

Ursachenaufklärung des MRT-Phasenkontrastes im  
Hochfeld mit Bezug auf die  
Wasser-Makromolekül-Wechselwirkung

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium**

**(Dr. rer. nat.)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften der

Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

von Herrn Dipl.-Phys. Tobias Leutritz

geb. am 08.11.1983 in Halberstadt

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. habil. Oliver Speck

Prof. Dr. rer. nat. habil. Nadim Jon Shah

eingereicht am: 07.07.2014

verteidigt am: 30.01.2015

## Danksagungen

Zuvorderst danke ich dem Projektinitiator und langjährigen Betreuer K. Zhong. Er hat mich durch das Projekt begleitet, wichtige Impulse gegeben und die Publikation wesentlich vorangetrieben. Ebenso danke ich dem Arbeitsgruppenleiter O. Speck für seine Ausdauer und Unterstützung. Die Projektpartner mit denen ich sehr eng zusammengearbeitet habe und deren Fachkompetenz meine Arbeit von anderen Blickwinkeln beleuchtet haben, sind insbesondere K.-H. Smalla und L. Hilfert. Auch hier fand ich inspirierende Rückmeldungen und Erbauung in Zeiten des Zweifels. Daneben sind die Projektpartner M. Matzke und F. Angenstein zu nennen, die mit ihren Mitarbeitern V. Ovtcharov und M. Hunger wichtige Beiträge im Projekt geleistet haben, die eine anschauliche Anwendung erst möglich machen. Dank gilt ebenso den technischen Mitarbeiterinnen M. Kupfernagel, I. Sauer, S. Kühnel, S. Berger, K. Pohlmann und den studentischen Hilfskräften A. Brensing, der wesentliche Zuarbeiten geleistet hat, M. Rosendale, N. Höche, U. Herrmann und C. Freitag. M. Ramm, L. Hilfert, K.-H. Smalla und O. Speck danke ich für das aufmerksame Lesen und kommentieren vorhergehender Fassungen. Damit konnte die Arbeit in die vorliegende Fassung gebracht werden.

So gilt letztlich Dank allen, die mich auf meinem Weg mit Zuhören und guten Worten begleitet haben und dem oder der Lesenden danke ich bereits jetzt für die Aufmerksamkeit, die Sie diesem Werk zu widmen gewillt sind.

Magdeburg, im Juli 2014

# Abstract

Subject of this thesis is the study of the chemical exchange between free water and water bound to macromolecules. This exchange induces frequency differences of the resonance frequencies of protons – especially of water – which are directly registered in the phase contrast of magnetic resonance imaging (MRI). The phase contrast is influenced by a changed physicochemical environment: hydrogen bonds change the density and thus the electrostatic configuration; an exchange of protons between different chemical environments, i. e. varied resonance frequency, becomes visible. Physical parameters, such as magnetic susceptibility, are also dependent on the direction of the static magnetic field.

In systems with well-defined boundary conditions – protein solutions or tissue extracts – the interactions of the physicochemical parameters were investigated by means of nuclear magnetic resonance (NMR). In particular, the influence of different NMR reference substances (for the precise determination of the resonance frequencies) was analyzed in detail and describes the occurring interactions. Thus, interactions of the widely used NMR reference substance 2,2,3,3-tetradeuterio-3-trimethylsilyl-propionate (TMSP) with proteins were detected. A process with different reference substances – with and without chemical contact with the substance under study – was used to quantify the proportions of magnetic susceptibility and chemical exchange between water and macromolecules. Both have the same magnitude but are opposite, so that the combined effect is smaller.

The influence of the geometry of the tissue on the water macromolecule exchange (WME) is differentiated: translational diffusion affects the WME and the induced frequency shifts of the MR resonances more than rotational diffusion. Thus, conclusions can be drawn on tissue degeneration.

Associated with the correlation times influenced by WME also the relaxation behaviour changes. This must be taken into account within MRI and can also be used for the characterization of the tissue condition.

Keywords: Water Macromolecule Exchange, MRI Phase Contrast, NMR Spectroscopy

# Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung des chemischen Austauschs zwischen freiem Wasser und an Makromoleküle gebundenem Wasser.

In der Magnetresonanztomographie ergeben sich dadurch Frequenzunterschiede der bei der Phasenbildung direkt registrierten Resonanzfrequenzen von Protonen – v. a. des Wassers. Der Phasenkontrast ist durch die veränderte physikochemische Umgebung beeinflusst: Wasserstoffbrückenbindungen verändern die Dichte und damit die elektrostatische Konfiguration; ein Austausch von Protonen zwischen verschiedenen chemischen Umgebungen, d. h. variiertes Resonanzfrequenz, wird sichtbar. Physikalische Parameter, wie magnetische Suszeptibilität, sind zudem von der Richtung des statischen Magnetfeldes abhängig.

In Systemen mit definierten Randbedingungen von Proteinlösungen oder Gewebeertrakten wurden die Wechselwirkungen der physikochemischen Parameter mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Insbesondere der Einfluss unterschiedlicher NMR-Referenzsubstanzen, die der genauen Bestimmung der Resonanzfrequenzen dienen, wurde eingehend analysiert und die auftretenden Wechselwirkungen beschrieben. So wurden Wechselwirkungen der weit verbreiteten NMR-Referenzsubstanz 3-(Trimethylsilyl)propionsäure-2,2,3,3-d<sub>4</sub> Natriumsalz (TMSP) mit Proteinen nachgewiesen. Ein Verfahren mit verschiedenen Referenzsubstanzen mit und ohne chemischen Kontakt zur untersuchten Substanz wurde eingesetzt, um die Anteile von magnetischer Suszeptibilität und chemischen Austausch (zwischen Wasser und Makromolekülen) zu quantifizieren. Beide haben die gleiche Größenordnung, sind jedoch entgegengesetzt, sodass der kombinierte Effekt geringer ausfällt.

Der Einfluss der Geometrie des Gewebes auf den Wasser-Makromolekül-Austausch ist differenziert: translatorische (stärker als rotatorische) Diffusionsanteile wirken sich auf den Wasser-Makromolekül-Austausch und die davon hervorgerufenen Frequenzverschiebungen der MR-Resonanzen aus. Damit lassen sich Rückschlüsse auf Gewebedegenerationen ziehen.

Die mit der Wasser-Makromolekül-Wechselwirkung einhergehende Beeinflussung der Korrelationszeiten hat zusätzlich einen Einfluss auf das Relaxationsverhalten. Dies muss bei der MRT-Bildgebung in verstärktem Maß berücksichtigt werden und kann ebenfalls hinsichtlich der Charakterisierung des Gewebeszustandes verwendet werden.

Schlagwörter: Wasser-Makromolekül-Wechselwirkung, MRT-Phasenkontrast, NMR-Spektroskopie

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>XIII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Hinführung zur Problemstellung . . . . .	1
1.2 Hypothesen und Arbeitsprogramm . . . . .	3
<b>2 Grundlagen</b>	<b>5</b>
2.1 Vorbemerkungen . . . . .	5
2.2 Einführung zu NMR und MRT . . . . .	7
2.2.1 Vorbemerkungen . . . . .	7
2.2.2 NMR-Spektroskopie . . . . .	7
2.2.3 Magnetresonanztomographie . . . . .	11
2.3 Überblick zu Kontrasten in der MRT . . . . .	12
2.3.1 Vorbemerkungen . . . . .	12
2.3.2 Suszeptibilität und Phasenkontrast . . . . .	14
2.3.3 Austausch und Phasenkontrast . . . . .	15
2.4 Ursachen des Wasser-Makromolekül-Austauschs . . . . .	15
2.4.1 Zusammensetzung biologischer Materie . . . . .	15
2.4.2 Besonderheiten von Wasser . . . . .	17
2.4.3 Physikochemische Wechselwirkungen im Kontext der NMR- Spektroskopie . . . . .	18
2.5 Physikalische Mechanismen im Kontext der Diffusion . . . . .	20
2.5.1 Vorbemerkungen . . . . .	20

2.5.2	Diffusion . . . . .	21
2.5.3	Temperatureinfluss . . . . .	23
2.5.4	Elektrostriktion . . . . .	24
2.6	Chemische Mechanismen im Kontext der Bindung . . . . .	24
2.6.1	Vorbemerkungen . . . . .	24
2.6.2	Hydratation von Makromolekülen . . . . .	24
2.6.3	Chemischer Austausch . . . . .	25
2.7	Modell zum Wasser-Makromolekül-Austausch . . . . .	28
2.8	Wechselwirkungen mit interner NMR-Referenz . . . . .	29
2.9	Schlussbemerkungen . . . . .	33
<b>3</b>	<b>Experimentelle Durchführung</b>	<b>35</b>
3.1	Vorbemerkungen . . . . .	35
3.2	Auswahl der Materialien . . . . .	35
3.2.1	Proteine . . . . .	35
3.2.2	Gewebeextrakte . . . . .	37
3.3	Auswahl der Methoden . . . . .	38
3.4	Parameterdimensionen . . . . .	40
3.5	Probenvorbereitung . . . . .	42
3.6	NMR-Spektroskopie . . . . .	43
3.6.1	Allgemeine Versuchsabläufe . . . . .	43
3.6.2	Messung der longitudinalen Relaxationszeit T1 . . . . .	44
3.6.3	Messung der transversalen Relaxationszeit T2 . . . . .	45
3.6.4	Diffusionsmessung . . . . .	46
3.7	Datenextraktion . . . . .	48
3.8	Methoden zur Ermittlung der Suszeptibilität . . . . .	50
3.8.1	Vorbemerkungen . . . . .	50
3.8.2	Winkelabhängige Messung . . . . .	51
3.8.3	Methode nach Hoffman . . . . .	51
3.8.4	Weitere Methoden . . . . .	53
3.9	Doppelte Referenzierung . . . . .	53
3.10	Messung von Austausch und Suszeptibilität . . . . .	53
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>57</b>
4.1	Vorbemerkungen . . . . .	57

4.2	Einfluss von Grundparametern auf die Frequenzvariation des Wassersignals . . . . .	58
4.2.1	Temperatur . . . . .	58
4.2.2	Stabilität des Messsystems . . . . .	61
4.2.3	Suszeptibilität . . . . .	65
4.2.4	Diffusion und Viskosität . . . . .	67
4.2.5	OH-Bindungsstellen . . . . .	73
4.2.6	Konformationsänderungen . . . . .	76
4.2.7	pH-Wert . . . . .	79
4.2.8	Proteingröße und -konzentration . . . . .	80
4.3	Einfluss der Wahl der NMR-Referenz . . . . .	83
4.3.1	Vorbemerkungen . . . . .	83
4.3.2	Dioxan . . . . .	83
4.3.3	TMSP . . . . .	84
4.3.4	Vergleich der NMR-Referenzsubstanzen TMSP und Dioxan	89
4.3.5	DSS . . . . .	90
4.3.6	Chloroform (extern) . . . . .	90
4.4	Gewebeextrakte im Hinblick auf Wasserfrequenzverschiebung und andere Parameter . . . . .	91
4.4.1	Vorbemerkungen . . . . .	91
4.4.2	Wasserfrequenz, Eisen- und Proteingehalt . . . . .	92
4.4.3	Relaxations- und Diffusionskonstanten . . . . .	100
4.4.4	Parameterstatistik . . . . .	102
4.5	Austausch und Suszeptibilität bei Proteinen und im Gewebe . . . .	105
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>107</b>
5.1	Vorbemerkungen . . . . .	107
5.2	Einfluss von Grundparametern auf die Frequenzvariation des Wassersignals . . . . .	107
5.2.1	Temperatur . . . . .	107
5.2.2	Stabilität des Messsystems . . . . .	110
5.2.3	Suszeptibilität . . . . .	110
5.2.4	Diffusion und Viskosität . . . . .	111
5.2.5	OH-Bindungsstellen . . . . .	113

5.2.6	Konformationsänderungen . . . . .	114
5.2.7	Proteingröße und -konzentration . . . . .	115
5.3	Einfluss der Wahl der NMR-Referenz . . . . .	117
5.3.1	Vorbemerkungen . . . . .	117
5.3.2	Dioxan . . . . .	117
5.3.3	TMSP . . . . .	118
5.3.4	DSS . . . . .	119
5.3.5	Chloroform (extern) . . . . .	119
5.4	Gewebeextrakte im Hinblick auf Wasserfrequenzverschiebung . . .	120
5.4.1	Allgemeine Bemerkungen . . . . .	120
5.4.2	Wasserfrequenz, Eisen- und Proteingehalt . . . . .	121
5.4.3	Relaxations- und Diffusionskonstanten . . . . .	123
5.4.4	Parameterstatistik . . . . .	123
5.5	Austausch und Suszeptibilität bei Proteinen und im Gewebe . . . .	124
5.6	Kritik und Verbesserungsvorschläge . . . . .	124
5.7	Ausblick . . . . .	125
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>127</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>129</b>



# Abkürzungsverzeichnis

<b>AAS</b>	Atomabsorptionsspektrometrie
<b>AS</b>	Ammoniumsulfat
<b>BBO</b>	<i>Double Resonance Broad Band</i>
<b>BSA</b>	<i>Bovine Serum Albumin</i>
<b>CEST</b>	<i>Chemical Exchange Saturation Transfer</i>
<b>CSI</b>	<i>Chemical Shift Imaging</i>
<b>DSS</b>	3-Trimethylsilyl-1-propansulfonsäure Natriumsalz
<b>EM</b>	Elektromagnetisch
<b>FID</b>	<i>Free Induction Decay</i>
<b>GST</b>	Glutathione S-transferase
<b>HDO</b>	Hydrodeuteriumoxid
<b>HF-MRT</b>	Hochfeldmagnetresonanztomographie
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>Lys</b>	Lysozym
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>MT</b>	<i>Magnetization Transfer</i>
<b>NMR</b>	Nuklearmagnetresonanz
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>ppb</b>	<i>parts per billion</i> , 1 ppb = $1 \cdot 10^{-9}$
<b>ppm</b>	<i>parts per million</i> , 1 ppm = $1 \cdot 10^{-6}$
<b>RF</b>	Radiofrequenz
<b>RNase A</b>	Ribonuklease A
<b>SE</b>	<i>Spin Exchange</i>
<b>TBI</b>	<i>Triple Resonance Broad Band</i>
<b>TMSP</b>	3-(Trimethylsilyl)propionsäure-2,2,3,3-d <sub>4</sub> Natriumsalz
<b>WMA</b>	Wasser-Makromolekül-Austausch



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Phasenkontrast im Vergleich zu konventioneller Magnitudenbildung in der MRT. . . . .	2
2.1	Energieniveaus für einen Kern mit Spin $I = 1/2$ bei eingeschaltetem äußeren Magnetfeld. . . . .	8
2.2	Darstellung des freien Induktionszerfalls und der Spektraldarstellung (fouriertransformierter FID) am Beispiel von Cyclosporin mittels $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie. . . . .	11
2.3	Zeitskalen von Proteindynamik und NMR-Verfahren. . . . .	19
2.4	Darstellung der Diffusion eines Wassermoleküls zwischen festen Kompartimenten. . . . .	22
2.5	Simulierte Resonanzspektren mit chemischem Austausch. . . . .	27
3.1	Darstellung eines Spektrums mit Wasserunterdrückung mit BSA. . .	39
3.2	Darstellung eines für diese Arbeit typischen NMR-Spektrums. . . .	44
3.3	Schema der Pulsfolge <i>Inversion Recovery</i> zur Bestimmung der longitudinalen Relaxationszeit $T_1$ . . . . .	45
3.4	Schema der Pulsfolge <i>CPMG</i> zur Bestimmung der transversalen Relaxationszeit $T_2$ . . . . .	46
3.5	Schema der Pulsfolge <i>Spin Exchange</i> (SE) zur Bestimmung der Diffusion. . . . .	47
3.6	Darstellung des Verlaufs der Datenextraktion. . . . .	49
3.7	Variation der Wasserfrequenz mit der Temperatur. . . . .	49
3.8	Signalspitze eines $^1\text{H}$ -Spektrums einer reinen Pufferlösung mit angepasster Lorentz-Kurve. . . . .	50
3.9	Darstellung eines typischen Spektrums mit Röhrenpositionen bei 2 mm und 20 mm unterhalb des Spulenmittelpunktes. . . . .	52

3.10	Korrelation der magnetischen Suszeptibilität mit der Linienbreite für spezifische NMR-Röhrchen und Probenkopf. . . . .	52
3.11	Schematische Darstellung des Messverfahrens zur Bestimmung von chemischem Austausch und magnetischer Suszeptibilität. . . . .	54
3.12	Darstellung der Dioxan-Resonanzfrequenz im NMR-Spektrum. . . . .	56
4.1	Temperaturabhängigkeit der Wasserfrequenzverschiebung mit BSA. . . . .	59
4.2	Anstiege der temperaturabhängigen Wasserfrequenzverschiebungen bezogen auf die Proteinkonzentrationen von BSA und IgG. . . . .	59
4.3	Anstiege der temperaturabhängigen Wasserfrequenzverschiebungen in BSA-Lösungen mit variabler TMSP-Konzentration. . . . .	60
4.4	Anstiege der Frequenzverschiebung in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt über der TMSP-Konzentration . . . . .	61
4.5	Darstellung des Zeitverlaufs der Frequenzdifferenzen von Wasser und 1,4-Dioxan. . . . .	63
4.6	Wasserfrequenzen von PBS-Lösungen bei verschiedenen Temperaturen und mit verschiedenen Probenköpfen (TBI, BBO) zu verschiedenen Zeiten. . . . .	64
4.7	Nachweis der Linienbreitenstabilisation für Positionen des Probenröhrchens zwischen 2 mm und 5 mm oberhalb des Spulenmittelpunktes für die Suszeptibilitätsbestimmung nach Hoffman. . . . .	65
4.8	Darstellung der relativen Suszeptibilitäten über der relativen Proteinkonzentration für verschiedene Proteine (inkl. Aminosäure L-Glutamin). . . . .	66
4.9	Abhängigkeit der Viskosität $\eta$ von der BSA-Konzentration mit 3%-Ammoniumsulfat bei verschiedenen Temperaturen. . . . .	67
4.10	Darstellung der Viskosität über der Temperatur für verschiedene Ammoniumsulfat-Konzentrationen mit 48 mg/ml BSA. . . . .	68
4.11	Zunahme der Viskosität in Abhängigkeit von der Zugabe von Ammoniumsulfat (AS) bei verschiedenen BSA-Konzentrationen und Temperaturen. . . . .	68
4.12	Darstellung der chemischen Verschiebung über der Viskosität der Proteinlösungen unterschiedlichen Konzentrationen und Temperaturen. . . . .	69

4.13	Anstiege der Kurvenanpassungen der Frequenzverschiebung in Abhängigkeit von der Viskosität für variable Ammoniumsulfat-Konzentration. . . . .	69
4.14	Variation der Diffusionskonstanten $D$ mit der Wartezeit. . . . .	70
4.15	Variation der Spektren-Integralwerte zur Diffusionsbestimmung mit Variation der Länge des Gradientenpulses. . . . .	70
4.16	Variation des Diffusionskoeffizienten $D$ über der BSA-Konzentration.	71
4.17	Diffusionskoeffizienten von BSA in Abhängigkeit von der Temperatur.	71
4.18	Darstellung der mittels NMR-Spektroskopie ermittelten Diffusionskoeffizienten $D$ von Lysozymlösungen verschiedener Konzentration.	71
4.19	Diffusionskoeffizienten für variable Proteinkonzentrationen in Gewebeextrakten (Kleinhirn). . . . .	72
4.20	Lineare Erhöhung der Viskosität mit der Konzentration von Saccharose bei verschiedenen Temperaturen $T$ . . . . .	72
4.21	Aktivitätsfaktor $b$ für BSA bei variabler Saccharosekonzentration. .	73
4.22	Aktivitätsfaktor $b$ für BSA bei variabler Saccharosekonzentration. .	74
4.23	Relative chemische Verschiebung des Wasser-Signals in Anwesenheit von Dextran 40 und BSA in unterschiedlichen Konzentrationen und bei drei Temperaturen. . . . .	74
4.24	Relative chemische Verschiebung des Wasser-Signals in Anwesenheit von Dextran 200 und BSA in unterschiedlichen Konzentrationen.	75
4.25	Linear angepasste Linienbreitenvariation der Wasserresonanzlinie bei variiertem Dextran 200 und BSA-Konzentration. . . . .	75
4.26	Vergleich des Wassersignals bei variabler BSA- und Ammoniumsulfatkonzentration. . . . .	76
4.27	Vergleich des Wassersignals bei variabler BSA- und Ammoniumsulfatkonzentration. . . . .	77
4.28	Variation des Wassersignals bei gleichbleibender BSA-Konzentration aber verschiedener Ammoniumsulfatkonzentrationen. . . . .	77
4.29	Vergleich hoch aufgelöster NMR-Spektren von BSA mit und ohne Ammoniumsulfat. . . . .	78
4.30	Kurvenanpassungen laut Austauschmodell von Cavanagh <i>et al.</i> für verschiedene Ammoniumsulfat-Zugaben zur IgG-Proteinlösung. . .	78

4.31	Abfall der Wasserfrequenz über steigendem pH-Wert mit und ohne BSA. . . . .	79
4.32	Darstellung der Frequenzverschiebung des Wassers für verschiedene Proteine bei variabler Konzentration. . . . .	80
4.33	Zunehmende Konzentrationsabhängigkeit der (absoluten) Frequenzverschiebung im Verhältnis zur Molekülgröße. . . . .	81
4.34	Darstellung der Relaxationskoeffizienten $1/T_1$ und $1/T_2$ für verschiedene GST-Konzentrationen. . . . .	81
4.35	Darstellung der inversen Relaxationszeiten für verschiedene BSA-Konzentrationen und die wässrige Lösung. Abnahme von $1/T_1$ und Zunahme von $1/T_2$ für steigende BSA-Konzentrationen. . . . .	81
4.36	Relative Wasserfrequenzverschiebung bei unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen von BSA und IgG. . . . .	82
4.37	Modellparameter $k_a$ und $b$ für variables BSA:IgG-Verhältnis. . . . .	82
4.38	Frequenzverschiebung bei 298 K für verschiedene Konzentrationen von Dioxan. . . . .	83
4.39	Frequenzverschiebung bei 298 K für verschiedene TMSP-Konzentrationen. . . . .	84
4.40	Konzentrationsabhängige Frequenzverschiebung für BSA bei 298 K mit TMSP und Dioxan. . . . .	85
4.41	Anstiege der Frequenzverschiebung in Abhängigkeit von der BSA-Konzentration über den temperaturabhängigen Anstiegen. . . . .	86
4.42	Anstiege der Frequenzverschiebung in Abhängigkeit von der BSA-Konzentration über temperaturabhängigen Anstiegen bei variiertes TMSP-Konzentration. . . . .	87
4.43	Darstellung der angepassten Gleichung 2.46 mit Parameter $\Delta_{\max}$ für TMSP. . . . .	88
4.44	Wasserfrequenzen in Lösungen mit TMSP bzw. Dioxan. . . . .	89
4.45	Darstellung der chemischen Verschiebung des Wassersignals für unterschiedliche DSS-Konzentrationen bei 298 K. . . . .	90
4.46	Abhängigkeit der relativ zu externem Chloroform ermittelten Wasser-Resonanzverschiebung von der BSA-Konzentration. . . . .	91
4.47	Darstellung der Protein- und Eisenkonzentrationen der Gewebeextrakte (Cortex) mit und ohne Membranen. . . . .	93

4.48	Frequenzverschiebungen über Eisen- und Proteinkonzentrationen der verschiedenen Gewebeextrakte aus Cortex. . . . .	94
4.49	Darstellung der Frequenzverschiebungen von Wasser verschiedener Gewebextrakte (Cortex) nach Membranextraktion. . . . .	95
4.50	Darstellung der Frequenzverschiebungen von Wasser verschiedener Gewebextrakte (Kleinhirn). . . . .	96
4.51	Gegenüberstellung der Eisen- und Proteinkonzentrationen verschiedener Gewebeextrakte aus Kleinhirn. . . . .	97
4.52	Darstellung der Frequenzverschiebungen bei variierter Temperatur für verschiedene Gewebeextrakte mit und ohne Membranen. . . . .	97
4.53	Darstellung der Korrelation von Eisenkonzentration und Suszeptibilität verschiedener Gewebeextrakte (Kleinhirn). . . . .	98
4.54	Massenverteilungen aus Gelelektrophorese für Myelin und Synaptosomen. . . . .	99
4.55	Zunahme der inversen Relaxationszeit $1/T_1$ bei zunehmender Proteinkonzentration von Kleinhirnextrakten. . . . .	100
4.56	Zunahme der inversen Relaxationszeit $1/T_2$ bei zunehmender Proteinkonzentration von Kleinhirnextrakten. . . . .	101
4.57	Zusammenstellung der Relaxationszeiten $T_1, T_2$ und der Diffusionskonstanten $D$ für zunehmende Proteinkonzentration von Kleinhirnextrakten. . . . .	101
4.58	Darstellung von Suszeptibilität und Austauschterm bei unterschiedlichen IgG-Konzentrationen. . . . .	105
5.1	Vergleich zwischen freier Energie und Wechselwirkungskoeffizient $k_a$ als Funktion des Molekylradius. . . . .	115
5.2	Vergleich zwischen freier Energie und Modellparameter $b$ für variables Proteinverhältnis. . . . .	116





# Tabellenverzeichnis

2.1	Übersicht zu Spin-Quantenzahl, natürlicher Häufigkeit und dem gyromagnetischen Verhältnis $\gamma$ wichtiger Isotope. . . . .	8
3.1	Übersicht über verwendete Proteine und deren Kenngrößen. . . . .	36
3.2	Varierte und bestimmte Parameter, deren Kombinationen sowie Angabe der korrespondierenden Abschnitte im Ergebnisteil. . . . .	41
3.3	Verwendete Referenzsubstanzen und deren zugehörige Frequenzverschiebung $f_0$ . . . . .	48
4.1	Anstiege $\Delta f_T$ der temperaturabhängigen Frequenzverschiebungen für die Pufferlösung (PBS) und Myelin in PBS mit und ohne Dioxan. . . . .	62
4.2	Anstieg $\Delta_{LB}$ der Linienbreiten des NMR-Wassersignals bezogen auf die Konzentration verschiedener Proteine. . . . .	66
4.3	Ermittelte Parameter für die Bindungsstellen N für TMSP am Protein und die Austauschrate $K_d$ . . . . .	88
4.4	Deskriptive Statistik von Parametern der Gewebeextrakte. . . . .	92
4.5	Korrelationen $r$ zwischen Parametern von Gewebeextrakten und $p$ -Werte. . . . .	95
4.6	Korrelationskoeffizienten der Relaxationszeiten $T_1$ , $T_2$ und der Diffusionskonstanten $D$ für Gewebeextrakte aus Kleinhirn. . . . .	102
4.7	Übersicht der Ergebnisse statistischer Auswertung der Gewebeextraktaten hinsichtlich höchster Korrelationen, sowie Hauptkomponenten mit Rotationsfaktoren. . . . .	103
4.8	Austauschterm für verschiedene Gewebeextrakte und Proteine. . . . .	106
4.9	Suszeptibilitätswerte für verschiedene Gewebeextrakte und Proteine. . . . .	106
5.1	Vergleichswerte für die Gewebeextrakte. . . . .	121



# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Hinführung zur Problemstellung

Präzise für Diagnostik und Forschung, dabei schonend für Patienten – das sind zentrale Anforderungen an Bildgebungsverfahren in der Medizin. Um diesen Ansprüchen gerecht zu werden durchlaufen nichtinvasive bildgebende Verfahren, wie Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) und Positronen emissionstomographie (PET), eine fortwährende Entwicklung.

Die größte Bandbreite an Einsatzmöglichkeiten bietet die MRT, da sie durch die Variation technischer Parameter in der Lage ist, eine Vielzahl von unterschiedlichen Bildkontrasten zu erzeugen.

Die MRT-Daten sind komplexwertig. Bei den gebräuchlichsten Anwendungen wird jedoch der Phasenanteil nicht genutzt. Die resultierenden Darstellungen repräsentieren Protonendichte und Relaxationsverhalten des untersuchten Objektes bzw. von dessen Komponenten. In neuerer Forschung erwies sich der Phasenanteil jedoch als nützlich.

Der Phasenkontrast in der Hochfeldmagnetresonanztomographie (HF-MRT; Magnetfeldstärken ab 3 T) zeigt dabei einen überproportional intensivierten Kontrast zwischen weißer (Substantia alba) und grauer Substanz (Substantia grisea) [1]. Hierin zeigen sich insbesondere die Suszeptibilitätsdifferenzen. Daneben wird zusätzliche anatomische Information illustriert, die in der Darstellung der Magnituden (zum Beispiel  $T_1$ -gewichtete MRT) fehlen (s. Abb. 1.1). So sind zum Beispiel Regionen vermehrten Eisengehaltes [2] oder venösen Blutes [3] mit intensiverem Kontrast sichtbar. Daher besitzt der Phasenkontrast ein großes Potential zur Diagno-

## 1.1 HINFÜHRUNG ZUR PROBLEMSTELLUNG

se und Prädiktion beispielsweise neurodegenerativer Erkrankungen, wie Multipler Sklerose oder Alzheimer.

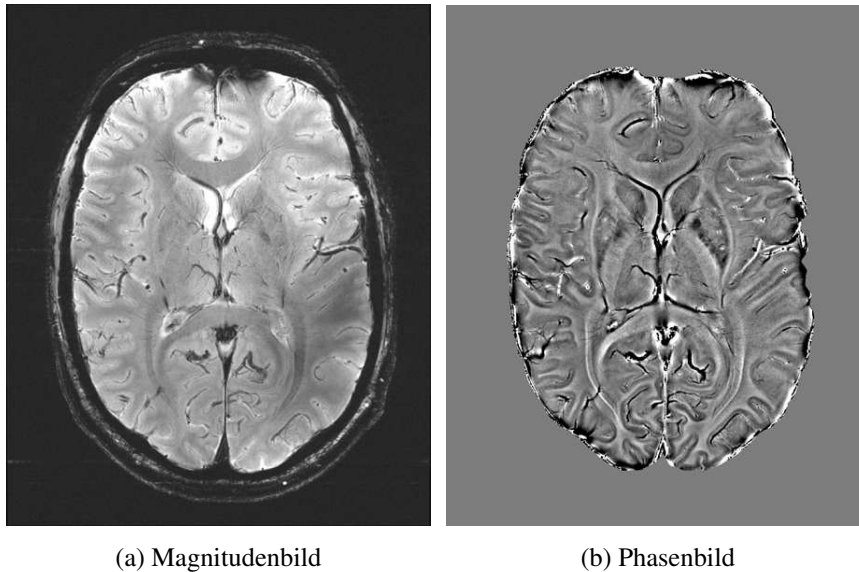


Abbildung 1.1: Der Phasenkontrast (b) zeigt zusätzliche Details im Vergleich zu konventioneller Magnitudenbildgebung (a) in der MRT – insbesondere im Bereich grauer und weißer Substanz sowie in Substrukturen [4].

Bei diesen Erkrankungen sind Läsionen im Gehirn nachweisbar. Die dadurch veränderte Gewebestruktur zeigt sich unter anderem in einem variierenden Phasenkontrast, obwohl die quantitative Zusammensetzung aus Proteinen und Wasser meist unverändert bleibt. Daher ist anzunehmen, dass es eine entscheidende Rolle spielt, wie der Einfluss der Gewebestruktur, d. h. der qualitativen Zusammensetzung, auf das MRT-Signal ist. Grundlegend dabei ist die Suszeptibilität im Bezug auf das statische Magnetfeld des MRT-Gerätes und die elektromagnetischen Einwirkungen in Abhängigkeit von der applizierten Radiofrequenz (RF)-Pulssequenz. Damit lässt sich auch *ein* Teil des Phasenkontrastes zwischen grauer und weißer Substanz erklären [5]. Andererseits ist der Austausch von Magnetisierung zwischen Wasser und Makromolekülen eine Grundlage insbesondere des Phasenkontrastes<sup>1</sup>. Durch diesen Austausch kommt es zu Frequenzverschiebungen, die im Phasenkontrast sichtbar werden.

Grundlage der hier vorliegenden Dissertation ist der Artikel „The molecular basis

---

<sup>1</sup>Auch die Relaxationskontraste basieren auf physikochemischen Wechselwirkungen der beteiligten Moleküle.

for gray and white matter contrast in phase imaging“ [6] von Zhong *et al.* und der Förderungsantrag [7] an das Center for Behavioral Brain Sciences (CBBS) Neuro-Networks<sup>2</sup>. Hierin wird das Modell der Wasser-Makromolekül-Wechselwirkung als Ursache für den guten Phasenkontrast in der Hochfeld-MRT beschrieben. In dieser Arbeit wurde dies an Hand von Messungen der chemischen Verschiebung des Wassersignals in Anwesenheit von Makromolekülen (Proteinen) mittels Nuklearmagnetresonanz (NMR)-Spektroskopie überprüft. Erste Messungen dazu hat unter anderem A. Brensing in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt [8, 9].

Mögliche Ursachen des Phasenkontrastes wurden auch mit Hilfe von Gewebeextrakten aus Rattenhirn bezüglich verschiedener Parameter, wie magnetische Suszeptibilität und Frequenzverschiebung, untersucht.

Es wird gezeigt, dass die Interaktion zwischen Wasser und Makromolekülen einen signifikanten Effekt im Kontext des Phasenkontrastes hervorruft. Damit sollte es möglich sein, einer differenzierteren Diagnostik auf Grund MRT-basierter Bildgebung eine fundiertere Basis zu geben.

## 1.2 Hypothesen und Arbeitsprogramm

**Hypothese 1.** *Magnetische Suszeptibilität und chemische Austauscheffekte wirken sich mit entgegengesetztem Vorzeichen auf die MRT-Frequenzverschiebung aus.*

Die hauptsächlich diamagnetischen Eigenschaften biologischer Substanzen bewirken eine Verschiebung der Resonanzfrequenzen zu kleineren Werten. Dahingegen verursacht der Austausch zwischen Wasser und Makromolekülen im Regelfall eine Verschiebung zu höheren Resonanzfrequenzen.

Daher wurden in dieser Arbeit mittels NMR-Spektroskopie wässrige Lösungen von Makromolekülen (Proteine, langkettige Saccharide) hinsichtlich der Frequenzverschiebung von Wasser untersucht. Variierende Konzentration und Molekülgröße dienten dabei als Kontrollparameter.

**Hypothese 2.** *Magnetische Suszeptibilität und chemische Austauscheffekte sind in ihrem absoluten Verhältnis unterschiedlich groß.*

Da die Suszeptibilität als Hauptursache des Phasenkontrastes herangezogen wird, muss sie quantifiziert und gegenüber dem Austauscheffekt abgegrenzt werden. Dazu

---

<sup>2</sup>Im Internet: <http://www.med.uni-magdeburg.de/neuromd/>.

## 1.2 HYPOTHESEN UND ARBEITSPROGRAMM

wurde eine Methode mit interner und externer NMR-Referenzsubstanz entwickelt und mit verschiedenen Proteinen und Gewebeextrakten durchgeführt.

**Hypothese 3.** *Der Austauscheffekt ist abhängig von physikochemischen Parametern wie Viskosität, Proteingröße und Temperatur, die Auswirkungen auf makromolekularer Ebene haben.*

Die Wirkung des Austausches auf die Resonanzfrequenz ist von Parametern, wie Molekülgröße und -geometrie, Temperatur, Ladungszahl, pH-Wert und Bindungsstellen abhängig. Durch Variation und gegenseitige Beeinflussung dieser Parameter können Schlüsse auf das Zusammenspiel der einzelnen Eigenschaften gezogen werden. Daraus lassen sich allgemeine Aussagen bezüglich des Nachweises (pathologischer) Veränderungen auf makromolekularer Ebene mittels Phasenkontrast ableiten.

# Kapitel 2

## Grundlagen

### 2.1 Vorbemerkungen

Mit zunehmender Verwendung der MRT in der medizinischen Forschung und Diagnostik schreitet auch die technische Entwicklung der verwendeten Gerätschaften voran. Aufgrund der linearen Abhängigkeit der Signalstärke von der Feldstärke des verwendeten statischen Magnetfeldes sind im Laufe der Zeit 1,5 Tesla von 3 Tesla-Geräten abgelöst worden. Mit der Installation des europaweit ersten 7 Tesla-Human-MRT in Magdeburg vor ca. 10 Jahren (und Nachfolgern an verschiedenen Standorten weltweit) zeichnet sich eine fortwährende Entwicklung hin zur Hochfeld-MRT ab. Die bei solchen Feldstärken gewonnenen Phasendaten zeigen bessere Kontraste zwischen grauer und weißer Substanz (vgl. Abb. 1.1), als dies mit konventionellen Techniken unter Zuhilfenahme der Amplitudenbilder möglich war: Es ist eine *nichtlineare* Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses um einen Faktor zwischen zwei und sechs zu verzeichnen [10].

Die in den Phasenbildern manifestierten Frequenzunterschiede  $f$  zeigen sich nach der Formel

$$\varphi = 2\pi f TE \quad (2.1)$$

in der Phase  $\varphi$ , wobei  $TE$  die Echozeit zwischen Anregungspuls und Registrierung der Resonanz ist [11].

Ursachen für diese Frequenzvariation sind in der physikochemischen Zusammensetzung und den damit verbundenen Eigenschaften biologischen Gewebes zu suchen.

Aufgrund des großen Anteils von Wasser im Gehirn (etwa 70% [12]) und der häu-

figen Anwendung von  $^1\text{H-MRT}$ <sup>1</sup> ist eine genauere Betrachtung des Wassersignals mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie im Hinblick auf Frequenzunterschiede naheliegend. Bisherige Anwendungen und Studien des MRT-Phasenkontrastes postulierten als wesentlichen Anteil der Kontrasterzeugung unterschiedliche magnetische Suszeptibilitäten im Gewebe. Die magnetische Suszeptibilität variiert beispielsweise aufgrund verschiedener Eisen- [13, 14] und Myelingealte [15] (hauptsächlich in der weißen Substanz enthalten) und ist zusätzlich von der Orientierung im statischen Magnetfeld abhängig. Damit lassen sich auch Einflüsse der Faserorientierung auf den Phasenkontrast erklären [14, 16]. Des Weiteren lässt sich auch die Frequenzverschiebung aufgrund chemischer Wechselwirkung zwischen Wasser und Gewebebestandteilen als Ursache des Phasenkontrastes anführen [11]. Auch dies kann eine Abhängigkeit von der Faserorientierung erklären [17], da die Diffusion im dichten Gewebe eingeschränkt ist. Die Verhältnisse im wässrigen Milieu, in dem sich die Biologie abspielt, sind insbesondere in der vorliegenden Arbeit von Bedeutung. Daher wurden als Untersuchungsgegenstand Makromoleküle in wässriger Lösung gewählt (vgl. Abschnitt 3.2). Diese wurden mittels NMR-Spektroskopie unter Verzicht auf räumliche Lokalisation (vgl. MRT) hinsichtlich der Frequenzverschiebung des Wassers untersucht (vgl. Abschnitt 3.3).

Im Rahmen der Fokussierung wird in dieser Arbeit die makromolekulare Größenordnung betrachtet. Gleichzeitig wird der daraus erstehende Mangel an Präzision im Bezug auf die Mannigfaltigkeit der Skalen im (menschlichen) Gehirn vom Mikro- zum Zentimeterbereich nicht außer Acht gelassen. Dafür sorgt das während der gesamten Projektlaufzeit durchgeführte CBBS<sup>2</sup>-Projekt. Darin vereint sind Teilprojekte, die von makromolekularer Ebene [18–20] über Experimentell-Allergisch-Encephalomyelitis (EAE)-Ratten-Modelle [21, 22] bis hin zu Studien an Patienten mit Multipler Sklerose (MS) das Phänomen des MR-Phasenkontrastes untersuchen. Dabei bewegen sich die Forschungsfelder in verschiedenen Skalen: einige Nanometer der Hydrathülle, Mikrometer von subzellulären Strukturen und Millimeter der Auflösung von MRT bzw. den beobachtbaren Strukturen.

In den folgenden Abschnitten werden die hier kurz angerissenen Themen weiter ausgeführt, um die Verknüpfung zwischen den Hypothesen und den angewandten Methoden bzw. den erzielten Ergebnissen zu vermitteln: Zunächst folgt eine Einfüh-

---

<sup>1</sup>Siehe dazu weiter unten in den Abschnitten 2.2.2, S. 7, und 2.4.1, S. 15.

<sup>2</sup>CBBS = Center for Behavioral Brain Sciences, Magdeburg.



rung in die Grundlagen der MRT, insbesondere aber der NMR-Spektroskopie, da sie die verwendete Methode der vorliegenden Arbeit ist. Danach wird ein Überblick zu den Kontrasten gegeben, die in der MRT auftreten können und Bezug zu den hier ergründeten Ursachen des Phasenkontrastes – magnetischer Suszeptibilität und chemischem Austausch – hergestellt. Ein größerer Abschnitt befasst sich sodann multiperspektivisch mit den Ursachen des Wasser-Makromolekül-Austauschs. In einem gesonderter Abschnitt werden die Besonderheiten der NMR-Referenzsubstanzen im Kontext des Austauschs beleuchtet und am Ende des Kapitels werden schließlich die Parameter, die den Phasenkontrast beeinflussen, zusammengefasst.

## 2.2 Einführung zu NMR und MRT

### 2.2.1 Vorbemerkungen

Bei der Aufklärung der Ursachen der phänomenologischen Effekte im MR-Phasenkontrast, die sich hauptsächlich im Mikro- bis Millimeterbereich manifestieren, kommen Methoden der nicht-invasiven NMR-Spektroskopie (vgl. Kapitel 3) zum Einsatz, welche ihre Sensitivität bis hin zum Nanometerbereich haben. Die makroskopischen Effekte lassen sich so präzise und mit den in der Anwendung der MRT vergleichbaren Mitteln beobachten und analysieren.

### 2.2.2 NMR-Spektroskopie

Quantenmechanisch betrachtet besitzt jedes Elementarteilchen einen Eigendrehimpuls (Spin). Für einen Atomkern resultiert der Gesamtdrehimpuls  $p$

$$p = \hbar \sqrt{I(I + 1)} \quad (2.2)$$

mit dem reduzierten Planckschen Wirkungsquantum  $\hbar = h/2\pi$  und der Spinquantenzahl  $I$ . Mit der Parallelität von magnetischem Moment  $\vec{\mu}$  und Spin  $\vec{p}$

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{p} \quad (2.3)$$

lässt sich das gyromagnetische Verhältnis  $\gamma$  des betrachteten Kerns abzuleiten [23]. Dieser ist für jeden Kern abhängig von seiner Konfiguration, d. h. der Zusammensetzung des Atomkerns aus Neutronen und Protonen unterschiedlicher Quantenzahlen (s. Tab. 2.1).

## 2.2 EINFÜHRUNG ZU NMR UND MRT

Tabelle 2.1: Übersicht zu Spin-Quantenzahl, natürlicher Häufigkeit und dem gyromagnetischen Verhältnis  $\gamma$  wichtiger Isotope [24].

Isotop	Spin $I$	$\gamma$ [ $10^7$ rad/Ts]	Häufigkeit [%]
$^1\text{H}$	$1/2$	26,7522	99,9885
$^{13}\text{C}$	$1/2$	6,7283	1,07
$^{15}\text{N}$	$1/2$	-2,7126	0,368
$^{17}\text{O}$	$5/2$	-3,6281	0,038
$^{19}\text{F}$	$1/2$	25,1815	100
$^{31}\text{P}$	$1/2$	10,8394	100

Die Anwesenheit eines magnetischen Feldes  $B_0$  bewirkt eine Präzessionsbewegung des Kernspin um eine Achse parallel zum Magnetfeld [23] mit der Kreisfrequenz  $\omega_0$ , die als Larmor-Frequenz bezeichnet wird:

$$\omega_0 = -\gamma B_0 \quad (2.4)$$

Unter dem Einfluss eines äußeren Magnetfeldes tritt der Zeeman-Effekt auf, d. h. eine Aufspaltung der Energiezustände in Abhängigkeit von der Magnetquantenzahl  $m$  ( $I, I-1, I-2, \dots, -I+1, -I$ ). Daraus resultiert, dass ein Kern mit Spin  $I$  eine Zahl von  $2I + 1$  Zuständen einnehmen kann. Bei Protonen ( $^1\text{H}$ -Kern) mit Spin  $I = 1/2$  ergeben sich daher zwei mögliche Spin-Zustände ( $\alpha$  und  $\beta$ ) welche unterschiedlichen Energieniveaus entsprechen: niedrig bei paralleler ( $\alpha$ ) und hoch bei antiparalleler ( $\beta$ ) Ausrichtung zum äußeren Magnetfeld (s. Abb. 2.1).

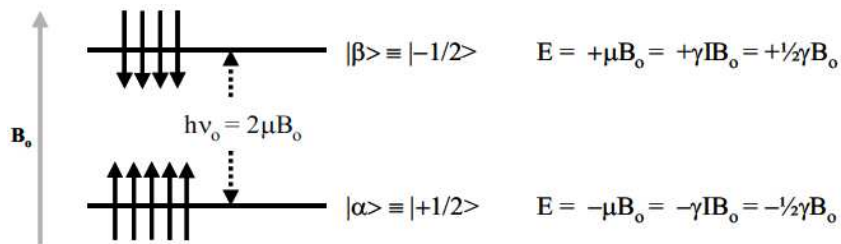


Abbildung 2.1: Energieniveaus für einen Kern mit Spin  $I = 1/2$  bei eingeschaltetem äußeren Magnetfeld ( $B_0$ ) [25].

Die verschiedenen Besetzungszustände stehen zueinander im Verhältnis

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{\frac{-\Delta E}{kT}} = e^{\frac{-h\nu_0}{kT}} \approx 1 - \frac{h\nu_0}{kT} \quad (2.5)$$

## KAPITEL 2 GRUNDLAGEN

und unterliegen somit der Boltzmann-Verteilung, was für hohe Temperaturen ( $T > 4 \text{ K}$ ) auf der rechten Seite mit dem ersten Glied der Taylor-Reihe approximiert ist [25].

Um den Energiesprung von  $\alpha$  zu  $\beta$  durch Immission einer elektromagnetischen Welle zu realisieren, muss Bohrs Resonanzbedingung

$$\Delta E = h\nu_0 \quad (2.6)$$

unter Einbeziehung des Planckschen Wirkungsquantums  $h$  und der Larmor-Frequenz  $\nu_0$  erfüllt sein. Ausgehend von dieser energetischen Anregung durch RF-Pulse relaxiert der Kern, d. h. er kehrt zum ursprünglichen Energiezustand zurück und emittiert dabei mit gleicher Frequenz die zuvor induzierte Energie.

Gleichzeitig richtet sich bei der Absorption die Nettomagnetisierung aus der longitudinalen Ausrichtung parallel zum Magnetfeld (z-Richtung) hin zu maximaler transversaler Orientierung (xy-Ebene) aus. Die Relaxation der Magnetisierung nennt man freien Induktionszerfall, englisch *Free Induction Decay* (FID). Die Bloch-Gleichungen beschreiben diesen Prozess der zeitlichen Variation der Magnetisierung  $\vec{M}$  in den drei Raumrichtungen (Ausgangsmagnetisierung  $\vec{M}_0$  in z-Richtung) in Form von Differentialgleichungen:

$$\begin{aligned} \frac{dM_z}{dt} &= -\frac{M_z - M_0}{T_1} \\ \frac{dM_x}{dt} &= \omega_0 M_y - \frac{M_x}{T_2} \\ \frac{dM_y}{dt} &= -\omega_0 M_x - \frac{M_y}{T_2} \end{aligned} \quad (2.7)$$

Die damit verbundenen Relaxationsprozesse werden in longitudinale und transversale Relaxation unterschieden. Erstere bezieht sich auf die Wiederherstellung der Nettomagnetisierung  $M_0$ , wie sie durch das Verhältnis in Gl. 2.5 beschrieben ist. Die Energie wird dabei an das Gitter der (molekularen) Bindung abgegeben, weshalb dieser Vorgang als Spin-Gitter-Relaxation bezeichnet wird. Die Zeitkonstante für die longitudinale Relaxation wird mit  $T_1$  bezeichnet. Für den transversalen Relaxationsprozess, der durch Spindephasierung (Spin-Spin-Wechselwirkung) bestimmt wird, ist die Zeitkonstante  $T_2$  für den Verlust der Quermagnetisierung definiert. Feldinhomogenitäten verursachen meist eine schnellere Relaxation mit  $T_2^*$  [26]:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{2} \gamma \Delta B_0 + \frac{1}{T_2}. \quad (2.8)$$

Das Relaxationsverhalten hat dabei lediglich einen Einfluss auf die resultierende Linienform, hier dargestellt als  $g(\nu)$  im Frequenzraum:

$$g(\nu) = \frac{2T_2}{1 + 4\pi^2 T_2^2 (\nu_0 - \nu)^2} \quad (2.9)$$

d. h. die Linienbreite ist proportional zu  $1/T_2$  und hat die Form einer Lorentz-Kurve. Die resultierenden Resonanzfrequenzen im NMR-Spektrum sind dabei unabhängig vom Relaxationsverhalten. Dahingegen stehen die Resonanzfrequenzen im Zusammenhang mit der resultierenden Magnetisierung einzelner Spins aufgrund des auf sie wirkenden Magnetfeldes.

Durch die Umgebung der betrachteten Spins (hier Makromoleküle in der Umgebung von Wasser) ergeben sich spezifische Änderungen des effektiven Magnetfeldes. Dazu tragen beispielsweise die magnetische Suszeptibilität des Kerns selbst, die abschirmende Wirkung der Elektronen im 1s-Orbital, strukturell benachbarte Kerne (z. B. im Molekül) und temporär benachbarte Spins bei. Letzteres ist beispielsweise durch chemische Wechselwirkung oder Protonenaustausch insbesondere mit dem Lösungsmittel, also Wasser, gegeben. Dies wird auch als Magnetisierungstransfer<sup>3</sup> bezeichnet. Durch die Summe der Effekte ergeben sich verschiedene Resonanzfrequenzen oder auch *chemische Verschiebungen*

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} \cdot B_0 \cdot (1 - \sigma), \quad (2.10)$$

charakterisiert durch die Abschirmungskonstante  $\sigma$ .

