daß MT-2 auf der Superdex 75PG-Säule vor MT-1 eluiert. Daraus kann auch abgeleitet werden, daß Zink - zumindest bei den betrachteten Proben - vorwiegend an MT-2 gebunden ist und Kupfer mehr an MT-1. Dies entspricht auch den bei den CZE-ICP-MS-Messungen erhaltenen Ergebnissen (siehe **Abb. 7-17** und **Abb. 7-18**). Die Metallbeladungsverhältnisse der MT können allgemein sehr unterschiedlich sein, wie Wolf et al. am Beispiel von MT im Cytosol von Lebern mit unterschiedlicher Krankheitsgeschichte gezeigt haben ⁶⁹.

Für eine Erklärung der festgestellten Antrennung der MT-Isoformen auf einer SEC-Säule kommen sterische oder Ladungseffekte in Frage, da die MT sich in ihrer Aminosäuresequenz nur geringfügig unterscheiden. Daß die Elutionsreihenfolge - MT-3, MT-2, MT-1 - genau umgekehrt ist als bei der AEC, weist eher auf einen Ladungseffekt und damit auf ionische Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial hin ¹⁶⁵. Wie bereits für MT-3 beschrieben, scheint es sich dabei um Ladungsabstoßungen der negativ geladenen Proteine und des Säulenmaterials zu handeln. Die Trennung von MT-1 und MT-2 ist

jedoch gering, da zwischen den beiden Isoformen nur ein geringer Ladungsunterschied besteht. Eine vollständige Abtrennung wie für das weit negativer geladene MT-3 besteht nicht¹⁵⁶.

Die Trennung von MT-1 und MT-2 konnte mit Hilfe von Einzelläufen gereinigter, mit Zink beladener MT-1 und MT-2 auf der Superdex 75PG-Säule überprüft werden. Die SEC-Trennung wurde mittels UV-Detektion bei 214 nm verfolgt. Dabei ergab sich zwischen den MT-Isoformen ein Retentionszeitunterschied von 1 min, wobei MT-2 zuerst eluierte. Dies bestätigte die obigen Beobachtungen. Wurde ein Gemisch der Isoformen im Verhältnis 1:1 auf die Säule injiziert, war im UV nur ein Peak zu erkennen, und zwar bei einer Retentionszeit, die genau zwischen den für die einzelnen Substanzen gefundenen lag. Wurden die Mischungsverhältnisse variiert, so daß eine Isoform überwog, war trotzdem nur ein Peak zu erkennen, die Retentionszeit verschob sich jedoch leicht in Richtung der überwiegenden Isoform.

Die Isoformen MT-1 und MT-2 scheinen demnach auf der Superdex 75PG-Säule angetrennt zu werden. Die Trennung ist allerdings so gering, so daß sie im UV bei einem Gemisch nicht zu erkennen ist. Sie wird nur durch den Vergleich der Retentionszeiten von einzeln injizierten Isoformen deutlich oder in den Elementprofilen, wenn ein Metall überwiegend an eine Isoform gebunden ist und die Retentionszeiten der Element-Peaks getrennt betrachtet werden können.

Die Trennung der Kupfer- und Zink-Signale und die entsprechenden Retentionszeiten hängen von den Metallbeladungsverhältnissen der Isoformen ab. In den betrachteten Beispielen (**Tab. 9-1**) variierten die Retentionszeiten der Kupfer-Signale stärker als die der Zink-Signale. Durch den Zusatz von Dithiothreitol zu diesen Proben wurden Effekte durch Oxidation und den damit verbundenen Metallverlusten ausgeschlossen. Partielle Oxidation der MT in den Cytosolproben kann die Variation der Retentionszeiten der einzelnen MT-Signale jedoch durch Peakverbreiterung verstärken (siehe auch Kapitel 10).

Die zwischen Kaninchen-MT-1/-2 und den MT in Cytosolproben vom Menschen und vom Schwein beobachteten Abweichungen in der Retentionszeit der Element-Peaks (**Tab. 9-1**) müssen demnach nicht auf Speziesunterschiede hinweisen. Da die Isoformen MT-1 und MT-2 auf der Superdex 75PG-Säule angetrennt werden, aber im Gemisch bei einer gemittelten Retentionszeit eluieren, richtet sich die Retentionszeit des Signals in jedem Elementprofil nach dem Verteilungsverhältnis des Elementes zwischen MT-1 und MT-2.

10 Redoxverhalten von Metallothioneinen im Gewebecytosol

Metallothioneine sind oxidationsempfindlich. Zur Extraktion von MT aus Geweben werden häufig Reduktionsmittel zum Puffer zugesetzt, um eine Oxidation der Proteine zu vermeiden bzw. rückgängig zu machen^{57, 166}. Da die verwendeten Reduktionsmittel wie β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol auch komplexierende Eigenschaften aufweisen, ist ihr Zusatz kritisch zu betrachten und auf die Zielsetzung der Untersuchung abzustimmen¹⁶⁷.

In Kapitel 5.2 wurde bereits gezeigt, daß mit Zusatz von DTT zum Homogenisierungspuffer die MT-Kupfer- und -Zink-Peaks gegenüber einer Extraktion ohne DTT deutlich erhöht sind. Außerdem tritt ein zusätzliches Zink-Signal im Elementprofil auf, welches dem zinkbindenden DTT zugeordnet werden kann (siehe **Abb. 5-2**). Dies zeigt zum einen, daß oxidierte MT im Gewebe vorhanden sind oder bei der Homogenisierung - trotz Vorsichtsmaßnahmen - gebildet werden. Die Oxidation von MT kann durch Zusatz von Reduktionsmitteln rückgängig gemacht werden. Zum anderen wird deutlich, daß durch Zugabe des Reduktionsmittels die Elementprofile geändert werden.

Es sollte geklärt werden, ob ohne DTT weniger MT aus dem Gewebe extrahiert werden oder ob die oxidierten MT im gewonnenen Cytosol ebenfalls vorhanden sind. Dafür wurde folgender Vergleich angestellt: Das Cytosol wurde ohne und mit Zugabe von DTT extrahiert. Zum Cytosol ohne DTT wurde nachträglich, vor der Injektion auf die chromatographische Säule, DTT in der gleichen Endkonzentration von $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ zugegeben, wie sie für die Extraktion mit DTT im Homogenisierungspuffer verwendet wurde¹¹². Es wurde darauf geachtet, daß die drei zu vergleichenden Proben die gleiche Verdünnung hatten.

In **Abb. 10-1** sind die erhaltenen Kupfer- und Zink-Profile im Vergleich dargestellt. Die Zunahme der MT-Kupfer- und Zink-Peaks mit DTT ist deutlich zu erkennen. Es ist kein signifikanter Unterschied feststellbar, ob DTT bei der Homogenisierung zugegeben wurde oder erst nach der Cytolextraktion. Das bedeutet, daß während Homogenisierung und Ultrazentrifugation kein Verlust von oxidierten MT auftritt, diese also extrahierbar sind.

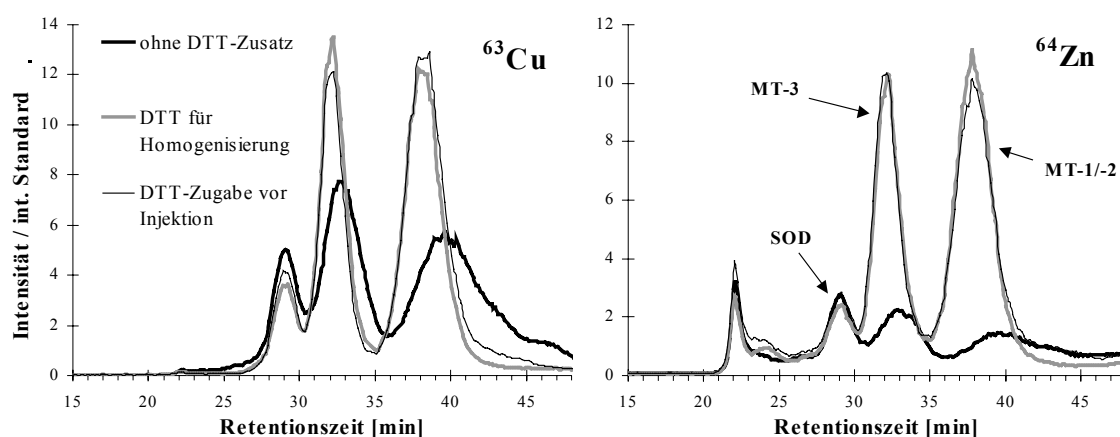


Abb. 10-1: Vergleich der Kupfer- und Zink-Profile der chromatographischen Trennung von humanem Gehirncytosol (frontale Region, Kontrolle) ohne Zusatz von DTT, mit DTT im Homogenisierungspuffer und mit Zusatz von DTT vor der Injektion auf die Säule

Die im Cytosol ohne DTT vorhandenen oxidierten MT sind jedoch mittels ICP-MS schwer detektierbar: Die Oxidation der MT bewirkt die Bildung von intra- und/oder intermolekularen Disulfid-Brücken. Dadurch verlieren sie ihre Metallbindungseigenschaften¹⁶⁷. Wegen des geringeren Metallgehaltes nehmen die detektierten MT-Metall-Peaks ab. Durch den Reduktionsmittelzusatz werden die gebildeten Disulfid-Brücken wieder aufgebrochen und Metalle erneut von den Sulfhydryl-Gruppen komplexiert^{168, 57}.

Eine leichte Abnahme des der SOD entsprechenden Kupfer-Signals (RT=29 min) mit DTT wurde ebenfalls beobachtet. Es besteht die Möglichkeit, daß MT bei Reduktion und Freiwerden der metallkomplexierenden Bindungsstellen Kupfer auch aus der SOD aufnimmt⁵⁴.

Um sicherzugehen, daß die erhöhten Peaks bei Zusatz von DTT wirklich auf reduzierte MT zurückzuführen sind, wurde zusätzlich eine Hitzedenaturierung durchgeführt. **Abb. 10-2** zeigt den Vergleich der Kupfer-, Zink-, Cadmium- und Blei-Profile der chromatographischen Trennung des selben humanen Gehirncytosols ohne und mit DTT. Zusätzlich wurden diese beiden Proben geteilt und jeweils ein Teil einer Hitzedenaturierung für 5 min bei 95°C unterzogen.

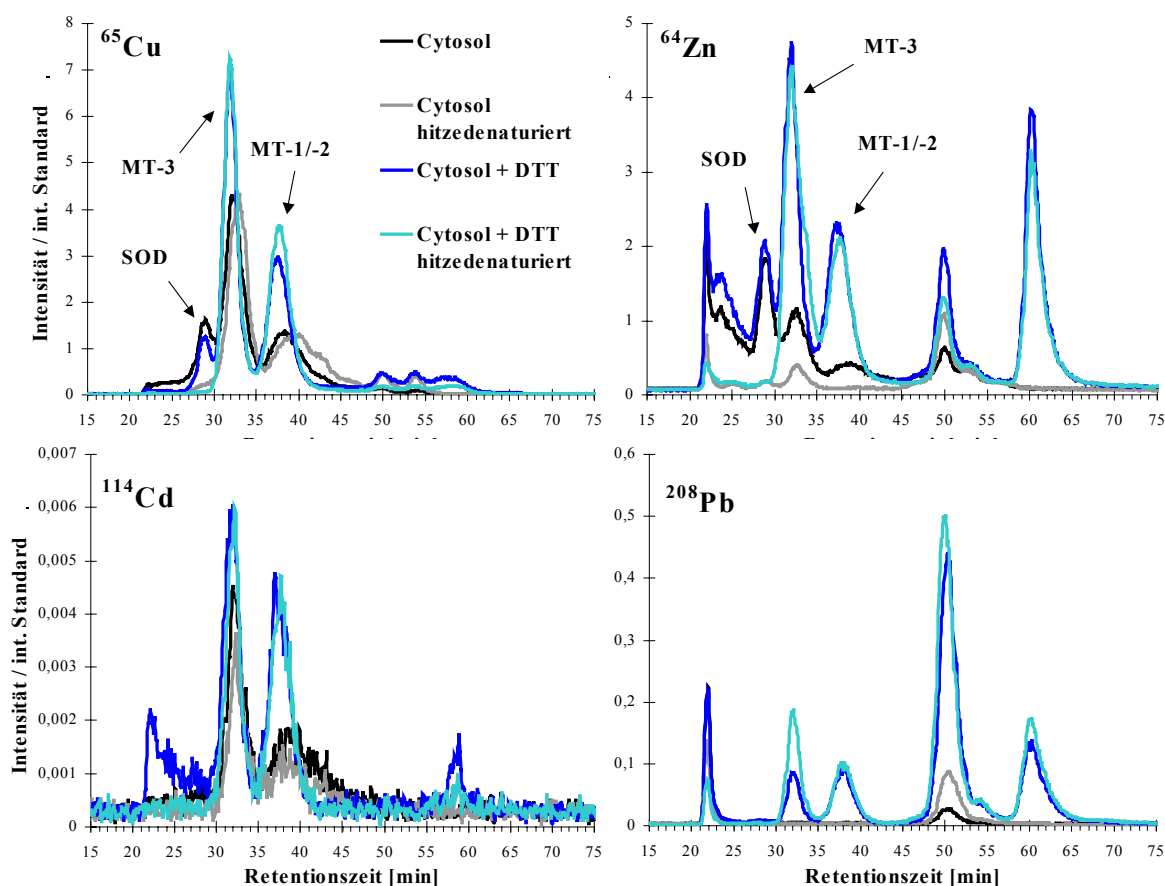


Abb. 10-2: Vergleich der Kupfer-, Zink-, Cadmium- und Blei-Profile der chromatographischen Trennung von humanem Gehirncytosol (occipitale Region, AD) ohne und mit Hitzedenaturierung der Probe sowie jeweils ohne und mit Zusatz von DTT

Wie in Kapitel 6.1.2 beschrieben, sind die MT hitzestabil und die MT-Metall-Peaks bleiben nach der Hitzefällung in den Elementprofilen erhalten. Von denaturierten Proteinen wie der SOD freigesetztes Kupfer kann von den MT unter Verdrängung von Zink aufgenommen werden.

Die durch Zusatz von DTT erhöhten MT-Peaks waren ebenfalls hitzestabil. Dies war eine Bestätigung ihrer Identität als reduzierte MT.

Bei Zusatz von DTT sind die MT-Signale um 0,5 min (MT-3) bis 1,5 min (MT-1/-2) zu kürzeren Retentionszeiten hin verschoben. Die Peaks sind außerdem erkennbar schärfer (**Abb. 10-1** und **Abb. 10-2**). Dies wurde darauf zurückgeführt, daß ohne DTT im Cytosol unterschiedliche, partiell oxidierte MT existieren, die sich in ihrer Metallbeladung unterscheiden: Eine unterschiedliche Anzahl von Sulfhydryl-Gruppen wurde oxidiert, so daß einzelne MT eine unterschiedliche Anzahl von noch gebundenen Metallen enthalten. Dadurch verändert sich die Ladung sowie die Konformation¹⁶⁷ der Moleküle. Unterschiedliche Ladungen bewirken unter den verwendeten Bedingungen eine leicht verschobene Elution auf der Superdex 75PG-Säule (siehe Kapitel 9). Da die partiell oxidierten MT später eluieren als die reduzierten MT, scheinen sie eine positivere Ladung aufzuweisen¹⁴⁹. Dies erklärt die Breite der MT-Peaks, die eine Mischung an unterschiedlichen Metallbeladungen enthalten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß oxidierte MT nach der Cytosolextraktion in den Proben vorhanden sind. Sie haben durch Oxidation der Sulfhydryl-Gruppen Metalle verloren, können jedoch wieder reduziert werden und nehmen erneut Metalle auf. Es handelt sich bei den ohne Reduktionsmittelzusatz extrahierten MT um eine Mischung von unterschiedlich partiell oxidierten MT mit unterschiedlichen Metallanteilen und damit unterschiedlichen Ladungen.

Da durch den Zusatz von DTT wahrscheinlich nicht das native Metallbindungsverhältnis wiederhergestellt wird, wurde im folgenden vom Zusatz von DTT zu den Proben bei der Homogenisierung abgesehen. Außerdem würde damit das ursprüngliche Verhältnis von oxidierten zu reduzierten MT verändert. Durch Zusatz des Reduktionsmittels vor der chromatographischen Trennung zu jeweils einem Teil der Probe können Vergleiche des Anteils an oxidiert vorliegenden MT angestellt werden. Darauf wird in Kapitel 12.4.5 näher eingegangen.

11 Native Metallbeladung von Metallothionein-3: Projekt an der Harvard Medical School

Die folgenden Untersuchungen zur Metallzusammensetzung von nativem MT-3 aus Schweinegehirn wurden im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes von April bis September 2000 im Center for Biochemical and Biophysical Sciences and Medicine (Prof. B. L. Vallee) an der Harvard Medical School in Boston, USA, durchgeführt.

In der Literatur waren die Angaben zum Metallgehalt von MT-3 bisher unterschiedlich (siehe **Tab. 11-1**). Uchida et al.¹⁰ fanden 3 Zink- und 4 Kupferionen pro Molekül und eine Verteilung von 2 Kupfer, 1 Zink auf die β -Domäne bzw. von 2 Kupfer, 2 Zink auf die α -Domäne⁸². Auch Pountney et al.⁷³ und Bogumil et al.¹⁶⁴ wiesen an isoliertem MT-3 Kupfer und Zink in verschiedenen stöchiometrischen Verhältnissen nach. Die aus dem Gehirn isolierten Isoformen MT-1/-2 enthielten ebenfalls Kupfer und Zink¹⁰. In der Literatur wurde spekuliert, daß Kupfer nicht in vivo an MT-3 gebunden ist und nur als Kontamination während der Isolierungsprozedur auftritt. Dagegen sprach, daß mit der gleichen MT-Isolierungsprozedur aus Gehirn kupferhaltiges MT-3, hingegen aus der Leber nur zinkbeladene MT erhalten wurden, obwohl die Leber eine hohe Kupferkonzentration enthielt¹⁶⁹. Sewell et al.⁸⁰ testeten die Metallbindungskapazitäten von rekombinantem GIF und fanden wie bei den Isoformen MT-1 und -2 eine Bindung von maximal 7 Cadmium- bzw. Zinkionen und von maximal 12 Kupferionen pro Molekül MT-3.

Tab. 11-1: In der Literatur beschriebene Metall-Stöchiometrie-Verhältnisse von MT-3

Spezies	mol Cu / mol Protein	mol Zn / mol Protein	Cu/Zn-Verhältnis
human ¹⁰	4	3	1,3
Rind ⁷³	1	5	0,2
Pferd ⁷³	3	3	1
human ⁸¹	-	-	1,7-1,9
Rind ¹⁶⁴	4-5	2-2,5	1,6-2,5

In diesem Projekt sollte die Metallzusammensetzung von nativem MT-3 aus Schweinegehirn bestimmt werden. Dafür wurde MT-3 aus dem Gehirncytosol isoliert, um störende Metalloproteine abzutrennen. Die bisher unterschiedlichen Angaben zu den Metallverhältnissen sollten dabei nach Möglichkeit geklärt werden.

Ein wichtiger Punkt dabei war, daß die MT-3-Isolierungen in der Literatur nicht immer unter physiologischen Bedingungen durchgeführt wurden, was zu einer Änderung der Metallzusammensetzung führen könnte. So wurden z.B. Lösungsmittel-Ausfällungen der MT verwendet oder nicht physiologische (alkalische) pH-Werte. Auch auf die Vermeidung möglicher Metallkontaminationen wurde nicht näher eingegangen. Es wurde sogar Cadmium zugesetzt, um über dieses Metall die Zink-Bindungsstellen zu quantifizieren⁷³.

Das Hauptaugenmerk bei der Isolierung von MT-3 aus Gehirncytosol vom Schwein lag deshalb auf der Einhaltung von möglichst physiologischen Bedingungen zur Bestimmung der nativen Metallbeladung. Puffer mit einem pH-Wert um 7,4 wurden verwendet. Auf Ausfällungen der MT mit organischen Lösungsmitteln wurde verzichtet. Dabei können sich die native Konformation der Proteine ändern und somit möglicherweise die

Metallbindungseigenschaften¹⁷⁰. Die verwendeten Puffer wurden während der Chromatographie mit Helium entgast.

Ein anderer wichtiger Punkt war die Vermeidung von Metallkontaminationen^{167, 171}. Metalle am MT werden leicht durch Metalle mit höherer Bindungsaffinität ersetzt. Deshalb wurden die Puffer vor ihrer Verwendung mit dem starken Kationenaustauscher Chelex 100 behandelt, um Metalle zu entfernen. Die benutzten Geräte und Gefäße wurden entweder mit verdünnter Salpetersäure gereinigt oder mit einer Lösung des Komplexbildners EDTA gespült. Die Änderung der Metallzusammensetzung während des Isolierungsprozesses war ein potentiell Problem, das zu beachten war.

11.1 Chromatographische Aufreinigung von MT-3 aus Gehirncytosol

Das Cytosol wurde wie in Kapitel 5.1 beschrieben extrahiert. Zur Homogenisierung wurde in diesem Fall ein Polytron PCU-2-110 Homogenisator eingesetzt. Die Zentrifugation erfolgte in einer Beckman Ultrazentrifuge L8-80M bei 100000 g und 4°C für 80 min. Zur Aufreinigung des MT-3 wurden verschiedene chromatographische Verfahren mit unterschiedlichen Trennmechanismen hintereinander durchgeführt, um eine möglichst vollständige Abtrennung anderer Proteine zu erreichen. Die Auflösung eines einzelnen chromatographischen Verfahrens ist dafür nicht ausreichend. Die Eluate der chromatographischen Läufe wurden aufgefangen und die MT-3 enthaltenden Fraktionen ermittelt. Diese wurden anschließend zusammengefaßt, aufkonzentriert und auf die nächste Säule aufgegeben.

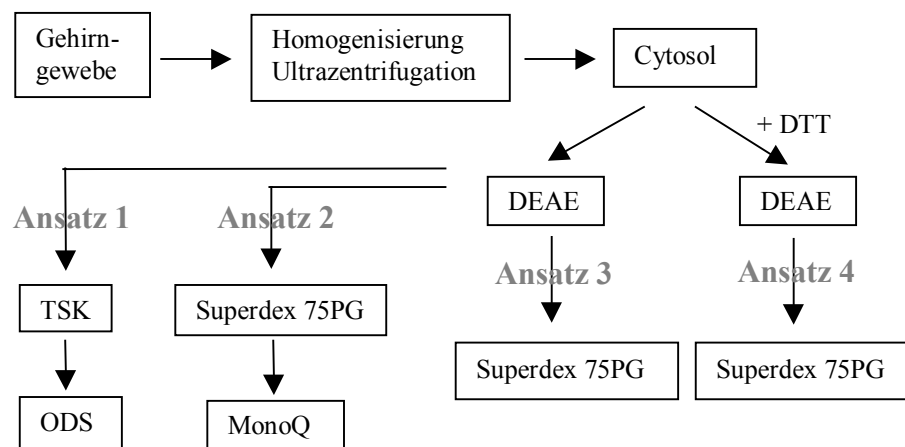


Abb. 11-1: Zusammenfassung der durchgeführten Trennschritte bei der chromatographischen Aufreinigung von MT-3 aus Schweinegehirn

Zur Verfolgung der Elution der Proteine wurde die UV-Absorption bei 214, 254 und 280 nm aufgenommen. Dabei wurde die Wellenlänge 254 nm bei hohen Proteinkonzentrationen verwendet und die empfindlichere Wellenlänge 214 nm für weiter aufgereinigte Fraktionen. Die Retentionszeiten des MT-3 wurden über Einzelläufe mit humanem rekombinanten MT-3 ermittelt.

In den Fraktionen der Trennungen wurde MT-3 über die Messung der Kupfer- und Zinkkonzentrationen detektiert. Die Metallbestimmung erfolgte mittels Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie (4100ZL, Perkin Elmer) (siehe auch Kapitel 8.1). Die Meßparameter der Graphitrohr-AAS wurden nach den Herstellerempfehlungen gewählt.

Zusätzlich wurden einzelne Fraktionen gelelektrophoretisch mittels SDS-PAGE getrennt, um ihre Reinheit zu kontrollieren. Durchgeführte Western Blots mit spezifischen anti-MT-3-Antikörpern konnten die Anwesenheit von MT-3 in den Fraktionen bestätigen.

Es wurden vier verschiedene Ansätze zur Isolierung des MT-3 durchgeführt, deren Trennbedingungen jeweils aufgrund der Ergebnisse des vorhergehenden Ansatzes angepaßt wurden. Die ausgeführten Trennschritte sind in **Abb. 11-1** zusammengefaßt.

Erster Ansatz

Experimentelle Details der im ersten Ansatz durchgeführten Trennungen befinden sich in **Tab. 11-2**. Der erste Ansatz folgte dem von Uchida et al.¹⁰ verwendeten Verfahren.

Tab. 11-2: Chromatographische Trennbedingungen des ersten Isolierungsansatzes

	Cytosol aus 20 g Schweinegehirn + 60 mL Tris-Puffer		
	AEC	SEC	Reversed Phase
Säulenmaterial:	DEAE Sephacel	TSK G2000SW	Prodigy 5 μ ODS-2
Dimension:	160 mm·16 mm	600 mm·7,5 mm	250 mm·4,6 mm
Puffer:	20 mmol·L ⁻¹ Tris 50 mmol·L ⁻¹ NaCl	Dulbecco's PBS ^a	2 mmol·L ⁻¹ Ammoniumformiat
pH-Wert:	7,8	7,6	7,4
Flußrate:	0,4 mL·min ⁻¹	0,6 mL·min ⁻¹	1 mL·min ⁻¹
Gradient:	50-300 mmol·L ⁻¹ NaCl (320 mL Elutionsvolumen)	-	0-40% Acetonitril (20 mL Elutionsvolumen)
Detektion:	UV (280 nm) Kupfer, Zink	UV (214, 254 nm) Kupfer	UV (214 nm) Kupfer
Fraktionen:	1,2 mL	0,6 mL	0,5 mL
MT-3 einzeln:	Literatur ¹⁰ : 200 mmol·L ⁻¹	30 min	23% Acetonitril

^aPBS: Phosphate Buffered Saline - phosphatgepufferte Salzlösung

Das Gehirncytosol wurde zuerst auf eine DEAE Sephacel-Anionenaustauscher-Säule aufgegeben, mit 50 mmol·L⁻¹ NaCl-haltigem Tris-Puffer gewaschen und anschließend mit einem linearen NaCl-Gradienten eluiert. Die Trennung wurde in einem Kühlraum bei 4°C ausgeführt. In den aufgefangenen Fraktionen wurden die Kupfer- und Zinkkonzentrationen bestimmt. Das Maximum des Kupfer-Peaks trat bei einer NaCl-Konzentration des Gradienten von etwa 175 mmol·L⁻¹ auf (siehe **Abb. 11-3** vom zweiten Ansatz). Dies entspricht etwa der von Uchida et al.¹⁰ angegebenen Elution des MT-3 auf einer vergleichbaren DEAE-Säule. Die Fraktionen wurden entsprechend der im Kupfer-Profil erkennbaren Peaks zusammengefaßt und in einem Konzentrator (Amicon, Beverly, USA) über eine YM3-Membran (Amicon) mit einer Ausschlußgrenze von 3000 Da aufkonzentriert.

Als zweiter Aufreinigungsschritt wurde eine SEC-Trennung über eine TSK G2000SW-Säule eingesetzt. Das UV-Profil ist in **Abb. 11-2 a** gezeigt. Die Retentionszeit des MT-3 wurde durch einen Einzellauf des rekombinanten Proteins zu etwa 30 min ermittelt (siehe **Abb. 11-2 c**). Die dieser Retentionszeit entsprechenden aufgefangenen Fraktionen wurden zusammengefaßt, aufkonzentriert und erneut auf die SEC-Säule injiziert. Nach dem zweiten Lauf waren die meisten im UV sichtbaren Unreinheiten abgetrennt, es war jedoch immer noch ein Doppelpeak vorhanden (**Abb. 11-2 b**). Ein Teilpeak entsprach der

Retentionszeit des als Referenz benutzten humanen MT-3. Die entsprechenden Fraktionen wurden zusammengefaßt und über eine Ultrafiltrationsmembran (YM3, Centricon, Amicon) erneut eingengt.

