

Untersuchungen zur Chromaufnahme von Hefezellen und Charakterisierung chromhaltiger Komplexe aus Bierhefe

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrads des Fachbereichs Chemie der
Universität Hamburg

Gundolf Weseloh

aus Hamburg

Hamburg 2001

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Knöchel

2. Gutachter: Prof. Dr. D. Rehder

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 28.01. 2002

So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muß sie für fertig erklären, wenn man nach Zeit und Umständen das Möglichste getan hat.

J. W. von Goethe,

Italienische Reise, 16. März 1787

Danksagungen:

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1991 bis März 1996 im Institut für Anorganische und Angewandte Chemie der Universität Hamburg angefertigt.

Herrn Prof. Dr. A. Knöchel danke ich für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die interessante Aufgabenstellung in Verbindung mit einem großen Freiraum bei der Bearbeitung des Themas und seine langjährige Förderung auch nach Beendigung der praktischen Laborarbeiten. Weiterhin verdanke ich ihm eine Sensibilisierung hinsichtlich der Bildung des Genitivs („um Gottes Willen!“).

Allen Mitarbeitern des Arbeitskreises danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Insbesondere danke ich Herrn Dr. Frank Gibau, Herrn Dr. Volker Hamm, Herrn Dr. Wilhelm Herdering, Herrn Dr. Heiko Potgeter und Frau Dr. Ines Stocker für anregende Diskussionen und fachliche Unterstützung. Herrn Dr. Frank Gibau und seinem Bruder Andreas danke ich darüber hinaus für die Erschaffung der Chromatographiesoft- und hardware, ohne die angesichts der vorherrschenden Sachmittelknappheit eine befriedigende Auswertung und Darstellung der Chromatographiedaten nicht möglich gewesen wäre. Herrn Wolfgang Stark danke ich für die Beratung in Hinblick auf die Planung, Durchführung und Bewertung der Tracerexperimente mit ^{51}Cr .

Herrn Dr. Werner Nowatzky danke ich für den Tipp mit dem „MAX232“ (Pegelwandler für die RS232- Schnittstelle).

Herrn Rost und Frau Zeise und ihren Mitarbeitern der feinmechanischen Werkstatt danke ich für die Anfertigung etlicher Sonderkonstruktionen. Herrn Jens Köster und Herrn Thorsten Roth (Glastechnische Werkstatt) sei gedankt für die Anfertigung einer Präzisionswelle für die Rührwerkskugelmühle.

Dem Team des Forschungsreaktors des „Joint Research Centre“ in Petten (Niederlande) danke ich für die Durchführungen der Aktivierungen im Hochflußreaktor. Herrn Dr. A. Podtelezhnikov (Protein and Peptide Group, EMBL (Heidelberg)) sowie Frau Dr. A. Jacob (Arbeitskreis Prof. Dr. H. Köster, Institut für Organische Chemie) und Herrn Dr. L. Schmidt (Arbeitsgruppe Prof. Dr. H. Jungclas, Philipps-Universität Marburg) danke ich für die Durchführung der ESI- und MALDI- bzw. Plasmadesorptionsmassenspektrometrie- Experimente.

Herrn Prof. Dr. D. Behne und Dr. A. Kyriakopoulos vom Hahn-Meitner-Institut Berlin danke ich für Verständnis und Geduld während der Fertigstellung dieser Arbeit.

Anette danke ich für fortwährende Aufmunterung und moralische Unterstützung.

Meinen Eltern danke ich für die umfassende Unterstützung während des Studiums und der Dissertation.

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG.....	5
2. LITERATURTEIL.....	7
2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als Modell für Stoffwechselfvorgänge eukaryontischer Organismen.....	7
2.2. Chrom und seine biologische Bedeutung.....	10
2.2.1. Spurenelemente, Essentialität, Toxizität und Elementspezies	10
2.2.2. Chemie des Chroms	15
2.2.3. Chemie des dreiwertigen Chroms in biologischen Systemen.....	22
2.2.4. Das Vorkommen von Chrom(III)- Spezies in biologischen Matrices...27	
2.2.5. Chrom als essentielles Spurenelement.....	31
2.2.6. Der Glukosetoleranzfaktor.....	35
2.2.6.1. Eigenschaften des Glukosetoleranzfaktors.....	35
2.2.6.2. <i>In vivo</i> Studien zur Wirkung des Glukosetoleranzfaktors an Tiermodellen und am Menschen	38
2.2.6.3. Methoden zur Bestimmung der Aktivität des Glukosetoleranzfaktors.....	45
2.2.6.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Chrom und der „Glukosetoleranzfaktor“	47
2.2.6.4.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und Chrom	47
2.2.6.4.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und Diabetes	52
2.2.6.4.3. Versuche zur Isolation von Fraktionen mit GTF- Aktivität aus Bierhefe	52
2.3. Methoden zur Untersuchung der Aufnahme von Chrom(III) in Bierhefe und zur Fraktionierung komplexer chromhaltiger Verbindungen aus Bierhefe und Nährmedium	57
2.3.1. Hefekultur	59
2.3.1.1. Auswahl der Heferasse	59
2.3.1.2. Wahl des Kulturmediums	60
2.3.1.3. Kulturbedingungen	61
2.3.2. Tracerexperimente mit ⁵¹ Cr	62
2.3.2.1. Eigenschaften von ⁵¹ Cr.....	63
2.3.2.2. Dimensionierung der Traceransätze	63
2.3.3. Zellernte	64
2.3.4. Zellaufschluß.....	64
2.3.5. Konditionierung des Zellextrakts.....	67

2.3.6.	Flüssigchromatographische Techniken.....	68
2.3.6.1.	Gelchromatographie.....	69
2.3.6.1.1.	Prinzip und Eigenschaften.....	70
2.3.6.1.2.	Auswahl der Trägermaterialien und Eluenten.....	72
2.3.6.1.3.	Abschätzung von Molekulargewichten.....	74
2.3.6.2.	Ionenpaarchromatographie.....	74
2.3.6.2.1.	Prinzip und Eigenschaften.....	75
2.3.6.2.2.	Auswahl der Trägermaterialien und Eluenten.....	78
2.3.6.3.	Detektion und Aufzeichnung der Chromatogramme.....	79
2.3.6.3.1.	Bestimmung des Chromgehalts.....	79
2.3.6.3.2.	Verfolgung der Chromatogramme über die optische Dichte (UV- Absorption).....	81
2.3.6.3.3.	Aufzeichnung der Chromatogramme.....	82
2.3.7.	Auswertung.....	82
2.3.8.	Massenspektrometrische Methoden.....	84
2.3.8.1.	Matrix- unterstützte Laser- Desorptions- Ionisations- Massenspektrometrie (MALDI-MS).....	84
2.3.8.2.	Plasmadesorptions- Massenspektrometrie (PD-MS).....	85
2.3.8.3.	Elektrospray- Massenspektrometrie (ESI-MS).....	85
3.	VERSUCHE ZUR AUFNAHME VON CHROM(III) IN BIERHEFE UND ZUR FRAKTIONIERUNG KOMPLEXER CHROMHALTIGER VERBINDUNGEN AUS BIERHEFE UND NÄHRMEDIUM.....	87
3.1.	Allgemeine Beschreibung der durchgeführten Experimente.....	88
3.1.1.	Wahl des Kulturmediums.....	89
3.1.2.	Kulturbedingungen.....	91
3.1.3.	Zugabe des Tracers.....	92
3.1.4.	Zellernte.....	93
3.1.5.	Mechanischer Aufschluß der Hefezellen mit Glasperlen.....	93
3.1.6.	Konditionierung des Zellextrakts.....	94
3.2.	Ergebnisse.....	95
3.2.1.	Aufnahme von Chrom in Batchkulturen von <i>S. cerevisiae</i>	95
3.2.2.	Fraktionierung niedermolekularer Chromverbindungen aus Hefe.....	96
3.2.2.1.	Schonende Extraktion von Chrom aus Hefe.....	96
3.2.2.2.	Reinigung der partikulären Fraktion.....	99

3.2.2.3.	Fraktionierung und Charakterisierung chromhaltiger Verbindungen aus Hefe mit Hilfe der Gelchromatographie	100
3.2.2.3.1.	Einfluß verschiedener Eluenten	101
3.2.2.3.2.	Abschätzung des Molekulargewichts	104
3.2.2.3.3.	Versuche zur Extraktion von Hefe mit wäßriger Ammoniaklösung	107
3.2.2.3.4.	Eignung von Fällungstechniken zur Aufarbeitung von Hefeextrakten.....	109
3.2.2.4.	Ultrafiltration und Gelchromatographie zur verlustarmen Vorreinigung des Hefe- Rohextrakts	111
3.2.2.5.	Analyse des vorgereinigten Hefeextrakts mit Hilfe der Ionenpaarchromatographie	113
3.2.2.6.	Überprüfung der Fraktionierung durch Reinjektionsversuche	117
3.2.2.7.	Quantitative Aspekte der Aufarbeitung gemäß Schema in Abb. 10	119
3.2.2.8.	Weitere Untersuchungen mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden	120
3.2.3.	Versuche zur Fraktionierung niedermolekularer Chromverbindungen aus dem Nährmedium der Hefekultur.....	126
3.2.3.1.	Charakterisierung mit Hilfe von Größenausschluß- und Ionenpaarchromatographie	127
3.2.3.2.	Versuche zur Konditionierung des Nährmediums.....	131
4.	DISKUSSION	135
4.1.	Die Aufnahme von dreiwertigem Chrom in Bierhefe.....	135
4.2.	Chromspezies in Bierhefe.....	138
4.2.1.	Erkenntnisse aus der Gelchromatographie	139
4.2.2.	Erkenntnisse aus der Ionenpaarchromatographie	141
4.2.3.	Erkenntnisse aus den massenspektrometrischen Methoden	144
4.2.4.	Schlußfolgerungen	145
4.3.	Chromspezies im verbrauchten Nährmedium der Hefekultur	151
4.4.	Bewertung und Ausblick	153
5.	EXPERIMENTELLES	157
5.1.	Allgemeine Laborausrüstung	157
5.2.	Allgemeine Arbeitstechniken	158
5.3.	Zubereitung des Nährmediums	159
5.4.	Markierungen mit ⁵¹Cr	161

5.4.1.	Tracer der Firma Amersham-Buchler	161
5.4.2.	Durch Bestrahlung von Reinstchrom gewonnene Tracer	162
5.5.	Gamma- Meßtechnik.....	164
5.6.	Kultivierung der Hefe	167
5.7.	Bestimmung der Biomasse.....	169
5.8.	Zellernte.....	169
5.9.	Zellaufschluß.....	170
5.10.	Ultrafiltration mit Hilfe von „Centricon“- UF- Zentrifugenröhrchen.	173
5.11.	Chromatographie.....	173
5.11.1.	Gelchromatographie	173
5.11.2.	Ionenpaarchromatographie	174
5.11.3.	Detektion.....	175
5.11.4.	Aufzeichnung und Verarbeitung der Chromatographiedaten	177
5.11.5.	Abschätzung der Molekulargewichte	178
5.11.5.1.	Bestimmung von Molekulargewichten auf Toyopearl HW 55s (hochmolekulare Fraktion):.....	178
5.11.5.2.	Bestimmung von Molekulargewichten auf Toyopearl HW 40s (niedermolekulare Fraktionen).....	180
5.11.5.2.1.	Fraktionen aus dem Hefeextrakt.....	180
5.11.5.2.2.	Fraktionen aus dem Nährmedium	181
5.12.	Massenspektrometrie	182
5.13.	Chemikalien	182
5.13.1.	Eingesetzte Chemikalien	182
5.13.2.	Sicherheitshinweise für die eingesetzten Gefahrstoffe.....	184
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	187
7.	SUMMARY	189
8.	LITERATUR.....	193

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Seit den Untersuchungen von Mertz und Schwarz Ende der fünfziger Jahre wird Chrom in seiner dreiwertigen Form eine Bedeutung als essentielles Spurenelement zugesprochen. Im Jahre 1957 entdeckten sie in Bierhefe einen Nahrungsfaktor, der eine bei Ratten durch Mangelernährung hervorgerufene Glukoseintoleranz korrigierte. Bei diesem Nahrungsfaktor handelte es sich offenbar um einen Chrom(III)-Komplex, der in Bierhefe aus anorganischem Chrom(III) besonders wirkungsvoll synthetisiert werden konnte. Die in den folgenden Jahren durchgeführten Studien ließen vermuten, daß Chrommangel nicht nur bei mit speziellen Diäten ernährten Ratten auftritt, sondern auch eine Bedeutung für den Diabetes Mellitus des Menschen und seine zahlreichen Folgeerkrankungen haben könnte.

Weitere Forschungen deuteten darauf hin, daß der in Hefe und Schweinenieren aufgefundene Chrom(III)-Komplex eine besonders gut resorbierbare Form dieses Ions darstellt. Die Ergebnisse von „in vitro“-Versuchen legten nahe, daß ähnlich wie Cobalamin im Falle von Kobalt, dieser „Glukosetoleranzfaktor“ die eigentlich wirksame Form des Spurenelements Chrom im Stoffwechsel von Säugetieren darstellt und im Zusammenwirken mit Insulin eine grundlegende Rolle im Stoffwechsel auf zellulärer Ebene spielen könnte.

Seitdem wurden etliche Studien zur Isolierung und Aufklärung der Struktur dieses Glukosetoleranzfaktors durchgeführt, ohne daß greifbare Resultate erzielt werden konnten. Gleichzeitig ist die Rolle von dreiwertigem Chrom in Hinblick auf eine möglichen Beteiligung an physiologischen Prozessen, insbesondere dem Energiestoffwechsel und der Pathogenese von Diabetes Typ 2, nach wie vor ungeklärt.

Bierhefe gilt seit den Anfängen der Erforschung der biologischen Bedeutung von Chrom als reichste Quelle des chromhaltigen Glukosetoleranzfaktors. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Aufnahme von Chrom(III) in Bierhefe zu bilanzieren und neue schonende Methoden zu ihrer Analytik zu entwickeln, um damit erstmals einen verlässlichen Überblick über die von Hefe gebildeten Chromverbindungen und deren Eigenschaften zu gewinnen. Damit soll diese Arbeit dazu beitragen, die seit langem offenen Fragen nach Existenz und Konstitution eines chromhaltigen „Glukosetoleranzfaktors“ einer Klärung zuzuführen.

2. LITERATURTEIL

Die Fortschritte in den Lebenswissenschaften in den vergangenen einhundert Jahren führten ebenfalls zu einem tieferen Verständnis der Funktionen von „Spurenmitteln“ in lebenden Organismen. Trotz einiger Bemühungen konnte die Bedeutung von Chrom als für Menschen und andere Lebensformen „essentielles“ Spurenelement bisher nicht eindeutig geklärt werden. Als „Modell“ zur Studie des Verhaltens von Chrom in höheren Organismen bietet sich Bierhefe an. Am Beispiel von Bierhefe lassen sich Methoden zur Analyse und Unterscheidung verschiedener Bindungsformen von dreiwertigem Chrom praktisch erproben.