Um eine von der Magnetfeldstärke unabhängige und damit zwischen Messungen bei unterschiedlichen Feldstärken vergleichbare chemische Verschiebung  $\delta$  zu erhalten, wird das Verhältnis der ermittelten Frequenz  $\nu_X$  relativ zu einer chemischen Referenzsubstanz mit Frequenz  $\nu_{\text{Ref}}$  zur Resonanzfrequenz<sup>4</sup>  $\nu_{\text{Mess}}$  bestimmt und in *parts per million* angegeben:

$$\delta(X) = \frac{\nu_X - \nu_{\text{Ref}}}{\nu_{\text{Mess}}} \cdot 10^6 \quad [\text{ppm}] \quad (2.11)$$

Eine nähere Betrachtung von NMR-Referenzsubstanzen im Kontext dieser Arbeit erfolgt ausführlich in Abschnitt 2.8.

In der NMR-Spektroskopie wird der FID in der Regel mit der gleichen Spule registriert, mit der auch die elektromagnetische Anregung induziert wird. Das ermittelte

<sup>3</sup>Englisch: Magnetization Transfer (MT)

<sup>4</sup>Bezogen auf die Kernsorte (z. B. <sup>1</sup>H) auf die das NMR-Experiment abzielt.

Signal ist eine Kombination aus Absorption (x-Komponente der transversalen Magnetisierung, Realteil) und Dispersion (y-Komponente, Imaginärteil) und kann so als komplexwertiges Signal betrachtet werden. Mit Hilfe der Fourier-Transformation

$$g(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t)e^{-i\omega t} dt \quad (2.12)$$

wird das Signal aus der Zeitdomäne  $f(t)$  (s. Abb. 2.2a) in die Frequenzdomäne  $g(\omega)$  überführt (s. Abb. 2.2).

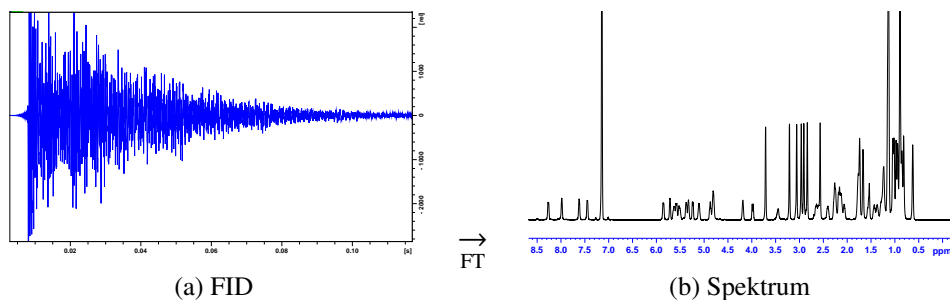


Abbildung 2.2: (a) Darstellung des freien Induktionszerfalls und (b) der Spektraldarstellung (fouriertransformierter FID) am Beispiel von Cyclosporin mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie.

Die gewonnenen NMR-Spektren können, wie bspw. in der obigen Abbildung dargestellt, sehr komplex sein und genaue Aufschlüsse über die chemische Komposition und Molekülstruktur einer Substanz geben. Darüber hinaus sind Interaktionen einzelner Substanzen (hier Wasser und Makromoleküle) im NMR-Spektrum und damit im MRT-Phasenkontrast verschlüsselt, was das Hauptinteresse dieser Arbeit darstellt. Darauf wird insbesondere im Abschnitt 2.6.3 (S. 25) eingegangen.

### 2.2.3 Magnetresonanztomographie

Die MRT hat ihren Ursprung in der Anwendung von NMR-Spektroskopie auf Gehirnextrakte [27]. Dies brachte Lauterbur im Jahre 1971 auf die Idee, mittels magnetischer Gradienten den lokalen Ursprung eines FID-Signals innerhalb des (*in vivo*) zu untersuchenden Individuums zu kodieren [28]. Damit war der Weg zur Anwendung auch in der Medizin bereitet.

Die detaillierte technische Umsetzung und Funktionsweise der MRT soll in dieser Arbeit zugunsten der Konzentration auf NMR-Spektroskopie nicht näher betrachtet

werden. Bei weitergehendem Interesse kann in entsprechender Literatur, z. B. bei Haacke [29], nachgelesen werden.

Im Folgenden werden die wichtigsten angewandten MRT-Kontraste und deren materielle Ursachen dargestellt. Dies dient dazu, die gewonnenen Erkenntnisse aus der NMR-spektroskopischen Untersuchung in das Feld der Bildgebung übertragen zu können und einen kurzen Überblick über andere Kontraste (neben dem Phasenkontrast) zu geben.

## 2.3 Überblick zu Kontrasten in der MRT

### 2.3.1 Vorbemerkungen

Hinsichtlich der generierten Kontraste in der MRT sind Relaxation<sup>5</sup>, Spindichte, magnetische Suszeptibilität, elektrische Leitfähigkeit des Gewebes, chemische Verschiebung und Diffusionseigenschaften maßgebliche Parameter der zu untersuchenden Objekte und Subjekte. Variationen dieser Parameter im betrachteten Untersuchungsobjekt erzeugen somit differenzierte Kontraste. Für die Darstellung dieser Kontraste werden unterschiedliche Sequenzen aus Gradienten- und RF-Feldern angewendet, womit eine Sensibilisierung auf verschiedene Parameter bzw. Parameterbereiche erfolgt (vgl. [30]).

Wie bereits in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, bildet der transversale Anteil der Magnetisierung das komplexwertige Signal in der MRT. Daraus werden in der NMR-Spektroskopie die Frequenzanteile  $f_i$  berechnet (vgl. Gl. 2.12). In der MRT hingegen wird im Wesentlichen die Amplitude, d. h. die Signalintensität ( $S = \sum f_i$ ) betrachtet. Demgegenüber spiegelt sich bei der Phasenbildgebung die Frequenzverschiebung  $f$  wieder (s. Gl. 2.1).

Die Spindichte (oder auch Protonendichte) bildet sich direkt in MRT-Bildern ab und ist die am einfachsten zu erklärende Kontrastursache. Wie bereits im vorigen Abschnitt dargestellt, sind Relaxationsprozesse als dissipative Effekte die Hauptverantwortlichen bei der Generierung von Kontrasten. Diese sind aber nur eine Eigenschaft im Zusammenspiel vieler Faktoren, wie sie sich im Signal-Rausch-Verhältnis darstellen lassen:

$$\text{SNR} \propto N\gamma^{5/2}B_0^{3/2}T^{-3/2}I(I+1)\sqrt{T_2/T_1}\sqrt{t_{\text{Mess}}}. \quad (2.13)$$

---

<sup>5</sup>Bestimmt durch die Zeitkonstanten  $T_1$ ,  $T_2$  und  $T_2^*$

## KAPITEL 2 GRUNDLAGEN

Dabei sind die Anzahl der Spins  $N$ , das gyromagnetische Verhältnis  $\gamma$ , die statische Magnetfeldstärke  $B_0$ , Temperatur  $T$ , Spinquantenzahl  $I$ , Relaxationskonstanten  $T_1$  und  $T_2$  sowie die Messzeit  $t_{\text{Mess}}$  die wesentlichen Variablen in der MRT-Bildgebung. Dabei ist der Faktor  $\sqrt{T_2/T_1}$  abhängig von der gewählten Sequenz – hier in der Form, dass  $90^\circ$ -RF-Pulse mit zeitlichen Abständen von  $t_n = T_1$  gesendet werden, d. h. die Anzahl der Messungen  $n = t_{\text{Mess}}/T_1$  ist.

Durch Variation der Repetitionszeit  $TR$  zwischen Anregungspulsen und der Echozeit  $TE$  vor der Aufnahme des Signals können beispielsweise  $T_1$ - und  $T_2$ -gewichtete Bilder generiert werden, da folgende Zusammenhänge zwischen Spindichte  $\rho$  und Signal  $S$  bestehen (einfache Sequenz bestehend aus  $90^\circ$ -RF-Pulsen):

$$\begin{aligned} S &\propto \rho \left(1 - e^{-TR/T_1}\right) \\ S &\propto \rho e^{-TE/T_2} \end{aligned} \quad (2.14)$$

Direkt im Zusammenhang mit den sich darin widerspiegelnden Relaxationsprozessen stehen *chemische Austauschprozesse*, welche zusätzlich zum Einfluss auf die Amplitudenbildung auch Phasenkontrast generieren.

Die zum Phasenkontrast beitragenden Anteile wurden von Wharton [31] wie folgt zusammengefasst:

- isotrope und anisotrope magnetische Suszeptibilität
- chemischer Austausch
- Mikrostruktur

Dies lässt sich in der Gleichung

$$\Delta f = \Delta f_{\text{Suszeptibilität}} + \Delta f_{\text{Austausch}} + \Delta f_{\text{Mikrostruktur}} \quad (2.15)$$

ausdrücken, die die zuvor genannten Anteile in gleicher Reihenfolge enthält.

Die Leitfähigkeit des Gewebes trägt ebenfalls zum Phasenkontrast bei. Die einzelnen Anteile unterscheiden sich maßgeblich in ihrer Abhängigkeit von der Richtung des Magnetfeldes und der geometrischen Gewebestruktur. Dazu sollen die für den Phasenkontrast wesentlichen Ursachen im Folgenden genauer betrachtet werden.

### 2.3.2 Suszeptibilität und Phasenkontrast

Zum Phasenkontrast trägt anteilig direkt die (isotrope und anisotrope) magnetische Suszeptibilität  $\chi$  bei, da die physikalische Beeinflussung des Magnetfeldes<sup>6</sup> die Resonanz der Kerne variieren lässt. Mit der Echozeit  $TE$  der Signalaufnahme spiegelt sich im Phasenkontrast (s. Gl. 2.1) eine Variation der Larmor-Frequenz und damit indirekt das mittlere lokale Magnetfeld der Wasserstoffkerne wieder. Makroskopische Verzerrungen des Magnetfeldes  $B_0$  beeinflussen direkt die Larmor-Frequenz (vgl. Gl. 2.4):

$$\omega_\chi(\vec{r}, \vec{B}_0) = -\gamma \cdot \Delta B(\vec{r}) . \quad (2.16)$$

Die lokale Magnetfeldverzerrung im Volumen  $V$  hängt dabei von der Richtung des Magnetfeldes und der umgebenden Verteilung der effektiven magnetischen Suszeptibilität  $\chi$  ab:

$$\Delta B(\vec{r}) = |\vec{B}_0| \cdot \int_V \chi(\vec{r}') \cdot \frac{3 \cdot \cos^2 \theta - 1}{4\pi \cdot |\vec{r} - \vec{r}'|} d\vec{r}' \quad (2.17)$$

wobei der Winkel  $\theta$  die Ausrichtung der Gewebestruktur gegenüber dem Magnetfeld  $B_0$  im Bogenmaß ausdrückt und die magnetische Suszeptibilität beeinflusst. Diese Betrachtungen machen sich die Generalisierung von Dipolfeldern, wie sie von Atomkernen generiert werden, in Form von Lorentz-Kugeln zu Eigen. Genauere Ergebnisse werden erzielt, wenn statt Kugeln Ellipsoide betrachtet werden [32], was insbesondere die Form von Wassermolekülen besser repräsentiert (s. Abschnitt 2.4.2, S. 17). Damit kann beispielsweise die Wasserfrequenzverschiebung  $\Delta f_{\text{Axon}}$  (bezogen auf die Larmorfrequenz  $f_0$ ) eines Axons mit Zytosol ausgedrückt werden als

$$\frac{\Delta f_{\text{Axon}}}{f_0} = 2\pi (\chi_{\text{Axon}} - \chi_{\text{Zytosol}}) \sin^2 \vartheta + \frac{4}{3} \pi \chi_{\text{Zytosol}} \quad (2.18)$$

mit dem Winkel  $\vartheta$  zwischen der Richtung des Axons und des externen Magnetfeldes  $B_0$  [33].

Im Bereich kurzer Echozeiten  $TE$  wurde ein nichtlinearer Effekt der Phasenentwicklung (entgegen Gl. 2.1) von Schweser *et al.* gezeigt [34], der in der Modellbildung und entsprechender Anwendung bei der Wahl der Sequenzparameter in der Bildgebung ebenfalls Beachtung finden muss.

In einer Studie bei einer Feldstärke von  $B_0 = 7 \text{ T}$  wurde eine Frequenzverschie-

<sup>6</sup>Bündelung im Falle para-/ferromagnetischer ( $\chi > 0$ ) bzw. Abschwächung des Magnetfeldes durch diamagnetische ( $-1 < \chi < 0$ ) Substanzen.



bung von etwa 2 Hz aufgrund von Suszeptibilitätsunterschieden im Gehirn festgestellt [10].

### 2.3.3 Austausch und Phasenkontrast

Die schnellen Wechselwirkungen zwischen Wasser und Makromolekülen – Wasser-Makromolekül-Austausch (WMA) – führen ebenfalls zu Änderungen der Larmor-Frequenz in der Form

$$\omega_{\text{WMA}} = \Xi(\vec{r}) \cdot c(\vec{r}) \quad (2.19)$$

mit der Konzentration der Makromoleküle  $c$  und dem Austauschterm  $\Xi$  am Ort  $\vec{r}$ . Diese Frequenzänderung ist im Gegensatz zur magnetischen Suszeptibilität nicht von der Ausrichtung zum Magnetfeld abhängig (wie soeben erläutert) und im Allgemeinen den (in biologischen Systemen) suszeptibilitätsbedingten (diamagnetischen) Frequenzänderungen entgegengesetzt [33, 35, 36].

Im folgenden Abschnitt soll das Thema *Austausch* ausführlicher und aus verschiedenen Blickwinkeln (biologisch, chemisch und physikalisch) betrachtet werden. Dabei wird auch Bezug auf die Mikrostruktur genommen, die ebenfalls den betrachteten Phasenkontrast beeinflusst.

## 2.4 Ursachen des Wasser-Makromolekül-Austauschs

### 2.4.1 Zusammensetzung biologischer Materie

Betrachtet man die Ursachen des MRT-Phasenkontrastes auf der Ebene des chemischen Austauschs, so stellt sich zunächst die grundsätzliche Frage, welcher Austausch in den hier aufgeführten Überlegungen betrachtet werden soll.

Dazu ist zunächst zu klären, welche Interaktionspartner in dem betrachteten System (hier biologisches Material in Form von Gehirnen) in Frage kommen. Der hohe Wasseranteil in biologischem Gewebe und die Skalenvariabilität, d. h. die unterschiedlichen Längenskalen der funktionellen und organisatorischen Strukturen, sind als Besonderheiten hervorzuheben. Auf makromolekularer Ebene besteht biologische Materie – in der hier relevanten Skala des Gewebes – aus Proteinen, Zytoskelett, Lipidmembranen, Zytoplasma etc. (vgl. [37, 38]). Das zunehmende Auflösungsvermögen der MRT im Bereich der Moleküle ist gerade hier von zunehmendem Interesse. Es sei dabei insbesondere auf Forschungen im Bereich der Metabo-

## 2.4 URSACHEN DES WASSER-MAKROMOLEKÜL-AUSTAUSCHS

liten und Neurotransmitter hingewiesen. Diese und die vorliegende Studie finden an der Schnittstelle zwischen Chemie (Nanometer-Auflösung) und Medizin (üblicherweise im Millimeter- bis Zentimeter-Bereich) statt. Dabei ist der *lokale* Fettgehalt von Hirngewebe nicht zu vernachlässigen: etwa 80% in Myelin, 49-66% in weißer Substanz und 36-40% in grauer Substanz [39]. Hinsichtlich der Wechselwirkung mit Wasser spielt dies jedoch eher eine untergeordnete Rolle aufgrund der hydrophoben Eigenschaften der Lipide.

Insbesondere wegen der funktionalen Eigenschaften<sup>7</sup> sind Proteine Gegenstand besonderen Interesses innerhalb dieser Arbeit. Dies wird im Kapitel 3 näher erläutert (S. 35). Proteine sind zusammengesetzt aus Aminosäuren. Es gibt insgesamt 20 kanonische Aminosäuren, die proteinogen sind. Davon sind sechs lipophil, alle anderen hydrophil. Aufgrund der Zusammensetzung von Proteinen aus vielen unterschiedlichen Aminosäuren, sind Proteine in ihrer Primärstruktur amphiphil. Beim Faltungsprozess der Primärstruktur (in wässriger Lösung) aggregieren hydrophobe Aminosäuren in Inneren und die hydrophilen Aminosäuren werden an der Oberfläche des Proteins exponiert. Dabei können sich aber auch, insbesondere aus funktionalen Gründen, Kavitäten mit hydrophoben Aminosäuren an der Oberfläche des Proteins bilden. Daraus resultiert überwiegend hydrophiles und stellenweise hydrophobes Verhalten der Proteine aufgrund der so gebildeten Sekundär- und Tertiärstruktur. Die Proteinfaltung ist ein Prozess im Sinne der Selbstorganisation und wird vor allem durch die amphiphile Komposition begünstigt. Dadurch ist im Wesentlichen auch die Stabilität der bis zu mehrere Tausend<sup>8</sup> Aminosäuren umfassenden Moleküle gewährleistet.

Beim Faltungsprozess werden auch Wassermoleküle im Protein eingeschlossen. Tatsächlich sind etwa 0,2 bis 0,4 g Wasser je Gramm Protein fest am bzw. im Protein gebunden [41]. Auch dies begünstigt die Bildung einer funktionell relevanten Hydrathülle um Proteine herum. Durch Diffusion (s. u.) und Neubildung von Wasserstoffbrückenbindungen kommt es zum Austausch von Wassermolekülen zwischen der Hydrathülle bzw. dem Protein und dessen freien Bindungsstellen an der Oberfläche und freiem Wasser. Die hierbei in Frage kommenden Bindungsstellen für Wasser sind Hydroxy- (-OH), Carboxyl- (-COOH) und Amino-Gruppen (-NH<sub>2</sub>, -NH),

<sup>7</sup>Proteine fungieren im Wesentlichen als Enzyme und haben Bedeutung beim Transport von verschiedenen Substanzen innerhalb des Körpers – durch Membranen hindurch oder subzellulär.

<sup>8</sup>Im Falle des hier verwendeten BSA, welches häufig im Blut vorkommt, sind es 582 Aminosäuren [40].

welche in einem breiten Bereich von etwa 1 bis 7 ppm des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums in Erscheinung treten.

Darüber hinaus sind die elektromagnetischen Eigenschaften biologischer Materie in der MRT von herausragender Bedeutung. Biologisches Gewebe ist zumeist diamagnetisch, lediglich desoxygeniertes Hämoglobin und Eisenablagerungen sind paramagnetisch. Die vielfältige Zusammensetzung des Gewebes bezüglich der vorkommenden Atome und Längenskalen kann Unterschiede in der magnetischen *Suszeptibilität*, wie durch paramagnetischen Sauerstoff [42], und der physikochemischen *Wechselwirkung*, wie durch Restriktion der Bewegung [43], zeigen.

Auch die Geometrie ist sehr vielfältig: die Organisationseinheiten der Zelle haben verschiedenste Ausprägungen geometrischer Formen. Im Gehirn, insbesondere in der weißen Substanz, sind (Nerven-)Fasern formbestimmend und damit auch für die physikochemische Wirkung dieser Mikrostruktur maßgeblich. So sind, wie weiter unten beschrieben, Vergleiche zwischen Gewebe und Poren in Gestein im Hinblick auf die Wechselwirkung des Wassers in bestimmten Längenskalen naheliegend (vgl. [43]).

### 2.4.2 Besonderheiten von Wasser

Im vorigen Abschnitt habe ich bereits mit der Besonderheit der Lokalisation im wässrigen Milieu vertraut gemacht. Dazu möchte ich noch ein paar Hinweise zur Besonderheit des Wassers selbst geben.

Zunächst ist darauf hinzuweisen, dass Wasser als polare Substanz mit tetraedrischer Form ein ausgeprägtes Bindungsverhalten über Wasserstoffbrückenbindungen aufrecht erhält. Es entsteht das sogenannte *Clustering* von Wassermolekülen, die so eine gewisse Nahordnung erhalten (gefaltet hexagonal bzw. nahezu plan pentagonal) [44]. Im Gegensatz zu anderen Flüssigkeiten erhöht sich dadurch das spezifische Volumen bei steigender *und* abnehmender Temperatur (Anomalie des Wassers) – ausgehend von einer Temperatur von etwa  $4\text{ }^\circ\text{C}$ .

Hinzu kommt die Fähigkeit, einen schnellen Protonenaustausch zu begünstigen [44]. Die vorhandenen Bindungen sind also flexibel genug, um einen schnellen Molekültransport zu gewährleisten.

Die hohe Polarisierbarkeit und die unsymmetrische Ionenverteilung sind ein weiterer wichtiger Aspekt (beispielsweise die Leitfähigkeit von Gewebe betreffend). Eine generalisierte Lorentz-Approximation (vgl. Abschnitt 2.3.2) ist daher für Wasser

## 2.4 URSACHEN DES WASSER-MAKROMOLEKÜL-AUSTAUSCHS

nicht ohne Kompromisse anwendbar und sollte daher auf das sphärische Lorentz-Modell erweitert werden, wie von He *et al.* gefordert [33].

### 2.4.3 Physikochemische Wechselwirkungen im Kontext der NMR-Spektroskopie

Generell gibt es eine Vielzahl an Wechselwirkungen zwischen Wasser und den Bestandteilen biologischen Gewebes. Einige der Prozesse lassen sich mit Hilfe von NMR-Spektroskopie oder auch in der MRT gezielt untersuchen. Als gebräuchliche Messmethoden sind beispielsweise *Magnetization Transfer* (MT) [45] und *Chemical Exchange Saturation Transfer* (CEST) [46] zu nennen. Diese Methoden sind jedoch sehr selektiv (Begrenzung auf schmale Frequenzbereiche), beziehen eine komplizierte Pulssequenz ein und erfordern eine mehrschrittige Auswertung. Auch *Chemical Shift Imaging* (CSI) wäre in dieser Hinsicht eine Methode, die sogar mittels Bildgebung auf direktem Wege chemische Verschiebungen visualisieren würde. Jedoch ist hierbei das Auflösungsvermögen wesentlich geringer, als bei der Phasenbildgebung. Im Gegensatz dazu bietet die Phasenkontrastbildgebung den Vorteil, direkt im hochaufgelösten Bild die mittleren Frequenzverschiebungen darzustellen, die (neben u. a. Suszeptibilitätsunterschieden) durch den Wasser-Makromolekül-Austausch bewirkt werden.

Der Prozess des Austausches lässt sich als Übertragung von elektromagnetischem Spin zwischen Protonen des Wassers und Protonen von Makromolekülen bzw. deren Hydrathüllen [47, 48] durch deren Bewegung im Raum beschreiben. Dadurch bewirkt der Austausch veränderte Resonanzfrequenzen, wie weiter unten beschrieben. Die damit verbundenen Vorgänge finden in Zeitskalen statt, die schnelle Bewegungen, wie Vibration oder Rotation (etwa  $10^{-10} - 10^{-6}$  s, s. Abb. 2.3), beinhalten. Unterscheidet man hierbei die einzelnen Ursachen nach klassischen Wissenschaftsgebieten, so kann man den Sachverhalt des Wasser-Makromolekül-Austauschs vereinfacht wie folgt beschreiben:

- physikalisch: Brownsche Bewegung (Diffusion)
- chemisch: chemische Bindung (van-der-Waals- und Wasserstoffbrückenbindung)

## KAPITEL 2 GRUNDLAGEN

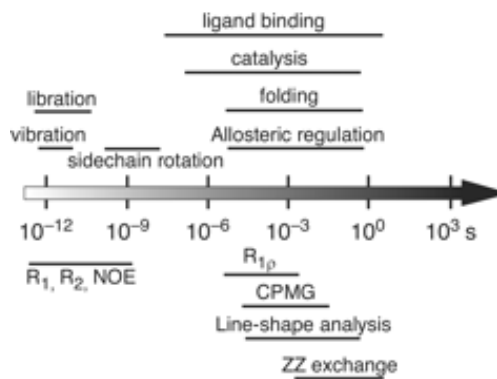


Abbildung 2.3: Zeitskalen von Proteindynamik (oben) und NMR-Verfahren (unten) [49]. Proteinbewegungen und NMR Relaxationsverfahren zur Erforschung umfassen mehr als 12 Größenordnungen der Zeitskala.

Zusammengenommen führen beide Teilaspekte zu chemischem<sup>9</sup> Austausch zwischen Wasser und Makromolekülen und folglich zu wechselnder physikochemischer Umgebung der betrachteten Spins.

Die Beeinflussung beider Prozessarten (Diffusion und Bindung) wird durch physikalische Parameter, wie Temperatur und Phasengrenzen (Bewegungsrestriktion in Folge der Geometrie), sowie chemische Einflussgrößen, wie pH-Wert und Konzentration, direkt beeinflusst. Durch Änderungen der Temperatur lassen sich zudem weitere Parameter, wie Viskosität und Proteinkonformation, beeinflussen. Letztere ist zudem abhängig von pH-Wert und Polarität bzw. Ionenstärke als chemische Parameter, was z. B. mit dem Vorhandensein bestimmter Salze [50] zusammenhängt. Im Folgenden sollen tiefer gehende Aspekte betrachtet werden, die ihrerseits Einflüsse auf Diffusion und chemische Bindung haben. Obwohl physikalische und chemische Parameter miteinander in Wechselwirkung stehen, erfolgt der Übersicht halber eine getrennte Reflexion. Dabei wird insbesondere auf die Betrachtungsweise mittels NMR-Spektroskopie Wert gelegt. Demzufolge ist der einbezogene Energieeinfluss im Bereich elektromagnetischer Energie zu verzeichnen.

<sup>9</sup>Im Folgenden soll dieser Begriff beibehalten werden, wobei in den allermeisten Fällen gleichzeitig auch die physikalischen Auswirkungen gemeint sind. Demzufolge müsste eigentlich von „physikochemischem“ Austausch gesprochen werden.

## 2.5 Physikalische Mechanismen im Kontext der Diffusion

### 2.5.1 Vorbemerkungen

Zu den physikalischen Mechanismen des Wasser-Makromolekül-Austausches zählen thermische, elektrostatische und durch Aggregation von Mikroteilchen (hier insbesondere Makromoleküle) bedingte Veränderungen der Diffusion. Damit variiert die Nähe der Protonen zu anderer chemischer und physikalischer Umgebung, d. h. Magnetisierung und daraus resultierende Resonanzfrequenzen dieser Wasserprotonen ändern sich. Wichtig hierbei ist die mittlere Verweildauer eines Wassermoleküls an den zum Teil fraktalen<sup>10</sup> Oberflächen von Makromolekülen [51]. Dies drückt sich in den Umorientierungszeiten aus, die mit den Rotationszeiten der Makromoleküle ins Verhältnis gesetzt werden können. Diese sogenannten *correlation times* bewegen sich in Größenordnungen von Mikro- bis Picosekunden, z. B. für Wasser  $\tau_d \approx 6,1 \cdot 10^{-10}$  s und für BSA  $\tau_p \approx 7,5 \cdot 10^{-8}$  s bei 298 K [52], und sind proportional zur dynamischen Viskosität  $\eta$  und dem Volumen  $V_m$  hydrierter Makromoleküle [52]:

$$\tau_p = \eta V_m / kT . \quad (2.20)$$

Anhand der genannten Beispielwerte wird deutlich, dass es sehr kurze Zeiträume sind, in denen Wassermoleküle in direktem Kontakt mit Makromolekülen stehen. Dennoch kann die Diffusion von Wasser in der Nähe von Proteinoberflächen bis zu einer Größenordnung langsamer sein als im frei beweglichen Wasser [53].

Das Diffusionsverhalten wird durch Bewegungsrestriktion des Wassers in einer von Mikrostruktur geprägten Umgebung in Verbindung mit variierendem Bewegungsverhalten, bspw. Verkettung<sup>11</sup>, der Makromoleküle selbst beeinflusst. Der damit verbundene *Energieaustausch* ist entscheidend für die Betrachtung des (chemischen) Austauschprozesses zwischen Makromolekülen und Wasser im Kontext des MRT-Phasenkontrasts, weshalb Diffusion und Austausch eng miteinander verknüpft betrachtet werden müssen.

Zunächst soll jedoch näher auf die physikalischen Parameter eingegangen werden,

<sup>10</sup>Anomales Diffusionsverhalten wegen Unebenheit, d. h. Verzweigungen und Selbstähnlichkeit, der Proteinoberfläche.

<sup>11</sup>So sind immobilisierte, d. h. miteinander verkettete, Proteine ein gutes Modellsystem für Gewebe [54].

die das für den Phasenkontrast relevante Verhalten von Wasser und Makromolekülen beschreiben.

## 2.5.2 Diffusion

Die translatorische Diffusion  $D_t$  des Wassers geht in Wechselwirkung mit (globulären) biologischen Makromolekülen in rotatorische Diffusion  $D_r$  über. Dabei befindet sich Wasser in einem quasigebundenen Zustand in einer Umgebung mit anderen magnetischen Eigenschaften als in ungebundenem Zustand, wodurch sich die Resonanzfrequenz ändert. Dies wird im Phasenkontrast registriert.

Die Aufenthaltszeiten von Wassermolekülen an Makromolekülen liegen, wie bereits oben genannt, in der Größenordnung von einigen Nanosekunden. Unter physiologischen Bedingungen können jedoch auch Verweildauern im Bereich zwischen  $1 \mu\text{s}$  und  $1 \text{ms}$  auftreten [55]. Otting *et al.* [55] vermuten, dass dies vor allem durch die erhöhten Austauschraten wegen Katalyse an Amino-, Hydroxyl- und Carboxyl-Gruppen bedingt wird. Als entscheidend wird der Umstand betrachtet, dass an und in Makromolekülen an sich schon Wasser gebunden ist (vgl. Abschnitt 2.4.1, S. 15), welches somit einer anderen physikochemischen Umgebung ausgesetzt ist und damit der Austausch nur noch einen weiteren Beitrag dazu leistet.

Für die rotatorische und translatorische Diffusion gelten folgende Zusammenhänge mit der dynamischen Viskosität  $\eta$ , der Temperatur  $T$  und dem hydrodynamischen Radius  $R_T$  [56]:

$$D_r = kT/(8\pi\eta_r R_T^3); \quad D_t = kT/(6\pi\eta_t R_T). \quad (2.21)$$

Entscheidend hierbei sind nun wiederum die Energien, wie die Aktivierungs- oder Platzwechselenergie  $E_A$ , die im Verhältnis zu der allgemeinen Gaskonstante  $R$  und der Temperatur  $T$  die dynamische Viskosität  $\eta$  bestimmt (vgl. Gl. 2.30):

$$\eta = \eta_0 e^{E_A/R \cdot T} \quad (2.22)$$

Es ist dabei festzustellen, dass beispielsweise die Aktivierungsenergie  $E_A$  für rotatorische Umorientierung geringer ist als für translatorische Diffusion [52]. Auch die Umorientierungszeiten folgen der gleichen Gesetzmäßigkeit (vgl. [26]).

Betrachtet man beispielsweise Wassermoleküle in einem porösen Medium, so wird die Bewegung durch die Kompartimente (s. Abb. 2.4) beeinträchtigt. Dies kann insbesondere durch die freie Weglänge bzw. Diffusionslänge  $l_D$  beschrieben werden,

## 2.5 PHYSIKALISCHE MECHANISMEN IM KONTEXT DER DIFFUSION

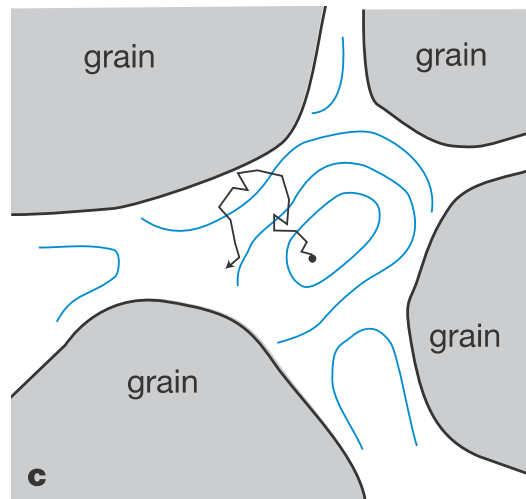


Abbildung 2.4: Darstellung der Diffusion eines Wassermoleküls zwischen festen Kompartimenten (grain). Blaue Linien zeigen lokale Magnetfeldlinien der Kompartimente. [43]

die abhängig von der Zeit  $t$  ist, in der Wassermoleküle mit der Diffusionskonstante  $D$  die Bewegungseinschränkung innerhalb einer Hydrathülle im Abstand von  $l_D$  registrieren [57]:

$$l_D \propto \sqrt{Dt}. \quad (2.23)$$

Der Diffusionskoeffizient des Anteils  $r$ , der in der Bewegung eingeschränkten Wassermoleküle

$$r = \frac{S \sqrt{Dt}}{V} \quad (2.24)$$

ist dann um den gleichen Faktor  $r$  reduziert, wobei der sphärische Durchmesser  $d$  der Restriktionsobjekte mit der Oberfläche  $S$  und dem Volumen  $V$  im Verhältnis

$$d = \frac{6V}{S} \quad (2.25)$$

zueinander steht.

Zudem kommt es durch die Wechselwirkung elektromagnetischer Spins zu einer Änderung des Relaxationsverhaltens<sup>12</sup> der durch Bewegungsrestriktion beeinträchtigten Protonen (vor allem in Wassermolekülen). Dies wirkt sich jedoch nicht auf den Phasenkontrast aus und soll daher hier nicht weiter betrachtet werden.

<sup>12</sup>Näheres beispielsweise in den Publikationen [54, 58–60].



### 2.5.3 Temperatureinfluss

Die Temperatur als mittlere kinetische Energie ist gleichzeitig ein Maß für die Kombination rotatorischer und translatorischer Bewegungen, sowie von Vibrationen der Teilchen. Dies drückt sich in den Anteilen der Diffusion als lineare Abhängigkeit aus (s. Gl. 2.21).

Die Relaxationsraten sind über die rotatorischen und translatorischen Reorientierungszeiten (in erster Näherung linear) temperaturabhängig [61].

Des Weiteren gilt eine lineare Abhängigkeit der Wasser- bzw. Hydrodeuteriumoxid (HDO)-Frequenzverschiebung von der Temperatur  $T$  [°C] im Bereich von 0 °C bis 50 °C mit  $f_{\text{HDO}}=5,051-0,0111T$  [62]. Verursacht wird dies hauptsächlich durch Dichteänderungen und damit veränderte Volumenssuszeptibilitäten. Vereinfacht für minimal wechselwirkende organische Flüssigkeiten (magnetisch isotrope Moleküle) und mit gasförmiger<sup>13</sup> externer NMR-Referenz gilt dann für die temperaturabhängige Resonanzfrequenzverschiebung

$$\frac{d\delta_{\text{obs}}}{dT} = 2,094 \cdot 10^6 \frac{\chi_v^T}{\rho_T} \frac{d\rho}{dT} \quad (2.26)$$

mit der Volumenssuszeptibilität  $\chi_v^T$  und der Dichte  $\rho_T$  bei Temperatur  $T$  [64].

Diese Dichteänderungen haben aber auch direkte Auswirkungen auf die Bindungslängen der Wasserstoffbrückenbindungen. Dabei sind insbesondere die Bindungen zwischen Wasser und Makromolekülen betroffen, weniger die Bindungen mit Wasser innerhalb der Makromoleküle [65].

Die Temperatur als statistische Größe drückt gleichzeitig Entropie und Enthalpie der betrachteten Teilchen und Moleküle aus. Somit lassen sich auch Austauschraten und NMR-Resonanzverschiebungen theoretisch herleiten. Hierzu erfolgt jedoch keine weitergehende Betrachtung, sondern eine auf die NMR-Spektroskopie spezialisierte Beschreibung wird verwendet (s. Abschnitt 2.6.3, S. 25). Dabei sind die betrachteten Größen nicht mehr linear von der Temperatur abhängig: ein Beispiel für die Bedeutung der Temperaturänderungen sind um 66% reduzierte Wasser-Austauschraten bei einer Temperatur von 20 °C statt 37 °C [66].

<sup>13</sup>Verwendung von Edelgasen, wie <sup>129</sup>Xe, bei niedrigen Drücken, da diese wegen fehlender intramolekularer Wechselwirkungen keine Temperaturabhängigkeit im NMR-Spektrum zeigen [63].

### 2.5.4 Elektrostriktion

Neben temperaturbedingten Dichteänderungen kommt es durch die chemischen Bindungen ebenfalls zu Dichteänderungen der Hydrathülle um Proteine herum [67,68]. Ursache hierfür sind die Packungsdichten an den Oberflächen der Makromoleküle. Durch Unebenheiten (konkave und konvexe Strukturen an der Proteinoberfläche) sind Wasserstoffbrückenbindungen teilweise geringer ausgeprägt (im Gegensatz zu den engen Bindungen innerhalb des Proteins), weshalb in der Hydrathülle eine geringere Dichte und als Ausgleich unmittelbar daran angrenzend eine höhere Dichte der Wassermoleküle nachzuweisen<sup>14</sup> ist [67]. Die in diesem Zusammenhang auftretende Elektrostriktion hat dabei unmittelbaren Einfluss auf die Resonanzfrequenzen der beteiligten Kerne aufgrund der beeinträchtigten elektronischen Abschirmung des Kerns.

## 2.6 Chemische Mechanismen im Kontext der Bindung

### 2.6.1 Vorbemerkungen

Durch austauschbare Protonen an den Makromoleküloberflächen ist eine Veränderung der resultierenden Resonanzfrequenz des Wassers zu verzeichnen [55]. Die für diesen Prozess zur Verfügung stehenden Protonen sind die von NH- und OH-Gruppen an der Oberfläche von Proteinen. Mit einem Austauschmodell lässt sich damit auch die Frequenzverschiebung erklären (vgl. Abschnitt 2.6.3, S. 25). Auch der Austausch von Wasser zwischen Hydrathülle und freiem Wasser lässt sich als Ursache heranziehen.

Zunächst soll dazu ein kurzer Abschnitt zur Hydratation von Makromolekülen in die chemische Betrachtungsweise einführen um dann chemischen Austausch im Kontext der NMR-Spektroskopie zu beleuchten.

### 2.6.2 Hydratation von Makromolekülen

In diesem Kontext sind insbesondere Wasserstoffbrückenbindungen im Zusammenhang mit den Besonderheiten des Wassers und der biologischen Materie (vgl. Abschnitt 2.4.2, S. 17) von Bedeutung. Durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbin-

---

<sup>14</sup>Durch Proteinkristallographie mittels Röntgenstrahlen.

dungen kommt es im Allgemeinen zur Verschiebung hin zu tiefem Feld (Entschirmung) durch Dipolfelder [69]. Dies ist auch temperaturabhängig, wie oben bereits erwähnt.

Die Anlagerung von Wassermolekülen an der Oberfläche von Makromolekülen, wie Proteinen, ist durch die Komposition aus hydrophilen Bestandteilen bedingt und lässt so die Unterscheidung in gebundene, d. h. in der Hydrathülle lokalisierte, und freie Wassermoleküle zu. Durch den schnellen Protonenaustausch, im Sinne einer Neubildung von Wasserstoffbrückenbindungen, ist das freie Wasser sehr sensibel für mögliche Bindungsstellen.

Zunächst kommt es zur Änderung von Relaxationsraten im Zusammenhang mit gebundenem Wasser und freiem Wasser:

$$\frac{1}{T_1} \sim \frac{b}{T_{1b}} + \frac{1-b}{T_{1f} + \tau_e} \quad (2.27)$$

mit  $T_{1b}$  als longitudinale Relaxationszeit der gebundenen Wasserfraktion ( $b \ll 1$ ),  $T_{1f}$  als longitudinale Relaxationszeit der freien Wasserfraktion und  $\tau_e$  als Residenzzeit des Wassers [61].

Für die Betrachtungen von hydratisierten Molekülen ist der effektive Radius  $r_h$  (Stokes-Radius) definiert als

$$r_h = \sqrt[3]{\frac{3M\bar{v}}{4\pi N}} \quad (2.28)$$

mit dem partiellen spezifischen Volumen  $\bar{v}$ , dem Molekulargewicht  $M$  und der Avogadrozahl  $N$  [70]. Daraus lässt sich der Zusammenhang zwischen Molekülmasse  $M$  und -oberfläche  $S$  herleiten:

$$S = \frac{M\bar{v}}{N} . \quad (2.29)$$

Die verschiedenen Modelle und darin betrachtete Abläufe (vgl. [55]; Magnetisierungstransfer, Protonenaustausch, Dipol-Dipol-Wechselwirkung etc.) beschreiben letztlich jedoch die gleichen Auswirkungen und sollen folgend unter dem Begriff *Austausch* betrachtet werden.

### 2.6.3 Chemischer Austausch

Eine ausführliche Betrachtung der Bloch-Gleichungen unter dem Gesichtspunkt chemischen Austausches liefert McConnell [71]. Dabei wird als Austausch der Transfer eines Kerns (in unserem Fall eines Protons oder eines Wassermoleküls)

## 2.6 CHEMISCHE MECHANISMEN IM KONTEXT DER BINDUNG

zwischen verschiedenen chemischen Umgebungen (hier: Makromolekül und wässrige Lösung) verstanden.

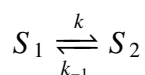
Allgemein gilt als empirische Beschreibung der Austauschrate  $k$  nach Arrhenius mit der Austauschenergie  $E_A$  folgendes (vgl. auch Gl. 2.22) [72]:

$$k = A \cdot e^{-E_A/RT} . \quad (2.30)$$

Dies stellt die Betrachtungen in den Zusammenhang mit den physikalischen Größen, insbesondere der Temperatur  $T$ .

Gehen wir nun über zu einem System, das mittels NMR-Spektroskopie betrachtet wird. Das resultierende NMR-Spektrum der interagierenden Substanzen ist nach Bain [72] immer eine Summe von Einzelspektren nicht miteinander wechselwirkender Substanzen.

Für die weitere Betrachtung wird eine einfache chemische (reversible) Reaktion



zwischen Edukt  $S_1$  und Produkt  $S_2$  mit Austauschraten  $k$  und  $k_{-1}$  angenommen.

Nach Palmer [49] lassen sich die Resonanzfrequenzen und Relaxationszeiten zweier interagierender Substanzen in Formeln darstellen. Entscheidend für die Ausprägung des resultierenden Spektrums ist das Verhältnis der kumulierten chemischen Austauschrate  $K_A = k + k_{-1}$  und der Differenz der Resonanzfrequenzen  $\Delta\omega$  aus den separaten Resonanzfrequenzen  $\omega_k$  der Populationen ( $k=1, 2$  für zwei Populationen). Bei einem langsamen Austausch, d. h.  $K_A < \Delta\omega$ , bleibt es bei separaten Resonanzfrequenzen (s. Abb. 2.5).

Mit den relativen Populationen  $p_k$  der beteiligten Substanzen im chemischen Gleichgewicht lassen sich die Resonanzfrequenz  $\omega_A$  und die Relaxationskonstante<sup>15</sup>  $R_2^A$  im Austausch berechnen. Den einfachsten Fall stellt ein schneller Austausch mit  $K_A > \Delta\omega$  dar:

$$\omega_A = p_1\omega_1 + p_2\omega_2 \quad (2.31)$$

$$R_2^A = R_2^0 + p_1p_2\Delta\omega^2/K_A \quad (2.32)$$

---

<sup>15</sup>Die Relaxationskonstante ist die inverse der Relaxationszeitkonstante, d. h.  $R_1 = 1/T_1$  bzw.  $R_2 = 1/T_2$ .

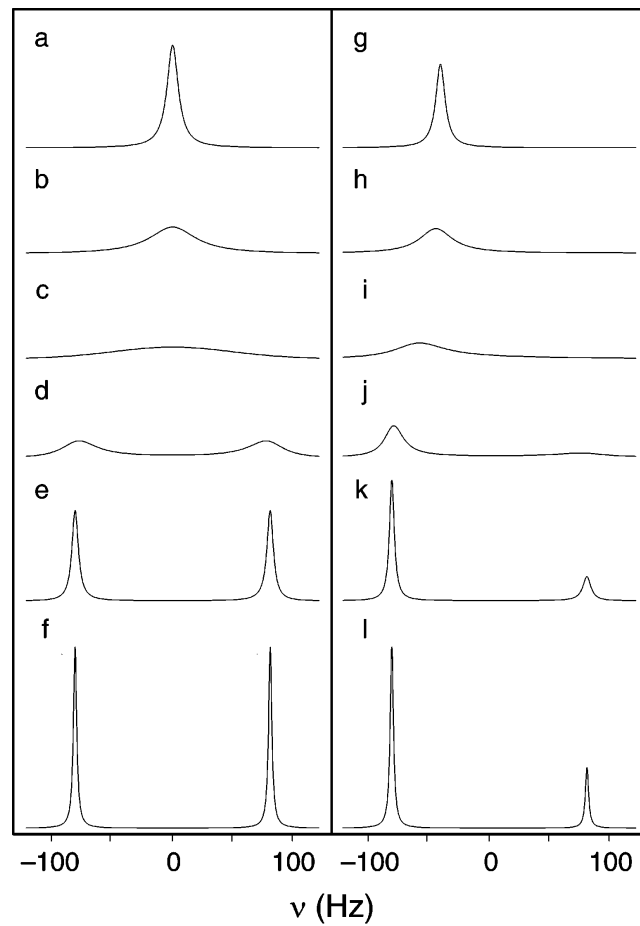


Abbildung 2.5: Simulierte Resonanzspektren mit chemischem Austausch [49]. (a - f) Gleichwertige Populationen  $p_1 = p_2 = 0,5$ . (g - l) Ungleichmäßige Populationen mit  $p_1 = 0,75$  und  $p_2 = 0,25$ . Austauschkoefizienten  $K_A$  (a, g) 10000, (b, h) 2000, (c, i) 900, (d, j) 200, (e, k) 20 und (f, l)  $0 \text{ s}^{-1}$ . Verwendung einer Relaxationsrate  $R_2 = 10 \text{ s}^{-1}$  und Resonanzdifferenz  $\Delta\omega/2\pi = 180 \text{ Hz}$ .

## 2.7 MODELL ZUM WASSER-MAKROMOLEKÜL-AUSTAUSCH

Bei einem intermediären Austausch ( $K_A \approx \Delta\omega$ ) kommt es zu einem allmählichen Verschmelzen der Resonanzfrequenzen:

$$\omega_A = \frac{\omega_1 + \omega_2}{2} - \frac{1}{\sqrt{8}} \sqrt{\Delta\omega^2 - K_A^2 + V_A} \quad (2.33)$$

$$R_2^A = R_2^0 + \frac{K_A}{2} - \frac{1}{\sqrt{8}} \sqrt{K_A^2 - \Delta\omega^2 + V_A} \quad (2.34)$$

$$\text{mit } V_A = \sqrt{(K_A^2 + \Delta\omega^2)^2 - 16p_1p_2\Delta\omega^2/K_A} \quad (2.35)$$

wobei  $R_2^0$  die populationsgewichtet gemittelte transversale Relaxationskonstante der nicht interagierenden Substanzen ist und eine Relation  $p_1 > p_2$  der Populationen angenommen wird. Die Variable  $V_A$  bezieht die vorgenannten Relationen, die Frequenzdifferenz  $\Delta\omega$  und die Austauschrate  $K_A$  ein und ist hier zur Vereinfachung der Formeldarstellungen separiert.

Zhong *et al.* [73] zeigten den Zusammenhang zwischen Linienbreite  $\delta\nu_{1/2}$  und den Frequenzunterschieden  $\Delta\nu$  wechselwirkender Bindungsstellen mit der Ratenkonstante  $1/\tau$ :

$$\delta\nu_{1/2} = \frac{(\Delta\nu)^2}{1/\tau}. \quad (2.36)$$

## 2.7 Modell zum Wasser-Makromolekül-Austausch

Zhong *et al.* schlagen als Austauschmodell für die chemische Verschiebung  $\Delta f$  folgenden exponentiellen Zusammenhang vor [74]:

$$\Delta f = k_a \cdot M \cdot e^{b \cdot M} \quad (2.37)$$

Dabei sind Austauschstärke  $k_a$ , Aktivitätsfaktor  $b$  und Makromolekülkonzentration  $M$  die bestimmenden Größen. Die Austauschstärke kann dabei über die mittlere translatorische Diffusionslänge  $D_t$  des freien Wassers und die mittlere rotatorische Diffusionslänge  $D_r$  der Makromoleküle ausgedrückt werden [74]:

$$k_a \sim e^{-D_r/D_t} \quad (2.38)$$

Für geringe Konzentrationen  $M$  lässt sich Gl. 2.37 durch Taylorreihenentwicklung in erster Näherung in eine lineare Gleichung der folgenden Form umwandeln:

$$\Delta f = k_a \cdot M. \quad (2.39)$$

## 2.8 Wechselwirkungen mit interner NMR-Referenz

Dieser Abschnitt wurde im wesentlichen der eigenen Publikation [20] entnommen. Insgesamt muss in den Überlegungen zum Messverfahren (vgl. Abschnitt 3.10, S. 53) berücksichtigt werden, dass alle in Lösung befindlichen Komponenten miteinander in Wechselwirkung treten können.

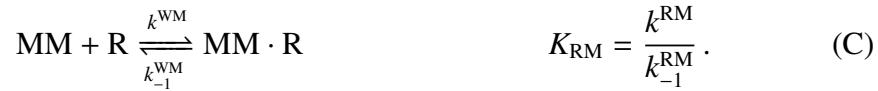
Daher ist ein weiteres Gebiet dieser Arbeit die intensive Betrachtung der Wechselwirkungen zwischen dem Lösungsmittel (Wasser) und der verwendeten NMR-Referenzsubstanz. Die Resonanzfrequenzen in der NMR werden immer relativ zu einer Referenzsubstanz gemessen. Grundsätzlich ist die wesentliche Eigenschaft einer Referenzsubstanz die vom Lösungsmittel und der zu untersuchenden Substanz unabhängige Frequenzverschiebung im NMR-Spektrum. Dies kann gewährleistet werden, wenn die Referenzsubstanz durch die unmittelbare Umgebung nicht in Struktur und magnetischem Verhalten beeinflusst wird. Eine externe Referenzsubstanz (beispielsweise in einem koaxialen Röhrchen) kann dies besser gewährleisten als eine interne, die sich in der zu untersuchenden Lösung selbst befindet. Verschiedene Studien ([35,63,75,76]) zeigen, dass es Wechselwirkungen zwischen Referenzsubstanz und Lösungsmittel bzw. den zu untersuchenden Substanzen gibt, weshalb hier ein besonderes Augenmerk darauf gelegt wird. Auch die Abhängigkeit von der gewählten Temperatur wurde als Einflussgröße identifiziert [77], weshalb auch diese Größe später in die Betrachtungen mit eingehen soll (Abschnitt 4.2.1). Der Austausch zwischen zwei Bindungsstellen kann durch Geschwindigkeitskonstanten für Hin- ( $k$ ) und Rückreaktion ( $k_{-1}$ ) charakterisiert werden. Daraus lässt sich die Gleichgewichtskonstante  $K$  berechnen aus

$$K = k/k_{-1} \quad (2.40)$$

Um den Wasser-Makromolekül-Austauscheffekt zu beschreiben, müssen drei Austauschprozesse folgender Substanzen berücksichtigt werden: (A) Wasser ( $H_2O$ ) und Makromoleküle (MM), (B) Wasser und Referenzsubstanz R, sowie (C) Makromoleküle und Referenzsubstanz. Dabei ist (A) der primär interessierende Prozess. Die

## 2.8 WECHSELWIRKUNGEN MIT INTERNER NMR-REFERENZ

drei Prozesse lassen sich wie folgt zusammenfassen:



Für Proteinlösungen in Wasser spielt nur Prozess A eine Rolle.