Die Kapazität der TSK-Säule war begrenzt, jede DEAE-Fraktion mußte in mehreren Läufen injiziert werden. Die Trennung war somit sehr zeitaufwendig und erhöhte dadurch die Wahrscheinlichkeit der Oxidation des MT. Es stellte sich auch heraus, daß der MT-3-Peak zu viele - mit der Gelelektrophorese sichtbare - weitere Proteine enthielt. Deshalb wurde für die folgenden Isolierungsansätze von der Literaturvorschrift abgewichen und eine andere, präparative Größenausschluß-Säule gewählt.

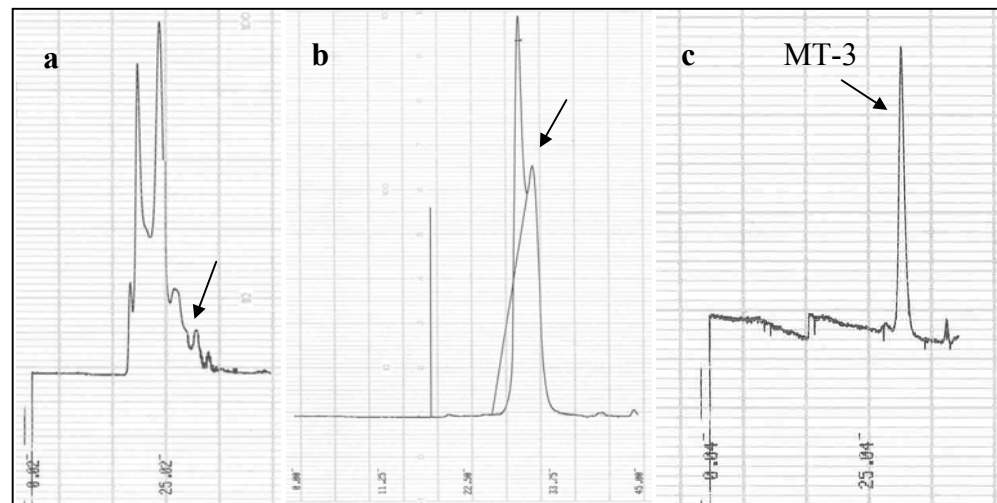


Abb. 11-2: UV-Profile bei 214 bzw. 254 nm der Trennung einer DEAE-Fraktion auf der TSK-SEC-Säule, **a)** erster Lauf, **b)** erneuter Lauf der gesammelten und aufkonzentrierten TSK-Fraktionen, **c)** Retentionszeit von rekombinantem humanen MT-3

Als letzter Isolierungsschritt wurde ein dritter, unterschiedlicher Trennmechanismus eingesetzt: die Reversed Phase (Umkehrphasen) - Chromatographie, welche die Analyten einer Probe nach ihrer Hydrophobizität trennt. Dafür wurde eine Prodigy 5 μ ODS-2 (Octadecyl Silan) Säule gewählt. Ein linearer Acetonitril-Gradient von 0-40% wurde angelegt. Das Referenz-MT-3 eluierte bei etwa 23% Acetonitril. Die MT-3-Fraktionen der TSK-Säule spalteten auf der C18-Säule in mehrere Peaks mit einer dem Referenz-MT-3 ähnlichen Retentionszeit auf.

Die C18-Säule hatte eine nur geringe Probenaufgabekapazität, und die Peaks lagen zu eng beieinander, um getrennt aufgefangen zu werden. Die MT-3-Konzentration in den Fraktionen war zu gering, um die MT-3 enthaltenden Fraktionen sicher zu identifizieren.

Beim nächsten Ansatz sollte eine größere Menge Gehirngewebe als Ausgangsmaterial genommen werden, um höhere MT-3-Konzentrationen zu erhalten. Die C18-Säule wurde nicht weiter verwendet.

Zweiter Ansatz

Die experimentellen Details der im zweiten Ansatz durchgeführten Trennungen sind in **Tab. 11-3** aufgeführt. Für diesen Ansatz wurde die doppelte Menge Gehirngewebe homogenisiert.

Tab. 11-3: Chromatographische Trennbedingungen des zweiten Isolierungsansatzes

	Cytosol aus 40 g Schweinegehirn + 120 mL Tris-Puffer		
	AEC	SEC	AEC
Säulenmaterial:	DEAE Sephacel	Superdex 75PG	Mono Q HR 5/5
Dimension:	160 mm·16 mm	650 mm·16 mm	50 mm·5 mm
Puffer:	20 mmol·L ⁻¹ Tris 50 mmol·L ⁻¹ NaCl	20 mmol·L ⁻¹ Tris	20 mmol·L ⁻¹ Tris
pH-Wert:	7,4-7,6	7,4	7,6
Flußrate:	0,4 mL·min ⁻¹	2 mL·min ⁻¹	0,5 mL·min ⁻¹
Gradient:	50-300 mmol·L ⁻¹ NaCl (320 mL Elutionsvolumen)	-	100-500 mmol·L ⁻¹ NaCl (20 mL Elutionsvolumen)
Detektion:	UV (280 nm) Kupfer, Zink	UV (214, 254 nm) Kupfer	UV (214 nm)
Fraktionen:	4 mL	1 mL	0,5 mL
MT-3 einzeln:	Literatur ¹⁰ : 200 mmol·L ⁻¹	36,6 min	210 mmol·L ⁻¹

Das gewonnene Cytosol wurde ebenfalls zuerst auf die DEAE Sephacel-Säule aufgegeben. Die in den aufgefängenen Fraktionen gemessenen Kupfer- und Zinkkonzentrationen sind in **Abb. 11-3** aufgetragen. Die DEAE-Fraktionen wurden entsprechend den Metall- sowie den UV-Profilen (bei 220 und 280 nm) in drei Pools zusammengefaßt und aufkonzentriert. Die verschiedenen Peaks enthielten neben MT-3 möglicherweise metallhaltige Verunreinigungen, die Isoformen MT-1 und -2 oder unterschiedliche Formen von MT-3.

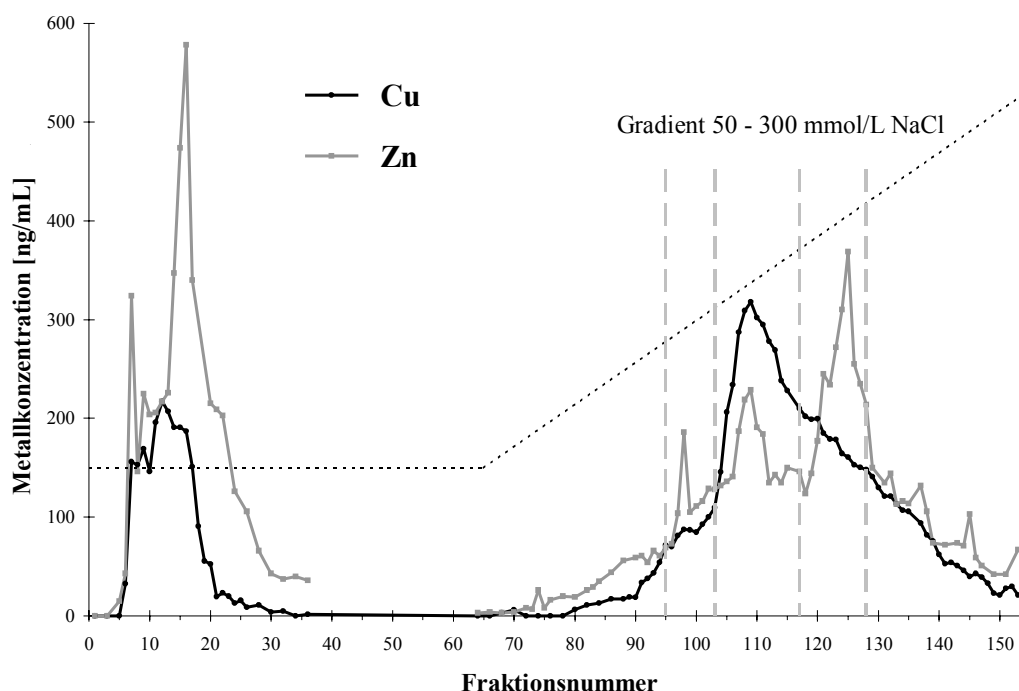


Abb. 11-3: Kupfer- und Zinkkonzentrationen in den Fraktionen der AEC-Trennung (DEAE Sephacel) von Gehirncytosol (Schwein) mittels eines 50-300 mmol·L⁻¹ NaCl-Gradienten (...); die zusammengefaßten Fraktionen sind gekennzeichnet (---) (Ansatz 2)

Die konzentrierten DEAE-Fractionen wurden auf eine Superdex 75PG-SEC-Säule injiziert und mit 20 mmol·L⁻¹ Tris-Puffer eluiert. Die nach dem Kupfer-Profil dem MT-3-Peak entsprechenden Fraktionen der jeweiligen Läufe wurden zusammengefaßt, aufkonzentriert und erneut auf die Superdex 75PG-Säule aufgegeben. Die Kupferkonzentration wurde in den gesammelten Fraktionen der SEC-Läufe bestimmt. Wie in **Abb. 11-4** zu sehen ist, war nach dem zweiten Lauf nur noch ein kupferhaltiger Peak zu erkennen. Der Kupfer-Peak trat bei allen drei DEAE-Fractionen auf, die höchste Konzentration wurde bei der dem Maximum im DEAE-Kupfer-Profil entsprechenden Fraktion gemessen. Das wies darauf hin, daß dies der Haupt-MT-3-Peak war. Bei den anderen Fraktionen konnte es sich um Ausläufer dieses Peaks auf der DEAE-Säule handeln. Eine andere Möglichkeit war das Auftreten mehrerer Formen von MT-3, etwa mit unterschiedlicher Metallbeladung und damit Ladung. Dies konnte durch teilweise Oxidation des MT-3 bedingt sein. Durch den DEAE-Trennschritt wurde ein Großteil der im UV sichtbaren Proteine abgetrennt, nach dem SEC-Lauf erfolgte eine weitere deutliche Aufreinigung (siehe auch **Abb. 11-6**). Die Superdex 75PG-Säule hatte eine größere Kapazität als die im ersten Ansatz verwendete TSK-Säule. Die gesammelten Fraktionen waren nach einem Wiederholungslauf auf der gleichen Säule reiner als bei der Trennung mit der TSK-Säule, wie bei der zur Überprüfung durchgeführten SDS-PAGE zu erkennen war.

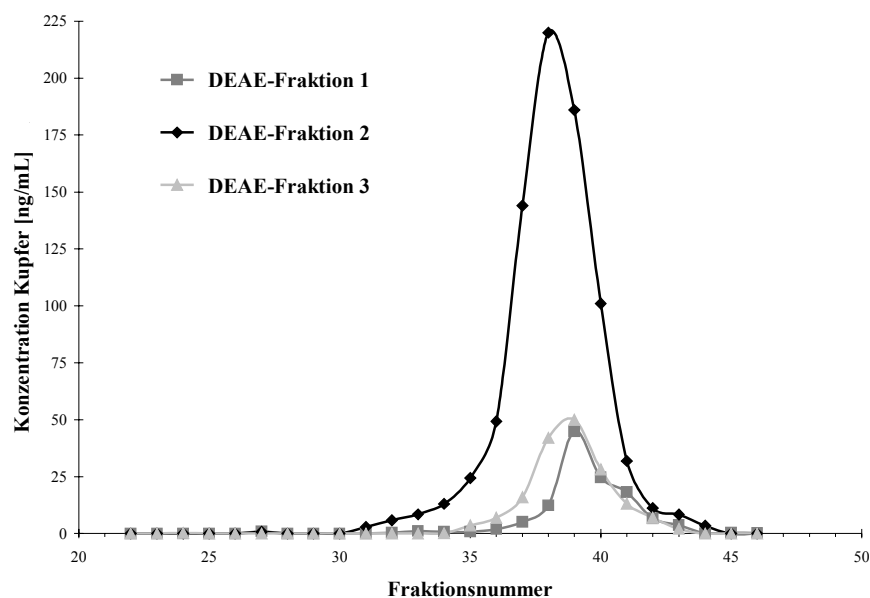


Abb. 11-4: Kupferkonzentration in den Fraktionen der Superdex 75PG-Trennung der DEAE-Fractionen

Um MT-3 von verbleibenden anderen Proteinen zu trennen, wurde eine weitere AEC-Trennung als dritter Isolierungsschritt gewählt: eine Mono Q HR 5/5-Säule mit starken Anionenaustauscher-Eigenschaften (quaternäre Ammoniumgruppen). Bei der Elution mit einem linearen NaCl-Gradienten von 100-500 mmol·L⁻¹ spalteten die Superdex-Fractionen in mehrere Peaks auf, deren Retentionszeiten nahe der des humanen Referenz-MT-3 lagen und jeweils Kupfer enthielten. Diese Peaks konnten verschiedene Formen von MT-3 mit unterschiedlicher Metallzusammensetzung sein. Sie konnten allerdings auch mit dieser Säule nicht getrennt fraktioniert werden.

Insgesamt waren die verschiedenen hintereinander durchgeführten Trennschritte sehr zeitaufwendig und daher die Gefahr zu groß, daß die Probe sich im Laufe der

Isolierungsprozedur zersetzte. Deshalb sollte die Isolierung beim folgenden Ansatz zügiger, mit weniger Trennschritten durchgeführt werden. Die Kombination von DEAE- und Superdex 75PG-Trennung hatte sich als effektiv erwiesen. Die Isolierungsprozedur sollte auf diese Schritte beschränkt und jeweils nur die Hauptfraktionen zusammengefaßt werden.

Es wurde außerdem davon ausgegangen, daß sich oxidiertes MT-3 im Cytosol befindet (siehe Kapitel 10), dessen relativer Anteil mit langer Handhabung der Proben ansteigen kann. Es sollte geprüft werden, ob auf der DEAE-Säule oxidiertes MT-3 getrennt von der reduzierten Form des MT-3 eluiert und dadurch abgetrennt werden kann. Die Zuordnung des oxidierten MT-3 sollte durch Zugabe von Dithiothreitol zum Cytosol und Beobachtung der Veränderungen der Elutionsprofile im Vergleich zum Ansatz ohne DTT erfolgen. Die Vergleichbarkeit der Ansätze mit und ohne DTT wurde durch die Verwendung des selben Cytosols sichergestellt. 60 g Gehirngewebe wurden in 120 mL Tris-Puffer homogenisiert. Eine Hälfte des gewonnenen Cytosols wurde mit DTT in einer Endkonzentration von $7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ versetzt und eingefroren, die andere Hälfte sofort für die Isolierung verwendet. Die experimentellen Parameter des dritten und vierten Ansatzes entsprachen denen aus Ansatz 2 (**Tab. 11-3**).

Dritter Ansatz

Die in den Fraktionen der Trennung über die DEAE Sephacel-Säule gemessenen Kupferkonzentrationen sind in **Abb. 11-5** dargestellt. Die dem Maximum des Kupfer-Peaks entsprechenden Fraktionen wurden zusammengefaßt.

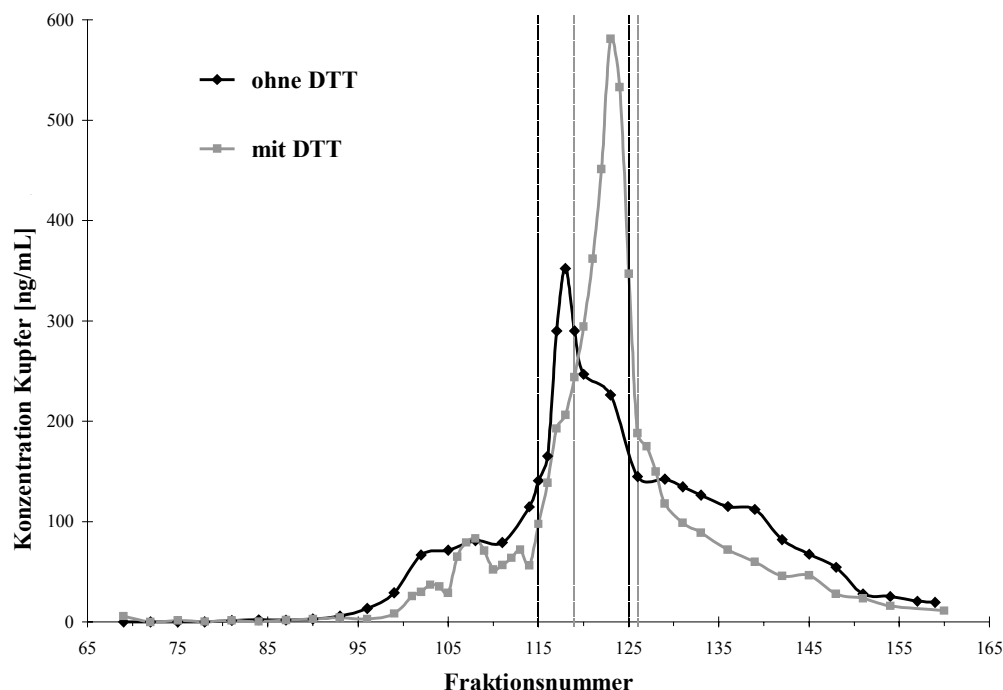


Abb. 11-5: Kupferkonzentrationen in den Fraktionen der AEC-Trennung (DEAE Sephacel) von Gehirncytosol (Schwein) mittels eines $50\text{-}300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl-Gradienten ohne (Ansatz 3) und mit (Ansatz 4) Zusatz von DTT; die zusammengefaßten Fraktionen von Ansatz 3 (---) und Ansatz 4 (---) sind gekennzeichnet

Diese aufkonzentrierte DEAE-Fraktion wurde anschließend auf die Superdex 75PG-Säule aufgegeben, der Haupt-MT-3-Peak ausgeschnitten, die Fraktionen aufkonzentriert und erneut injiziert. Die dem MT-3-Peak entsprechenden Fraktionen des zweiten Laufes zeigten bei der Gelelektrophorese nur wenige Verunreinigungsbanden (siehe **Abb. 6-10**).

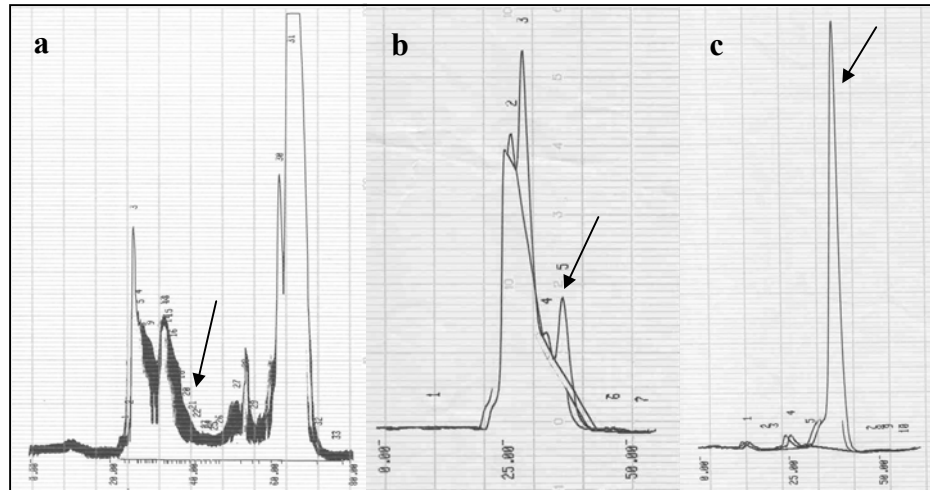


Abb. 11-6: UV-Profile bei 214 nm bzw. 254 nm der Trennung auf der Superdex 75PG-Säule von **a)** Gehirncytosol (Schwein) und **b)** einer DEAE-Fraktion (erster Lauf) sowie **c)** des erneuten Laufes der gesammelten und aufkonzentrierten Superdex-Fraktionen von **b**

Abb. 11-6 zeigt die UV-Profile der Superdex 75PG-Trennung von Gehirncytosol (**a**), der DEAE-Fraktion (**b**) und der konzentrierten Superdex-Fraktion (**c**). Die Abtrennung von Proteinen durch DEAE- und Superdex 75PG-Läufe ist deutlich zu erkennen. Auch im Vergleich zur SDS-PAGE von Fraktionen eines Superdex-75PG-Laufes ohne vorherige DEAE-Trennung (siehe **Abb. 7-19**) wird die durch die Kombination der Trennschritte erreichte Aufreinigung deutlich. Die Aufreinigung über die AEC- und doppelten SEC-Trennschritte wurde damit bezüglich des Metalloprotein MT-3 als ausreichend angesehen. Es handelt sich bei dieser Prozedur um einen guten Kompromiß zwischen geforderter Reinheit des Proteins - im engeren Sinn der Abtrennung von weiteren Metalloproteinen - und einer zügigen Aufarbeitung zur Vermeidung von Oxidations- und Zersetzungseffekten.

Vierter Ansatz

Mit diesem Ansatz sollte die Zuordnung von Peaks des oxidierten MT-3 ermöglicht werden. Indem hierbei die Signale von oxidiertem MT-3 unterdrückt wurden, sollten beim Vergleich mit den Elutionsprofilen des dritten Ansatzes dort mögliche Peaks von oxidiertem MT-3 erkennbar sein. DTT wurde zum Cytosol und zu den Fraktionen bei den verschiedenen Trennschritten zugegeben, um im Cytosol bereits vorhandenes oxidiertes MT-3 zu reduzieren und eine Oxidation während der Isolierungsprozedur zu vermeiden. Die DTT-Endkonzentration betrug jeweils $7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Die Aufreinigung von MT-3 erfolgte wie beim dritten Ansatz mittels DEAE Sephacel- und Superdex 75PG-Säule. Es wurden jeweils die Hauptfraktionen zusammengefaßt (siehe **Abb. 11-5** für die DEAE-Trennung).

Abb. 11-5 zeigt die Kupferkonzentrationen in den Fraktionen der DEAE-Trennung mit und ohne DTT. Die Proben waren genau vergleichbar, da sie aus dem selben extrahierten Cytosol stammten und die chromatographischen Trennungen unter den gleichen Bedingungen ausgeführt wurden. Die beiden Kupfer-Profile unterschieden sich: Bei Zusatz von DTT war der MT-3-Peak deutlich schmaler und höher als ohne DTT. Auch war die Elution zu längeren Zeiten hin verschoben. Es wurde angenommen, daß dieser Peak dem nicht-oxidierten MT-3 entsprach, der somit eine negativere Ladung hatte. Demnach konnte eine Schulter des Hauptpeaks ohne DTT diesem nicht-oxidierten MT-3 zugeordnet werden und das Peakmaximum partiell oxidiertem MT-3. Die Breite des Peaks ohne DTT weist auf eine Verteilung von verschiedenen Metallbeladungen von unterschiedlich oxidiertem MT-3 hin. Dies entspricht den Ergebnissen, die bei Trennungen von Cytosolen auf der Superdex 75PG-Säule gefunden wurden (siehe Kapitel 9). Ein signifikant erhöhter MT-3-Peak wurde ebenfalls für die Superdex 75PG-Trennung der mit DTT versetzten DEAE-Fraktion gefunden (siehe **Abb. 11-7**).

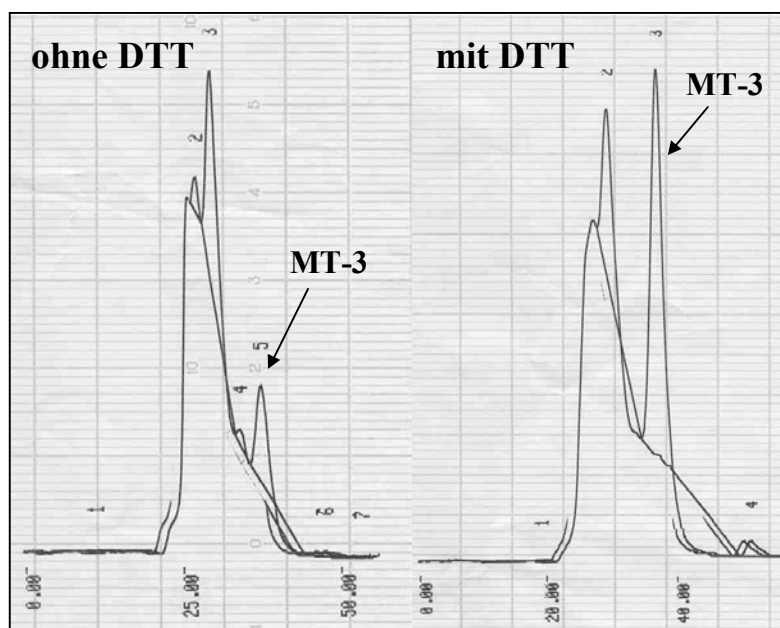


Abb. 11-7: UV-Profil bei 254 nm der Trennung auf der Superdex 75PG-Säule von DEAE-Fractionen ohne (Ansatz 3) und mit (Ansatz 4) Zusatz von DTT

Wie in Kapitel 10 beschrieben, kann MT auf der Superdex 75PG-Säule nicht von partiell oxidiertem MT getrennt werden. Bei den auf der DEAE Sephacel-Säule durchgeführten Trennungen des Gehirncytosols konnte ebenfalls keine vollständige Abtrennung erreicht werden (siehe **Abb. 11-5**). Ohne Zusatz von DTT war auch in diesem Fall der MT-3-Peak sehr breit und bestand höchstwahrscheinlich ebenfalls aus einer Mischung von MT der verschiedensten Oxidationsstufen und Metallbeladungen.

Im folgenden wurden dennoch die isolierten MT-3-Fractionen auf Reinheit und Metallzusammensetzung untersucht.

11.2 Untersuchung der aufgereinigten Fraktionen

Die aufgereinigten MT-3-Fraktionen der verschiedenen Ansätze wurden bezüglich ihrer Reinheit mittels SDS-PAGE, Western Blot, SELDI-TOF-MS und Aminosäurenanalyse untersucht. Durch Western Blot mit spezifischen Antikörpern wurde die Anwesenheit von MT-3 in den Fraktionen bestätigt (siehe Kapitel 6.1.5.3 und **Abb. 6-11**). MT-3 wurde auch anhand seiner Molmasse im SELDI-TOF-Massenspektrum nachgewiesen (siehe Kapitel 6.1.5.1 und **Abb. 6-5**). Mit der Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung wurde zusätzlich gezeigt, daß es sich in den aufgereinigten Fraktionen um MT-3 mit nur geringen Verunreinigungen handelte (siehe **Abb. 6-9**). Wegen der sehr geringen Probenkonzentration konnte nicht festgestellt werden, ob es sich bei letzteren um reale Verunreinigungen oder Artefakte durch die automatische Peakzuordnung des Auswertungsprogrammes handelte (siehe Kapitel 6.1.5.2). Über die Aminosäurenanalyse wurde auch der MT-Gehalt in den Fraktionen berechnet.

Die Kupfer- und Zinkkonzentrationen wurden mittels Graphitrohr-AAS gemessen. Die Bestimmung der Metallzusammensetzung in den Homogenaten und den Cytosolen zeigte jeweils ein annähernd konstantes Kupfer/Zink-Verhältnis (siehe **Tab. 11-4**).