2.1. *Saccharomyces cerevisiae* als Modell für Stoffwechselforgänge eukaryontischer Organismen

Die Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* gehört zusammen mit etwa 40 weiteren Arten der Gattung *Saccharomyces* den *Endomycetales* an, welche wiederum eine Ordnung der Klasse der *Endomycetes* (Sproßpilze, Klasse der echten Pilze (*Eumycota*)) bilden [1]. Die im Brauereiwesen gebräuchlichen Namen wie z.B. *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. carlsbergensis* und *S. diastaticus* sind für den Taxonomen keine eigenständigen Arten, sondern bezeichnen phenotypisch unterschiedliche, unfruchtbare Rassen der Art *Saccharomyces cerevisiae* [2].

Zwischen Pflanzen-, Pilz- und Tierreich gibt es keine scharfen Abgrenzungen. Pilze unterscheiden sich von Pflanzen durch das Fehlen von Chlorophyll. Als heterotrophe Organismen sind sie daher auf die Nutzung von externen Kohlenstoffquellen angewiesen und ähneln darin den Tieren. Ähnlich wie pflanzliche Zellen und im Gegensatz zu tierischen Zellen besitzen Hefezellen eine Vakuole und eine Zellwand aus Polysacchariden. Alle Zellen der Pilze, Pflanzen und Tiere besitzen als Eukaryonten einen definierten Zellkern und mehrere Arten von spezialisierten Organellen. Hefepilze sind einzellige, eukaryontische Mikroorganismen, die sich vorwiegend ungeschlechtlich durch

Knospung vermehren. Die nur unter besonderen Bedingungen stattfindende geschlechtliche Vermehrung geschieht durch Kopulation von haploiden Sproßzellen (Somatogamie), die aus den durch Reifeteilung entstandenen Ascosporen hervorgegangen sind. Nach Bildung einer Zygote schließt sich wiederum die diploide Lebensphase an, die bei *S. cerevisiae* die wesentliche Form der Existenz darstellt.

Von der Menschheit schon seit Jahrtausenden bei der Bereitung von Bier, Wein und Brot genutzt, ist die Bierhefe *S. cerevisiae* in den letzten Jahrzehnen zu einem der wichtigsten Versuchsobjekte der Biowissenschaften geworden. Bierhefe ist im Labor- und im großtechnischen Maßstab verhältnismäßig einfach zu vermehren. Als typischer Eukaryont besitzt sie wesentliche Merkmale höherer Organismen. Hefen vereinen die Vorteile der Prokaryonten (schnelles Wachstum, relativ kleines, übersichtliches Genom) mit der Möglichkeit, die komplexeren Funktionen eukaryontischer Zellen „im Reagenzglas“ zu studieren. So hat das Genom des Einzellers *S. cerevisiae* mit ca. 6200 Genen [3] ca. 1/5 des Umfangs des menschlichen Genoms (26.000 – 38.000 Gene) [4]. Die Analyse fundamentaler biologischer Zusammenhänge in „Modellorganismen“ hat eine direkte Beziehung zur Biologie komplexerer Eukaryonten bis hin zum Menschen [5]. Dieser Modellcharakter der Hefepilze äußert sich insbesondere auch in verblüffenden Homologien zwischen den in den Transport von Ionen der Übergangsmetalle involvierten Genen der Hefe und des Menschen [6][7], wie detaillierte Studien der hochkomplexen Eisenassimilation von *S. cerevisiae* gezeigt haben [8][9].

Eine der wichtigsten Eigenschaften der Rassen von *S. cerevisiae* ist die Fähigkeit, Kohlenstoffquellen wie Glukose, aber auch andere Zucker sowohl aerob zu oxidieren, als auch aneorob zu Ethanol zu vergären, was zwei völlig unterschiedliche Zustände des Stoffwechsels mit sich bringt. Bei Gegenwart einer nicht zu geringen Menge Glukose und bei Vorhandensein ausreichender Mengen von Sauerstoff werden, abhängig von der jeweiligen Rasse und den Kulturbedingungen, in unterschiedlichem Ausmaß beide Stoffwechselwege gleichzeitig begangen, da allein die Gegenwart einer vergärbaren Kohlenstoffquelle die Nutzung des anaeroben Stoffwechselwegs stimuliert [10]. Überwiegend aerobe Nutzung der Kohlenstoffquelle ist bei *S. cerevisiae* nur im Grenzbereich sehr geringer Konzentrationen möglich. Diese Eigenschaft führt in Batch- Kulturen dieser Hefen zu typischen „diauxischen“ Wachstumskurven, wie sie beispielhaft in Abb. 1 dargestellt sind:

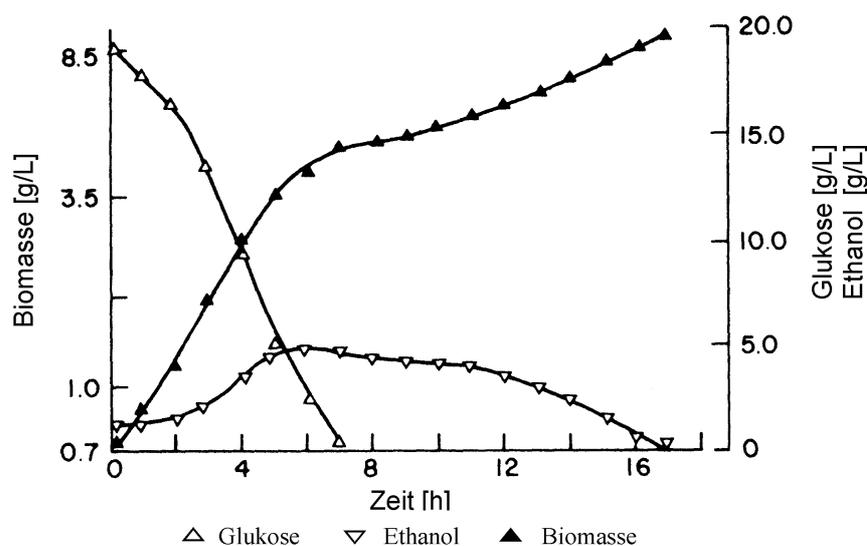


Abb. 1: Wachstumskurven von *S. cerevisiae* in einer Batchkultur im Standardmedium bei einer Glukosekonzentration von 20 g/L [10].

Nach einer kurzen Verzögerung („Lag- Phase“) wird in der ersten, exponentiellen Wachstumsphase aus der Kohlenstoffquelle, vorzugsweise Glukose, trotz Sauerstoffangebots überwiegend fermentativ Ethanol gebildet, der in der zweiten Phase mit einer wesentlich geringeren Geschwindigkeit oxidativ zu CO_2 und Wasser abgebaut wird. Sind alle Nährstoffe verbraucht, geht die Kultur in eine stationäre Phase über, die durch einen langsamen Verbrauch von Biomasse gekennzeichnet ist [11]. Diese Änderungen des Stoffwechselzustands führen zu Änderungen in der chemischen Zusammensetzung der Hefe in den verschiedenen Wachstumsphasen. Bereits in Gegenwart von Glukosekonzentrationen ≥ 1 g/L wird in *S. cerevisiae* die Synthese von Enzymen der Atmungskette inhibiert („negativer Pasteur- Effekt“) [12]. Sofern überwiegend aerobes Wachstum gewünscht wird, sollte die Glukosekonzentration so niedrig wie möglich gehalten werden (kleiner als 1% [13]), da eine höhere Glukosekonzentration ihre eigene respirative Metabolisierung hemmt.

Bierhefe hat die Eigenschaft, während des Wachstums Protonen in das Nährmedium abzugeben, was zu einem beträchtlichen Absinken des pH- Werts um bis zu vier Einheiten [14] bis herab zu pH- Werten unter 4 [13] führen kann. Diese Ansäuerung des Mediums tritt sowohl bei aerobem als auch bei anaerobem Wachstum in Erscheinung und ist direkt an den Vorgang der Glykolyse gekoppelt. Das Ausmaß der Ansäuerung im Nährmedium ist abhängig von der externen Glukosekonzentration und dem pH-

Wert in der Nährlösung, so daß die externe Protonenkonzentration einem Sättigungswert zustrebt [14]. Dadurch wird ein zu starkes Absinken des pH- Werts verhindert. Nach Verbrauch der Glukose kehrt sich der Protonenfluß um und der extrazelluläre pH- Wert beginnt wieder zu steigen [15]. In Verbindung mit den typischen diauxischen Wachstumskurven der Bierhefe können in einer Batch- Kultur daher im ungepufferten oder nur schwach gepufferten Nährmedium Schwankungen des pH- Werts um mehrere Einheiten auftreten.

2.2. Chrom und seine biologische Bedeutung

Voraussetzung für die Bewertung der biologischen Bedeutung eines Elementes sind nicht nur Kenntnisse über sein Vorkommen in der unbelebten und belebten Natur und sein chemisches und physiologisches Verhalten, sondern auch über grundsätzliche Zusammenhänge zwischen Chemie und Physiologie.

2.2.1. Spurenelemente, Essentialität, Toxizität und Elementspezies

Die Hauptbestandteile aller irdischen Lebensformen sind Wasserstoff, Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel. Die Konzentration dieser Elemente in biologischer Materie kann in Dimensionen von g/kg ausgedrückt werden. Darüber hinaus sind die als Kation vorkommenden „Makromineralen“ Natrium, Magnesium, Kalium, Kalzium, Chlorid sowie das ausschließlich gebunden vorkommende Element Phosphor unentbehrlicher Bestandteil aller Zellen. Ihre Konzentrationen in lebender Materie sind zwar durchweg niedriger als die der Hauptbestandteile, liegen aber immer noch im Bereich von g/kg und damit in einer Größenordnung, die durch analytische Methoden problemlos zugänglich ist. Die restlichen 67 natürlich vorkommenden Elemente (mit Ausnahme der Edelgase, bei denen eine Beteiligung an biologischen Prozessen mit großer Wahrscheinlichkeit auszuschließen ist) finden sich in lebenden Organismen in viel geringeren Konzentrationen in einem weiten Bereich zwischen mg/kg und µg/kg

Gewebe. Diese Konzentrationen waren bis zur Entwicklung leistungsfähiger atom-spektroskopischer Methoden nicht zu quantifizieren und wurden daher pauschal als „Spuren“- Elemente qualifiziert. Zu den Spurenelementen werden heute alle Mineralstoffe gezählt, deren Gehalte unter 50 mg/kg Körpergewicht liegen, einschließlich Eisen, dessen Konzentration oft darüber liegt, das aber aufgrund seiner Funktion im Stoffwechsel ebenfalls zu den Spurenelementen gezählt wird [16].

Tatsächlich lassen sich bei Anwendung hinreichend empfindlicher Analysemethoden sämtliche natürlich vorkommenden Elemente des Periodensystems in irdischen Lebensformen nachweisen. Die reine Anwesenheit eines bestimmten Elements in einem Organismus beweist allerdings nicht, daß dieses Element dort physiologische Aufgaben erfüllt. Ein für eine bestimmte Lebensform „essentielles“, also „wesentliches“ Spurenelement ist daher von einem nicht essentiellen, unwesentlichen und im jeweiligen Organismus nur „akzidentiell“ vorhandenen Spurenelement zu unterscheiden. Es liegt auf der Hand, daß hierbei die Einstufung eines Elements als „essentiell“ oder „akzidentiell“ vom jeweiligen Wissenstand abhängt. Mertz hat daher festgestellt, daß alle Elemente, einschließlich der Mengenelemente, in zwei Kategorien eingeteilt werden können: „diejenigen, deren Essentialität durch anerkannte wissenschaftliche Standards bewiesen wurde und diejenigen, für die der Beweis ihrer Essentialität nicht existiert“ [17].

Dieser Beweis der Essentialität ist allerdings bei immer geringer werdenden relevanten Konzentrationsbereichen der untersuchten Elemente zunehmend schwerer zu führen. Klassische Beweise der „Essentialität“ eines Elements beruhen sämtlich auf dem Ansatz, dem zu untersuchenden Organismus das betreffende Element in einem möglichst großen Umfang zu entziehen und die dabei auftretenden Änderungen in seinem Gesundheitszustand zu beobachten. Cotzias [18] hat die Kriterien einer Essentialität schärfer formuliert. Ein Element kann als essentielles Spurenelement betrachtet werden, wenn es folgende Bedingungen erfüllt:

- Das Element ist in allen gesunden Geweben aller Lebewesen vorhanden.
- Seine Konzentration ist von einem Tier zum nächsten ziemlich konstant.
- Sein Entzug aus dem Körper erzeugt reproduzierbar und unabhängig von der betrachteten Spezies die gleichen physiologischen und strukturellen Abnormalitäten.
- Diese durch einen Mangelzustand erzeugten Abnormalitäten werden stets von bestimmten biochemischen Veränderungen begleitet.
- Diese biochemischen Veränderungen können verhindert oder geheilt werden, wenn der Mangelzustand verhindert oder behoben wird.

Der Nachweis des essentiellen Charakters eines Spurenelements ist experimentell nur schwer zu erbringen, da oft schon kleinste Mengen des entsprechenden Elements ausreichen, um Mangelercheinungen zu beheben. Bei einem extrem geringen Bedarf des zu untersuchenden Elementes stößt dieser Ansatz aufgrund der „Allgegenwärtigkeit“ sämtlicher natürlich vorkommender Elemente praktisch an seine Grenzen. Zudem ist so einer mehr ganzheitliche Betrachtungsweise einer „optimalen“ Versorgung mit Nährstoffen und Spurenelementen mit ihren vielfältigen Interaktionen [19] kaum Rechnung zu tragen. Ein Beweis für die Essentialität eines Elementes kann deshalb letztendlich nur erbracht werden, wenn die Funktion des betrachteten Elements auf molekularer Ebene unzweideutig bestimmt werden kann, was gleichzeitig die strikteste Definition des Begriffs „Essentialität“ beinhaltet.

Im Gegensatz zur Essentialität ist die Toxizität allen Elementen eigen und abhängig von der Konzentration des betreffenden Elements, dem der Organismus ausgesetzt ist. Die toxische Wirkung eines Metallions ist kein isoliertes Phänomen, sondern tritt als Teil einer Dosis-Wirkungsbeziehung im Organismus auf. Venchikow [20] unterscheidet zwischen einem Bereich der „biologischen Wirkung“ eines Elements, in dem es vom Organismus als Nahrungsstoff (und damit als „essentielles Spurenelement“) verwertet wird, und einem Bereich der pharmakotoxikologischen Wirkung, der bei starker Exposition zum Tragen kommt (Abb. 2a). Dies bedeutet, daß abhängig von der Exposition mit einem Spurenelement verschiedene Wirkungsmechanismen ausgelöst werden können. Auch die supraphysiologische Exposition des Organismus mit einem „es-

sentiellen“ Spurenelement kann zu einer Verbesserung der Funktion des Organismus führen.