Unter der Annahme eines schnellen Austauschprozesses und der Populationswahrscheinlichkeiten

$$p_1 = n_f/M \quad \text{und} \quad p_2 = n_g/M$$

der freien (Anzahl  $n_f$ ) und der gebundenen (Anzahl  $n_g$ ) Wassermoleküle kann die Gleichung 2.31 (siehe S. 25) angewandt werden. Die Gesamtzahl der Wassermoleküle  $M$  ist

$$M = n_g + n_f$$

und das Verhältnis gebundener und freier Wassermoleküle drückt sich in der Ratenkonstante

$$K_{\text{WM}} = n_g/n_f$$

aus. Mit dem Wasser-Makromolekül-Austauscheffekt werden somit die Konzentration der Makromoleküle  $[\text{MM}]$ , die Ratenkonstante  $K_{\text{WM}}$  und die chemische Verschiebung  $\Delta\omega_{\text{MM}}$  zwischen freiem und an Makromolekülen gebundenem Wasser als Faktoren einbezogen. Damit erhält man eine Näherung für die Frequenzverschiebung  $f_{\text{WMA}}$  der Wasserfrequenz in Anwesenheit von Makromolekülen:

$$f_{\text{WMA}} \approx \frac{K_{\text{WM}}\Delta\omega_{\text{MM}}[\text{MM}]}{1 + K_{\text{WM}}[\text{MM}]}. \quad (2.41)$$

Da die Makromolekülkonzentration (insbesondere bezogen auf die Wasserkonzentration) als sehr klein angenommen werden kann, ist der Faktor  $K_{\text{WM}}[\text{MM}]$  mit der Ordnung  $\mathcal{O}(0)$  abzuschätzen. Daher kann die Frequenzverschiebung als linear abhängig von der Makromolekülkonzentration betrachtet werden:

$$f_{\text{WMA}} \approx K_{\text{WM}}\Delta\omega_{\text{MM}}[\text{MM}] \quad (2.42)$$

Diese Abhängigkeit wird später noch gezeigt (siehe Abschnitt 4.2.8). Wie bereits oben erwähnt, werden die Resonanzfrequenzen in Relation zur Resonanzfrequenz



einer Referenzsubstanz gemessen. Sofern die Referenzsubstanz mit dem Lösungsmittel (also Wasser) und den Makromolekülen interagiert, muss dies berücksichtigt werden. Dies ist der Fall bei 1,4-Dioxan. In Anwesenheit von 1,4-Dioxan erfährt Wasser eine kompetitive Bindungssituation, da es mit Dioxan Wasserstoffbrückenbindungen eingeht [78]. Daher müssen die beiden Prozesse A und B in die Berechnung der Wasserverschiebung mit einbezogen werden:

$$f_{\text{WMA}} \approx \frac{K_{\text{WM}}\Delta\omega_{\text{MM}}}{1 + K_{\text{WM}}[\text{MM}] + K_{\text{RW}}[\text{D}]}[\text{MM}] + \frac{K_{\text{RW}}\Delta\omega_{\text{D}}}{1 + K_{\text{WM}}[\text{MM}] + K_{\text{RW}}[\text{D}]}[\text{D}] \quad (2.43)$$

wobei  $K_{\text{RW}}$  die Gleichgewichtskonstante für den Wasser-Dioxan-Austausch ist,  $\Delta\delta_{\text{D}}$  die Differenz der chemischen Verschiebung von Wasser zwischen freiem und mit Dioxan gebundenem Zustand und  $[\text{D}]$  die Dioxankonzentration. Die Wasserverschiebung reduziert sich somit in Anwesenheit von Dioxan um den Faktor  $(1 + K_{\text{WM}}[\text{MM}] + K_{\text{RW}}[\text{D}])$ , der von der Dioxankonzentration  $[\text{D}]$  abhängt. Bei geringen Dioxan- und Makromolekülkonzentrationen, wie in dieser Studie verwendet, kann die Wasserverschiebung bezüglich Dioxan mit der Ableitung von Gl. 2.43 wie folgt angenähert werden

$$\frac{\partial f_{\text{WMA}}}{\partial [\text{D}]} = \frac{K_{\text{RW}}\Delta\omega_{\text{D}} + K_{\text{WM}}K_{\text{RW}}(\Delta\omega_{\text{D}} - \Delta\omega_{\text{MM}})[\text{MM}]}{(1 + K_{\text{WM}}[\text{MM}] + K_{\text{RW}}[\text{D}])^2}. \quad (2.44)$$

Bei geringen Konzentrationen von Dioxan ist der beschriebene Anstieg maßgeblich von der Makromolekülkonzentration  $[\text{MM}]$  und den chemischen Verschiebungsdifferenzen der Bindungszustände Wasser—Makromolekül ( $\Delta\omega_{\text{MM}}$ ) und Wasser—Dioxan ( $\Delta\omega_{\text{D}}$ ) abhängig.

Da die Verschiebungsrichtung von  $\Delta\omega_{\text{D}}$  entgegengesetzt zu der Wasser-Makromolekül-Austauschverschiebung  $\Delta\omega_{\text{MM}}$  ist, kann es bei höherer Dioxankonzentration zum Vorzeichenwechsel und zu einem anderen Betrag der Austauschwechselwirkung kommen. Direkte Interaktion zwischen Dioxan und Makromolekülen kann dabei vernachlässigt werden.

Die Methylgruppen von TMSP können mit hydrophoben Kavitäten oder Bindungsstellen an der Oberfläche der Makromoleküle interagieren und damit das Signal von TMSP verändern.

Üblicherweise existiert an Proteinen mehr als eine Kavität, mit der TMSP wechselwirken kann. Nach [79] gibt es bei dem Protein BSA zwei verschiedene Typen

## 2.8 WECHSELWIRKUNGEN MIT INTERNER NMR-REFERENZ

hydrophober Bindungsstellen. Daher kann ein Michaelis-Menten-Modell mit randomisierter Mehrfachbindung [80] den Prozess für TMSP beschreiben. Die oben beschriebenen Prozesse A und C werden hierbei berücksichtigt und lassen sich wie folgt darstellen:

$$f_{\text{WMA}} \approx \left( K_{\text{WM}} \Delta\omega_{\text{MM}} + \frac{C_1[\text{T}] + C_2[\text{T}]^2}{1 + K'[\text{T}] + K''[\text{T}]} \Delta\omega_{\text{R}} \right) [\text{MM}] \quad (2.45)$$

wobei  $C_1$  und  $C_2$  Anpassungsparameter sind.  $K'$  und  $K''$  repräsentieren die verschiedenen Gleichgewichtskonstanten der hydrophoben Bindungsstellen und  $\Delta\omega_{\text{R}}$  die Frequenzseparation zwischen freiem und gebundenem TMSP, dessen Konzentration mit  $[\text{T}]$  abgekürzt ist.

Gleichung 2.45 liefert nicht direkt die Zahl der hydrophoben Bindungsstellen zwischen BSA und TMSP. Daher kann folgendes Austauschmodell nach [81] wie folgt angenommen werden:

$$\Delta f = \frac{\Delta_{\text{max}}([L] + N[P] + K_d - \sqrt{([L] + N[P] + K_d)^2 - 4[L]N[P]})}{(2N[P])} \quad (2.46)$$

mit der observierten chemischen Verschiebung  $\Delta f$  (relativ zur Resonanzfrequenz ohne TMSP – hier angenähert durch geringe Konzentration von TMSP), der Frequenzänderung  $\Delta_{\text{max}}$  im Gleichgewicht, Protein-  $[P]$  und Ligandenkonzentration  $[L]$  und der Dissoziationskonstante  $K_d$ . Mit dem Faktor  $N$  wird die Anzahl hydrophober Bindungsstellen an der Proteinoberfläche einbezogen. Wechselwirkungen zwischen TMSP und Wasser werden dabei als vernachlässigbar angenommen.

Bei der Bestimmung absoluter Resonanzfrequenzen wird zumeist auf externe NMR-Referenzsubstanzen zurückgegriffen. Unter Einbeziehung der IUPAC-Empfehlung Nr. 3 [82] muss die Observable  $\delta^{\text{Obs}}$  um die magnetische Suszeptibilität der Referenzsubstanz korrigiert werden:

$$\delta = \delta^{\text{Obs}} + \delta_{\chi} = \delta^{\text{Obs}} + \left( \frac{1}{3} - \bar{\alpha} \right) (\chi - \chi_{\text{Ref}}) \quad (2.47)$$

mit dem Formfaktor  $\bar{\alpha} = 0$  für einen unendlich langen, parallel zum statischen Magnetfeld orientierten Zylinder und den magnetischen Suszeptibilitäten  $\chi$  der zu untersuchenden Lösung und der Referenz  $\chi_{\text{Ref}}$  im koaxialen, räumlich getrennten Zylinder. Im Kontext dieser Arbeit wird dies jedoch meist außer Acht gelassen, da Frequenzdifferenzen betrachtet werden.

## 2.9 Schlussbemerkungen

Die Vielzahl der vorgenannten Parameter (chemische Wechselwirkungen und physikalische Einflussgrößen) beeinflussen in unterschiedlicher Stärke und Ausprägung (positiv/negativ; vgl. Gl. 2.15) den Phasenkontrast. Insbesondere der letzte Abschnitt zeigt, dass eine Unterscheidung der einzelnen Anteile höchst kompliziert ist und eine sehr differenzierte experimentelle Untersuchung erfordert.

Dazu möchte ich an dieser Stelle die genannten Anteile am Phasenkontrast noch einmal kurz zusammenfassen:

- isotrope und anisotrope magnetische **Suszeptibilität**, darunter z. B.
  - Eisen- und Myelingeht
  - desoxygeniertes Hämoglobin
  - paramagnetischer Sauerstoff
  - diamagnetisches Gewebe
  
- chemischer **Austausch** – zu unterscheiden in Diffusion (*physikalisch*) unter Einfluss von v. a.
  - Viskosität und Proteinkonformation
  - Bewegungsrestriktion der Wassermoleküle
  - Temperatur
  - Elektrostriktion

und *chemische* Bindung, abhängig von bspw.

- Bindungsstellen für Wassermoleküle
  - Ionenstärke
  - pH-Wert
  - Austauschrate
- 
- **Mikrostruktur**, maßgeblich bestimmt durch
    - Faserorientierung
    - Geometrie

## 2.9 SCHLUSSBEMERKUNGEN

# Kapitel 3

## Experimentelle Durchführung

### 3.1 Vorbemerkungen

In diesem Kapitel soll zunächst im Abschnitt 3.2 auf Spezifika der Materialwahl eingegangen werden, um die Auswahl der Studienobjekte verständlich zu machen. Eine Zusammenstellung der angewandten Methoden erfolgt anschließend in den Abschnitten 3.3 bis 3.10.

Dabei wird zunächst die Methodenwahl begründet (Abschnitt 3.3), berücksichtigte Parameterdimensionen (Abschnitt 3.4) und die Probenvorbereitung (Abschnitt 3.5) vorgestellt, die verwendeten Methoden der NMR-Spektroskopie (Abschnitt 3.6) und die Datenextraktion (Abschnitt 3.7) erläutert.

Abgeschlossen wird das Kapitel mit den Methoden zur Ermittlung von Suszeptibilität (Abschnitt 3.8) bzw. Suszeptibilität *und* Austausch (Abschnitt 3.10) mit einem Einschub zur doppelten Referenzierung (Abschnitt 3.9) in der NMR-Spektroskopie.

### 3.2 Auswahl der Materialien

#### 3.2.1 Proteine

Auf der Suche nach einem möglichst eingegrenzten, leicht handhabbaren und dennoch verallgemeinerbaren Studiengegenstand betrachten wir zunächst die Bestandteile des menschlichen Gehirns nach absteigendem Gehalt. Zuallererst fällt Wasser mit einem Anteil von 70% am stärksten ins Gewicht, danach folgen Gewebe (graue und weiße Hirnsubstanz), und wenn man hiervon noch eine Größenordnung kleiner

## 3.2 AUSWAHL DER MATERIALIEN

betrachtet folgen die Makromoleküle<sup>1</sup>, darunter hauptsächlich Proteine (vgl. auch Abschnitt 2.4.1, S. 15).

Makromoleküle sind in einer Größenordnung, die den Untersuchungsgegenstand der Wasser-Makromolekül-Wechselwirkung am besten repräsentieren und zudem auf dem Markt frei verfügbar sind. Zudem haben Proteine eine große Bedeutung für die biologische Funktion (z. B. enzymatische Wirkung). Ebenso bedeutend sind Membranen, würden aber zugleich wieder eine andere Komplexität mit sich bringen, wie z. B. Mizellbildung. Daher kommen Proteine als Studienobjekte in Betracht.

In Tabelle 3.1 sind die Proteine verzeichnet, die im Laufe der Studien verwendet wurden.

Tabelle 3.1: Übersicht über verwendete Proteine und deren Kenngrößen (M = Molekulargewicht).

Abk.	Name	M [kDa]
RNase A	Ribonuklease A	13,7
Lys	Lysozym	14
GST	Glutathione S-transferase	26
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>	67
IgG	Immunoglobulin G	144

Bei der Auswahl der Proteine spielten verschiedene Gesichtspunkte eine Rolle: Für die Untersuchungen eignen sich globuläre Proteine am besten. Diese zeigen zum einen nur geringe richtungsabhängige Effekte, die sich in einem entsprechend isotropen Verhalten im Bezug auf die magnetische Suszeptibilität auswirken. Das isotrope physikochemische Verhalten (wie beispielsweise der Diffusion) ist dabei ein weiterer entscheidender Gesichtspunkt.

Des Weiteren ist auf eine ausgewogene Verteilung der molekularen Massen geachtet worden, um ein breites Spektrum der im Gehirn vorzufindenden Längenskalen abzudecken. Beschränkungen in der Auswahl nach dem Molekulargewicht der Proteine ergaben sich aus praktischen Erwägungen der Probenvorbereitung und Vorgaben der NMR-Spektroskopie (Verwendung verdünnter Lösungen) sowie des Kostenrahmens für die Beschaffung von Ausgangsmaterial. So konnten nur Proteine gewählt

<sup>1</sup>Man kann Makromoleküle ab einem Molekulargewicht von etwa 3,5 kDa zählen [83].

## KAPITEL 3 EXPERIMENTELLE DURCHFÜHRUNG

werden, die in großen Mengen gewonnen werden können, wie beispielsweise Lysozym aus Hühnereiweiß oder *Bovine Serum Albumin* (BSA) aus Rinderserum. Aufgrund schlechter Löslichkeit sehr großer Eiweiße (> 100 kDa) in Wasser wurde die Auswahl der Proteine bezüglich des Molekulargewichts limitiert. Die verwendeten Konzentrationen der Makromoleküle liegen weit unter Werten physiologischer Bedingungen: bis zu 1 mM im Vergleich zu etwa 30 mM [83]. Dennoch ist die resultierende Viskosität der Lösungen ein Problemfall in der hochauflösenden NMR-Spektroskopie aufgrund der zunehmenden Linienbreiten im Spektrum, was im Kapitel 5 diskutiert wird. Bereits die Einbringung der Proben (hochviskose Suspensionen) in NMR-Röhrchen ist ein schwieriges Unterfangen, was sich insbesondere bei der Untersuchung von Gewebeextrakten gezeigt hat. Minimierung der Umfüllreste gelingt mit Hilfe von Pipetten und langsamem Arbeiten unter Ausnutzung der Oberflächenspannung durch Andrücken der Pipettenspitzen an die Glaswand des NMR-Röhrchens.

Eine weitere Frage bei der Proteinauswahl ist die allgemeine Verwendung und Akzeptanz in der Forschung. Unter Berücksichtigung all dieser Aspekte (Größe und Form, Verfügbarkeit und Handhabbarkeit) wurde BSA als Standardprotein für die meisten der hier durchgeführten Experimente verwendet.

### 3.2.2 Gewebeextrakte

Um auch Makromoleküle aus dem direkten Zusammenhang eines Gehirns *in vitro* zu untersuchen fiel die Wahl auf Gewebeextrakte aus Rattenhirn. Dazu wurden aus männlichen, 12 Wochen alten Ratten, Vorder- bzw. Kleinhirn entnommen. Nach Homogenisierung in Pufferlösung mit Potter S<sup>2</sup> bei 900 U/s und in 12 Doppelhüben wurde die Suspension mit einer Beschleunigung von 1000 g für 10 min zentrifugiert. Danach erfolgten weitere Schritte zur Trennung verschiedener Zellbestandteile entsprechend unterschiedlicher Dichten über Zentrifugation und anschließende Resuspension der Sedimente (siehe dazu [19]). Um den Einfluss von Membranen auf die Wasserverschiebung zu untersuchen wurde bei den Extrakten aus dem Cortex mittels Zugabe von Triton X-100 (nicht-ionisches Tensid zur Entfernung der Membranproteine – es bleibt im Wesentlichen das Zytoskelett) bzw. Aceton (Entfernung der Lipide) eine Lipidextraktion durchgeführt. Damit konnten Proben gewonnen

---

<sup>2</sup>Gewebehomogenisiermaschine, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland.

werden, die die Membranen nicht mehr enthalten und damit wiederum ein vereinfachtes System darstellen.

Aus Cortex und Kleinhirn wurden jeweils die Bestandteile Myelin, Mitochondrien, grobe und „leichte“ Membranen sowie Synaptosomen verwendet. Zusätzlich wurden synaptische Verbindungen aus dem Cortex und Mikrosomen sowie Zytosol aus dem Kleinhirn untersucht. Homogenat aus Kleinhirn fand ebenfalls Eingang in die Studien.

Die gemessenen Größen waren hierbei Proteinkonzentration (mittels BCA-Test), Eisenkonzentration (mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)<sup>3</sup>) und Frequenzverschiebung des Wassers (mittels NMR-Spektroskopie). Im Falle der Kleinhirngewebeextrakte wurden die Relaxationszeiten  $T_1$  und  $T_2$  sowie der Diffusionskoeffizient  $D$  des Wassers bestimmt (siehe dazu Abschnitte 3.6.2-3.6.4). Dazu sind die Proben in reinen  $D_2O$ -Lösungen zubereitet worden, um den *radiation damping* Effekt<sup>4</sup> zu reduzieren und somit die EM-Pulssequenzen korrekt durchzuführen<sup>5</sup>.

### 3.3 Auswahl der Methoden

Zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Wasser und Makromolekülen sind Relaxation, Magnetisierungstransfer (MT), und *Chemical Exchange Saturation Transfer* (CEST) weit verbreitete Mittel (siehe auch Abb. 2.3, S. 19). Mit diesen Methoden konzentriert sich die Untersuchung hauptsächlich auf Unterprozesse des sehr komplexen Vorganges der Wechselwirkung verschiedener Kompartimente. So kann man beispielsweise das Relaxationsverhalten oder den Austausch von Magnetisierung an sich betrachten.

Hinzu kommt, dass die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden ihre spezifischen Zeitskalen mit sich bringen (s. Abb. 2.3). Dabei sind meist aufwändige Verfahren anzuwenden, die der in der Regel schnell und einfach durchführbaren Phasenbildgebung in der MRT entgegenstehen. Daher wurde die Beschränkung auf eine Resonanzfrequenzbestimmung des Wassersignals aus ebenso direkt erzeug-

---

<sup>3</sup>Die ermittelten Werte haben die Einheit mg/kg. Der Einfachheit halber wird in dieser Arbeit jedoch die gleichwertige Einheit ppm verwendet.

<sup>4</sup>Zusätzliche Relaxation wegen Rückkopplung zwischen emittiertem EM-Signal und der Empfangsspule.

<sup>5</sup>Andernfalls misslingt die  $90^\circ$ -Pulswinkel-Bestimmung: es zeigt sich statt der Sinus- eine Sägezahncharakteristik der Pulswinkel-Signal-Abhängigkeit [84].



### KAPITEL 3 EXPERIMENTELLE DURCHFÜHRUNG

baren FID-Spektren vorgenommen. Aus dem komplexwertigen Signal der magnetischen Spin-Präzession im statischen Magnetfeld lässt sich die Phase eines MRT-Bildes/Bildbestandteiles direkt ermitteln (s. Gl. 2.1). Somit ist grundsätzlich eine Vergleichbarkeit der hier durchgeführten Resonanzfrequenzmessungen und einer MRT-Phasenbildgebung gegeben.

Parallel zur zeitlichen Auflösung ist eine Begrenzung in der räumlichen Auflösung notwendig: Ein wasserunterdrücktes Spektrum der BSA-Lösung (s. Abb. 3.1) lässt die komplexe Struktur des Proteins erahnen und macht die potentiellen Bindungsstellen (vor allem -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH) für Wasser im Bereich von etwa  $7 \pm 0,5$  ppm sichtbar. Bei solch komplexen Strukturen mit hunderten von Endgruppen an der Makromoleküloberfläche und einem Vielfachen von Verzweigungen, Unterabschnitten etc. sind die Bereiche in denen die Resonanzen der Bindungsstellen auftreten sehr weit gestreut und können auch unterhalb der Wasserfrequenz liegen (wie hier im Bereich von etwa 1-4 ppm).

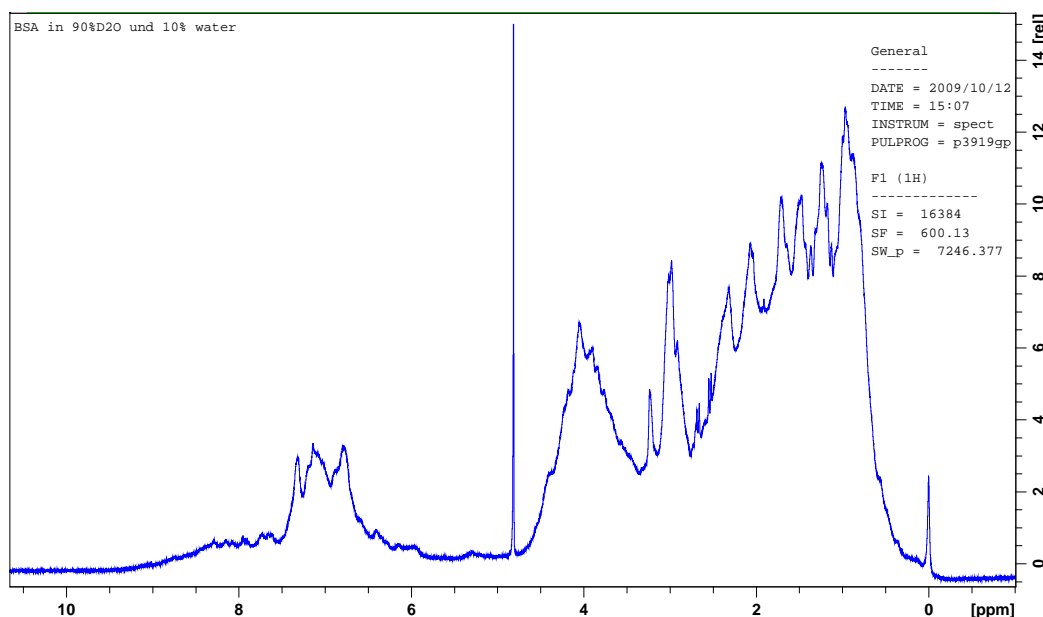


Abbildung 3.1: Darstellung eines Spektrums mit Wasserunterdrückung (reduziertes Wassersignal durch WATERGATE-Sequenz) mit BSA.

Eine gezielte Untersuchung, mit welchen Bindungsstellen sich einzelne Wassermoleküle im Austausch befinden, ist demzufolge ein kompliziertes und angesichts der vorliegenden Variabilität biologischer Makromoleküle unangemessenes Verfahren. Die Konzentration der durchgeführten Studien liegt daher auf Parametern der

Makro-Ebene und einer rudimentären Untersuchung von Strukturveränderungen an Makromolekülen.

### 3.4 Parameterdimensionen

Es gibt viele wählbare Parameter zur quantitativen und qualitativen Untersuchung des Einflusses des Wasser-Makromolekül-Austausches auf den MR-Phasenkontrast (vgl. Abschnitt 2.9, S. 33). Darunter fallen (neben Größe und Form der Makromoleküle) die hier betrachteten physikochemischen Parameter Makromolekülkonzentration, pH-Wert, Viskosität (variiert durch Zugabe von Polysacchariden) bzw. Diffusionskoeffizient und Temperatur. Direkt verbunden mit der Wahl der Makromoleküle und von einer Steuerung ausgeschlossen<sup>6</sup> sind Parameter, wie die Zahl der hydrophilen Bindungsstellen oder die Ladungszahl eines Proteins.

Durch die Einbeziehung von Gewebeextrakten bzw. Zellkompartimenten (s. Abschnitt 3.2.2) kommen noch weitere Parameter hinzu, die sich nicht mehr mit vertretbarem Aufwand kontrollieren lassen und somit der Analyse überlassen werden. Demzufolge wird eine genaue Charakterisierung der Gewebe- und Zellextrakte hinsichtlich der *Massenverteilung* mittels Gelelektrophorese vorgenommen und zusätzlich eine Bestimmung der *Eisenkonzentration* mittels Atomabsorptionsspektroskopie<sup>7</sup> vorgenommen. Letzteres dient der Überprüfung des Suszeptibilitätseinflusses von Eisen (s. Hypothesen 1 und 2 in Abschnitt 1.2), welches im Gehirn auch außerhalb des Blutes an verschiedenen Stellen, insbesondere aber in Proteinen eingebunden ist. Zumeist ist dies auch mit pathogenen Läsionen verbunden und ist daher besonders im Hinblick auf Auffälligkeiten in der Phasenbildgebung zu beachten.

In Tabelle 3.2 werden die variierten bzw. bestimmten Parameter und deren Kombinationen aufgezeigt. Dabei sind die praktischen Erwägungen maßgeblich, wie die Parameter beeinflussbar und getrennt voneinander wählbar sind und welche Einflussgröße auf den Phasenkontrast damit erfasst wird.

Letztlich sollen die vorgenannten Parameter im Zusammenhang mit dem Austausch-

---

<sup>6</sup>Biochemische Verfahren zur Manipulation von Proteinen existieren, sind aber so aufwendig, dass die Herstellung von Proteinmengen in der hier verwendeten Größenordnung von einigen Milligramm mehrere Tausend Euro und mehrere Wochen, wenn nicht gar Monate in Anspruch nehmen würden.

<sup>7</sup>Methode: Graphitrohr AAS, Gerät: SpectrAA800 VARIAN.

## KAPITEL 3 EXPERIMENTELLE DURCHFÜHRUNG

Tabelle 3.2: Variierte (oben) und bestimmte (unten) Parameter, deren Kombinationen (jeweils durch Doppelpunkt aufgeteilt zwischen variierten und ermittelten Parametern) sowie Angabe der korrespondierenden Abschnitte im Ergebnisteil.

Parameter	Abk.	Kombinationen	Abschnitt
Temperatur	T	TPIX:f, TGIX:f	4.2.1, S. 58 ff.
Zeit	Z	Z:f	4.2.2, S. 61
pH-Wert	H	H:f	4.2.7, S. 79
Makromolekülkonzentration	M	PM:fk <sub>a</sub> bR	4.2.8, S. 80 ff.
Ammoniumsulfatkonz.	A	APMT:f	4.2.6, S. 76 ff.
Polysaccharidkonz.	Y	YMT:V	4.2.5, S. 73 ff.
Protein	P	PM:fk <sub>a</sub> bR	4.2.8, S. 80 ff.
Gewebeextrakt	G	G:ESfRD	4.4, S. 91 ff.
interne NMR-Referenz	I	PMT:f	4.3, S. 83 ff.
externe NMR-Referenz	X	PMX:f	4.3, S. 91
Länge des Gradientenpulses	$\Delta$	$\Delta$ T:D	4.2.4, S. 70
Gradientenfeldstärke	B	B $\Delta$ :I	4.2.4, S. 70
Wasserresonanzfrequenz	f	GPMIX:f	4.5, S. 105
Linienbreite	L	YM:f	4.2.5, S. 75
Eisengehalt	E	G:E	4.4.2, S. 92 ff.
Suszeptibilität	S	KP:LS	4.2.3, S. 65 ff.
Relaxationszeiten	R	G:R	4.4.3, S. 100 ff.
Diffusionskoeffizient	D	PMT:fD	4.2.4, S. 67 ff.
Viskosität	V	APMT:V	4.2.4, S. 67 ff.
spektrale Integralwerte	I	B $\Delta$ :I	4.2.4, S. 70
Austauschterm	k <sub>a</sub>	YMT:k <sub>a</sub>	4.2.5, S. 73
Aktivitätsfaktor	b	YMT:b	4.2.5, S. 74

term betrachtet werden, um den auf makromolekularer Ebene stattfindenden Einfluss des Gewebes auf den Phasenkontrast nachzuweisen und verständlicher zu machen (s. Hypothese 3 in Abschnitt 1.2).

### 3.5 Probenvorbereitung

Zur Stabilisierung der Proteinlösung und als Grundlösungsmittel wird phosphatgepufferte Salzlösung<sup>8</sup> mit pH = 7 verwendet. In der NMR-Spektroskopie ist es üblich, die Messfrequenz mit einer zusätzlichen Frequenz (hier die Resonanzfrequenz von <sup>2</sup>H) zu koppeln (sogenannter *lock*). Damit wird das langsame Abnehmen des Magnetfelds (sog. *drift*, hervorgerufen durch Unvollkommenheiten der Supraleiter) kompensiert. Zur Pufferlösung wurde daher D<sub>2</sub>O beigemischt (10 Volumenprozent). Die Proteine wurden in der damit zubereiteten Pufferlösung entweder in verschiedenen Mengen gelöst oder Stammlösungen mit dem Grundlösungsmittel verdünnt. Bei Verwendung interner NMR-Frequenzstandards wurde die entsprechende Substanz (TMSP, DSS) dem Lösungsmittel vor der Probenbereitung zugesetzt, da diese in fester Form vorliegen. Im Falle von 1,4-Dioxan konnte auch eine Zugabe nach der Probenbereitung mit einer variablen Kolbenhubpipette<sup>9</sup> für Mengen zwischen 0,5 µl und 10 µl erfolgen. Auch im Falle der Beimischung anderer Substanzen, wie Dextran, wurden Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen hergestellt und entsprechend zusammengebracht, um eine Konzentrationsvariation (meist im Bereich 0-100 mM) zu erreichen. Zur Vermeidung von Luftblasen wurden die Lösungen zentrifugiert. Die resultierenden Proteinkonzentrationen wurden entweder mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie<sup>10</sup> oder einem BCA-Test<sup>11</sup> ermittelt.

Die erreichten Proteinkonzentrationen variieren zwischen 0 mg/ml und 100 mg/ml. Damit liegen die Konzentrationen im Bereich physiologischer Bedingungen: im Zytosol liegen Makromoleküle mit Konzentrationen zwischen etwa 40 mg/ml und 60 mg/ml vor [85]. Da Zytosol der wässrige Zellbestandteil ist, liegt dort jedoch die geringste Makromolekülkonzentration (abgesehen vom Liquor) *in vivo* vor. Höhere

<sup>8</sup>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, PBS; Cell Concepts GmbH, Umkirch, Deutschland.

<sup>9</sup>Digitale Mikropipette, pipet4u, AHN Biotechnologie GmbH, Nordhausen, Deutschland. Messunsicherheit max. 2,5%, Ungenauigkeit max. 1,5%.

<sup>10</sup>Eine 1:10 Lösung wurde dazu am Nanodrop 1000 Spektrophotometer über die Methode „Protein A280“ (Absorptionmessung bei 280 nm Wellenlänge) untersucht.

<sup>11</sup>BCA = Bicinchoninsäure. Der BCA-Test ist ein quantitatives Verfahren zur Proteinbestimmung.

Konzentrationen können zum einen aufgrund der Lösungseigenschaften mancher Proteine und zum anderen wegen der Anforderungen der hochauflösenden NMR-Spektroskopie<sup>12</sup> nicht verwendet werden.

### 3.6 NMR-Spektroskopie

#### 3.6.1 Allgemeine Versuchsabläufe

Die vorbereiteten Lösungen wurden mittels Pipetten in angepassten Volumina<sup>13</sup> zwischen 500  $\mu\text{l}$  und 700  $\mu\text{l}$  in Präzisions-NMR-Röhrchen mit einem Durchmesser von 5 mm eingefüllt. Die Röhrchen wurden in einem Rotor positioniert und in den Magneten des NMR-Spektrometers über eine Stickstoff- bzw. Druckluft-betriebene Lift-Anlage eingeführt. Die Messungen erfolgten mit den NMR-Spektrometern DPX 400 (400 MHz) und AVANCE 600 (600 MHz) der Firma Bruker. Die Proben wurden in den Experimenten bei Temperaturen von 298 K, 303 K und 308 K für etwa 10 Minuten stabilisiert.

Zur Reduktion von Feldinhomogenitäten durch die Probe wurde manueller (400-MHz-System) bzw. Gradienten-Shim (600 MHz-System) durchgeführt. Mit einer einzelnen Pulsanregung erfolgte eine kleinwinklige<sup>14</sup> Spin-Anregung. Der daraufhin entstehende freie Induktionszerfall (FID) wurde über Verstärker und Digitalisierer im Spektrometer registriert<sup>15</sup>. Das erhaltene zeitlich modulierte Frequenzsignal wurde mit Hilfe einer Fourier-Transformation in ein Frequenzspektrum umgewandelt, das relativ zur Spektrometerfrequenz in Einheiten von *parts per million* (ppm) dargestellt wird (s. Abb. 3.2). Zur Registrierung der Frequenzverschiebungen des Wassers wird diese relativ zu den Referenzsubstanzen bestimmt. Bei Lösungen ohne interne Referenzsubstanz wird Chloroform in einem koaxialen NMR-Röhrchen verwendet. Dieses beinhaltet etwa 150  $\mu\text{l}$  Chloroform als externe Referenz. In der Regel wird eine Vergleichsmessung mit dem reinen Lösungsmittel (PBS und D<sub>2</sub>O) durchgeführt. Relativ zu dem Resultat aus dieser Messung wird die Verschiebung des Wassersignals angegeben als  $\Delta f$ .

<sup>12</sup>NMR-Proben müssen eine niedrige Viskosität aufweisen und frei von Luftblasen sein.

<sup>13</sup>Die Füllhöhe liegt standardmäßig bei 4,5 cm. Bei der Verwendung von koaxialen Inserts reduziert sich das Probenvolumen entsprechend.

<sup>14</sup>Resultierender Auslenkungswinkel  $< 30^\circ$ .

<sup>15</sup>Anzahl der Datenpunkte: 64k, resultierende Auflösung: 0,15 Hz.

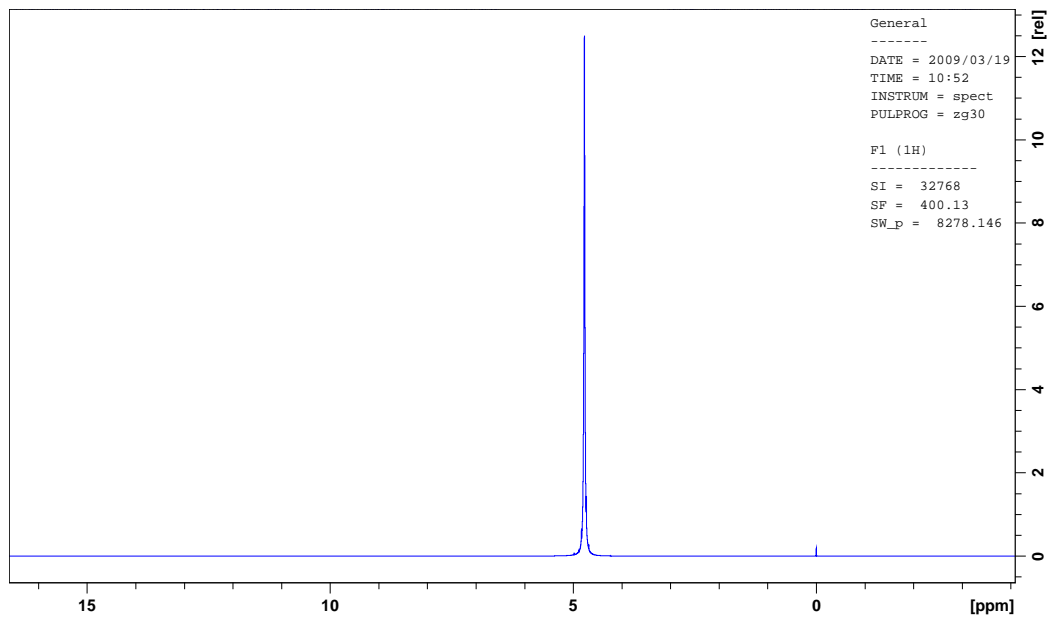


Abbildung 3.2: Darstellung eines für diese Arbeit typischen NMR-Spektrums. Zentral das dominante Wassersignal, bei 0 ppm das Referenzsignal von TMSP.

### 3.6.2 Messung der longitudinalen Relaxationszeit $T_1$

Zur Bestimmung der longitudinalen Relaxationszeit  $T_1$  wurde das Pulsprogramm Inversion Recovery verwendet (s. Abb. 3.3). Dabei wurden folgende Parameter gewählt: 8 Mittelungen, 10 variierte Inversionszeiten  $TI$ <sup>16</sup>. Die Relaxationszeit wurde mit dem Statistikprogramm R [86] berechnet, indem die Intensitäten bzw. Integrale  $I$  der aufgenommenen Einzelspektren an die Funktion

$$I = I_0 - P \cdot e^{-TI/T_1} \quad (3.1)$$

angepasst wurden. Dabei ist  $TI$  die Inversionszeit,  $P$  ein Anpassungsfaktor und  $I_0$  die maximal messbare Intensität des Signals.

<sup>16</sup>Werte: 0,01 s, 0,1 s, 0,25 s, 0,5 s, 1 s, 2 s, 3 s, 4 s, 5 s und 10 s.

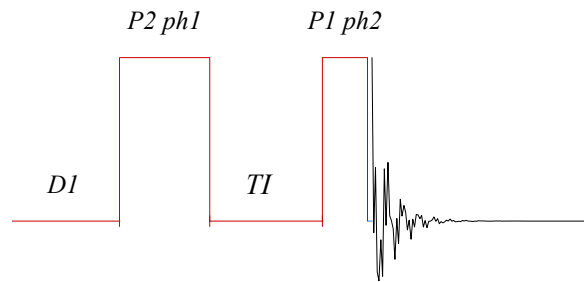


Abbildung 3.3: Schema der Pulsfolge *Inversion Recovery* zur Bestimmung der longitudinalen Relaxationszeit  $T_1$ . 180°-Puls  $P2$  mit Phase  $ph1$  ( $0^\circ$ ,  $0^\circ$ ,  $180^\circ$ ,  $180^\circ$ ,  $90^\circ$ ,  $90^\circ$ ,  $270^\circ$ ,  $270^\circ$ ), 90°-Puls  $P1$  mit Phase  $ph2$  ( $0^\circ$ ,  $180^\circ$ ). Variable Inversionszeit  $TI$ . Wartezeit zur Relaxation  $DI$ .

### 3.6.3 Messung der transversalen Relaxationszeit $T_2$

Zur Bestimmung der transversalen Relaxationszeit  $T_2$  wurde das Pulsprogramm CPMG (Carr, Purcell, Meiboom, Gill) verwendet (s. Abb. 3.4). Dabei wurden folgende Parameter gewählt: 8 Mittelungen, 12 variierte Zyklenzahlen<sup>17</sup>. Dabei wird die Frequenz des eingestrahlten RF-Pulses resonant zu Wasser gewählt. Die Relaxationszeit wird manuell berechnet, indem die Intensitäten/Integrale  $I$  der aufgenommenen Einzelspektren an die Funktion

$$I = I_0 \cdot e^{-TE/T_2} \quad (3.2)$$

angepasst werden. Dabei ist  $I_0$  ein Anpassungsfaktor und die Echozeit  $TE$  wird berechnet über die Gleichung

$$TE = (D20 \cdot 2 + P2) \cdot c \quad , \quad (3.3)$$

wobei  $c$  der Zyklenzahl entspricht,  $D20$  ist eine Wartezeit und  $P2$  die Länge des 180°-Pulses. Letztgenannte Parameter werden der Datei *acqu* entnommen, in der alle Versuchsparameter verzeichnet sind.

<sup>17</sup>Werte: 3, 7, 15, 31, 45, 63, 91, 127, 255, 511, 1023, 2049.

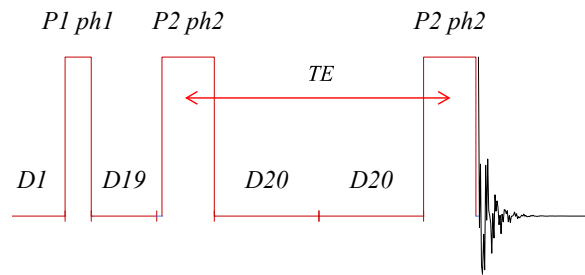


Abbildung 3.4: Schema der Pulsfolge *CPMG* zur Bestimmung der transversalen Relaxationszeit  $T_2$ . 180°-Puls  $P2$  mit Phase  $ph2$  (90°, 270°, 90°, 270°, 0°, 180°, 0°, 180°), 90°-Puls  $P1$  mit Phase  $ph1$  (0°, 0°, 180°, 180°, 90°, 90°, 270°, 270°), Wartezeit zur Relaxation  $D1$ , Wartezeit  $D19$  ( $= D20 - P1/2$ ), Wartezeit  $D20$ , Echozeit  $TE$ . Wiederholung des Sequenzabschnitts der beiden 180°-Pulse mit Zyklenzahl  $c$  (siehe Text).

### 3.6.4 Diffusionsmessung

Das Programm `stebpgp1s` (Stimulated Echo Experiment) ermöglicht die Ermittlung der Zerfallskurve zur Diffusionsmessung (s. Abb. 3.5). Die Messungen erfolgen ebenfalls resonant zur Wasserfrequenz. Dazu sind die Parameter  $D20$  und  $P30$  zunächst anzupassen, indem das Programm `stebpgp1s1d` ausgeführt wird. Dabei wird das Referenzspektrum bei 2% Gradientenfeldstärke (`gpz6`) mit dem Spektrum bei 95% verglichen. Dabei sollte die Signalstärke auf 5% abfallen. Die Änderung von  $P30$  ( $= 1/2 \delta$ ) wirkt sich im Optimierungsprozess am stärksten aus.

Dabei wurden folgende Parameter gewählt: Variation der Gradientenfeldstärke auf linearer Rampe mit 16 Stufen<sup>18</sup>, Startwert 2%, Endwert 95%.

Die Diffusionskonstante  $D$  ergibt sich durch Anpassung an die Gleichung

$$I = I_0 \cdot e^{-D\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)} \quad (3.4)$$

mit einem Anpassungsfaktor  $I_0$ , dem gyromagnetischen Moment  $\gamma$ <sup>19</sup>, der Gradientenfeldstärke  $g$ , der Länge des Gradientenpulses  $\Delta$  ( $= D20$ ) und der Diffusionszeit  $\delta$  ( $= 2 \cdot P30$ ).

<sup>18</sup>Einzelwerte des Gradienten: 0,681 G/cm, 2,793 G/cm, 4,904 G/cm, 7,016 G/cm, 9,127 G/cm, 11,239 G/cm, 13,35 G/cm, 15,462 G/cm, 17,573 G/cm, 19,685 G/cm, 21,796 G/cm, 23,908 G/cm, 26,019 G/cm, 28,131 G/cm, 30,242 G/cm, 32,354 G/cm

<sup>19</sup>267522210 Hz/T



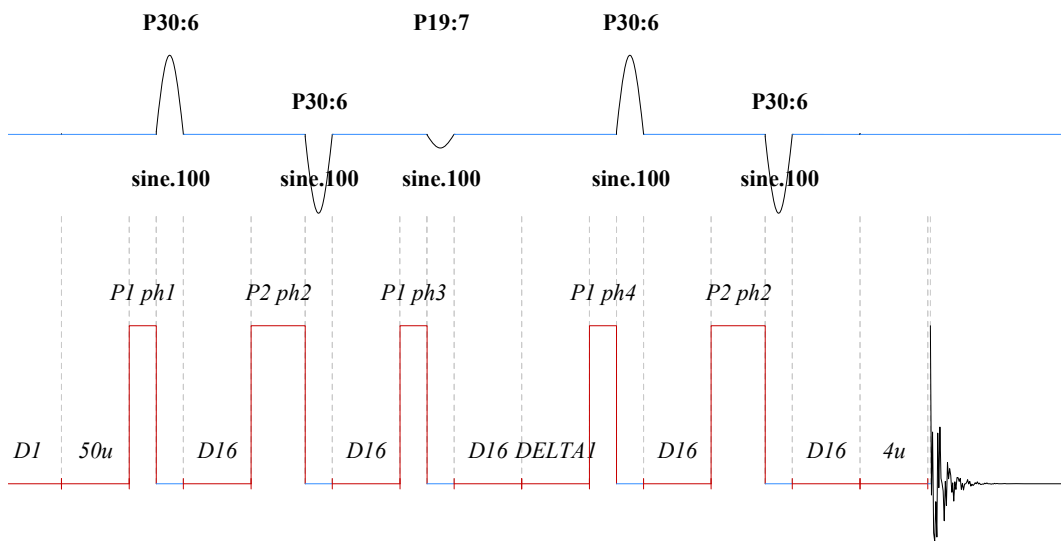


Abbildung 3.5: Schema der Pulsfolge *Spin Exchange* (SE) zur Bestimmung der Diffusion. Gradientenpuls „6“ mit 100% Feldstärke und Dauer P30 (P30:6) bzw. „7“ mit -17,5% Feldstärke und Dauer P19 (P19:7, *spoil*); sinusförmige Pulsform (sine.100). 90°-Puls *P1* mit Phase *ph1* (0), *ph2* (0, 0, 0, 0,  $\pi$ ,  $\pi$ ,  $\pi$ ,  $\pi$ ), *ph3* (0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,  $\pi$ ,  $\pi$ ,  $\pi$ ,  $\pi$ ,  $\pi$ ,  $\pi$ ,  $\pi$ ), bzw. *ph4* (0,  $\frac{1}{2}\pi$ ,  $\pi$ ,  $\frac{3}{4}\pi$ ),  $\pi$ -Puls *P2* mit Phase *ph2*. Diffusionszeit *DELTA1* ( $= D20 - P1 * 2 - P2 - P30 * 2 - D16 * 3 - P19$ ). Wartezeit zur Relaxation *D1*, bzw. zur Erholung der Gradienten *D16* und Wartezeiten 50  $\mu$ s (50u) und 4  $\mu$ s (4u).

### 3.7 Datenextraktion

Zur Betrachtung und Auswertung der erhaltenen Spektren wurden die Programme TopSpin (Bruker BioSpin), Spinworks [87] und matNMR<sup>20</sup> [88] verwendet. Letzteres kam insbesondere bei der Bestimmung der Relaxationszeiten und Diffusionskonstanten zum Einsatz, da die herstellereigene Implementierung der Software TopSpin in der verwendeten Version 2.1 fehlerhaft arbeitet. Statistische Auswertungen, insbesondere Kurvenanpassungen, wurden mit dem Statistikprogramm R [86] durchgeführt.

Protonenspektren wässriger Proteinlösungen wurden mittels NMR-Spektroskopie aufgezeichnet (vgl. Abschnitt 3.6). Nach einer Verarbeitung<sup>21</sup> des FID ist zur vereinfachten und konsistenten Auswertung jedes Spektrum auf einen feststehenden Wert referenziert worden (s. Tab. 3.3).

Tabelle 3.3: Verwendete Referenzsubstanzen und deren zugehörige Frequenzverschiebung  $f_0$

Substanz	$f_0$ [ppm]
TMSP	0,00
1,4-Dioxan	3,75
Chloroform	7,26

Die resultierenden Spektren wurden hinsichtlich der Verschiebung des Wassersignals ausgewertet, d. h. die Frequenz  $f$  der Signalspitze, die Wasser zuzuordnen ist, wurde bestimmt. Im Allgemeinen wurde eine Referenzmessung mit dem reinen Lösungsmittel durchgeführt und die ermittelte Resonanzfrequenz des Wassers  $f_0$  bei den Messergebnissen mit Proteinen bzw. Gewebextrakten subtrahiert (s. Abb. 3.6). Die Linienbreite des Signals von Wasser ist sehr groß (i. d. R. bis zu 20 Hz i. Vgl. zu etwa 1 Hz bei Chloroform). Daher ist zum einen das Ablesen der Frequenzverschiebung nicht sehr präzise (i. d. R. hat nicht nur ein Datenpunkt den Maximalwert). Zum anderen verändern sich die Maximalwerte durch Feldinhomogenitäten. Dies ist insbesondere bei Temperaturänderung zu verzeichnen (vgl. Abschnitt 4.2.1).

<sup>20</sup>Verwendung in Verbindung mit Matlab R2009b, The MathWorks, Inc.

<sup>21</sup>Fourier-Transformation, automatische/manuelle Phasenkorrektur, automatische Grundlinienkorrektur

## KAPITEL 3 EXPERIMENTELLE DURCHFÜHRUNG

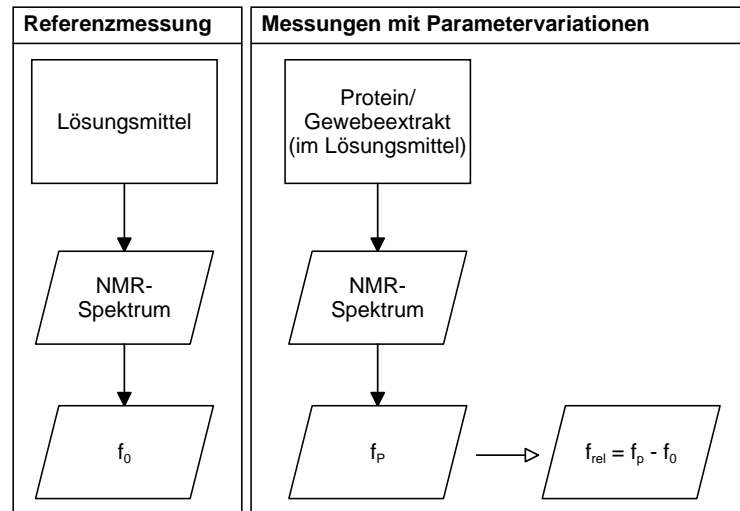


Abbildung 3.6: Darstellung des Verlaufs der Datenextraktion aufgeteilt in einzelne Referenzmessung und Messungen mit Parametervariation. Der linke Block wird dabei i. d. R. nur einmal durchgeführt, der rechte entsprechend der Anzahl der Parametervariationen.