Die Analyse der Metallzusammensetzung der aufgereinigten MT-3-Fraktionen (siehe **Tab. 11-5**) zeigte, daß das Kupfer/Zink-Verhältnis sich bei längerer Handhabung und ohne Zusatz von DTT erhöhte. Der Zinkanteil in den Fraktionen mit DTT war größer. Nach der Aufkonzentrierung der Fraktionen war jedoch auch bei diesen Proben der Kupferanteil erhöht (siehe auch Kapitel 7.3.5)¹⁶⁷. Dies bestätigte die relative Instabilität der zinkbindenden Stellen von MT im Vergleich zu den kupferbindenden Stellen^{73, 81}. Die zinkbindenden Stellen werden leichter oxidiert und verlieren dabei ihre Metalle¹⁶⁷.

Tab. 11-4: Bestimmung der Kupfer/Zink-Verhältnisse in Homogenat und Cytosol vom Gehirn (Schwein)

Ansatz		Cu/Zn
2	Homogenat	0,30
	Cytosol	0,41
3 + 4	Homogenat	0,26
	Cytosol	0,44

Die Metallgehalte vom ersten Ansatz wurden nicht bestimmt.

Tab. 11-5: Bestimmung der Kupfer/Zink-Verhältnisse in den aufgereinigten MT-3-Fraktionen (Schwein)

Ansatz	Fraktionen der Superdex 75PG-Trennung	Cu/Zn
2		12,8
3		28,1
4	37	0,7
	38	2,0
	39	1,5
4 (konzentriert)	37	2,1
	38	8,5
	39	4,0

Folgende Metallstöchiometrie wurde am Beispiel der Fraktion 37 der Superdex 75PG-Trennung vom vierten Ansatz bestimmt: Der nach der Aminosäurenanalyse berechnete MT-3-Gehalt ($8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ bzw. $58 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) entsprach etwa der Abschätzung nach den Metallgehalten ($6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Das ermittelte Metallverhältnis war damit 5 Kupfer und 2 Zink pro Molekül. Dies entspricht dem von Bogumil et al.¹⁶⁴ für Rinder-MT-3 bestimmten Verhältnis. Allerdings handelte es sich bei dieser Probe um eine Fraktion des vierten Ansatzes mit DTT und entspricht demnach nicht dem nativen Zustand. Auch die für die MT-3-Fraktion des dritten Ansatzes gemessenen Metallgehalte können nicht als ein festes, natives Metallverhältnis angegeben werden, da es sich - wie in **Abb. 11-5** zu erkennen war - um eine Mischung aus verschiedenen partiell oxidierten MT-3 handelte.

Die durchgeführten Isolierungen von MT-3 bestätigten, daß Gehirncytosol neben MT-3 zusätzlich partiell oxidiertes MT-3 enthält, welches Metalle bindet (siehe Kapitel 10). Letzteres kann mit DTT reduziert werden und wieder mehr Metalle aufnehmen. Der relative Anteil des oxidierten MT variiert je nach Handhabung und Isolierungsbedingungen, z.B. durch Zusatz eines Reduktionsmittels. Während einer langen Isolierungsprozedur kann die Oxidation nicht genau kontrolliert werden. Wird die Oxidation durch Zusatz eines Reduktionsmittels unterdrückt bzw. rückgängig gemacht, wird dadurch das native Metallbeladungsverhältnis verfälscht. Die zinkbindenden Stellen im MT-3 sind dabei labiler und leichter oxidierbar als die kupferbindenden Stellen⁷³.

In den unterschiedlichen Fraktionen der DEAE-Trennung wurde jeweils bei der Superdex 75PG-Trennung MT-3 gefunden. Die MT-3 enthaltenden Fraktionen spalteten auf der ODS- und der MonoQ-Säule in mehrere Peaks auf. Dies spricht dafür, daß MT-3 in verschiedenen Formen im Gehirncytosol vorkommt. Auch mit der im Hahn-Meitner-Institut verwendeten Fractogel-DEAE-Säule wurden für den MT-3 Kupfer- und Zink-Peak leicht abweichende Retentionszeiten in den Elementprofilen festgestellt (**Abb. 7-3**). Dabei handelt es sich höchstwahrscheinlich um verschiedene Metallbeladungsverhältnisse, die durch unterschiedliche partielle Oxidation von MT-3 verursacht werden. Es ist anzunehmen, daß bei individuellen Gehirnproben die Metallzusammensetzungen vom physiologischen Zustand des Gewebes und den darin enthaltenen Metallkonzentrationen abhängen.

Die einzelnen MT-3-Beladungsformen konnten mit den - auch in der Literatur für Isolierungen verwendeten - Methoden nicht quantitativ aufgetrennt werden. Deshalb war in den aufgereinigten MT-3-Fractionen ein Gemisch von unterschiedlichen Metallbeladungen vorhanden, und die Metallbestimmung lieferte nur einen Mittelwert dieser Metallzusammensetzungen. Dies würde auch die in der Literatur abweichenden Angaben über die Metallbeladungsverhältnisse erklären.

Insgesamt läßt sich die Aussage treffen, daß es nicht eine bestimmte, feste native Metallzusammensetzung gibt, sondern verschiedene Formen von MT-3 mit unterschiedlichen Metallgehalten, welche im Cytosol eine Mischung bilden. Die Auftrennung dieser Mischung und Bestimmung der unterschiedlichen Metallgehalte ist technisch mit den verwendeten Methoden nicht zu realisieren, da die Auflösung dieser Trennmethode für die feinen Abstufungen nicht ausreichend ist. Außerdem muß eine Veränderung der Probe während des Versuchs der Trennung stets berücksichtigt werden.

Der Anteil von oxidiertem MT-3 verdient besondere Beachtung. Die Bestimmung des Verhältnisses von oxidiertem zu nicht oxidiertem MT muß im Cytosol sofort nach der Cytosolextraktion erfolgen, um eine Verfälschung zu vermeiden bzw. zu minimieren. Über mögliche Veränderungen während der Homogenisierung kann keine Aussage getroffen werden.

Die Betrachtung eines größeren Probenkollektives ist aussagekräftiger als die beispielhafte Bestimmung der Metallgehalte in einem Gewebe. Es können dabei Vergleiche gezogen und Trends in Abhängigkeit vom pathologischen Zustand der Gewebe bestimmt werden. Dementsprechende Untersuchungen werden im folgenden Kapitel beschrieben.

12 Ergebnisse der Untersuchungen der humanen Gehirnproben

Humane Gehirnproben wurden mit dem beschriebenen Verfahren der SEC-Trennung und der on-line ICP-MS-Multielementdetektion untersucht. Es handelte sich dabei um verschiedene Regionen von AD-Gehirnen und Gehirngewebe einer Kontrollgruppe, bei welcher keine Alzheimer-Erkrankung diagnostiziert worden war. Ziel der Untersuchung war dabei, die Verteilung der Elemente an einzelnen Proteinen zu vergleichen und mögliche Unterschiede zu ermitteln, die durch die Erkrankung hervorgerufen sein konnten. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf den Metallothioneinen und besonders der Isoform MT-3, die im Gehirn eine besondere Rolle spielt. Bei einigen Proben konnte die weiße und graue Masse des Gehirns getrennt untersucht werden. Neben dem Vergleich der Elementprofile mit der SEC-ICP-MS wurden Untersuchungen mit der CZE-ICP-SFMS durchgeführt. Zusätzlich zu den Speziationsanalysen wurden auch die Gesamtelementgehalte in den Proben bestimmt.

12.1 Morbus Alzheimer

Morbus Alzheimer macht sich durch den schleichenden Verlust von Gedächtnis und kognitiven Funktionen bemerkbar, der durch Störung der synaptischen Funktion und ein fortschreitendes Absterben der Nervenzellen ausgelöst wird. AD ist die häufigste Ursache für Altersdemenz. Charakteristisch sind die vor allem aus Amyloid β ($A\beta$) bestehenden senilen Plaques und die Neurofibrillenbündel¹⁶³. Die Acetylcholinsynthese ist reduziert¹⁶⁰. Die genauen Ursachen von Morbus Alzheimer sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt zahlreiche verschiedene Ansätze und unterschiedliche Beobachtungen, die sich scheinbar teilweise widersprechen¹⁷². Einige Erscheinungen treten auch während des normalen Alterungsprozesses auf. Die Heterogenität der Phänotypen der Alzheimer-Erkrankung und die unterschiedlichen möglichen Ursachen haben sogar Anlaß zu der Vermutung gegeben, daß AD eine komplexe Gruppe von Erkrankungen mit ähnlichen Symptomen ist¹⁷³.

Das vermehrte Auftreten des $A\beta$ -Peptids wird vielfach als ein grundlegender auslösender Faktor für AD genannt - auch die als Risikofaktoren für AD angesehenen genetischen Faktoren stehen damit in Zusammenhang¹⁷². Dies wird durch erste Erfolge von Impfversuchen gegen $A\beta$ im Mausmodell unterstützt¹⁷⁴. Die $A\beta$ -Ablagerungen sind direkt oder indirekt neurotoxisch¹⁶³. Sie lösen möglicherweise Prozesse wie die beobachtete Immunantwort aus (Ausschüttung von Cytokinen und Akutphasen-Proteinen) sowie die Schädigungen der Nervenzellen, Störung der Homöostase von Ionen und oxidative Schäden. Diese Vorgänge führen insgesamt zu Funktionsverlusten und zum Absterben der Nervenzellen sowie zu einem Mangel an Neurotransmittern¹⁷². Durch ein bestimmtes Allel des Apolipoprotein E-codierenden Gens hervorgerufene Störungen des Cholesterin-metabolismus werden ebenfalls mit AD in Verbindung gebracht¹⁶³.

Anzeichen für Entzündungsvorgänge wurden schon 1907 von Alois Alzheimer bei der Beschreibung der pathologischen Merkmale der Erkrankung festgestellt¹⁷³. Es wird vermutet, daß $A\beta$ -Ablagerungen Entzündungsvorgänge auslösen, welche die pathologischen Prozesse von AD verstärken könnten¹⁶². Auch werden bei Abwehrreaktionen freie Radikale produziert.

In AD-Gehirnen treten typische, durch freie Radikale verursachte Schäden auf wie DNA-Schäden und Protein- sowie Lipid-Oxidation²⁴. Es wurde gezeigt, daß Aß die Produktion von freien Radikalen verstärkt¹⁶². Das Gehirn ist besonders anfällig gegenüber oxidativem Streß durch den hohen Lipidgehalt und erhöhten Sauerstoffumsatz bei wenig ausgeprägtem Antioxidantien-Schutz¹⁶³. Metalle sind an der katalytischen Produktion von freien Radikalen beteiligt. Die Beteiligung von verschiedenen Metallen wie Eisen, Aluminium, Quecksilber, Kupfer und Zink an der AD-Pathologie ist Gegenstand verschiedener Untersuchungen²⁴. In AD-Gehirnen wurden erhöhte Eisengehalte festgestellt. Eine Störung des Eisenmetabolismus, vor allem in Verbindung mit durch Eisen generierte freie Radikale, wird als ein entscheidender Prozeß im Verlauf von AD vermutet¹⁵. Auch die durch Kupfer ausgelöste Toxizität der Kupfer-Komplexe mit dem Amyloid Vorläufer Protein durch Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen kann zur Pathologie von AD beitragen²¹. Der Zinkmetabolismus scheint ebenfalls bei AD gestört zu sein, es tritt eine anomale Zinkmobilisierung auf. Zink kann eine doppelte Rolle bei AD spielen: Es löst die Aß-Ablagerung aus, kann aber auch die - durch Eisen und Kupfer verursachte - Wasserstoffperoxid-Bildung von Aß verhindern und damit oxidativen Streß abwenden¹⁸. Insgesamt ist bei allen festgestellten Prozessen bisher nicht sicher, ob es sich um die grundlegende Ursache oder Folgeerscheinungen der Erkrankung handelt. Therapeutischer Ansatz ist bis heute vor allem eine Acetylcholin-Substitution. Untersucht werden Behandlungen mit Antioxidantien, entzündungssenkende Medikamente, eine Impfung gegen das Aß-Peptid, cholesterinsenkende Medikamente sowie Östrogen-Substitution und Substanzen, die eine Aggregation von Aß verhindern¹⁶³.

12.2 Vergleich von Elementen in weißer und grauer Masse der Gehirngewebe

Die Nervenenerregungen weiterleitenden Fortsetze der Nervenzellen (Axone) sind von einer myelinhaltigen Markscheide ummantelt⁹¹. Durch diese Myelinschicht (>1 µm im Durchmesser) werden die Axone elektrisch isoliert und so die Nervenleitungen schneller und effizienter⁹². Myelin ist eine Fortsetzung der Plasmamembran der Zellen, welche die Axone umgeben und das Myelin produzieren. Myelin zeichnet sich aus durch:

- einen hohen Lipidanteil (70-80%)
- eine einfache Proteinzusammensetzung
- niedrige Enzymaktivitäten.

Es ist besonders konzentriert in der weißen Masse des Gehirngewebes und hat dort einen Anteil von 50-60% der Trockenmasse⁹².

Bei den Gewebeproben, von denen genügend Material vorhanden war, wurden die weiße und die graue Masse so gut wie möglich getrennt und die Elementgehalte zusätzlich zur Analyse im Gesamtgewebe separat bestimmt. Es sollte festgestellt werden, ob Unterschiede in den Gehalten bestimmter Elemente in den unterschiedlichen Gewebetypen vorlagen und ob dabei auch Unterschiede zwischen Alzheimer- und Kontrollproben auftraten.

12.2.1 Elementgehalte der Gewebeproben von weißer und grauer Masse

Die Zink-, Selen- und Eisengehalte wurden mittels INAA ermittelt und auf das Trockengewicht bezogen. In **Tab. 12-1** sind die für Kontroll- und Alzheimerproben getrennt berechneten Mittelwerte für die weiße und graue Masse der Gewebe sowie für das Verhältnis der Elementgehalte in weißer zu grauer Masse aufgeführt. Mittels des Mann-Whitney-U-Tests wurde auf signifikante Unterschiede zwischen AD- und Kontrollproben sowie zwischen weißer und grauer Masse innerhalb einer Gruppe geprüft.

Bei den Eisenwerten muß berücksichtigt werden, daß sie neben dem Eisengehalt der Zellen auch den des Hämoglobins anhaftender Blutreste im Gehirngewebe enthalten können. Die Blutgefäße wurden jedoch nach Möglichkeit entfernt, was im Vergleich zu anderen Organen im Gehirn relativ gut durchführbar war.

Tab. 12-1: Elementgehalte in weißer und grauer Masse von Kontroll- und AD-Gehirnen, statistischer Test auf signifikante Unterschiede

	Gruppe ^a	Anzahl Proben (Patienten) ^b	Zn [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ TM]	Se [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ TM]	Fe [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ TM]
weiße Masse	Kon	7 (2)	34,4 ± 5,6	0,37 ± 0,06	147 ± 39
weiße Masse	AD	8 (6)	32,1 ± 9,3	0,40 ± 0,11	166 ± 44
graue Masse	Kon	7 (2)	83,9 ± 10,1	0,72 ± 0,03	253 ± 54
graue Masse	AD	8 (6)	68,1 ± 8,4	0,71 ± 0,04	259 ± 56
weiß:grau	Kon	7 (2)	0,41 ± 0,08	0,51 ± 0,09	0,60 ± 0,21
weiß:grau	AD	6 (5)	0,50 ± 0,15	0,59 ± 0,15	0,68 ± 0,21

Mann-Whitney U-Test^d

weiße Masse	Kon/AD	p>0,05 ^e	p>0,05	p>0,05
graue Masse	Kon/AD	p<0,05	p>0,05	p>0,05
weiß/grau	Kon	p<0,01	p<0,01	p<0,01
weiß/grau	AD	p<0,001	p<0,001	p<0,01
weiß:grau	Kon/AD	p>0,05	p>0,05	p>0,05

^a Kon: Kontrollen, AD: Morbus Alzheimer;

^b Es ist zu beachten, daß nur von wenigen Proben zusätzlich weiße und graue Masse getrennt vorhanden war und deshalb alle vorhandenen Proben (Regionen) in die Berechnung einbezogen wurden.

^c TM: Trockenmasse;

^d Statistica Version 5.1, StatSoft, Inc.; ^e Dabei ist p<0,05 ein wahrscheinlicher Unterschied, p<0,01 ein signifikanter und p<0,001 ein hochsignifikanter Unterschied.

Bei den untersuchten Proben konnte nur für Zink in der grauen Masse ein wahrscheinlicher Unterschied zwischen den AD-Gehirngeweben und denen der Kontrollgruppe festgestellt werden. Bei den AD-Proben war der auf die Trockenmasse bezogene Zinkgehalt dabei niedriger. Ehmann et al.¹⁷⁵ fanden bei den hier untersuchten Elementen nur einen erhöhten Eisengehalt (p<0,05) in der grauen Masse von AD-Gehirnen.

Ein auffälliger und statistisch signifikanter bis hochsignifikanter Unterschied bestand bezüglich der Konzentration der Elemente in der weißen und in der grauen Masse. Die Elementgehalte waren in der weißen Masse deutlich geringer, was vermutlich auf den hohen Lipidanteil zurückzuführen ist. Das Verhältnis der Elementgehalte in weißer Masse zu dem in grauer Masse betrug um 0,5 für Zink und Selen, bei Eisen lag es etwa um 0,65. Dieses Verhältnis wies keinen statistischen Unterschied zwischen AD- und Kontrollproben

auf. Auch Ehmann et al.¹⁷⁵ fanden signifikant niedrigere Gehalte dieser drei Elemente in der weißen Masse verglichen mit der grauen Masse. Andrási et al.¹⁷⁶ stellten ebenfalls in der grauen Masse allgemein höhere Elementkonzentrationen fest.

12.2.2 Elementprofile im Cytosol von weißer und grauer Masse

Bei einem Kontroll-Gehirngewebe (Kleinhirn) konnte zusätzlich aus weißer und grauer Masse getrennt Cytosol extrahiert werden. Die Kupfer-, Zink- und Cadmium-Profile der SEC-Trennung über die Superdex 75PG-Säule werden in **Abb. 12-1** verglichen. Die auf die Trockenmasse bezogenen Elementgehalte, die SOD-Aktivität und der Proteingehalt dieser Proben sowie die Elementgehalte in den entsprechenden Geweben sind in **Tab. 12-2** aufgeführt.

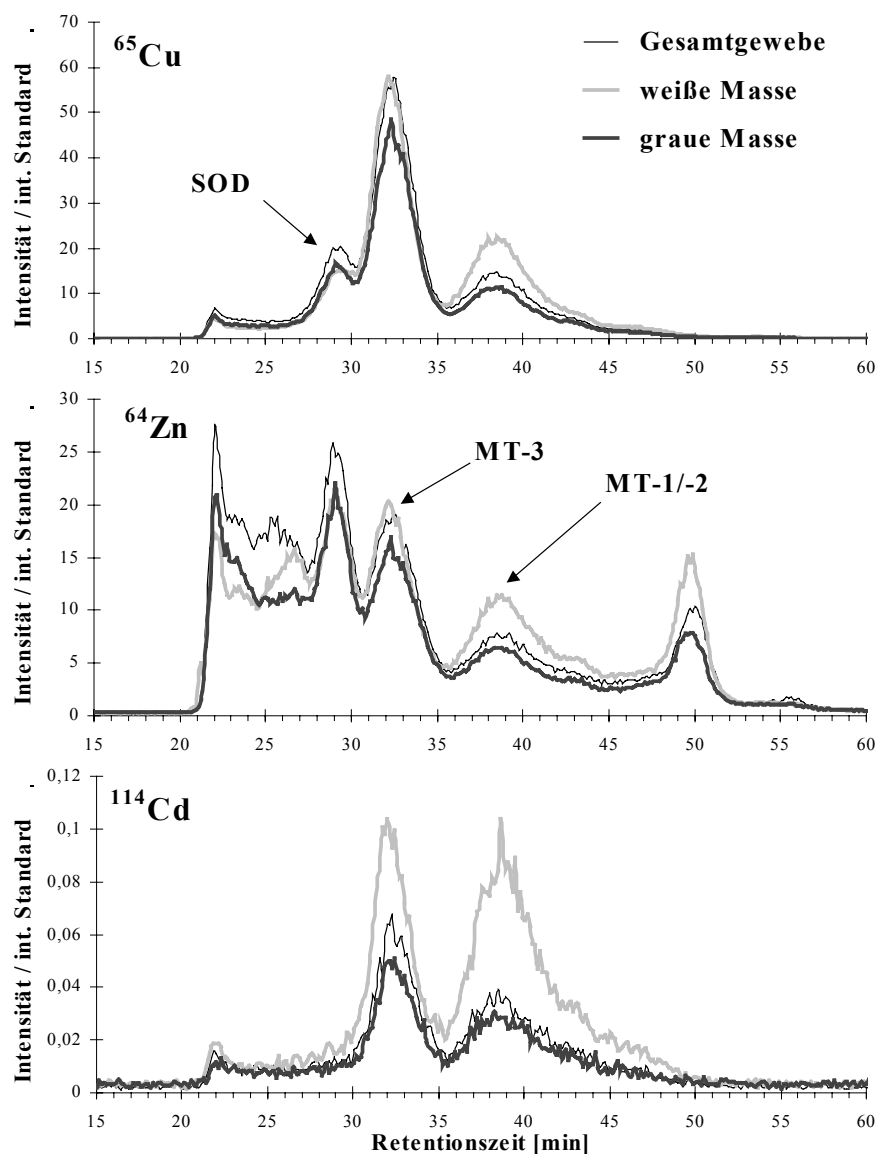


Abb. 12-1: Vergleich der Kupfer-, Zink- und Cadmium-Profile der chromatographischen Trennung des Cytosols einer humanen Gehirnprobe (Kleinhirn, Kontrolle) sowie der Cytosole von getrennter weißer und grauer Masse dieses Gewebes

Tab. 12-2: Elementgehalte sowie SOD-Aktivität und Proteingehalt in den aus weißer Masse, grauer Masse und dem Gesamtgewebe extrahierten Cytosolen einer humanen Gehirnprobe sowie Elementgehalte in den entsprechenden Geweben (Kleinhirn, Kontrolle)

		Gesamtgewebe	weiße Masse	graue Masse
Zn	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ TM)	64,0	34,2	79,9
Se	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ TM)	0,61	0,30	0,74
Fe	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ TM)	153	81	178
		Cytosol Gesamtgewebe	Cytosol weiße Masse	Cytosol graue Masse
Zn	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ TM)	99	119	108
Se	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ TM)	0,72	0,62	0,57
Fe	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ TM)	383	118	111
Cu	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ TM)	88	114	85
Cd	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ TM)	0,45	0,95	0,40
SOD	($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ TM)	7900	9100	8500
Proteingehalt	($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ TM)	0,51	0,48	0,50

Die Elementgehalte sind bei den Geweben in der weißen Masse niedriger als in der grauen Masse. Im Cytosol hingegen sind dort die Elementgehalte höher als in der grauen Masse. Dies wird auf den hohen, nicht ins Cytosol extrahierten Lipidgehalt der weißen Masse zurückgeführt. Die auf die Trockenmasse bezogene SOD-Aktivität und der Proteingehalt im Cytosol sind bei den beiden Proben vergleichbar.

Der Vergleich der Elementprofile zeigt, daß im Cytosol der weißen Masse mehr an die Metallothioneine gebundenes Kupfer, Zink und Cadmium vorhanden ist als im Cytosol der grauen Masse. Die SOD-Kupfer- und Zink-Peaks sind etwa gleich. Die Verhältnisse der Peakflächen der Kupfer- und Zink-Signale zwischen weißer und grauer Masse sind in **Tab. 12-3** angegeben.

Tab. 12-3: Verhältnis der Peakflächen der Kupfer- und Zink-Signale von SOD, MT-3 und MT-1/-2 der chromatographischen Trennung der Cytosole von weißer und grauer Masse einer humanen Gehirnprobe (siehe **Abb. 12-1**)

	weiße / graue Masse
Cu (SOD)	1,08
Zn (SOD)	1,01
Cu (MT-3)	1,13
Zn (MT-3)	1,13
Cu (MT-1/-2)	1,91
Zn (MT-1/-2)	1,77

Hierbei ist zu berücksichtigen, daß die Signalfächen durch eine Peakentfaltung bestimmt wurden (PeakFit Version 4, Jandel Scientific Software, AISN Software Inc.). Die Signale wurden entsprechend ihrer Retentionszeit den Metalloproteinen zugeordnet. Die vom Programm zunächst automatisch optimierten Peakflächen wurden durch einen interaktiven Eingriff am Bildschirm soweit verbessert, bis eine möglichst optimale Übereinstimmung der Anpassung mit den Originalprofilen erreicht war. Die subjektive Beurteilung und das Vorhandensein von nur unzureichend aufgetrennten Signalen bedingt eine gewisse

Unsicherheit der Flächenbestimmung. Diese Peakflächenabschätzung ist jedoch die einzige Möglichkeit, zumindest semiquantitative Aussagen zu erhalten.

Uchida et al.¹⁰ fanden eine höhere GIF-Aktivität in der grauen Masse. Anhand der in dieser Arbeit untersuchten Einzelprobe läßt sich keine definitive Aussage treffen.

Es wurden insgesamt deutliche Unterschiede im Elementgehalt der weißen und grauen Masse des Gehirngewebes gefunden. Sie können mit der unterschiedlichen Beschaffenheit der Gewebe, speziell dem hohen Lipidanteil der weißen Masse, in Verbindung gebracht werden. Auch die Elementprofile wiesen Unterschiede auf, die jedoch anhand eines größeren Probenkollektives überprüft werden müssen.

12.3 Vergleich der verschiedenen Gehirnregionen

Die Elementprofile der chromatographischen Trennung der Cytosole der verschiedenen Gehirnregionen von AD- und Kontrollproben wurden verglichen. In **Abb. 12-2** sind am Beispiel einer AD- und einer Kontrollgehirnprobe einzelne Elementprofil-Vergleiche der unterschiedlichen Gehirnregionen dargestellt.

Bei einigen Elementen wie Iod und Blei gab es zwar Unterschiede der Elementmuster zwischen verschiedenen Patienten, bei den unterschiedlichen Gehirnregionen eines einzelnen Patienten jedoch waren die Elementmuster vergleichbar. Auch die Selen-Profile - soweit das bei der Detektion am Rande der Nachweisgrenze beurteilt werden konnte - waren für die einzelnen Regionen und auch verschiedenen Patienten sehr ähnlich.

Bei anderen Elementen wie Eisen und Mangan gab es Variationen der Peakintensitäten zwischen den einzelnen Regionen. Obwohl bei mehreren Patienten das Ferritin-Signal der occipitalen Region ausgeprägter war als bei den anderen Regionen, waren insgesamt keine einheitlichen Trends zu erkennen. Es schien sich eher um individuelle Schwankungen innerhalb der Gehirnregionen zu handeln.

Ein auffallender Unterschied waren die höheren MT-3-Signalintensitäten im Cytosol des Kleinhirns, vor allem beim Kupfer, teilweise auch bei Zink, Cadmium und Silber. Das Kleinhirn galt in der Literatur lange als von AD ausgenommen, da dort keine pathologischen Prozesse nachgewiesen wurden. Inzwischen wurden auch im Kleinhirn einige für AD typische Merkmale gefunden, jedoch keine neurofibrillären Ablagerungen¹⁷⁷. Uchida et al.¹⁰ hatten die neurotrophische Aktivität (siehe Kapitel 2.2.1) von AD-Gehirnexttrakten mit den Neurofibrillen, nicht aber mit den Plaques, in Verbindung gebracht. In Extrakten von AD-Kleinhirn, welches keine Neurofibrillen enthielt, wurde auch keine verstärkte neurotrophische Aktivität gefunden. Da die erhöhte neurotrophische Aktivität auf das Fehlen von MT-3 zurückgeführt wurde, wäre damit bei AD im Kleinhirn mehr MT-3 vorhanden als in anderen Regionen. Dies stimmt mit der bei den betrachteten Elementprofilen festgestellten Tendenz überein, daß im Kleinhirn mehr MT-3 bzw. MT-3 mit gebundenen Metallen (siehe Abschnitt 12.4.5) vorhanden ist. Den Metallen wird eine wichtige Rolle zur Stabilisierung der für die Funktion von MT-3 essentiellen Struktur zugeschrieben.