Wenn auch Venchikows Überlegungen sicherlich grundsätzliche Bedeutung haben und Gültigkeit für niedere Organismen besitzen, so beschreiben sie nicht notwendigerweise die Reaktion höherer Organismen mit starker homöostatischer Kontrolle ihres inneren Milieus [21]. Üblicherweise wird der Zusammenhang von Essentialität und Toxizität in Form einer lediglich einphasigen Dosis- Wirkungsbeziehung dargestellt, die ausgehend von Konzentrationsbereichen einer mit dem Leben unvereinbaren Mangelversorgung über einen Bereich optimaler Versorgung bis hin zum Bereich der Giftwirkung reicht (Abb. 2b)):

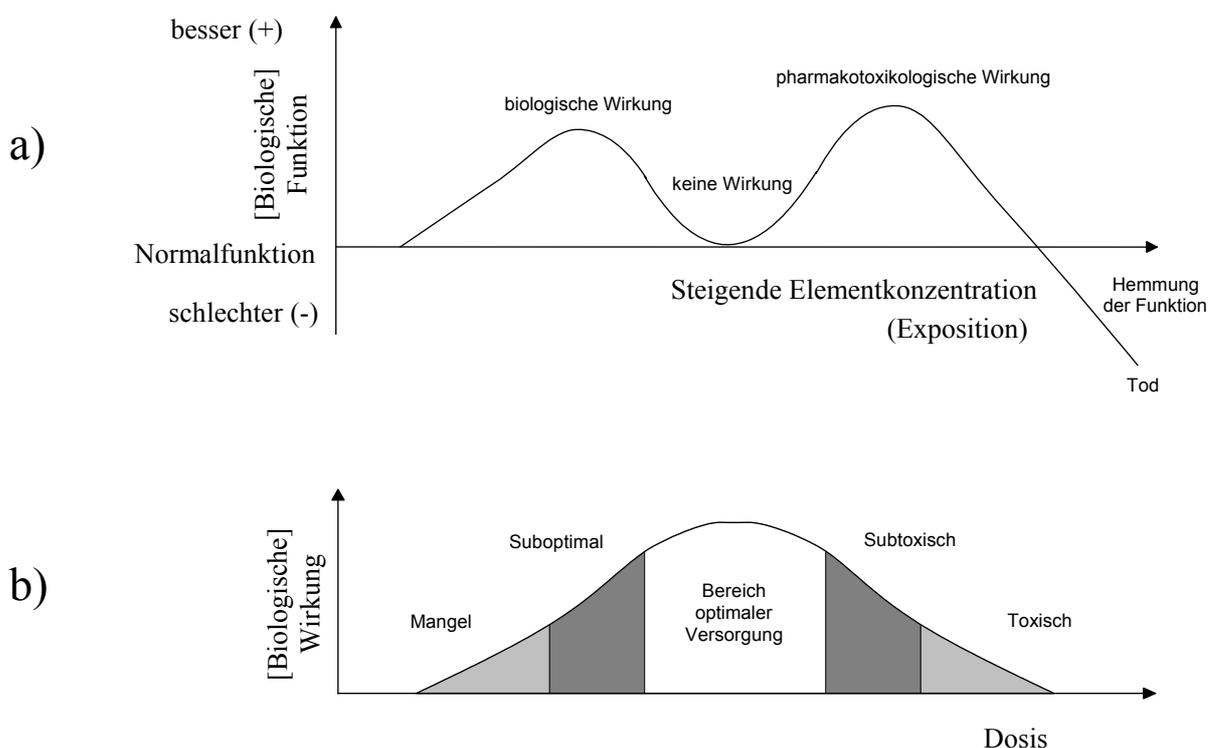


Abb. 2: Dosis- Wirkungsbeziehungen für essentielle Spurenelemente: a) Zweiphasige Kurve nach Venchikov [20] b) universelle Dosis-Wirkungsbeziehung (nach [21]). Verdeutlichende Kommentare sind in eckigen Klammern hinzugefügt worden.

Kirchgeßner und Reichlmayr-Lais [22] beschreiben in Bezug auf den Bedarf fünf typische Stufen der Zufuhr entlang ansteigender Dosis:

1. **Mangel:** Verbunden mit der Entwicklung klinischer Symptome.
2. **Suboptimal oder marginal:** Metabolische Defekte sind offensichtlich.
3. **Optimal**
4. **Subtoxisch:** Biochemische Defekte beginnender Toxizität entwickeln sich.
5. **Toxisch:** Klinische Symptome sind etabliert.

Die Dosis- Wirkungsbeziehung unterscheidet sich zwischen den einzelnen essentiellen Spurenelementen stark hinsichtlich der absoluten Konzentration und der Konzentrationsdifferenz zwischen Mangel und Toxizität.

Von den Alkali- Kationen abgesehen, hängt die physiologische Wirkung sämtlicher Elemente nicht von ihren absoluten Konzentrationen, sondern von der Konzentration bzw. „Aktivität“ der chemischen Bindungsformen (genannt Spezies, chemische Spezies oder Elementspezies) ab, in der sie im jeweils betrachteten System vorliegen [23]. Nach IUPAC werden „chemische Spezies“ (in diesem Zusammenhang auch „Spezies“ genannt), als die spezifische Form eines Elements in Hinblick auf seine Isotopenzusammensetzung, seinen elektronischen- oder Oxidationszustand, und/oder seine Komplex- oder Molekülstruktur definiert¹. Weiterhin wird der Begriff „Speziation“ definiert als die Verteilung eines Elementes unter definierten chemischen Spezies in einem System² [24]. Es ist offensichtlich, daß sich die Begriffe „Essentialität“ und „Toxizität“ sowie die physiologischen Wirkungen von Elementen, wie sie in „Dosis-Wirkungsbeziehungen“ dargestellt werden können, stets auf konkrete chemische Spezies beziehen und *nicht* auf die absoluten Konzentrationen eines chemischen Elements, wie sie beispielsweise durch atomspektrometrische Methoden bestimmt werden. Die Kenntnis der innerhalb und außerhalb des Organismus vorliegenden Elementspezies ist also eine wichtige Voraussetzung für die Beurteilung seiner Versorgungssituation.

¹ „Chemical species. Chemical elements: specific form of an element defined as to isotopic composition, electronic or oxidation state, and/or complex or molecular structure“.

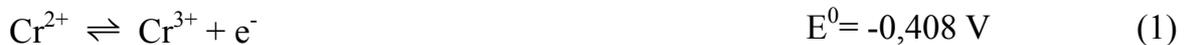
² „Speciation of an element; speciation. Distribution of an element amongst defined chemical species in a system“.

2.2.2. Chemie des Chroms

Chrom findet sich in der Natur in unterschiedlichen Konzentrationen praktisch überall in Boden, Wasser, Luft und in allen biologischen Geweben [25]. In der Rangliste der Häufigkeit der Elemente der Erdkruste nimmt Chrom mit einem mittleren Gehalt von 0,0064% (entsprechend 64 mg/kg) [26]) den 21. Platz ein [27] und ist damit häufiger als z.B. Kupfer oder Zink. Da nur wenige geochemische Anreicherungsmechanismen existieren, gibt es nur wenige Lagerstätten, und Chrom kommt relativ gleichmäßig verteilt im Gestein vor [28]. Im Boden werden Chromgehalte von 10 bis 150 mg/kg angegeben [29]. Allerdings kann der Chromgehalt lokal (z.B. in Serpentin) auch wesentlich höher sein [30]. Im Seewasser wird ein mittlerer Chromgehalt von $0,3\mu\text{g/L}$ angegeben, während die Konzentrationen im Süßwasser sehr von lokalen Gegebenheiten (Geologie, anthropogene Kontaminationen) abhängen [31]. In der Natur kommt Chrom fast ausschließlich in der dreiwertigen Form vor, abbauwürdige Vorkommen finden sich nur in Form von Chromeisenstein (Chromit) FeCr_2O_4 , einem schwarzen Spinell mit Cr^{3+} -Ionen in oktaedrischen und Fe^{2+} -Ionen in tetraedrischen Lücken der kubisch-dichtesten Kugelpackung von O^{2-} -Ionen. Chromit ist ausschließliche Quelle für die großtechnische Verwendung von Chrom als Metall, zur Legierung von Eisen und zur Herstellung von Chromverbindungen [26]. Die Fördermenge von Chromit wird für 1998 weltweit auf 14,2 Mt geschätzt, wovon allein 7 Mt auf Südafrika entfallen. Die Hauptmenge von Chromit (1998 ca. 10,8 Mt) wird zur Erzeugung von Ferrochrom ($\text{Fe}^*\text{2Cr}$) als Bestandteil von legierten Stählen eingesetzt. Lediglich 1,0 Mt (8%) dienen der Erzeugung von Chemikalien [32].

Chrom, Atomnummer 24, findet sich in der 16. Gruppe des Periodensystems (VIa) und ist mit der Elektronenkonfiguration $(\text{Ar})3\text{d}^54\text{s}^1$ ein typisches Übergangsmetall. Obwohl formal Oxidationsstufen von -IV bis +VI denkbar sind, ist Cr in Oxidationsstufen $< +\text{II}$ nur unter extremem Luft- und Feuchtigkeitsausschluß stabil, so daß in natürlichen Systemen (neben metallischem Chrom) nur die Oxidationsstufen von +II bis +VI auftreten können. Von Chromverbindungen der Oxidationsstufe +IV und +V sind nur einige wenige Verbindungen bekannt. Diese Oxidationsstufen haben allerdings eine gewisse Bedeutung als kurzlebige Zwischenprodukte bei der Reduktion von Cr(VI).

Durch sein negatives Redoxpotential ist Chrom(II) ein starkes und schnell wirkendes Reduktionsmittel (jeweils Normalbedingungen, Aktivität der Lösungen 1 Mol/L, 25°C)



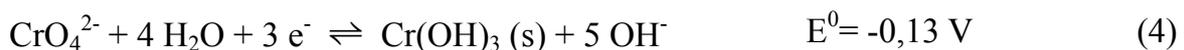
das selbst unter strikt anaeroben Bedingungen langsam Wasser unter Bildung von Wasserstoff reduziert. Thermodynamisch sollten allerdings reine, neutrale wäßrige Lösungen von Cr^{2+} unbegrenzt haltbar sein, da die Redoxpotentialdifferenz gegenüber der Normalwasserstoffelektrode bei pH 7 (E^0) von $\text{H}_2 = -0.414 \text{ V}$ beträgt [26]. Während Cr(II) und Cr(III)- Ionen in wäßriger Lösung als hydratisierte Kationen existieren, kommt das hochgeladene Cr(VI) ausschließlich in Form von Oxoverbindungen des Typs CrO_4^{2-} (Chromat), $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ (Dichromat) und CrO_3 (Chrom(VI)-Oxid) vor [26]. Chromate sind die Salze der Chromsäure $\text{H}_2\text{CrO}_4^{2-}$ mit $\text{pK}_{\text{S}1} = -0.6$ und $\text{pK}_{\text{S}2} = 5.9$; Chromat und Dichromat liegen im Gleichgewicht vor:



In nicht zu verdünnten, sauren Lösungen existiert daher vornehmlich Dichromat, während im alkalischen Bereich und in stark verdünnten Lösungen generell Chromat dominiert. Die Oxidationskraft des Dichromat- Ions wird in saurer Lösung (pH=0) durch den Vorgang



und in alkalischer Lösung (pH=14) durch den Vorgang



bestimmt.

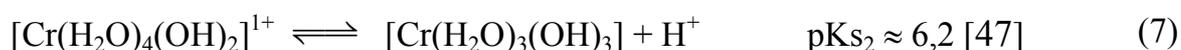
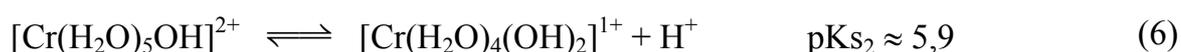
ist Cr(III) die dominierende Form von Chrom in der Natur. Chrom(III) mit der Elektronenkonfiguration $(Ar)3d^34s^0$ bildet zahlreiche, im allgemeinen oktaedrische paramagnetische low-spin Komplexe, in denen die t_{2g} -Niveaus jeweils halbbesetzt sind. Cr^{3+} wurde von Pearson aufgrund seiner hohen Ladung und seines Reaktionsverhaltens gegenüber Basen in die Gruppe der „Klasse a“ oder „harten“ Kationensäuren eingeordnet [36]. Nieboer und Richardson formalisierten die Kriterien von Pearson und stuften Cr^{3+} zusammen mit Fe^{3+} als „Borderline“ zwischen den „Klasse A“ und „Klasse B“-Kationen ein [37]¹. Chemisch ähnelt Chrom(III) dem Verhalten von Eisen(III) einerseits und Gallium(III) Scandium(III) und Aluminium(III) andererseits. Bei diesem Vergleich ist allerdings zu beachten, daß Gallium, Scandium und Aluminium nicht zu den Übergangsmetallen gehören, so daß bei diesen Elementen mangels energetisch günstiger, verfügbarer d-Orbitale keine zusätzliche Stabilisierung durch Komplexbindungen erfolgen kann. Gallium(III), Aluminium(III) und Scandium(III) bilden daher in der Regel keine stabilen Verbindungen mit Donor-Liganden wie Schwefel und Stickstoff, es sei denn, daß eine zusätzliche Stabilisierung durch Chelatbildung erfolgen kann. Im chemischen Trennungsgang der Elemente werden mittels Urotropin Chrom(III), Eisen(III) und Aluminium(III) zusammen (mit Beryllium(II)) als Hydroxide gefällt [38]. Der deutliche „Klasse A“-Charakter von Cr(III) zeigt sich ebenso wie der von Fe(III) in der Stabilität von Komplexen mit unterschiedlichen Donoren in der Reihenfolge $F^- > Cl^- > Br^-$ und O-Donoren $>$ S-Donoren [39]. Fe(III) und Cr(III) binden ähnlich wie Al(III), Ca(II) und Mg(II) in biologischen Systemen vor allem an Sauerstoff-Zentren [34].

Eine der hervorstechendsten Eigenschaften von Verbindungen des Cr(III) ist die außerordentlich große kinetische Reaktionsträgheit gegenüber Substitutionsreaktionen am Koordinationszentrum, die nur noch von Ru^{3+} , Rh^{3+} und Co^{3+} übertroffen wird [40][41]. So beträgt die Halbwertszeit des koordinativ gebundenen Wassers im Fall von $[Cr(H_2O)_6]^{3+}$ ca. 80 Stunden, während sie für $[Fe(H_2O)_6]^{3+}$ im Bereich von Millisekunden [42], für zweiwertige Kationen wie Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} oder Mg^{2+} sogar im Bereich von Mikro- oder Nanosekunden liegt. Diese ungewöhnlich große Reaktionsträgheit der d^3 -Konfiguration des Cr(III) ist vor allem im unverzerrten oktaedrischen

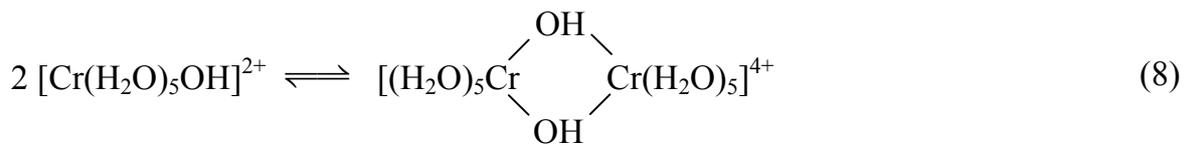
¹ Tatsächlich wird in ihrer Veröffentlichung nur Cr^{2+} , nicht aber Cr^{3+} aufgeführt. Die Zuordnung von Cr^{3+} entsprechend ihren Kriterien ergibt für Cr^{3+} ebenso wie für Cr^{2+} eine Einstufung als „Borderline“-Kation in enger Nachbarschaft zu Ga^{3+} und etwa auf halben Weg zwischen dem „Borderline“-Kation Fe^{3+} und dem „Klasse A“-Kation Al^{3+} .