Dabei ändern sich sowohl die Shim-Parameter, die Eigenschaften der Send- und Empfangsspule, als auch die Reaktion der Atomkerne (vgl. auch Boltzmannverteilung). So zeigen beispielsweise die von der Temperatur linear abhängigen Resonanzfrequenzen Abweichungen (s. Abb. 3.7, links). Dieses Phänomen kann durch eine nachträgliche Dekonvolution der Linienform behoben werden, d. h. es kommt zu einer Glättung der Kurve (s. Abb. 3.7, rechts), indem die vorhandenen Datenpunkte einer Lorentz-Kurve angepasst werden (s. Abb. 3.8).

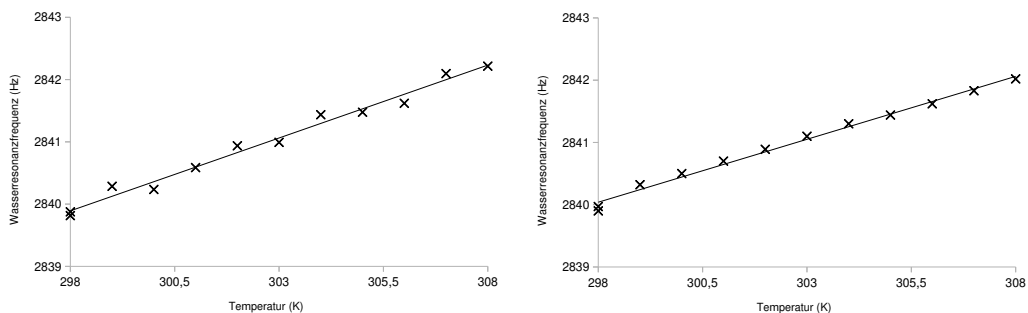


Abbildung 3.7: Variation der Wasserfrequenz mit der Temperatur. Durchgezogene Linie: lineare Regression. Links mit normaler Vorverarbeitung ( $r = 0,9841$ ), rechts nach Dekonvolution ( $r = 0,9914$ ).

## 3.8 METHODEN ZUR ERMITTLUNG DER SUSZEPTIBILITÄT

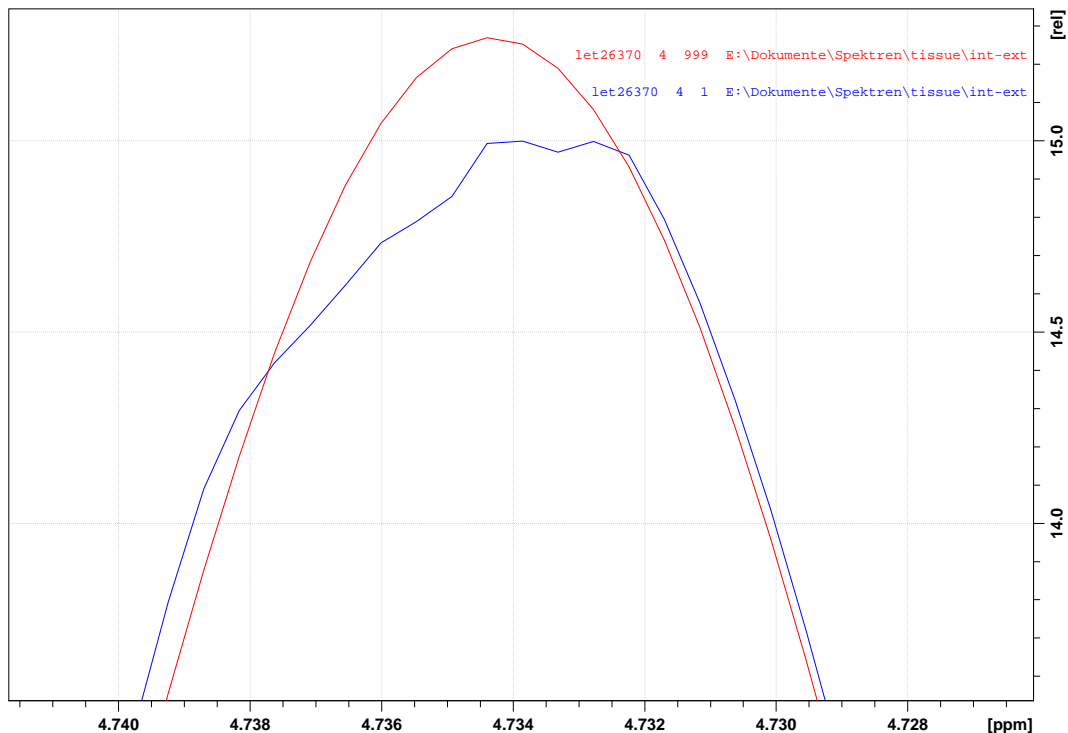


Abbildung 3.8: Signalspitze eines  $^1\text{H}$ -Spektrums einer reinen Pufferlösung (blau) mit angepasster Lorentz-Kurve (rot).

Bei der Darstellung der Ergebnisse im folgenden Kapitel wurden im allgemeinen Messfehler von 0,003 ppm angenommen (thermisches Rauschen, Magnetfelddrift) und berücksichtigt, soweit dies in der Darstellung sinnvoll möglich ist. Bei abgeleiteten Größen sind die Standardabweichungen als Fehler berücksichtigt.

## 3.8 Methoden zur Ermittlung der Suszeptibilität

### 3.8.1 Vorbemerkungen

Da die magnetische Suszeptibilität als eine Hauptursache des Phasenkontrastes angesehen wird, ist es erforderlich, diesen Parameter ebenfalls in den Untersuchungen mit einzubeziehen. Im Verlaufe meiner Arbeit habe ich verschiedene Methoden angewendet bzw. erprobt, die im Folgenden kurz dargestellt werden sollen.

### 3.8.2 Winkelabhängige Messung

Grundlage für diese Methode ist die richtungsabhängige Wirkung der magnetischen Suszeptibilität im Magnetfeld. Dabei gilt für die Suszeptibilität  $\chi$  folgender Zusammenhang

$$\chi \propto \cos^2 \theta - 1/3 \quad (3.5)$$

für eine homogene Substanz in zylindrischer Geometrie und mit dem Winkel  $\theta$  zum statischen Magnetfeld. Variiert man den Winkel, bspw. eines Röhrchens mit der Probesubstanz, kann mit Gleichung 3.5 die Suszeptibilität bestimmt werden.

Für eine Durchführung am 7 T Human Scanner wurde eine selbstgebaute<sup>22</sup> Spule (Spulendurchmesser 5 mm) verwendet. Eine zu geringe Sensitivität ließ keine genauere Untersuchung mit dieser Anordnung zu.

Am 7 T NMR Spektrometer (Microimaging, Spulendurchmesser 30 mm) ergaben sich ähnliche Probleme, weshalb die Methode keine weitere Anwendung fand.

### 3.8.3 Methode nach Hoffman

Hoffman beschrieb 2003 eine Methode unter Verwendung von NMR-Spektrometrie [63]. Grundlage sind unterschiedliche Formfaktoren bei veränderter Füllung der NMR-Spule. Zwei FID-Messungen mit unterschiedlicher Position des Probenröhrchens unterhalb des Zentrums der Spule<sup>23</sup> werden dazu durchgeführt: (a) 20 mm (die normale Position) und (b) 2 mm. Die Differenz der Linienbreiten bei 4% Signalintensität (s. Abb. 3.9) liefert ein relatives Maß der magnetischen Suszeptibilität und kann durch Vergleichswerte bekannter Substanzen umgerechnet werden, da ein linearer Zusammenhang zwischen Linienbreite und Suszeptibilität besteht (s. Abb. 3.10). Damit kann über den Zusammenhang

$$\chi = -0,3313 \cdot LB + 0,0162 \quad (3.6)$$

die Suszeptibilität  $\chi$  über die Bestimmung der Linienbreite  $LB$  nach der beschriebenen Methode bestimmt werden.

Diese Methode wurde wegen der schnellen und einfachen Durchführung insbesondere bei den Gewebeextrakten angewendet.

<sup>22</sup>Dank an Matthias Kladdeck, damals Diplomand in der Arbeitsgruppe.

<sup>23</sup>Die Positionierung erfolgte mittels Probenröhrchen-Justage-Zylinder der Firma Bruker.

### 3.8 METHODEN ZUR ERMITTLUNG DER SUSZEPTIBILITÄT

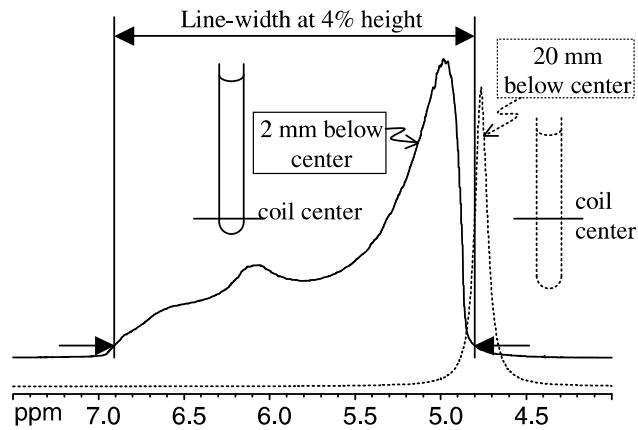


Abbildung 3.9: Darstellung eines typischen Spektrums mit Röhrenpositionen bei 2 mm (durchgezogene Linie) und 20 mm (gestrichelte Linie) unterhalb des Spulenmittelpunktes (*coil center*) [63].

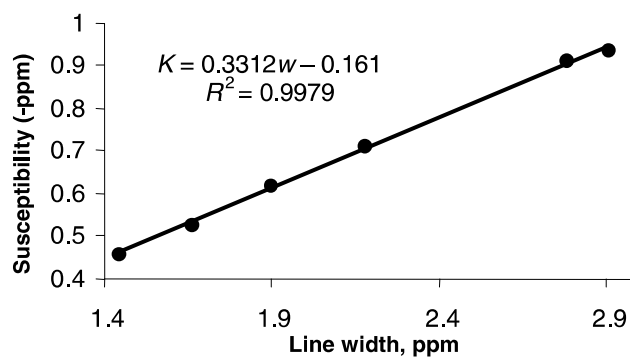


Abbildung 3.10: Korrelation der magnetischen Suszeptibilität mit der Linienbreite für spezifische NMR-Röhren (5 mm Durchmesser) und Probenkopf (Bruker 5 mm BBO) [63].

### 3.8.4 Weitere Methoden

Eine magneto-mechanische Methode verwendet eine Waage zur Messung der Kraftwirkung der Feldänderung, hervorgerufen durch die in einem Magnetfeld befindliche Substanz mit einer Gouy- oder sonstigen (empfindlichen) Waage (vgl. [89]). Eine mit Hilfe der NMR-Spektroskopie durchführbare Methode wird im folgenden Abschnitt beschrieben, die die kombinierte Messung von magnetischer Suszeptibilität und chemischer Austauschwechselwirkung mit Hilfe von NMR ermöglicht.

## 3.9 Doppelte Referenzierung

Aufgrund der Beeinflussung der untersuchten Substanzen durch die Suszeptibilität der externen NMR-Referenzsubstanz (s. Ende Abschnitt 2.8), wurde teilweise eine doppelte Referenzierung mit interner und externer NMR-Referenzsubstanz vorgenommen. Dies geschieht in der Form, dass gemeinsam mit der Pufferlösung die Resonanzfrequenzen der internen Referenz Dioxan ( $f_D^W$ ) und der externen Referenz Chloroform ( $f_C^W$ ) gemessen wurden. Dies erfolgte entsprechend mit den Proteinlösungen ( $f_D^P$  und  $f_C^P$ ). Die Wasserresonanzfrequenzen wurden dann nach folgender Formel korrigiert, wie bei Blackburn *et al.* vorgeschlagen [90]:

$$f_{\text{kor}}^P = f^P - f_C^P + (f_C^W - f_D^W) . \quad (3.7)$$

## 3.10 Messung von Austausch und Suszeptibilität

Das hier beschriebene Verfahren habe ich in Anlehnung an ein Verfahren entwickelt, das Luo *et al.* veröffentlicht haben [91]. Die Vorgehensweise ist nun stark vereinfacht: statt der Messung der Suszeptibilität in zwei orthogonalen Ausrichtungen eines NMR-Röhrchens (vgl. Abschnitt 3.8.2) und der Bestimmung des Austauschterms mittels normaler NMR-Spektroskopie, wird die integrierte Messung beider Parameter mit Hilfe der NMR-Spektroskopie durchgeführt.

Grundlage ist eine Messreihe, bestehend aus vier unterschiedlichen Parametersätzen (s. auch Abb. 3.11):

Abk. Erläuterung

0: ohne interne Referenz ( $\text{CHCl}_3$  als externe Referenz)

1: mit interner Referenz (1,4-Dioxan)

W: ohne Protein (wässrige Lösung mit  $\text{D}_2\text{O}$ )

P: mit Protein in wässriger Lösung

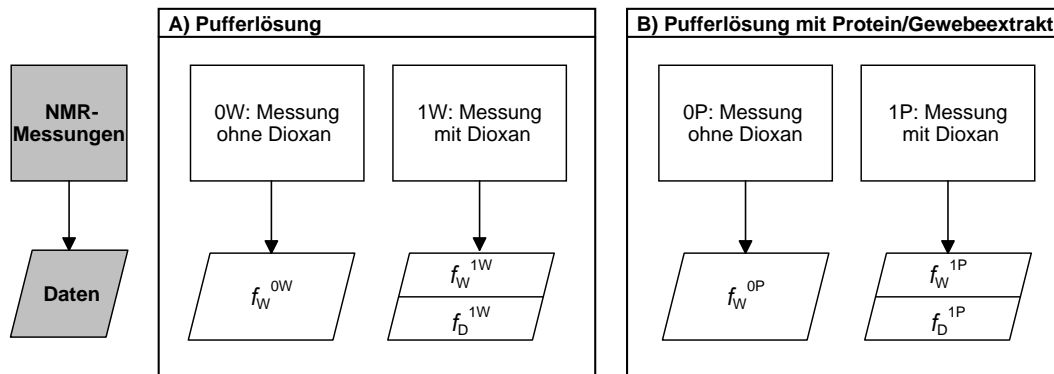


Abbildung 3.11: Schematische Darstellung des Messverfahrens zur Bestimmung von chemischem Austausch und magnetischer Suszeptibilität.

Diese Einzelmessungen lassen sich auch folgenden Kombinationen zuordnen:

- 0W und 0P, d. h. Wasser bzw. Proteinlösung ohne Dioxan
- 1W und 1P, d. h. Wasser bzw. Proteinlösung mit Dioxan.

Dabei gelten für die chemischen Verschiebungen  $f_W$  des Wassers in den einzelnen Messungen folgende Gleichungen:

$$f_W^{0W} = f_W^0 + \Delta f_S^0 \quad (3.8)$$

$$f_W^{0P} = f_W^0 + \Delta f_S^0 + \Delta f_{AP} + \Delta f_{SP} \quad (3.9)$$

$$f_W^{1W} = f_W^0 + \Delta f_S^0 + \Delta f_{AD} + \Delta f_{SD} \quad (3.10)$$

$$f_W^{1P} = f_W^0 + \Delta f_S^0 + \Delta f_{AD} + \Delta f_{SD} + \Delta f_{AP} + \Delta f_{SP} \quad (3.11)$$

wobei die Indizes  $S$  für Suszeptibilität,  $A$  für Austausch und die Subindizes  $P$  für Protein,  $D$  für Dioxan und 0 für den Referenzwert (ohne Protein und interne Referenz) stehen. Die meisten dieser Variablen und die Referenzwerte dienen der vollständigen Darstellung. Sie sind für die Zwecke dieser Arbeit irrelevant und werden



### KAPITEL 3 EXPERIMENTELLE DURCHFÜHRUNG

daher nicht ermittelt.

Für die chemischen Verschiebungen  $f_D$  der internen Referenz Dioxan in den einzelnen Messungen gelten folgende Gleichungen:

$$f_D^{1W} = f_{D0} + \Delta f_{SD} + \Delta f_{AD} \quad (3.12)$$

$$f_D^{1P} = f_{D0} + \Delta f_{SD} + \Delta f_{AD} + \Delta f_{SP}. \quad (3.13)$$

Bei der Berechnung der magnetischen Suszeptibilität und des chemischen Austausches ist mit den vorgestellten Gleichungen wie folgt vorzugehen:

Die Differenz der Verschiebungen  $f_D^{1P}$  (Gl. 3.13) und  $f_D^{1W}$  (Gl. 3.12) liefert die durch das Protein hervorgerufene Frequenzverschiebung  $\Delta f_S^P$ , die nur auf die Suszeptibilität zurückzuführen ist. Die Subindizes „abs“, „rel“, und „korr“ stehen dabei für die Auswertung (1.) *absoluter* Resonanzfrequenzen, (2.) *relativ* zu externem Chloroform – mit Resonanzfrequenz  $f_C$  – und (3.) *korrigierter* Doppelreferenzierung nach Abschnitt 3.9:

$$\Delta f_{S_{\text{abs}}}^P = f_D^{1P} - f_D^{1W} \quad (3.14)$$

$$\begin{aligned} \Delta f_{S_{\text{rel}}}^P &= (f_D^{1P} - f_C^{1P}) - (f_D^{1W} - f_C^{1W}) \\ &= f_D^{1P} - f_C^{1P} - f_D^{1W} + f_C^{1W} \end{aligned} \quad (3.15)$$

$$\begin{aligned} \Delta f_{S_{\text{korr}}}^P &= (f_D^{1P} - f_C^{1P} + f_C^{\text{korr}}) - (f_D^{1W} - f_C^{1W} + f_C^{\text{korr}}) \\ &= f_D^{1P} - f_C^{1P} - f_D^{1W} + f_C^{1W}. \end{aligned} \quad (3.16)$$

Es ist dabei festzustellen, dass die beiden letztgenannten Gleichungen identisch sind. Demzufolge ist eine Unterscheidung zwischen Doppelreferenzierung und Verwendung von externem Chloroform nicht nötig.

Aus der Differenz der Verschiebungen  $f_W^{1P}$  (Gl. 3.11) und  $f_W^{1W}$  (Gl. 3.10) bzw.  $f_W^{0P}$  (Gl. 3.9) und  $f_W^{0W}$  (Gl. 3.8), sowie der gerade berechneten Frequenzverschiebung  $\Delta f_S^P$  ergibt sich die Verschiebung  $\Delta f_A^P$  bzw.  $\Delta^D f_A^P$  für den Austausch zwischen Protein und Wasser<sup>24</sup>:

$$\Delta^D f_{A_{\text{abs}}}^P = f_W^{1P} - f_W^{1W} - \Delta f_S^P \quad (3.17)$$

$$\Delta f_{A_{\text{abs}}}^P = f_W^{0P} - f_W^{0W} - \Delta f_S^P \quad (3.18)$$

<sup>24</sup>Der Subindex  $D$  bei  $\Delta^D f_A^P$  soll die Berechnung aus Frequenzverschiebungen von Messungen mit Dioxan verdeutlichen, d. h. ausschließlich Messungen mit Dioxan werden berücksichtigt.

### 3.10 MESSUNG VON AUSTAUSCH UND SUSZEPTIBILITÄT

Diese beiden Gleichungen gelten für absolute Resonanzfrequenzen und erweitern sich mit den vorgenannten Gleichungen 3.15 bzw. 3.16 auf die nachstehenden Formen mit einfacher bzw. doppelter Referenzierung (jeweils identisch, daher nur mit der Bezeichnung rel):

$$\Delta^D f_{A_{\text{rel}}}^P = f_W^{1P} - f_W^{1W} - f_D^{1P} + f_D^{1W} \quad (3.19)$$

$$\Delta f_{A_{\text{rel}}}^P = f_W^{0P} - f_C^{0P} - f_W^{0W} + f_C^{0W} - f_D^{1P} + f_C^{1P} - f_C^{1W} + f_D^{1W} \quad (3.20)$$

was zu Abweichungen von den absoluten Berechnungen nach Gl. 3.17 bzw. 3.18 führt:

$$\Delta f_{A_{\text{rel}}}^P - \Delta f_{A_{\text{abs}}}^P = -f_C^{0P} + f_C^{0W} + f_C^{1P} - f_C^{1W} \quad (3.21)$$

$$\Delta f_{S_{\text{rel}}}^P - \Delta f_{S_{\text{abs}}}^P = -f_C^{1P} + f_C^{1W} . \quad (3.22)$$

Absolute und relative Berechnungsvarianten für den Austauschterm  $\Delta^D f_A^P$  (Messungen mit Dioxan) sind dahingegen identisch.

Die Dioxankonzentration wird so gering gehalten wie möglich, um die Wechselwirkung zwischen Dioxan und Wasser zu minimieren (vgl. Abschnitte 2.8 bzw. 4.3). Letztlich ist eine Menge von 10  $\mu\text{l}$  je Probe (Ausgangsvolumen 550  $\mu\text{l}$ ) verwendet worden und entspricht damit einer Konzentration von 2 mM. Dabei ist das Resonanzsignal von Dioxan noch gut von Ethanol-Signalen aus der externen Referenz (Chloroform mit etwa 0,05% Ethanol) zu unterscheiden (s. Abb. 3.12).

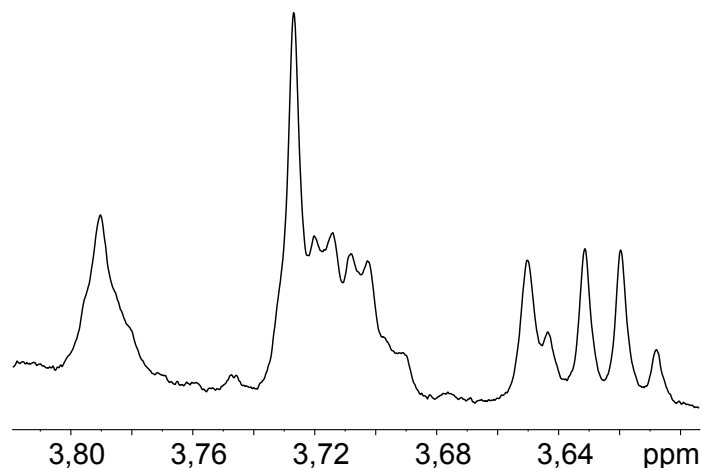


Abbildung 3.12: Darstellung der Dioxan-Resonanzfrequenz (größtes Signal) im NMR-Spektrum mit Ethanol-Quartett (rechts) und überlagernden Signalen der Makromoleküle.

# Kapitel 4

## Ergebnisse

### 4.1 Vorbemerkungen

Nach der Vorstellung der Grundlagen und Methoden, wie chemischen Austausch und magnetische Suszeptibilität betreffend, soll nun in der Darstellung der Ergebnisse diese Reihenfolge aufgegriffen werden:

Zunächst werden Beobachtungen hinsichtlich allgemeiner technischer und physikalischer Parameter gezeigt (s. Abschnitte 4.2.1-4.2.3). Darunter zählen:

- Temperatur
- Messstabilität
- Suszeptibilität
- Diffusion/Viskosität

Danach betrachte ich konkretere Systemgrößen näher, die eher dem chemischen und biophysikalischen Bereich zuzuordnen sind (s. Abschnitte 4.2.5-4.2.7):

- OH-Bindungsstellen
- Konformationsänderungen
- pH-Wert

Die unumgängliche Verknüpfung physikalischer und chemischer Parameter spiegelt sich auch hier wieder (insbesondere im Bereich der Diffusion). Abgeschlossen

## 4.2 FREQUENZVARIATION DES WASSERSIGNALS

wird die Betrachtung dieser Grundparameter mit dem Abschnitt 4.2.8 zur Proteinkonzentration.

Schließlich sollen drei große Abschnitte dieses Kapitel beschließen und die wesentlichen Erkenntnisse meiner Arbeit begründen (s. Abschnitte 4.3-4.5):

- die Problematik der Wahl von NMR-Referenzsubstanzen
- Ergebnisse der Untersuchung von Gewebeextrakten
- die Ermittlung von Austausch und Suszeptibilität mit Hilfe geeigneter NMR-Referenzsubstanzen

Diese sind über die Methodik (s. Abschnitte 3.8 und 3.10, S. 50 ff.) und damit einhergehende Überlegungen (s. Abschnitt 2.8, S. 29 ff.) eng miteinander verknüpft.

## **4.2 Einfluss von Grundparametern auf die Frequenzvariation des Wassersignals**

### **4.2.1 Temperatur**

Die NMR-Messungen wurden in der Regel bei drei verschiedenen Temperaturen durchgeführt, um die Temperaturabhängigkeit zu erfassen, wie sie im Abschnitt 2.5.3 (S. 23) dargestellt wurde. Für das Protein BSA wurde die Temperaturabhängigkeit ausführlicher untersucht. Die lineare Abhängigkeit (abnehmende Wasserfrequenzverschiebung für steigende Temperatur) wird in Abb. 4.1 gezeigt; die Anstiege der temperaturabhängigen Wasserfrequenzen über der Proteinkonzentration für BSA und IgG sind in Abb. 4.2 dargestellt. Für zunehmende Proteinkonzentration zeigt sich in beiden Fällen eine Zunahme der Anstiege bis zu einer Konzentration von 33 mg/ml IgG bzw. 50 mg/ml BSA. In beiden Versuchsreihen wurde TMSP als interne NMR-Referenz verwendet.

## KAPITEL 4 ERGEBNISSE

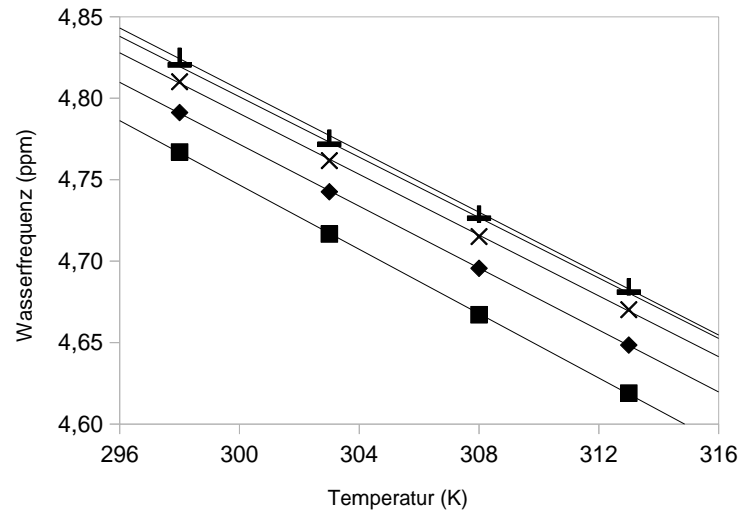


Abbildung 4.1: Temperaturabhängigkeit der Wasserfrequenzverschiebung mit BSA (Konzentrationen: ■ 0 mg/ml, ◆ 25 mg/ml, × 50 mg/ml, ∗ 75 mg/ml, | 100 mg/ml).

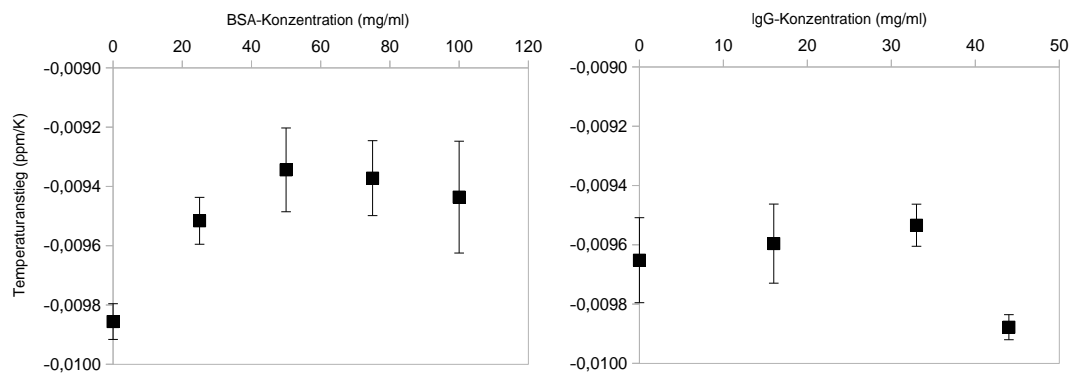


Abbildung 4.2: Anstiege der temperaturabhängigen Wasserfrequenzverschiebungen (vgl. Abb. 4.1) bezogen auf die Proteinkonzentrationen von BSA (links) und IgG (rechts).

## 4.2 FREQUENZVARIATION DES WASSERSIGNALS

In Abschnitt 4.3 wird darauf eingegangen, wie die Konzentration von TMSP die Wasserfrequenzverschiebung beeinflusst. An dieser Stelle will ich bereits mit Bezug auf die Temperaturabhängigkeit darauf eingehen. Bei der Vorbereitung der Probelösungen von BSA mit unterschiedlichen TMSP-Konzentrationen variiert auch die BSA-Konzentration leicht. Über dieser Variation von etwa 0,06 mM BSA ändert sich die temperaturabhängige Frequenzverschiebung um ca. 15 ppb/K (s. Abb. 4.3) – im Vergleich zu 4 ppb/K bei 1,5 mM BSA-Variation und gleichzeitig konstanter TMSP-Konzentration (vgl. Abb. 4.2, links). Eine wesentlich stärkere Kausalität liegt jedoch bei der Variation der TMSP-Konzentration im Bereich von 0 mM bis 100 mM. Die Anstiege der Wasserfrequenzverschiebung über der Temperatur stabilisieren sich für höhere Konzentrationen von TMSP (über etwa 50 mM, s. Abb. 4.4).

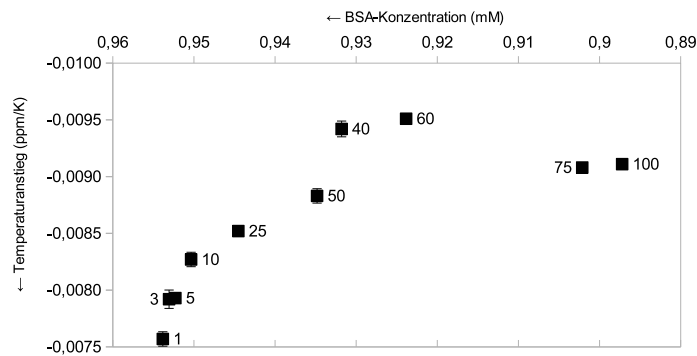


Abbildung 4.3: Anstiege der temperaturabhängigen Wasserfrequenzverschiebungen in BSA-Lösungen mit variabler TMSP-Konzentration (Werte in mM notiert an den Datenpunkten). Beachte: Ausrichtungen von Abszisse und Ordinate sind umgekehrt, um visuelle Korrespondenz mit Abb. 4.4 und 4.40 herzustellen.

Eine vergleichbare Charakteristik der Abhängigkeit einer Variablen von der TMSP-Konzentration zeigt sich später bei der Wasserfrequenzverschiebung mit Bezug auf die BSA-Konzentration (vgl. Abschnitt 4.3 und Abbildungen 4.41 ff., wo die von Temperatur- und Proteinkonzentration abhängigen Frequenzverschiebungen in Relation zueinander gesetzt werden).

Eine weitere Auffälligkeit im temperaturabhängigen Verhalten mit einer NMR-Referenz zeigt sich bei Verwendung von Chloroform als externe Referenzsubstanz: im Vergleich von NMR-Frequenzverschiebungen *relativ* zur Resonanzfrequenz von

## KAPITEL 4 ERGEBNISSE

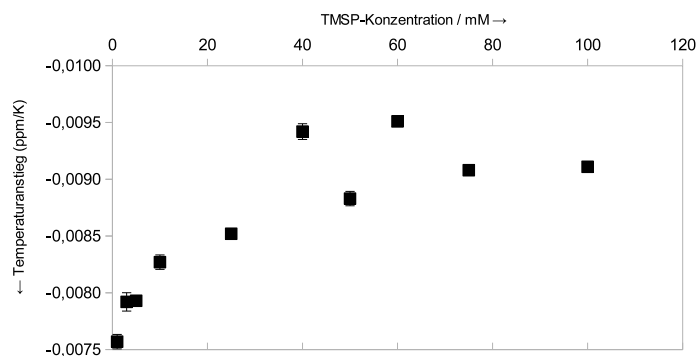


Abbildung 4.4: Anstiege der Frequenzverschiebung in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt über der TMSP-Konzentration (gleicher Datensatz, wie in Abb. 4.3). Ähnlichkeiten zum Verlauf s. Abb. 4.40.

Chloroform und *absolut* zeigen sich 30-50fach stärkere Anstiege temperaturabhängiger Frequenzverschiebungen im Falle *relativer* Verschiebungen (s. Tab. 4.1, S. 62). Es gilt das gleiche Verhältnis von relativen zu absoluten Resonanzfrequenzen wie nach der Berechnung der relativen Frequenzverschiebungen nach Gl. 2.11, d. h.

$$f^{\text{rel.}} = f^{\text{abs.}} - f_{\text{CHCl}_3}.$$

### 4.2.2 Stabilität des Messsystems

Die im vorigen Abschnitt dargestellten Ergebnisse legen unter anderem nahe, dass es für diese Studie essentiell ist, sehr geringe Frequenzunterschiede zu registrieren. Neben den Aufnahmebedingungen der NMR-Spektren, wie Bandbreite, Datenpunkte und Messdauer, spielt auch die physikalisch-technische Stabilität des Gesamtsystems aus supraleitendem Magneten, Anregungs- und Registrierungselektronik eine Rolle.

Im Allgemeinen ist die Reliabilität der NMR-Spektroskopie auch gegen geringfügige Verstellungen einzelner Parameter wie Beispielsweise Matching (Anpassung der Messempfindlichkeit) und Tuning (Anpassung der Resonanzfrequenz) sehr hoch. Der am häufigsten veränderte Parameter – auch für einzelne Proben (beispielsweise bei Temperaturänderung) – ist die Korrektur lokaler Feldinhomogenitäten (shim). Für eine Abschätzung der Fehler bei Wiederholung von Messungen mit unterschiedlichem shim wurden für mehrere Proben drei Messungen durchgeführt. Bei

## 4.2 FREQUENZVARIATION DES WASSERSIGNALS

Tabelle 4.1: Anstiege  $\Delta f_T$  der temperaturabhängigen Frequenzverschiebungen für die Pufferlösung (PBS) und 2,17 g/l Myelin in PBS mit und ohne Dioxan. Die Daten wurden relativ (rel.) zur Resonanzfrequenz der externen NMR-Referenz ( $\text{CHCl}_3$ ) und absolut (abs.) ausgewertet. Die beiden letzten Spalten beziehen sich auf Daten mit doppelter Referenzierung (intern & extern, vgl. Abschnitt 3.9).  $p < 2\text{E-}05$ .

Substanz	Resonanz	rel./abs.	$\Delta f_T$ (Hz/K)	$R^2$	rel. zu Dioxan	
					$\Delta f_T$ (Hz/K)	$R^2$
PBS	Wasser	rel.	-8,53	0,99964	-1,45	0,99860
	Wasser	abs.	0,22	0,99405		
	$\text{CHCl}_3$	abs.	8,74	0,99958	1,69	0,99870
PBS mit Dioxan	Wasser	rel.	-8,26	0,99990	-1,49	0,99786
	Wasser	abs.	0,20	0,99073		
	Dioxan	rel.	-1,69	0,99870	5,11	0,99915
	Dioxan	abs.	6,80	0,99974		
	$\text{CHCl}_3$	abs.	8,49	0,99987		
Myelin	Wasser	rel.	-8,41	0,99906	-1,63	0,99123
	Wasser	abs.	0,21	0,99214		
	$\text{CHCl}_3$	abs.	8,63	0,99901	1,80	0,97081
Myelin mit Dioxan	Wasser	rel.	-8,46	0,99964	-1,63	0,99142
	Wasser	abs.	0,21	0,99368		
	Dioxan	rel.	-1,58	0,99979	4,98	0,99779
	Dioxan	abs.	7,09	0,99953		
	$\text{CHCl}_3$	abs.	8,67	0,99960		



## KAPITEL 4 ERGEBNISSE

jeder Einzelmessung wurde die Probe aus der Probenspule entfernt und wieder eingesetzt und wieder ein neuer shim eingestellt. Dabei beträgt die mittlere Standardabweichung der gemessenen chemischen Verschiebung von Wasser 0,0002 ppm. Ohne die oben genannten Messparameter zu ändern (eingeschaltetes *autoshim*), wurde eine Messreihe durchgeführt, die die zeitliche Stabilität des NMR-Systems über einen halben Tag zeigt (s. Abb. 4.5). Dabei sind lediglich Abweichungen von  $\pm 0,0002$  ppm zu verzeichnen. Trotz Frequenzstabilisierungs-(Lock-)System ist eine Drift von 0,11 Hz/h zu verzeichnen.

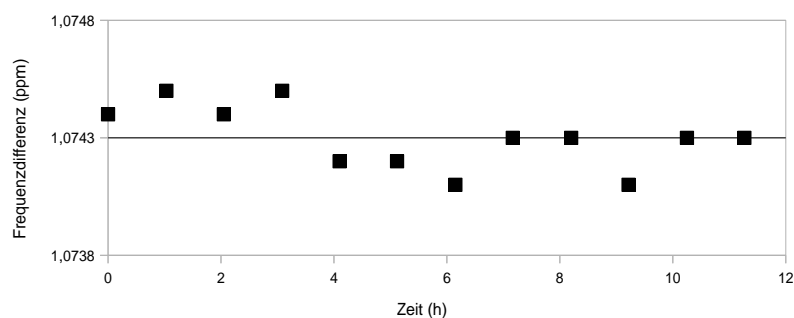


Abbildung 4.5: Darstellung des Zeitverlaufs der Frequenzdifferenzen von Wasser und 1,4-Dioxan. Die Abweichungen vom Mittelwert  $\Delta f = 1,0743$  ppm betragen maximal  $\pm 0,0002$  ppm bei  $T = 293$  K.

Das Signal-Rausch-Verhältnis liegt in der Regel in der Größenordnung  $10^3$  bis  $10^5$ , abhängig von der Anzahl der Mittelungen und der Signalintensität/Konzentration der untersuchten Lösung.

Hinsichtlich der Wiederholbarkeit der NMR-Messungen mit Unterbrechung ist im zeitlichen Verlauf auch eine stärkere Variation aufgefallen als oben berichtet: Abweichungen mit bis zu 0,1 ppm sind zu verzeichnen – insbesondere bei der Durchführung von Messreihen, die an verschiedenen Tagen durchgeführt worden, also längere Unterbrechungen enthielten (s. Abb. 4.6).

## 4.2 FREQUENZVARIATION DES WASSERSIGNALS

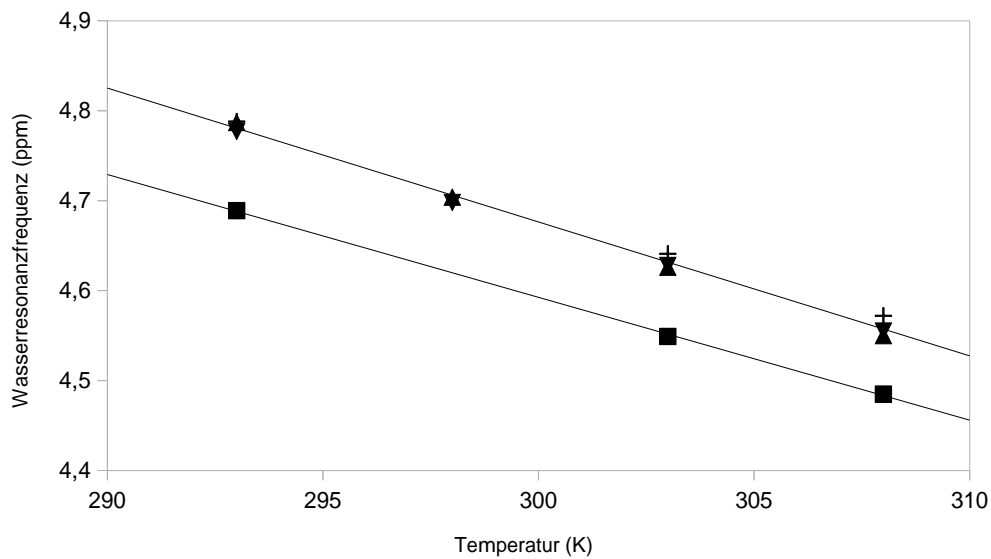


Abbildung 4.6: Wasserfrequenzen von PBS-Lösungen bei verschiedenen Temperaturen und mit verschiedenen Probenköpfen (*Triple Resonance Broad Band* = TBI, *Double Resonance Broad Band* = BBO) zu verschiedenen Zeiten unter Angabe des Datums: ■ 2011-05-03 (TBI), + 2011-09-21 (TBI), , ▼ 2012-05-29 (TBI), ▲ 2012-08-17 (BBO). Darstellung der linearen Anpassung für den ersten Datensatz und (gemittelt) für die letzten drei Messungen.

### 4.2.3 Suszeptibilität

Die Anwendung der Methode nach Hoffman (Abschnitt 3.8.3) zeigt in der Prinzipienüberprüfung große Zuverlässigkeit in Hinsicht auf die stabil bleibende Linienbreite im Bereich von etwa 2-5 mm über dem Zentrum (Position des Röhrchenbodens, s. Abb. 4.7).

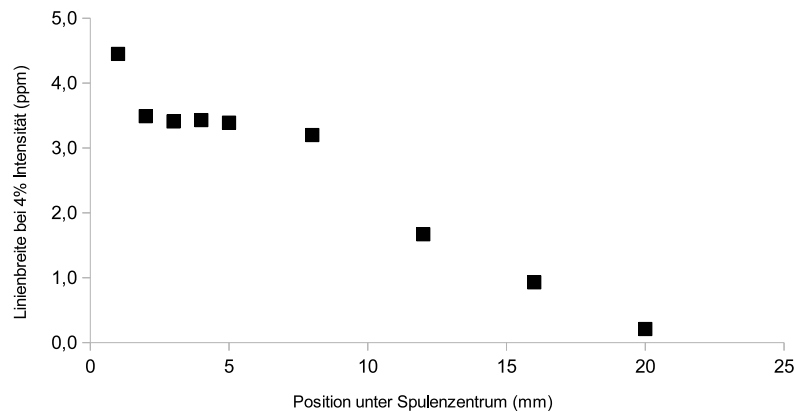


Abbildung 4.7: Nachweis der Linienbreitenstabilisation für Positionen des Probenröhrchens zwischen 2 mm und 5 mm oberhalb des Spulenzentrums für die Suszeptibilitätsbestimmung nach Hoffman.

Bei Wiederholung der Messungen (an verschiedenen Tagen) mit Proteinlösungen zeigen sich jedoch größere Abweichungen ( $> 0,4$  ppm) und es ist eine Varianz der Linienbreiten in der Ausgangslage des Probenröhrchens bei 20 mm unterhalb des Spulenzentrums (Standardposition) im Bereich von etwa 0,07 ppm bis 0,24 ppm für verschiedene Proteinlösungen festzustellen.

Ein eindeutiger Trend der Abhängigkeit der Suszeptibilität von der Proteinkonzentration lässt sich aufgrund der erhobenen Daten nicht nachweisen (s. Abb. 4.8).

Im Gegensatz dazu lässt sich für die Linienbreite des NMR-Wassersignals eine lineare Abhängigkeit von der Konzentration verzeichnen (s. Tab. 4.2). Dabei gibt es eine nur geringe Variation über verschiedene Proteingrößen – lediglich für Lysozym fällt ein abweichender Wert auf, der im Gegensatz zu den anderen negativ und absolut etwas größer ist.

## 4.2 FREQUENZVARIATION DES WASSERSIGNALS

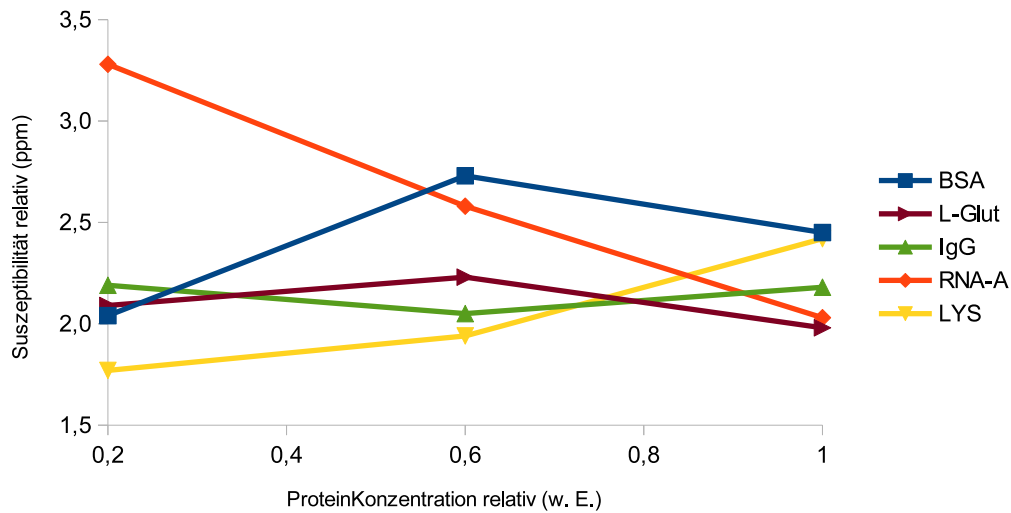


Abbildung 4.8: Darstellung der relativen Suszeptibilitäten über der relativen Proteinkonzentration für verschiedene Proteine (inkl. Aminosäure L-Glutamin).

Tabelle 4.2: Anstieg  $\Delta_{LB}$  der Linienbreiten LB des NMR-Wassersignals bezogen auf die Konzentration verschiedener Proteine. Angabe der  $F$ -Werte und der dafür ermittelten  $p$ -Werte zur statistischen Signifikanz.

Protein	Masse (kDa)	$\Delta_{LB}$ (Hz/mg/ml)	$R^2$	$F$	$p$
GST	26,0	0,0277	0,6748	6,22	0,05
BSA	67,0	0,0220	0,7957	7,79	0,06
RNase A	13,7	0,0233	0,8784	14,44	0,03
LYS	14,3	-0,0431	0,8913	16,41	0,02
IgG	144,0	0,0334	0,8619	12,49	0,04

#### 4.2.4 Diffusion und Viskosität

Die durchgeführten Experimente zeigen, dass die Viskosität abhängig von der BSA-Konzentration steigt und indirekt proportional zur Temperatur ist (s. Abb. 4.9).

Die Zugabe von Ammoniumsulfat (AS) erhöht die Viskosität der BSA-Lösung, wie in Abb. 4.10 dargestellt. Dabei korrespondiert die Zugabe einer Menge von 9,44% Ammoniumsulfat mit einer Erhöhung der Viskosität um 0,16 mPa·s ohne Anwesenheit von BSA. Für zunehmende Protein-Konzentration nimmt dieser Anteil nicht-linear zu (s. Abb. 4.11). Die Wasserfrequenzverschiebungen variieren dabei stark mit der resultierenden BSA- und AS-Konzentration (s. Abb. 4.12). Dabei gibt es einen Sättigungsbereich in Form eines Sattelpunktes (s. Abb. 4.13).

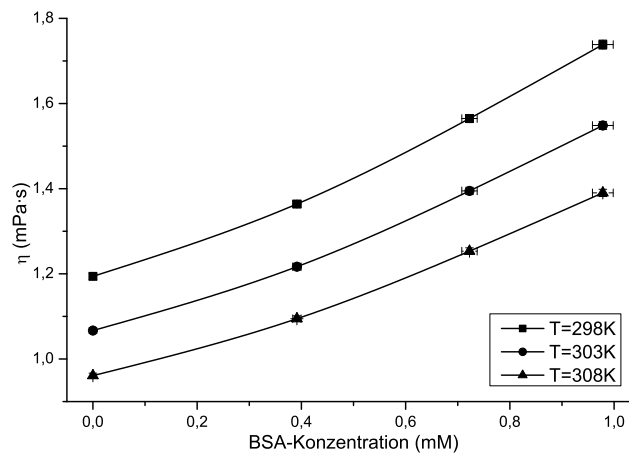


Abbildung 4.9: Abhängigkeit der Viskosität  $\eta$  von der BSA-Konzentration mit 3%-Ammoniumsulfat bei verschiedenen Temperaturen.

## 4.2 FREQUENZVARIATION DES WASSERSIGNALS

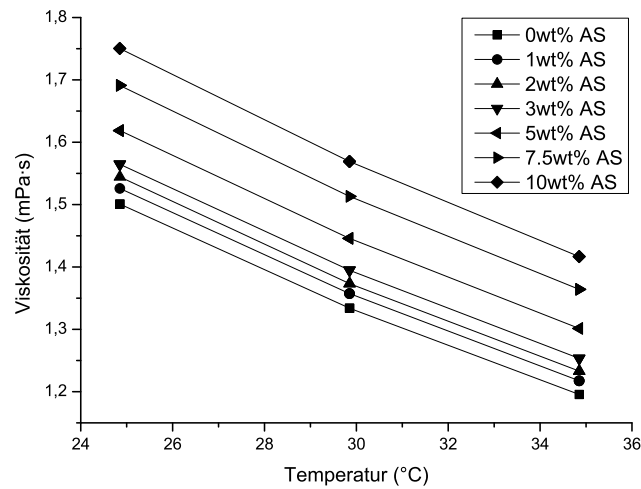


Abbildung 4.10: Darstellung der Viskosität über der Temperatur für verschiedene Ammoniumsulfat-Konzentrationen mit 48 mg/ml BSA.