Da auch bei den Kontrollproben der MT-3-Peak im Kleinhirn die größte Intensität aufweist, scheint dieser regionale Unterschied jedoch eher gehirnspezifisch zu sein und

nicht im Zusammenhang mit AD zu stehen. Dies muß an weiteren Proben überprüft werden.

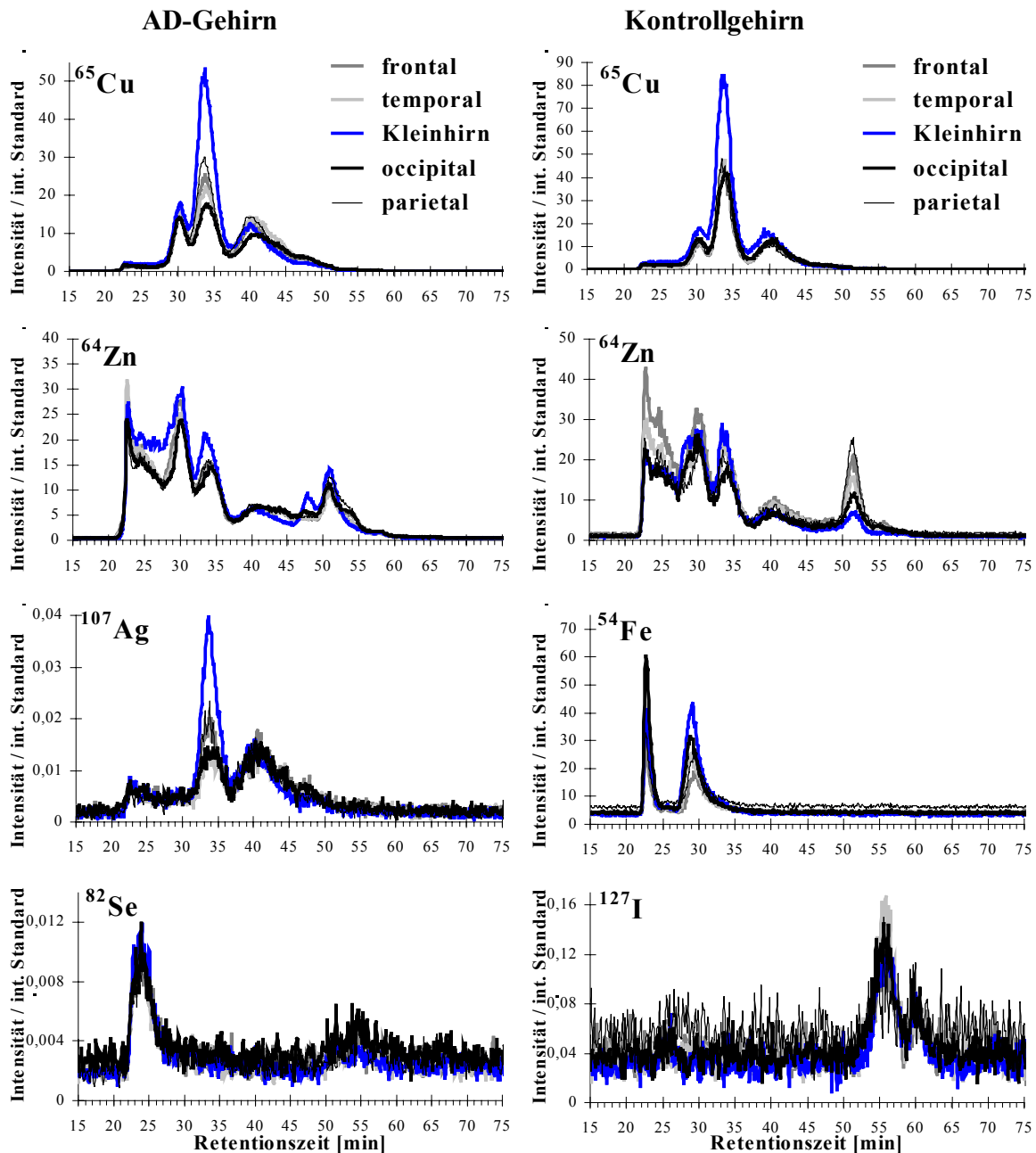


Abb. 12-2: Vergleich der Kupfer-, Zink-, Silber-, Eisen-, Selen- und Iod-Profile der chromatographischen Trennung der Cytosole unterschiedlicher humaner Gehirnregionen eines AD- und Kontrollgehirns; Thalamus und Caudatus sind nicht mit dargestellt, da durch verschiedene Konzentrationen und Injektionsvolumina keine direkte Vergleichbarkeit gegeben war

12.4 Vergleich der AD- und der Kontrollproben

Im folgenden werden Elementgehalte und Elementprofile der chromatographischen Trennung von AD-Gehirnproben mit denen einer Kontrollgruppe verglichen, um mögliche, auf die Erkrankung zurückzuführende Unterschiede feststellen zu können.

12.4.1 Gesamtelementgehalte in AD- und Kontrollgehirnen

Zum Vergleich der Elementgehalte müssen die ermittelten Werte auf eine einheitliche Vergleichsgröße bezogen werden. Die in den Geweben gemessenen Elementgehalte wurden in dieser Arbeit grundsätzlich auf die Trockenmasse bezogen, da diese als weniger anfällig für Schwankungen betrachtet wurde als die Feuchtmasse. Als Bezugsgröße für den Elementgehalt in den Cytosolen standen die Trockenmasse wie auch der Gesamtproteingehalt zur Auswahl. Wurde jedoch der Proteingehalt auf die Trockenmasse des Cytosols bezogen, wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontroll- und den AD-Proben festgestellt (siehe **Tab. 12-4**). Der relative Proteingehalt war bei den Kontrollproben höher. Dieser Unterschied ist möglicherweise auf eine andere morphologische Beschaffenheit des Gehirngewebes bei AD zurückzuführen. Dabei könnte der Unterschied hauptsächlich im Proteingehalt oder vor allem in der Trockenmasse begründet sein. Über die genaue Ursache kann im Rahmen dieser Arbeit keine Aussage getroffen werden. Nach Literaturangaben ist jedoch der Proteingehalt bzw. die Proteinsynthese bei AD erniedrigt¹⁷⁵.

Es ist wichtig festzuhalten, daß der festgestellte Unterschied bei der Umrechnung auf Bezugsgrößen beachtet werden muß. Der mit den dabei erhaltenen Werten durchgeführte Vergleich zwischen AD- und Kontrollproben kann irreführend sein, wenn diese schon einen inhärenten Unterschied der Bezugsgröße zwischen Alzheimer- und Kontrollproben enthalten. Auch der Vergleich von Angaben in der Literatur ist erschwert, wenn sie sich auf verschiedene Bezugsgrößen beziehen.

In dieser Arbeit werden zum Vergleich von AD- und Kontrollproben die Elementgehalte im Cytosol wie bei den Gesamtgeweben auf die Trockenmasse bezogen.

Tab. 12-4: Proteingehalt pro Trockenmasse im Cytosol von Kontroll- und AD-Gehirnproben

Gruppe	Probenanzahl	Patientenanzahl	g Protein / g TM
Kontrollen	14	5	0,49 ± 0,09
Morbus Alzheimer	27	11	0,41 ± 0,09
Mann-Whitney U-Test Kontrollen/AD			p<0,01

Die in den Gesamtgeweben bzw. Cytosolen der Gehirnproben von AD- und Kontrollproben bestimmten Gehalte von Zink, Selen, Eisen, Kupfer und Cadmium sind in **Tab. 12-5** und **Tab. 12-6** angegeben. Die gefundenen Gesamtgehalte für Zink, Selen und Eisen entsprechen den ermittelten Werten anderer Arbeitsgruppen^{178, 176}.

Es wurden bei den auf die Trockenmasse bezogenen Elementgehalten keine statistischen Unterschiede zwischen AD- und Kontrollproben festgestellt. Nur für Selen in der

parietalen Region und Cadmium im Kleinhirn wurde eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für einen Unterschied gefunden.

Tab. 12-5: Vergleich der Zink-, Selen- und Eisengehalte von AD- und Kontrollproben (Gesamtgewebe): Mittelwerte für die einzelnen Regionen, bezogen auf die Trockenmasse

Region	Gruppe	Anzahl Proben	Zink [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ TM]	MW U- Test ^a	Selen [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ TM]	MW U- Test ^a	Eisen [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ TM]	MW U- Test ^a
parietal	Kon	5	50,1±18,6	p>0,05	0,53±0,12	p<0,05	232± 37	p>0,05
	AD	10	59,0±14,5		0,68±0,11		291± 73	
frontal	Kon	5	67,5±22,5	p>0,05	0,61±0,12	p>0,05	236± 51	p>0,05
	AD	11	64,1±11,4		0,67±0,10		231± 19	
Kleinhirn	Kon	5	71,9± 8,2	p>0,05	0,73±0,08	p>0,05	242± 83	p>0,05
	AD	11	68,4±11,0		0,77±0,13		255± 96	
occipital	Kon	5	74,6± 8,8	p>0,05	0,72±0,07	p>0,05	328± 73	p>0,05
	AD	10	62,1±15,9		0,69±0,15		287±100	
temporal	Kon	4	72,3±12,6	p>0,05	0,65±0,06	p>0,05	259± 47	p>0,05
	AD	9	70,7±14,4		0,67±0,10		266± 61	
Thalamus	Kon	2	72,7±11,3		0,71±0,07		238± 19	
	AD	5	50,4±17,0		0,62±0,17		232± 91	
frontobas ^b	Kon	1	74,5		0,67		287	
	AD	5	77,5±10,3		0,71±0,03		282± 60	
Medulla	Kon	2	54,0±19,2		0,42±0,04		58± 12	
	AD	2	49,8± 0,8		0,50±0,09		73± 15	
Hippocam ^c	Kon	1	69,7		0,65		261	
Hypothal ^d	Kon	1	61,2		0,53		317	
Pons	AD	2	36,5±12,4		0,41±0,05		72± 13	

^a Mann-Whitney U-Test bei mindestens 3 Proben in jeder Gruppe

^b frontobasal, ^c Hippocampus, ^d Hypothalamus

In der Literatur werden Unterschiede in den Elementgehalten kontrovers diskutiert. Ehmann et al. ¹⁷⁵ fanden zunächst keine signifikanten Unterschiede der Zink-, Selen- und Eisengehalte sowie der Mangan- und Silbergehalte bei AD und Kontrollen. Es handelte sich dabei um Gesamtgehirnproben ohne regionale Spezifität. Sie schlossen daraus, daß, wenn diese Elemente bei den pathologischen Prozessen von AD eine Rolle spielen, diese in einer Umverteilung der Elemente und einer örtlichen Wirkung an spezifischen Zellorten liegen muß ¹⁷⁵. Die gleiche Gruppe zeigte später ¹⁷⁹, daß Zink- und Eisengehalte - auf die Trockenmasse bezogen - in den dort untersuchten Gehirnregionen bei AD erhöht und die Kupfergehalte niedriger sind, allerdings nur in einigen Fällen statistisch signifikant. Niedrigere Kupfer- (und Cadmium-) Werte bei AD wurden tendenziell auch in der vorliegenden Arbeit gefunden (siehe **Tab. 12-6**), jedoch ohne statistische Signifikanz. In einer weiteren Untersuchung fand obige Arbeitsgruppe ²⁶, daß die Eisen- und Zinkgehalte in fast allen untersuchten Gehirnregionen bei AD signifikant erhöht sind, Selen jedoch nur in einer Region (Amygdala). Dabei handelte es sich um auf die Feuchtmasse bezogene Werte. In der früheren Veröffentlichung wurde festgestellt, daß die AD-Gehirngewebe einen signifikant höheren Wasseranteil enthielten als die Kontrollproben.

Andrási et al. ¹⁸⁰ fanden bei der Untersuchung verschiedener Gehirnregionen keinen signifikanten Unterschied der über alle Proben gemittelten Eisenkonzentration, jedoch der

Zinkkonzentration, welche bei AD erhöht war. Außerdem gab es Unterschiede der Verteilungen dieser beiden Elemente in den Gehirnregionen und zwischen AD- und Kontrollproben bei einzelnen Regionen, wobei die Konzentrationen teilweise bei Alzheimer, teilweise bei den Kontrollen höher waren. In der occipitalen Region der AD-Proben z.B. waren Eisen- und Zinkgehalte niedriger. Letzteres stimmt mit der Tendenz der in dieser Arbeit gefundenen Werte überein. Die Autoren wiesen auch auf widersprüchliche Angaben in der Literatur über Zinkgehalts-Unterschiede zwischen AD- und Kontrollproben hin¹⁸⁰. Auch Cuajungco et al. erwähnten die bisher kontroversen Ergebnisse in der Literatur bezüglich der Zinkkonzentration bei AD-Proben. Mehrere Studien schienen dabei jedoch auf einen niedrigeren Zinkgehalt bei AD hinzuweisen¹⁸¹.

Tab. 12-6: Vergleich der Kupfer- und Cadmiumgehalte von AD- und Kontrollproben (Cytosole): Mittelwerte für die einzelnen Regionen, bezogen auf die Trockenmasse

Region	Gruppe	Anzahl Proben	Cu [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ TM]	MW U-Test ^a	Cd [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ TM]	MW U-Test ^a
parietal	Kon	5	92,4 ± 14,5	p>0,05	0,46 ± 0,14	p>0,05
	AD	10	71,1 ± 31,1		0,30 ± 0,11	
Kleinhirn	Kon	3	123,7 ± 33,2	p>0,05	0,72 ± 0,30	p<0,05
	AD	6	95,3 ± 47,1		0,28 ± 0,13	
occipital	Kon	1	89,7		0,40	
	AD	4	69,8 ± 9,6		0,44 ± 0,10	
temporal	Kon	2	95,2 ± 4,2		0,77 ± 0,44	
	AD	2	62,3 ± 33,7		0,27 ± 0,14	
Hippocampus frontobasal	Kon	1	81,9		0,33	
	AD	2	108,8 ± 8,4		0,30 ± 0,11	
Putamen	AD	2	69,1 ± 1,5		0,27 ± 0,16	
Caudatus	AD	1	71,7		0,14	

^a Mann-Whitney U-Test bei mindestens 3 Proben in jeder Gruppe

Insgesamt konnten in dieser Arbeit keine signifikanten Unterschiede der Zink-, Selen-, Eisen-, Kupfer- und Cadmiumkonzentrationen in einzelnen Gehirnregionen zwischen AD- und Kontrollproben festgestellt werden. Auch in der Literatur ist kein einheitlicher Trend vorhanden, es gibt Angaben für erhöhte Elementkonzentrationen bei AD ebenso wie bei Kontrollproben, jeweils für unterschiedliche Gehirnregionen.

Daraus kann geschlossen werden, daß die Untersuchungen stark von verschiedenen Faktoren abhängig sind, die bei den einzelnen Studien variieren und deshalb eine Vergleichbarkeit erschweren und eine Verallgemeinerung unmöglich machen. Die Art der Probe (z.B. in Formalin eingelegt), die Probenvorbehandlung und neben der Region auch der genaue Probenahmeort (Unterabschnitte einzelner Regionen, Verhältnis von weißer zu grauer Masse) können einen Einfluß haben. Es wurden z.B. auch schon Unterschiede zwischen linker und rechter Gehirnhälfte gefunden¹⁷⁸. Ebenso kann die Bezugsgröße (Feuchtmasse, Trockenmasse, Proteingehalt) eine Rolle spielen und möglicherweise die Art der statistischen Auswertung. Nicht zuletzt muß von großen individuellen Schwankungen ausgegangen werden, welche das Erreichen statistisch signifikanter Aussagen erheblich erschweren.

12.4.2 Vergleich von Elementprofilen in Cytosolen von AD- und Kontrollgehirnen

Da die Bestimmung der Gesamtgehalte - auch in der Literatur kontrovers diskutiert - in den untersuchten Gehirnproben keine Unterschiede zwischen AD- und Kontrollproben aufwiesen, wurden weitergehende Einblicke von der Speziationsanalyse erwartet. Mögliche Unterschiede in der Verteilung der Elemente zwischen Proteinen im Cytosol von AD-Gehirnen im Vergleich zu den Kontrollproben sollten gefunden werden.

Die Eisen-, Mangan-, Selen- und Iod-Profile der chromatographischen Trennung der Cytosolproben von AD- und Kontrollproben sind in **Abb. 12-3** und **Abb. 12-4** aufgetragen.

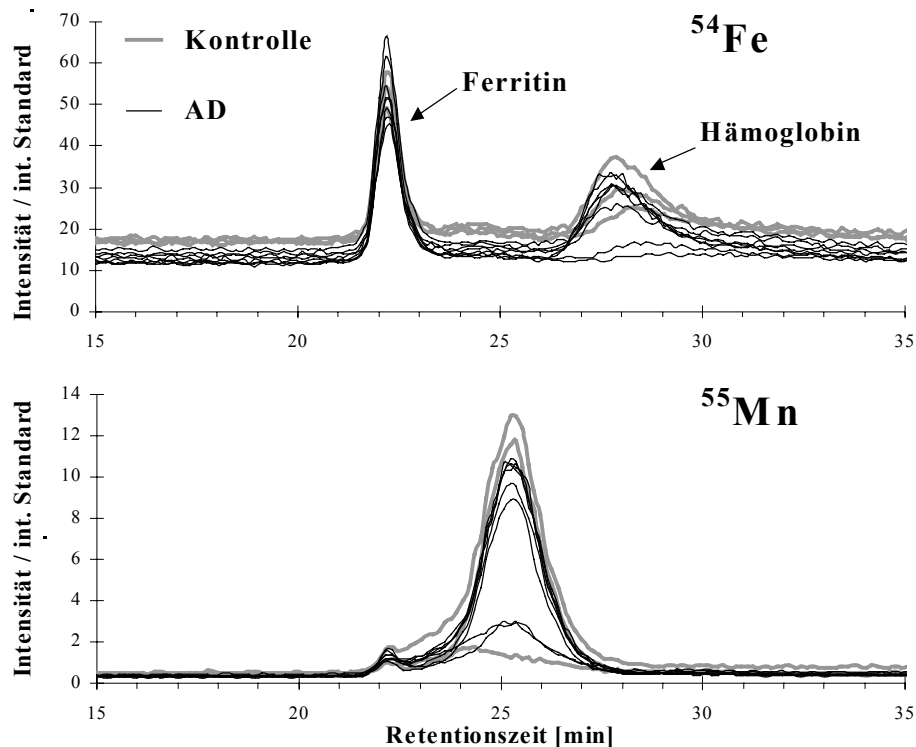


Abb. 12-3: Vergleich der Eisen- und Mangan-Profile der chromatographischen Trennung des Cytosols von humanen AD- und Kontrollgehirnproben (parietale Region)

Die Speicherung von bioverfügbarem Eisen im Gehirn ist essentiell für eine normale neurologische Funktion, die durch Eisenmangel ebenso wie durch Eisenüberschuß beeinträchtigt werden kann¹². Das Gehirn hat wegen des hohen Energieumsatzes einen großen Bedarf an Eisen, das als essentieller Faktor in mehreren Enzymen der Atmungskette zur Energieproduktion benötigt wird. Eisen ist außerdem Ko-Faktor von Enzymen bei der Synthese von Neurotransmittern und essentiell für die Biosynthese von Lipiden und Cholesterin, welche wiederum für die Myelin-Synthese gebraucht werden. Durch Eisen können aber auch über die Fenton-Reaktion freie Radikale entstehen, die oxidative Schäden an Proteinen, Lipiden und der DNA verursachen¹². Eine Störung des Eisenmetabolismus kann demnach schwerwiegende Folgen haben und wird mit der Pathologie mehrerer neurodegenerativer Erkrankungen in Verbindung gebracht. Eisenablagerungen wurden in AD-Gehirnen besonders in den Plaques gefunden¹⁵.

Die eisenregulierenden Proteine Transferrin und Ferritin wurden in diesem Zusammenhang im Gehirn untersucht. In einer Studie wurden eine niedrigere Transferrin-Konzentration, eine unveränderte bis leicht erniedrigte Ferritin-Konzentration, aber höhere Eisengehalte in

AD-Gehirnen gefunden. Daraus wurde auf eine niedrigere Eisenmobilität und eine erhöhte Eisenlagerung geschlossen, die vermehrt eiseninduzierte oxidative Schädigungen von Lipiden hervorrufen könnten. Eisen könnte somit auch zum gestörten Cholesterinstoffwechsel bei AD beitragen¹⁸². Connor et al. wiesen auf eine mögliche ungenügende Speicherung von Eisen bei AD hin, da Ferritin im Alter im Gehirn zunimmt, nicht jedoch bei Patienten mit AD¹². Dobson stellte fest, daß die teilweise gefundenen erhöhten Eisenkonzentrationen bei AD nicht mit höheren Ferritin- oder Transferrin-Gehalten korrelieren und es bis jetzt keine klaren Aussagen über anomale Ferritin-Werte bei AD gibt. Redoxaktives Eisen wurde jedoch an den Plaques und Neurofibrillen bei AD gefunden. Ein Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von biogenem Magnetit im Gehirn mit der Bildung von freien Radikalen und damit oxidativen Schäden bei neurodegenerativen Erkrankungen wurde vermutet¹⁵. Bei einem weiteren eisenbindenden Protein, dem p97 oder Melanotransferrin, wurde eine Erhöhung im AD-Gehirn sowie im Serum von AD-Patienten festgestellt¹⁸³.

In den Eisen-Profilen in **Abb. 12-3** sind der Ferritin- und der Hämoglobin-Peak zu erkennen, Transferrin liegt unter der Nachweisgrenze. Im humanen Gehirn ist die Ferritin-Konzentration zehnfach höher als die Transferrin-Konzentration¹⁸⁴. Bei der Detektion mittels ICP-MS kommt hinzu, daß Ferritin wesentlich mehr Eisen gebunden hat als Transferrin - bis zu 4500 Eisenatome gegenüber 2 Eisenatomen pro Molekül - und damit durch Elementdetektion besser detektierbar ist. Über eine mögliche veränderte Transferrin-Konzentration bei AD kann deshalb keine Aussage getroffen werden. Der Hämoglobin-Gehalt ist von den am Gewebe verbliebenen Blutresten abhängig und für einen Vergleich zwischen AD- und Kontrollproben deshalb bei diesen Untersuchungen nicht aussagekräftig. Das Ferritin-Signal im Cytosol der Gehirnproben weist in den betrachteten Eisen-Profilen keinen Unterschied zwischen AD- und Kontrollproben auf und zeigt nur die Variation der individuellen Proben. Dies ist natürlich nur eine Aussage über den Eisengehalt im Ferritin und nicht die Konzentration des Proteins an sich. Der Eisengehalt kann jedoch als die relevantere Information, nämlich über den Anteil gespeicherten Eisens, angesehen werden. In einer Studie wurde gefunden, daß Ferritin aus AD-Gehirnen mehr Eisen enthält als Ferritin aus Kontrollgehirnen¹⁷⁹.

Auch die Mangan-Profile (**Abb. 12-3**) wiesen keinen erkennbaren Unterschied zwischen AD- und Kontrollproben auf, sondern ebenfalls nur individuelle Variationen des der manganabhängigen SOD zugeordneten Peaks. Auffallend war dabei das vollständige Fehlen dieses Signals bei einer Kontrolle (Nr. 143).

Die Selen-Profile (**Abb. 12-4**) waren stark verrauscht. Es handelte sich um Messungen im Bereich der Nachweisgrenze der ICP-QMS. Tendenziell kann aber gesagt werden, daß die Profile nahezu identisch waren und somit keine Unterschiede für die ins Cytosol extrahierten Selenoproteine vorlagen.

Beim Vergleich der Iod-Profile in **Abb. 12-4** fällt der besonders hohe - freiem Iod oder T₄ entsprechende - Peak bei RT=58 min einer Kontrolle (Nr. 143) auf, die auch als einzige Probe einen - dem T₃ zugeordneten - Peak bei RT=62 min sowie Signale bei RT=22 und 24 min (Thyroglobulin und TBG) aufweist. Der Peak bei RT=58 min ist bei fast allen AD-Proben niedriger als bei den Kontrollen. Außer bei einer AD-Probe (Nr. 137) ist das Signal bei RT=53,5 min bei den Kontrollen deutlich, bei den AD-Proben jedoch nicht vorhanden. Auch in der früheren Arbeit⁵ wurde festgestellt, daß dieser Iod-Peak bei den Kontrollen gegenüber den AD-Proben wesentlich stärker ausgeprägt war. Der Peak konnte jedoch nicht genau identifiziert werden. Da keine näheren Informationen zur Patientengeschichte

bzw. Probenentnahme vorlagen, kann nicht gesagt werden, ob es sich bei diesem bei den Kontrollen erhöhten Peak um einen Artefakt handelt und das Signal möglicherweise durch iodhaltige Kontrastmittel oder Desinfektionsmittel verursacht wurde. Da der Effekt jedoch bei fast allen untersuchten Proben einheitlich auftrat, könnte es einen Zusammenhang mit pathologischen Prozessen bei AD geben. Dies muß an weiteren Proben mit detailliert bekannter Behandlungsgeschichte geklärt werden.

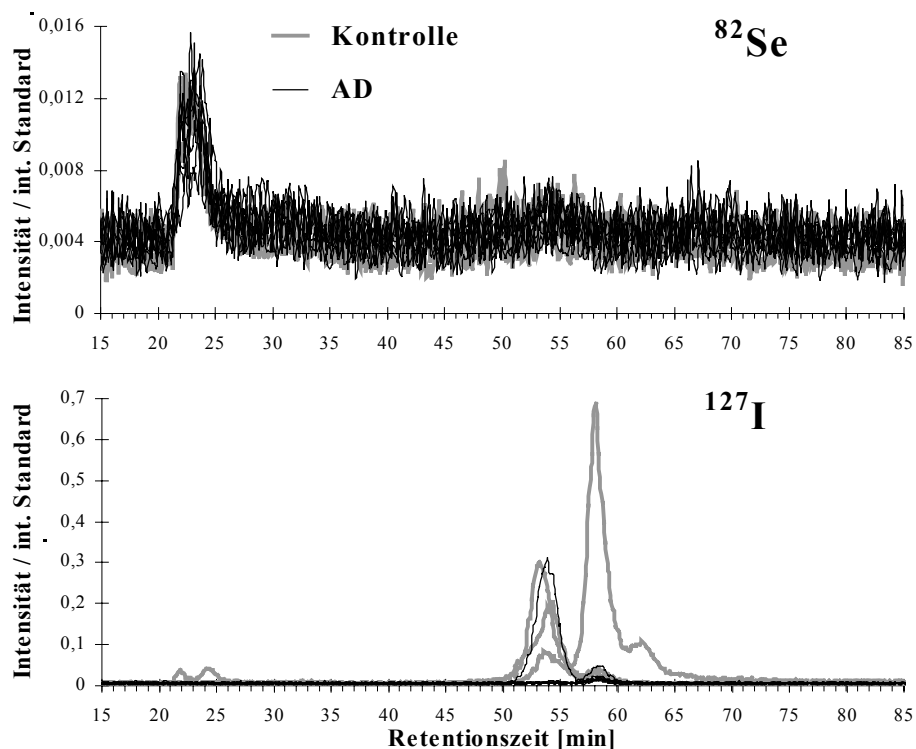


Abb. 12-4: Vergleich der Selen- und Iod-Profile der chromatographischen Trennung des Cytosols von humanen AD- und Kontrollgehirnproben (temporale Region)

Im folgenden werden die Elementprofile der an MT gebundenen Metalle betrachtet.