Ligandenfeld zu beobachten. So ist der Austausch von Wasser im Monohydroxy- Kation $[\text{CrOH}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ mit einer Halbwertszeit von ca. 1 Stunde gegenüber dem Hexaaqua- Kation $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ um den Faktor 80 schneller (bei $[\text{FeOH}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ allerdings ist die Beschleunigung gegenüber $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ sogar 750-fach [42]). Vermutlich aufgrund einer vorausgehenden Ionenpaarbildung zwischen den Reaktionspartnern ist der Austausch von koordinativ gebundenem Wasser im Chrom- Hexaaqua- Komplexes gegen Glyzin unter Bildung des Chrom- Monoglyzinato- Komplexes beschleunigt [43]. Unter bestimmten Bedingungen, in einem anisotropen Ligandenfeld oder bei speziellen elektronischen Verhältnissen, kann die Reaktionsgeschwindigkeit von Chrom(III)- Komplexen noch stärker beschleunigt werden. So wird durch Anwesenheit von Kohlendioxid als Katalysator die Austauschgeschwindigkeit von H_2O in $[\text{Cr}(\text{NH}_3)_5^{18}\text{OH}]^{2+}$ um den Faktor 30 gesteigert [44]. Substitutionsreaktionen an Cr-Porphinkomplexen laufen um einen Faktor 10^3 bis 10^4 schneller ab als Polykondensationsreaktionen am Cr- Zentrum [45]. Andere Beispiele werden für Komplexe mit Schiff- Basen und $[\text{Cr}(\text{EDTA})\text{H}_2\text{O}]$ genannt [46].

Wie andere dreiwertige Kationen unterliegt auch das Hexaaquachrom(III)- Kation der Hydrolyse und ist damit eine Kationensäure:



Hinsichtlich der Säurestärke in der ersten Dissoziationsstufe steht Cr^{3+} zwischen Fe^{3+} ($\text{pKs}_1 \approx 2,7$) [47] und Aluminium ($\text{pKs}_1 \approx 5,0$) [48]. Ob das ungeladene Trishydroxokation $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{OH})_3]$ wie von Rai et al. behauptet [49] in realen Systemen tatsächlich in nennenswerten (wie in Abb. 2 gezeigt) oder nur in geringen [50] Konzentrationen auftritt, ist umstritten. Allgemein wird angenommen [41], daß das schon bei pH-Werten von wenig über 4 zunächst gebildete Hydroxokation $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_5\text{OH}]^{2+}$ rasch weiter zum Hydroxo- verbrückten, zweikernigen Dimer [51][52]



und bei weiterer Basenzugabe zunächst in komplizierter Weise über das Trimer und Tetramer zu höheren mehrkernigen Polykondensaten weiterreagiert (Abb. 4),

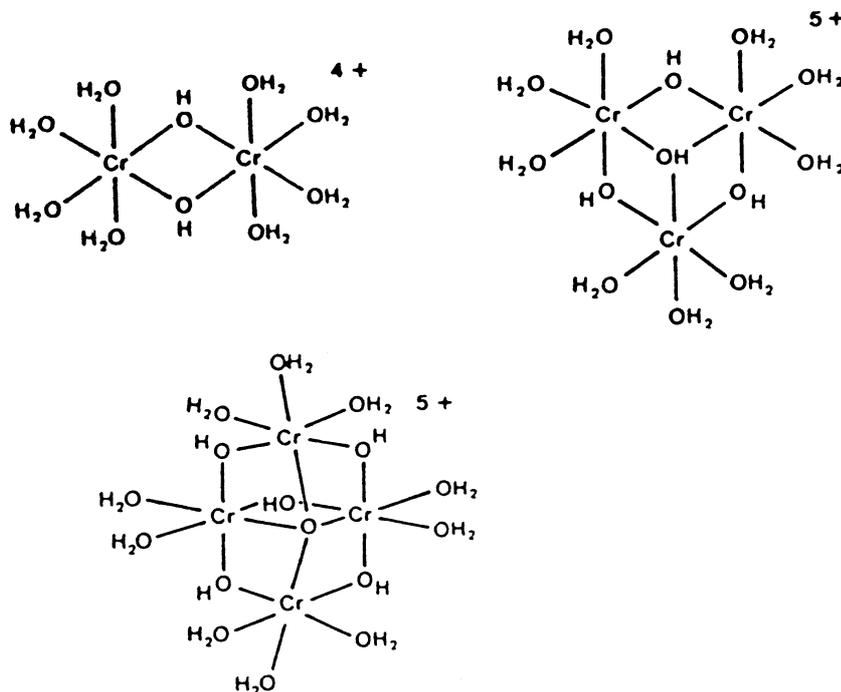


Abb. 4: Dimer, Trimer und Tetramer von Cr(III)-Hydroxid [53].

bevor schließlich Chrom(III)-Hydroxide ausfallen. Die Bildung von hydroxo- und oxoverbrückten Oligo- und Polykondensaten („Olation“) ist ein wesentliches Motiv der wässrigen Chrom(III)-Chemie [54]. Der Kern des „basischen Cr(III)-Azetats“ mit der Formel $[\text{Cr}_3\text{O}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_6(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ z.B. besteht wie in Abb. 5 dargestellt aus einem durch jeweils zwei Azetat-Liganden verbrückten, gleichseitigen Dreieck aus Cr(III)-Ionen mit einem O-Atom im Zentrum [41][55]:

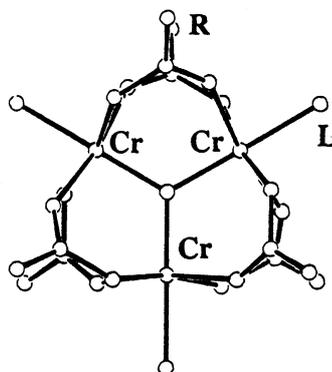


Abb. 5: Struktur des Triaqua-hexa- μ -acetato- μ_3 -oxo-trichrom(III)-Kations ($[\text{Cr}_3(\mu_3\text{-O})(\mu\text{-O}_2\text{CCH}_3)_6(\text{H}_2\text{O})_3]^+$) (Wasserstoff-Atome wurden zur Verbesserung der Übersichtlichkeit weggelassen).

Aufgrund des Massenwirkungsgesetzes ist allerdings anzunehmen, daß die Bildung von Kondensationsprodukten von Cr(III) gegenüber anderen Substitutionsreaktionen am Cr(III)-Zentrum nur bei höheren Chromkonzentrationen und in Abwesenheit alternativer Reaktionspartner begünstigt ist. Bei sehr niedrigen Chromkonzentrationen und bei gleichzeitiger Anwesenheit ausreichender Mengen an Basen, Bedingungen, wie sie in biologischen Systemen vorherrschen, erscheint die spontane Bildung von Di- oder Oligomeren eher unwahrscheinlich.

Das niedrige Löslichkeitsprodukt von „Cr(OH)₃“ (pL = 30,2) ähnlich wie das von Fe(OH)₃ (pL = 37,4) [56] zeigt, daß das Gleichgewicht der Reaktion



stark auf der rechten Seite liegt. Olation und der Angriff von Hydroxidionen sind daher wirksame Konkurrenzreaktionen gegenüber der Bildung von Chrom(III)-Komplexen mit anderen Basen und erklären die Instabilität vieler Cr(III)-Komplexverbindungen bei höheren pH-Werten. Weniger stabile Chrom(III)-Komplexverbindungen können daher thermodynamisch nur bei niedrigeren pH-Werten existieren und tendieren oberhalb von pH 7 zum Zerfall. Dies gilt für allem, wenn labile Aqua-Liganden Bestandteil des Komplexes sind, da diese nach (8) im Sinne einer Olation reagieren können.

2.2.3. Chemie des dreiwertigen Chroms in biologischen Systemen

Über das Verhalten von Chrom(III) in biologischen Systemen ist verhältnismäßig wenig bekannt. Kennzeichnend ist seine große thermodynamische Stabilität. Innerhalb des Cytosols herrscht, kontrolliert durch die Anwesenheit reduzierender Substanzen wie vor allem Glutathion und NADPH, ein reduzierendes Milieu mit einem Potential zwischen -180 und -260 mV vor [57]. Zusätzlich existieren in verschiedenen Zellkompartimenten reduzierende Substanzen wie Ascorbinsäure [58], Cystein, Ribose, Fruktose und Arabinose. Weiterhin können eine Vielzahl von enzymatischen und nichtenzymatischen Faktoren als Reduktionsmittel wirken. Dazu gehören Mikrosomen, Mitochondrien, Cytochrom P-450, Cytochrom b_5 (der Elektronentransportkomplex der inneren Mitochondrienmembran) und einige Flavoenzyme wie Glutathionreduktase, Lipoyldehydrogenase und Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase [59][60]. Ein Blick auf das Pourbaix-Diagramm von Chrom (Abb. 3) zeigt, daß im Bereich des cytosolischen Redoxpotentials ausschließlich Chrom(III) thermodynamisch stabil ist. Intrazellulär wäre allerdings auch ein Auftreten von Chrom(II) denkbar: Das Redoxpotential des Redoxpaares Cr(II)/Cr(III) beträgt nach (1) -0,408V und liegt damit bei pH 7 in der Nähe des Redoxpotentials H_2/H^+ von -0.414 V. Die wichtigen intrazellulären Ferredoxine (Redoxsysteme auf der Basis von Eisen-Schwefel-Proteinen), wie z.B. die Ferredoxin-NADP-Reduktase, besitzen Redoxpotentiale noch unterhalb dieses Wertes [61] und sind daher thermodynamisch in der Lage, Chrom(III) zu Chrom(II) zu reduzieren. Nimmt man darüber hinaus an, daß das Redoxpotential des Redoxpaares Cr(II)/Cr(III) durch Komplexbildung weiter angehoben werden kann, könnte die intrazelluläre Reduktion von Chrom(III) stark erleichtert werden. Ozawa und Hanaki konnten *in vitro* die Reduktion von Chrom(III) zu Chrom(II) mittels $H_2O_2/NADH$, $H_2O_2/Glutathion$ und H_2O_2/L -Cystein nachweisen [62]. Ähnlich zeigten Sugden et al., daß das Redoxpotential Cr(II)/Cr(III) in Cr(III)-Bipyridyl- und Phenanthrolinkomplexen zu positiveren Werten verschoben wird und damit prinzipiell in die Reichweite zytosolischer Reduktionsmittel wie NAD(P)H, Glutathion und Ascorbinsäure kommt [63]. Obwohl diese Beobachtungen zunächst mehr in Hinblick auf eine toxikologische Bedeutung von Chrom(III) interpretiert wurden, könnte im Mechanismus einer intermediären, intrazellulären Reduktion von Chrom(III) eine Möglichkeit bestehen, im Sinne einer „metabolischen Aktivierung“ die außerordentliche Reaktionsträgheit von Chrom(III)

hinsichtlich eines Ligandenaustauschs zu überwinden, da diese bei Cr(II) nicht besteht. In ähnlicher Weise wäre durch metabolisch gebildetes H_2O_2 intermediär eine Oxidation von Cr(III) über Cr(IV) und Cr(V) bis hin zum Cr(VI) und damit die Bildung karzinogener Chromspezies denkbar [55][64].

Tatsächlich konnten bisher für derartige Reduktions- und Oxidationsvorgänge von Chrom(III) in lebenden Zellen keine Belege gefunden werden [65]. Da in der Natur praktisch ausschließlich Cr(III) vorkommt, ist die Biochemie von Chrom nach gegenwärtigem Wissensstand auf diese Oxidationsstufe beschränkt. Das Interesse am Metabolismus vom ausschließlich anthropogenen Cr(VI) ist demgegenüber von toxikologischen und pharmakologischen Interessen geleitet, da seine Beteiligung am natürlichen Stoffwechselgeschehen praktisch ausgeschlossen werden kann.

Für eine Einschätzung des Verhaltens von dreiwertigem Chrom in biologischen Systemen ist es sinnvoll, Vergleiche zu Ionen mit ähnlichen chemischen Eigenschaften heranzuziehen. In Tabelle 1 sind charakteristische Parameter zusammengestellt:

Kation:	Al³⁺	Ga³⁺	Sc³⁺	Cr³⁺	Fe³⁺
Ionenradius [pm]:	51	62	73	62	64 ¹ /55 ²
Ladungsdichte z/r (*10²):	5,88	4,83	4,11	4,83	4,68 ¹ /5,45 ²
Koordinationszahl:	(4),6	6	6	6	6

¹high-spin; ²low-spin

Tabelle 1: Chemische und physikalische Eigenschaften von Cr³⁺ und ähnlichen Ionen [66].

Alle aufgeführten Ionen weisen durch ihre hohe Ionenladung eine hohe Ladungsdichte auf. Bindungen mit „harten“ Basen (siehe Kapitel 2.2.2) sollten daher grundsätzlich bevorzugt werden. Die größten Ähnlichkeiten hinsichtlich der Ladungsdichte weisen Cr³⁺ und Ga³⁺ auf. Gallium ist allerdings in der Erdkruste deutlich seltener als Chrom; eine Bedeutung in biologischen Systemen wurde bisher nicht nachgewiesen. ⁶⁷Ga wird in der Medizin als Zitratlösung gelegentlich bei der „Gallium-Szintigraphie“ zur Darstellung von Tumoren und Entzündungsherden eingesetzt, und diese Form der Ver-

abreichung wurde meist auch in Untersuchungen zu seinem metabolischen Verhalten in Tierversuchen gewählt [66]. Seine niedrige Halbwertszeit von 78 Stunden erlaubt allerdings keine Langzeitstudien. Als Hauptgruppenelement ermöglicht Gallium nicht die Bildung von stabilen Komplexverbindungen, es sei denn, daß eine zusätzliche Stabilisierung durch Chelatbildung erreicht wird. In dieser Konfiguration erfahren allerdings vergleichbare Komplexe des Eisens(III) und Chroms(III) ebenfalls eine weitere Stabilisierung, so daß Gallium(III) als Bindungspartner im direkten Vergleich mit Chrom(III) und Eisen(III) nicht „konkurrenzfähig“ ist. Insgesamt gesehen sind die Kenntnisse über den Metabolismus von Gallium sehr gering, zumal diesem Element auch aufgrund einer fehlenden ökotoxikologischen Bedeutung in der Vergangenheit wenig biochemisches Interesse entgegengebracht wurde.