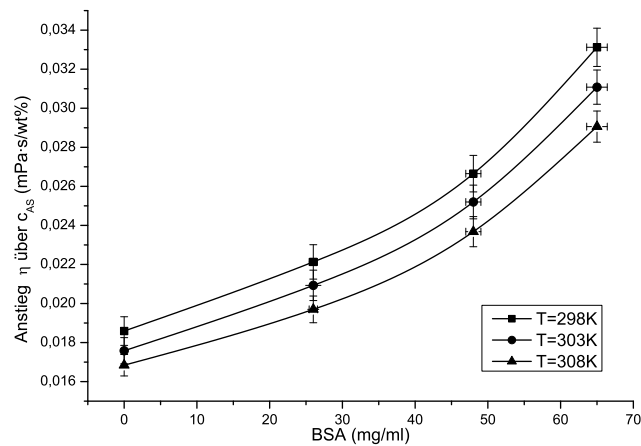


Abbildung 4.11: Zunahme der Viskosität in Abhängigkeit von der Zugabe von Ammoniumsulfat (AS) bei verschiedenen BSA-Konzentrationen und Temperaturen.

## KAPITEL 4 ERGEBNISSE

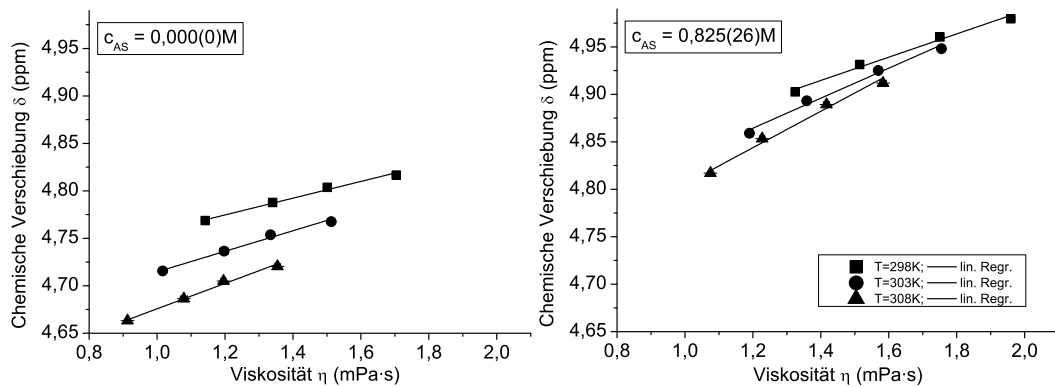


Abbildung 4.12: Darstellung der chemischen Verschiebung über der Viskosität der Proteinlösungen unterschiedlichen Konzentrationen und Temperaturen.

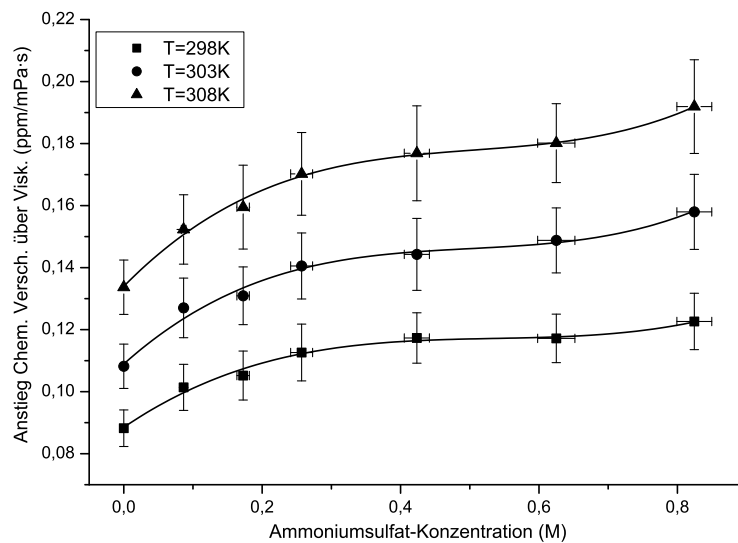


Abbildung 4.13: Anstiege der Kurvenanpassungen der Frequenzverschiebung in Abhängigkeit von der Viskosität – verursacht durch variable BSA-Konzentration (vgl. Abb. 4.12) – für variable Ammoniumsulfat-Konzentration und Temperatur.

## 4.2 FREQUENZVARIATION DES WASSERSIGNALS

Bei der Bestimmung der Diffusionskonstanten mittels NMR zeigen sich Schwierigkeiten/Inkongruenzen bei der Wahl der Wartezeiten (s. Abb. 4.14). Statt einer Optimierung zeigt sich ein von der Erwartung abweichendes Verhalten der Integralwertentwicklung über der Gradientenfeldstärke (s. Abb. 4.15). Mit zunehmender BSA- und Lysozym-Konzentration nimmt der ermittelte Diffusionskoeffizient ab (s. Abb. 4.18 und 4.16) und ist bei höherer Temperatur größer (s. Abb. 4.16). Letzteres ist besser bei drei verschiedenen Temperaturen in Abb. 4.17 zu sehen.



Abbildung 4.14: Variation der Diffusionskonstanten  $D$  mit der Länge  $D20$  des Gradientenpulses bei 298 K (■). Abweichende Temperaturen bei 1800 ms: 303 K (●), 308 K (▼).

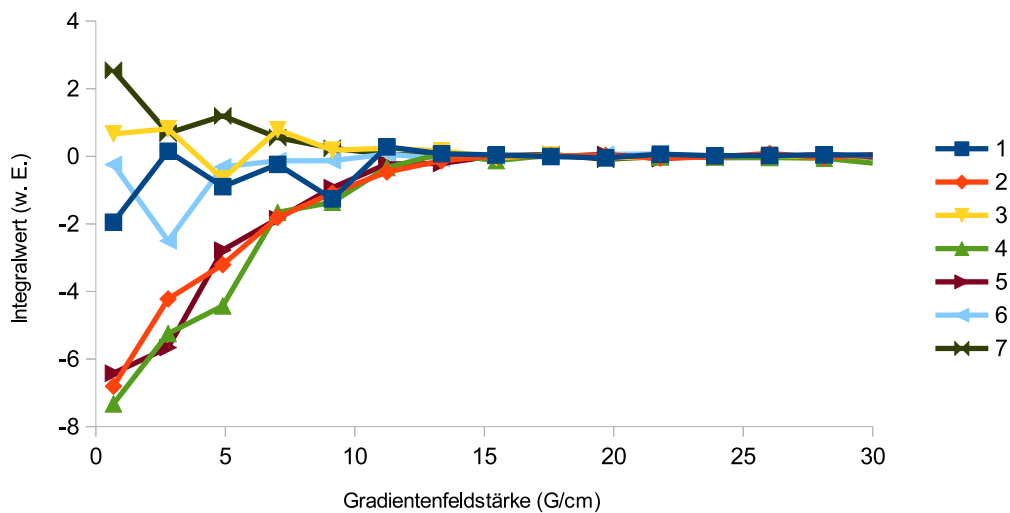


Abbildung 4.15: Variation der Spektren-Integralwerte  $I$  zur Diffusionsbestimmung mit Variation der Länge  $D20$  des Gradientenpulses (jeweils in ms, bei 298 K): 1) 1600, 2) 1700, 3) 1800, 4) 1900, 5) 2000, 6) 1800 (bei 303 K), 7) 1800 (bei 308 K).



## KAPITEL 4 ERGEBNISSE

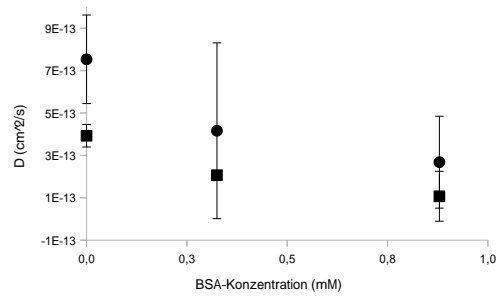


Abbildung 4.16: Variation des Diffusionskoeffizienten  $D$  über der BSA-Konzentration bei ■ 298 K und ● 303 K.

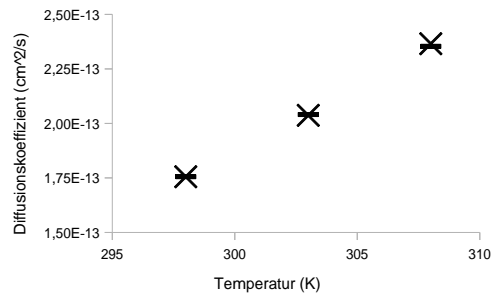


Abbildung 4.17: Diffusionskoeffizienten von BSA (58 mM) in Abhängigkeit von der Temperatur (Messreihe × und Wiederholung –).

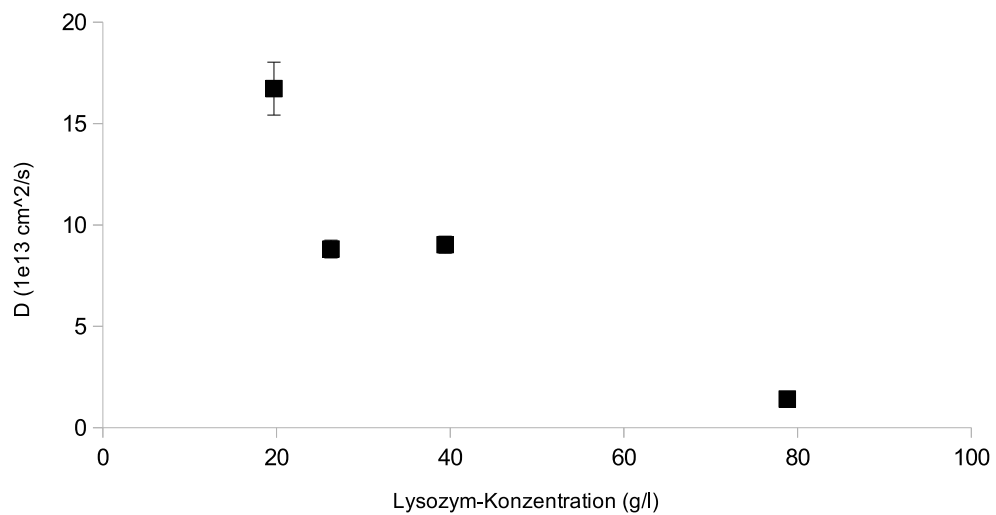


Abbildung 4.18: Darstellung der mittels NMR-Spektroskopie ermittelten Diffusionskoeffizienten  $D$  von Lysozymlösungen verschiedener Konzentration.

## 4.2 FREQUENZVARIATION DES WASSERSIGNALS

Bei den untersuchten Gewebeextrakten sind die ermittelten Diffusionskonstanten eher unabhängig von der Proteinkonzentration (s. Abb. 4.19). In der Diskussion wird auch darauf genauer Bezug genommen.

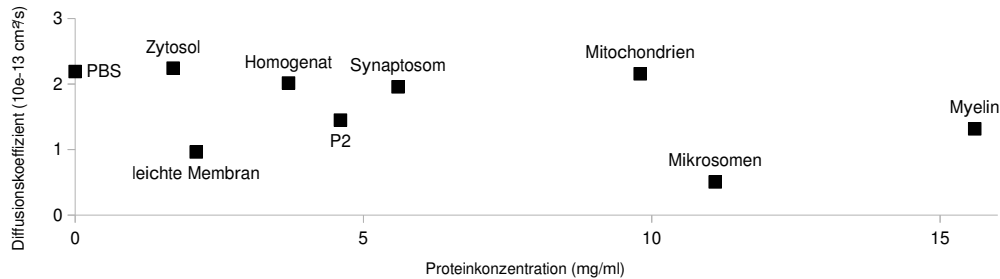


Abbildung 4.19: Diffusionskoeffizienten für variable Proteinkonzentrationen in Gewebeextrakten (Kleinhirn).

Eine gezielte Beeinflussung der Viskosität erfolgte mit der Zugabe von Saccharose, welche eine lineare Erhöhung der Viskosität in Abhängigkeit von der Konzentration bewirkt (s. Abb. 4.20).

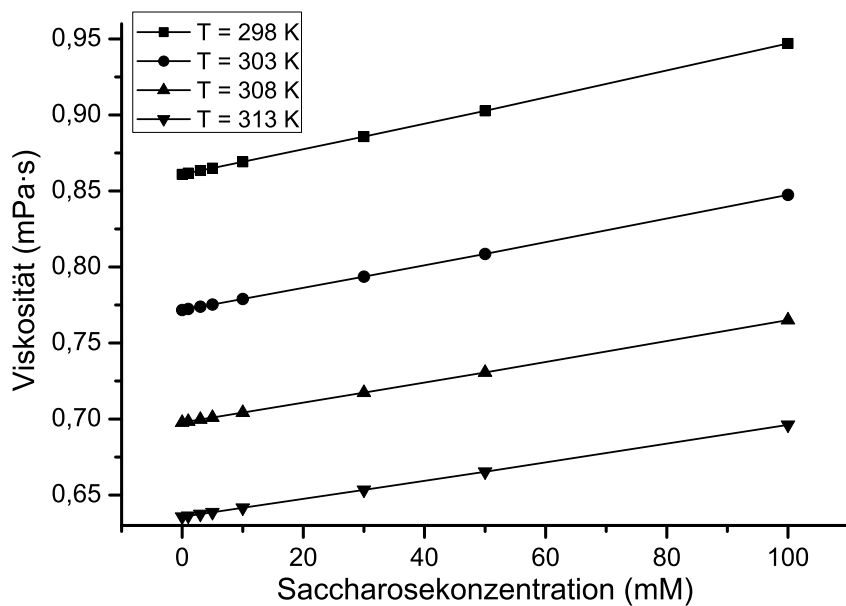


Abbildung 4.20: Lineare Erhöhung der Viskosität mit der Konzentration von Saccharose bei verschiedenen Temperaturen  $T$ .

Eine Anpassung von Messwerten bei variiertem BSA- und Saccharosekonzentration an das exponentielle Modell nach Gl. 2.37 liefert die Parameter  $k_a$  und  $b$ , die den

folgenden (qualitativ ähnlichen) Darstellungen folgen (s. Abb. 4.21 und 4.22):

$$k_a = C + Be^{-M/A} \quad (4.1)$$

$$b = C - Be^{-A/M} \quad (4.2)$$

wobei  $M$  die Makromolekülkonzentration (von Saccharose) und  $A, B, C$  Anpassungsparameter sind. Für zunehmende Saccharosekonzentration nehmen die Terme also ab, wobei der Abfall bei geringen Konzentrationen am größten ist.

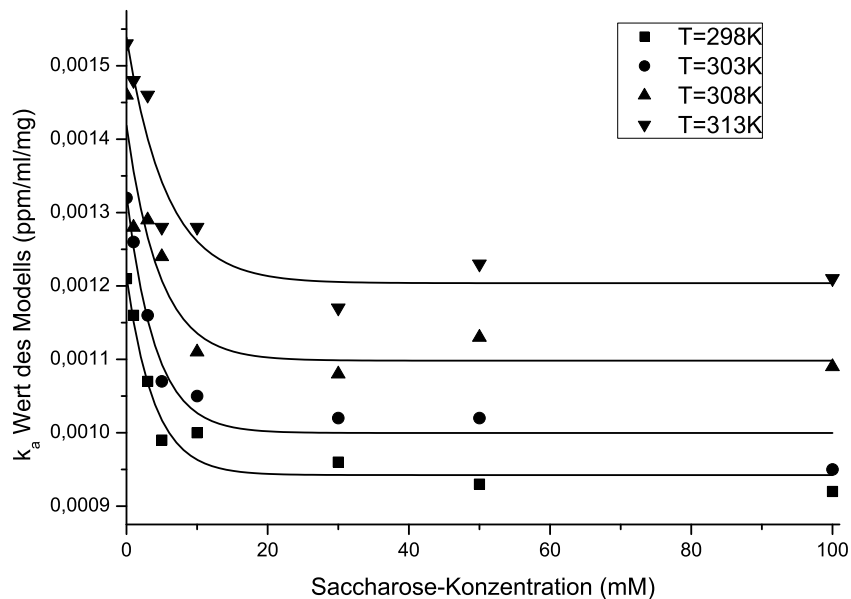


Abbildung 4.21: Austauschterm  $k_a$  für BSA bei variabler Saccharosekonzentration mit Anpassung an Gl. 4.1 mit  $R^2$  im Bereich von 0,87-0,95 ( $p < 0,025$ ).

#### 4.2.5 OH-Bindungsstellen

Langkettige, gerade Polysaccharide unterschiedlicher Massen (40 kDa und 200 kDa) wurden in verschiedener Konzentration mit BSA (67 kDa) in Mischung gebracht und die Wasserverschiebung im  $^1\text{H}$ -Spektrum untersucht. Dabei wirkt sich die Zugabe von Dextran kaum nachweisbar auf die Verschiebung des Wassersignals aus, wie die gleichbleibenden relativen Verschiebungen in Abb. 4.23 und 4.24 zeigen. Demgegenüber ist eine Zunahme der Linienbreite der Wasserresonanzlinie in Abhängigkeit von der Dextrankonzentration nachweisbar (s. Abb. 4.25).

## 4.2 FREQUENZVARIATION DES WASSERSIGNALS

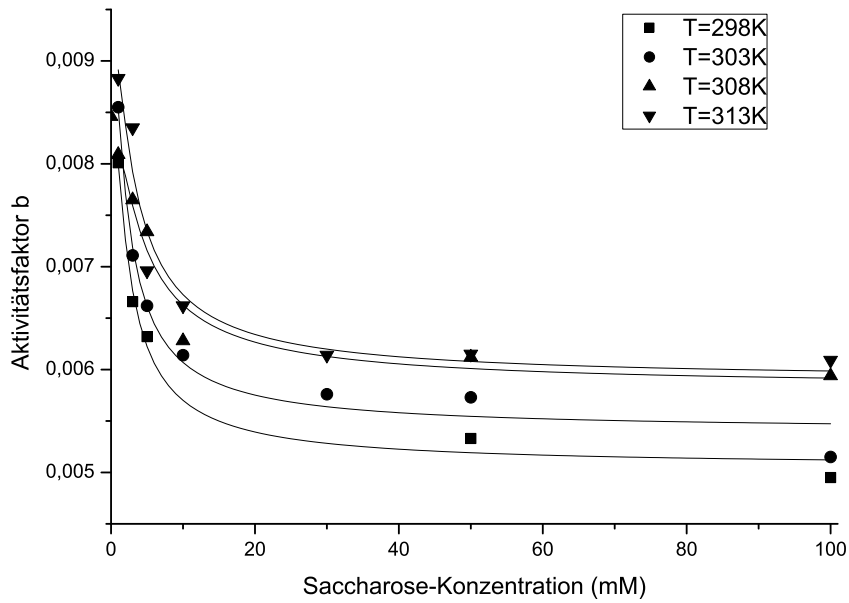


Abbildung 4.22: Aktivitätsfaktor  $b$  für BSA bei variabler Saccharosekonzentration mit Anpassung an Gl. 4.2 mit  $R^2$  im Bereich von 0,93-0,98 ( $p < 0,006$ ).

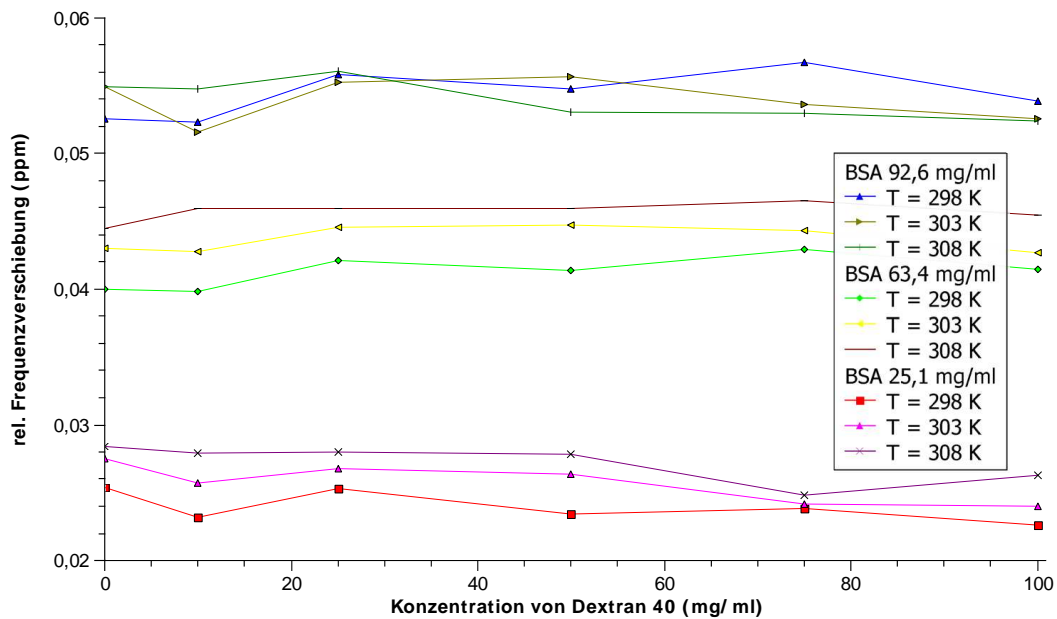


Abbildung 4.23: Relative chemische Verschiebung des Wasser-Signals in Anwesenheit von Dextran 40 und BSA in unterschiedlichen Konzentrationen und bei drei Temperaturen.

## KAPITEL 4 ERGEBNISSE

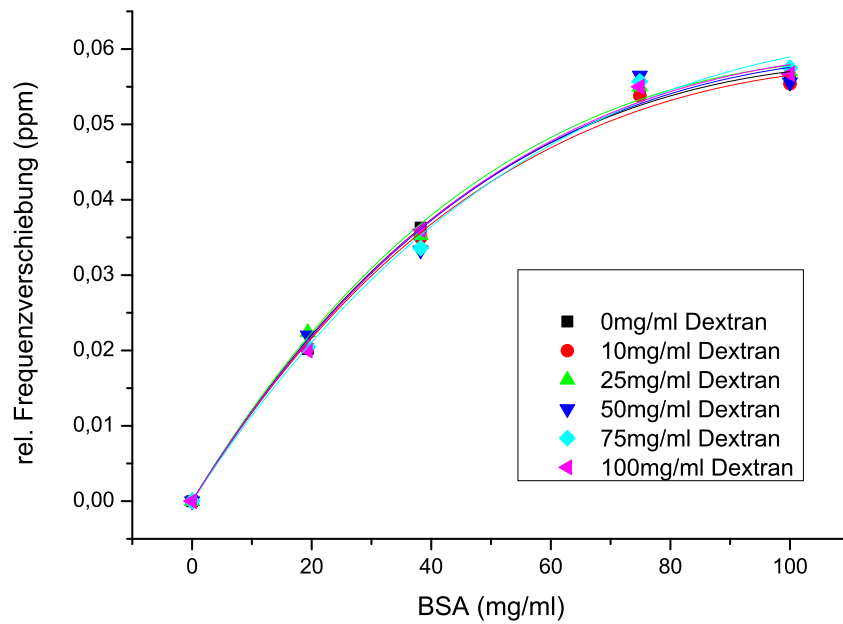


Abbildung 4.24: Relative chemische Verschiebung des Wasser-Signals in Anwesenheit von Dextran 200 und BSA in unterschiedlichen Konzentrationen. Exponentielle Modellanpassung nach Gl. 2.37.

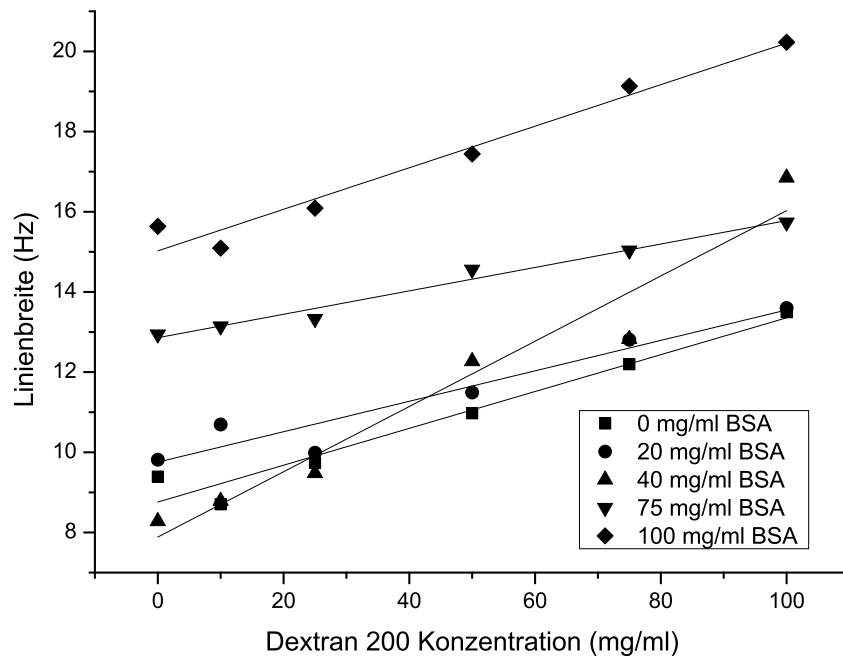


Abbildung 4.25: Linear angepasste Linienbreitenvariation der Wasserresonanzlinie bei variiertem Dextran 200 Konzentration und variabler BSA-Konzentration.

### 4.2.6 Konformationsänderungen

Um sowohl die Zahl der Bindungsstellen, die Ladungszahl als auch die Form eines Proteins (Konformation) zu verändern, wurde durch Zugabe von Ammoniumsulfat (AS) eine Entfaltung des Proteins erzwungen. Ergebnisse dieser Teilstudie mit BSA bzw. IgG zeigen die Abbildungen 4.26-4.29 bzw. 4.30. Mit zunehmender AS-Konzentration nimmt die relative chemische Verschiebung des Wassersignals zu: von 0,05 ppm/mM BSA bei 0 M AS auf 0,08 ppm/mM BSA bei 0,825 M AS. Dies entspricht einer Zunahme der von BSA abhängigen Frequenzverschiebung von etwa 0,04 ppm/mM je 1 M AS im betrachteten Bereich bei 298 K (s. Abb. 4.27).

Mittels Wasserunterdrückung wurde die Konformitätsänderung überprüft. Außer einer verstärkten Linienbreite und phasenbedingter Unterschiede sind keine augenfälligen Veränderungen mittels 1D-NMR festzustellen (s. Abb. 4.29).

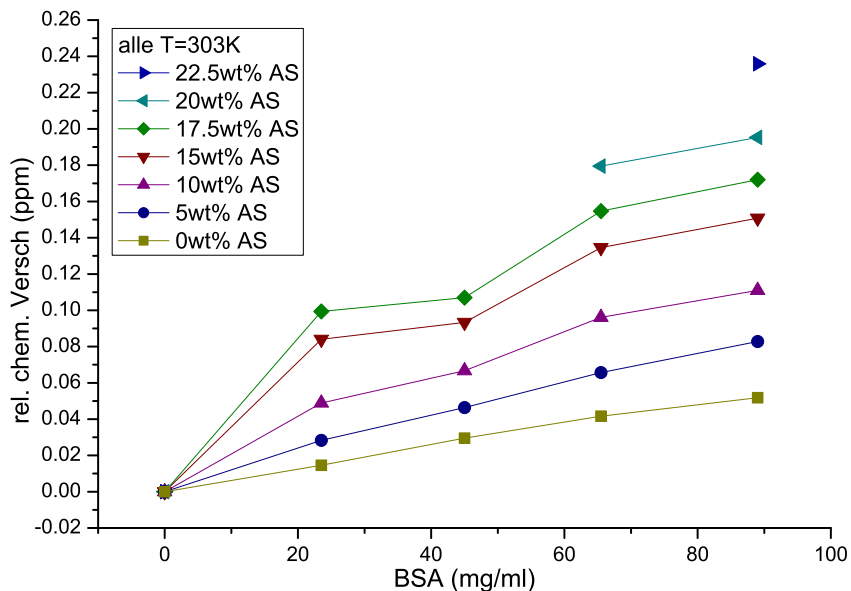


Abbildung 4.26: Vergleich des Wassersignals bei variabler BSA- und Ammoniumsulfatkonzentration.

## KAPITEL 4 ERGEBNISSE

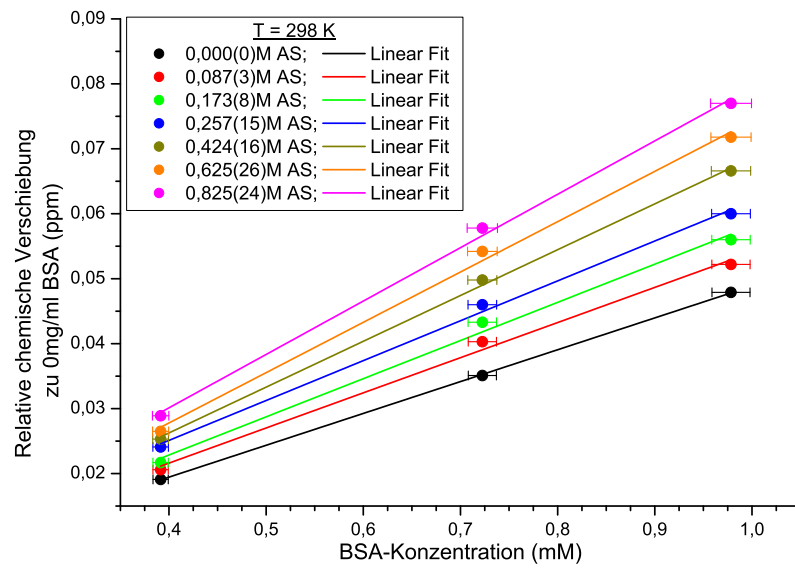


Abbildung 4.27: Vergleich des Wassersignals bei variabler BSA- und Ammoniumsulfatkonzentration.

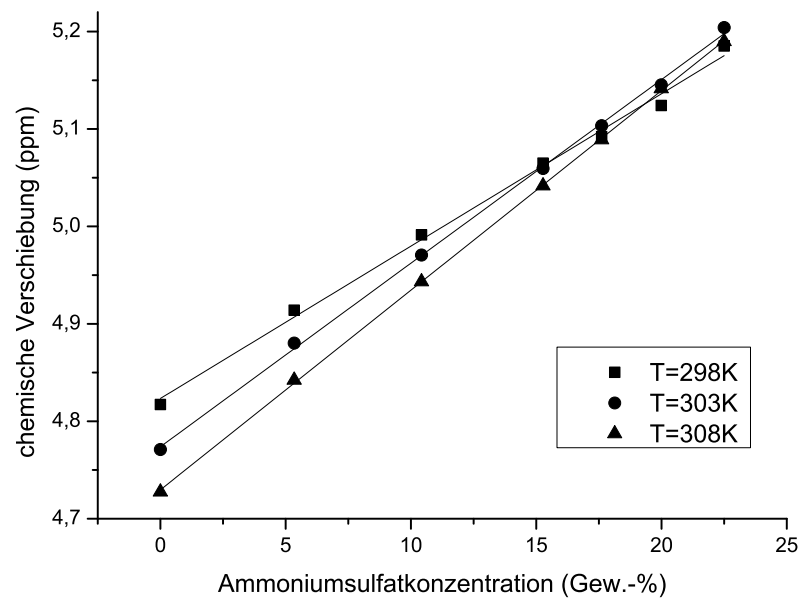


Abbildung 4.28: Variation des Wassersignals bei gleichbleibender BSA-Konzentration aber verschiedener Ammoniumsulfatkonzentrationen. Die Verschiebung folgt der Ammoniumsulfatkonzentration linear (durchgezogene Linien). Der Anstieg ist proportional zur Temperatur.

## 4.2 FREQUENZVARIATION DES WASSERSIGNALS

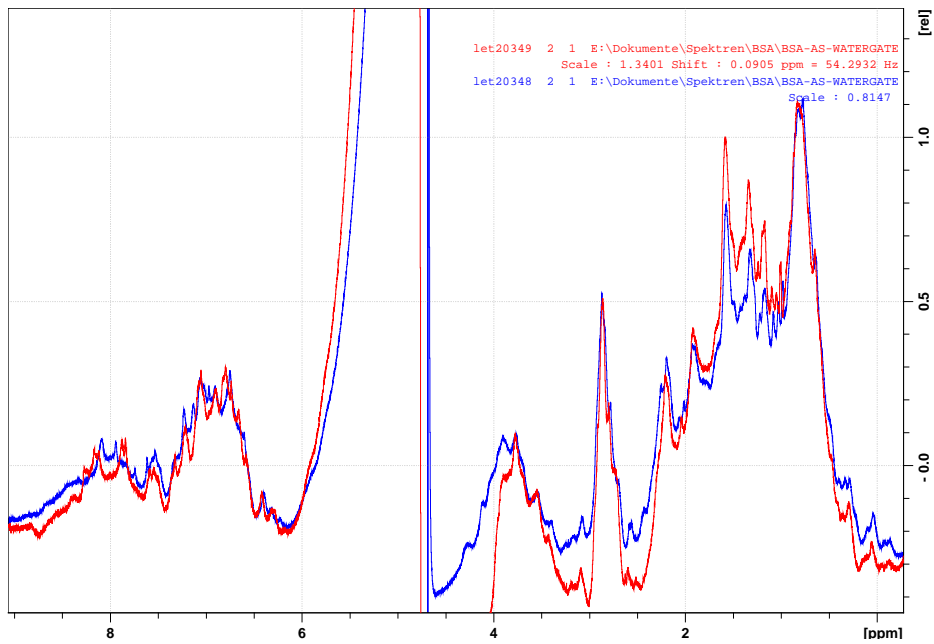


Abbildung 4.29: Vergleich hoch aufgelöster NMR-Spektren von BSA mit (rot) und ohne (blau) Ammoniumsulfat (3M, 10%). Spektren mit Wasserunterdrückung.

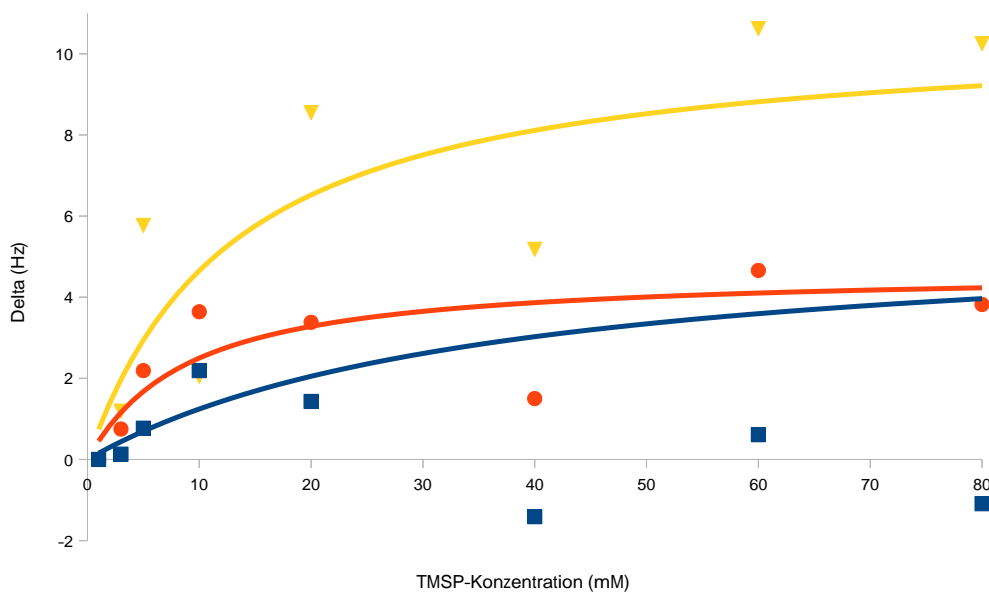


Abbildung 4.30: Kurvenanpassungen laut Austauschmodell (Gl. 2.46) von Cavanagh et al. [81] für verschiedene Ammoniumsulfat-Zugaben zur IgG-Proteinlösung ( $\blacksquare$  0  $\mu\text{l}$ ,  $\bullet$  100  $\mu\text{l}$ ,  $\blacktriangledown$  200  $\mu\text{l}$ ). Anpassung bei 0  $\mu\text{l}$  nur für Werte bis 20 mM TMSP mit  $N = 10$  ( $p_{0\mu\text{l}} = 0,886$ ;  $p_{100\mu\text{l}} = 0,059$ ;  $p_{200\mu\text{l}} = 0,034$ ).



### 4.2.7 pH-Wert

Durch Zugabe von Natriumhydroxid (NaOH) wurde der in der Proteinlösung vorliegende pH-Wert variiert. Die Wasserresonanzfrequenzen mit und ohne zugegebenem Protein sinken mit zunehmendem pH-Wert nichtlinear (s. Abb. 4.31). Dabei ist der anwendbare pH-Wert-Bereich mit Proteinen aufgrund der Degeneration bei stark von pH = 5 abweichenden Werten eingeschränkt auf einen Bereich von etwa  $4 \leq \text{pH} \leq 7$ .

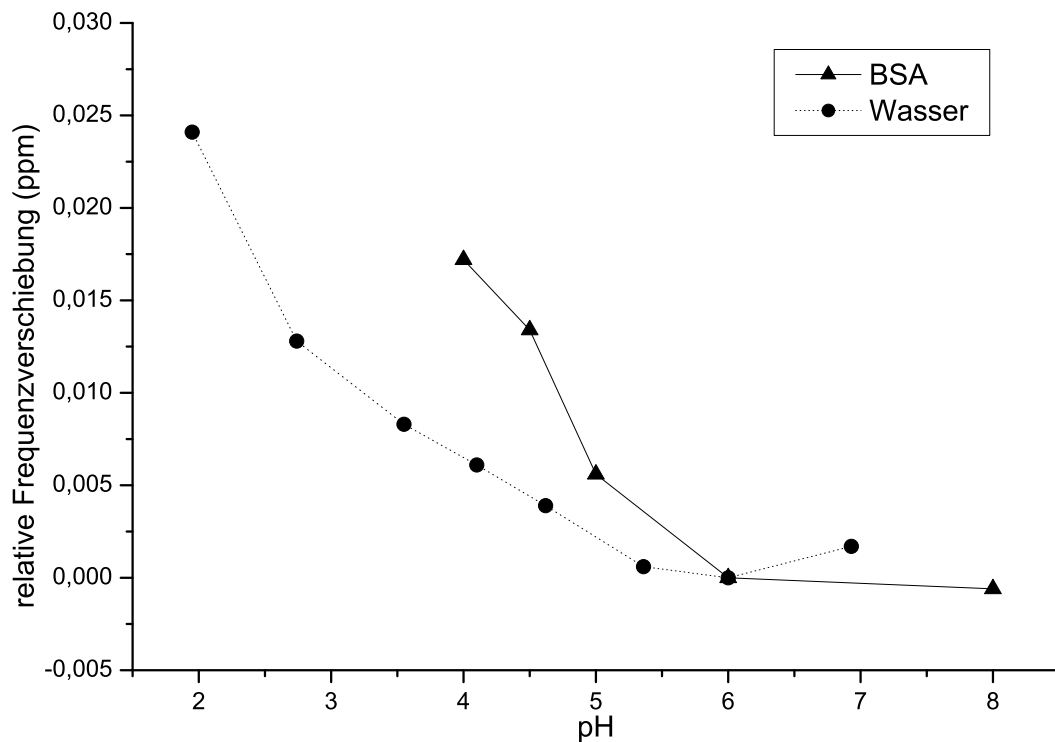


Abbildung 4.31: Abfall der Wasserfrequenz über steigendem pH-Wert mit (▲) und ohne (●) BSA.

### 4.2.8 Proteingröße und -konzentration

Die NMR-Frequenzverschiebung des Wassersignals wurde für globuläre Proteine unterschiedlicher Größe (s. Tab. 3.1, S. 36) ermittelt. Dabei wurde die Konzentration der Proteine in der wässrigen Lösung in einem Bereich zwischen 0 g/l und 100 g/l variiert. Eine Auftragung über der Proteinkonzentration (s. Abb. 4.32) veranschaulicht die vom jeweils verwendeten Protein verursachte Frequenzverschiebung des Wassers. In dem untersuchten Konzentrationsbereich zeigt sich eine lineare Abhängigkeit der Frequenzverschiebung von der Proteinkonzentration. Der daraus ermittelbare Grad der Frequenzverschiebung ist auch gegenüber der korrespondierenden Proteingröße als linear abhängig zu betrachten ( $r = 0,963$ ,  $p < 0,0003$ , s. Abb. 4.33).

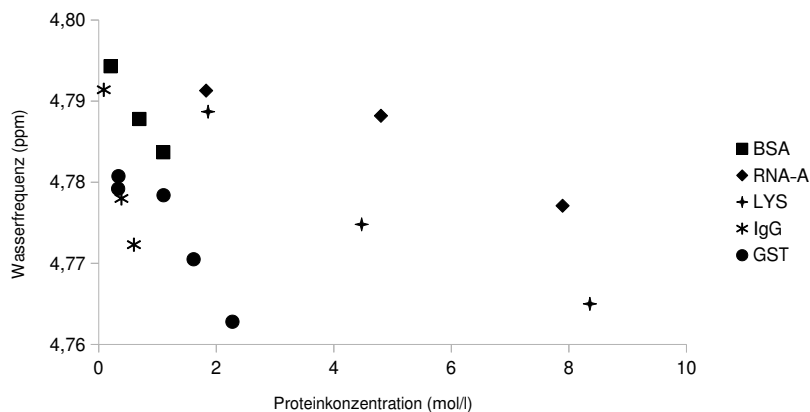


Abbildung 4.32: Darstellung der Frequenzverschiebung des Wassers für verschiedene Proteine bei variabler Konzentration. Die absolute Abweichung vom Wasser-signal ohne Proteine (4,793 ppm) nimmt mit der Proteinkonzentration je nach Art unterschiedlich stark zu (vgl. Abb. 4.33).

Zusätzlich zur reinen Messung der Frequenzverschiebung wurden Relaxationszeit-messungen ( $T_1$ ,  $T_2$ ) durchgeführt. Beispielhaft sind hierfür Messergebnisse für GST (s. Abb. 4.34) und BSA (s. Abb. 4.35) dargestellt.

## KAPITEL 4 ERGEBNISSE

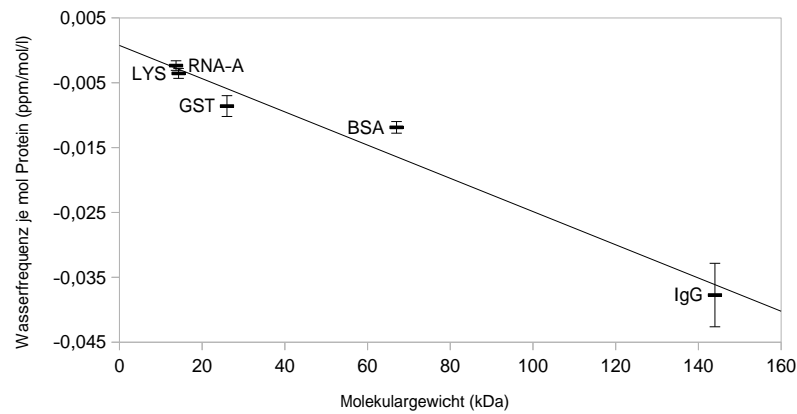


Abbildung 4.33: Zunehmende Konzentrationsabhängigkeit der (absoluten) Frequenzverschiebung im Verhältnis zur Molekülgröße basierend auf Messungen mit verschiedenen Proteinen und deren Konzentrationen (vgl. Abb. 4.32).

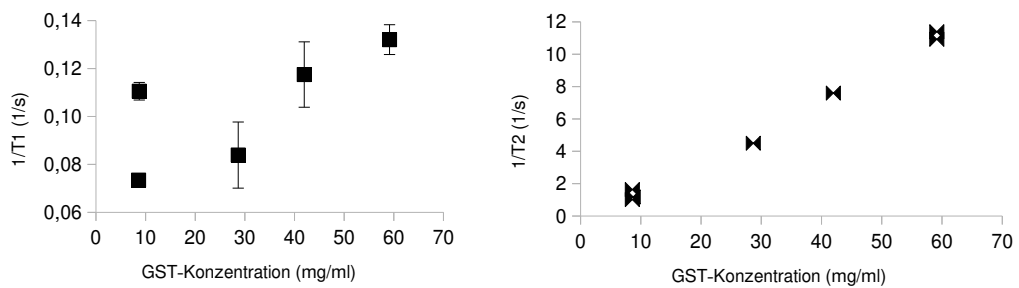


Abbildung 4.34: Darstellung der Relaxationskoeffizienten  $1/T_1$  und  $1/T_2$  für verschiedene GST-Konzentrationen.

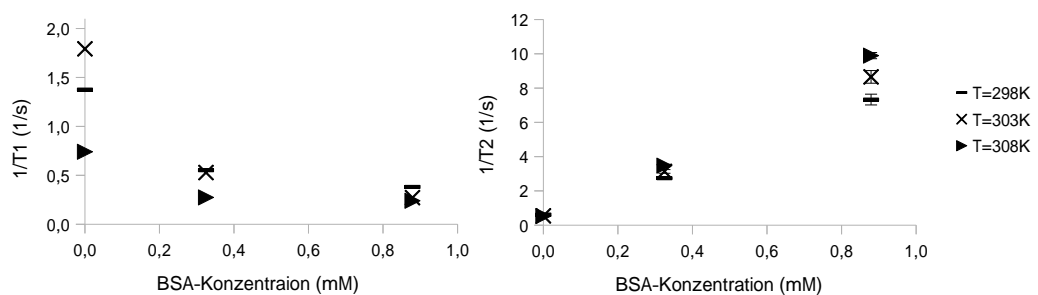


Abbildung 4.35: Darstellung der inversen Relaxationszeiten für verschiedene BSA-Konzentrationen und die wässrige Lösung. Abnahme von  $1/T_1$  und Zunahme von  $1/T_2$  für steigende BSA-Konzentrationen.

## 4.2 FREQUENZVARIATION DES WASSERSIGNALS

Betrachtet man Mischungen von Proteinen (in unserem Fall BSA und IgG), so ergeben sich vom linearen Verhalten abweichende Frequenzverschiebungen bei variabler Zusammensetzung, wie in der Abbildung 4.36 zu erkennen ist. Die Kurven können dabei wieder dem exponentiellen Modell (Gl. 2.37, S. 28) angepasst und die Parameter  $k_a$  und  $b$  aufgetragen werden. Dabei ergibt sich für  $k_a$  ein linearer Verlauf und ein mit Maximalwert konkaver Verlauf für den Parameter  $b$  (s. Abb. 4.37).

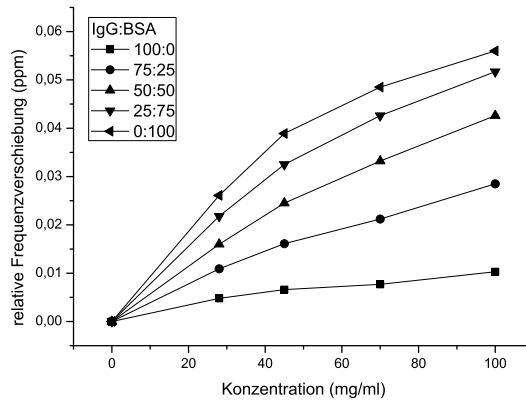


Abbildung 4.36: Relative Wasserfrequenzverschiebung bei unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen von BSA und IgG über der BSA-Konzentration.

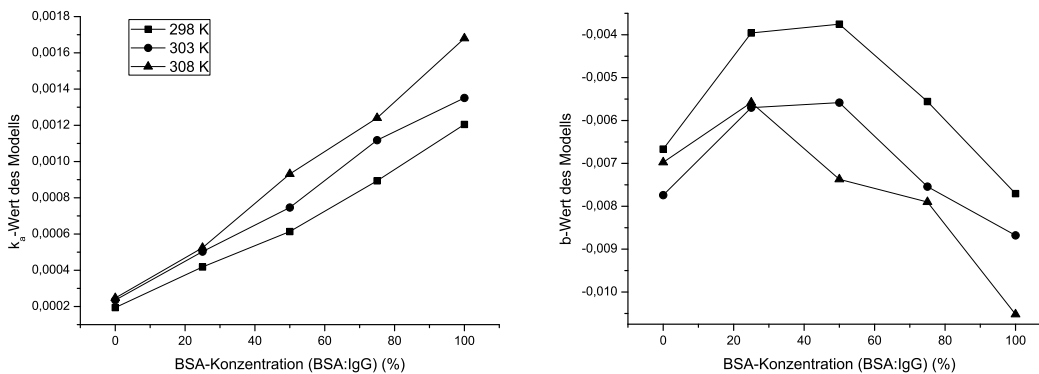


Abbildung 4.37: Modellparameter  $k_a$  (links) und  $b$  (rechts) nach Gl. 2.37 für variables BSA:IgG-Verhältnis.

## 4.3 Einfluss der Wahl der NMR-Referenz

### 4.3.1 Vorbemerkungen

Wie im Abschnitt 2.8 besprochen, ist die Wechselwirkung mit der Referenzsubstanz in den Betrachtungen zur Wasser-Makromolekül-Wechselwirkung von Bedeutung für die Durchführung und Auswertung der NMR-Experimente. Die Abhängigkeit der Wasserverschiebung, bezogen auf die verwendeten Referenzsubstanzen 1,4-Dioxan (s. Abb. 4.38), TMSP (s. Abb. 4.39) und DSS (s. Abb. 4.45), zeigen unterschiedliches Verhalten. Dies wird besonders für variierte Konzentrationen der Referenzsubstanz deutlich (vgl. Abb. 4.38 und 4.39).

### 4.3.2 Dioxan

Für Dioxankonzentrationen bis zu 50 mM bleibt die Frequenzverschiebung  $\Delta f$  in etwa konstant bei 0,009 ppm/mM (bei einer Temperatur von 298 K). Das ist konsistent mit Ergebnissen aus einer ähnlichen Studie, in der 0,011 ppm/mM ermittelt wurde [91].

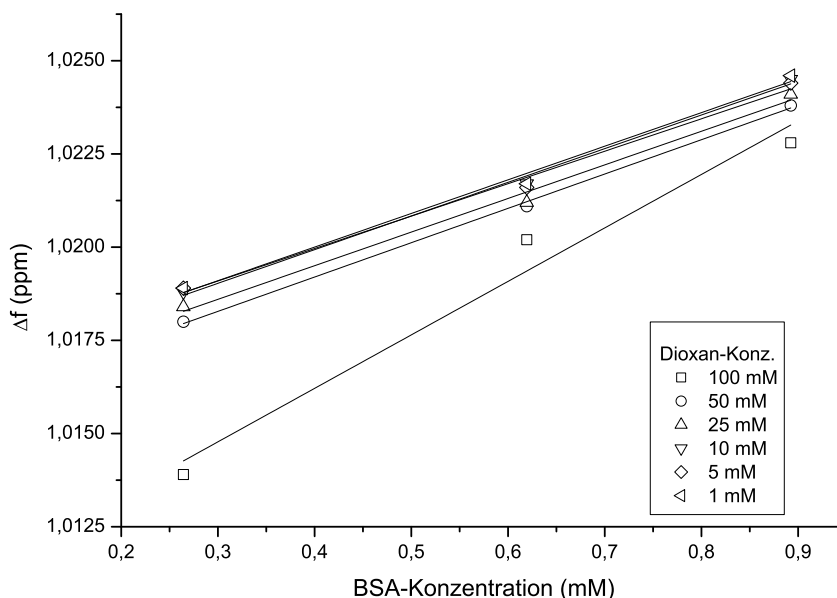


Abbildung 4.38: Frequenzverschiebung bei 298 K für verschiedene Konzentrationen von Dioxan (siehe Legende).