12.4.3 SOD als Referenz für den Vergleich der MT-Signale

Die Kupfer- und Zink-Profile der chromatographischen Trennung der Cytosole der AD- und Kontrollproben wurden verglichen. Dabei fiel auf, daß die der Superoxid Dismutase entsprechenden Signale bei allen Proben fast identisch waren, im Gegensatz zu den MT-Signalen (siehe **Abb. 12-5** in Abschnitt 12.4.4). Die SOD-Signale erschienen somit geeignet als Bezugspunkt zum Vergleich der MT-Metall-Signale in AD- und Kontrollproben. Bei der in den folgenden Abschnitten beschriebenen Untersuchung sollten AD- und Kontrollproben mit und ohne Zusatz des Reduktionsmittels DTT jeweils untereinander verglichen werden. Es wurde überprüft, ob sich die SOD-Signale tatsächlich als Referenz eigneten.

Die Peakflächen der Kupfer- und Zink-SOD-Signale wurden aus den Elementprofilen durch Peakentfaltung erhalten (siehe auch Abschnitt 12.2.2) und einer statistischen Prüfung

auf Unterschiede (Mann-Whitney U-Test) unterzogen. Die Werte wurden jeweils für eine Gehirnregion gemittelt, getrennt nach AD- und Kontrollproben bzw. Proben mit und ohne Zusatz von DTT. In **Tab. 12-7** und **Tab. 12-8** sind beispielhaft die Ergebnisse für vier verschiedene Gehirnregionen angegeben. Ein statistischer Vergleich von Proben unterschiedlicher Patienten ist wegen individueller Unterschiede grundsätzlich schwierig. Durch diese Unterschiede und damit hohe Standardabweichungen kann eine statistische Signifikanz unterdrückt werden oder - bei einem kleinen Probenkollektiv - fälschlicherweise ein Unterschied erscheinen.

Tab. 12-7: Peakflächen der SOD-Kupfer- und Zink-Signale in den Elementprofilen der Cytosole verschiedener humaner Gehirnregionen, Vergleich der AD- und Kontrollgehirne (8 AD- und 3 Kontrollproben)

Region	ohne Zusatz von DTT Peakflächen [1000*F.E. ^a]					mit Zusatz von DTT Peakflächen [1000*F.E.]			
		AD	Kon	AD/Kon	MW U-Test ^b	AD	Kon	AD/Kon	MW U-Test ^b
temp ^c	Cu	3,3±0,5	3,6±0,2	0,91	p>0,05	2,6±0,4	2,7±0,2	0,96	p>0,05
	Zn	1,9±0,3	2,0±0,3	0,93	p>0,05	2,1±0,4	2,4±0,4	0,89	p>0,05
pari ^d	Cu	3,6±1,2	4,0±0,1	0,91	p>0,05	2,7±0,3	2,8±0,3	0,94	p>0,05
	Zn	1,6±0,3	1,9±0,1	0,87	p>0,05	2,0±0,4	2,4±0,3	0,84	p>0,05
occi ^e	Cu	3,8±0,6	4,5±0,2	0,83	p<0,05	3,0±0,2	3,3±0,2	0,92	p>0,05
	Zn	2,0±0,2	2,2±0,2	0,91	p>0,05	2,5±0,3	2,5±0,2	1,02	p>0,05
Thal ^f	Cu	3,9±0,9	3,5±0,6	1,12	p>0,05	3,3±0,6	3,0±0,3	1,11	p>0,05
	Zn	2,7±0,7	2,1±0,4	1,31	p>0,05	3,0±0,5	2,5±0,4	1,19	p>0,05

^a F.E.: Flächeneinheiten

^b Mann-Whitney U-Test auf Signifikanz der Unterschiede zwischen AD- und Kontrollproben

^c temporale Region, ^d parietale Region, ^e occipitale Region, ^f Thalamus

Tab. 12-8: Verhältnis der Peakflächen der SOD-Kupfer- und Zink-Signale in den Elementprofilen der Cytosole verschiedener humaner Gehirnregionen ohne und mit Zusatz von DTT (8 AD- und 3 Kontrollproben)

Region		Kontrollen		Morbus Alzheimer	
		ohne/mit DTT ^a	MW U-Test ^b	ohne/mit DTT ^a	MW U-Test ^b
temporal	Cu	1,36±0,09	p<0,05	1,29±0,13	p<0,05
	Zn	0,86±0,05	p>0,05	0,91±0,07	p>0,05
parietal	Cu	1,42±0,12	p<0,05	1,36±0,36	p<0,01
	Zn	0,80±0,05	p<0,05	0,83±0,05	p<0,05
occipital	Cu	1,40±0,15	p<0,05	1,25±0,15	p<0,01
	Zn	0,88±0,10	p>0,05	0,79±0,07	p<0,05
Thalamus	Cu	1,16±0,15	p>0,05	1,18±0,15	p>0,05
	Zn	0,82±0,10	p>0,05	0,89±0,11	p>0,05

^a Es wurde jeweils die Kupfer- bzw. Zink-Peakfläche einer Probe ohne DTT auf die entsprechende Peakfläche der selben Probe mit Zusatz von DTT bezogen. Anschließend wurde der Mittelwert aller Proben für eine Region gebildet.

^b Mann-Whitney U-Test auf Signifikanz der Unterschiede zwischen Proben ohne und mit Zusatz von DTT

Obwohl eine Tendenz zu etwas niedrigeren Peakflächen bei den AD-Proben bestand, wurden insgesamt keine signifikanten statistischen Unterschiede festgestellt. Dafür traten teilweise signifikante Unterschiede zwischen Proben mit und ohne Zusatz von DTT auf. Dabei nahm das Kupfer-SOD-Signal mit Zusatz von DTT ab (siehe auch Kapitel 10), das Zink-SOD-Signal eher zu. Aber auch bei den Proben mit DTT bestand kein Unterschied zwischen AD- und Kontrollproben. Die AD- und Kontrollproben sollten miteinander und nur jeweils ohne Zusatz von DTT oder jeweils mit Zusatz von DTT verglichen werden. Deshalb störte eine Variation der SOD-Signale bei Zusatz von DTT nicht, solange keine Unterschiede der SOD-Signale zwischen den Patientengruppen auftraten.

Zusätzlich wurde die SOD-Aktivität in den Cytosolproben bestimmt (siehe Kapitel 6.2.1) und statistisch verglichen. Die Ergebnisse sind in **Tab. 12-9** aufgeführt. Auch bei den SOD-Aktivitäten wurde kein signifikanter Unterschied zwischen AD- und Kontrollproben festgestellt.

Tab. 12-9: Vergleich der SOD-Aktivitäten im Cytosol humaner Gehirnproben der AD- und Kontrollgruppe am Beispiel von zwei Gehirnregionen

Region	Gruppe	Anzahl der Proben	SOD [$\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ TM]	Mann-Whitney U-Test
Kleinhirn	Kon	3	9500 ± 1800	$p > 0,05$
	AD	6	9000 ± 1700	
parietal	Kon	5	8100 ± 1600	$p > 0,05$
	AD	10	8050 ± 1100	

Somit konnte davon ausgegangen werden, daß bei den untersuchten Proben bezüglich der SOD tatsächlich keine Unterschiede zwischen Kontroll- und AD-Gehirnen bestanden. Die Signale der Superoxid Dismutase wurden folglich als Bezugspunkt für den Vergleich der MT-Kupfer- und -Zink-Peaks in den Elementprofilen der Cytosole von AD- und Kontrollproben verwendet.

12.4.4 MT-Signale in Elementprofilen von AD- und Kontrollgehirnen

Die Elementprofile der von den MT gebundenen Metalle Kupfer, Zink, Cadmium, Silber und Blei im Gehirncytosol von AD- und Kontrollproben sind zum Vergleich am Beispiel der temporalen Region in **Abb. 12-5** aufgetragen.

Trotz individueller Variationen ist für die Kupfer-, Zink- und Cadmium-Profilen ein Unterschied zwischen AD- und Kontrollproben zu erkennen: Die MT-1/-2 und MT-3-Signale sind - bei Kupfer und Zink im Vergleich zu den bei beiden Gruppen ähnlichen SOD-Signalen - bei den Kontrollgehirnen höher. Auch im Silber-Profil weisen die Kontrollproben meist höhere MT-Signale auf, nur 2 von 8 AD-Proben haben vergleichbare Signale (Nr. 68 und 133). Bei den übrigen AD-Proben liegen die Silber-MT-Signale gerade über der Nachweisgrenze. Im Blei-Profil sind keine MT-Signale erkennbar.

Die Tendenz der niedrigeren MT-Signale bei AD-Proben wurde bei den meisten untersuchten Proben und Gehirnregionen gefunden. Nur beim Cytosol des Thalamus waren die einzelnen Kontrollen von den AD- Proben kaum unterscheidbar. Da für die Region des Thalamus jedoch jeweils nur sehr wenig Probenmaterial vorlag, mußte in deutlich höheren und stark voneinander abweichenden Verdünnungen gearbeitet werden. Zusätzlich waren die Probeaufgabenmengen deutlich verringert. Dies macht den Vergleich der Elementprofile unsicher, so daß keine genaue Aussage getroffen werden kann.

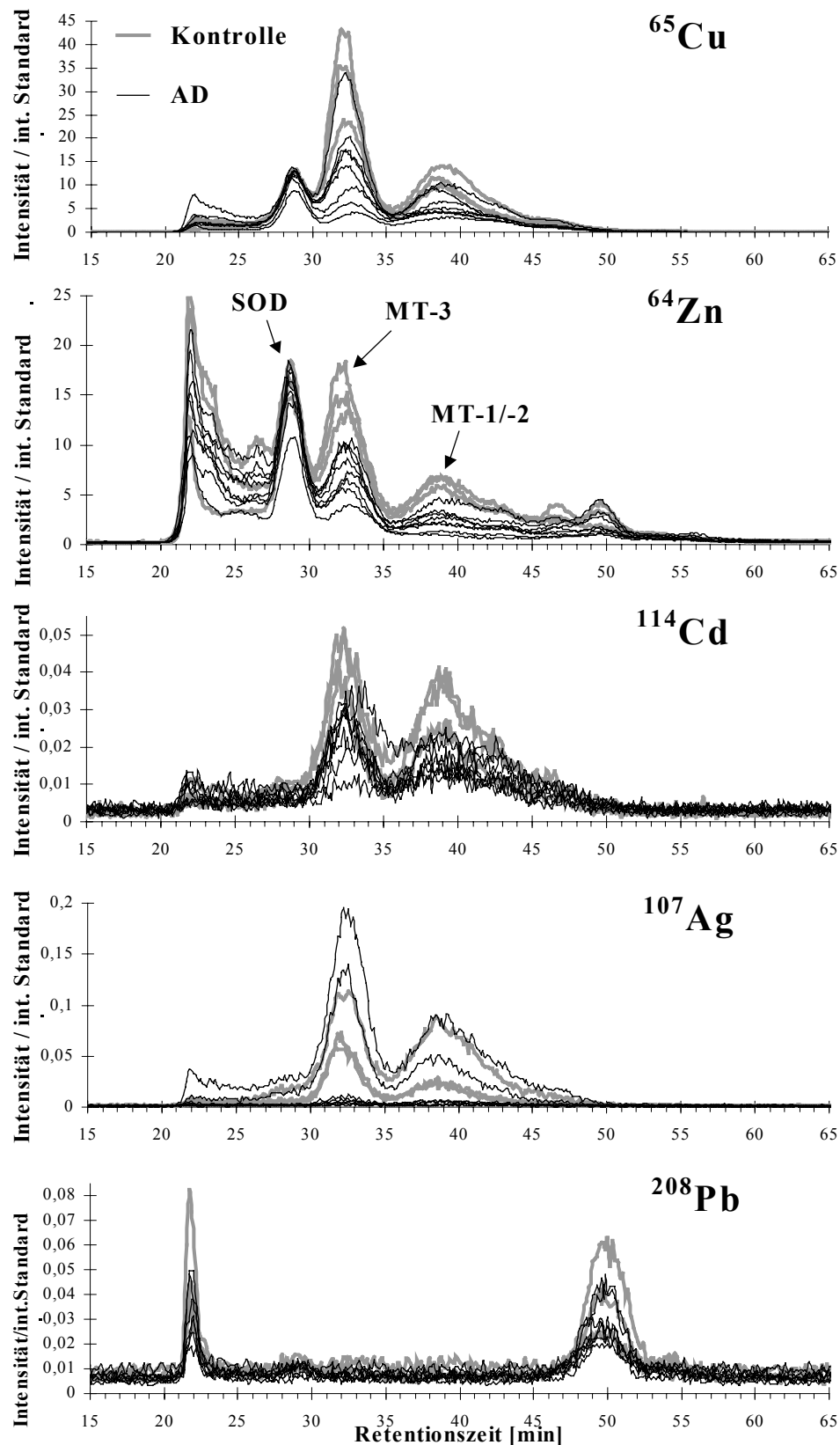


Abb. 12-5: Vergleich der Kupfer-, Zink-, Cadmium-, Silber und Blei-Profile der chromatographischen Trennung des Cytosols von humanen AD- und Kontrollgehirnproben (temporale Region)

Einige Gehirncytosole von AD- und Kontrollproben wurden mittels CZE-ICP-MS-Kopplung untersucht. Die erhaltenen Elektropherogramme - Kupfer und Zink - von zwei Proben der temporalen Region sind beispielhaft in **Abb. 12-6** dargestellt.

Auch mit diesem Verfahren wurde - im Rahmen der möglichen Vergleiche bei den wenigen untersuchten Proben - eine Tendenz zur Abnahme der MT-Metall-Signale bei AD-Proben festgestellt.

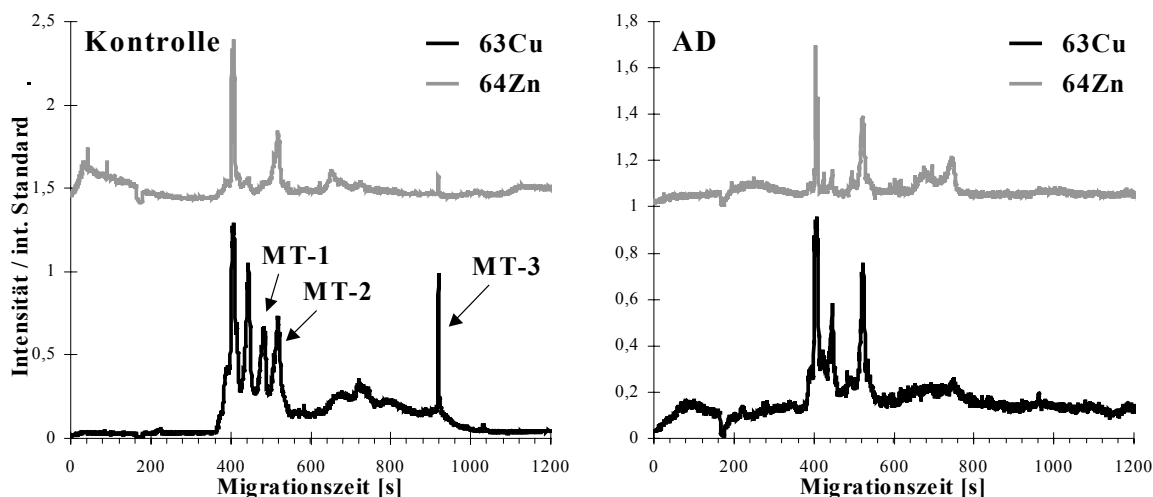


Abb. 12-6: Kupfer- und Zink-Profile der CZE-Trennung von humanen Gehirncytosolen einer AD- und einer Kontrollprobe (temporale Region, nach Acetonitril-fällung)

Das Auftreten von niedrigeren MT-Signalen bei den AD-Proben scheint mit der in der Literatur beschriebenen Herunterregulierung von MT-3 bei AD ⁷⁷ übereinzustimmen.

12.4.5 Oxidation der MT in AD-Gehirnen

Bei Versuchen mit Zusatz des Reduktionsmittels DTT zu den Cytosolproben waren Unterschiede der MT-Signale im Vergleich zu den Cytosolen ohne DTT aufgetreten (siehe Kapitel 10). Durch den Zusatz des Reduktionsmittels werden die Disulfid-Brücken von in der Probe vorhandenen oxidierten MT reduziert, die MT können damit wieder mehr Metalle binden. Dies machte sich in erhöhten MT-Metall-Peaks in den Elementprofilen bemerkbar.

Zu den verschiedenen Cytosolproben der AD- und Kontrollgehirne wurde ebenfalls DTT zugesetzt, um die Veränderungen in den Elementprofilen gegenüber den chromatographischen Läufen ohne DTT zu untersuchen. Die erhaltenen Elementprofile mit Zusatz des Reduktionsmittels sind am Beispiel der temporalen Region in **Abb. 12-7** dargestellt. Sie können mit den Elementprofilen der selben Proben ohne Zusatz von DTT in **Abb. 12-5** verglichen werden.

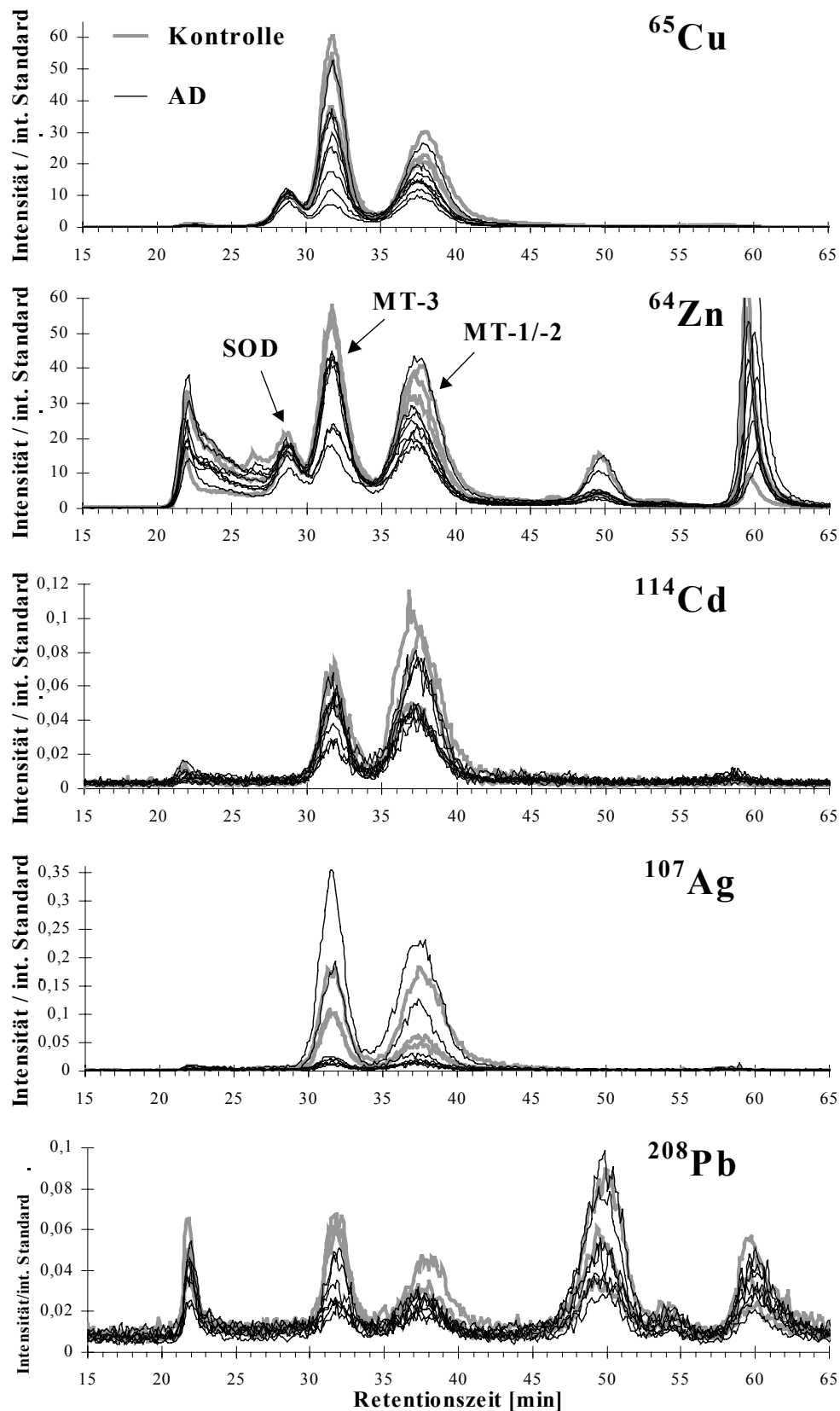


Abb. 12-7: Vergleich der Kupfer-, Zink-, Cadmium-, Silber- und Blei-Profile der chromatographischen Trennung des Cytosols von humanen AD- und Kontrollgehirnproben mit DTT-Zusatz (temporale Region)

Die MT-Signale der untersuchten Metalle sind mit DTT in allen Fällen erhöht. Dies wird - für Kupfer und Zink - besonders deutlich im Vergleich zu den SOD-Signalen, die sich wenig verändert haben. Auch bei den Blei-Profilen treten nun die MT-Signale hervor. Dies bedeutet, daß bei allen Proben oxidierte bzw. partiell oxidierte MT im Cytosol vorhanden waren. Besonders auffällig ist die Zunahme der Schärfe der Signale mit DTT, vor allem für die Zink-MT-1/-2-Signale (siehe auch Kapitel 10). Das in **Abb. 12-5** sehr breite Signal, welches teilweise mehrere Unterpeaks zeigt, entspricht bei Zusatz von DTT einem einzigen deutlichen Peak. Die Isoformen MT-1 und MT-2 weisen demnach große Variationen an unterschiedlichen partiellen Oxidationszuständen, Metallbeladungen und damit Ladungen auf. Der Zink und Blei enthaltende Peak bei RT=60 min entspricht dem im Überschuß zugegebenen DTT. Bei dem Signal bei ca. RT=49,5 min handelt es sich vermutlich um eine niedermolekulare, unspezifisch metallbindende Verbindung - wie z.B. Citrat -, die ebenfalls Zink und Blei bindet (siehe auch **Abb. 12-5**).

Mit Zusatz des Reduktionsmittels treten die vorher festgestellten Unterschiede zwischen AD- und Kontrollproben nicht mehr deutlich hervor. Dies weist darauf hin, daß in AD- und Kontrollproben ein ähnlicher Gehalt an MT vorhanden ist, jedoch die Anteile an oxidierten MT variieren.

Um diese Feststellungen näher quantifizieren und eine statistische Aussage treffen zu können, wurden die Peakflächen der Kupfer- und Zink-MT-Signale durch Peakentfaltung (siehe Abschnitt 12.2.2) abgeschätzt und die erhaltenen Werte mittels des Mann-Whitney U-Tests auf statistisch signifikante Unterschiede geprüft. Es muß darauf hingewiesen werden, daß die Abschätzungen der Peakflächen besonders bei den MT-1/-2-Peaks ohne Zusatz von DTT durch die breiten und schlecht aufgetrennten Signale unsicher waren. Sie sollten jedoch als Näherung zum Vergleich der MT-Metall-Peaks von AD- und Kontrollproben ohne und mit Zusatz von DTT verwendet werden. Die Ergebnisse der Auswertung sind in **Tab. 12-10**, **Tab. 12-11** und **Tab. 12-12** aufgeführt.

Tab. 12-10: Peakflächen der Kupfer- und Zink-Signale von MT-3 und MT-1/-2 der AD- und Kontrollproben (temporale Region), bezogen auf die entsprechenden SOD-Peakflächen, jeweils ohne und mit Zusatz von DTT (8 AD- und 3 Kontrollproben)

		MT-3 Peakflächen bezogen auf SOD ^a				MT-1/-2 Peakflächen bezogen auf SOD ^a			
		Kupfer	MW U- Test ^b	Zink	MW U- Test ^b	Kupfer	MW U- Test ^b	Zink	MW U- Test ^b
ohne	AD	1,74±0,80	p<0,05	0,79±0,18	p<0,05	1,09±0,60	p<0,05	0,41±0,18	p<0,05
	Kon	3,28±0,44		1,46±0,12		2,16±0,70		0,99±0,19	
mit	AD	2,68±1,47	p>0,05	2,19±0,47	p>0,05	2,64±0,68	p>0,05	2,49±0,68	p>0,05
	Kon	4,75±1,12		2,95±0,50		3,85±0,78		3,26±0,91	

^a Die Kupfer-Peakflächen der MT sind auf die Kupfer-SOD-Peakfläche der selben Probe bezogen (jeweils ohne oder mit DTT), die Zink-Peakflächen der MT auf die Zink-SOD-Peakfläche der selben Probe (jeweils ohne oder mit DTT). Anschließend wurde der Mittelwert für die einzelnen Gruppen gebildet.

^b Mann-Whitney U-Test auf Signifikanz der Unterschiede zwischen AD- und Kontrollproben

Tab. 12-10 enthält die für AD- und Kontrollproben - jeweils ohne und mit Zusatz von DTT - gemittelten Kupfer- und Zink-Peakflächen. Diese waren auf die entsprechenden Kupfer- bzw. Zink-SOD-Signalfächen jeweils der selben Probe bezogen. Der Vergleich zeigt, daß die Kupfer- und Zinkwerte von MT-3 und MT-1/-2 ohne Zusatz von DTT für die

Kontrollproben etwa doppelt so hoch sind wie für die AD-Proben. Die statistische Auswertung ergab dabei für alle Werte ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

Mit Zusatz von DTT sind zwar ebenfalls noch Unterschiede vorhanden. Diese sind jedoch geringer und nicht mehr statistisch signifikant, können demnach auch zufällig zustande gekommen sein. Dies entspricht der in **Abb. 12-5** festgestellten Tendenz zu niedrigeren MT-Metall-Signalen bei den AD-Proben ohne DTT, die in **Abb. 12-7** bei den Proben mit DTT weniger ausgeprägt auftrat. Damit wird die Annahme bestätigt, daß die MT-Konzentration in den AD-Proben nicht grundsätzlich kleiner ist als in den Kontrollproben, sondern daß durch Oxidation die Metallbeladung der MT verändert wurde.

Tab. 12-11: Verhältnis ohne und mit Zusatz von DTT der Peakflächen der Kupfer- und Zink-Signale von MT-3 und MT-1/-2 der AD- und Kontrollproben (temporale Region) (8 AD- und 3 Kontrollproben)

		MT-3		MT-1/-2	
		ohne/mit DTT ^a	MW U-Test ^b	ohne/mit DTT ^a	MW U-Test ^b
AD	Kupfer	0,86±0,04	$p > 0,05$	0,53±0,21	$p < 0,05$
	Zink	0,33±0,06	$p < 0,001$	0,14±0,05	$p < 0,01$
Kon	Kupfer	0,95±0,06	$p > 0,05$	0,75±0,08	$p > 0,05$
	Zink	0,43±0,04	$p < 0,05$	0,27±0,05	$p < 0,05$

^a Die Kupfer- bzw. Zink-Peakflächen ohne DTT wurden auf die entsprechenden Kupfer- bzw. Zink-Peakflächen der selben Probe mit Zusatz von DTT bezogen. Anschließend wurde der Mittelwert für die AD- bzw. Kontrollgruppe gebildet.

^b Mann-Whitney U-Test auf Signifikanz der Unterschiede zwischen den Peakflächen der Proben ohne und mit Zusatz von DTT

In **Tab. 12-11** werden die MT-Peakflächen ohne und mit Zusatz von DTT miteinander verglichen. Dabei wurden die Kupfer- bzw. Zink-Signalfächen ohne DTT direkt auf die entsprechenden Signalfächen der selben Probe mit Zusatz von DTT bezogen und für AD- und Kontrollproben getrennt gemittelt. Deshalb war in diesem Fall ein Bezug auf die SOD-Signalfächen nicht notwendig. Der Einfluß der DTT-Behandlung der Proben macht sich beim Zink viel stärker bemerkbar als beim Kupfer, sowohl bei den Kontrollproben als auch bei den AD-Proben. Letztere weisen dabei die größeren Unterschiede, mit statistisch höherer Signifikanz auf.