Anders sind die Verhältnisse beim Aluminium. Aluminium als Hauptgruppenelement ist zwar prinzipiell gleichfalls kaum in der Lage, stabile Komplexverbindungen zu bilden. Dieses elektronische „Defizit“ wird allerdings durch die hohe Ladungsdichte des relativ kleinen Aluminium- Kations teilweise wieder ausgeglichen. Vor allem mit harten Basen, zu nennen ist hier insbesondere Sauerstoff, werden sehr stabile Verbindungen überwiegend der Koordinationszahlen 4 und 6 gebildet. Eine geringere Affinität von Aluminium(III) gegenüber der Base Stickstoff und die fehlende Stabilisierung durch Komplexbindungen sollte gegenüber Chrom zumindest teilweise durch die wesentlich größere Häufigkeit von Aluminium in Umwelt und Lebensformen ausgeglichen werden können (durchschnittliche Konzentration in der Erdkruste: Aluminium 73000 µg/g, Eisen 33800 µg/g, Chrom 64 µg/g [26]; im Blutserum: Aluminium 6 µg/L, Eisen ~ 1000 µg/L, Chrom 0,17 µg/L [67]). Aluminium ist in der Erdkruste eines der häufigsten Elemente und findet breite technische Verwendung. Die auf Mobilisierung von bodengebundenem Aluminium zurückgeführten Umweltschäden durch „sauren Regen“ und Vergiftungsfälle nach langjähriger Dialyse mit Aluminium- haltigem Wasser („Dialysis Encephalopathy Syndrome“, „Dialysis Osteomalacia“) sowie die Möglichkeit einer ursächlichen Beteiligung von Aluminiumionen an der Entstehung von *Morbus Alzheimer* [66] haben zu einer Intensivierung der Erforschung der Biochemie dieses Elements geführt. Gleichwohl sind die Kenntnisse über den Stoffwechsel von Aluminium(III) noch sehr lückenhaft. Der Mechanismus der durch Aluminiumionen bedingten toxischen Schädigungen beim Menschen und im Pflanzenreich bis hin zur Hefe liegt bis heute weitgehend im Dunkeln.

Aufgrund der Ähnlichkeiten im Ionenradius und ihrer besonderen Eigenschaften als Übergangselement weisen Chrom(III) und Eisen(III) chemisch insgesamt die größten Gemeinsamkeiten auf. Beide binden mit hoher Affinität sauerstoff- und stickstoffhaltige und mit geringerer Affinität schwefelhaltige Liganden. Beide werden aus ihren Salzlösungen im Bereich physiologischer pH- Werte als mehrkernige, biologisch nicht direkt verwertbare Hydroxide aufgefällt (siehe Kapitel 2.2.2). Jede biologische Verwertung von Cr^{3+} und Fe^{3+} setzt daher eine Mobilisierung dieser Ionen in Form löslicher, bei pH- Werten um 7 stabiler Verbindungen voraus. Tatsächlich binden alle bisher bekannten physiologischen Eisen(III)- Transportmoleküle in hoher Affinität auch Chrom(III). Dies gilt für die vor allem in Prokaryonten vorhandenen Siderophore ebenso wie für die in Pflanzen vorhandenen, relativ unspezifisch Eisen bindenden Phytochelatine als auch für das im Tierreich vorhandene Transferrin [68][69]. Da die Freisetzung von Eisen in den Eisen- Transportmolekülen aufgrund der sehr hohen Stabilität dieser Verbindungen teilweise die Reduktion von Fe(III) zu Fe(II) voraussetzt, ist zu erwarten, daß Chrom(III) aufgrund des wesentlich stärker negativen Redoxpotentials von Cr(II) (E^0 von Cr(II)/Cr(III) = -0,408 V (Gleichung (1)) gegenüber +0.77 V für Fe(II)/Fe(III) bei pH= 7 [70]) aus der Bindung dieser „Eisenträger“ nicht in gleicher Weise wie Fe(III) freigesetzt werden kann.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen Chrom(III) und Eisen(III) besteht außer im negativeren Redoxpotential des Redoxpaares Cr(II)/Cr(III) gegenüber Fe(II)/Fe(III) in der großen Reaktionsträgheit des dreiwertigen Chroms (Kapitel 2.2.2). Es ist daher nicht zu erwarten, daß Chrom(III) in irgendeiner Weise die Funktion von dreiwertigem Eisen übernehmen kann. Darüber hinaus ist die direkte Beteiligung von Chrom(III) an katalytischen Prozessen im aktiven Zentrum von Enzymen aufgrund der Reaktionsträgheit von Chrom- Komplexen eher unwahrscheinlich. Mertz [71] hat daher gemutmaßt, daß die biologische Rolle von Chrom vor allem in einer mehr strukturellen Funktion wie z.B. der Bindung von Hormonen an ihren Rezeptor oder die Stabilisierung der Tertiärstruktur von Proteinen oder Nukleinsäuren liegen könnte.

Im Gegensatz zu ein- und zweiwertigen Kationen und zu Eisen(III) ist für Chrom(III) ebenso wie für Aluminium(III) kein Mechanismus der zellulären Aufnahme bekannt. Entsprechend sind die intrazellulär vorkommenden Chromkonzentrationen in allen bekannten Fällen sehr gering, und der „Biokonzentrationsfaktor“ ist stets kleiner 1. Entgegen anderslautenden Berichten gilt dies auch für Bierhefe (s.u.). Chrom(III) wird

also in allen bisher untersuchten Fällen aus den Lebewesen ausgeschlossen; eine intrazelluläre Anreicherung findet nicht statt. Da allerdings in allen Lebensformen dennoch Chrom in geringen Konzentrationen aufgefunden wird, muß, ähnlich wie beim Aluminium, ein bisher nicht bekannter Mechanismus vorliegen, durch den dreiwertiges Chrom in die Zelle gelangt.

Erkenntnisse über das chemische Verhalten von Chrom(III) in biologischen Systemen kommen daher vor allem aus *in vitro*- Versuchen. Das dreiwertige Chrom- Kation bildet mit nahezu allen in biologischen Systemen vorkommenden Molekülen spezifisch oder unspezifisch Komplexe unterschiedlicher Stabilität. So wurde die Bindung von Chrom(III) an Di- und Polyphosphat , Azetat [55], Oxalat , Ziträt und Zuckern [72] beschrieben. Zahllose Komplexe mit Aminosäure- Liganden konnten präpariert werden. Wie für ein „Borderline“- Kation (Kapitel 2.2.2) zu erwarten, komplexieren natürliche α -Aminosäuren sowohl über über das N-Atom der α -Aminogruppe und das α -Carboxylat als auch über das S-Atom von Seitenketten- Sulfhydrylfunktionen (L-Cystein, D-Penicillamin), das heterozyklische Imidazol- N- Atom des Histidins und wahrscheinlich das O-Atom des β -Carboxylats von Asparaginsäure [34]. Die Komplexierung von L-Cystein zum $\text{Cr}(\text{L-cys})_2^-$ Anion zeigt den deutlichen „Klasse A“- Charakter [37] von Chrom(III): in saurer Lösung unterliegt das Anion einer sauren Hydrolyse, wobei die zunächst vorhandene Cr-S- Bindung gespalten und durch je ein Wassermolekül ersetzt wird, während die α -Amino- und α -Carboxylato- Funktionen unverändert bleiben [60]. Generell ist die Bindungsstärke von Chrom(III) zu Schwefelliganden gering . Ähnlich zeigt Chrom wenig Affinität zu den N-Donorzentren von Nukleotiden [73] und bindet an die Phosphat- Reste der Nukleotide und Polynukleotide [74][75], wobei katalytisch aktives Magnesium verdrängt werden kann. Entsprechend komplexieren Proteine Chrom(III) unspezifisch vornehmlich über freie Carboxylatgruppen [34][76]. Spezifisch hingegen wird Chrom an einer Metallbindungsstelle von Transferrin, dem wesentlichen Eisentransportprotein im Blutserum, gebunden [77].

2.2.4. Das Vorkommen von Chrom(III)- Spezies in biologischen Matrices

Die Mehrzahl der Erkenntnisse über das Verhalten von Chrom(III) in biologischen Systemen entstammt theoretischen Überlegungen oder den Erkenntnissen aus *in vitro*-Versuchen. Über das tatsächliche Verhalten von Chrom in Lebewesen ist nur wenig bekannt. So konnte bisher nur eine verschwindend geringe Anzahl von Chromkomplexen aus biologischen Systemen isoliert und identifiziert werden. Aufgrund der grundsätzlichen Ähnlichkeit aller eukaryontischen Lebewesen ist zu erwarten, daß das Wissen über deren Wechselwirkungen mit Chrom, insbesondere in seiner dreiwertigen Form, direkte Relevanz auch für das Verhalten von Chrom in Bierhefe hat. Umgekehrt stellt die Frage nach dem Vorkommen des dreiwertigen Chroms in Bierhefe lediglich einen Sonderfall einer mehr übergeordneten Fragestellung hinsichtlich der allgemeinen biologischen Bedeutung dieses Elements dar. Die zur Speziation von Chrom in anderen Lebensformen eingesetzten Verfahren sollten sich grundsätzlich auch zur Speziation von Chrom in Bierhefe eignen.

Befördert von den Untersuchungen zur Bedeutung von Chrom als essentiellm Spurenelement (siehe Kapitel 2.2.5) und Fragestellungen in Hinblick auf die Toxizität von Chrom(VI) wurden seit Ende der sechziger Jahre eine Reihe von Versuchen unternommen, den Metabolismus von Chrom in den Oxidationsstufen +III und +VI in einer Reihe von Lebensformen zu verfolgen. Ein Teil dieser Versuche orientierte sich methodisch an den vorgeschlagenen Verfahren zur Isolation des chromhaltigen „Glukosetoleranzfaktors“, wie sie in Kapitel 2.2.6 beschrieben werden. Um den Chromgehalt analytisch verfolgen zu können, wurden entweder die zu untersuchenden Spezies selber „*in vivo*“ oder ihre Extrakte „*in vitro*“ mit Chrom(III) (meist in Form des Chlorids CrCl_3) oder Chrom(VI) (als $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ oder K_2CrO_4 , Na_2CrO_4) „kalt“ oder mit radioaktivem ^{51}Cr markiert eingesetzt. Dabei wurden meist supraphysiologische Chrommengen verwendet. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der bis 1999 durchgeführten und in englischer, französischer oder deutscher Sprache veröffentlichten Arbeiten. Nicht erfaßt wurden Veröffentlichungen, die lediglich als „Abstract“ erschienen sind oder bei denen die Extraktions- und Isolationsprozedur nicht beschrieben wurde:

Tabelle 2: Versuche zur Isolation biogener Chromverbindungen (bis 1999, ohne Hefe)

	Jahr	Spezies:	Beladung:	Start-material:	Extraktion und Aufreinigung:	Cr-Best.:	Fractionen: [MW, Ladung]	Ref.:
Lyon et al.	1969	Leptospermum scoparium (Südseemyrte)	Cr(VI)	trocken	EtOH 80% Elektrophorese	⁵¹ Cr	$[\text{Cr}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]^{3-}$ $[\text{Cr}(\text{C}_2\text{O}_4)_2]^-$	[90]
Huffman et al.	1973	Phaseolus vulgaris (Bohne)	Cr(VI)	nativ	Puffer/H ₂ O Sephadex G10 Elektrophorese	⁵¹ Cr	1*(-) 500-3000	[78]
Blincoe	1974	Medicago sativa L. (Luzerne)	Cr(VI)	nativ	H ₂ O Sephadex G25 DEAE-Cellulose/HPO ₄ ²⁻ Elektrophorese	⁵¹ Cr	1*(-) ~2900	[79]
Lahouti et al.	1979	Brassica oleracea L. var. botrytis cauliflora (Blumenkohl)	Cr(III) Cr(VI)	nativ	H ₂ O EtOH 80% Elektrophorese	⁵¹ Cr	3*(-)	[80]
Yamamoto et al.	1981	Maus	Cr(VI)	nativ	Puffer/H ₂ O DEAE-Sephadex/HPO ₄ ²⁻ Sephadex G-15 TLC	GFAAS	2*(-) 1600,2600	[92]
Starich et al.	1982	Medicago sativa L. (Luzerne)	Cr(VI) Cr(III)	nativ	Sephadex G-25 DEAE-Sephacel/HPO ₄ ²⁻	⁵¹ Cr GFAAS	(-) ~3000	[81]
Starich et al.	1983	Medicago sativa L. (Luzerne)	Cr(VI) Cr(III)	nativ	Sephadex G-25 DEAE-Sephacel/HPO ₄ ²⁻	⁵¹ Cr GFAAS	(-) ~2600	[82]
Wada et al.	1983	Hund	Cr(VI)	nativ	H ₂ O DEAE-Cellulose/NH ₄ Cl Dowex 50W/NH ₄ Cl Sephadex G-15	?	(-) 1500	[93]
Yamamoto et al.	1987	Kaninchen	Cr(VI)	nativ	EtOH 90% DEAE-Sephadex A-25/NH ₄ Ac Sephadex G-25 Sephadex G-15	GFAAS	(-) 1500	[83]
Denniston et al.	1987	CHO-Zellen (in vitro)	Cr(VI)	nativ	PBS TSK DEAE 5-PW/Tris/NaCl HPLC-RP18/TBAOH	⁵¹ Cr	Cr-rNTP (-) Cr-GSH (-)	[84]

Suzuki	1987	Blutplasma (Ratte) in vitro	Cr(VI) Cr(III)	nativ	Mono Q HR 5/5/Tris/NaCl	AAS	2*(-)	[85]
		Erythrozyten-Lysat in vitro	Cr(VI) Cr(III)	nativ	Mono Q HR 5/5/Tris/NaCl	AAS	5*(-)	
		Leberzellen-Zytosol in vitro	Cr(VI) Cr(III)	nativ	Mono Q HR 5/5/Tris/NaCl	AAS	7*(-)	
Yamamoto et al.	1988	Rinder-Colostrum		nativ	EtOH 90% DEAE-Sephadex A-25/NH ₄ Ac Sephadex G-25 Sephadex G-15	GFAAS	(-) 1500	[86]
Borguet et al.	1990	Blutplasma (Ratte)	Cr(III)	nativ	CM-Sephadex C-50/Tris DEAE-trisacryl M/Tris/NaCl	⁵¹ Cr	Cr-Transferrin Cr-Albumin	[87]
Milacic et al.	1994	Brassica oleracea L. var. conica (Spitzkohl)	Cr(VI)	nativ	Mono Q HR 5/5/Tris/NaCl	GFAAS	(-)	[88]
Borguet et al.	1995	Blutplasma (human, CAPD)	CR(III)	nativ	MonoS HR 5/5/Tris/NaCl MonoQ HR 5/5/NaCl Superose 12 HR 10/30/NaCl	⁵¹ Cr	Cr-Transferrin Cr-Albumin (-)	[89]
Davis et al.	1997	Rinderleber	Cr(VI)	nativ	EtOH 90% DEAE-Cellulose/NH ₄ Ac Sephadex G-25 Sephadex G-15	Photo- metrisch	(-) 1500	[91]

Abkürzungen: n.a.: nicht angegeben; EtOH: Ethanol; BuOH: Butanol; NH₄OH: wäßrige Ammoniaklösung; TEA: Triethylamin ; TEAc: Triethylaminacetat; Tris: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan; MW: Molekulargewicht; MWCO: Molecular weight cut-off (Dialyse); CHO: Chinese hamster ovary cells; TLC: Thin layer chromatography; PIXE: Particle induced X-ray emission; GFAAS: Graphite furnace atom absorption spectrometry; AAS: Atom absorption spectrometry; CAPD: continuous ambulatory peritoneal dialysis.