### 4.3.3 TMSP

Im Vergleich zu den Messungen mit Dioxan als interne Referenzsubstanz ist das Frequenzverhalten für TMSP komplexer. Um dies übersichtlicher zu erfassen, werden die Anstiege der Frequenzverschiebungen in Abhängigkeit von der BSA-Konzentration (s. Abb. 4.39) für die variierenden Dioxan- und TMSP-Konzentrationen durch lineare Regression ermittelt und dargestellt (s. Abb. 4.40).

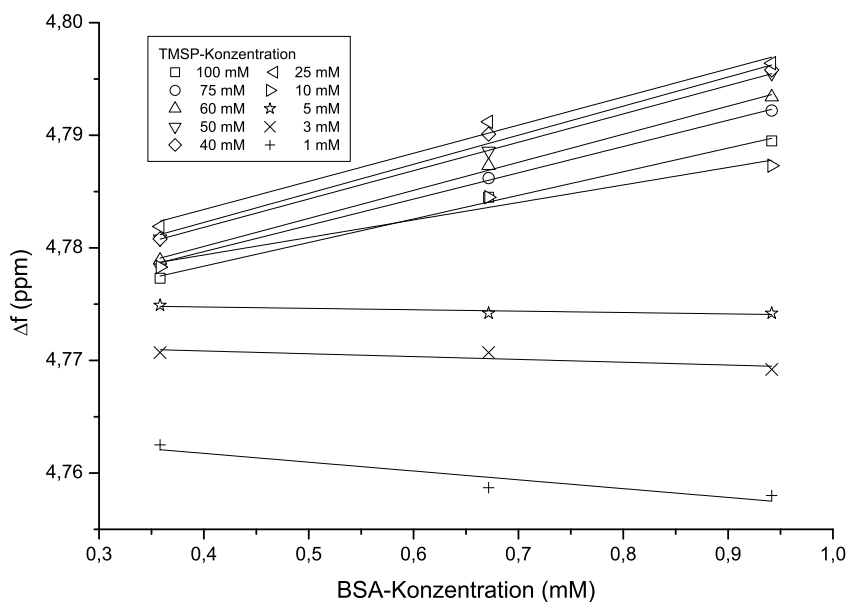


Abbildung 4.39: Frequenzverschiebung bei 298 K für verschiedene TMSP-Konzentrationen.

Für TMSP-Konzentrationen unter 10 mM ist die Frequenzverschiebung bezogen auf die BSA-Konzentration leicht negativ oder verschwindend. Wird mehr TMSP als Referenzsubstanz verwendet (ab 25 mM), so konvergiert die Verschiebung zu einem konstant bleibenden Wert von etwa 0,025 ppm/mM (s. Abb. 4.40), was dem Michaelis-Menten-Modell (s. Gl. 2.45) entspricht, an das die Daten mit einem Korrelationskoeffizienten von  $R^2 = 0,918$  ( $p = 0,014$ ) angepasst werden können.

Diese Änderung ist deutlicher zu verzeichnen, wenn die proteinabhängigen Verschiebungen gegen die temperaturabhängigen Verschiebungen aufgetragen werden (s. Abb. 4.41).

Dann zeigt sich bei den höheren TMSP-Konzentrationen eine ungeordnete Abfolge von Datenpunkten in Relation zur temperaturabhängigen Verschiebung des Wassersignals. Ordnung lässt sich darin wiederherstellen, wenn die entsprechen-

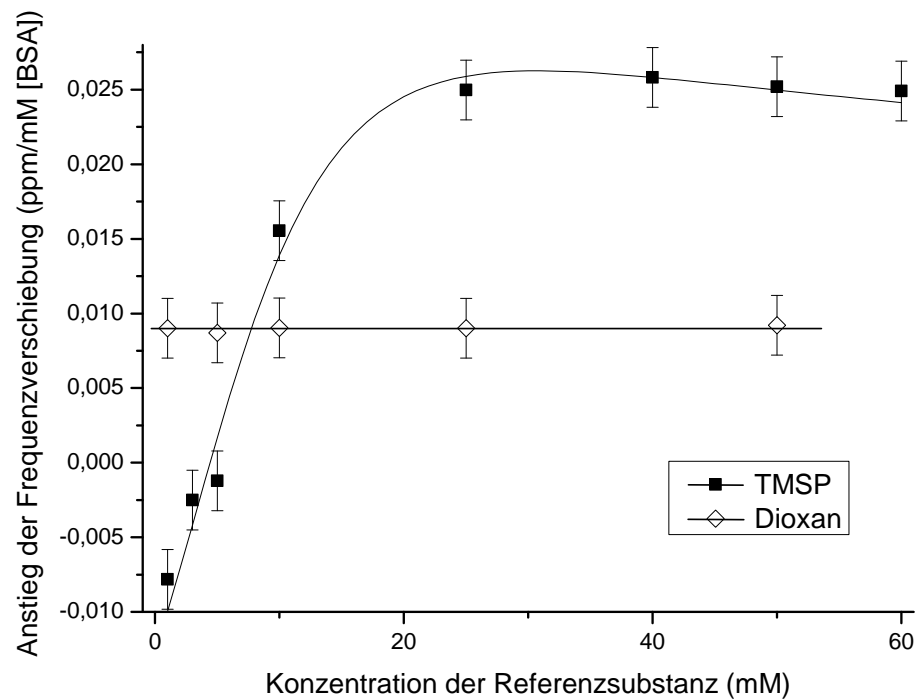


Abbildung 4.40: Konzentrationsabhängige Frequenzverschiebung für BSA bei 298 K. Dioxan (◇) zeigt eine konstante Verschiebung von 0,009 ppm/mM. Die Verschiebung mit interner Referenz TMSP (■) variiert mit der TMSP-Konzentration und stabilisiert sich bei hohen TMSP-Konzentrationen zu etwa 0,025 ppm/mM. Kurvenanpassung für TMSP erfolgte mittels Michaelis-Menten-Kinetik.

### 4.3 EINFLUSS DER WAHL DER NMR-REFERENZ

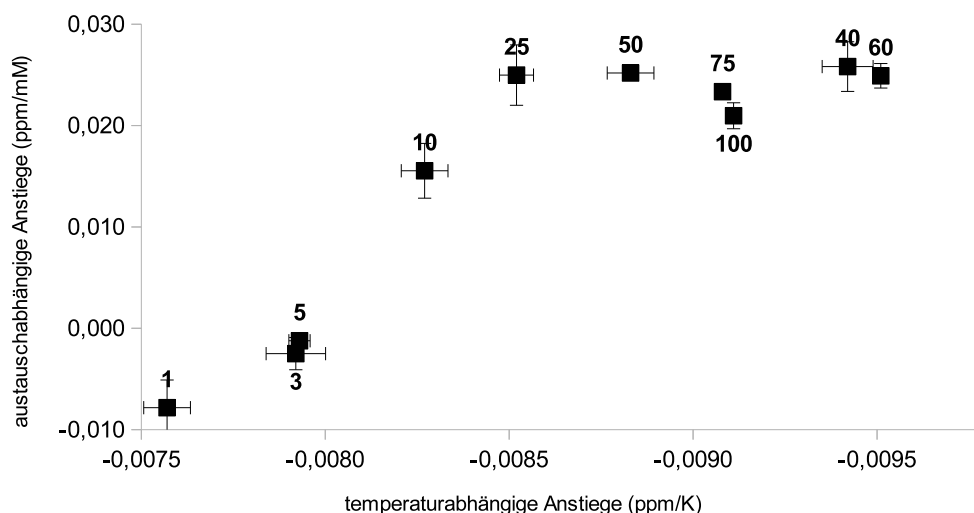


Abbildung 4.41: Anstiege der Frequenzverschiebung in Abhängigkeit von der BSA-Konzentration dargestellt über den temperaturabhängigen Anstiegen (vgl. Abb. 4.4) mit Notierung der jeweiligen TMSP-Konzentration in mM über dem Datenpunkt.

den protein- und temperaturabhängigen Werte durch die korrespondierende TMSP-Konzentration in mM geteilt werden. Dadurch lässt sich die Aufteilung in niedrige (bis 10 mM) und hohe (ab 25 mM) TMSP-Konzentrationen mit ihrem jeweils entgegengesetzten Verhalten in Bezug auf die Wasserverschiebung darstellen (s. Abb. 4.42). Man kann nun die Datenpunkte korrespondierend zu TMSP-Konzentrationen von 1-10 mM bzw. 25-100 mM linear verbinden. Beide Geraden schneiden sich dort, wo eine TMSP-Konzentration von jeweils 13,6 mM, 14,1 mM und 14,6 mM vorliegen würde<sup>1</sup>. Berechnet wurden diese Werte aus den Darstellungen der Frequenzverschiebungen bezogen auf die BSA-Konzentration gegenüber den temperaturabhängigen Verschiebungen (die durch die jeweiligen Konzentrationen geteilt wurden) bei 0,92 mM, 0,70 mM und 0,35 mM BSA (vgl. Tabelle 4.3). Die Konzentrationen von TMSP wurden aus den temperaturabhängigen Verschiebungsanstiegen  $T_{BSA}$  zurückgerechnet, indem der Faktor A aus der Relation

$$T_{BSA} = -A/[TMSP] \quad (4.3)$$

<sup>1</sup>Der genannten Darstellung liegt eine BSA-Konzentration von 0,92 mM für die Berechnung der temperaturabhängigen Frequenzverschiebungen zu Grunde und ergibt einen Schnittpunkt bei 13,6 mM TMSP. Der temperaturabhängige Anstieg wurde zusätzlich auf die BSA-Konzentration normiert. Andernfalls verändern sich die Schnittpunkte nur geringfügig ( $\pm 0,1$  mM).



## KAPITEL 4 ERGEBNISSE

durch nicht-lineare Kurvenanpassung bestimmt wurde.

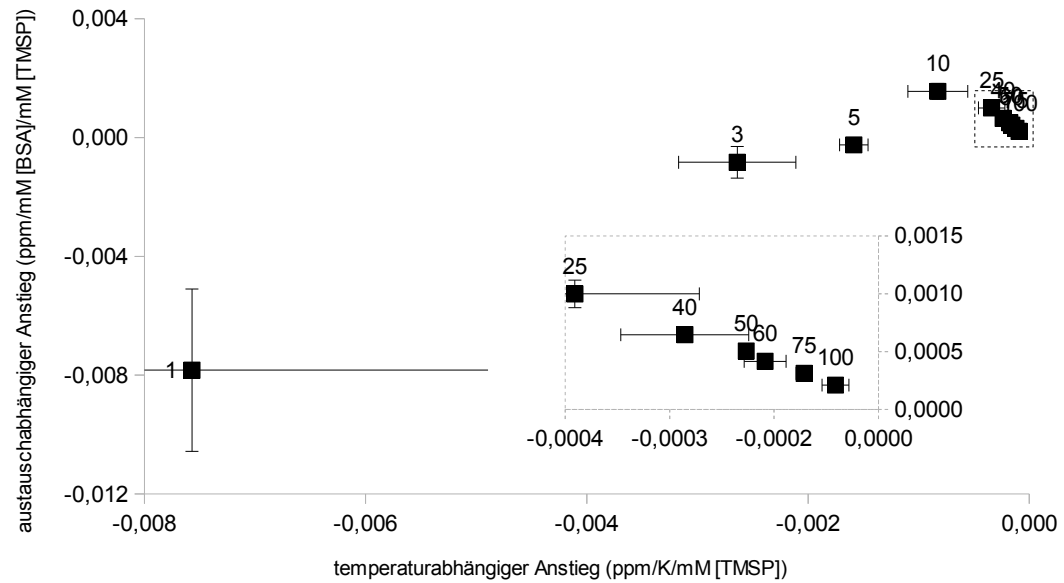


Abbildung 4.42: Anstiege der Frequenzverschiebung in Abhängigkeit von der BSA-Konzentration über temperaturabhängigen Anstiegen bei variiertes TMSP-Konzentration (Zahlenwerte an den Datenpunkten), jeweils normiert auf 1 mM TMSP. Entgegengesetztes lineares Verhalten: ansteigend für 1-10 mM, abnehmend für 25-100 mM TMSP. (Vergrößerter Ausschnitt rechts unten für [TMSP]  $\geq$  25 mM.)

Nach der Gleichung 2.46 wurde aus den gemessenen Werten der Frequenzverschiebung für variiertes TMSP-Konzentrationen die Anzahl von hydrophoben Bindungsstellen für TMSP an BSA berechnet. Diese betragen im Mittel 11,74 (s. Tab. 4.3). Der Parameter  $\Delta_{\max}$  ist dabei die Differenz zwischen minimaler und maximaler beobachteter Frequenzverschiebung (s. Abb. 4.43).

### 4.3 EINFLUSS DER WAHL DER NMR-REFERENZ

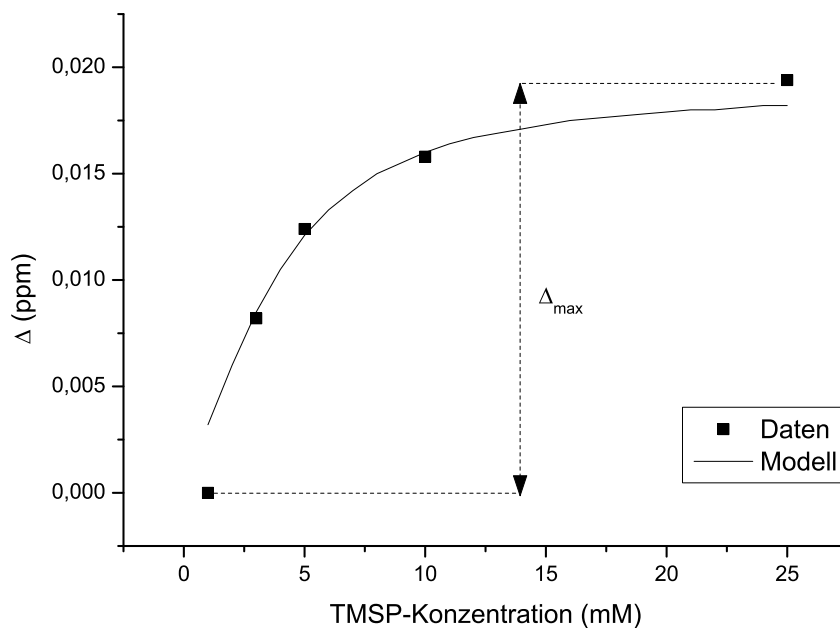


Abbildung 4.43: Darstellung der angepassten Gleichung 2.46 mit Parameter  $\Delta_{\max}$  für TMSP.

Tabelle 4.3: Ermittelte Parameter nach Gleichung 2.46 für die Bindungsstellen  $N$  für TMSP am Protein und die Austauschrate  $K_d$  (Fehlerwerte  $N_{\text{err}}$ ,  $K_{d\text{err}}$ ;  $p < 0,034$ ).

$T$ (K)	[BSA] (mM)	$N$	$N_{\text{err}}$	$K_d$	$K_{d\text{err}}$	$R^2$
298	0,34627	12,71	2,63	1,33160	0,36650	0,99240
	0,70199	10,41	3,18	1,20450	0,87490	0,96990
	0,92886	11,84	1,37	0,71030	0,40590	0,99381
303	0,34627	13,07	4,46	1,17460	0,60470	0,97525
	0,70199	8,75	3,17	1,62660	0,93510	0,97408
	0,92886	11,39	0,15	0,78036	0,04438	0,99993
308	0,34627	14,75	3,61	1,28110	0,50730	0,98658
	0,70199	11,39	0,15	0,78036	0,04438	0,99972
	0,92886	11,39	0,15	0,78036	0,04438	0,99991

### 4.3.4 Vergleich der NMR-Referenzsubstanzen TMSP und Dioxan

Die bei höheren Temperaturen (303 K und 308 K) beobachteten Kurven für TMSP und Dioxan sind qualitativ ähnlich zu denen bei 298 K. Die entsprechenden Verschiebungen bei hohen TMSP- und niedrigen Dioxankonzentrationen liegen bei 0,028 ppm/mM und 0,010 ppm/mM (303 K) bzw. 0,031 ppm/mM und 0,012 ppm/mM (308 K).

Um die Wasser-Referenzsubstanz-Interaktion näher zu quantifizieren wurde eine Messreihe ohne Makromoleküle (BSA) durchgeführt (s. Abb. 4.44). Darin zeigt sich eine negative Frequenzabhängigkeit für Dioxan mit  $(-2,68 \pm 0,42) \times 10^{-5}$  ppm/mM ( $R^2 = 0,85$ ,  $p = 1E-05$ ). Für TMSP ergibt sich eine Relation der Wasser-Frequenz mit dem Wert  $(4,76 \pm 0,19) \times 10^{-6}$  ppm/mM in entgegengesetzter Richtung und mit wesentlich geringerer Signifikanz ( $R^2 = 0,01$ ,  $p = 0,998$ ).

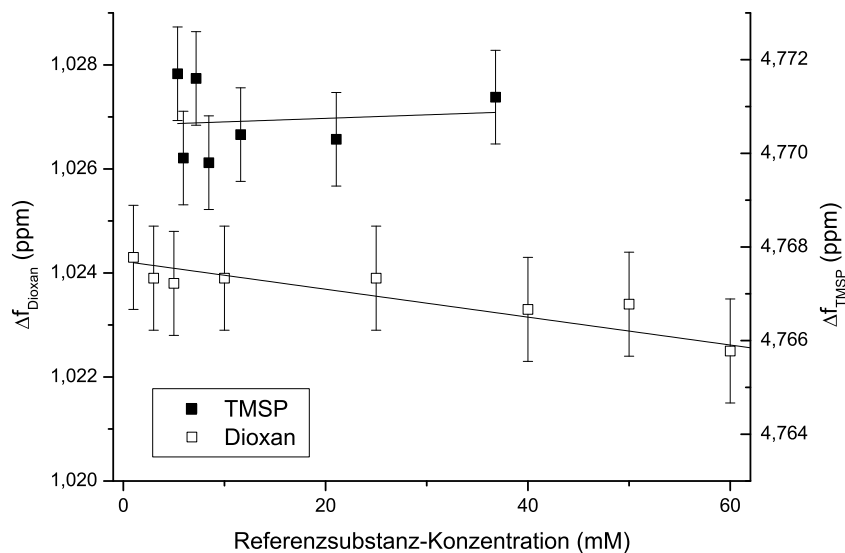


Abbildung 4.44: Wasserfrequenzen in Lösungen mit TMSP bzw. Dioxan (kalibriert auf 0 ppm bei 0,00 ppm für TMSP bzw. 3,75 ppm für Dioxan). Lineare Regression ergibt  $(-2,68 \pm 0,42) \cdot 10^{-5}$  ppm/mM ( $R^2 = 0,85$ ,  $p = 1E-05$ ) für Dioxan und  $(4,76 \pm 0,19) \cdot 10^{-6}$  ppm/mM ( $R^2 = 0,01$ ,  $p = 0,998$ ) für TMSP.

### 4.3.5 DSS

Zur Ergänzung meiner Untersuchungen wurde auch DSS betrachtet, da es von Shimizu *et al.* (ebenso wie TSP, das TMSP sehr ähnlich ist) wegen Wechselwirkung mit Proteinen, also Abhängigkeit der Resonanzfrequenz von der Proteinkonzentration als ungeeignet betrachtet wird [75]. Eine spezifische Auswertung der in Abb. 4.45 beispielhaft dargestellten Daten bei 298 K erfolgte daher nicht.

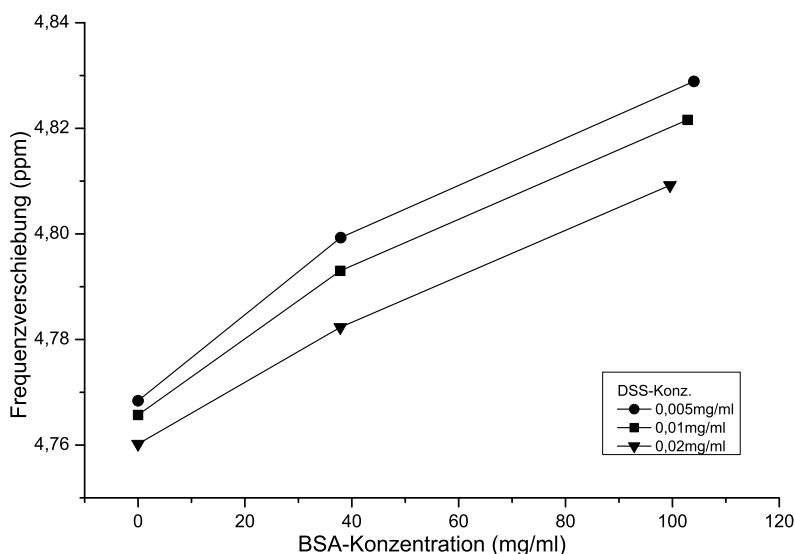


Abbildung 4.45: Darstellung der chemischen Verschiebung des Wassersignals für unterschiedliche DSS-Konzentrationen bei 298 K.

### 4.3.6 Chloroform (extern)

Eine Messung des kombinierten Austausch- und Suszeptibilitätseffekts wurde in coaxialer Anordnung vorgenommen. Das innere Röhrchen ist dabei mit Chloroform gefüllt. Gleichzeitig ist der Probenlösung mit BSA nun keine Referenzsubstanz mehr zugesetzt, um zusätzliche Interaktionen mit Wasser und Makromolekülen zu vermeiden. Es zeigt sich dabei (s. Abb. 4.46) eine Frequenzverschiebung bezogen auf die BSA-Konzentration mit  $(-0,016 \pm 0,003)$  ppm/mM bei 298 K. Der dabei angenommene experimenteller Fehler von  $\pm 0,003$  ppm soll Temperaturgradienten, Feldfluktuationen (Drift) und Feldinhomogenitäten (imperfect shimming) berücksichtigen.

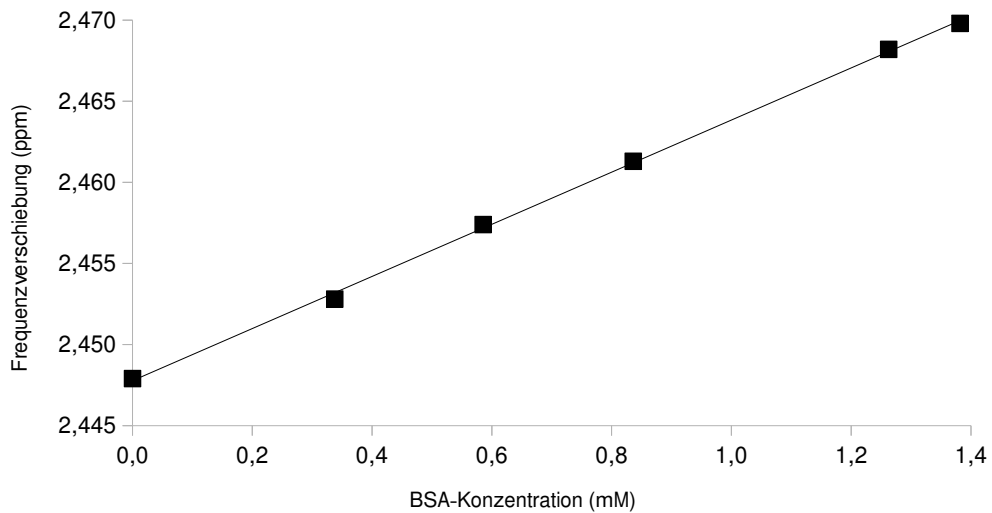


Abbildung 4.46: Abhängigkeit der relativ zu externem Chloroform ermittelten Wasser-Resonanzverschiebung von der BSA-Konzentration.

## 4.4 Gewebeextrakte im Hinblick auf Wasserfrequenzverschiebung und andere Parameter

### 4.4.1 Vorbemerkungen

Neben einer NMR-spektroskopischen Auswertung hinsichtlich der Wasserfrequenzverschiebung wurden Eisen- und Proteingehalte, sowie Massenverteilungen der präparierten Gewebeextrakte ermittelt (vgl. Abschnitt 3.2.2). Bei den Extrakten aus Kleinhirn wurde zusätzlich eine Suszeptibilitätsbestimmung nach der Methode von Hoffman vorgenommen (vgl. Abschnitt 3.8.3). Außerdem wurden die Relaxationszeitkonstanten ( $T_1$  und  $T_2$ ) und die Diffusionskonstante  $D$  bestimmt.

Zunächst sollen die Wasserfrequenzverschiebungen gegenüber den Protein- und Eisengehalten dargestellt und statistisch zusammengefasst werden (Abschnitt 4.4.2). Die ermittelten Suszeptibilitäten werden hierin einbezogen. Im darauffolgenden Abschnitt stelle ich Relaxationszeit- und Diffusionskonstanten in Bezug zur Proteinkonzentration (Abschnitt 4.4.3). Im letzten Abschnitt versuche ich mit einer ausführlicheren statistischen Auswertung Zusammenhänge zwischen den Parametern und deren Einfluss auf die Wasserfrequenzverschiebung herzustellen (Abschnitt 4.4.4).

Tabelle 4.4: Deskriptive Statistik von Parametern der Gewebeextrakte.

Abkürzungen: o. M. = ohne Membranen, Std.-abw. = Standardabweichung,

 $\Delta f_{\text{rel}}$  = relative Wasserfrequenzverschiebung,  $\chi$  = Suszeptibilität.

Cortex	Mittelwert	Std.-abw.	min.	max.
[Protein] / mg/ml	26,5	5,6	20,4	30,0
[Fe] / ppm	4,1	1,8	1,6	6,3
$\Delta f_{\text{rel}}$ / ppm	-0,029	0,009	-0,046	-0,020
Cortex (o. M.)	Mittelwert	Std.-abw.	min.	max.
[Protein] / mg/ml	2,6	0,4	2,1	3,0
[Fe] / ppm	3,6	0,6	2,9	4,7
$\Delta f_{\text{rel}}$ / ppm	-0,009	0,003	-0,014	-0,007
Kleinhirn	Mittelwert	Std.-abw.	min.	max.
[Protein] / mg/ml	6,8	4,9	1,7	15,6
[Fe] / ppm	1,4	1,7	0,4	5,4
$\Delta f_{\text{rel}}$ / ppm	0,010	0,007	0,003	0,022
$T_1$ / s	4,8	1,3	2,5	6,1
$T_2$ / s	0,6	0,5	0,1	1,7
$D / 10^{-13} \text{ cm}^2/\text{s}$	1,6	0,6	0,5	2,2
$\chi$ / ppm	-0,8	0,2	-1,2	-0,6

#### 4.4.2 Wasserfrequenz, Eisen- und Proteingehalt

Alle Werte sind in den folgenden Abbildungen 4.47-4.51 aufgezeichnet und in der nachstehenden Tabelle 4.4 mit charakterisierenden statistischen Werten zusammengefasst. Sofern nicht anders angegeben kommen die Daten zur Darstellung, die bei einer Temperatur von 308 K aufgezeichnet wurden (entspricht annähernd Körpertemperatur).

Bei der Abhängigkeit der Eisen- von der Proteinkonzentration zeigt sich eine nur geringe Korrelation (vgl. auch andere Werte in Tab. 4.5) mit  $r = 0,4070$  ( $p = 0,80$ ) bzw. nach der Membranextraktion mit  $r = 0,2911$  ( $p = 0,94$ ; s. Abb 4.47).

## KAPITEL 4 ERGEBNISSE

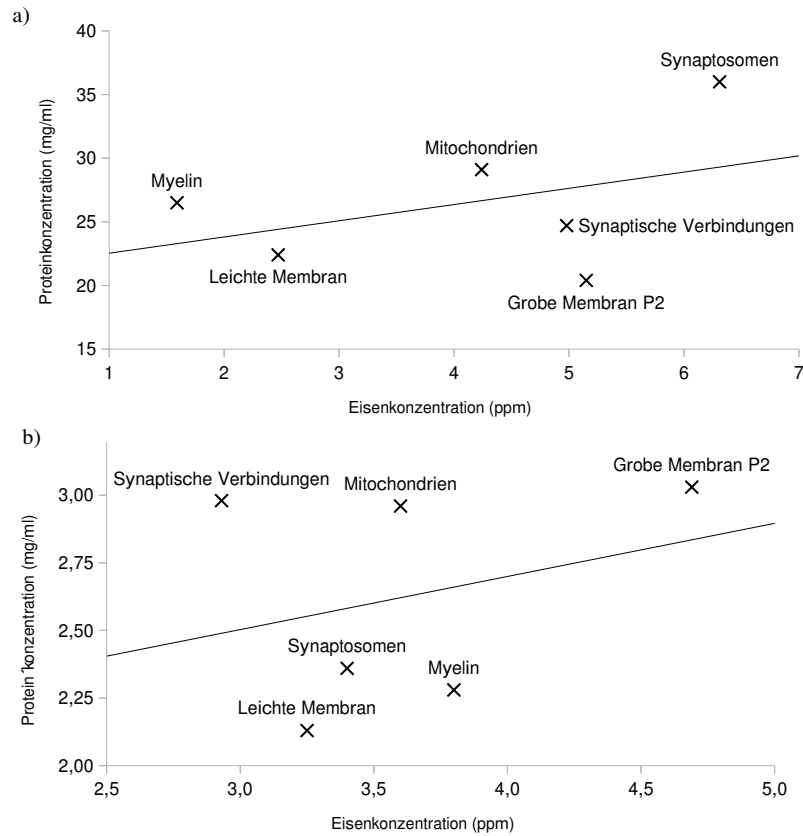


Abbildung 4.47: Darstellung der Protein- und Eisenkonzentrationen der Gewebeertrakte (Cortex) und linearen Regressionen a) mit ( $R^2 = 0,1656$ ,  $p = 0,49$ ) und b) ohne Membranen ( $R^2 = 0,0847$ ,  $p = 0,79$ ).

#### 4.4 GEWEBEEXTRAKTE

Eine ähnlich schwache Korrelation von  $r = 0,4318$  ( $p = 0,76$ ) ergibt sich für den Zusammenhang zwischen Eisenkonzentration und Frequenzverschiebung. Dennoch sind qualitative Ähnlichkeiten bei der Auftragung der Frequenzverschiebungen des Wassers über Eisen- und Proteinkonzentrationen zu erkennen (s. Abb. 4.48).

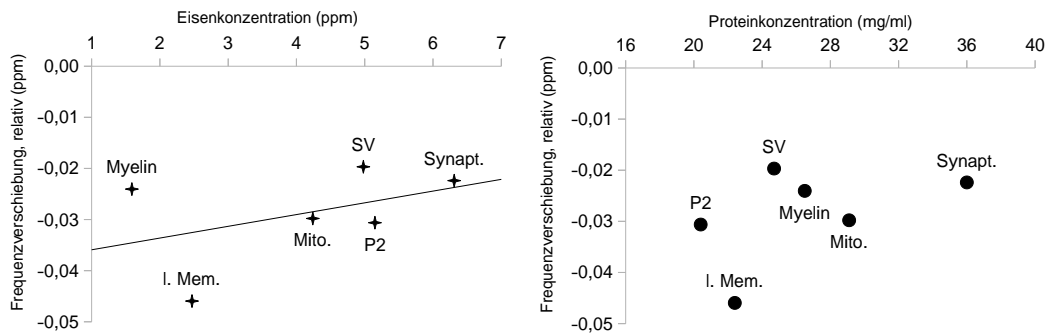


Abbildung 4.48: Frequenzverschiebungen (relativ zur Wasserfrequenz) über Eisen- (links) und Proteinkonzentrationen (rechts) der verschiedenen Gewebeextrakte (Cortex): Myelin, leichte Membran (I. Mem.), Mitochondrien (Mito.), Synaptische Verbindungen (SV), grobe Membran (P2), Synaptosomen (Synapt.). Durchgezogene Linie im linken Diagramm: lineare Regression mit  $R^2 = 0,1864$  ( $p = 0,43$ ).

Diese qualitative Verteilung der Datenpunkte ändert sich stark nach der Entfernung von Membranproteinen (s. Abb. 4.49). Die Korrelation zwischen Frequenzverschiebung und Eisenkonzentration nimmt jedoch zu auf  $r = -0,9006$  ( $p = 0,0009$ , vgl. Abb. 4.49).

Für die Verschiebungen unterschiedlicher subzellulärer Fraktionen zeigen sich vor der Membranentfernung stärker voneinander unterscheidbare Werte (s. Abb. 4.52). Die Darstellung von Eisen- und Suszeptibilitätswerten zeigt eine vergleichbar starke Korrelation von  $r = -0,8997$  ( $p = 0,01$ ; s. Abb. 4.53), wie sie zuvor zwischen Eisenkonzentration und Frequenzverschiebung festgestellt wurde.

Die Korrelationen  $r$  zwischen Protein- und Eisengehalt sowie der Frequenzverschiebung des Wassersignals sind generell schwach<sup>2</sup>, aber in vergleichbarer Größenordnung, sowohl für den Eisen- als auch für den Proteingehalt (s. Tab. 4.5).

<sup>2</sup>Korrelationen  $r$  zwischen 0,4070 ( $p = 0,80$ ) und 0,6475 ( $p = 0,15$ ); außer für Eisen-Frequenz-Korrelation ohne Membranen mit  $r = -0,9006$  ( $p = 0,0009$ ).



## KAPITEL 4 ERGEBNISSE

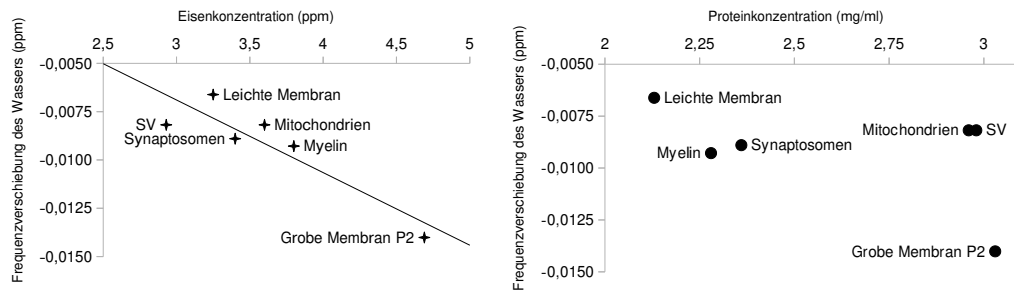


Abbildung 4.49: Darstellung der Frequenzverschiebungen von Wasser verschiedener Gewebeextrakte (Cortex) nach Membranextraktion. Aufgetragen jeweils über den Eisen- (links) und Proteinkonzentrationen (rechts). SV = Synaptische Verbindungen. Durchgezogene Linie im linken Diagramm: lineare Regression mit  $R^2 = 0,8111$  ( $p = 0,0009$ ).

Tabelle 4.5: Korrelationen  $r$  zwischen Parametern von Gewebeextrakten (o. M. = ohne Membranen) bei annähernd Körpertemperatur (308 K). Entsprechende  $p$ -Werte darunter.

	Cortex		Cortex (o. M.)		Kleinhirn	
	[Protein]	$\Delta f$	[Protein]	$\Delta f$	[Protein]	$\Delta f$
[Eisen]	0,4070	0,4318	0,2911	-0,9006	0,5499	0,6475
$p$ -Werte	0,80	0,76	0,94	0,0009	0,36	0,15
[Protein]		0,4704		-0,4982		0,5604
$p$ -Werte		0,70		0,64		0,33

#### 4.4 GEWEBEEXTRAKTE

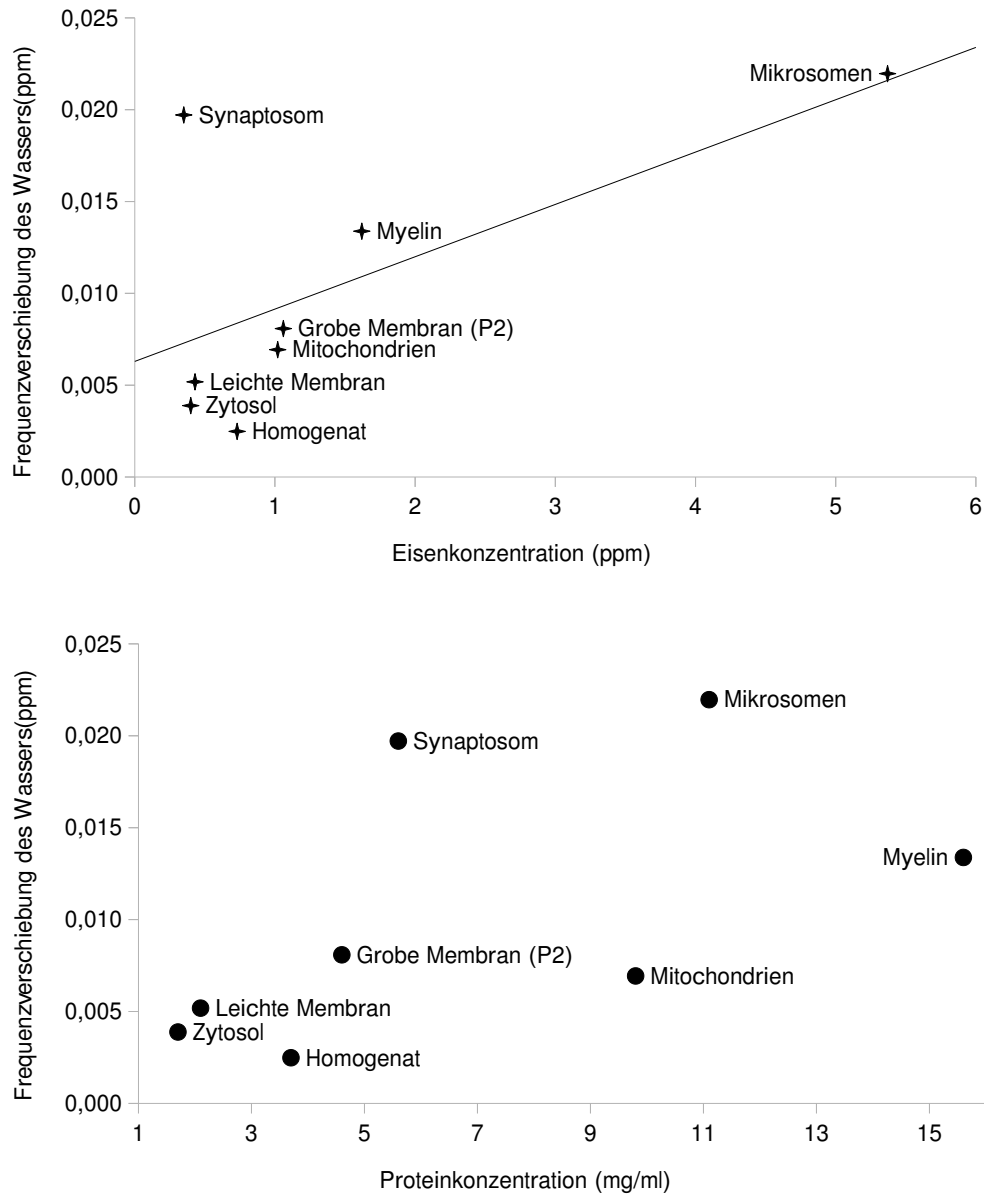


Abbildung 4.50: Darstellung der Frequenzverschiebungen von Wasser verschiedener Gewebextrakte (Kleinhirn). Aufgetragen jeweils über den Eisen- (oben) und Proteinkonzentrationen (unten). Durchgehende Linie (oben): lineare Regression mit  $R^2 = 0,4192$  ( $p = 0,075$ ).

## KAPITEL 4 ERGEBNISSE

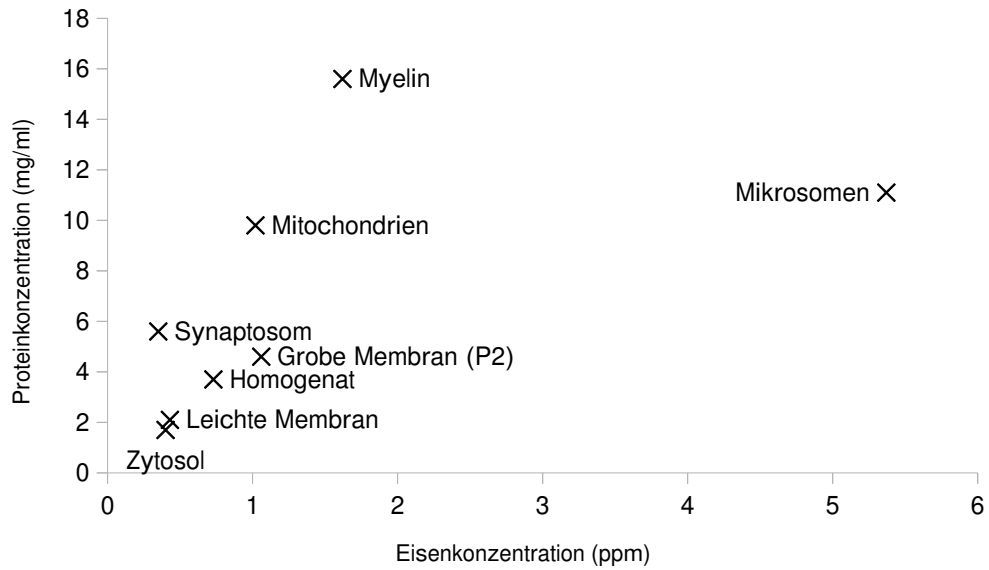


Abbildung 4.51: Gegenüberstellung der Eisen- und Proteinkonzentrationen verschiedener Gewebeextrakte aus Kleinhirn.

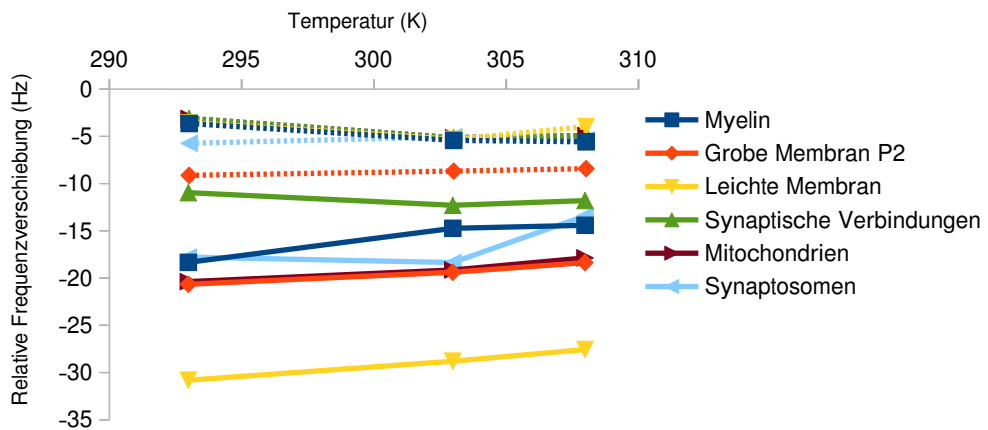


Abbildung 4.52: Darstellung der Frequenzverschiebungen bei variiertem Temperatur für verschiedene Gewebeextrakte mit (durchgehende Linien) und ohne (gestrichelte Linien) Membranen.

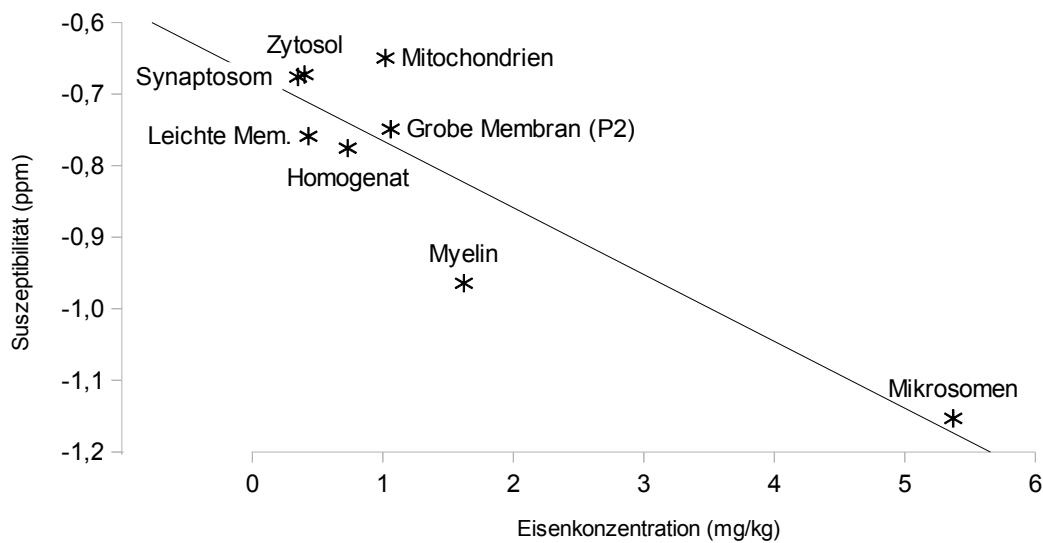


Abbildung 4.53: Darstellung der Korrelation von Eisenkonzentration und Suszeptibilität verschiedener Gewebeextrakte (Kleinhirn;  $R^2 = 0,8092$ ,  $p = 0,0009$ ).

In die Betrachtungen einzubeziehen sind auch die unterschiedlichen Massenverhältnisse der aus verschiedenen Proteinen, Zytoskelett und anderen subzellulären und zellulären Kompartimenten bestehenden Gewebeextrakte. Hierzu können durch Gelelektrophorese gewonnene Massenprofile herangezogen werden. Um einen besseren Vergleich ziehen zu können, wurden die Ursprungsdaten normiert und linearisiert (s. Abb. 4.54). Prinzipiell zeigen sich nur geringe Unterschiede in den Massenverteilungen. Auch die Membranextraktion führt zu keiner bemerkenswerten Veränderung, da die Strukturproteine erhalten bleiben. Lediglich die Lipidmembranen werden herausgelöst, die im Massenspektrum eher im unteren Bereich zu verzeichnen sind. Dies ist beispielsweise im Bereich von etwa 0-10 kDa bei Myelin in Abb. 4.54 zu sehen, da Myelin einen hohen Lipidanteil besitzt.

## KAPITEL 4 ERGEBNISSE

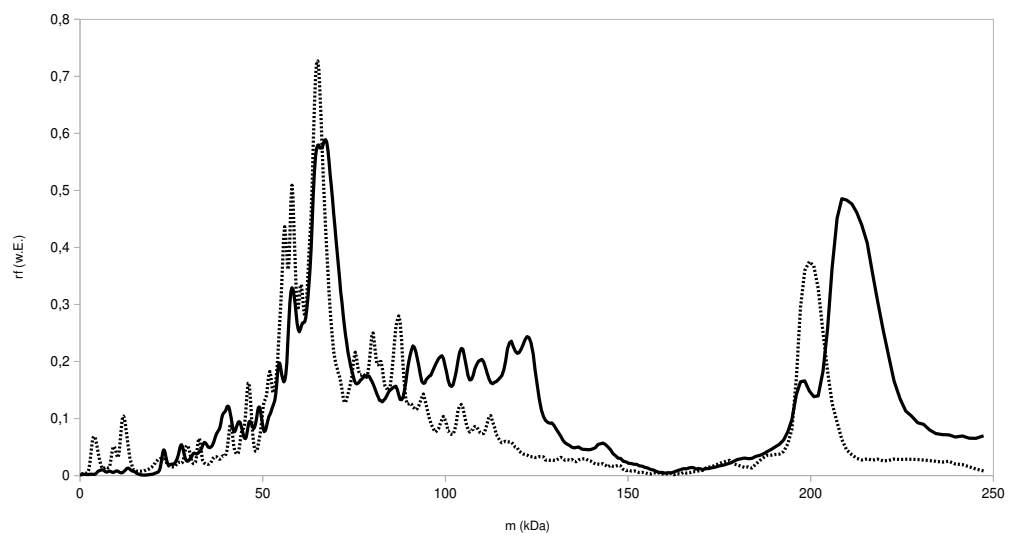


Abbildung 4.54: Massenverteilungen  $m$  aus Gelelektrophorese ( $rf = \text{relative front}$ ) für Myelin (gestrichelte Linie) und Synaptosomen (durchgängige Linie). Die Werte sind zur einfacheren Vergleichbarkeit normiert (bezogen auf den Integralwert) und linear korrigiert dargestellt.

### 4.4.3 Relaxations- und Diffusionskonstanten

Im Folgenden sollen zur Vervollständigung der Messdaten und zum besseren Vergleich mit den Proteinlösungen auf der einen und mit *in vivo* Messungen auf der anderen Seite auch die Relaxationszeitkonstanten zur Darstellung gebracht werden. Für zunehmende Proteinkonzentration der Gewebeextrakte aus Kleinhirn zeigt sich eine Zunahme<sup>3</sup> der inversen Relaxationszeitkonstanten  $1/T_1$  (s. Abb. 4.55) und  $1/T_2$  (s. Abb. 4.56).

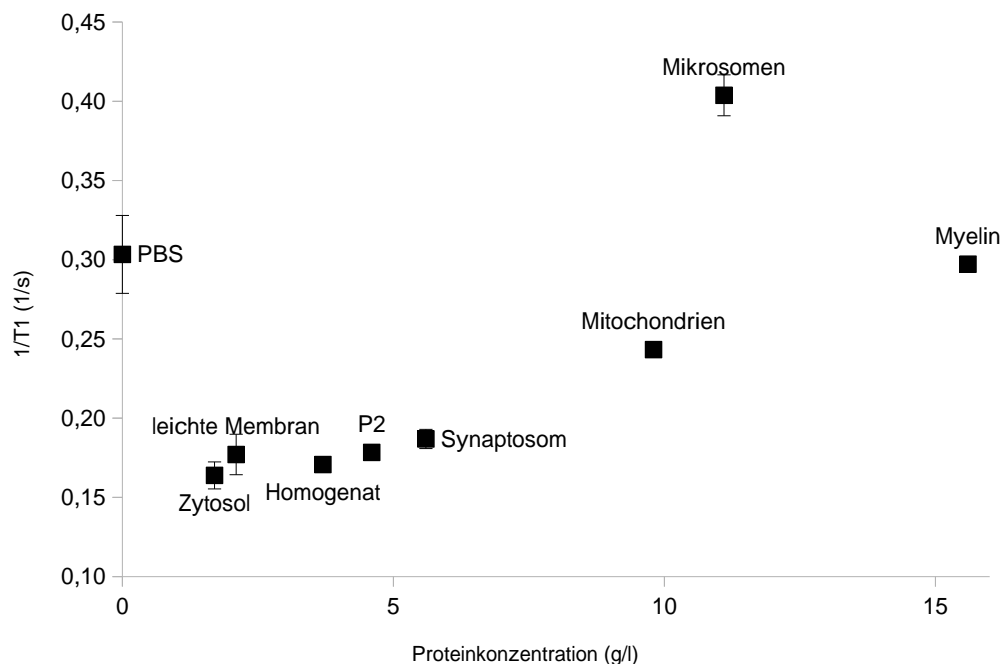


Abbildung 4.55: Zunahme der inversen Relaxationszeit  $1/T_1$  bei zunehmender Proteinkonzentration von Kleinhirnextrakten.