Dies bedeutet, daß in den Cytosolen der AD-Proben ein größerer Anteil an oxidierten MT vorhanden ist als in den Kontrollproben. Sie können deshalb bei DTT-Zugabe nach Reduktion der Bindungsstellen mehr zusätzliche Metalle binden.

Diese Feststellung wird durch die Betrachtung der Kupfer/Zink-Verhältnisse bestätigt. Es wurden die Kupfer/Zink-Verhältnisse der Metallothioneine in den einzelnen Proben berechnet und für die verschiedenen Gruppen - AD- und Kontrollproben, jeweils ohne und mit Zusatz von DTT - gemittelt. Sie sind in **Tab. 12-12** aufgeführt. Diese Verhältnisse weisen zwischen AD- und Kontrollproben keine signifikanten Unterschiede auf. Das Signifikanzniveau lag in allen Fällen bei $p > 0,05$. Bei der Betrachtung der Kupfer/Zink-Verhältnisse ohne und mit Zusatz von DTT treten jedoch Unterschiede auf, die bei den AD-Proben größer sind und statistische Signifikanz erreichen ($p < 0,01$). Dabei nehmen mit Zugabe von DTT die Verhältnisse - durch Anstieg der Zink-Signale - ab.

Tab. 12-12: Kupfer-zu-Zink-Verhältnisse der Peakflächen von MT-3 und MT-1/-2 von AD- und Kontrollproben (temporale Region), jeweils ohne und mit Zusatz von DTT (8 AD- und 3 Kontrollproben)

			MT-3		MT-1/-2	
			Kupfer/Zink ^a	MW U-Test ^b	Kupfer/Zink ^a	MW U-Test ^b
AD	ohne DTT		3,9 ± 1,7	p<0,01	5,8 ± 2,6	p<0,01
	mit DTT		1,4 ± 0,5		1,3 ± 0,3	
Kon	ohne DTT		4,1 ± 0,5	p<0,05	4,0 ± 0,9	p<0,05
	mit DTT		1,9 ± 0,4		1,4 ± 0,2	

^a Die Kupfer-Peakflächen wurden auf die entsprechenden Zink-Peakflächen der selben Probe ohne bzw. mit Zusatz von DTT bezogen. Anschließend wurde der Mittelwert für die einzelnen Gruppen gebildet.

^b Mann-Whitney U-Test auf Signifikanz der Unterschiede der Kupfer-zu-Zink-Verhältnisse zwischen den Proben ohne und mit Zusatz von DTT.

Die Daten scheinen auch zu bestätigen, daß die Isoformen MT-1 und MT-2 leichter oxidiert werden als MT-3¹⁶⁴. Die Unterschiede der Peakflächen der MT-3-Signale ohne und mit DTT sind geringer als die der MT-1/-2-Signale. Obwohl bekannt ist, daß die zinkbindenden Stellen in MT labiler sind¹⁴⁹ als die kupferbindenden Stellen, kann dies nicht direkt aus dieser Untersuchung abgeleitet werden, da bei Zugabe des Reduktionsmittels nicht sichergestellt ist, ob die MT Metalle in dem vor der Oxidation bestehenden Verhältnis aufnehmen. Das Metallverhältnis mit DTT ist von der Verfügbarkeit dieser Metalle im Cytosol abhängig.

Es muß die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß die beobachtete Oxidation der MT trotz aller Vorsichtsmaßnahmen durch die Probenaufarbeitung entstanden oder verstärkt worden sein kann. Trotzdem bleibt auch in diesem Fall ein Unterschied zwischen AD- und Kontrollproben bestehen, der statistisch signifikant ist. Das bedeutet, daß sich die AD-Gehirne auf jeden Fall von den Kontrollen unterscheiden. Es müssen damit zumindest Faktoren in den AD-Gehirnen existieren, welche eine verstärkte Oxidation in den AD-Proben bewirken. Dabei kann es sich z.B. um geschwächte antioxidative Schutzmechanismen handeln.

In den Silber-Profilen (**Abb. 12-7**) sind die geringsten Unterschiede zwischen den Proben ohne und mit Zusatz von DTT zu bemerken. Die Silber-MT-Peaks der beiden AD-Proben, welche auch ohne DTT einen hohen Silber-MT-Gehalt aufwiesen, nahmen mit DTT zusammen mit denen der Kontrollproben zu. Die MT-Signale der anderen AD-Proben waren weiterhin sehr niedrig. Es kann anhand der vorliegenden Daten keine Aussage getroffen werden, ob es sich um individuelle Unterschiede handelt oder ob ein Unterschied im Silbergehalt zwischen AD- und Kontrollproben eine bestimmte Rolle spielt. Dies muß anhand weiterer Proben untersucht werden.

Die beschriebenen Unterschiede wurden in verschiedener Ausprägung bei allen untersuchten Regionen (mit Ausnahme des Thalamus und des Kleinhirns - siehe Abschnitt 12.3) gefunden. Insgesamt läßt sich damit die Aussage treffen, daß

- ein geringfügig niedrigerer MT-Gehalt in AD-Gehirnen über den Vergleich der einzelnen MT-Metall-Signale gefunden wurde, was den Angaben in der Literatur entspricht⁷⁷
- ein bedeutenderer Unterschied im Anteil an oxidierten MT im Cytosol der AD-Proben im Vergleich zu den Kontrollproben auftritt.

Dies könnte möglicherweise auch die Kontroverse in der Literatur über eine Herunterregulierung des MT-3 bei AD erklären. Die Untersuchungen wurden mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt. In vielen Fällen wurde nur die MT-3-mRNA betrachtet, welche nicht notwendigerweise mit dem MT-3-Proteingehalt genau korrelieren muß. Es ist möglich, daß bei einigen Nachweisen des MT-3-Proteins - z.B. über Cadmiumsättigungsverfahren⁸¹ - das oxidierte MT-3 nicht detektiert wurde. Da die Struktur von MT-3 und ihre Aufrechterhaltung durch die gebundenen Metalle für die inhibitorische Funktion des MT-3 als ausschlaggebender Faktor betrachtet wird⁸², ist z.B. anzunehmen, daß das partiell oxidierte MT-3 keine biologische Funktion aufweist und über den Bioassay¹⁰ nicht detektiert werden kann. Dies gilt auch für die immunochemische Detektion, bei der möglicherweise die Antikörper nicht mit dem oxidierten MT-3 reagieren, wenn sich die räumliche Struktur verändert hat¹⁶⁷. Dies würde einen bei AD-Proben besonders niedrigen gefundenen MT-3-Gehalt erklären, der für das Protein an sich angenommen wurde, sich aber nur auf das funktionelle MT-3 (mit gebundenen Metallen) beziehen würde. Der Bezug auf den Proteingehalt könnte in anderen Fällen⁸¹ einen Unterschied von AD zu Kontrollproben verdeckt haben. Außerdem wurde auch in der Literatur mehrfach das Problem des Nachweises statistischer Signifikanz wegen großer individueller Probenvariationen angesprochen^{81, 77}.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung weist verstärkt auf bei AD auftretende oxidative Prozesse hin, welche ebenfalls in der Literatur diskutiert werden^{27, 29, 30, 32}. Es kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Oxidation Ursache oder Folgeerscheinung der AD-Erkrankung ist.

Die Oxidation der MT bewirkt eine Freisetzung von Kupfer und Zink. Zink kann u.a. die Aggregation des Amyloid β -Peptids auslösen¹⁸. Kupfer wiederum verstärkt die Bildung von freien Radikalen, welche eine weitere Oxidation der MT bewirken können. Es ist möglich, daß dieser Prozeß, einmal in Gang gebracht, sich immer weiter verstärkt und dadurch die Schädigungen der Nervenzellen bei AD verursacht oder zumindest beschleunigt. Ob freie Radikale - z.B. durch Entzündungsprozesse gebildet - und eine Funktion der MT als Radikalfänger oder eine Störung der Metallhomöostase am Anfang der Kette stehen, ist nicht zu sagen. Die Freisetzung der Metalle könnte auch durch eine Erniedrigung des pH-Wertes in der Zelle ausgelöst werden, wie er durch das Platzen von Lysosomen hervorgerufen werden kann. In AD-Gehirnen wurde ein niedrigerer pH-Wert²⁰ sowie eine Ansammlung von lysosomalen Hydrolasen in den senilen Plaques¹⁸⁵ gefunden. MT reagieren empfindlich auf saure pH-Werte, um so stärker, wenn schon einige Metalle freigesetzt sind⁵¹. Die am schwächsten gebundenen Metalle (Zink) werden zuerst freigesetzt.

Durch die Oxidation und Bildung von Disulfid-Brücken unter Freisetzung der Metalle wird möglicherweise auch die Struktur der MT entscheidend verändert. Da diese bei MT-3 essentiell für die inhibitorische Wirkung zu sein scheint⁸², würde MT-3 durch die oxidativen Prozesse bei AD diese Funktion verlieren. Dies könnte die Regulierung des Nervenwachstums beeinträchtigen und damit zur Degenerierung der Nervenzellen bei AD beitragen¹¹.

Wahrscheinlich ist, daß zahlreiche verschiedene Prozesse an der Pathologie von AD beteiligt sind und auch die MT dabei mehrere Funktionen wahrnehmen. Das Auftreten von oxidativen Prozessen und eine mögliche Rolle von freien Metallen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Damit wurde ebenfalls deutlich, daß die Speziationsanalyse im Vergleich zur Betrachtung der Gesamtelementgehalte tiefere Einblicke in die Vorgänge in einer Zelle erlaubt.

12.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß deutliche, vermutlich durch die unterschiedliche Gewebebeschaffenheit (Lipidgehalt) bedingte Unterschiede im Elementgehalt der weißen und grauen Masse der Gehirnproben gefunden wurden.

Bei der Betrachtung der Elementprofile der verschiedenen Gehirnregionen der einzelnen Patienten fielen erhöhte MT-3-Metall-Peaks im Kleinhirn auf. Ein Zusammenhang zur AD-Pathologie konnte dabei bei den untersuchten Proben nicht festgestellt werden.

Der auf die Trockenmasse bezogene Proteingehalt war bei den Kontrollproben statistisch signifikant höher als bei den AD-Proben. Dies zeigt, daß der Vergleich von Daten mit unterschiedlichen Bezugsgrößen problembehaftet ist. In dieser Arbeit wurden die gemessenen Elementgehalte auf die Trockenmasse bezogen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede der untersuchten Elementgehalte - Zink, Selen, Eisen, Kupfer und Cadmium - zwischen AD- und Kontrollproben festgestellt werden. Dies entspricht den Literaturangaben insofern, daß bisher kein eindeutiger, einheitlicher Trend zu Unterschieden bei AD-Proben festgestellt wurde.

Auch bei der einzelnen Betrachtung von eisenbindenden Proteinen über die Elementprofile der chromatographischen Trennung konnten keine Unterschiede zwischen AD- und Kontrollproben festgestellt werden. Die Iod-Profile wiesen Unterschiede auf, welche jedoch anhand weiterer, klar definierter Proben überprüft werden müssen.

Die Elementprofile der an die MT gebundenen Metalle waren für den Vergleich von AD- und Kontrollproben besonders interessant. Die SOD-Metall-Peaks konnten dabei zum Vergleich der MT-Signale als Referenz benutzt werden, da keine Unterschiede zwischen Kontroll- und AD-Gehirnen bestanden.

Das festgestellte Auftreten von niedrigeren MT-Signalen schien mit der in der Literatur beschriebenen Herunterregulierung von MT-3 bei AD übereinzustimmen. Durch Vergleich der Cytosolproben mit und ohne Zusatz von DTT zeigte sich jedoch, daß ein bedeutenderer Unterschied im höheren Anteil an oxidierten MT im Cytosol der AD-Proben im Vergleich zu den Kontrollproben bestand. Damit konnte das Auftreten oxidativer Prozesse bei AD bestätigt und eine mögliche Rolle der MT bei den pathologischen Prozessen gezeigt werden.

13 Zusammenfassung und Ausblick

Die Betrachtung einzelner Spezies von Elementen wird in zunehmendem Maße als essentiell für das Verständnis von Vorgängen wie Mobilität, Bioverfügbarkeit, Speicherung oder Toxizität dieser Elemente und damit deren Bedeutung in Umwelt und Gesundheit angesehen. Besonders zur Aufklärung der Rolle von Spurenelementen in komplexen physiologischen oder pathologischen Stoffwechselprozessen ist die Kenntnis des Gesamtgehaltes eines Elementes nicht ausreichend.

In der vorliegenden Arbeit wurden an unterschiedliche Proteine im Cytosol von menschlichen Geweben gebundene Spurenelemente untersucht. Die physiologische Funktion der Elemente im Organismus hängt entscheidend davon ab, an welche Proteine sie gebunden sind: Transportproteine, Speicherproteine oder Metalloenzyme, welche an zahlreichen Stoffwechselreaktionen beteiligt sind. Während pathologischer Vorgänge kann bei gleichbleibender Gesamtkonzentration eines Elementes eine Umverteilung zwischen verschiedenen Proteinen stattfinden, die auf die ablaufenden Prozesse schließen läßt.

Im Vordergrund der Untersuchungen standen dabei die Metallothioneine, niedermolekulare cysteinreiche Proteine mit hoher Affinität für Metalle wie Kupfer, Zink und Cadmium. Neben ihren Eigenschaften als Radikalfänger werden sie als bedeutend für die Homöostase der Spurenelemente Zink und Kupfer und - besonders in Zusammenhang mit Zink - als an zahlreichen vitalen Stoffwechselprozessen beteiligt angesehen⁹. Die Isoform MT-3 wird vor allem im Gehirn gefunden und seit ihrer Entdeckung in Zusammenhang mit Morbus Alzheimer diskutiert¹⁰.

Für die Speziationsanalysen wurden Verbundverfahren eingesetzt: Trennung der Biomoleküle mittels chromatographischer bzw. kapillarelektrophoretischer Verfahren und on-line-Detektion der Elemente im Eluat mittels einer gekoppelten ICP-MS bzw. ICP-AES für die AEC. Hauptsächlich wurde eine SEC-Säule (Superdex 75PG, Pharmacia) eingesetzt, die einen breiten Molmassenbereich umfaßt. Die für die Untersuchung von Cytosolproben optimierte SEC-ICP-MS-Kopplung eignete sich wegen ihrer Robustheit und Automatisierbarkeit besonders für die Untersuchung großer Probenkollektive. Ein besonderer Vorteil dieser gewählten Säule war die Abtrennung der Isoform MT-3 von den anderen MT-Isoformen. Für die Untersuchung von Gehirnproben war die einzelne Betrachtung dieser gehirnspezifischen Isoform eine wichtige Voraussetzung. Durch den hohen Lipidanteil von Gehirnproben besonders bei großen Probenserien entstehende Beeinträchtigungen des Säulenmaterials konnten durch Vorbehandlung mit einem Serumklärer und Einsatz eines Vorsäulenfilters umgangen werden, der nach einigen Läufen jeweils einfach gewechselt werden konnte.

Die Bedingungen der Extraktion der Zellflüssigkeit aus Gewebeproben wurden untersucht, um das für die Analyse mittels chromatographischer Trennung geeignetste Probenmaterial auszumachen und hinsichtlich der enthaltenen Zellorganellen zu charakterisieren. Das mittels einer Ultrazentrifugation bei 100000 g extrahierte Cytosol erwies sich als am besten geeignet. Die Untersuchung der Metalloproteine mit der verwendeten Methode ist auf im Cytosol lösliche Proteine beschränkt und zeigt damit nur einen Ausschnitt der gesamten Zelle. Durch die einheitliche Probenvorbereitung ist jedoch die Vergleichbarkeit verschiedener Proben gewährleistet.

Mit der durchgeführten Speziationsanalyse der proteingebundenen Elemente wurden Elementprofile von bis zu 36 detektierten Isotopen erhalten. Jedes Elementprofil zeigt dabei verschiedene Proteine an. Auch wenn Proteine chromatographisch nicht vollständig aufgetrennt werden, können sie über die Elementprofile doch getrennt betrachtet werden, wenn sie unterschiedliche Elemente gebunden haben.

Zur Beurteilung der Rolle der Spurenelemente in physiologischen Prozessen müssen zunächst die Signale in den Elementprofilen einzelnen Proteinen zugeordnet werden. Dies wurde in dieser Arbeit durch Nutzung charakteristischer Eigenschaften der Proteine und über spezifische Testmethoden wie Enzymaktivitäten oder immunochemische Reaktionen durchgeführt. Damit konnten die eisenhaltigen Proteine Ferritin, Transferrin, Hämoglobin und Myoglobin nachgewiesen werden sowie die Antioxidantien Superoxid Dismutase (Kupfer/Zink, Mangan) und Glutathion Peroxidase (Selen). Des weiteren wurden unter anderem am Schilddrüsenstoffwechsel beteiligte iodhaltige Proteine zugeordnet. Mittels MALDI-TOF-MS und Western Blot mit spezifischen Antikörpern konnte schließlich die Identität des für diese Arbeit besonders interessanten MT-3-Peaks auf der verwendeten Superdex 75PG-Säule bestätigt werden.

Das Trennprinzip der SEC bedingt inhärent eine Beschränkung der Auflösung. Um eine Auftrennung aller drei MT-Isoformen zu erhalten, wurden Trennungen mit anderen Trennmechanismen durchgeführt. Die Isoformen MT-1, MT-2 und MT-3 können aufgrund von Ladungsunterschieden mittels AEC getrennt werden³⁷. Der Nachteil besteht in der hohen Salzfracht des Elutionsgradienten, welche mit der ICP-MS-Detektion inkompatibel ist. Deswegen wurde in diesem Fall eine Kopplung mit der ICP-AES ausgeführt, was eine Einbuße an Empfindlichkeit bedeutete. Im Gegenzug wurden jedoch Informationen über die Metallgehalte der einzelnen Isoformen MT-1 und MT-2 erhalten.

Die Kapillarzonenoelektrophorese, welche die Vorteile einer sehr hohen Auflösung und eines äußerst geringen Probenbedarfs aufweist, wurde ebenfalls zu Auftrennung der MT-Isoformen in Cytosolproben eingesetzt. Es handelte sich dabei um eine Kooperation mit dem GKSS-Forschungszentrum in Geesthacht, wo kürzlich die Entwicklung einer robusten Kopplung von CZE und ICP-SFMS gelungen war¹⁵². Diese Methode sollte zur Anwendung auf biologische Proben, den Gehirncytosolproben, optimiert werden. Dabei zeigte sich, daß die Trennung komplexer biologischer Proben verschiedene Probleme aufwirft, die bei der Trennung von Einzelsubstanzen nicht auftreten. So war die Vergleichbarkeit der Elektropherogramme und damit die Zuordnung der Signale durch Variationen der Migrationszeiten bei der Trennung der Cytosolproben erheblich erschwert. Diese Variationen konnten über die Migrationszeiten von mitlaufenden Markersubstanzen durch eine Zeitnormierung rechnerisch ausgeglichen werden. Die getrennten Signale von MT-1, MT-2 und MT-3 wurden zugeordnet. Damit erwies sich die CZE-ICP-SFMS-Kopplung für die Trennung und elementspezifische Detektion selbst komplexer Proben aus kleinsten Probevolumina geeignet.

Es zeigte sich auch, daß für die Identifizierung von Signalen zu verwendende Referenzsubstanzen auf ihre Eignung für diesen Zweck geprüft werden müssen. Im vorliegenden Fall konnten Unterschiede in der Migrationszeit von rekombinantem humanen MT-3 gegenüber dem MT-3 der humanen Proben festgestellt werden, die möglicherweise auf die fehlende ko-translationale Acetylierung und damit auf Ladungsunterschiede zurückzuführen waren. Speziesunterschiede von verschiedenen Säugetieren hingegen wurden nicht festgestellt.

Die Verwendung von hintereinandergeschalteten unterschiedlichen Trennmethoden - SEC, AEC oder CZE - erlaubte bei den durchgeführten Versuchen zum einen eine Matrixabreicherung für die gegenüber Matrixeffekten empfindliche CZE. Zum anderen

konnten jeweils die bei einer Trennmethode gesammelten Fraktionen mit einem anderen, unterschiedlichen Trennmechanismus auf ihre Reinheit überprüft werden bzw. die Probenbestandteile weiter aufgetrennt werden. Außerdem wurden die „orthogonalen“ Methoden zur Bestätigung der Zuordnung von Signalen genutzt.

Es zeigte sich also, daß jedes einzelne Trennverfahren unterschiedliche Stärken aufweist, die gegebenenfalls zusammen eingesetzt werden können. Ansonsten kann je nach der Zielsetzung der durchzuführenden Untersuchungen die geeignetste Trennmethode ausgewählt werden.

Für die Untersuchung von Metalloproteinen in humanen Probenkollektiven wurde die SEC-ICP-MS-Kopplung verwendet. Zunächst sollten unterschiedliche Organe eines Patienten untersucht werden. Der menschliche Organismus umfaßt eine Vielzahl verschiedener Zellarten, die auf unterschiedliche Aufgaben spezialisiert sind. Es konnte deshalb davon ausgegangen werden, daß unterschiedliche Organe mit unterschiedlichen Zelltypen auch andere Metalloprotein-Zusammensetzungen aufweisen. Diese Hypothese wurde durch die Untersuchung der Elementprofile in den einzelnen Organen bestätigt. Unter anderem konnten bei den Metallothioneinen unterschiedliche Signalthöhen und Unterschiede in den einzelnen gebundenen Metallen festgestellt werden: Das höchste Cadmium-MT-Signal wurde in der Niere, das höchste Zink-MT-Signal in der Leber gefunden.

Im nächsten Schritt wurde die Verteilung der Metalloproteine in einem bestimmten Organ - der Leber - von verschiedenen Patienten untersucht. In den aufgenommenen Elementprofilen waren deutliche Unterschiede festzustellen, die auf unterschiedliche pathologische Prozesse in den untersuchten Lebern zurückgeführt wurden. Auch bei dieser Untersuchung traten deutliche Unterschiede in den Metallbeladungsverhältnissen der MT hervor. Das markanteste Beispiel war eine Leber mit primärer biliärer Zirrhose, einer Erkrankung, welche mit verminderter Kupferausscheidung verbunden ist. Das Kupfer sammelt sich in der Leber und wird größtenteils von MT gebunden, wie an dem übermäßig erhöhten Kupfer-MT-Signal zu erkennen war.

Da sich demnach die Auswirkungen pathologischer Zustände auf die Element- und Proteinverteilung in einem Organ mit der durchgeführten Speziationsanalyse nachweisen ließen, sollte ein größeres Probenkollektiv untersucht werden. Es handelte sich dabei um post-mortem Gehirnproben einer Gruppe von Patienten mit Morbus Alzheimer und einer Kontrollgruppe, bei der kein AD diagnostiziert worden war.

Bei diesen Untersuchungen lag das Hauptaugenmerk auf den MT und speziell MT-3, weshalb im Vorfeld einige speziellere Untersuchungen zu den MT durchgeführt wurden.

Das Elutionsverhalten der MT auf der verwendeten SEC-Säule wurde durch geringfügige Ladungswechselwirkungen der Proteine mit dem Säulenmaterial erklärt. Diese bewirkten zum einen die deutliche, für eine reine SEC ungewöhnliche Abtrennung der Isoform MT-3 von den anderen Isoformen. Außerdem waren die Retentionszeiten der Kupfer- und Zink-Signale des MT-1/-2-Peaks in Abhängigkeit der Metallverhältnisse von MT-1 zu MT-2 durch eine Antrennung dieser Isoformen verschoben.

MT sind besonders oxidationsempfindlich. Es konnte gezeigt werden, daß oxidierte MT extrahierbar und im gewonnenen Cytosol vorhanden sind. Dabei handelt es sich um eine Mischung von in unterschiedlichem Grad oxidierten MT. Durch die Bildung von Disulfid-Brücken bei der Oxidation verlieren die Sulfhydryl-Gruppen ihre metallkomplexierenden Eigenschaften. Die unterschiedlich partiell oxidierten MT haben deshalb eine unterschiedliche Metallbeladung, wodurch sich auch Ladung und Konformation ändern. Dadurch haben sie leicht verschobene Retentionszeiten, was eine Peakverbreiterung der

MT-Signale bewirkt. Durch Zusatz eines Reduktionsmittels werden die Disulfid-Brücken wieder aufgebrochen, Metalle erneut gebunden und die Retentionszeiten einheitlicher, mit schärferen Signalen.

Um die in der Vergangenheit in der Literatur unterschiedlichen Angaben zur Metallbeladung von MT-3 zu klären, wurde in einem Projekt am Center for Biochemical and Biophysical Sciences and Medicine (Prof. B. L. Vallee) an der Harvard Medical School die Metallzusammensetzung von nativem MT-3 aus Schweinegehirn untersucht. Zur Bestimmung der Metallbeladungsverhältnisse im MT-3 mußte das Protein zuerst isoliert werden. Wie auch Untersuchungen mittels SDS-PAGE und MALDI-TOF-MS in den Fraktionen eines SEC-Laufes zeigten, waren wie zu erwarten nach nur einem Trennschritt noch zahlreiche weitere Proteine enthalten. Deshalb wurden zur Aufreinigung mehrere chromatographische Trennschritte hintereinandergeschaltet. Die durchgeführten Untersuchungen bestätigten, daß in den Proben mehrere MT-3-Formen vorhanden waren, die mit keiner der verwendeten Methoden getrennt werden konnten. Es wurde angenommen, daß es sich dabei um unterschiedliche Metallbeladungsverhältnisse, verursacht durch unterschiedliche partielle Oxidation der MT-3 handelte. Metallbestimmungen konnten deswegen nur einen Mittelwert der verschiedenen Metallbeladungen liefern. Dies und die Annahme, daß die Metallzusammensetzungen in individuellen Gehirnproben vom physiologischen Zustand und dem Spurenelementstatus abhängen, würde die abweichenden Angaben in der Literatur erklären.

Da somit keine feststehende, bestimmte native Metallbeladung existiert, sondern eine Mischung von variierenden Metallzusammensetzungen, die vor allem auch vom Oxidationszustand der MT abhängt, ist die Betrachtung eines größeren Probenkollektives aussagekräftiger als die beispielhafte Bestimmung der MT-Metallgehalte in einem Gewebe.

Bei der Untersuchung von Gehirnproben wurde ein signifikanter Unterschied in den Elementgehalten (Zink, Selen, Eisen) von weißer und grauer Masse gefunden. Die Elementgehalte waren in der weißen Masse niedriger, was auf den hohen Lipidanteil zurückgeführt wurde.

Beim Vergleich der Elementprofile von AD- und Kontrollproben fiel auf, daß die Kupfer- und Zink-Signale der Superoxid Dismutase bei allen betrachteten Proben eine vergleichbare Intensität hatten. Auch der Vergleich der Peakflächen sowie der in den Cytosolproben gemessenen SOD-Aktivitäten zeigte, daß kein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Proben bestand. Deshalb wurde das SOD-Signal als Bezugspunkt für die Vergleiche der MT-Signale in den verschiedenen Cytosolen verwendet.

Es zeigte sich, daß die MT-Kupfer- und -Zink-Signale in den Elementprofilen der chromatographischen Trennung der AD-Gehirncytole - mit den SOD-Peaks als Referenz - niedriger waren als bei den Kontrollproben. Dies schien mit der in der Literatur beschriebenen Herunterregulierung der MT-Expression bei AD übereinzustimmen.

Durch Zusatz eines Reduktionsmittels (DTT) zu den Proben wurden jedoch bei den AD-Proben wie bei den Kontrollen erhöhte MT-Metall-Peaks festgestellt. Dies zeigte, daß in den Cytosolen beider Gruppen oxidierte MT vorlagen, deren Oxidation durch Zugabe eines Reduktionsmittels wieder rückgängig gemacht werden konnte. Nach Reduktion der Disulfid-Brücken konnten sie wieder verstärkt Metalle komplexieren.