Es fällt auf, daß die Mehrzahl der Arbeiten auf einer Beladung mit Chromat beruhen, da es von Organismen schneller resorbiert wird. Obwohl Chromat in biologischen Matrices rasch reduziert wird (Kapitel 2.2.3), ist allgemein unbewiesen, ob *in vitro* bzw. *in vivo* letztendlich die gleichen Spezies wie nach Einsatz von Chrom(III) entstehen. Hervorzuheben ist weiterhin, daß in allen Fällen ausschließlich anionische Spezies isoliert wurden. Im Gegensatz zu den Arbeiten, die sich mit der Isolation des „Glukosetoleranzfaktors“ befaßten (siehe Kap. 2.2.6.4.3), wurde als Ausgangsmaterial in fast allen Fällen für die Isolationsversuche natives Ausgangsmaterial gewählt. Die verwendeten Extraktionsprozeduren sind in vielen Fällen schonender als bei den Arbeiten zur Extraktion des „Glukosetoleranzfaktors“ (siehe Kapitel 2.2.6.4.3), wenn auch häufig Ionenaustauschersäulen unter teilweise wenig schonenden Elutionsbedingungen eingesetzt wurden.

Tris- Oxalatochromat(III) ist die einzige Chrom(III)- Verbindung biologischen Ursprungs, die bisher identifiziert werden konnte [90]. Die Verbindung wurde allerdings nur durch Vergleich der Papier- Elektropherogramme mit Standardverbindungen identifiziert.

Die Arbeiten von Borguet et al. [87][89] befaßten sich mit der Speziationsanalyse von Chrom im Blutserum. Außer den bereits bekannten Chrom- bindenden Proteinen Transferrin und Serum- Albumin wurde auch eine niedermolekulare Verbindung entdeckt, die aber nicht weiter identifiziert werden konnte.

Einen besonderen Stellenwert haben die Arbeiten von Davis und Vincent [91], die auf den Veröffentlichungen von Yamamoto et al. und Wada et al. [92][93] beruhen. Aus Extrakten von mit $K_2Cr_2O_7$ inkubierter Rinderleber isolierten sie eine Chrom(III)-haltige, anionische Substanz mit einem Molekulargewicht von ca. 1500, die *in vitro* eine Phosphatase [94] und zusammen mit Insulin eine Insulin-Rezeptorkinase stimulieren konnte [95]. Allerdings ist es bisher nicht gelungen, Reinheit und Konstitution dieser „LMWCr“ („low molecular weight chromium binding substance“) genannten Verbindung zweifelsfrei zu beweisen bzw. aufzuklären.

2.2.5. Chrom als essentielles Spurenelement

Die Erkenntnisse über Chrom als essentielles Spurenelement gehen auf die Arbeiten von Schwarz und Merz zurück, die in den fünfziger Jahren die Ursache von diätetisch bedingten Lebernekrosen bei Ratten untersuchten. Die Tiere wurden dazu mit einer speziellen Diät ernährt, der nach damaligem Wissensstand lediglich Vitamin E fehlte und die aus Rohrzucker (59%) als Kohlenhydratquelle, Futter (Torula)-Hefe (30%) als Proteinquelle sowie gereinigtem (Vitamin E-freiem) Schweineschmalz (5%), einer Salzmischung (5%) und Vitampulver (1%) bestand [96]. Die Tiere zeigten nach einiger Zeit eine gestörte Glukosetoleranz, d.h. eine überdurchschnittliche Erhöhung des Blutzuckerspiegels nebst langsamem Rückgang des Blutzuckerspiegels nach Verabreichung von Glukose, und entwickelten nach durchschnittlich 45 Tagen eine tödlich verlaufende Lebernekrose. Mertz und Schwarz konnten im Lauf ihrer Untersuchungen zeigen, daß die tödlich verlaufende Lebernekrose auf einen gleichzeitigen Mangel von Vitamin E und Selen („Faktor 3“) zurückzuführen war und die verminderte Glukosetoleranz eine eigenständige Erscheinung unabhängig vom Selen- und Vitamin E- Mangel war, die im übrigen auch unter „Standard- Diäten“ beobachtet wurde [97]. Weitere Untersuchungen zeigten, daß eine einzige Dosis von aus Bierhefe und Schweinenieren gewonnenen Extrakten die verminderte Glukosetoleranz innerhalb von 18 Stunden vollständig beseitigte [98]. Nach weiteren Versuchen zur Reinigung und Konzentrierung dieses Extraktes, dem sie entsprechend ihrer Wirkung den Namen „**Glukose-Toleranz-Faktor**“ (**GTF**)“ gaben, sprachen sie diesem folgende Eigenschaften zu [99]:

- GTF kann in einer 6 bis 12 Schritte umfassenden Prozedur aus Bierhefe oder sauren Hydrolysaten aus Schweinenieren extrahiert werden.
- GTF- Konzentrate können die bei Ratten experimentell erzeugte Glukoseintoleranz nach einmaliger oraler Dosis (50-100 µg Konzentrat/100 g Körpergewicht) innerhalb von 18 Stunden beseitigen.
- GTF ist wasserlöslich, mit Phenol und Isobutanol extrahierbar, absorbierbar auf Aktivkohle und Ionenaustauscherharzen und zeigt deutlich kationische Eigenschaften.
- Hochkonzentrierte GTF- Fraktionen verlieren ihre Aktivität unter Lagerung bei 4°C. Dieser Aktivitätsverlust kann nicht durch Zugabe reduzierender Substan-

zen wie Cystein oder Ascorbinsäure oder durch Ausschluß von Sauerstoff verhindert werden.

- Naßveraschung von rohen oder hochaktiven GTF- Präparaten mit HNO_3 - H_2SO_4 , gefolgt von einer kurzen Fraktionierung mit Phenol, zerstört nicht die Wirkung von GTF.
- GTF- Präparate enthalten Chrom (photometrisch nachgewiesen).

Bei Versuchen an Ratten konnte demonstriert werden, daß etliche Chromverbindungen, aber nicht einfache Chrom(III)salze oder Natriumdichromat eine den GTF- Präparaten vergleichbare Wirkung zeigten. Unter den oral wirksamen Agentien befand sich eine Reaktionsmischung von Cr(II) und Cr(VI), von Cr(VI) mit Titanylchlorid, Kalium-Tris-Oxalatochromat(III) und Hexa-Harnstoff- Chrom(III)- chlorid [99].

In den folgenden Jahren wurden diese Versuche von Schroeder zunächst an Ratten wiederholt, die unter kontrollierten Bedingungen in speziell zur Erforschung der Wirkung von Spurenelementen errichteten Laboratorien gehalten wurden. Bei diesen Versuchen wurden neben Störungen des Glukosemetabolismus ebenfalls erhöhte Serumcholesterinwerte und verstärkte Ablagerung von Lipiden in der Aorta beobachtet, die in den Kontrollversuchen durch Gaben von anorganischem Chrom(III) (als Chlorid oder Azetat) im Trinkwasser der Ratten verhindert werden konnten [100][101][102][103].

Diese Tierversuche legten nahe, daß Chrommangel beim Menschen durch ähnliche Symptome gekennzeichnet sein könnte. Eine gestörte Glukosetoleranz ist beim Menschen eine der ersten Erscheinungen eines beginnenden Diabetes mellitus vom Typ 2¹ [105][106]. Eine Reihe von Supplementationsstudien mit Chrom(III)chlorid an Diabe-

¹ Entsprechend den neuesten Empfehlungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) [104] wird Diabetes mellitus in drei Kategorien eingeteilt: Diabetes Typ 1 ist gekennzeichnet durch absoluten Insulinmangel infolge einer teilweisen oder vollständigen Zerstörung der Insulin- produzierenden Zellen des endokrinen Pankreas. Diabetes Typ 2 äußert sich durch eine verminderte Insulinwirkung am Zielort bei gleichzeitig gestörter, jedoch nicht völlig versiegender Insulinsekretion und tritt klinisch hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, im späteren Erwachsenenalter in Erscheinung („Altersdiabetes“). Während die Ursachen für Diabetes Typ 2 nach wie vor unbekannt sind, werden als Diabetes Typ 3 diejenigen Formen der Krankheit klassifiziert, deren Ursache entweder auf spezifische monogenetische Defekte oder die Folgen bestimmter anderer Krankheiten zurückgeführt werden kann [104].

tikern [107][108][109] und Probanden mit gestörter Glukosetoleranz [110][111] erbrachte wenig konsistente Ergebnisse. Wenn überhaupt Wirkungen zu verzeichnen waren, traten diese regelhaft nur bei einem Teil der Probanden nach mehreren Wochen der oralen Supplementation auf. Mertz [112] betont, daß Chrommangel nur einer unter mehreren Faktoren sei, die den Kohlenhydratstoffwechsel negativ beeinflussen würden, und es könne erwartet werden, daß eine Chromzufuhr nur den Teil eines Krankheitssymptoms korrigieren könne, der durch Chrommangel verursacht worden sei¹.

Seitdem wurden zahllose Studien an Ratten, Mäusen, Nutztieren [113] und Menschen [114] mit verschiedenen Formen von Chrom(III) durchgeführt. In den siebziger und achtziger Jahren wurde von Patienten berichtet, die nach langdauernder „total parenteraler Ernährung“ (TPN) Symptome von gestörter Glukosetoleranz und Diabetes mellitus entwickelten, die nach parenteraler Zufuhr von anorganischem Chrom(III) verschwanden [115].

Aufgrund dieser Beobachtungen bringt Anderson [116] Chrommangel mit folgenden Symptomen in Zusammenhang:

- Verminderte Glukosetoleranz.
- Erhöhter Insulinspiegel.
- Glykurämie.
- Hyperglykämie im Nüchternzustand.
- Vermindertes Wachstum.
- Verminderte Lebensdauer.
- Erhöhte Cholesterin- und Triglyzeridspiegel im Serum.
- Erhöhte Wahrscheinlichkeit von Ablagerungen in der Aorta.
- Periphere Neuropathie.
- Enzephalopathie und Verwirrtheit.
- Verminderte Fruchtbarkeit und Spermienanzahl.

¹ „Chromium is only one of many factors influencing carbohydrate metabolism, and it can be expected to correct only that part of a pathological symptom which is caused by chromium deficiency.“

Diese Symptome treten in fortgeschrittenen Stadien der verschiedenen Formen des Diabetes mellitus auf und wurden zum Teil entweder im Zuge der durchgeführten Supplementationsstudien an Tieren oder in den Fällen von vermutetem Chrommangel bei total parenteral ernährten Menschen beobachtet.

Wie bei den frühen Untersuchungen, so zeigte sich auch stets bei den später durchgeführten Supplementationsstudien mit Chrom(III), daß nur jeweils ein Teil der Probanden auf die Supplementation positiv reagierte. Anderson hebt in diesem Zusammenhang hervor, daß Diabetes Typ 2 und verminderte Glukosetoleranz verschiedene Ursachen haben könnten und der Bedarf an Chrom individuell unterschiedlich sein könnte. Individuen mit schwereren Symptomen wie einem ausgeprägten Diabetes Typ 2 würden nur von länger dauernder oraler Chromzufuhr in höheren Dosen profitieren im Gegensatz zu Individuen, die nur eine gestörte Glukosetoleranz zeigten und bei denen bereits eine Verbesserung der Symptome mit relativ geringen Dosen von Chrom in kürzerer Zeit zu beobachten sei. In Fällen, bei denen die Symptome von Diabetes oder gestörter Glukosetoleranz nicht auf Chrommangel zurückzuführen wären (also insbesondere bei ausreichender Chromversorgung), würden zusätzlich zugeführte Chromdosen keine Verbesserung der Symptome bewirken [114]. Da bis heute der Chromstatus eines Menschen (oder auch eines Versuchstieres) nicht eindeutig bestimmt werden kann [117], ließe sich deshalb ein Chrommangel nur im Nachhinein feststellen.

Chrom wird von vielen Ernährungswissenschaftlern heute als ein für den Menschen essentielles Spurenelement angesehen [118]. In den USA empfiehlt die „National Academy of Sciences“ eine „angemessene Einnahme“ (Adequate Intake) von Chrom für Männer je nach Lebensalter zwischen 30 und 35 µg/Tag und für Frauen (abhängig von Schwangerschaft, Laktation und Lebensalter) zwischen 20 und 45 µg/Tag. Empfehlungen für einen durchschnittlichen Bedarf („Estimated Average Requirement“) konnten aufgrund unzureichender Beweislage nicht gegeben werden [119].

Während verschiedene Befunde einen Chrombedarf für Menschen, Ratten und andere Labor- und verschiedene Nutztiere nahelegten [118], liegen über andere Lebensformen kaum derartige Erkenntnisse vor. Eine Bedeutung von Chrom als „essentielles Spurenelement“ für Pflanzen ist verneint worden [120][121], wenn auch gelegentlich über wachstumsfördernde Wirkungen von Chromsalzen berichtet wurde [122]. Es muß allerdings eingeschränkt werden, daß beim damaligen Stand der Analysetechnik und

lerdings eingeschränkt werden, daß beim damaligen Stand der Analystechnik und angesichts der Allgegenwärtigkeit von Chrom, trotz gegenteiliger Angaben der jeweiligen Autoren, ein Bedarf unterhalb von 0,1 mg/L Nährmedium wohl kaum hätte gesichert werden können. Bollard [123] merkt an, daß Chrom, wenn überhaupt, von der Pflanze nur in einem Niveau unterhalb von Molybdän benötigt werden könne. Auch für Hefe ließ sich bisher kein Bedarf für Chrom nachweisen [124].

2.2.6. Der Glukosetoleranzfaktor

Am Anfang der Erkenntnisse in Zusammenhang mit der Bedeutung von Chrom als essentiellem Spurenelement standen die Beobachtungen von Schwarz und Mertz, daß bei an mangelernährten Ratten das nach einigen Wochen auftretende Symptom der Glukoseintoleranz durch einmalige orale Gaben eines Extrakts aus Bierhefe oder Schweinenieren „innerhalb von 18 Stunden“ beseitigt werden konnte. Da anorganisches Chrom(III) in diesen Experimenten im Gegensatz zu einigen synthetisch hergestellten Chromkomplexen nicht oder nur gering wirksam war, gleichzeitig aber Chrom als Bestandteil dieser Extrakte nachgewiesen werden konnte, schlossen Schwarz und Mertz auf die Existenz eines natürlich vorkommenden chromhaltigen „Glukose-Toleranz-Faktors“ (GTF) in Hefe und Schweinenieren.

2.2.6.1. Eigenschaften des Glukosetoleranzfaktors

Obwohl auch einfache Chrom(III)- Salze die verminderte Glukosetoleranz von mit bestimmten „Chrommangeldiäten“ ernährten Ratten bei Zugabe zum Futter verhindern konnten, waren eine Reihe der dem Glukosetoleranzfaktor zugeschriebenen Eigenschaften durch Chromsalze oder einfache Chromkomplexe nicht zu erklären [125][126]:

- Einfache Chromsalze zeigen eine im Vergleich zu GTF- Extrakten nur schwache und zeitverzögerte Wirkung in vivo und in vitro.
- Nur ein Teil der Patienten mit verminderter Glukosetoleranz reagiert auf die Gabe einfacher Chromverbindungen.
- Einfache Chromsalze gehören nicht zu dem Pool, von dem aus Chrom über die Plazenta in den Fötus transportiert wird.
- Einfache Chromsalze markieren nur schwer den Pool, von dem aus das nach einer Mahlzeit oder nach Glukosegabe in das Blutserum abgegebene Chrom gespeist wird.
- Absorption und Exkretion einfacher Chromverbindungen ist unabhängig vom Chromstatus des jeweiligen Versuchstiers.
- Einfache Chromsalze werden im Gegensatz zu Chrom(III) in GTF- Extrakten nur in einem geringen Maße resorbiert (durchschnittlich 3%), wodurch eine Chrom- Balance im Körper bei einer täglich mit der Nahrung zugeführten Chrommenge von ca. 50 µg und einer Ausscheidung über den Urin von täglich 4 bis 10 µg nicht erklärlich ist.