Eine Gegenüberstellung der Relaxationszeitkonstanten  $T_1$ ,  $T_2$  und der Diffusionskonstanten  $D$  (s. Abb. 4.57) zeigt eine schwankende Diffusionskonstante mit nicht signifikanter Korrelation  $r = -0,4306$  ( $p = 0,67$ ). Die gute Korrelation von  $T_2$  mit der Proteinkonzentration ( $r = -0,7396$ ,  $p = 0,05$ ) gegenüber der etwas geringeren von  $T_1$  ( $r = -0,5789$ ,  $p = 0,29$ ) mit der Proteinkonzentration ist ebenso zu erkennen. Die Korrelationskoeffizienten genannter Größen finden sich in Tab. 4.6.

<sup>3</sup>Für  $1/T_1$  zeigt sich dies nur unter Ausschluss von PBS und mit einem Ausreißer bei Mikrosomen.

## KAPITEL 4 ERGEBNISSE

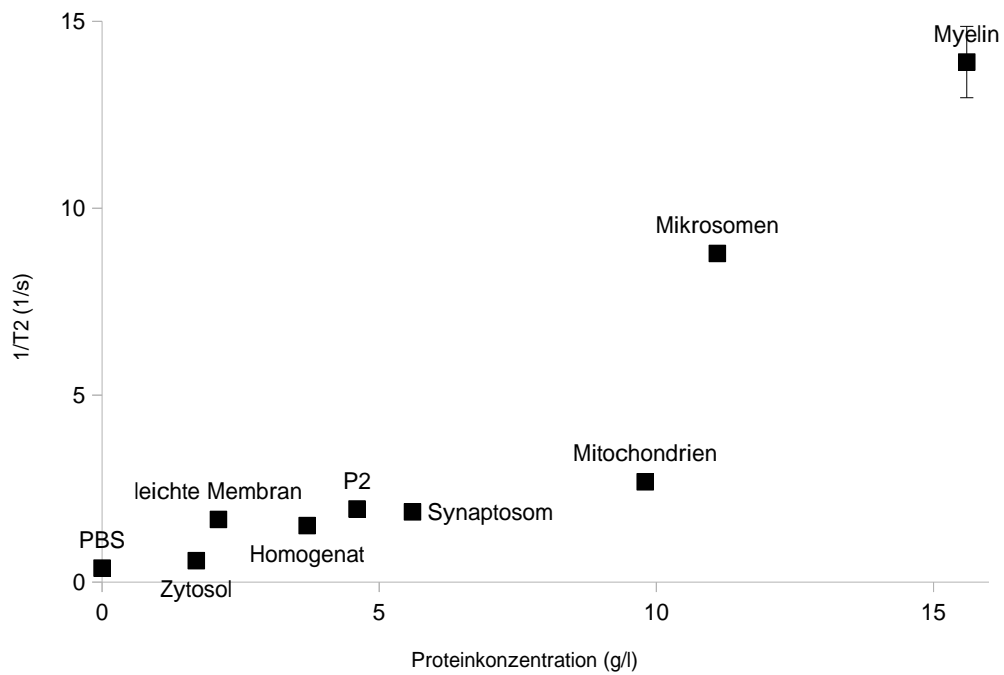


Abbildung 4.56: Zunahme der inversen Relaxationszeit  $1/T_2$  bei zunehmender Proteinkonzentration von Kleinhirnextrakten.

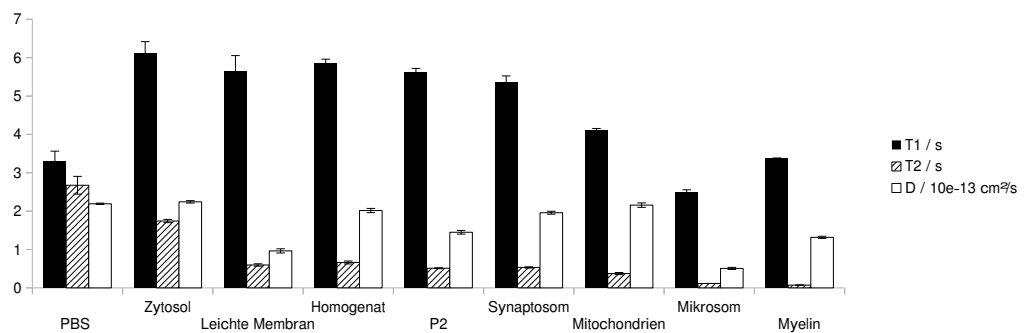


Abbildung 4.57: Zusammenstellung der Relaxationszeiten  $T_1$ ,  $T_2$  und der Diffusionskonstanten  $D$  für (v. l. n. r.) zunehmende Proteinkonzentration von Kleinhirnextrakten.

Tabelle 4.6: Korrelationskoeffizienten der Relaxationszeiten  $T_1$ ,  $T_2$  und der Diffusionskonstanten  $D$  für Gewebeextrakte aus Kleinhirn (mit und ohne Einbeziehung der Referenzmessung mit PBS) unter Angabe der  $p$ -Werte (jeweils darunter).

	mit PBS			ohne PBS		
	[Protein]	$D$	$T_2$	[Protein]	$D$	$T_2$
$T_1$	-0,5789	0,3831	0,0717	-0,8958	0,5811	0,7214
$p$ -Wert	0,29	0,78	1,00	0,001	0,28	0,06
$T_2$	-0,7396	0,5814		-0,7373	0,5744	
$p$ -Wert	0,05	0,28		0,05	0,30	
$D$	-0,4306			-0,3358		
$p$ -Wert	0,67			0,87		

#### 4.4.4 Parameterstatistik

Mit Hilfe statistischer Methoden (deskriptiv s. o. in Tab. 4.4, S. 92) wurden die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Parametern, wie Eisen- und Proteingehalt und der Wasserresonanz, untersucht. So wurden die Korrelationen bereits in den Tabellen 4.4 und 4.6 dargestellt. Im Folgenden sind noch einmal wichtige Korrelationen und Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse dargestellt. Dabei wurden Korrelationen innerhalb der Resonanzfrequenzen bei verschiedenen Temperaturen vernachlässigt, da dies keinen weiteren Erkenntnisgewinn liefert (vgl. Abschnitt 4.2.1).



KAPITEL 4 ERGEBNISSE

Tabelle 4.7: Übersicht der Ergebnisse statistischer Auswertung der Gewebeextrakt-  
daten hinsichtlich höchster Korrelationen  $r$  zwischen Parameter P1 und P2, so-  
wie Hauptkomponenten PCA1 und PCA2 mit Rotationsfaktoren (Rot.). Signifikanz  
( $p < 0,05$ ) mit \* gekennzeichnet.

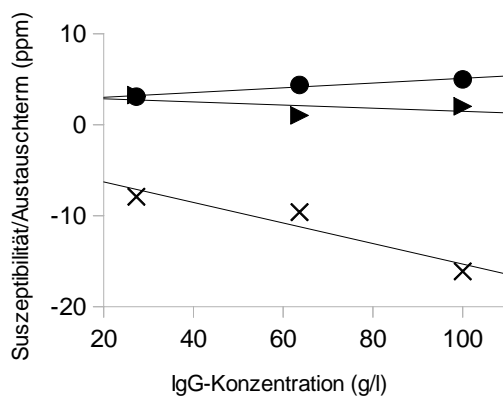
			Cortex			
max. Korr.			PCA1		PCA2	
P1	P2	$r$	Param.	Rot.	Param.	Rot.
[Protein]	$f(308\text{ K})$	0,4704	$f(308\text{ K})$	0,5417	[Protein]	-0,6667
[Fe]	$f(293\text{ K})$	0,4480	$f(293\text{ K})$	0,5294	[Fe]	-0,5918
[Fe]	$f(308\text{ K})$	0,4318	$f(303\text{ K})$	0,5040	$f(303\text{ K})$	0,3799
[Fe]	[Protein]	0,4070	[Fe]	0,3056	$f(293\text{ K})$	0,2211
[Protein]	$f(293\text{ K})$	0,2922	[Protein]	0,2808	$f(308\text{ K})$	0,1099
Cortex (ohne Membranen)						
P1	P2	$r$	Param.	Rot.	Param.	Rot.
[Fe]	$f(308\text{ K})$	-0,9006*	$f(308\text{ K})$	0,4999	[Protein]	-0,9421
[Fe]	$f(303\text{ K})$	-0,8875*	$f(303\text{ K})$	0,4928	$f(293\text{ K})$	-0,2434
[Fe]	$f(293\text{ K})$	-0,8163	[Fe]	-0,4700	[Fe]	0,2242
[Protein]	$f(308\text{ K})$	-0,4982	$f(293\text{ K})$	0,4696	$f(303\text{ K})$	-0,0530
[Protein]	$f(303\text{ K})$	-0,4417	[Protein]	-0,2564	$f(308\text{ K})$	0,0086
[Fe]	[Protein]	0,2911				
Kleinhirn						
P1	P2	$r$	Param.	Rot.	Param.	Rot.
$\chi$	[Fe]	-0,8997*	$T_1$	-0,3874	$f(293\text{ K})$	0,6356
$T_1$	[Protein]	-0,8958*	[Fe]	0,3773	$f(298\text{ K})$	0,5152
$T_1$	[Fe]	-0,8317*	$f(308\text{ K})$	0,3746	$f(308\text{ K})$	0,3145
$D$	$\chi$	0,8168	$\chi$	-0,3721	[Protein]	-0,2980
$T_1$	$\chi$	0,7964	$T_2$	-0,3271	$T_1$	0,2300
$T_2$	[Protein]	-0,7373	$D$	0,3202	$\chi$	0,2059
$T_1$	$T_2$	0,7214	[Protein]	0,3178	$T_2$	0,1580
$D$	[Fe]	-0,7193	$f(298\text{ K})$	0,2901	$D$	0,1205
$T_1$	$f(308\text{ K})$	-0,6816	$f(293\text{ K})$	0,1848	[Fe]	-0,0901

#### 4.4 GEWEBEEXTRAKTE

## 4.5 Austausch und Suszeptibilität bei Proteinen und im Gewebe

Mit der Methode der Anwendung interner und externer NMR-Referenzen wurden die beiden Parameter Suszeptibilität  $\chi$  und Austauschterm  $\Xi$  bestimmt. Das zweischrittige Verfahren liefert nach der in Abschnitt 3.10 notierten Subtraktion der Frequenzverschiebungen von Wasser bzw. Dioxan mit und ohne der zu untersuchenden Substanz (Protein/Gewebe) das von Luo et al. [35] beschriebene Verhalten: Suszeptibilität verringert und Austausch erhöht die Frequenzverschiebung. Über die lineare Regression (s. Abb. 4.58) der ermittelten Parameter mit der Proteinkonzentration konnte so eine vergleichbare Darstellung gewonnen werden (s. Tab. 4.8 und 4.9). Die Berechnung erfolgte unter Berücksichtigung der beiden möglichen Verfahren: Verwendung *absoluter* und zu der externen NMR-Referenzsubstanz *relative* Resonanzfrequenzen. Dabei ist ein generell kleinerer Wert der Suszeptibilität (Faktor 0,17-0,81, vgl. Tab. 4.9) und ein teilweise größerer Wert des Austauschterms (Faktor 1,08-1,33, vgl. Tab. 4.8) aus der absoluten Berechnung im Vergleich zur relativen festzustellen.

a) relativ



b) absolut

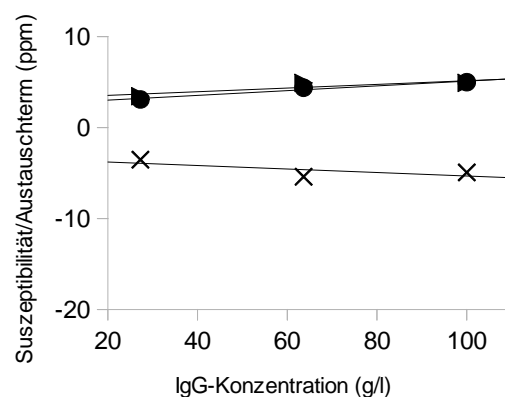


Abbildung 4.58: Darstellung von Suszeptibilität (×) und Austauschterm (● nach Gl. 3.18/3.20 bzw. ► nach Gl. 3.17/3.19 unter Berücksichtigung aller Messungen bzw. nur denen mit Dioxan) bei unterschiedlichen IgG-Konzentrationen. Datengrundlage a) relativ zu  $\text{CHCl}_3$  bzw. b) absolut.

#### 4.5 AUSTAUSCH UND SUSZEPTIBILITÄT

Tabelle 4.8: Austauschtermine für verschiedene Gewebeextrakte (oben) und Proteine (unten) unter Angabe des jeweiligen Bestimmtheitsmaßes  $R^2$  und  $p$ -Wertes, berechnet mit absoluten und relativen Wasserfrequenzverschiebungen.

Gewebe/Protein	Austausch $\Xi$ / ppb/(g/l)					
	relativ			absolut		
	$\Xi$	$R^2$	$p$	$\Xi$	$R^2$	$p$
Myelin	0,766	0,9994	1E-05	0,766	0,9994	1E-05
Synaptosom	0,971	0,8810	0,028	0,971	0,8810	0,028
Lys	0,131	0,9711	0,003	0,142	0,9879	0,001
BSA	0,079	0,8876	0,026	0,105	1,0000	1E-07
IgG	0,044	0,9591	0,005	0,044	0,9595	0,005

Tabelle 4.9: Suszeptibilitätswerte für verschiedene Gewebeextrakte (oben) und Proteine (unten) unter Angabe des jeweiligen Bestimmtheitsmaßes  $R^2$  und  $p$ -Wertes, berechnet mit absoluten und relativen Wasserfrequenzverschiebungen.

Gewebe/Protein	Suszeptibilität $\chi$ / ppb/(g/l)					
	relativ			absolut		
	$\chi$	$R^2$	$p$	$\chi$	$R^2$	$p$
Myelin	-1,209	0,7652	0,081	-0,350	0,7652	0,081
Synaptosom	-0,368	0,9894	0,001	-0,298	0,9829	0,001
Lys	-0,368	0,9987	3E-05	-0,140	0,9787	0,002
BSA	-0,227	0,9998	2E-06	-0,114	0,9281	0,013
IgG	-0,188	0,8973	0,022	-0,032	0,5136	0,268

# Kapitel 5

## Diskussion

### 5.1 Vorbemerkungen

Im Folgenden sollen die im vorigen Kapitel dargestellten Ergebnisse entlang der dort verwendeten Gliederung interpretiert und kritisch betrachtet werden. Im Ausblick am Ende zeige ich weitere Schritte und offene Fragen auf (Abschnitt 5.7), um dann mit der Zusammenfassung zu schließen.

### 5.2 Einfluss von Grundparametern auf die Frequenzvariation des Wassersignals

#### 5.2.1 Temperatur

Die nachgewiesene lineare Abhängigkeit der Resonanzfrequenzen von der Temperatur<sup>1</sup> (mit  $p < 2E-05$ ) stellen die Ergebnisse, wie nachfolgend gezeigt, in einen bekannten Rahmen (vgl. Abschnitt 2.5.3, S. 23). Zunächst sollen jedoch davon abweichende Ergebnisse diskutiert werden.

Bereits bei der Parameterraumerweiterung auf die Proteinkonzentration zeigt sich ein unerwartetes konkaves Verhalten der Temperaturabhängigkeit über der Konzentration von Proteinen unter Verwendung der internen Referenz TMSP (s. Abb. 4.2, S. 59). Besonders deutlich wird dies bei stärkerer Variation der TMSP-Konzentration (s. Abb. 4.42, S. 87), sodass ein Zusammenhang mit der Protein-Konzentration

---

<sup>1</sup>In Folge von Dichteänderung und damit Suszeptibilitätsänderungen. Vgl. Abb. 4.1, S. 59, bzw. Tab. 4.1, S. 62

## 5.2 FREQUENZVARIATION DES WASSERSIGNALS

vernachlässigt werden kann, obwohl dies durch eine Betrachtung des  $f(T,[BSA])$ -Zusammenhangs (bei einer geringen Variation von BSA mit 0,06 mM) nahegelegt wird. Da diese starke Abhängigkeit (in Zahlen 250 ppb/K/mM BSA) jedoch nur bei variierender TMSP-Konzentration festgestellt wird (lediglich 2,7 ppb/K/mM BSA bei konstanter TMSP-Konzentration) ist die interne NMR-Referenz TMSP als Verursacher zu benennen. Denn ein ähnliches (konkaves) Verhalten der Temperaturanstiege in Abhängigkeit von der Konzentration konnte auch für die alleinige Variation der TMSP-Konzentration festgestellt werden (s. Abschnitt 4.3.3, S. 84), wobei das Verhalten  $f(T,[TMSP])$  dort zunächst als Sättigung interpretiert werden konnte (s. Abb. 4.40, S. 85). Daher liegt die Vermutung nahe, dass sich auch hierbei eine Wechselwirkung zwischen Proteinen und TMSP manifestiert (s. Abb. 4.4, S. 61). Dies wurde verifiziert, indem Frequenzverschiebungsanstiege in Abhängigkeit von Temperatur und Proteinkonzentration gegeneinander aufgetragen wurden und dabei eine deutliche konkave Abhängigkeit<sup>2</sup> sichtbar wird (s. Abb. 4.42, S. 87).

Auch die Verwendung externer Resonanzsubstanzen erweist sich in diesem Kontext als problematisch: die starke Temperaturabhängigkeit der Frequenzverschiebung von Chloroform (2,3 ppm/K vs. 0,5 ppb/K für  $^2\text{H}_2\text{O}$  [64]) verfälscht die relativ zu Chloroform ermittelten Frequenzverschiebungen von Wasser und Dioxan (vgl. Tab. 4.1), d. h. die so ermittelten Werte sind tatsächlich etwa 40fach höher als die absolut berechneten. Beispielsweise erhält man durch Division der Resonanzfrequenz von 600,13 MHz Werte von 0,37 ppb/K (mit absoluten Resonanzfrequenzen) und -14,21 ppb/K (mit relativen Resonanzfrequenzen) für PBS. Für die (absolut betrachtet) höheren Werte sind dennoch vergleichbare Literaturangaben zu finden: experimentell  $-11,9 \pm 0,3$  ppb/K [92] und theoretisch: -11,88 ppb/K [93]. Bei diesen stark voneinander abweichenden Literaturwerten ist die Methode der Bestimmung zu beachten: Cross *et al.* [64] verwendeten Ethan (bei niedrigem Druck) und Wishart *et al.* [92] lediglich  $\text{D}_2\text{O}$  als externe NMR-Referenz, d. h. dort wurde die Temperaturabhängigkeit absolut bestimmt.

Die Beeinflussung der Resonanzfrequenzen der Substanzen durch unterschiedliche Suszeptibilitäten ist als Hauptursache für die vorgenannten Schwierigkeiten zu nennen [90], wobei mit der Korrektur nach dem Doppelreferenzverfahren (s. Abschnitt 3.9) zumindest eine Annäherung der Werte in die selbe Größenordnung erreicht wird. Für Chloroform ergibt sich so ein Wert von 2,82 ppb/K, was nun dem vorge-

---

<sup>2</sup>Wechsel des (linearen) Kurvenanstiegs vom Positiven zum Negativen.

## KAPITEL 5 DISKUSSION

nannten Literaturwert bis auf eine Abweichung von 22% deutlich näher kommt als die ermittelten 14,56 ppb/K mit 533% Abweichung. Für Dioxan ergibt sich lediglich eine Annäherung in die gleiche Größenordnung (von 14,1 ppb/K zu 8,5 ppb/K mit der Doppelreferenzmethode im Vergleich zu 1,7 ppb/K bei Cross *et al.* [64]). Für die reine Pufferlösung (PBS) weicht der Wert mit -2,42 ppb/K stärker von den Literaturwerten ab. Der Vorzeichenwechsel grenzt das neue Ergebnis zu den Ergebnissen mit der externen NMR-Referenzsubstanz ab und weist auf eine verlässlichere Bestimmung des Wertes hin. Da jedoch weiterhin die Einbeziehung einer NMR-Referenz (nun der internen in Bezug zur externen) eine Rolle spielt, sind die mit den absoluten Resonanzfrequenzen berechneten Werte als verlässlicher anzusehen. Dennoch wäre mit der Einbeziehung der konkreten temperaturabhängigen Suszeptibilitäten der Genauigkeit gedient. So liefern Hoffman *et al.* [77] einen Wert von  $\kappa = 0,782 + 9,5 \times 10^{-4}T$  für die Volumensuszeptibilität von Chloroform. Des Weiteren müssten dann auch die konkreten Formfaktoren (verschieden von 0) für die verwendeten NMR-Röhrchen einbezogen werden (vgl. Gl. 2.47, S. 32).

Diese Überlegungen finden hier jedoch keine weitere Anwendung, da die dynamische Betrachtung des Systems Wasser-Makromolekül lediglich aufgrund der Frequenzverschiebungen bei konstanter Temperatur vorgenommen wird. Insofern bei pathologischer Veränderung auch Temperaturvariation im Gehirn auftreten kann, ist das vorgenannte komplexe Verhalten in die Betrachtungen mit einzubeziehen.

Zum Abschluss dieses Abschnitts will ich noch auf die Ergebnisse der Messungen mit Myelin eingehen (s. unterer Abschnitt in Tab. 4.1, S. 62). Abhängig von der Modalität der Messung (mit/ohne Dioxan) wechseln die Differenzen der Temperaturabhängigkeit (relativ zu den Werten der reinen PBS-Lösung) die Vorzeichen. Außer im Falle der Wasserresonanzfrequenzen nach der Doppelreferenzmethode: hier beträgt die Differenz konsistent -9,4% bzw. -12,4% (mit/ohne Dioxan). Etwa halb so klein sind die Differenzen bei absoluter Betrachtung der Resonanzfrequenzen (+5,0%/-4,6%) bzw. wesentlich kleiner bei relativer Betrachtung (CHCl<sub>3</sub>-Referenz) mit -2,4% bzw. +1,4%.

Insgesamt ist festzuhalten, dass die Referenzierung eine große Rolle spielt. Eine Korrektur, wie beim Doppelreferenzverfahren, scheint nur bedingt erfolgversprechend zu sein. Möglicherweise sind andere Ergebnisse zu erwarten, wenn auf eine Referenzierung verzichtet würde, welche über die Suszeptibilitätsunterschiede eine zusätzliche Beeinflussung der beobachteten Resonanzfrequenzen verursacht.

### 5.2.2 Stabilität des Messsystems

Insgesamt lässt sich eine ausreichende Stabilität des Messsystems für die Ermittlung der geringen Resonanzfrequenzunterschiede von weniger als 1 ppb bei einer mittleren Abweichung von 0,2 ppb feststellen (s. Abb. 4.5, S. 63). Trotz Frequenzstabilisierung bleibt eine Drift von 0,11 Hz/h zu verzeichnen. Dies könnte auf den verwendeten *autoshim* zurückzuführen sein. Bei einer mittleren Aquisitionszeit von unter 20 Minuten (inklusive Temperaturstabilisierung von etwa 10 Minuten) bedeutet dies eine Drift von 0,04 Hz bzw. 0,06 ppb. Für das einzelne Experiment ist diese Drift daher irrelevant. Bezogen auf eine ganze Messreihe mit mehreren Proben sind im Mittel etwa vier Stunden üblich, was eine Drift von 0,44 Hz bzw. 0,73 ppb bedeutet. Dies liegt noch im Rahmen der Toleranz, muss aber als Fehlerquelle mit einbezogen werden.

Die wesentlich größeren Abweichungen in der Größenordnung von 0,1 ppm (s. Abb. 4.6, S. 64) sind nicht durch einen Wechsel des NMR-Probenkopfes begründbar, da auch wiederholte Messungen mit verschiedenen Probenköpfen zum gleichen Ergebnis führten (s. Abb. 4.6, S. 64). Möglicherweise sind andere Grundeinstellungen bei den dazwischenliegenden Messungen verändert worden. So sind beispielsweise die Ausgangswerte für den Shim, sowie Lock und Match häufig variierte Parameter, insbesondere beim Wechsel von Lösungsmitteln oder gar Kernresonanzen (beispielsweise  $^{13}\text{C}$  oder  $^{15}\text{N}$ ). Aufgrund dessen wurde bei der Auswertung in den betrachteten Datenreihen auf Konsistenz geachtet, was dadurch erleichtert wird, dass die üblichen Frequenzvariationen innerhalb einer Messreihe wesentlich kleiner ausfallen und damit größere Abweichungen besonders auffallen.

Aus diesem Grunde wurden beispielsweise im Falle der Gewebeextrakte aus dem Cortex nicht die NMR-Daten vom 03.05.2011 aus dieser Messreihe, sondern aus einer nachfolgenden (21.09.2011) – mit den übrigen Messungen konsistenten – Messreihe als Referenz verwendet (s. Abb. 4.6, S. 64).

### 5.2.3 Suszeptibilität

Auf der einen Seite sind die Messungen nach der Methode von Hoffman zuverlässig hinsichtlich der stabilen Linienbreiten im Bereich von 2 bis 5 mm unterhalb des Spulenmittelpunktes (s. Abb. 4.7, S. 65). Demgegenüber scheint jedoch für die Normalposition (bei 20 mm über dem Spulenmittelpunkt) keine vergleichbare Sta-



bilität zu existieren. Zudem beeinflussen Unterschiede in der Einfüllhöhe hierbei noch zusätzlich die betrachteten Parameter, insbesondere der hier als konstant angenommenen Formfaktoren. Diese Annahme ist jedoch bei leicht unterschiedlichen Einfüllmengen der Probesubstanzen (wegen hoher Viskosität) nicht mehr gegeben. Bei den übrigen NMR-Experimenten spielt dies keine oder eine untergeordnete Rolle, solange das gesamte Spulenvolumen von der Substanz ausgefüllt ist.

Die bereits in der Ausgangsposition variierenden Linienbreiten verschiedener Proteinslösungen haben ihre Ursache in der Komposition (also tatsächlicher Suszeptibilitätsunterschiede), der Größe (direkter Einfluss auf die Linienbreite über transversale Relaxation) und der erreichten Feldhomogenität durch den *shim*. Daher sind auch keine schlüssigen Ergebnisse für die relativen Suszeptibilitäten der untersuchten Proteine zu erwarten (s. Abb. 4.8, S. 66).

Dagegen erscheinen die Betrachtungen der Linienbreiten in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (abgesehen von Lysozym) in einem nahezu konstanten und von der Molekülgröße unabhängigen Bereich zu liegen (im Mittel 0,0213 Hz/mg/ml, siehe Tabelle 4.2, S. 66). Die Korrelationen von Molekülmasse und Linienbreite liegen zwischen  $r = 0,4809$  und  $r = 0,7205$  (ohne Lysozym) und sind nicht signifikant ( $p = 0,73$  bzw.  $p = 0,42$  ohne Lysozym). Daraus kann eine konstante Volumensuszeptibilität geschlossen werden, die wegen des prinzipiell ähnlichen Aufbaus der Proteine aus Aminosäuren möglich, aber nicht zwingend erforderlich ist.

### 5.2.4 Diffusion und Viskosität

Bezugnehmend auf die temperaturabhängigen Resonanzfrequenzänderungen lässt sich bei der Betrachtung der Diffusion (s. Abb. 4.17, S. 71) eine Zu- und bei der Viskosität (s. Abb. 4.10, S. 68) eine Abnahme bei steigender Temperatur beobachten. Diese Beobachtungen entsprechen den Erwartungen, da die Temperaturerhöhung eine Zunahme der Brownschen Bewegung bewirkt (vgl. Gl. 2.21 und 2.22, S. 21). Dies lässt sich auch mit der Variation der freien Weglängen begründen (vgl. Gl. 2.23, S.22), die bei abnehmender Dichte zunehmen.

Die nichtlineare Zunahme der Viskosität in Abhängigkeit von der BSA-Konzentration (vgl. Abb.4.9, S. 67) spiegelt sich ebenfalls in der Viskositätszunahme über der Ammoniumsulfatkonzentration wieder (s. Abb. 4.11, S. 68). Qualitativ kommt es hierbei zu einer exponentiell approximierbaren Zunahme der Viskosität mit zunehmender Makromolekülkonzentration (vgl. exponentielles Modell Gl. 2.37, S. 28).

## 5.2 FREQUENZVARIATION DES WASSERSIGNALS

Der in Abb. 4.13 (S. 69) sichtbare Sattelpunkt lässt sich als Bereich interpretieren, in dem die Proteinkonformation stabil bleibt (vgl. weiter unten).

Als Gründe für die geringe Variation der Diffusionskoeffizienten zwischen den verschiedenen Gewebeextraktproben (s. Abb. 4.19, S. 72) sind trotz der starken Variation der Proteinkonzentration zwischen 1,7 mg/ml und 15,6 mg/ml folgende Möglichkeiten zu nennen:

- suboptimale Parameter bei der Diffusionsmessung  
Teilweise mussten viele der zur Berechnung des Diffusionskoeffizienten ermittelten Werte verworfen werden, da keine Übereinstimmung mit dem zu erwartenden Kurvenverlauf nach Gl. 3.4 vorlag (vgl. auch Darstellung des Einflusses der Parameterwahl in Abb. 4.15, S. 70).
- hochkonzentriertes Makromolekülgemisch  
Emulsionen schlagen sich im Laufe der Zeit nieder und haben möglicherweise zum Zeitpunkt der Diffusionsmessung (zumeist letzte Messung nach >30 min Messzeit) ähnliche Sättigungsgehalte von Proteinkonzentrationen; das Vorliegen unterschiedlicher Größenordnungen von Molekülen mit insgesamt ähnlichem Massenprofil (vgl. Abb. 4.54, S. 99) in den Gewebeextrakten kann ebenfalls das wenig abweichende Diffusionsverhalten erklären.
- Wasserdiffusion und Proteinrotation vergleichbar  
Wie Koenig *et al.* zeigen, haben die genannten Größen auch in Umgebungen mit hoher Makromoleküldichte (wie sie in Zellen anzutreffen ist) nahezu die gleichen Werte, wie in verdünnten Lösungen [94]. Dies ist insbesondere der hohen Protonenmobilität im Wasser zuzuschreiben.

Gerade die letztgenannte Ursache lässt sich nicht einmal mit intaktem Gewebe, das fixiert wurde, beheben. Denn die Fixation führt zu erhöhter extrazellulärer und transmembraner Diffusion und der Restriktionsgrößen, sowie zur Reduktion der Relaxationszeiten aufgrund weniger freier Aminogruppen und einer Reorganisation der Membranstruktur [66].

Im Zusammenhang mit variierter Relaxation steht die Zunahme der Linienbreite mit erhöhter Proteinkonzentration. Dies ist auch direkte Folge des Austausches (vgl. Gl. 2.36 und Abschnitt 2.6.3).

### 5.2.5 OH-Bindungsstellen

Werden einer wässrigen Lösung Polymere hinzugefügt, nimmt die Viskosität zu, d. h. die Diffusion nimmt ab (s. Abb. 4.20, S. 72). Dies hängt insbesondere mit der starken Hydratation der Polymerstrukturen zusammen, die ca. 100 mal stärker ist als bei globulären Makromolekülen [95]. Somit sind Änderungen des Diffusions- und Austauschverhaltens zwischen Wasser und Makromolekülen zu erwarten.

Abbildung 4.23 (S. 74) bildet die Frequenzvariation von Lösungen mit BSA und unterschiedlichen Dextrankonzentrationen ab. Dabei zeigt sich keine Abhängigkeit von der Dextrankonzentration im untersuchten Bereich (bis 100 mM). Die Abhängigkeit der Wasserfrequenzverschiebung von der BSA-Konzentration ist hingegen deutlich zu verzeichnen (s. Abb. 4.24, S. 75) und genügt hierbei in guter Näherung dem von Zhong *et al.* vorgeschlagenen Austauschmodell [74] aus Gleichung 2.37 – nahezu unbeeinflusst von der Dextrankonzentration.

Dahingegen nimmt die Linienbreite des NMR-Wassersignals linear mit der Dextrankonzentration zu (s. Abb. 4.25, S. 75) und ist dabei unabhängig von der BSA-Konzentration. Daraus lässt sich eine separate Wechselwirkung der polymeren Dextranmoleküle mit Wasser schließen. Dextran tendiert aufgrund der Kettenlänge zur Vernetzung, was zur Restriktion der Bewegung der Makromoleküle, aber auch von Wasser führt. Die primäre Wechselwirkung mit Wasser findet durch chemischen Austausch an den Hydroxyl-(OH)-Gruppen der Polymerketten statt. Dadurch wird das Relaxationsverhalten beeinflusst, was sich in der Zunahme der Linienbreite widerspiegelt. Dies liefert einen Hinweis darauf, dass nicht dieser Austausch den Beitrag zum Phasenkontrast liefert, sondern der Diffusionsaustausch (in Kombination mit chemischem Austausch), wie von Hills *et al.* vorgeschlagen [96].

Dies wird auch durch das Verhalten der Austauschstärke  $k_a$  (s. Abb. 4.21, S. 73) bei zunehmender Saccharosekonzentration veranschaulicht: der Gleichung 2.38 folgend ist der translatorische Diffusionsanteil  $D_t$  (proportional zu  $1/M$  in Gl. 4.1) bei geringen Konzentrationen noch größer als der rotatorische Diffusionsanteil  $D_r$ , der sich als konstant betrachten lässt, weil die Polymerstrukturen (wie oben beschrieben) zur Verkettung neigen. Bei zunehmender Saccharosekonzentration nimmt die Restriktion der translatorischen Diffusion zu, womit die rotatorische Diffusion dominiert. Der Austausch von Wasser mit Makromolekülen scheint damit hauptsächlich an die translatorische Diffusion gebunden zu sein, da der Austauschterm diesem am stärksten folgt. Dies ist auch plausibel, da über die translatorische Bewegung am

schnellsten eine neue physikochemische Umgebung erreicht wird.

Verallgemeinert lässt sich somit Protonenaustausch als der treibende Prozess für die Phasenkontraständerung ansehen.

### 5.2.6 Konformationsänderungen

Die relativ breite Variation der  $^1\text{H}$ -Verschiebungen einzelner Resonanzen von Aminosäuren im Bereich von bis zu mehreren ppm ist typisches Merkmal der starken Konformationsvariation von Proteinen [97] (vgl. Abschnitt 2.4.1, S. 15 ff.). Bei der gezielten Beeinflussung der Proteinkonformation (und weiterer bindungsspezifischer Parameter, wie pH-Wert und Ionenstärke) durch die Zugabe von Ammoniumsulfat zu BSA-Lösungen lässt sich eine Zunahme der chemischen Verschiebung des Wassersignals nachweisen (vgl. Abschnitt 4.2.6, S. 76 ff.). Dabei können jedoch keine quantitativen Aussagen über den Konformationszustand der Proteine gemacht werden<sup>3</sup>. Aufgrund der Kurvenform in Abb. 4.13 (S. 69) ist jedoch von einem erfolgten Übergang des Proteins in eine andere Konformation auszugehen.

Quantitativ ist wiederum auf die Diffusionsbeeinflussung der Strukturänderung hinzuweisen, da aggregierte Proteine geringere rotatorische und translatorische Diffusion und erhöhte Restriktion für Wassermoleküle vorweisen und somit die Mittelung der Austauscheffekte ebenfalls reduziert ist [98]. Daher sind höhere Wasserfrequenzverschiebungen auf stärkere Aggregation zurückzuführen. Die ermittelte pH-Wert-Abhängigkeit der Wasserresonanzfrequenz (s. Abb. 4.31, S. 79) entspricht sehr gut den Beobachtungen einer anderen Studie [99]. Aussagen über das Verhalten mit Protein sind somit differenziert zu betrachten. Abweichend zur Messung mit reinem Wasser ist eine Zunahme der Resonanzfrequenz mit BSA über einem weiten Frequenzbereich zu verzeichnen ( $\text{pH} \leq 6$ ). Bei höheren bzw. niedrigeren pH-Werten ist von einer Denaturierung der Proteine auszugehen, was Entfaltung und Verkettung (Aggregation) zur Folge hat, wodurch die rotatorische und translatorische Diffusion und damit der Einfluss auf Wassermoleküle abnimmt. Dies kann das Absinken der relativen Wasserfrequenzverschiebung auf nahezu Null erklären. Der beobachtete pH-Wert-Bereich liegt in Übereinstimmung mit dem von Peters berichteten Bereich normaler Konformation für  $4,3 \leq \text{pH} \leq 8$  [40].

---

<sup>3</sup>Dies würde beispielsweise 2- und 3-dimensionale NMR-Spektroskopie erfordern, was über den Rahmen dieses Projekts hinausgegangen wäre, da das verwendete Protein sehr komplex ist.

### 5.2.7 Proteingröße und -konzentration

Eine theoretische Betrachtung des Prozesses der Faltung und Entfaltung von Proteinen bzw. Mischungen von Proteinen wurde von Zhou durchgeführt [100]. Darin wird die freie Energie zur Proteinfaltung in Abhängigkeit von der Proteingröße betrachtet. Dabei erscheinen die theoretischen Beschreibungen qualitativ ähnlich zu den hier durchgeführten experimentellen Beobachtungen mit unterschiedlichen Proteingrößen (vgl. Abb. 5.1) bzw. Konzentrationen von Proteingemischen (vgl. Abb. 5.2).

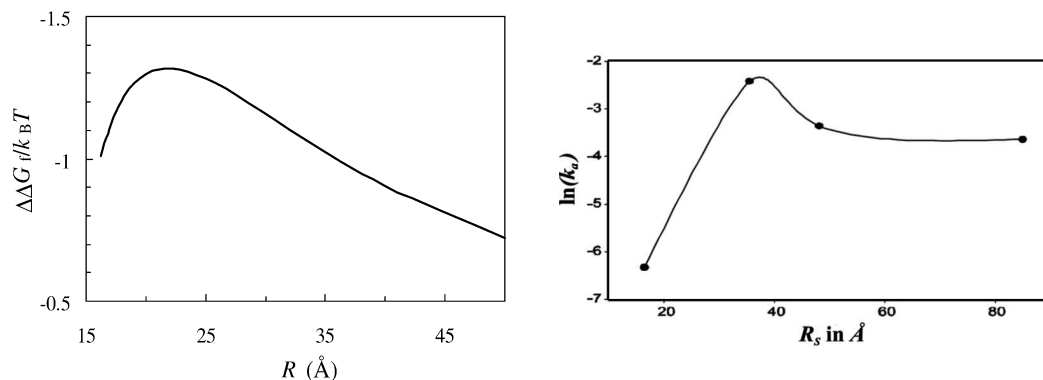


Abbildung 5.1: Vergleich zwischen freier Energie (links, Bildrechte bei [100]) und Wechselwirkungskoeffizient  $k_a$  (rechts [74]) als Funktion des Molekülradius  $R_S$ . Links: Maximum der freien Energie bei  $R_S = 22,5 \text{ \AA}$  (Konzentration der Moleküle: 150 g/l). Rechts: Bei kleinen Molekülen ( $R_S < 20 \text{ \AA}$ ) ist die Wechselwirkung deutlich geringer als bei großen. Für Radien  $R_S > 40 \text{ \AA}$  nimmt die Wechselwirkung langsam wieder ab, nachdem sie bei  $R_S \approx 38 \text{ \AA}$  (vgl. BSA: 67 kDa  $\equiv 35,5 \text{ \AA}$ ) ein Maximum erreicht hat.

Proteingröße und -konzentration sind demnach bestimmend für die Dynamik eines Wechselwirkungssystems. Demzufolge ist anzunehmen, dass auch die Wechselwirkung zwischen Wasser und Makromolekülen ähnlichen Gesetzmäßigkeiten unterliegen ist. Dies ist vor allem daher naheliegend, weil in der Berechnung von Zhou die Übergänge zwischen gefalteten und entfalteten Proteinen betrachtet werden, d. h. zwischen globulären und polymerähnlichen Formen. Die maximale freie Energie entspricht dabei dem stabilsten Zustand globulärer Proteine. Unter der Annahme, dass die globuläre Form auch maximale Frequenzunterschiede generiert (vgl. Abschnitt 5.2.5), sind somit im Phasenkontrast die stabilen Proteine am besten abgebildet, wohingegen bei Proteindenaturierung und für deren Stabilität ungünstigen

## 5.2 FREQUENZVARIATION DES WASSERSIGNALS

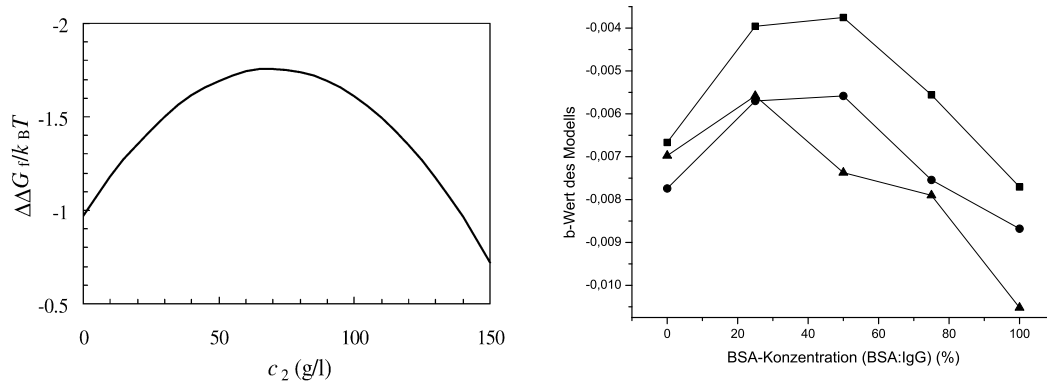


Abbildung 5.2: Vergleich zwischen freier Energie (links [100]) und Modellparameter  $b$  (rechts) für variables Proteinverhältnis.

Gemischen der Kontrast reduziert sein kann.

Betrachten wir der Einfachheit halber wieder Lösungen von Proteinen einer Größe. Wie bereits oben beschrieben, zeigt die Volumenssuszeptibilität der Proteine ein lineares Verhalten – zumindest hinsichtlich der Linienbreite in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (s. Abschnitt 5.2.3, S. 110). Linearität zeigt sich insbesondere in der Abhängigkeit der Wasserfrequenzverschiebung und der inversen Relaxationszeit  $1/T_2$  von der Proteinkonzentration, weniger jedoch bei  $1/T_1$ . Für  $1/T_2$  ist dies insbesondere auf die Austauschwechselwirkung der Wassermoleküle mit Makromolekülen zurückzuführen, wie von diversen Studien bereits belegt [54, 60]. Dies wird insbesondere mit der Sensibilität des Wassers bezüglich der rotatorischen Diffusion der Makromoleküle begründet.

Für die Wasser-Makromolekül-Wechselwirkung im Falle geringer Konzentrationen wurde ebenfalls eine lineare Abhängigkeit vorhergesagt (s. Gl. 2.42). Dies konnte hier an verschiedenen Proteinen nachgewiesen werden (s. Abb. 4.32, S. 80). Für die Abhängigkeit der Frequenzverschiebung von der Konzentration ist entgegen der obenstehenden nichtlinearen Funktionalität eine lineare Darstellung am passendsten (s. Abb. 4.33) mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,9630$  ( $p < 0,0003$ ). Möglicherweise wird der Austauscheffekt durch die linear von der Proteinkonzentration abhängende Volumenssuszeptibilität überlagert (vgl. Abschnitt 5.5, S. 124).

## 5.3 Einfluss der Wahl der NMR-Referenz

### 5.3.1 Vorbemerkungen

Im Zuge der quantifizierbaren Erfassung des Austauscheffektes und der Suszeptibilität wurden separat TMSP und Dioxan als interne NMR-Referenzsubstanzen verwendet.

Die Studie von Luo *et al.* [91] mit Dioxan als interner NMR-Referenz ergab einen Austauscheffekt von 0,011 ppm/mM und einen doppelt so großen Suszeptibilitätseffekt von -0,022 ppm/mM, jedoch mit negativem Vorzeichen [91].

Meine Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der Wasser-Makromolekül-Austausch unter Ausschluss der Interaktion mit der internen NMR-Referenz ermittelt werden kann. Der von mir gemessene Wert von 0,025 ppm/mM bei 298 K mit TMSP als interne NMR-Referenz (bei Konzentrationen von TMSP über 25 mM) weicht von den vorgenannten Ergebnissen von Luo *et al.* [91] ab. Die Differenz der Austauschwerte von dieser und meiner Studie ist mit der Einbeziehung der Interaktion zwischen Dioxan und Wasser begründbar. Dies wurde bei Luo *et al.* [91] nicht berücksichtigt und kann somit zu einer Unterschätzung des Austauschwertes führen.

### 5.3.2 Dioxan

In Anwesenheit von Dioxan ist der gemessene Austauschterm unabhängig von der Dioxankonzentration (bis 50 mM) konstant und mit 0,009 ppm/mM nicht einmal halb so groß, wie der Wert mit TMSP-Konzentrationen über 25 mM (s. Abb. 4.40, S. 85). Bei 50 mM Dioxan entspricht dies einem Volumenanteil von etwa 0,85%. Der Austauschterm bei anderen Studien mit 1,5% und 1% Dioxan entsprach lediglich einem Drittel [35] bzw. der Hälfte [91] des Suszeptibilitätsterms. Auch in diesen Studien wurde der reduzierte Austauschterm mit der konkurrierenden Wechselwirkung zwischen Wasser und Dioxan begründet [78]. Diese Wechselwirkung konnte gut mit der Messung der Resonanzfrequenzen in Abwesenheit von Proteinen nachgewiesen werden (s. Abb. 4.44, S. 89), wohingegen für TMSP eine vergleichsweise schwache Wechselwirkung mit Wasser (eine Größenordnung schwächer) mit sehr geringer und nicht signifikanter Korrelation ( $R^2=0,01$ ,  $p = 0,998$ ) festgestellt wurde. Dies ist auch mit dem Austauschmodell unter Berücksichtigung der kompetitiven Bindungssituation in Gl. 2.43 der Fall. Danach ist eine Reduzierung des

Austauschterm für hohe Dioxankonzentrationen zu erwarten. Für die verwendeten Konzentrationen bis 50 mM ist jedoch keine Abhängigkeit des Austauschterms von der Dioxankonzentration zu verzeichnen (s. Abb. 4.38 und 4.40). Demzufolge ist der Austauschterm bei geringen Dioxankonzentrationen – wie in Abschnitt 2.8 (S. 31) beschrieben – hauptsächlich von der Makromolekülkonzentration und den chemischen Verschiebungsdifferenzen der Bindungszustände Wasser—Makromolekül und Wasser—Dioxan abhängig.

Daher kann Dioxan aufgrund der geringen Konzentrationsabhängigkeit bezüglich des Austauschterms als verlässlicher angesehen werden als TMSP (s. nachfolgend).

#### 5.3.3 TMSP

TMSP als NMR-Referenz hingegen erscheint zunächst verlässlicher, den *Betrag* des Austauschterms betreffend, insofern kaum Interaktion von TMSP mit Wasser nachzuweisen ist und bei höheren Konzentrationen (auf den ersten Blick) eine Sättigung des Austauschterms zu verzeichnen ist (s. Abb. 4.40, S. 85). Die genauere Betrachtung im Zusammenhang mit den temperaturabhängigen Verschiebungsanstiegen (s. Abb. 4.42, S. 87) zeigt jedoch einen Knick bei einer mittleren TMSP-Konzentration von 14,1 mM (im Bereich von 13,6 und 14,6 mM). Da die Werte jeweils auf 1 mM TMSP normiert sind, lässt sich dieser Zahlenwert von 14,1 mM auch unabhängig von der Einheit betrachten und stimmt sehr gut mit den ermittelten Bindungsstellen für TMSP an BSA überein, die im Mittel bei 11,7 liegen (alle signifikant; im Bereich von 8,8 bis 14,7; vgl. Tab. 4.3, S. 88). Literaturwerte liegen meist bei neun hydrophoben Bindungsstellen [101]. Die damit zusammenhängende Interaktion von TMSP und BSA wurde bei Luo *et al.* anhand von Linienbreitenvariation nachgewiesen [91]. Zur qualitativen Darstellung dieses Austausches genügt ein Michaelis-Menten-Modell (s. Abb. 4.40). Die quantitativ ermittelten Gleichgewichtskonstanten  $K_d$  (s. Tab. 4.3) sind bei höheren BSA-Konzentrationen geringer, was auf die zunehmende Sättigung der Bindungsstellen zurückzuführen ist. Die Anzahl von Bindungsstellen an der Oberfläche für hydrophobe Substanzen sind in der Regel bei Proteinen sehr gering, was auf den Prozess der Proteinsynthese zurückzuführen ist. Dennoch kommen hydrophobe Bindungsstellen in Kavitäten vor und sind so für hydrophobe Substanzen erreichbar.

Die zum oben beschriebenen Knick analoge konkave Darstellung von temperaturabhängigen Verschiebungen über Proteinkonzentrationen (s. Abb. 4.2, S. 59) wurde



## KAPITEL 5 DISKUSSION

bereits in Abschnitt 5.2.1 beschrieben. Nach dieser eingehenden Analyse der Daten können wesentlich höhere TMSP-Konzentrationen im Sättigungsbereich der Bindungsstellen zwischen TMSP und Proteinen demzufolge nicht die Verlässlichkeit der gewonnenen Daten steigern, wie zuvor in der eigenen Publikation [20] dargestellt.

Eine Abhängigkeit von TMSP ließe sich demzufolge nur bedingt reduzieren, zumal die Anstiege entlang der dargestellten Datenpunkte für temperatur- und austauschabhängige Frequenzverschiebungen im oberen Bereich (25-100 mM TMSP) nahezu dreimal so groß sind, wie im niedrigen Bereich (1-10 mM TMSP), jedoch mit negativem Vorzeichen. Möglicherweise verursacht die Zugabe von TMSP Konformationsänderungen am Protein, die bei der Bindung von hydrophoben Liganden sehr typisch sind.