Mit Zusatz von DTT war die Differenz der MT-Signale zwischen AD- und Kontrollproben weniger ausgeprägt. Das bedeutet, daß ein Unterschied des Gesamtgehaltes an MT bei AD und Kontrollgehirnen nicht die hauptsächliche Differenz darstellt. Bei den AD-Gehirnen wurde durch die durchgeführten Versuche ein erhöhter Anteil an oxidierten MT gegenüber

den Kontrollen festgestellt. Dies deutet darauf hin, daß bei Morbus Alzheimer vermehrt oxidative Prozesse im Gehirn stattfinden. Oxidativer Streß bei AD, besonders im Zusammenhang mit Metallen, wird in der Literatur viel diskutiert²⁰. Es kann hier keine Aussage darüber getroffen werden, ob die festgestellte Oxidation der MT und die daraus resultierende Metallabgabe Ursache oder Wirkung der Erkrankung ist. Der Zusammenhang zwischen pathologischen Vorgängen der Alzheimer-Erkrankung und oxidativen Prozessen ist damit jedoch bestätigt. Die vermutete Rolle von MT-3 bei AD kann auch in diesem Zusammenhang stehen.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die Untersuchung der Verteilung von Spurenelementen zwischen unterschiedlichen Proteinen tatsächlich Einblicke in die während einer Erkrankung ablaufenden Prozesse geben kann. Die Speziationsanalyse mit empfindlicher Elementdetektion ist dafür ein geeignetes Instrument.

In zukünftigen Untersuchungen sollten die Speziationsverfahren mehr im Hinblick auf die Analyse von Elementen *in vivo* ausgerichtet werden und könnten so einen wichtigen Beitrag auch zu diagnostischen Zwecken leisten. Der erste Schritt dazu ist die Ausrichtung auf kleine Probenvolumina, wie sie mit der CZE-ICP-MS-Kopplung schon verwendet werden konnten. Damit wären Untersuchungen von geringen Probemengen möglich, wie sie bei Nadelbiopsien anfallen. So könnte die Speziationsanalyse nicht nur an post-mortem Proben erfolgen, sondern direkt als klinisch-diagnostisches Hilfsmittel eingesetzt werden, in diesem Fall allerdings weniger in bezug auf Gehirnproben.

14 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

A β	Amyloid β
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
ACN	Acetonitril
AD	Morbus Alzheimer (Alzheimer's Disease)
AEC	Anionenaustauscherchromatographie (Anion Exchange Chromatography)
cps	Impulse pro Sekunde (counts per second)
CZE	Kapillarzonenelektrophorese (Capillary Zone Electrophoresis)
DBVK	Drehbare Bestrahlungsvorrichtung im Kern
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic Acid)
DTT	Dithiothreitol
EC	Enzyme Commission number system
EDL	elektrodenlose Entladungslampe (Electrodeless Discharge Lamp)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Ethylenediaminetetraacetic acid)
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EOF	Elektroosmotischer Fluß
F.E.	Flächeneinheiten
GIF	Growth Inhibitory Factor
GPx	Glutathion Peroxidase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion, oxidiert
HKL	Hohlkathodenlampe
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
ICP-AES	Atomemissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma als Anregungsquelle (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry)
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma als Anregungsquelle (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry)
INAA	Instrumentelle Neutronenaktivierungsanalyse
INT	2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium-chlorid
IUPAC	International Union for Pure and Applied Chemistry
Kon	Kontrollen
MALDI-TOF-MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight - Mass Spectrometry
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger Ribonucleic Acid)
MeOH	Methanol
MT	Metallothionein
MW U-Test	Mann-Whitney U-Test
NADP ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (reduzierte Form)
NMR	kernmagnetische Resonanz (Nuclear Magnetic Resonance)
ODS	Octadecyl Silan

PAGE	P olyacrylamid- G elelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (P hosphate B uffered S aline)
QMS	Q uadrupol- M assenspektrometrie
RIA	R adioimmunoassay
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure (r ibosomal R ibonucleic A cid)
RT	R etentionszeit
SDS	Natriumlauryl/dodecylsulfat (S odium d odecylsulfate)
SEC	Größenausschlußchromatographie (S ize E xclusion C hromatography)
SELDI-TOF-MS	S urface E nhanced L aser D esorption/ I onisation - T ime o f F light - M ass S pectrometry
SF	S ektorfeld
SOD	S uperoxid D ismutase
T ₃	3, 3', 5-Triiod-L-thyronin
T ₄	L-Thyroxin (3, 3', 5, 5'-Tetraiod-L-thyronin)
TBG	T hyroxin b indendes G lobulin
Tf	T ransferrin
TFA	Trifluoressigsäure (T rifluoric A cid)
TMB	3, 3', 5, 5'- T etramethyl b enzidin
Tris	T ris(hydroxymethyl-)aminomethan
TM	T rocken m asse
UV	U ltraviolett
XOD	X anthin O xidase

Probenbeschreibungen

Tab. 14-1: Untersuchte Gehirnproben

Nr.	Alter [Jahre]	Ge- schlecht ^a	Sektion [h post mortem]	Gruppe ^b	Untersuchte Gehirnregionen
63	73	m	>24	AD	frontale, frontobasale, occipitale, parietale, temporale Region, Caudatus, Kleinhirn, Thalamus
64	68	m	5	AD	frontale, frontobasale, occipitale, parietale, temporale Region, Caudatus, Kleinhirn, Thalamus
66	77	m	7	AD	frontale, occipitale, parietale, temporale Region, Caudatus, Kleinhirn, Thalamus
67	67	w	49	AD	frontale, occipitale, parietale, temporale Region, Caudatus, Kleinhirn, Thalamus
68	93	w	76	AD	frontale, frontobasale, occipitale, parietale, temporale Region, Caudatus, Kleinhirn, Thalamus
69	74	m	45,5	AD	frontale, frontobasale, occipitale, parietale, temporale Region, Caudatus, Kleinhirn, Thalamus
98	72	w	<48	AD	frontale, occipitale, parietale Region, Kleinhirn, Pons
104	59	m	11	Kon	frontale, occipitale, parietale, temporale Region, Kleinhirn, Medulla oblongata,
105	81	w	10	Kon	frontale, frontal parasagittale, frontobasale, occipitale, parietale, temporale Region, frontaler Cortex, Hippocampus, Hypothalamus, Kleinhirn, Medulla oblongata
109	89	w	>24	AD	frontale, frontobasale, occipitale, parietale, temporale Region, Kleinhirn, Medulla oblongata, Putamen, Thalamus
110	78	m	>24	AD	frontale, frontobasale, occipitale, parietale, temporale Region, Caudatus, Kleinhirn, Medulla oblongata, Pons, Putamen, Thalamus
133	85	m	25	AD	frontale, occipitale, parietale, temporale Region, Caudatus, Kleinhirn, Thalamus
137	89	m	n.v. ^c	AD	frontale, occipitale, parietale, temporale Region, Caudatus, Kleinhirn, Thalamus
140	87	m	n.v.	Kon	frontale, occipitale, parietale, temporale Region, Caudatus, Kleinhirn, Thalamus
143	61	m	n.v.	Kon	frontale, occipitale, parietale, temporale Region, Caudatus, Kleinhirn, Thalamus
145	85	w	n.v.	Kon	frontale, occipitale, parietale, temporale Region, Caudatus, Kleinhirn, Thalamus

^a w: weiblich, m: männlich; ^b Die Kontrollen stammen von Patienten, bei denen kein Morbus Alzheimer diagnostiziert wurde; ^c n.v.: Angabe nicht vorhanden

Tab. 14-2: Untersuchte Organproben

Nr.	Alter [Jahre]	Ge- schlecht ^a	Sektion [h post mortem]	Erkrankungen	Untersuchte Organe
1	n.v.	n.v. ^b	72	protrahierter septischer Schock bei Endokarditis; ausgedehnte Bronchopneumonie	Gehirn (Gyrus präzentralis), Leber (rechter Leberlappen), Niere, Herzmuskel (linker Ventrikel), Skelettmuskel (M. quadrizeps femoris), Milz, Pankreas (Korpus), Schilddrüse, Lunge (rechter Oberlappen), Dünndarm (Ileum), Dickdarm (Kolon transversum), Knochenmark (rechter Femur), Knochen (Wirbelkörper), Haut
TPN 4 ^c	n.v.	n.v.	ca. 72	septischer Schock bei Peritonitis/Pankreatitis	Leber, Niere, Herzmuskel (linker Ventrikel), Skelettmuskel (M. pectoralis), Gehirn
852	n.v.	n.v.	- ^d	alkohol-toxische Leberzirrhose	Leber
930	n.v.	n.v.	- ^d	primäre biliäre Zirrhose, hepatozelluläres Karzinom	Leber
933	n.v.	n.v.	- ^d	kryptogene Leberzirrhose	Leber
1038	n.v.	n.v.	- ^d	Zystenleber	Leber
8	76	w	86	Myokardinfarkt, cardiogener Schock, Diabetes mellitus, hochgradige Arteriosklerose	Leber, Niere, Herzmuskel
18	90	w	62	Myokardinfarkt, Pneumonie, Arteriosklerose, Lungenarterienembolie	Leber, Niere
19	43	m	48	Leberzirrhose, Coma hepaticum, rezidivierende Lungenarterienembolien	Leber, Niere, Herzmuskel

^a w: weiblich, m: männlich; ^b n.v.: Angabe nicht vorhanden; ^c TPN: total parenterale Ernährung;

^d im Rahmen einer Lebertransplantation entnommen

Ergänzungen zu Kapitel 4: HPLC-ICP-MS-Kopplung

Tab. 14-3: Charakteristika verschiedener Größenausschluß-Säulenmaterialien

	Fractogel EMD BioSEC	Superdex 75PG	Shodex Asahipak GS-520 HQ
Trennbereich [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$]:	5000-1000000	3000-70000	10000-300000
Material:	Metacrylat- Copolymer mit linearen Polymerketten modifiziert	Verbindung von quervernetzter Agarose und Dextran	Vinylalkohol- Polymer (Hartgel)
Durchmesser·Länge [mm]:	16·600	16·600	7,6·300
Partikelgröße [μm]:	20-40	24-44	9
Betriebsdruck [MPa]:	0,0-0,2	0,0-0,2	4
Eigenschaften:	Tentakel- Biochromatographie mechanisch und chemisch stabil, druckstabil bis 2 MPa	stark hydrophil, minimale nichtspezifische Wechselwirkungen; mechanisch stabil, druckstabil bis 0,3 MPa	sehr gleichmäßige Verteilung von Hydroxylgruppen an der Oberfläche, keine anderen polaren Gruppen

Tab. 14-4: Meßparameter der zweiten HPLC-Anlage

Säule:	Superdex 75PG(16·600 mm)
Eluens:	20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-Puffer, pH=7,4 (mit HNO_3 eingestellt)
interne Standardelement-Lösung:	50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Ge, Rh, Ir mit 20% MeOH, 0,33 % HNO_3
Flußrate Eluens:	2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
Flußrate interner Standard:	0,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
Druck:	drucklos, bis 0,2 MPa Druckaufbau durch System
Injektionsvolumen:	500 μL
Spülung der Probenschleife und Nadel:	4 mL (nach jeder Injektion, mit Wasser)
Autosampler-Thermostat:	4 $^{\circ}\text{C}$
UV-Detektion:	280 nm (Iodlampe)

Tab. 14-5: Mit ICP-MS gemessene Elemente, ihre Massen und Ionisierungsenergien ¹⁸⁶

Element	Relative Atommasse	1. Ionisierungs- energie [eV]	2. Ionisierungs- energie [eV]	Bezug auf internes Standardelement
Li	6,941	5,320	75,63	Ge
Mg	24,305	7,642	15,03	Ge
Al	26,982	5,984	18,83	Ge
P	30,974	10,485	19,72	Ge
S	32,066	10,360	23,33	Ge
Cl	35,453	12,966	23,80	Ge

Ca	40,078	6,111	11,87	Ge
Cr	51,996	6,764	16,50	Ge
Mn	54,838	7,435	15,64	Ge
Fe	55,847	7,869	16,18	Ge
Co	58,933	7,876	17,06	Ge
Ni	58,693	7,635	18,17	Ge
Cu	63,546	7,725	20,29	Ge
Zn	65,390	9,393	17,96	Ge
Ge	72,610	7,898	15,93	
As	74,922	9,814	18,63	Ge
Se	78,960	9,751	21,18	Ge
Br	79,904	11,814	21,80	Rh
Rb	85,468	4,177	27,28	Rh
Sr	87,620	5,695	11,03	Rh
Mo	95,940	7,099	16,15	Rh
Rh	102,906	7,460	18,07	
Ag	107,868	7,576	21,48	Rh
Cd	112,411	8,992	16,90	Ir
I	126,905	10,450	19,13	Ir
Cs	132,905	3,894	25,08	Ir
Ba	137,327	5,211	10,00	Ir
Ir	192,220	9,120	17,41	
Hg	200,590	10,440	18,76	Ir
Pb	207,200	7,415	15,03	Ir

Tab. 14-6: Meßparamter der zweiten Quadrupol-ICP-MS

ICP-MS:	ELAN 6000
Zerstäuber:	Cross-Flow mit Scott-Sprühkammer
Fackel:	Quarzglas
Injektorrohr:	Aluminiumoxid
Konen (Sampler, Skimmer):	Nickel
Plasmagas-Fluß:	12 L·min ⁻¹ (Argon)
Hilfsgas-Fluß:	ca. 0,3 L·min ⁻¹ (Argon)
Zerstäubergas-Fluß:	0,8-1,0 L·min ⁻¹ (Argon) (jeweils optimiert)
Plasmaleistung:	1200 W
Sweep-Zahl:	5
Wiederholungen:	1
Verweilzeit pro Masse:	50 ms
Totzeit:	50 ns
Meßzeit pro Scan:	9,54 s
Aufnahmezeit Chromatographie-Lauf:	100 min
Detektor-Modus:	dual (Analog- und Pulsmodus)
Autolinsen-Modus:	ja
Gemessene Isotope:	⁷ Li, ²⁴ Mg, ²⁵ Mg, ²⁷ Al, ³¹ P, ³⁴ S, ³⁵ Cl, ³⁷ Cl, ⁴² Ca, ⁴³ Ca, ⁵⁴ Fe, ⁵⁵ Mn, ⁵⁷ Fe, ⁵⁹ Co, ⁶³ Cu, ⁶⁴ Zn, ⁶⁵ Cu, ⁶⁷ Zn, ⁷² Ge, ⁷⁷ Se, ⁷⁹ Br, ⁸² Se, ⁸⁵ Rb, ⁸⁶ Sr, ⁹² Mo, ⁹⁸ Mo, ¹⁰³ Rh, ¹¹¹ Cd, ¹¹⁴ Cd, ¹²⁷ I, ¹³³ Cs, ¹³⁸ Ba, ¹⁹³ Ir, ²⁰⁰ Hg, ²⁰⁸ Pb

15 Literaturverzeichnis

- 1 P. Brätter, W. Forth, W. Fresenius, H. J. Holtmeier, S. Hoyer, J. D. Kruse-Jarres, H. Liesen, L. Mohn, V. Negretti de Brätter, A. M. Reichlmayr-Lais, G. Sitzer, G. Tölg, *Mineralstoffe und Spurenelemente - Leitfaden für die ärztliche Praxis*, Verlag Bertelsmann Stiftung, Gütersloh, 1992
- 2 W. Mertz, *The Essential Trace Elements*, Science 1981, 213: 1332-1338
- 3 R. Cornelis, *Involvement of Analytical Chemistry in Chemical Speciation of Metals in Clinical Samples*, Annals of Clinical and Laboratory Science 1996, 26 (3): 252-263
- 4 J. Szpunar, *Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques*, The Analyst 2000, 125: 963-988
- 5 A.-N. Richarz, *Speziation von Spurenelementen in menschlichen Körperflüssigkeiten*, Diplomarbeit am Fachbereich 5 Chemie der Technischen Universität Berlin, 1998
- 6 L. M. W. Owen, A. M. Rauscher, S. J. Fairweather-Tait, H. M. Crews, *Use of HPLC with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for trace element speciation studies in biological materials*, Biochemical Society Transactions 1996, 24: 947-952
- 7 D. M. Templeton, F. Ariese, R. Cornelis, L.-G. Danielsson, H. Muntau, H. P. Van Leeuwen, R. Łobiński, *Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000)*, Pure Appl. Chem. 2000, 72 (8): 1453-1470
- 8 P. Schramel, *Anwendung der ICP-MS für die Spurenelementbestimmung in biologischen Materialien*, in: Analytiker Taschenbuch Band 15, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1997, 89-120
- 9 J. H. R. Kägi, *Overview of Metallothionein*, in: J. F. Riordan, B. L. Vallee (Hrsg.), Methods in Enzymology 205, Metallobiochemistry Part B: Metallothionein and Related Molecules, Academic Press, Inc., San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, 1991, 613-626
- 10 Y. Uchida, K. Takio, K. Titani, Y. Ihara, M. Tomonaga, *The Growth Inhibitory Factor That Is Deficient in the Alzheimer's Disease Brain Is a 68 Amino Acid Metallothionein-like Protein*, Neuron 1991, 7: 337-347
- 11 S. Tsuji, H. Kobayashi, Y. Uchida, Y. Ihara, T. Miyatake, *Molecular cloning of human growth inhibitory factor cDNA and its down-regulation in Alzheimer's disease*, The EMBO Journal 1992, 11 (13): 4843-4850
- 12 J. R. Connor, S. L. Menzies, J. R. Burdo, P. J. Boyer, *Iron and Iron Management Proteins in Neurobiology*, Pediatric Neurology 2001, 25 (2): 118-129
- 13 M. Gerlach, D. Ben-Shachar, P. Riederer, M. B. H. Youdim, *Altered Brain Metabolism of Iron as a Cause of Neurodegenerative Diseases?*, Journal of Neurochemistry 1994, 63 (3): 793-807
- 14 J. R. Connor, S. L. Menzies, S. M. St. Martin, E. J. Mufson, *A Histochemical Study of Iron, Transferrin, and Ferritin in Alzheimer's Diseased Brains*, Journal of Neuroscience Research 1992, 31: 75-83

- 15 J. Dobson, *Nanoscale biogenic iron oxides and neurogenerative disease*, FEBS Letters 2001, 496: 1-5
- 16 M. P. Cuajungco, G. J. Lees, *Zinc Metabolism in the Brain: Relevance to Human Neurodegenerative Disorders*, Neurobiology of Disease 1997, 4: 137-169
- 17 A. I. Bush, R. D. Moir, K. M. Rosenkranz, R. E. Tanzi, *Zinc and Alzheimer's disease*, Science 1995, 268: 1921-1923
- 18 X. Huang, M. P. Cuajungco, C. S. Atwood, R. D. Moir, R. E. Tanzi, A. I. Bush, *Alzheimer's Disease, β -Amyloid Protein and Zinc*, J. Nutr. 2000, 130: 1488S-1492S
- 19 X. Huang, M. P. Cuajungco, C. S. Atwood, M. A. Hartshorn, J. D. A. Tyndall, G. R. Hanson, K. C. Stokes, M. Leopold, G. Multhaup, L. E. Goldstein, R. C. Scarpa, A. J. Saunders, J. Lim, R. D. Moir, C. Glabe, E. F. Bowden, C. L. Masters, D. P. Fairlie, R. E. Tanzi, A. I. Bush, *Cu(II) Potentiation of Alzheimer A β Neurotoxicity*, The Journal of Biological Chemistry 1999, 274 (52): 37111-37116
- 20 A. I. Bush, *Metals and neuroscience*, Current Opinion in Chemical Biology 2000, 4: 184-191
- 21 G. Multhaup, T. Ruppert, A. Schlicksupp, L. Hesse, D. Beher, C. L. Masters, K. Beyreuther, *Reactive Oxygen Species and Alzheimer's Disease*, Biochemical Pharmacology 1997, 54: 533-539
- 22 P. Heron, K. Cousins, C. Boyd, S. Daya, *Paradoxical effects of copper and manganese on brain mitochondrial function*, Life Sci 2001, 68 (14): 1575-1583
- 23 M. P. Cuajungco, K. Y. Fagét, X. Huang, R. E. Tanzi, A. I. Bush, *Metal Chelation as a Potential Therapy for Alzheimer's Disease*, Annals New York Academy of Sciences 2000, 920: 292-304
- 24 Y. Christen, *Oxidative stress and Alzheimer disease*, Am J Clin Nutr 2000, 71 (suppl): 621S-629S
- 25 M. A. Deibel, W. D. Ehmann, W. R. Markesbery, *Copper, iron, and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: possible relation to oxidative stress*, J. Neurol. Sci 1996, 143: 137-142
- 26 C. R. Cornett, W. R. Markesbery, W. D. Ehmann, *Imbalances of Trace Elements Related to Oxidative Damage in Alzheimer's Disease Brain*, NeuroToxicology 1998, 19 (3): 339-346
- 27 J. M. Carney, *Oxidative Stress Leading to Loss of Critical Proteases in Alzheimer's Disease - An Alternative View of the Etiology of AD*, in: Z. S. Khachaturian, M.-M. Mesulam (Hrsg.), Annals New York Academy of Sciences, 924, Alzheimer's disease - A compendium of current theories, The New York Academy of Sciences, New York, 2000, 160-163
- 28 D. A. Loeffler, P. A. LeWitt, P. L. Juneau, A. A. F. Sima, H.-U. Nguyen, A. J. DeMaggio, C. M. Brickman, G. J. Brewer, R. D. Dick, M. D. Troyer, L. Kanaley, *Increased regional brain concentrations of ceruloplasmin in neurodegenerative disorders*, Brain Research 1996, 738: 265-274
- 29 D. L. Marcus, C. Thomas, C. Rodriguez, K. Simberkoff, J. S. Tsai, J. A. Strafaci, M. L. Freedman, *Increased Peroxidation and Reduced Antioxidant Enzyme Activity in Alzheimer's Disease*, Experimental Neurology 1998, 150: 40-44

-
- 30 S. Varadarajan, S. Yatin, M. Aksenova, D. A. Butterfield, *Review: Alzheimer's Amyloid β -Peptide-Associated Free Radical Oxidative Stress and Neurotoxicity*, Journal of Structural Biology 2000, 130: 184-208
- 31 M. A. Smith, M. Vašák, M. Knipp, R. J. Castellani, G. Perry, *Dimethylargininase, a nitric oxide regulatory protein, in Alzheimer's disease*, Free Radical Biology & Medicine 1998, 25 (8): 898-902
- 32 S. M. de la Monte, N. Ganju, N. Feroz, T. Luong, K. Banerjee, J. Cannon, J. R. Wands, *Oxygen Free Radical Injury Is Sufficient to Cause Some Alzheimer-Type Molecular Abnormalities in Human CNS Neuronal Cells*, Journal of Alzheimer's Disease 2000, 2: 261-281
- 33 J. H. R. Kägi, B. L. Vallee, *Metallothionein: a Cadmium- and Zinc-containing Protein from Equine Renal Cortex*, The Journal of Biological Chemistry 1960, 235 (12): 3460-3465
- 34 M. Margoshes, B. L. Vallee, *A cadmium protein from equine kidney cortex*, Journal of the American Chemical Society 1957, 79: 4813-4814
- 35 Y. Kojima, P.-A. Binz, J. H. R. Kägi, *Nomenclature of metallothionein: Proposal for a revision*, in: C. Klaassen (Hrsg.), Metallothionein IV, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 1999, 3-6
- 36 C. F. Shaw III, M. J. Stillman, K. T. Suzuki, *Metallothioneins - An Overview of Metal-Thiolate Complex Formation in Metallothioneins*, in: C. F. Shaw III, M. J. Stillman, K. T. Suzuki (Hrsg.), Metallothioneins - Synthesis, Structure and Properties of Metallothioneins, Phytochelatins and Metal-Thiolate Complexes, VCH Publishers, Inc., New York, Weinheim, Cambridge, 1992, 1-13
- 37 Y. Kojima, *Definitions and Nomenclature of Metallothionein*, in: J. F. Riordan, B. L. Vallee (Hrsg.), Methods in Enzymology 205, Metallobiochemistry Part B: Metallothionein and Related Molecules, Academic Press, Inc., San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, 1991, 8-10
- 38 P.-A. Binz, J. H. R. Kägi, *Metallothionein: Molecular evolution and classification*, in: C. Klaassen (Hrsg.), Metallothionein IV, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 1999, 7-13
- 39 On-line im Internet: URL: <http://www.expasy.ch/cgi-bin/lists?metallo.txt> [Stand: 15.03.2001]
- 40 M. Sato, K. T. Suzuki, *Recent Studies on Measurement of Metallothionein and Its Isoforms in Biological Materials*, Biomed Res Trace Elements 1995, 6 (1): 13-28
- 41 K. T. Suzuki, *Preparation of Metallothioneins*, in: C. F. Shaw III, M. J. Stillman, K. T. Suzuki (Hrsg.), Metallothioneins - Synthesis, Structure and Properties of Metallothioneins, Phytochelatins and Metal-Thiolate Complexes, VCH Publishers, Inc., New York, Weinheim, Cambridge, 1992, 14-30
- 42 M. Vašák, D. W. Hasler, *Metallothioneins: new functional and structural insights*, Current Opinion in Chemical Biology 2000, 4: 177-183
- 43 C. J. Quaife, S. D. Findley, J. C. Erickson, G. J. Froelick, E. J. Kelly, B. P. Zambrowicz, R. D. Palmiter, *Induction of a New Metallothionein Isoform (MT-IV) Occurs during Differentiation of Stratified Squamous Epithelia*, Biochemistry 1994, 33: 7250-7259

-
- 44 On-line im Internet: NiceProt View of Swiss-PROT, URL: <http://www.expasy.ch/cgi-bin/niceprot.pl> [Stand: 14.08.2001]
- 45 J. H. Beattie, *Strategies for the qualitative and quantitative analysis of metallothionein isoforms by capillary electrophoresis*, Talanta 1998, 46: 255-270
- 46 P. Brätter, R. Brunetto, H.-J. Gramm, S. Recknagel, H. Siemens, *Detection by HPLC-ICP of Metallothionein in Serum of Epileptic child with Valproate-associated Hepatotoxicity*, J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis. 1992, 6: 251-255
- 47 R. D. Palmiter, S. D. Findley, T. E. Whitmore, D. M. Durnam, *MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family*, Procl. Natl. Acad. Sci. USA 1992, 89: 6333-6337
- 48 M. Nordberg, *Metallothioneins: historical review and state of knowledge*, Talanta 1998, 46: 243-254
- 49 M. Vašák, *Metal Removal and Substitution in Vertebrate and Invertebrate Metallothioneins*, in: J. F. Riordan, B. L. Vallee (Hrsg.), Methods in Enzymology 205, Metallobiochemistry Part B: Metallothionein and Related Molecules, Academic Press, Inc., San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, 1991, 452-458
- 50 J. Hidalgo, M. Aschner, P. Zatta, M. Vašák, *Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system*, Brain Research Bulletin 2001, 55 (2): 133-145
- 51 C. D. Klaassen, J. Liu, *Role of metallothionein in cadmium-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity*, Drug Metabolism Reviews 1997, 29 (1&2): 79-102
- 52 B. L. Vallee, *The function of metallothionein*, Neurochem. Int. 1995, 27 (1): 23-33
- 53 C. Jacob, W. Maret, B. L. Vallee, *Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95: 3489-3494
- 54 K. T. Suzuki, T. Kuroda, *Direct Transfer of Copper from Metallothionein to Superoxide Dismutase: A Possible Mechanism for Differential Supply of Cu to SOD and Ceruloplasmin in LEC Rats*, Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology 1994, 86 (1): 15-23
- 55 L.-J. Jiang, W. Maret, B. L. Vallee, *The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95: 3483-3488
- 56 Y. Chen, W. Maret, *Catalytic selenols couple the redox cycles of metallothionein and glutathione*, Eur. J. Biochem. 2001, 268: 3346-3353
- 57 T. P. J. Mulder, A. R. Janssens, H. W. Verspaget, C. B. W. Lamers, *Isolation, characterization, and determination of human liver (copper/zinc) metallothionein*, Experientia 1990, 46: 688-693
- 58 P. J. Thornalley, M. Vašák, *Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals*, Biochimica et Biophysica Acta 1985, 827: 36-44
- 59 M. Sato, M. Sasaki, H. Hojo, *Induction of Metallothionein synthesis by oxidative stress and possible role in acute phase response*, in: K. T. Suzuki, N. Imura, M. Kimura (Hrsg.), Metallothionein III - Biological Roles and Medical Implications, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 1993, 125-140