Die Wirksamkeit von anorganischem Chrom(III), das bei ständiger Zufuhr im Trinkwasser der Ratten die Mangelsymptome verhinderte (siehe Kapitel 2.2.5), stellt keinen notwendigen Widerspruch zur postulierten Existenz des Glukosetoleranzfaktors dar, wenn angenommen wird, daß der gesunde Organismus der Ratte in der Lage ist, anorganisches Chrom(III) in eine aktive Form, nämlich den Glukosetoleranzfaktor, umzuwandeln.

Aus Infrarotspektren von Extrakten aus Bierhefe und dem Vergleich mit Chrom- Nikotinsäure- Reaktionsmischungen leiteten Mertz et al. den in Abb. 6 gezeigten Strukturvorschlag für den Glukosetoleranzfaktor ab, dessen wesentliches Merkmal die über den Pyridin-Stickstoff transständig koordinierten Nikotinsäuremoleküle sind [204]:

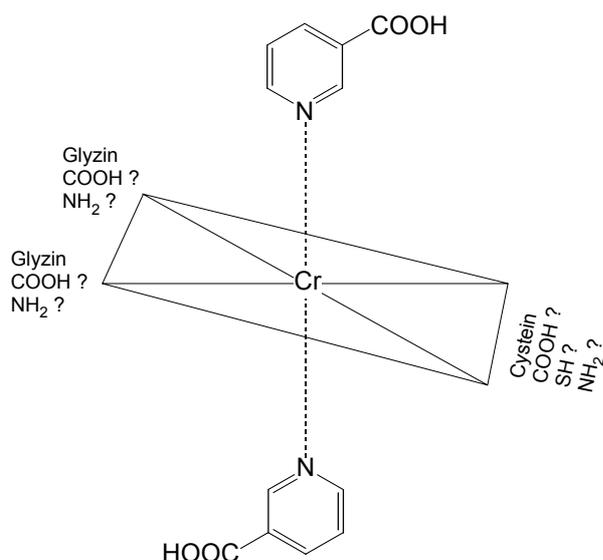


Abb. 6: Von Mertz für den Glukosetoleranzfaktor vorgeschlagene Struktur [204]

Die von Mertz gewonnenen Bierhefeextrakte enthielten allerdings offensichtlich zahlreiche Verunreinigungen, darunter insbesondere auch freie Nikotinsäure. Die vorgeschlagene, lediglich aus Infrarotspektren abgeleitete Struktur ist daher rein spekulativ. Insbesondere das Vorliegen einer Achse Nikotinsäure-Chrom-Nicotinsäure kann daraus nicht abgeleitet werden [127].

Inzwischen lassen neuere Erkenntnisse die Existenz des chromhaltigen „Glukosetoleranzfaktors“ nicht mehr als zwingend notwendig erscheinen [25]. Bereits Ende der siebziger Jahre wurde der Wert der beim Menschen durchschnittlich täglich mit dem Urin ausgeschiedenen Chrommenge auf deutlich unter $1\ \mu\text{g}$ herabgesetzt [116]. Die Chrom-Balance im Körper eines Durchschnittsmenschen kann unter diesen Bedingungen aufrechterhalten werden, ohne daß die Existenz einer besonders gut resorbierbaren Form für Chrom zu postulieren ist. Die Experimente von Mertz und Roginski hinsichtlich der Resorptionseigenschaften von „aktiven“ Chromverbindungen, die zu einem hohen Prozentsatz im Verdauungstrakt resorbiert und in großem Umfang plazental in den Fötus transferiert werden [128][129], konnten nicht reproduziert werden. Spätere Untersuchungen konnten im Blutserum des Menschen postprandial bzw. nach Glukosebelastung keine [130] Korrelation mit dem Glukosespiegel oder eine inverse Korrelation mit dem Insulinspiegel nachweisen [131].

Bis heute konnte nicht belegt werden, wie und in welcher Form Chrom seine behauptete Funktion als essentielles Spurenelement ausübt. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß die Ursache einiger Formen des Diabetes mellitus Typ 2 auf der Unfähigkeit des Organismus beruhen, aus anorganischem Chrom die benötigte bioaktive Form zu synthetisieren. Vermehrte Chromzufuhr führt regelmäßig erst nach einer Verzögerung von einigen Wochen zu einer Besserung der auf Chrommangel zurückgeführten Symptome, was im krassen Gegensatz zu den bei Mangelerscheinungen allgemein beobachteten Sofortreaktionen des Körpers nach oraler Zufuhr eines fehlenden Nahrungsstoffes steht. Es ist daher denkbar, daß das zugeführte anorganische Chrom(III) im Körper zunächst zu einer aktiven, komplexen Form umgewandelt werden muß, um wirksam werden zu können. Anderson stellte fest, daß Streß [132], körperliche Aktivität [133] und verstärkte Zufuhr von Kohlenhydraten, insbesondere Rohrzucker und Glukose [134][135], zu einer vermehrten Chromausscheidung im Urin führen. Es ist daher möglich, daß durch Streßsituationen, bestimmte Medikationen [136] oder durch unausgewogene Ernährung ein erhöhter Chrombedarf entsteht, in dessen Folge es zu einer Verschlechterung der Glukosetoleranz kommt. Dieser vermehrte Chrombedarf sollte vorzugsweise durch erhöhte Zufuhr „aktiver“ Chromverbindungen zu decken sein.

2.2.6.2. *In vivo* Studien zur Wirkung des Glukosetoleranzfaktors an Tiermodellen und am Menschen

Seit den siebziger Jahren wurden eine Reihe von Untersuchungen hinsichtlich der Wirkung von Präparaten mit „GTF-Aktivität“ an verschiedenen Ratten- und Mausmodellen (Tabelle 3) sowie an Menschen (Tabelle 4) vorgenommen. Auch hier zeigte sich die grundsätzliche Problematik, Labortiere mit tatsächlichem Chrom- bzw. GTF-Mangel hervorzubringen [137], bzw. den Chrom- und GTF- Status eines Menschen zweifelsfrei zu bestimmen (Kap. 2.2.5). Hinzu kommt als besondere Problematik, daß „Bierhefe“ oder verschiedene Hefeextrakte keinesfalls ein einheitliches Produkt darstellen. Dies betrifft nicht nur den Chromgehalt der Hefeprodukte, der, sofern er überhaupt dokumentiert wurde, in den verschiedenen Studien als sehr unterschiedlich angegeben wird. Der Gehalt des „Glukosetoleranzfaktors“ in Nährstoffen soll sehr unterschiedlich sein und korrelierte generell nicht mit dem Gesamtchromgehalt (s.o.).

Toepfer et al. finden in Hefeextrakten lediglich 6% des im Extrakt befindlichen Chroms mit biologischer Aktivität assoziiert [138]. Zudem enthält Hefe bzw. Hefeextrakt zahlreiche weitere z.T. bioaktive Stoffe [139], insbesondere auch eine Reihe von Vitaminen [140], die einen Einfluß auf Stoffwechselfparameter ausüben können. Durch die nur ungenügend definierte Qualität der Hefe bzw. Hefeextrakte lassen sich diese Studien nur schwer vergleichen und einschätzen.

Tabelle 3 und Tabelle 4 zeigen sämtliche bis zum Jahr 2000 in englischer, französischer oder deutscher Sprache veröffentlichten Studien, die an Mäusen und Ratten oder Menschen unter Verwendung von Hefe oder Hefeextrakten durchgeführt wurden (Doppel- Veröffentlichungen wurden nicht aufgenommen).

nächste Seiten:

Tabelle 3: Untersuchungen zur Wirkung von Hefeextrakten oder Bierhefe auf Ratten und Mäuse.

Tabelle 4: Untersuchungen zur Wirkung von Hefeextrakten oder Bierhefe auf den Menschen.

Tabelle 3: Untersuchungen zur Wirkung von Hefeextrakten oder Bierhefe auf Ratten und Mäuse:

	Jahr	Anz	Art	Alter	Geschl	Basisdiät	Hefe	Dosis	Chromdo- sis	Verabrei- chung	Dauer	Insulin ^a	Blutgluk.	Lipide	Wirkungs- eintritt	Bewer- tung [*]	Referenz
Mertz et al.	1959	9	Ratte ¹	5w	♂	Torula-Hefe 30% ^b	„Yeastamin“	4% ^b	n.a.	oral	51d		+		1d	+	[97]
		9	Ratte ¹	5w	♂	Torula-Hefe 30% ^b	GTF	0.2% ^b	n.a.	oral	49d		+		1d	+	
		10	Ratte ¹	5w	♂	Purina lab. chow	„Yeastamin“	4% ^b	n.a.	oral	57d		+		1d	+	
		10	Ratte ¹	5w	♂	Rockland rat diet	Bierhefe	4% ^b	n.a.	oral	24d		+		1d	+	
		10	Ratte ¹	5w	♂	Rockland rat diet	Bierhefe	8% ^b	n.a.	oral	24d		+		1d	+	
Tuman et al.	1977	11	Maus ²	n.a.	n.a.	Purina Formulab	GTF	5mg	n.a.	i.p.	4h		+		4h	-	[141]]
		18	Maus ³	19w	♀	Purina Formulab	GTF	5mg	n.a.	i.p.	4h		+		4h	-	
		20	Maus ³	25w	♂	Purina Formulab	GTF	5mg	n.a.	i.p.	4h	+	+		4h	-	
		n.a.	Maus ³	17w	♀	Purina Formulab	GTF	5mg	n.a.	i.p.	4h	+	+		4h	-	
		12	Maus ³	23w	♀	Purina Formulab	GTF	5mg	n.a.	i.p.	4h			+	4h	-	
		12	Maus ³	19w	♂	Purina Formulab	GTF	5mg	n.a.	i.p.	4h			+	4h	-	
Tuman et al.	1978	6	Maus ²	n.a.	n.a.	Purina Formulab	GTF	5mg	4µg	i.p.	4h		+		4h	-	[142]
		6	Maus ³	n.a.	n.a.	Purina Formulab	GTF	5mg	4µg	i.p.	4h		+	+	4h	-	
Stoecker et al.	1987	8	Maus ⁴	5w	♂	Torula-Hefe 36% ^b	Bierhefe	39% ^b	43ng/g ^c	oral	23d	+	+	0		+	[143]
		14	Maus ⁵	5w	♂	Torula-Hefe 36% ^b	Bierhefe	39% ^b	43ng/g ^c	oral	23d	0	0	0		+	
Flatt et al.	1989	12	Maus ³	15w	n.a.	Torula-Hefe 5% ^b	Bierhefe	5% ^b	2,5µg/g ^c	oral	56d	0	0			+	[144]
Mirsky	1993	10	Ratte ⁶	n.a.	♂	n.a.	GTF	0,5ml	12,5ng	i.v.	24h		+	+	1h	-	[145]

¹Ratte Sprague-Dawley; ²Maus C57BL/KsJ (+/+); ³Maus C57BL/KsJ (*db/db*); ⁴Maus C57BL/6J-OB (*ob/ob*); ⁵Maus C57BL/6J-OB (?/+); ⁶Ratte Sprague-Dawley, Streptozotocin- Diabetes- Modell. ^aInsulinsensitivität; ^bFutter-Anteil; ^cChromgehalt im Futter insgesamt; *Erläuterung siehe Text
 Abkürzungen: GTF: GTF- Extrakt; i.p.: intraperitoneal; i.v.: intravenös; n.a.: nicht angegeben. Die Effekte +,-,0 beziehen sich auf eine absolut
 „günstige“ bzw. ungünstige Beeinflussung der entsprechenden Parameter („0“≡ keine Änderung).

Tabelle 4: Untersuchungen zur Wirkung von Hefeextrakten oder Bierhefe auf den Menschen:

	Jahr der Veröffentlich.	Anzahl der Probanden	Gesundheitszustand	Alter [y]	Geschlecht	Hefe	Wochendosis	Chromdosis (wöchentl.)	Studiendauer	Studienart	Insulin-Sensitivität	Blutglukose	HDL	TG	Cholesterin	Bewertung*	Referenz
Freiberg et al.	1975	70	G, IGT, D	1.5-70	n.a.	„Yeastamin“	~ 35g	n.a.	2-15m	uk		0				-	[146]
Doisy et al.	1976	12	IGT	>65	n.a.	„Yeastamin“	28g	n.a.	1-2m	uk	+					0	[147]
		16	G	20-25	n.a.	Bierhefe	70g	n.a.	1m	uk	+				+	0	
Liu et al.	1978	27	G, D	40-75	♀	„Hefeextrakt“	35g	28µg	3m	uk	+	+		+	+	0	[139]
Riales	1979	8	G, KHK	35-50	♂	Bierhefe	35g	75µg	1,5m	uk			++		0	0	[148]
Offenbacher et al.	1980	24	G, D	63-93	♂♀	Bierhefe	63g	76µg	2m	k,B	+	+		+	+	+	[149]
Polansky et al.	1982	41	G, IGT	n.a.	n.a.	Bierhefe	56-70g	n.a.	3m	k	+	+	0	0	0	0	[150]
Elwood et al.	1982	27	G, HL	22-72	♂♀	Chromhefe	140g	336µg	2m	uk			+	0	+	0	[151]
		19	G	22-58	♂♀	Chromhefe	70g	168µg	2m	uk			+		+	0	
Grant et al.	1982	37	D	Ø64	♂♀	Bierhefe	11,2g	9µg	1,75m	k,DB		0	+			0	[152]
Hunt et al.	1983	78	G,D	n.a.	n.a.	Chromhefe	n.a.	1400µg	3m	k,DB	0	0	0	0	0	+	[153]
Rabinowitz et al.	1983	63	G,D	Ø52	♂	„Yeastamin“	58g	126µg	4m	k,DB	0	0		0	0	+	[154]
		63	G,D	Ø52	♂	Bierhefe	58g	42µg	4m	k,DB	0	0		0	0	+	
Wang et al.	1984	n.a.	HL	n.a.	n.a.	Bierhefe	45g	75µg	3m	k			0		0	-	[155]
Elias et al.	1984	6	D	41-66	♂♀	Chromhefe	364g	146µg	0,5m	uk	+	+				0	[156]
Vinson et al.	1984	23	G,D	17-63	n.a.	Chromhefe	0,7g	1526µg	6m	uk		+	+	0	0	0	[157]
Offenbacher et al.	1985	23	G	63-86	♂♀	Bierhefe	35g	35µg	2,5m	k	0	0		0	0	+	[158]
Vinson et al.	1985	7	G	22-42	♂♀	Chromhefe	0,046g*	100µg*	1d	k		+				-	[159]
Cheng et al.	1988	63	D	22-69	♂♀	Chromhefe	7g	700µg	2m	k		0				0	[160]
Clausen	1988	20	HypoG	n.a.	n.a.	Chromhefe	n.a.	875µg	3m	uk		+ ¹				-	[161]

Wang et al.	1989	30	HL	31-66	♂♀	Bierhefe	45g	75µg	3m	k	0	0	0	0	+	+	[162]
Jiang et al.	1991	19	(G)	46-61	♂♀	Chromhefe	14g	1400µg	2m	k				+	0	-	[163]
Roebach Jr. et al.	1991	72	HT,KHK	20-70	♂	Chromhefe	n.a.	4200µg	2m	k,DB			+	0	0	+	[164]
Uusitupa et al.	1992	24	IGT	65-74	♂♀	Chromhefe	n.a.	1120µg	6m	k,DB	0	0	0	0	0	+	[165]
Li	1994	22	(G)	40-76	♂♀	Bierhefe	70g	49µg	3m	k	+	+		+	0	0	[166]
Trow et al.	2000	12	D	45-67	♂♀	Chromhefe	n.a.	700µg	2m	uk	0	0	0	0	0	0	[167]

¹Verbesserung eines hypoglykämischen Zustands; *Erläuterung siehe Text

Abkürzungen: n.a.: nicht angegeben; G: gesunde Probanden; IGT: Probanden mit verminderter Glukosetoleranz; D: Diabetiker (nicht näher spezifiziert); KHK: Probanden mit koronarer Herzkrankheit; HL: Probanden mit Hyperlipidämie; HypoG: Probanden mit hypoglykämischen Zuständen; uk: unkontrolliert; k: kontrolliert; B: Blindstudie (einseitig); DB: Doppelblindstudie. Die Effekte +,-,0 beziehen sich auf eine absolut „günstige“ bzw. ungünstige Beeinflussung der entsprechenden Parameter („0“= keine Änderung).