Der mit TMSP ermittelte Austauschterm mit 0,025 ppm/mM bei 298 K ist etwa doppelt so groß, wie der mit Dioxan ermittelte Wert. Da TMSP jedoch eine deutlich geringere Interaktion mit Wasser zeigt, ist anzunehmen, dass dieser Wert im Sättigungsbereich von TMSP am ehesten dem Wert des Wasser-Makromolekül-Austausches entspricht.

### 5.3.4 DSS

Wie bereits im zugehörigen Abschnitt 4.3.5 erwähnt, wurden aufgrund der bekannten Wechselwirkungen mit Proteinen keine weiteren Auswertungen der – verglichen mit TMSP – weniger umfangreichen Messung durchgeführt. Gegenüber DSS ist zudem TMSP ein wesentlich verbreiteterer NMR-Standard.

### 5.3.5 Chloroform (extern)

Die mit Chloroform als externer Referenzsubstanz ermittelte Verschiebung der Resonanzfrequenzen ergibt sich zu -0,013 ppm/mM bei 298 K, was zunächst mit dem bei Luo *et al.* berichteten Wert für die Suszeptibilität nahezu übereinstimmt (s. o.), wenn man einen Messfehler von 0,003 ppm annimmt. Wichtige Voraussetzung für diese Annahme ist jedoch, dass die Vernachlässigung einer gegenseitigen Beeinflussung der Suszeptibilitäten zwischen untersuchter Proteinlösung und der NMR-Referenz ausgeschlossen ist und der Wasser-Makromolekül-Austausch bei dieser Messung keine Rolle spielen würde. Insbesondere die letztere Annahme ist jedoch

nicht haltbar, weshalb nicht anzunehmen ist, dass es sich bei dem ermittelten Wert lediglich um die Suszeptibilität handelt, sondern ebenfalls ein kombinierter Effekt von Austausch und Suszeptibilität zum Tragen kommt. Was die Beeinflussung der Suszeptibilität selbst angeht, findet sich im Abschnitt 5.5 eine eingehendere und abschließende Diskussion.

## 5.4 Gewebeextrakte im Hinblick auf Wasserfrequenzverschiebung

### 5.4.1 Allgemeine Bemerkungen

Berichtete Frequenzdifferenzen von etwa 0,02 ppm in Phasenbildern [85] sind sehr gut vergleichbar mit den Messwerten in der vorliegenden Studie mit Gewebeextrakten (s. Tab. 5.1), womit die Vergleichbarkeit mit *in vivo* Messungen gegeben ist.

Eine herausgehobene Stellung von Myelin [102] bezüglich des Eisengehaltes und der resultierenden chemischen Verschiebung in Abhängigkeit von Protein- und Eisengehalt – im Vergleich zu *in vivo* Messungen<sup>4</sup> – konnte nicht festgestellt werden. Dies ist vor allem der nicht mehr erhaltenen Schichtstruktur von Myelin zuzuschreiben, da eine Angleichung aller Gewebeextrakte im Hinblick auf die geometrische Struktur dem Gewinnungsverfahren der Proben geschuldet ist. Auch in der Massenverteilung zeigen sich nur geringe Unterschiede (s. Abb. 4.54, S. 99).

Wie in Abbildung 4.6 dargestellt, gab es abweichende Messergebnisse der Wasserfrequenz im Lösungsmittel für die ersten Messungen an Gewebeextrakten aus dem Cortex. Eine mit den anderen Daten konsistente Darstellung (vgl. Abschnitt 5.2.2) führt somit zu negativen relativen Frequenzverschiebungen, wohingegen die relativen Frequenzverschiebungen der Gewebeextrakte vom Kleinhirn positiv sind. Einerseits zeigt dies Probleme in der Datenauswertung mit Bezug auf eine NMR-Referenzsubstanz (siehe voriger Abschnitt). Zum anderen fallen Unterschiede in der Größenordnung der mittleren Protein-Konzentrationen der vorliegenden Gewebeextrakte auf (s. Tab. 5.1). Wie bei den Messungen von Austausch und Suszeptibilität (s. Abschnitt 4.5) festgestellt wurde, sind besonders im Bereich geringer Protein-Konzentrationen beide Anteile gering - die resultierende Summe ist also erst bei

<sup>4</sup>Hierbei ist weiße Substanz aufgrund des hohen Myelingehtes gut von grauer Substanz mit geringem Myelin-Anteil zu unterscheiden, d. h. es ist ein hoher Kontrast zwischen beiden zu sehen.

höheren Konzentrationen auch deutlich von Null verschieden.

Tabelle 5.1: Vergleichswerte für die Gewebeextrakte.  $\overline{Fe}$  = mittlere Eisenkonzentration,  $\overline{P}$  = mittlere Proteinkonzentration,  $|\overline{\Delta f^{rel}}|$  = mittlere relative Wasserfrequenzabweichung (absolut),  $|\Delta f_{max}^{rel}|$  = maximale relative Wasserfrequenzabweichung (absolut), o. M. = ohne Membranen.

Gewebe aus ...	$\overline{Fe}$ [ppm]	$\overline{P}$ [mg/ml]	$ \overline{\Delta f^{rel}} $ [ppm]	$ \Delta f_{max}^{rel} $ [ppm]
Cortex	4,1	26,5	0,031	0,051
Cortex (o. M.)	3,6	2,6	0,009	0,015
Kleinhirn	1,4	6,8	0,009	0,022

### 5.4.2 Wasserfrequenz, Eisen- und Proteingehalt

Die generell schwachen und nicht signifikanten<sup>5</sup> Korrelationen  $r$  zwischen Eisen- und Proteinkonzentration lassen darauf schließen, dass in den gewählten Gewebeextrakten keine hervorgehobenen Eisenspeicher vorzufinden sind. Andererseits sind vermehrte Eisenablagerungen altersabhängig [103], weshalb bei wenige Wochen alten Ratten keine signifikante Eisenablagerung vorzufinden ist. Demgegenüber sind die vorzufindenden Korrelationen  $r$  zwischen Wasserfrequenzverschiebung und Protein- (0,47-0,56) bzw. Eisenkonzentration (0,43-0,64) für Cortex- und Kleinhirngewebeextrakte ähnlich schwach und nicht signifikant ( $p > 0,15$ ). Dabei sind die Korrelationen  $r$  zur Wasserfrequenzverschiebung für die Gewebeextrakte *ohne* Membranen generell negativ und für Eisen sogar bei einem Wert von  $r = -0,9$  und damit sogar signifikant ( $p = 0,01$ ). Daraus kann geschlossen werden, dass Membranlipide am Phasenkontrast doch einen Anteil haben und der Eisengehalt insbesondere in Proteinen und nicht in den Membranen vorzufinden ist.

Gleichzeitig weisen die Gegenüberstellungen der Eisen- und Proteinabhängigkeit

<sup>5</sup>Werte  $r$  zwischen 0,29 und 0,55 mit entsprechendem  $p$  zwischen 0,36 und 0,94 (vgl. Tab. 4.5, S. 95).

in Abb. 4.48, 4.49 und 4.50 (S. 94 ff.) sehr ähnliche Konfigurationen auf, wobei größere Abweichungen in folgenden Gewebeextrakten zu finden sind:

- P2, Myelin, synaptische Verbindungen (Cortex),
- Synaptische Verbindungen, Mitochondrien, Myelin (Cortex ohne Membranen),
- Myelin, Mitochondrien, Synaptosom (Kleinhirn).

Lediglich dahingehend ist Myelin besonders auffällig, aber auch synaptische Verbindungen sind ähnlich herausgestellt.

Festzustellen sind größere Variationen des Eisengehaltes im Falle der Cortexgewebeextrakte (1,6-6,3 ppm) bei relativ geringer Schwankung der Proteinkonzentration (20,4-30,0 g/l). Bei den Gewebeextrakten ohne Membranen bzw. aus Kleinhirn sind diese Unterschiede hingegen deutlich geringer.

Generell ist festzuhalten, dass der Protein- und Eisengehalt eine Frequenzvariation hervorruft, aber weder in Kombination noch alleinig für den resultierenden Phasenkontrast ursächlich sein kann. Auch die Darstellung der Wasserfrequenz über der Temperatur (s. Abb. 4.52, S. 97) zeigt eine uneindeutige Tendenz, welche auf die konkurrierenden Anteile zurückzuführen ist. Besonders ins Gewicht fällt hier allerdings die reduzierte Proteinkonzentration der Gewebeextrakte ohne Membranen, was sich in deutlich verringerter Abweichung von der ungestörten Resonanzfrequenz des Wassers bemerkbar macht.

Dennoch lässt sich der Protein- und Eisenkonzentration ein gleichwertiger Anteil am Phasenkontrast zuschreiben. Der für Eisen angenommene lineare Anteil (entsprechend der Suszeptibilität, s. Abb. 4.53) wird hierbei durch den Austauscheffekt überlagert (vgl. Abschnitt 5.5 bzw. bei Oros-Peusquens *et al.* [104]).

Die ermittelten Suszeptibilitätswerte (s. Abb. 4.53, S. 98) liegen für die meisten Gewebeextrakte im Bereich der Suszeptibilität von Wasser ( $-0,72 \text{ ppm cm}^3 \text{ g}^{-1}$ , [63]). Lediglich die Werte für Myelin und Mikrosomen sind mit  $-0,96 \text{ ppm}$  und  $-1,15 \text{ ppm}$  wesentlich geringer. Zudem müsste mit zunehmender Eisenkonzentration die Suszeptibilität in den positiven Bereich übergehen. Die Korrelation zeigt aber einen gegenteiligen Trend. Dazu trägt vor allem die Komposition des Gewebes aus paramagnetischem Material bei, die auch bei höheren Konzentrationen von Eisen in der Lage ist, den entgegengesetzten ferromagnetischen Effekt des Eisens zu kompensieren [105].

### 5.4.3 Relaxations- und Diffusionskonstanten

Die näherungsweise linear<sup>6</sup> (vgl. Tabelle 4.6) mit der Proteinkonzentration zunehmenden inversen Relaxationszeiten  $1/T_1$  (s. Abb. 4.55, S. 100) und  $1/T_2$  (s. Abb. 4.56) sind konform mit den oben gezeigten Ergebnissen für einzelne Proteine. Wie zuvor zeigt sich für die Diffusionskonstante keine eindeutige Tendenz ( $p > 0,28$ ). Dabei verweise ich hier auf die vorangegangene ausführliche Diskussion dazu (s. Abschnitt 5.2.4).

Die Ergebnisse stimmen mit Daten überein, in denen die Relaxationszeitkonstanten von Nervenfasern mit und ohne Myelin verglichen wurden: dort zeigten sich höhere Zeitkonstanten für diejenigen Nerven *ohne* Myelin [106].

### 5.4.4 Parameterstatistik

Zunächst spiegeln sich die vorgenannten Beziehungen in den höchsten Korrelationen wieder (s. Tab. 4.7, S. 103). Des Weiteren verdichten die Hauptkomponentenanalysen die beobachteten und zu erwartenden Abhängigkeiten. So zeigt sich beispielsweise bei der zweiten Analyse bei Cortexgewebeextrakten (PCA2) ein Kontrast zwischen Frequenzvariation und Eisen- bzw. Proteinkonzentration (erkennbar an entgegengesetzten Vorzeichen). Dies ist ebenfalls der Fall bei PCA1 für die aufbereiteten Extrakte ohne Membranen. Des Weiteren zeigt PCA2 bei Kleinhirngewebeextrakten einen Kontrast zwischen Eisen- bzw. Proteinkonzentration und Frequenzvariation, Relaxationszeiten und Diffusionskonstante sowie Suszeptibilität. Alle übrigen ableitbaren Kontraste sind nicht kausal begründbar und daher nicht aussagekräftig.

---

<sup>6</sup>Insbesondere unter Vernachlässigung des Wertes für PBS: für  $T_1$  verringert sich der  $p$ -Wert von 0,29 auf 0,001.

## 5.5 Austausch und Suszeptibilität bei Proteinen und im Gewebe

Im Zusammenhang mit den Problematiken bei der Verwendung von NMR-Referenzsubstanzen (s. Abschnitt 5.3) steht vor allem die Frage nach der getrennten Ermittlung von Suszeptibilitäts- und Austauschtermen.

Mit der in Abschnitt 3.10 beschriebenen Methode konnte dieses Anliegen erfüllt werden. Dennoch verbleibt ein unübersehbarer Einfluss der NMR-Referenzsubstanzen (vgl. Gl. 3.21 und 3.22, S. 56). Damit lassen die vorliegenden Differenzen jedoch konkret auf die variierenden Resonanzfrequenzen der Referenzsubstanzen schließen und sind quantifizierbar.

Die Überlagerung beider Effekte zeigt eine reduzierte Frequenzverschiebung. Betrachtet man die relativ berechneten Werte (s. Tab. 4.8 und 4.9, S. 106), so ist die Suszeptibilität (außer im Falle der Synaptosomen) absolut betrachtet immer stärker als der Austauschterm. Demgegenüber ist nach der absoluten Berechnungsvariante das absolute Verhältnis  $|\Xi/\chi|$  der Austausch- und Suszeptibilitätsterme nur noch im Falle von BSA etwas größer als 1, sonst sind also die Austauschterme dominierend.

## 5.6 Kritik und Verbesserungsvorschläge

Insbesondere in der Verfahrensweise gibt es Alternativen, die ich hier kurz benennen und diskutieren möchte. Zunächst ist die Messung der Suszeptibilität nach *Chu et al.* [107] mit orthogonal und parallel zum Magnetfeld ausgerichteten Kapillaren möglich. Dies wurde auch ansatzweise versucht: am 300 MHz NMR-Spektrometer mit Micro 2.5 Probenkopf und 50 mm Resonatordurchmesser wurden gekürzte NMR-Röhrchen verwendet, um die Orientierung auch senkrecht zum Magnetfeld zu realisieren. Dies wurde jedoch nicht weiter verfolgt, da das Signal-Rausch-Verhältnis zu gering war. Des Weiteren wurde eine in der Arbeitsgruppe angefertigte Spule verwendet, um am 7 T-Ganzkörper-Human-MRT NMR-Röhrchen bei verschiedenen Winkeln zum Magnetfeld zu untersuchen, was aus ähnlichen Gründen wie oben fallen gelassen wurde.

Eine weitere Methode wäre die Messung mit sogenanntem *magic angle spinning*, bei der die Proben im Winkel von etwa  $54,7^\circ$  gegen das Magnetfeld gekippt bei hoher Drehzahl rotiert werden. Dies führt zur Unterdrückung dipolarer Wechsel-

wirkungen und richtungsabhängiger (anisotroper) Anteile, wie beispielsweise der Suszeptibilität.

Aufgrund der hohen Relaxationszeitkonstante des Wassers im Sekundenbereich ist die gewählte Wartezeit von 10 s vor der neuerlichen Anregung mit einem RF-Puls in Frage zu stellen. Dies könnte auch die beobachteten Linienbreiten des Wasser-signals erklären. Des Weiteren wurde nicht beachtet, dass die Relaxationszeiten vom Protonierungsgrad abhängen [73], jedoch zwischen 10% und 100% Deuterium verwendet wurde. Dies führt auch zu Änderungen der Wasser-Makromolekül-Wechselwirkung aufgrund von austauschbaren Protonen an der Oberfläche von Molekülen.

Eine weitere Ungenauigkeit in der Betrachtung ist die Vereinfachung auf isotrope chemische Wechselwirkung. Bei Erweiterung auf den sog. *chemical shift tensor* [108] ist jedoch auch der Wasser-Makromolekül-Effekt als anisotrop zu betrachten.

### 5.7 Ausblick

Wie im vorigen Abschnitt erwähnt, ist auch die Anisotropie der chemischen Wechselwirkung und der magnetischen Suszeptibilität in künftige Betrachtungen mit einzubeziehen.

Eine Verbesserung der Unterscheidungsmöglichkeit der einzelnen Ursachen, die den Phasenkontrast generieren (Suszeptibilität bzw. Austausch), erscheint unerlässlich. Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden haben ihre Grenzen, wie oben ausführlich dargestellt. Verschiedene Ansätze hierbei könnten inerte NMR-Referenzen bezüglich der physikochemischen Wechselwirkung sein. Eine Möglichkeit sind gasförmige NMR-Referenzsubstanzen, die in der praktischen Anwendung weitaus komplizierter sind. Eine andere Variante ist die Verwendung von Deuterium bzw. anderer Kerne mit von  $^1\text{H}$  verschiedenen Resonanzfrequenzen. Jeweils müssen Praktikabilität und mögliche andere Einflüsse geprüft werden.

Eine eingehende Untersuchung von Membranlipiden mit den hier durchgeführten Methoden sollte weitere wichtige Hinweise auf die Zusammenhänge zwischen Phasenkontrast und Makromolekül- bzw. Eisenkonzentration geben. Möglicherweise sind weitere Gewebebestandteile in Betracht zu ziehen, die besonders bei Pathologien eine Rolle spielen.

Insbesondere die Interpretation von *in vivo* Daten kann mit Hilfe des hier geschilderten Verständnisses des Phasenkontrastes konkretere Hinweise auf Pathologien liefern. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass geringere Kontraste eine stärkeren Restriktion und energetisch instabile Proteine belegen. Suszeptibilitätskontraste sollten in diesen Situationen unverändert bleiben, da Suszeptibilitätsunterschiede verschiedener Gewebeextrakte und Makromolekülgrößen als vernachlässigbar nachgewiesen wurden.



# Kapitel 6

## Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung des chemischen Austauschs zwischen freiem Wasser und an Makromoleküle gebundenem Wasser.

In der Magnetresonanztomographie ergeben sich dadurch Frequenzunterschiede der bei der Phasenbildgebung direkt registrierten Resonanzfrequenzen von Protonen – v. a. des Wassers. Der Phasenkontrast ist durch die veränderte physikochemische Umgebung beeinflusst: Wasserstoffbrückenbindungen verändern die Dichte und damit die elektrostatische Konfiguration; ein Austausch von Protonen zwischen verschiedenen chemischen Umgebungen, d. h. variiertes Resonanzfrequenz, wird sichtbar. Physikalische Parameter, wie magnetische Suszeptibilität, sind zudem von der Richtung des statischen Magnetfeldes abhängig.

In Systemen mit definierten Randbedingungen von Proteinlösungen oder Gewebextrakten wurden die Wechselwirkungen der physikochemischen Parameter mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Insbesondere der Einfluss unterschiedlicher NMR-Referenzsubstanzen, die der genauen Bestimmung der Resonanzfrequenzen dienen, wurde eingehend analysiert und die auftretenden Wechselwirkungen beschrieben. So wurden Wechselwirkungen der weit verbreiteten NMR-Referenzsubstanz TMSP mit Proteinen nachgewiesen. Ein Verfahren mit verschiedenen Referenzsubstanzen mit und ohne chemischen Kontakt zur untersuchten Substanz wurde eingesetzt, um die Anteile von magnetischer Suszeptibilität und chemischen Austausch (zwischen Wasser und Makromolekülen) zu quantifizieren. Beide haben die gleiche Größenordnung, sind jedoch entgegengesetzt, sodass der kombinierte Effekt geringer ausfällt.

Der Einfluss der Geometrie des Gewebes auf den Wasser-Makromolekül-Austausch

ist differenziert: translatorische (stärker als rotatorische) Diffusionsanteile wirken sich auf den Wasser-Makromolekül-Austausch und die davon hervorgerufenen Frequenzverschiebungen der MR-Resonanzen aus. Damit lassen sich Rückschlüsse auf Gewebedegenerationen ziehen.

Die mit der Wasser-Makromolekül-Wechselwirkung einhergehende Beeinflussung der Korrelationszeiten hat zusätzlich einen Einfluss auf das Relaxationsverhalten. Dies muss bei der MRT-Bildgebung in verstärktem Maß berücksichtigt werden und kann ebenfalls hinsichtlich der Charakterisierung des Gewebezustandes verwendet werden.

# Literaturverzeichnis

- [1] ABDULJALIL, Amir M.; SCHMALBROCK, Petra; NOVAK, Vera; CHAKERES, Donald W.: Enhanced gray and white matter contrast of phase susceptibility-weighted images in ultra-high-field magnetic resonance imaging. In: *J. Magn. Res. Imaging* 18 (2003), 284–290. doi:10.1002/jmri.10362
- [2] PFEFFERBAUM, Adolf; ADALSTEINSSON, Elfar; ROHLFING, Torsten; SULLIVAN, Edith V.: MRI estimates of brain iron concentration in normal aging: Comparison of field-dependent (FDRI) and phase (SWI) methods. In: *NeuroImage* 47 (2009), 493–500. doi:10.1016/j.neuroimage.2009.05.006
- [3] SAVICKI, J. P.; LANG, G.; IKEDA-SAITO, M.: Magnetic susceptibility of oxy- and carbonmonoxyhemoglobins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (1984), Nr. 17, S. 5417–5419
- [4] YANG, Shan: *Vergleichende Untersuchungen zur Signalkombination in der MRT-Phasenbildgebung mittels SENSE und adaptiver Rekonstruktion*. Magdeburg, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Diss., 01.04.2010
- [5] MARQUES, José P.; MADDAGE, Rajika; MLYNARIK, Vladimir; GRUETTER, Rolf: On the origin of the MR image phase contrast: An in vivo MR microscopy study of the rat brain at 14.1 T. In: *NeuroImage* 46 (2009), S. 345–352
- [6] ZHONG, Kai; LEUPOLD, Jochen; ELVERFELDT, Dominik v.; SPECK, Oliver: The molecular basis for gray and white matter contrast in phase imaging. In: *NeuroImage* 40 (2008), S. 1561–1566
- [7] ZHONG, Kai: *CBBS NeuroNetworks Grant proposal: Linking the Microscopic and Macroscopic World: Systematic Study of Water Macromolecule Exchange as a Basis for Ultra-High Field MR Phase Contrast Imaging*:

- A four-partner-network between the Departments of Biomedical Magnetic Resonance, the Institute for Chemistry, the Dept. Neurology II, Otto-von-Guericke University, the Institute for Neurobiology (IFN). Magdeburg, 2008.*  
– A four-partner-network between the Departments of Biomedical Magnetic Resonance, the Institute for Chemistry, the Dept. Neurology II, Otto-von-Guericke University, the Institute for Neurobiology (IFN)
- [8] BRENSING, Alexander: *NMR-Untersuchungen der Wasser-Makromolekül-Wechselwirkung unter Änderung physikalischer Umgebungsparameter.* Magdeburg, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Diss., 29.01.2009
- [9] BRENSING, Alexander: *Kernspinresonanzuntersuchungen von Eigenschaften der Wasser-Makromolekül-Austausch-Wechselwirkung als Teil der kontrast-generierenden Mechanismen in MR-Phasenbildern.* Magdeburg, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Diss., 10.11.2010
- [10] DUYN, Jeff H.; GELDEREN, Peter v.; LI, Tie-Qiang; ZWART, Jacco A. d.; KORRETSKY, Alan P.; FUKUNAGA, Masaki: High-field MRI of brain cortical substructure based on signal phase. In: *PNAS* 104 (2007), 11796–11801. doi:10.1073/pnas.0610821104
- [11] SHMUELI, K.; LI, T-Q; DODD, Stephen J.; YAO, Bing; FUKUNAGA, M.; DUYN, Jeff H.: The Contribution of Exchange to MRI Phase Contrast in the Human Brain: Organization for Human Brain Mapping 2009 Annual Meeting. In: *NeuroImage* 47 (2009), Nr. Supplement 1, S. S72
- [12] MITCHELL, H. H.; HAMILTON, T. S.; STEGGERDA, F. R. ; BEAN, H. W.: The Chemical Composition of the Adult Human Body and its Bearing on the Biochemistry of Growth. In: *Journal of Biological Chemistry* 158 (1945), Nr. 3, 625–637. <http://www.jbc.org/content/158/3/625.short>
- [13] OGG, Robert J.; LANGSTON, James W.; HAACKE, E. M. ; STEEN, R. G.; TAYLOR, June S.: The correlation between phase shifts in gradient-echo MR images and regional brain iron concentration. In: *Magnetic Resonance Imaging* 17 (1999), Nr. 8, S. 1141–1148
- [14] OH, S.-H; KIM, Y.-B; CHO, Z.-H; LEE, J.: Origin of B0 orientation dependent R2\* (=1/T2\*) in white matter. In: *NeuroImage* 73 (2013), S. 71–79

## LITERATURVERZEICHNIS

- [15] DEISTUNG, Andreas; SCHÄFER, Andreas; SCHWESER, Ferdinand; BIEDERMANN, Uta; TURNER, Robert; REICHENBACH, Jürgen R.: Toward in vivo histology: A comparison of quantitative susceptibility mapping (QSM) with magnitude-, phase-, and R2\*-imaging at ultra-high magnetic field strength. In: *NeuroImage* 65 (2013), S. 299–314
- [16] LI, Wei; WU, Bing; AVRAM, Alexandru V.; LIU, Chunlei: Magnetic susceptibility anisotropy of human brain in vivo and its molecular underpinnings. In: *NeuroImage* 59 (2012), Nr. 3, S. 2088–2097
- [17] BENDER, B.; KLOSE, U.: The in vivo influence of white matter fiber orientation towards B<sub>0</sub> on T2\* in the human brain. In: *NMR in Biomedicine* 23 (2010), Nr. 9, S. 1071–1076
- [18] SMALLA, Karl-Heinz; WYNEKEN, Ursula: 2-Dimensional Gel Electrophoresis-Based Proteomic Analysis of Brain Synapses. In: LI, Ka W. (Hrsg.): *Neuroproteomics* Bd. 57. New York : Springer, 2011. – ISBN 978–1–61779–111–6, S. 95–113
- [19] SMALLA, Karl-Heinz; KLEMMER, Patricia; WYNEKEN, Ursula: Isolation of the Postsynaptic Density: A Specialization of the Subsynaptic Cytoskeleton. In: DERMIETZEL, Rolf (Hrsg.): *The Cytoskeleton* Bd. 79. New York and NY [u.a.] : Humana Press, 2013. – ISBN 9781627032650, S. 265–280
- [20] LEUTRITZ, Tobias; HILFERT, Liane; SMALLA, Karl-Heinz; SPECK, Oliver; ZHONG, Kai: Accurate quantification of water-macromolecule exchange induced frequency shift: Effects of reference substance. In: *Magnetic Resonance in Medicine* 69 (2013), Nr. 1, S. 263–268
- [21] ANGENSTEIN, F.; HILFERT, L.; ZUSCHRATTER, W.; ALTROCK, W. D.; NIESSEN, H. G.; GUNDELFINGER, E. D.: Morphological and Metabolic Changes in the Cortex of Mice Lacking the Functional Presynaptic Active Zone Protein Bassoon: A Combined <sup>1</sup>H-NMR Spectroscopy and Histochemical Study. In: *Cerebral Cortex* 18 (2007), Nr. 4, S. 890–897
- [22] HUNGER, Marcel; BUDINGER, Eike; ZHONG, Kai; ANGENSTEIN, Frank: Visualization of acute focal lesions in rats with experimental autoimmune encephalomyelitis by magnetic nanoparticles, comparing different MRI sequences in-

- cluding phase imaging. In: *Journal of Magnetic Resonance Imaging* (2013), S. n/a
- [23] BLOCH, F.: Nuclear Induction. In: *Phys. Rev.* 70 (1946), Nr. 7-8, 460–474. doi:10.1103/PhysRev.70.460
- [24] FRIEBOLIN, Horst: *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie: Eine Einführung*. 5. Weinheim and Bergstr : Wiley-VCH, 2013. – ISBN 9783527334926
- [25] CHARY, K. V. R.; GOVIL, Girjesh: *NMR in biological systems: From molecules to humans*. Dordrecht : Springer, 2008. – ISBN a9781402066795
- [26] BAKHMUTOV, Vladimir I.: *Practical NMR relaxation for chemists*. Chichester : Wiley, 2004. – ISBN 0470094451
- [27] DAMADIAN, R.: Tumor Detection by Nuclear Magnetic Resonance. In: *Science* 171 (1971), Nr. 3976, S. 1151–1153
- [28] PIETZSCH, Joachim; NOBELPRIZE.ORG (Hrsg.): *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2003 - Perspectives*. [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2003/perspectives.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2003/perspectives.html). Version: 2003
- [29] HAACKE, E. M.: *Magnetic resonance imaging: Physical principles and sequence design*. New York and NY : Wiley-Liss, 1999. – ISBN 0-471-35128-8
- [30] ROBERTS, Timothy P.; MIKULIS, David: Neuro MR: Principles. In: *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 26 (2007), Nr. 4, S. 823–837
- [31] WHARTON, S. J.; BOWTELL, Richard: A four parameter fitting method to quantify fully the sources of phase contrast in gradient echo MRI. In: ISMRM (Hrsg.): *ISMRM 19th Annual Meeting & Exhibition*, 2011, S. 2762
- [32] LUO, J.; HE, X.; YABLONSKIY, D. A.: Magnetic susceptibility induced white matter MR signal frequency shifts—experimental comparison between Lorentzian sphere and generalized Lorentzian approaches. In: *Magnetic Resonance in Medicine* 71 (2014), Nr. 3, 1251–1263. ba

## LITERATURVERZEICHNIS

- [33] HE, X.; YABLONSKIY, D. A.: On the Nature of Phase Contrast in Gradient Echo MRI: A Generalized Lorentzian Approach. In: ISMRM (Hrsg.): *ISMRM 17th Scientific Meeting & Exhibition* Bd. 17, 2009, S. 864
- [34] SCHWESER, Ferdinand; DEISTUNG, Andreas; GÜLLMAR, D.; ATTERBURY, M.; LEHR, Berengar W.; SOMMER, K.; REICHENBACH, Jürgen R.: Non-Linear Evolution of GRE Phase as a Means to Investigate Tissue Microstructure. In: ISMRM (Hrsg.): *ISMRM 19th Annual Meeting & Exhibition*, 2011, S. 4527
- [35] LUO, J.; HE, X.; D'AVIGNON, D. A.; ACKERMAN, J. J.; YABLONSKIY, D. A.: Contribution of protein-induced magnetic susceptibility and <sup>1</sup>H exchange effects to water MR frequency shifts. In: ISMRM (Hrsg.): *ISMRM 17th Scientific Meeting & Exhibition* Bd. 17, 2009, S. 863
- [36] HE, Xiang; YABLONSKIY, Dmitriy A.: Biophysical mechanisms of phase contrast in gradient echo MRI. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (2009), Nr. 32, 13558–13563. doi:10.1073/pnas.0904899106
- [37] MATTSSON, Sören; THOMAS, Brian J.: Development of methods for body composition studies. In: *Physics in Medicine and Biology* 51 (2006), Nr. 13, S. R203–R228
- [38] WOODARD, H. Q.; WHITE, D. R.: The composition of body tissues. In: *British Journal of Radiology* 59 (1986), Nr. 708, S. 1209–1218
- [39] O'BRIEN, John S.; SAMPSON, E. L.: Lipid composition of the normal human brain: gray matter, white matter, and myelin. In: *Journal of Lipid Research* 6 (1965), Nr. 4, S. 537–544
- [40] PETERS, Theodore J.: Serum Albumin. In: ANFINSEN, C. B. (Hrsg.); EDSALL, John T. (Hrsg.); RICHARDS, Frederic M. (Hrsg.): *Advances in Protein Chemistry* Bd. Volume 37. Academic Press, 1985. – ISBN 0065–3233, S. 161–245
- [41] BERNHARDT, J.; PAULY, H.: Partial specific volumes in highly concentrated protein solutions. I. Water-bovine serum albumin and water-bovine hemoglobin. In: *J. Phys. Chem.* 79 (1975), Nr. 6, 584–590. doi:10.1021/j100573a010

- [42] EGGLESTON, B. C.; EVANS, D. F.; RICHARDS, R. E.: The effect of dissolved oxygen on diamagnetic susceptibilities. In: *Journal of the Chemical Society (Resumed)* (1954), S. 941
- [43] SONG; RYU; SEN: Determining multiple length scales in rocks. In: *Nature* 406 (2000), Nr. 6792, S. 178–181
- [44] FINNEY, J. L.: Water? What's so special about it? In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 359 (2004), Nr. 1448, S. 1145–1165
- [45] WOLFF, Steven D.; BALABAN, Robert S.: Magnetization transfer contrast (MTC) and tissue water proton relaxation in vivo. In: *Magnetic Resonance in Medicine* 10 (1989), 135–144. doi:10.1002/mrm.1910100113
- [46] WARD, K. M.; ALETRAS, A. H.; BALABAN, Robert S.: A New Class of Contrast Agents for MRI Based on Proton Chemical Exchange Dependent Saturation Transfer (CEST). In: *Journal of Magnetic Resonance* 143 (2000), Nr. 1, 79–87. doi:10.1006/jmre.1999.1956
- [47] KOENIG, Seymour H.; BROWN, R. D. I.; UGOLINI, Raphael: A unified view of relaxation in protein solutions and tissue, including hydration and magnetization transfer. In: *Magnetic Resonance in Medicine* 29 (1993), Nr. 1, 77–83. doi:10.1002/mrm.1910290114
- [48] CHADZYNSKI, Grzegorz L.; BENDER, Benjamin; GROEGER, Adriane; ERB, Michael; KLOSE, Uwe: Tissue specific resonance frequencies of water and metabolites within the human brain. In: *Journal of Magnetic Resonance* 212 (2011), Nr. 1, S. 55–63
- [49] PALMER, Arthur G.: NMR Characterization of the Dynamics of Biomacromolecules. In: *Chemical Reviews* 104 (2004), Nr. 8, S. 3623–3640
- [50] HOFMEISTER, Franz: Zur Lehre von der Wirkung der Salze: Zweite Mittheilung. Ueber Regelmässigkeiten in der eiweissfällenden Wirkung der Salze und ihre Beziehung zum physiologischen Verhalten derselben. In: *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 24 (1888), Nr. 4, S. 247–260



## LITERATURVERZEICHNIS

- [51] BIZZARRI, Anna R.; CANNISTRARO, Salvatore: Molecular Dynamics of Water at the Protein-Solvent Interface. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 106 (2002), Nr. 26, 6617–6633. doi:10.1021/jp020100m
- [52] GALLIER, J.; RIVET, P.; CERTAINES, J. d.: <sup>1</sup>H- and <sup>2</sup>H-NMR study of bovine serum albumin solutions. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 915 (1987), 1–18. doi:10.1016/0167-4838(87)90119-1
- [53] HILLS, B. P.; TAKACS, S. F.; BELTON, Peter S.: A new interpretation of proton NMR relaxation time measurements of water in food. In: *Food Chemistry* 37 (1990), Nr. 2, 95–111. doi:10.1016/0308-8146(90)90084-H
- [54] KOENIG, Seymour H.; BROWN, R. D. I.: A molecular theory of relaxation and magnetization transfer: Application to cross-linked BSA, a model for tissue. In: *Magnetic Resonance in Medicine* 30 (1993), Nr. 6, S. 685–695
- [55] OTTING, Gottfried; LIEPINSH, Edvards: Protein Hydration Viewed by High-Resolution NMR Spectroscopy: Implications for Magnetic Resonance Image Contrast. In: *Accounts of Chemical Research* 28 (1995), Nr. 4, 171–177. doi:10.1021/ar00052a002
- [56] ZORRILLA, Silvia; HINK, Mark A.; VISSER, Antonie J. W. G.; LILLO, M. P.: Translational and rotational motions of proteins in a protein crowded environment. In: *Biophysical Chemistry* 125 (2007), Nr. 2-3, 298–305. doi:10.1016/j.bpc.2006.09.003
- [57] LATOUR, L.L; MITRA, P.P; KLEINBERG, R.L; SOTAK, C.H: Time-Dependent Diffusion Coefficient of Fluids in Porous Media as a Probe of Surface-to-Volume Ratio. In: *Journal of Magnetic Resonance, Series A* 101 (1993), Nr. 3, S. 342–346
- [58] RULE, Gordon S.; HITCHENS, T K.: *Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy*. Dordrecht : Springer, 2006 (Springer-11651 /Dig. Serial]). doi:10.1007/1-4020-3500-4. – ISBN 9781402035005
- [59] HALLENGA, K.; KOENIG, S. H.: Protein rotational relaxation as studied by solvent<sup>1</sup>H and<sup>2</sup>H magnetic relaxation. In: *Biochemistry* 15 (1976), Nr. 19, S. 4255–4264

- [60] YILMAZ, Ali; BUDAK, Hatice; ULAK, F. S.: Determination of the effective correlation time modulating  $^1\text{H}$  NMR relaxation processes of bound water in protein solutions. In: *Magnetic Resonance Imaging* 26 (2008), Nr. 2, 254–260. doi:10.1016/j.mri.2007.05.008
- [61] BOTTOMLEY, Paul A.: A review of normal tissue hydrogen NMR relaxation times and relaxation mechanisms from 1–100 MHz: Dependence on tissue type, NMR frequency, temperature, species, excision, and age. In: *Medical Physics* 11 (1984), Nr. 4, S. 425–448
- [62] GOTTLIEB, Hugo E.; KOTLYAR, Vadim; NUDELMAN, Abraham: NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. In: *The Journal of Organic Chemistry* 62 (1997), Nr. 21, 7512–7515. doi:10.1021/jo971176v
- [63] HOFFMAN, Roy E.: Variations on the chemical shift of TMS. In: *Journal of Magnetic Resonance* 163 (2003), Nr. 2, S. 325–331
- [64] CROSS, Bradford P.; SCHLEICH, Thomas: Temperature dependence of the chemical shifts of commonly employed proton n.m.r. reference compounds. In: *Organic Magnetic Resonance* 10 (1977), Nr. 1, S. 82–85
- [65] BAXTER, Nicola J.; WILLIAMSON, Michael P.: Temperature dependence of  $^1\text{H}$  chemical shifts in proteins. In: *Journal of Biomolecular NMR* 9 (1997), Nr. 4, S. 359–369
- [66] SHEPHERD, T. M.; THELWALL, P. E.; STANISZ, Greg J. ; BLACKBAND, S. J.: Aldehyde fixative solutions alter the water relaxation and diffusion properties of nervous tissue. In: *Magnetic Resonance in Medicine* 62 (2009), Nr. 1, S. 26–34
- [67] GERSTEIN, M.; CHOTHIA, C.: Packing at the protein-water interface. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (1996), Nr. 19, S. 10167–10172
- [68] SMITH, J. C.; MERZEL, F.; BONDAR, A.-N.; TOURNIER, A.; FISCHER, S.: Structure, dynamics and reactions of protein hydration water. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 359 (2004), Nr. 1448, S. 1181–1190

## LITERATURVERZEICHNIS

- [69] GÜNTHER, Harald: *NMR-Spektroskopie: Grundlagen, Konzepte und Anwendungen der Protonen- und Kohlenstoff-13 Kernresonanz-Spektroskopie in der Chemie; 49 Tabellen, 60 Aufgaben mit Lösungen*. 3., neubearb. und erw. Aufl. Stuttgart : Thieme, 1992. – ISBN 3134875039
- [70] WALDECK, A.Reginald; KUCHEL, Philip W.; LENNON, Alison J.; CHAPMAN, Bogdan E.: NMR diffusion measurements to characterise membrane transport and solute binding. In: *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 30 (1997), Nr. 1-2, S. 39–68
- [71] McCONNELL, Harden M.: Reaction Rates by Nuclear Magnetic Resonance. In: *The Journal of Chemical Physics* 28 (1958), Nr. 3, S. 430
- [72] BAIN, Alex D.: Chemical exchange in NMR. In: *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 43 (2003), Nr. 3-4, S. 63–103
- [73] ZHONG, Jianhui; GORE, John C.; ARMITAGE, Ian M.: Relative contributions of chemical exchange and other relaxation mechanisms in protein solutions and tissues. In: *Magnetic Resonance in Medicine* 11 (1989), 295–308. doi : 10.1002/mrm.1910110304
- [74] ZHONG, Kai; SMALLA, Karl-Heinz; BRENSING, Alexander; SPECK, Oliver: Molecular Size Dependency of Water Macromolecule Exchange Induced Frequency Shift. In: ISMRM (Hrsg.): *ISMRM 17th Scientific Meeting & Exhibition* Bd. 17, 2009, S. 865
- [75] SHIMIZU, A.; IKEGUCHI, M.; SUGAI, S.: Appropriateness of DSS and TSP as internal references for <sup>1</sup>H NMR studies of molten globule proteins in aqueous media. In: *Journal of Biomolecular NMR* 4 (1994), Nr. 6, 859–862. doi : 10.1007/BF00398414
- [76] HOFFMAN, Roy E.: Standardization of chemical shifts of TMS and solvent signals in NMR solvents. In: *Magnetic Resonance in Chemistry* 44 (2006), Nr. 6, S. 606–616
- [77] HOFFMAN, Roy E.; BECKER, Edwin D.: Temperature dependence of the <sup>1</sup>H chemical shift of tetramethylsilane in chloroform, methanol, and dimethylsulfoxide. In: *Journal of Magnetic Resonance* 176 (2005), Nr. 1, S. 87–98

- [78] MIZUNO, Kazuko; IMAFUJI, Shingo; FUJIWARA, Teruko ; OHTA, Tomoko; TAMAYA, Yuka: Hydration of the CH Groups in 1,4-Dioxane Probed by NMR and IR: Contribution of Blue-Shifting CH $\cdots$ OH<sub>2</sub> Hydrogen Bonds. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 107 (2003), Nr. 16, 3972–3978. doi:10.1021/jp021712+
- [79] REYNOLDS, Jacqueline A.; GALLAGHER, Joan P.; STEINHARDT, Jacinto: Effect of pH on the binding of N-alkyl sulfates to bovine serum albumin. In: *Biochemistry* 9 (1970), Nr. 5, S. 1232–1238
- [80] BARDSLEY, W. G.; LEFF, P.; KAVANAGH, J.; WAIGHT, R. D.: Deviations from Michaelis-Menten kinetics. The possibility of complicated curves for simple kinetic schemes and the computer fitting of experimental data for acetylcholinesterase, acid phosphatase, adenosine deaminase, arylsulphatase, benzylamine oxidase, chymotrypsin, fumarase, galactose dehydrogenase, beta-galactosidase, lactate dehydrogenase, peroxidase and xanthine oxidase. In: *Biochem J* 187 (1980), Nr. 3, S. 739–765
- [81] CAVANAGH, John: *Protein NMR spectroscopy: Principles and practice*. 2. ed. Amsterdam : Elsevier Acad. Press, 2007. – ISBN 0–12–164491–x
- [82] HARRIS, Robin K.; BECKER, Edwin D.; CABRAL MENEZES, Sonia M. d.; GRANGER, Pierre; HOFFMAN, Roy E.; ZILM, Kurt W.: Further conventions for NMR shielding and chemical shifts (IUPAC Recommendations 2008). In: *Pure and Applied Chemistry* 80 (2008), Nr. 1, S. 59–84
- [83] MADER, Irina; SEEGER, Uwe; KARITZKY, Jochen; ERB, Michael; SCHICK, Fritz; KLOSE, Uwe: Proton magnetic resonance spectroscopy with metabolite nulling reveals regional differences of macromolecules in normal human brain. In: *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 16 (2002), Nr. 5, S. 538–546
- [84] MAO, Xi-an; GUO, Jian-xin; YE, Chao-hui: Competition between radiation damping and transverse relaxation effects on NMR signal intensities. In: *Chemical Physics Letters* 218 (1994), Nr. 3, 249–253. doi:10.1016/0009-2614(93)E1478-Y

## LITERATURVERZEICHNIS

- [85] SPECK, Oliver; DUYN, Jeff H.: Brain Anatomy with Phase. In: HAACKE, E. M. (Hrsg.); REICHENBACH, Jürgen R. (Hrsg.): *Susceptibility weighted imaging in MRI*. s.l. : Wiley, 2011. – ISBN 0470043431, S. 103–116
- [86] R DEVELOPMENT CORE TEAM: *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. <http://www.R-project.org>. Version: 2009
- [87] KIRK MARAT: *SpinWorks\_3*. <http://www.umanitoba.ca/chemistry/nmr/spinworks/>. Version: 1993-2009
- [88] BEEK, Jacco D. v.: matNMR: A flexible toolbox for processing, analyzing and visualizing magnetic resonance data in Matlab®. In: *Journal of Magnetic Resonance* 187 (2007), Nr. 1, 19–26. doi:10.1016/j.jmr.2007.03.017
- [89] CORTEL, Adolf: Demonstrations on Paramagnetism with an Electronic Balance. In: *Journal of Chemical Education* 75 (1998), Nr. 1, S. 61
- [90] BLACKBURN, B. J.; HRUSKA, Frank E.; SMITH, Ian C. P.: Concerning the problems involved with use of external references for variable temperature chemical shift measurements. In: *Canadian Journal of Chemistry* 47 (1969), Nr. 23, S. 4491–4493
- [91] LUO, Jie; HE, Xiang; D'AVIGNON, D. A.; ACKERMAN, Joseph J. H.; YABLONSKIY, Dmitriy A.: Protein-induced water 1H MR frequency shifts: Contributions from magnetic susceptibility and exchange effects. In: *Journal of Magnetic Resonance* 202 (2010), Nr. 1, 102–108. doi:10.1016/j.jmr.2009.10.005
- [92] WISHART, DavidS; BIGAM, ColinG; YAO, Jian; ABILDGAARD, Frits; DYSON, H.Jane; OLDFIELD, Eric ; MARKLEY, JohnL; SYKES, BrianD: 1H, 13C and 15N chemical shift referencing in biomolecular NMR. In: *Journal of Biomolecular NMR* 6 (1995), Nr. 2
- [93] BALEVICIUS, V.; AIDAS, K.: Temperature Dependence of 1H and 17O NMR Shifts of Water: Entropy Effect. In: *Applied Magnetic Resonance* 32 (2007), Nr. 3, S. 363–376

- [94] KOENIG, Seymour H.: Classes of hydration sites at protein-water interfaces: the source of contrast in magnetic resonance imaging. In: *Biophysical Journal* 69 (1995), Nr. 2, S. 593–603
- [95] HARDING, Stephen E.: The intrinsic viscosity of biological macromolecules. Progress in measurement, interpretation and application to structure in dilute solution. In: *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 68 (1997), Nr. 2-3, S. 207–262
- [96] HILLS, B. P.; WRIGHT, K. M.; BELTON, Peter S.: Proton N.M.R. studies of chemical and diffusive exchange in carbohydrate systems. In: *Molecular Physics: An International Journal at the Interface Between Chemistry and Physics* 67 (1989), Nr. 6, 1309–1326. doi: 10.1080/00268978900101831
- [97] WISHART, D.S.; SYKES, B.D; RICHARDS, F.M: Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. In: *Journal of Molecular Biology* 222 (1991), Nr. 2, S. 311–333
- [98] HILLS, B. P.; TAKACS, S. F.; BELTON, Peter S.: The effects of proteins on the proton N.M.R. transverse relaxation time of water – II. Protein aggregation. In: *Molecular Physics: An International Journal at the Interface Between Chemistry and Physics* 67 (1989), Nr. 4, 919–937. doi: 10.1080/00268978900101541
- [99] MARCO, Antonio d.: pH dependence of internal references. In: *Journal of Magnetic Resonance (1969)* 26 (1977), Nr. 3, S. 527–528
- [100] ZHOU, Huan-Xiang: Effect of mixed macromolecular crowding agents on protein folding. In: *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 72 (2008), Nr. 4, S. 1109–1113
- [101] KRAGH-HANSEN, Ulrich; HELLEC, Florence; FORESTA, Béatrice de; LE MAIRE, Marc; MØLLER, Jesper V.: Detergents as Probes of Hydrophobic Binding Cavities in Serum Albumin and Other Water-Soluble Proteins. In: *Biophysical Journal* 80 (2001), Nr. 6, S. 2898–2911
- [102] LEE, Jongho; SHMUELI, Karin; KANG, Byeong-Teck; YAO, Bing; FUKUNAGA, Masaki; GELDEREN, Peter van ; PALUMBO, Sara; BOSETTI, Francesca; SILVA, Afonso C.; DUYN, Jeff H.: The contribution of myelin to magnetic

## LITERATURVERZEICHNIS

- susceptibility-weighted contrasts in high-field MRI of the brain. In: *NeuroImage* 59 (2012), Nr. 4, S. 3967–3975
- [103] HALLGREN, B.; SOURANDER, P.: THE EFFECT OF AGE ON THE NON-HAEMIN IRON IN THE HUMAN BRAIN. In: *Journal of Neurochemistry* 3 (1958), Nr. 1, S. 41–51
- [104] OROS-PEUSQUENS, Ana-Maria; MATUSCH, Andreas; LINDEMAYER, Johannes; BECKER, Johanna S.; SHAH, N. J.: Changes in MR contrast after fixation: insight from M0, R2\*, phase and element imaging by LA-ICP-MS. In: ISMRM (Hrsg.): *ISMRM 20h Annual Meeting & Exhibition*, 2012, S. 383
- [105] SCHENCK, John F.: Health and Physiological Effects of Human Exposure to Whole-Body Four-Tesla Magnetic Fields during MRI. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 649 (1992), Nr. 1 Biological Ef, S. 285–301
- [106] JOLESZ, F. A.; POLAK, J. F.; ADAMS, D. F.; RUENZEL, P. W.: Myelinated and nonmyelinated nerves: comparison of proton MR properties. In: *Radiology* 164 (1987), Nr. 1, S. 89–91
- [107] CHU, Ksimon-.C; XU, Yan; BALSCHI, James A.; SPRINGER, Charles S.: Bulk magnetic susceptibility shifts in nmr studies of compartmentalized samples: use of paramagnetic reagents. In: *Magnetic Resonance in Medicine* 13 (1990), Nr. 2, S. 239–262
- [108] FACELLI, Julio C.: Chemical shift tensors: Theory and application to molecular structural problems. In: *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 58 (2011), Nr. 3-4, S. 176–201

Verzeichnis der wissenschaftlichen Veröffentlichungen:

LEUTRITZ, Tobias; HILFERT, Liane; SMALLA, Karl-Heinz; SPECK, Oliver; ZHONG, Kai:  
Accurate quantification of water-macromolecule exchange induced frequency shift: Effects of  
reference substance.

In: Magnetic Resonance in Medicine 69 (2013), Nr. 1, S. 263–268



## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte  
Dissertation zu dem Thema

Ursachenaufklärung des MRT-Phasenkontrastes im Hochfeld mit  
Bezug auf die Wasser-Makromolekül-Wechselwirkung

selbständig verfasst, nicht bereits als Dissertation verwendet  
habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig  
angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere  
Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum  
naturalium (Dr. rer. nat.) bei anderen Einrichtungen eingereicht  
habe.

Magdeburg, den 7. Juli 2014

Dipl.-Phys. Tobias Leutritz