- 60 A. Vilanova, C. Gutiérrez, N. Serrat, X. Raga, J. L. Paternain, *Metallothionein, Zinc and Copper Levels: Relationship with Acute Myocardial Infarction*, Clinical Biochemistry 1997; 30(3): 235-238
- 61 R. Studer, C. P. Vogt, M. Cavigelli, P. E. Hunziker, J. H. R. Kägi, *Metallothionein accretion in human hepatic cells is linked to cellular proliferation*, Biochem. J. 1997, 328: 63-67
- 62 Y. Kondo, J. M. Rusnak, D. G. Hoyt, C. E. Settineri, B. R. Pitt, J. S. Lazo, *Enhanced Apoptosis in Metallothionein Null Cells*, Molecular Pharmacology 1997, 52: 195-201
- 63 T. P. J. Mulder, A. R. Janssens, H. W. Verspaget, C. B. H. W. Lamers, *Development of a radioimmunoassay for human metallothionein*, J. Immunological Methods 1990, 130: 157-161
- 64 R. J. Cousins, *Measurement of Human Metallothionein by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, in: J. F. Riordan, B. L. Vallee (Hrsg.), Methods in Enzymology 205, Metallobiochemistry Part B: Metallothionein and Related Molecules, Academic Press, Inc., San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, 1991, 131-140
- 65 D. R. Grassetti, J. F. Murru, *Determination of sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'-dithiodipyridine*, Arch. Biochem. Biophys. 1967, 119: 41-49
- 66 R. Bartsch, D. Klein, K. H. Summer, *The Cd-Chelex assay: a new sensitive method to determine metallothionein containing zinc and cadmium*, Arch. Toxicol. 1990, 64: 177-180
- 67 D. Klein, R. Bartsch, K. H. Summer, *Quantification of Cu-Containing Metallothionein by a Cd-Saturation Method*, Analytical Biochemistry 1990, 189: 35-39
- 68 A. M. Scheuhammer, M. G. Cherian, *Quantification of Metallothioneins by a Silver-Saturation Method*, Toxicology and Applied Pharmacology 1986, 82: 417-425
- 69 C. Wolf, U. Rösick, P. Brätter, *Quantification of the metal distribution in metallothioneins of the human liver by HPLC coupled with ICP-AES*, Fresenius J Anal Chem 2000, 368: 839-843
- 70 S. H. Appel, *A unifying hypothesis for the cause of amyotrophic lateral sclerosis, Parkinsonism, and Alzheimer's disease*, Ann. Neurol. 1981, 10: 499-505
- 71 Y. Uchida, Y. Ihara, M. Tomonaga, *Alzheimer's disease brain extract stimulates the survival of cerebral cortical neurons from neonatal rats*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1988, 150: 1263-1267
- 72 Y. Uchida, M. Tomonaga, *Neurotrophic action of Alzheimer's disease brain extract is due to the loss of inhibitory factors for survival and neurite formation of cerebral cortical neurons*, Brain Research 1989, 481: 190-193
- 73 D. L. Pountney, S. M. Fundel, P. Faller, N. E. Birchler, P. Hunziker, M. Vašák, *Isolation, primary structures and metal binding properties of neuronal growth inhibitory factor (GIF) from bovine and equine brain*, FEBS Letters 1994, 345: 193-197
- 74 H. Kobayashi, Y. Uchida, Y. Ihara, K. Nakajima, S. Kohsaka, T. Miyatake, S. Tsuji, *Molecular cloning of rat growth inhibitory factor cDNA and the expression in the central nervous system*, Molecular Brain Research 1993, 19: 188-194

- 75 B. A. Masters, C. J. Quaife, J. C. Erickson, E. J. Kelly, G. J. Froelick, B. P. Zambrowicz, R. L. Brinster, R. D. Palmiter, *Metallothionein III Is Expressed in Neurons That Sequester Zinc in Synaptic Vesicles*, The Journal of Neuroscience 1994, 14 (10): 5844-5857
- 76 T. Yuguchi, E. Kohmura, K. Yamada, T. Sakaki, T. Yamashita, H. Otsuki, A. Wanaka, M. Tohyama, S. Tsuji, T. Hayakawa, *Changes in growth inhibitory factor mRNA expression compared with those in c-jun mRNA expression following facial nerve transection*, Molecular Brain Research 1995, 28: 181-185
- 77 W. H. Yu, W. J. Lukiw, C. Bergeron, H. B. Niznik, P. E. Fraser, *Metallothionein III is reduced in Alzheimer's disease*, Brain Research 2001, 894: 37-45
- 78 P. Moffatt, C. Séguin, *Expression of the Gene Encoding Metallothionein-3 in Organs of the Reproductive system*, DNA and Cell Biology 1998, 17 (6): 501-510
- 79 S. H. Garrett, M. A. Sens, J. H. Todd, S. Somji, D. A. Sens, *Expression of MT-3 protein in the human kidney*, Toxicology Letters 1999, 105: 207-214
- 80 A. K. Sewell, L. T. Jensen, J. C. Erickson, R. D. Palmiter, D. R. Winge, *Bioactivity of Metallothionein-3 Correlates with Its Novel β Domain Sequence Rather Than Metal Binding Properties*, Biochemistry 1995, 34: 4740-4747
- 81 J. C. Erickson, A. K. Sewell, L. T. Jensen, D. R. Winge, R. D. Palmiter, *Enhanced neurotrophic activity in Alzheimer's disease cortex is not associated with down-regulation of metallothionein-III (GIF)*, Brain Research 1994, 649: 297-304
- 82 Y. Uchida, Y. Ihara, *The N-terminal Portion of Growth Inhibitory Factor Is Sufficient for Biological Activity*, JBC Online 1995, 270 (7): 3365-3369
- 83 M.-C. Amoureux, D. Van Gool, M.-T. Herrero, R. Dom, F. C. Colpaert, P. J. Pauwels, *Regulation of Metallothionein-III (GIF) mRNA in the Brain of Patients with Alzheimer Disease Is Not Impaired*, Molecular and Chemical Neuropathology 1997, 32: 101-121
- 84 A. Tomiak, *Erfassung und Auswertung zeitabhängiger Signale bei dem Verbundsystem Gelchromatographie ICP-OES zur Spurenelementspeziation*, GIT Fachzeitschrift für das Laboratorium 1992, 36
- 85 H. Vanhoe, *A Review of the Capabilities of ICP-MS for Trace Element Analysis in Body Fluids and Tissues*, J. Trace Elem. Electrolytes Health and Dis. 1993, 7: 131-139
- 86 A. Z. Mason, S. D. Storms, K. D. Jenkins, *Metalloprotein Separation and Analysis by Directly Coupled Size Exclusion High-Performance Liquid Chromatography Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy*, Analytical Biochemistry 1990, 186: 187-201
- 87 K. G. Heumann, L. Rottmann, J. Vogl, *Elemental Speciation with Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Isotope Dilution Mass Spectrometry*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry 1994, 9: 1351-1355
- 88 D. E. Gueffroy, *Buffers, A guide for the preparation and use of buffers in biological systems*, 9. Auflage, Calbiochem Corporation, La Jolla, 1990
- 89 W. Kopaciewicz, F. E. Regnier, *Nonideal Size-Exclusion Chromatography of Proteins: Effects of pH at Low Ionic Strength*, Analytical Biochemistry 1982, 126: 8-16

-
- 90 *Ausschlußchromatographie von Proteinen - Salzkonzentration in der mobilen Phase*, HP PEAK 1992, 2: 6-7
- 91 J. Falbe, M. Regitz (Hrsg.), *CD Römpp Chemie Lexikon*, 9. Auflage, Version 1.0, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1995
- 92 W. T. Norton, *Isolation of Myeline from Nerve Tissue*, in: S. Fleischer, L. Packer (Hrsg.), *Methods in Enzymology* 31, Biomembranes Part A, Academic Press, New York, San Francisco, London, 1974, 435-444
- 93 J. A. C. Broekaert, *ICP-Massenspektrometrie*, in: *Analytiker Taschenbuch Band 9*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1990, 127-163
- 94 R. Pesch, *ELEMENT Demo Version 1.3 - demonstration and information program about the ELEMENT HR ICP-MS*, Finnigan MAT GmbH, 1997
- 95 J. W. Olesik, *Fundamental Research in ICP-OES and ICPMS*, *Analytical Chemistry News & Features* 1996, 469A-474A
- 96 A. Stroh, *Einsatz der ICP-MS in der Klinischen Chemie*, in: J. Köhrle (Hrsg.), *Mineralstoffe und Spurenelemente*, Schriftenreihe der Gesellschaft für Mineralstoffe und Spurenelemente e.V., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1998, 203-207
- 97 E. H. Larsen, S. Stürup, *Carbon-enhanced Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometric Detection of Arsenic and Selenium and Its Application to Arsenic Speciation*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 1994, 9: 1099-1105
- 98 P. Allain, L. Jaunault, Y. Mauras, J.-P. Mermet, T. Delaporte, *Signal Enhancement of Elements Due to the Presence of Carbon-Containing Compounds in Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, *Anal. Chem.* 1991, 63: 1497-1498
- 99 F. Vanhaecke, M. Van Holderbeke, L. Moens, R. Dams, *Evaluation of a Commercially Available Microconcentric Nebulizer for Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 1996, 11: 543-548
- 100 R. Wolf, E. Denoyer, Z. Grosser, *EPA Method 200.8 for the Analysis of Drinking Waters - Application Note*, The Perkin-Elmer Corporation, USA, 1995
- 101 Phenomenex, *A user's Guide: Introduction to Peptide and Protein HPLC*, 1998
- 102 J. Koolman, K.-H. Röhm, *Taschenatlas der Biochemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1998
- 103 B. Österlund, J.-C. Janson, *A strategic approach to protein purification: Part I*, *Science Tools from Pharmacia Biotech* 1997, 2 (3): 8-10
- 104 K. T. Suzuki, *Purification of Vertebrate Metallothioneins*, in: J. F. Riordan, B. L. Vallee (Hrsg.), *Methods in Enzymology* 205, Metallobiochemistry Part B: Metallothionein and Related Molecules, Academic Press, Inc., San Diego, New York, Boston, London, Sidney, Tokyo, Toronto, 1991, 252-263
- 105 S. Fleischer, M. Kervina, *Subcellular Fractionation of Rat Liver*, in: S. Fleischer, L. Packer (Hrsg.), *Methods in Enzymology* 31, Biomembranes Part A, Academic Press, New York, San Francisco, London 1974, 6-41
- 106 J. Graham, *Isolation of Subcellular Organelles and Membranes*, in: D. Rickwood (Hrsg.), *Centrifugation*, 2. Aufl., IRL Press, Oxford, Washington DC, 1994, 161-182

- 107 C. de Duve, *Criteria of Homogeneity and Purity of Mitochondria*, in: R. W. Estabrook, M. E. Pullman (Hrsg.), *Methods in Enzymology* 10, Academic Press, New York, London, 1967, 7-18
- 108 G. D. Smith, T. J. Peters, *Analytical subcellular fractionation of rat liver with special reference to the localisation of putative plasma membrane marker enzymes*, *Eur. J. Biochem.* 1980, 104 (1): 305-311
- 109 H. Aebi, *Katalase*, in: H. U. Bergmeyer (Hrsg.), *Methoden der enzymatischen Analyse*, Band I, 2. Auflage, Verlag Weinheim, 1970, 636-647
- 110 H. Koenig, *The Isolation of Lysosomes from Brain*, in: S. Fleischer, L. Packer (Hrsg.), *Methods in Enzymology* 31, Biomembranes Part A, Academic Press, New York, San Francisco, London 1974, 457-477
- 111 G. Szasz, *γ -Glutamyl-Transpeptidase*, in: H. U. Bergmeyer (Hrsg.), *Methoden der enzymatischen Analyse*, Band I, 2. Auflage, Verlag Weinheim, 1970, 733-738
- 112 A.-N. Richarz, P. Brätter, *Speciation analysis of trace elements in the brains of individuals with Alzheimer's disease with special emphasis on metallothioneins*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2002, 372: 412-417
- 113 S. J. Lippard, J. M. Berg, *Bioanorganische Chemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1995, 346-351
- 114 M. Karas, F. Hillenkamp, *Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10000 Daltons*, *Anal. Chem.* 1988, 60: 2299-2301
- 115 M. Karas, *Matrix-assisted laser desorption ionization MS: a progress report*, *Biochemical Society Transactions* 1996, 24: 897-900
- 116 M. Merchant, S. R. Weinberger, *Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry*, *Electrophoresis* 2000, 21: 1164-1167
- 117 Ciphergen Biosystems, Inc., *Advanced ProteinChip Technology*, Produktinformation, Fremont, 2000
- 118 J. H. Beattie, A. M. Wood, G. J. Duncan, *Rat metallothionein-2 contains N ^{α} -acetylated and unacetylated isoforms*, *Electrophoresis* 1999, 20: 1613-1618
- 119 R. C. Beavis, T. Chaudhary, B. T. Chait, *α -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid as a Matrix for Matrix-assisted Laser Desorption Mass Spectrometry*, *Organic Mass Spectrometry* 1992, 27: 156-158
- 120 S.-H. Hong, M. Toyama, W. Maret, Y. Murooka, *High Yield Expression and Single Step Purification of Human Thionein/Metallothionein*, *Protein Expression and Purification* 2001, 21: 243-250
- 121 J.-P. Boissel, T. J. Kasper, H. F. Bunn, *Cotranslational Amino-terminal Processing of Cytosolic Proteins*, *The Journal of Biological Chemistry* 1988, 263 (17): 8443-8449
- 122 J. H. Beattie, J. A. Lomax, M. P. Richards, R. Self, R. Pesch, H. Münster, *Metallothionein isoform analysis by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry*, *Biochemical Society Transactions* 1996, 24: 220S
- 123 On-line im Internet: ProtParam tool, URL: <http://expasy.cbr.nrc.ca/cgi-bin/protparam> [Stand: 23.11.2000]

- 124 B. Ye, W. Maret, B. L. Vallee, *Zinc metallothionein imported into liver mitochondria modulates respiration*, PNAS 2001, 98 (5): 2317-2322
- 125 H. Schagger, G. von Jagow, *Tricine-SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa*, Analytical Biochemistry 1987, 166: 368-379
- 126 C. C. McCormick, L.-Y. Lin, *Quantification and Identification of Metallothioneins by Gel Electrophoresis and Silver Staining*, in: J. F. Riordan, B. L. Vallee (Hrsg.), Methods in Enzymology 205, Metallobiochemistry Part B: Metallothionein and Related Molecules, Academic Press Inc., San Diego, New York, Boston, London, Sidney, Tokyo, Toronto 1991, 71-78
- 127 C. A. Mizzen, N. J. Cartel, W. H. Yu, P. E. Fraser, D. R. McLachlan, *Sensitive detection of metallothionein-1, -2 and -3 in tissue homogenates by immunoblotting: a method for enhanced membrane transfer and retention*, J. Biochem. Biophys. Methods 1996, 32: 77-83
- 128 W. P. Michalski, *Chromatographic and electrophoretic methods for analysis of superoxide dismutases*, Journal of Chromatography B 1996, 684: 59-75
- 129 P. Brätter, A. Raab, A.-N. Richarz, *Trace Element Speciation in Human Body Fluids*, in: A. M. Roussel, R. A. Anderson, A. E. Favier (Hrsg.), Trace Elements in Man and Animal 10 (Proceedings of the Tenth International Symposium on Trace Elements in Man and Animal, held May 2-7, 1999, in Evian, France), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2000, 145-152
- 130 P. Aisen, C. Enns, M. Wessling-Resnick, *Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism*, The International Journal of Biochemistry 2001, 33: 940-959
- 131 Orgentec Diagnostika GmbH, *Ferritin ORG 5FE*, Arbeitsanleitung, Mainz, 2001
- 132 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, *Sigma Diagnostics Plasma Hämoglobin Verfahren Nr. 527*, Arbeitsanleitung, Deisenhofen, 1998
- 133 Dade Behring Marburg GmbH, *Turbiquant Myoglobin*, Arbeitsanleitung, Marburg, 1998
- 134 E. Heilmann, *Die klinische Bedeutung von Transferrin*, Lab.med. 1981, 5: 79-82
- 135 R. Brigelius-Flohé, *Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases*, Free Radical Biology & Medicine 1999, 27 (9/10): 951-965
- 136 D. Behne, A. Kyriakopoulos, *Mammalian Selenium-containing Proteins*, Annu. Rev. Nutr. 2001, 21: 453-473
- 137 K. Takahashi, N. Avissar, J. Whitin, H. Cohen, *Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme*, Arch Biochem Biophys 1987, 256 (2): 677-686
- 138 R. Brigelius-Flohé, K.-D. Aumann, H. Blöcker, G. Gross, M. Kiess, K.-D. Klöppel, M. Maiorino, A. Roveri, R. Schuckelt, F. Ursini, E. Wingender, L. Flohé, *Phospholipid-hydroperoxide Glutathione Peroxidase*, The Journal of Biological Chemistry 1994, 269 (10): 7342-7348
- 139 H. Pfeifer, M. Conrad, D. Roethlein, A. Kyriakopoulos, M. Brielmeier, G. W. Bornkamm, D. Behne, *Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation*, The FASEB Journal 2001, 15: 1236-1238

-
- 140 Radox Laboratories GmbH, *RANSEL RS 506*, Arbeitsanleitung, Krefeld, 1998
- 141 D. E. Paglia, W. N. Valentine, *Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase*, J Lab Clin Med 1967, 70 (1): 158-169
- 142 M. P. Moschos, *Selenoprotein P*, Cell. Mol. Life Sci. 2000, 57: 1836-1845
- 143 P. D. Whanger, *Selenoprotein W: a review*, Cell. Mol. Life Sci. 2000, 57: 1846-1852
- 144 G. Löffler, P. E. Petrides, L. Weiss, H. A. Harper, *Physiologische Chemie*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1979
- 145 J. P. Doweiko, D. J. Nompleggi, *Role of Albumin in Human Physiology and Pathophysiology*, Journal of Parenteral and Enteral Nutrition 1991, 15 (2): 207-211
- 146 J. Köhrle, *The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action*, Cell. Mol. Life Sci. 2000, 57: 1853-1863
- 147 A. Tomiak, *Signalverarbeitung bei analytischen Verbundverfahren zur Spurenelementbestimmung in biologischen Matrices*, Dissertation an der Technischen Universität Berlin, 1988
- 148 C. Wolf, *Entwicklung einer Methode zur quantitativen Bestimmung und Elementspeziation von Metallothioneinen und deren Isoformen im Cytosol humaner Gewebeproben*, Dissertation am Fachbereich 5 Chemie der Technischen Universität Berlin, 1999
- 149 K. T. Suzuki, T. Maitani, *Comparison of Properties of Two Isometallothioneins in Oxidation and Metal Substitution Reactions*, Chem. Pharm. Bull. 1983, 31 (12): 4469-4475
- 150 A. Prange, D. Schaumlöffel, *Determination of element species at trace levels using capillary electrophoresis-inductively coupled plasma sector field mass spectrometry*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry 1999, 14: 1329-1332
- 151 S. Mounicou, K. Poleć, H. Chassaingne, M. Potin-Gautier, R. Łobiński, *Characterization of metal complexes with metallothioneins by capillary zone electrophoresis (CZE) with ICP-MS and electrospray (ES)-MS detection*, J. Anal. At. Spectrom. 2000, 15: 635-642
- 152 D. Schaumlöffel, A. Prange, *A new interface for combining capillary electrophoresis with inductively coupled plasma-mass spectrometry*, Fresenius J Anal Chem 1999, 364: 452-456
- 153 D. A. Skoog, J. L. Leary, *Instrumentelle Analytik*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1996
- 154 A. Padarauskas, *Kapillarzonenelektrophorese in der anorganischen Analytik*, in: H. Günzler, A. M. Bahadir, K. Danzer, W. Engewald, W. Fresenius, R. Galensa, W. Huber, M. Linscheid, G. Schwedt, G. Tölg (Hrsg.), *Analytiker-Taschenbuch Band 19*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1998, 263-316
- 155 A. Prange, D. Schaumlöffel, P. Brätter, A.-N. Richarz, C. Wolf, *Species analysis of metallothionein isoforms in human brain cytosols using capillary electrophoresis hyphenated to inductively coupled plasma - sector field mass spectrometry*, Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 2001, 371: 764-774

- 172 D. J. Selkoe, *Toward a Comprehensive Theory for Alzheimer's Disease - Hypothesis: Alzheimer's Disease Is Caused by the Cerebral Accumulation and Cytotoxicity of Amyloid β -Protein*, in: Z. S. Khachaturian, M.-M. Mesulam (Hrsg.), *Annals New York Academy of Sciences*, 924, Alzheimer's disease - A compendium of current theories, The New York Academy of Sciences, New York, 2000, 17-25
- 173 D. Praticò, J. Q. Trojanowski, *Inflammatory hypothesis: novel mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration and new therapeutic targets?*, *Neurobiology of Aging* 2000, 21: 441-445
- 174 D. Schenk, R. Barbour, W. Dunn, G. Gordon, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, M. Lee, Z. Liao, I. Lieberburg, R. Motter, L. Mutter, F. Soriano, G. Shopp, N. Vasquez, C. Vandever, S. Walker, M. Wogulis, T. Yednock, D. Games, P. Seubert, *Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse*, *Nature* 1999, 400: 173-177
- 175 W. D. Ehmann, W. R. Markesbery, M. Alauddin, T. I. M. Hossain, E. H. Brubaker, *Brain Trace Elements in Alzheimer's Disease*, *NeuroToxicology* 1986, 7 (1): 197-206
- 176 E. Andrási, J. Nádasdi, Z. Molnar, L. Bezur, L. Ernyei, *Determination of Main and Trace Element Contents in Human Brain by NAA and ICP-AES Methods*, *Biological Trace Element Research* 1990, 26-27: 691-698
- 177 A. J. Larner, *The cerebellum in Alzheimer's disease*, *Dement Geriatr Cogn Disord* 1997, 8 (4): 203-209
- 178 A. E. Panayi, N. M. Spyrou, L. C. Ubertalli, O. A. Akanle, P. Part, *Differences in trace element concentrations between the right and left hemispheres of human brain using INAA*, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 2000, 244 (1): 205-207
- 179 M. A. Deibel, W. D. Ehmann, W. R. Markesbery, *Copper, iron, and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: possible relation to oxidative stress*, *Journal of Neurological Sciences* 1996, 143: 137-142
- 180 E. Andrási, É. Farkas, D. Gawlik, U. Rösick, P. Brätter, *Brain Iron and Zinc Contents of German Patients with Alzheimer Disease*, *Journal of Alzheimer's Disease* 2000, 2: 17-26
- 181 M. P. Cuajungco, G. J. Lees, *Zinc and Alzheimer's disease: is there a direct link?*, *Brain Res Brain Res Rev* 1997, 23 (3): 219-236
- 182 J. L. Beard, J. R. Connor, B. C. Jones, *Iron in the Brain*, *Nutrition Reviews* 1993, 51 (6): 157-170
- 183 M. L. Kennard, H. Feldman, T. Yamada, W. A. Jefferies, *Serum levels of the iron binding protein p97 are elevated in Alzheimer's disease*, *Nature Medicine* 1996, 2 (11): 1230-1235
- 184 F. A. Sorond, R. R. Ratan, *Ironing-Out Mechanisms of Neuronal Injury under Hypoxic-Ischemic Conditions and Potential Role of Iron Chelators as Neuroprotective Agents*, *Antioxidants & Redox Signaling* 2000, 2 (3): 421-436
- 185 M. N. Sabbagh, D. Galasko, E. Koo, L. J. Thal, *Amyloid- β and Treatment Opportunities for Alzheimer's Disease*, *Journal of Alzheimer's Disease* 2000, 2: 231-259

186 A. F. Holleman, E. Wiberg, *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, 101. Auflage, de Gruyter Verlag, Berlin, New York, 1995

Lebenslauf

Andrea-Nicole Richarz

Geburtsdatum und -ort: 30.10.1973, Berlin

1980 – 1984 Halensee-Grundschule, Berlin

1984 – 1992 Französisches Gymnasium, Berlin

12.06.1992 Abitur

02.07.1992 Baccalauréat

01.10.1992 – 30.09.1993 Studium der Landschaftsplanung an der Technischen Universität Berlin

01.10.1993 – 02.11.1998 Studium der Chemie an der Technischen Universität Berlin

10.08.1995 Vordiplom

01.10.1995 – 31.03.1996 Studium der Chemie an der Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier, Frankreich

01.04.1997 – 30.09.1998 Stipendium der Fritz-ter-Meer-Stiftung der Bayer AG

01.12.1997 – 31.10.1998 Diplomarbeit in der Abteilung NG „Spurenelemente in Gesundheit und Ernährung“ des Hahn-Meitner-Institutes Berlin: „Speziation von Spurenelementen in menschlichen Körperflüssigkeiten“

02.11.1998 Diplom

seit 01.11.1998 Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung NG „Spurenelemente in Gesundheit und Ernährung“ des Hahn-Meitner-Institutes Berlin und Durchführung der Dissertation „Speziationsanalyse von proteingebundenen Elementen in Cytosolen als biologische Marker für Lebensprozesse unter besonderer Berücksichtigung der Metallothioneine im Gehirn“

15.07.1999 Erwin-Stephan-Preis der Technischen Universität Berlin

01.04.2000 – 30.09.2000 Forschungsaufenthalt im Center for Biochemical and Biophysical Sciences and Medicine an der Harvard Medical School in Boston, USA

Publikationen

- 1 P. Escarpa Gaede, P. H. Moran, A.-N. Richarz
Transition Metal complexes of 2-Cyclopentadienyl-2-indenyl-propane
Journal of Organometallic Chemistry 1998, 559: 107-121
- 2 P. Brätter, A. Raab, A.-N. Richarz
Trace Element Speciation in Human Body Fluids
in: A. M. Roussel, R. A. Anderson, A. E. Favier (Hrsg.), Trace Elements in Man and Animal 10 (Proceedings of the Tenth International Symposium on Trace Elements in Man and Animal, held May 2-7, 1999, in Evian, France), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2000, 145-152
- 3 A. Prange, D. Schaumlöffel, A.-N. Richarz, P. Brätter
Speciation of metallothioneins in animal and human samples from nanoliter volumes
in: J. A. Centeno, Ph. Collery, G. Vernet, R. B. Finkelman, H. Gibb, J.-C. Etienne (Hrsg.), Metal Ions in Biology and Medicine, Volume 6, Proceedings of the Sixth International Symposium on Metal Ions in Biology and Medicine held in San Juan, Puerto Rico, USA, on May 7-10, 2000, John Libbey Eurotext, Paris, 2000, 430-432
- 4 A. Prange, D. Schaumlöffel, P. Brätter, A.-N. Richarz, C. Wolf
Species analysis of metallothionein isoforms in human brain cytosols by use of capillary electrophoresis hyphenated to inductively coupled plasma-sector field mass spectrometry
Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 2001, 371: 764-774
- 5 A.-N. Richarz, P. Brätter
Speciation analysis of trace elements in the brains of individuals with Alzheimer's disease with special emphasis on metallothioneins
Analytical and Bioanalytical Chemistry 2002, 372: 412-417