Die Studien sind von der Auswahl der Versuchstiere bzw. Probanden über die Art der Supplementation eingesetzten Hefepräparats bis hin zu den berücksichtigten physiologischen Parametern sehr heterogen. Im Falle der Humanstudien fällt auf, daß nur wenige Untersuchungen „kontrolliert“ (d.h. mit Kontrollgruppe) oder unter Verblindung durchgeführt wurden. Der in den jeweils letzten Spalten aufgeführten, hier vorgenommenen „Bewertung“ wurden folgende Kriterien zugrunde gelegt:

I. Studien an Ratten und Mäusen:

- Studien wurden generell positiv (+) bewertet, wenn die Versuchsbedingungen vollständig und nachvollziehbar beschrieben wurden.
- Studien wurden tendenziell positiv bewertet, wenn die dargestellten Effekte offensichtlich deutlich (und nicht nur „signifikant“) in Erscheinung treten.
- Studien wurden generell negativ (-) bewertet, wenn Hefepräparate intraperitoneal¹ (i.p.) oder intravenös (i.v.) verabreicht worden sind. Die komplexe und undefinierte Zusammensetzung der gängigen Hefeextrakte läßt unvorhersehbare physiologische Reaktionen erwarten. Entsprechende Erfahrungen liegen bereits seit langem vor (siehe Kapitel 2.2.6.4).

II. Humanstudien:

- Studien mit Verblindung wurden generell positiv (+) bewertet.
- Studien wurden tendenziell positiv bewertet, wenn die Studie in der Veröffentlichung umfassend und nachvollziehbar dokumentiert wird.
- Studien wurden tendenziell positiv bewertet, wenn die dargestellten Effekte offensichtlich deutlich (und nicht nur „signifikant“) in Erscheinung treten.
- Studien mit umfangreicher statistischer Dokumentation der Daten wurden tendenziell als positiv bewertet.
- Studien, die von den Autoren selbst als „vorläufig“ eingeschätzt werden, wurden tendenziell als negativ (-) bewertet.

¹ in das Bauchfell

- Studien mit ungewöhnlicher Methodik, deren Anwendbarkeit nicht ausführlich begründet worden ist, wurden als negativ bewertet.
- Studien, deren Qualität entsprechend den o.a. Kriterien nicht zuzuordnen sind, werden mit (0) bewertet.

Entsprechend diesen relativen Einschätzungen sind bei den Ratten/Mäuse- Studien mit Ausnahme der frühen Untersuchungen von Mertz und Schwarz 1959 [97] von insgesamt fünf weiteren Studien lediglich drei [143][144] als methodisch fundiert zu betrachten. Davon wird nur in einer Studie [143] (33%) ein positiver Effekt einer Supplementation mit Hefe beobachtet. Im Falle der Humanstudien sind von 26 Studien acht methodisch positiv einzuschätzen. Fünf dieser Studien (62,5%) konnten keinerlei Effekte einer Supplementation mit Hefe nachweisen. Die grundsätzliche Problematik des Nachweises eines absoluten (durch mangelnden Chromgehalt der Nahrung bedingten) oder relativen (durch mangelnde Resorption des Chroms aus der Nahrung oder durch erhöhten Bedarf bedingten) Chrommangels (s.o.) bleibt von dieser Klassifikation der Studien unberührt.

2.2.6.3. Methoden zur Bestimmung der Aktivität des Glukosetoleranzfaktors

Für die Überprüfung einer größeren Anzahl von Proben auf GTF- Aktivität ist der „kurative Assay“, bei dem die bei Versuchstieren durch die Mangeldiät hervorgerufenen Symptome „geheilt“ werden, nicht praktikabel. Man griff daher bald auf ein zur metabolischen Verfolgung der Insulinwirkung entwickeltes *in vitro* Assaysystem zurück [168] . Hierbei wird der insulinabhängige Glukosemetabolismus an aus der Rattenepididymis¹ entnommenem Fettgewebe untersucht, indem die Glukoseaufnahme des Gewebes in Abhängigkeit von der Konzentration von Insulin oder/und anderen zu testenden Stoffen quantitativ verfolgt wird.

¹ Die Epididymis ist das den Hoden anhängende, zur Speicherung von Spermien dienende Gewebe (Nebenhoden).

Bei der Untersuchung der Insulinwirkung *in vitro* auf epididymale Adipozyten von Ratten zeigten Mertz et al., daß in diesem System sowohl anorganisches Chrom(III) [168] als auch Extrakte des Glukosetoleranzfaktors die Insulinwirkung verstärken können [128][169]. Dabei zeigten GTF- Extrakte eine wesentlich stärkere Wirkung als einfache Chromsalze [126]. Die Wirkung von Chrom(III) oder des Glukosetoleranzfaktors manifestiert sich im Unterschied zu einer „insulinmimetischen Wirkung“ nur im Zusammenwirken mit Insulin. Eine Voraussetzung für eine Wirksamkeit (zumindest von Chromsalzen) in diesem Assay ist laut Mertz et al., daß die Adipozyten aus Ratten stammen, die mit einer vorgeblich Chrommangel erzeugenden Diät ernährt wurden. In einem weiterentwickelten Assay, der im Gegensatz zu Fettgewebe einzelne Adipozyten verwendet, konnte später die Wirkung von einfachen anorganischen Chromverbindungen nicht mehr demonstriert werden [170].

Die Untersuchung verschiedener Nahrungsmittel und Gewürze mit Hilfe dieser Assays zeigte, daß außer aus Schweinenieren, Leber [128] und Bierhefe auch aus zahlreichen anderen Quellen Extrakte mit *in vitro*- GTF- Aktivität gewonnen werden konnten. Darunter befanden sich Hummerschwänze, Pilze, Garnelen, schwarzer Pfeffer [171] sowie Vanille-Eis, Erdnußbutter, Thunfisch, Zimt, Gewürznelken, Lorbeer und Kurkuma [172]. Die biologische Aktivität korrelierte dabei nicht mit dem Gesamtchromgehalt der jeweiligen Quelle, sondern mit dem ethanolisch extrahierbaren Chromanteil.

Ein weiterer Assay auf GTF- Aktivität auf Basis von Bierhefe (*Saccharomyces carlsbergensis*) wurde von Burkeholder und Mertz vorgeschlagen [173] und später von anderen Autoren vielfach zur Testung auf GTF- Aktivität eingesetzt. „GTF-aktive“ Hefeextrakte waren in der Lage, die Fermentation von in chromarmem Nährmedium gezogener Hefe dosisabhängig um bis zu 46% gegenüber Kontrollen zu verstärken. Während sich die Wirkung von GTF- haltigen Extrakten praktisch ohne Zeitverzögerung zeigte, entfaltete anorganisches Chrom seine Wirkung erst nach einer mehrere Stunden dauernden Inkubationszeit.

2.2.6.4. *Saccharomyces cerevisiae*, Chrom und der „Glukosetoleranzfaktor“

Bierhefe war eine der ersten Quellen, aus denen Extrakte mit Eigenschaften des „Glukosetoleranzfaktors“ gewonnen wurden (siehe Kapitel 2.2.5). Nicht zuletzt aufgrund ihrer bequemen Handhabung im Labormaßstab und der Möglichkeit, das in Bierhefe aufgenommene Chrom radioaktiv zu markieren, diente Bierhefe bei nahezu allen dokumentierten Prozeduren zur Gewinnung von Extrakten mit GTF- Aktivität als Ausgangsmaterial.

2.2.6.4.1. *Saccharomyces cerevisiae* und Chrom

Der Chromgehalt der Hefe bzw. der Hefeextrakte ist naturgemäß stark von den Kulturbedingungen abhängig. Zum Chromgehalt können die Ingredienzien des Nährmediums (z.B. Bierwürze) wie z.B. Hopfen und Malz, aber auch Einträge aus den verwendeten Werkstoffen, insbesondere Edelstähle, beitragen [174][175]. In neuerer Zeit werden zudem spezielle Hefeprodukte mit erhöhtem Chromgehalt angeboten. Literaturangaben über den Chromgehalt von Hefe und Hefeprodukten schwanken daher stark von 0,4 µg/g [156] bis hin zu 2180 µg/g [157]. Der Chromgehalt des für GTF- Studien häufig eingesetzten Hefeextraktes der Firma Merck wird z.B. in zwei separaten Batches mit 1,15 µg/g und 11,2 µg/g [176] bis 21 µg/g angegeben [177]. Der Median des Chromgehalts der in den o.a. Supplementationstudien (Kap. 2.2.6) eingesetzten Hefeprodukte (Trockenhefe und Extrakt) beträgt 1,67 µg/g Hefeprodukt. Eine ältere Quelle gibt einen Wert von 10 µg/g an [178]. Die IAEA- Datenbank „Natural Matrix Reference Materials“ enthält für Hefe Referenzproben von 0,30 µg/g bis 221 µg/g Chromgehalt [179].

Chrom hat für *S. cerevisiae* vermutlich keine Bedeutung als essentielles Spurenelement (s. Kap. 2.2.5), und wirkt auch in seiner dreiwertigen Form in höheren Konzentrationen toxisch. Bereits Hébert [180] vergleicht Chrom hinsichtlich seiner toxischen Wirkung auf Hefe mit Zirkon, Aluminium und Cer, stellt aber gleichzeitig eine gewisse Steigerung der Fermentationsgeschwindigkeit durch Zugabe von Chrom(III)sulfat

fest. White und Munns [181] klassifizieren Chrom als „gemäßigt giftig“ für Hefe in synthetischem Nährmedium, wobei das Hefewachstum bei einem Chromgehalt von 260 mg/L vollständig zum Erliegen kommt. Eine Chromkonzentration von 5 mg/L hatte keine Auswirkungen auf die Fermentation in Bierwürze, wirkte aber deutlich hemmend auf das Hefewachstum bei wiederholtem Überimpfen [182]. Hartelius [183] konnte eine stark hemmende Wirkung von CrCl_3 in synthetischem Nährmedium bei einer Konzentration von 250 mg/L nachweisen, während bei einer Konzentration von 50 mg/L noch normales Wachstum beobachtet wurde. In einem komplexen Medium (Bierwürze) hingegen war Hefewachstum noch bis 1000 mg/L möglich. Kumpulainen und Koivistoinen bemerkten eine leichte Depression des Hefewachstums in synthetischem Medium bereits bei einer Chrom(III)konzentration (als CrCl_3) von 1 mg/L Nährmedium [184]. Ähnlich stellten Davies et al. [185] in synthetischem Nährmedium eine deutliche Wachstumshemmung bei einer Chrom(III)konzentration (als Chrom(III)azetat) von 2 mg/L fest. Unter gleichen Bedingungen konnten Holdsworth und Neville [186] keinerlei Effekte der Chromzugabe bemerken. Hegóczki et al. [187] bemerkten in halbsynthetischem Nährmedium eine leichte Wachstumshemmung ab 10 mg/L und eine deutliche Hemmung ab 50 mg/L Chrom(III)konzentration. Bei 100 mg/L und 200 mg/L betrug die Dichte der gebildeten Biomasse noch ca. $\frac{1}{3}$ des Ausgangswertes. Batic und Raspor [188] stellten einen toxischen Effekt von Chromalaun ($\text{K}_2\text{Cr}(\text{SO}_4)_2$) schon bei einer Konzentration von 5,2 mg/L im Nährmedium fest, der sich in der Batch- Kultur in einer deutlich verlängerten „lag“- Phase äußerte.

Die Angaben über die Chromaufnahme von Hefe in Batchkulturen schwanken beträchtlich. Burkeholder und Mertz geben an, daß in der Batchkultur die Zugabe von Glukose in das Nährmedium nach drei und vier Tagen die Aufnahme von Chrom(III) (Form wird nicht angegeben) um den Faktor 40 steigert [173]. Anderson et al. stellen dagegen je nach Zusammensetzung des Nährmediums nach Glukosezugabe entweder eine Abnahme oder nur einen geringen Einfluß der Glukosezugabe auf die von der Hefe aufgenommene Menge von Chrom(III) (als CrCl_3) fest [189]. Stattdessen finden sie einen deutlichen Einfluß der Phosphatgehalts auf den Chromgehalt der Hefe. Der Einsatz eines Standardmediums mit einem Phosphatgehalt größer als 0,3 g/L bei einem Optimum von 1 g/L steigerte die Chromaufnahme um den Faktor 100. Kumpulainen und Koivistoinen [184] finden keinen Einfluß einer Glukosezugabe zur Hefekultur auf die Aufnahme von CrCl_3 , Kumpulainen et al. [190] finden allerdings einen geringen Einfluß der Inkubationszeit. Anderson et al. stellten fest, daß Zitronensäure und Kali-

umziträt als potentielle Chelatbildner für Chrom(III) die Aufnahme von CrCl_3 hemmen [191]. Bei Vergleich von CrCl_3 mit Chrom(III)- Nikotinsäure-Glutathion und Chrom(III)- Nikotinsäure-Glyzin, Cystein, Glutaminsäure- Komplexen ergaben sich keine Unterschiede in der Chrom- Aufnahme durch Bierhefe [189]. Während die meisten Autoren die Hefe mit CrCl_3 inkubierten, setzten Davies et al. [185] sowie Holdsworth und Neville [192][186] Chrom(III)-Azetat ein. Batic und Raspor [188] verwendeten hingegen Chromalaun ($\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$). Tabelle 5 zeigt eine Übersicht über die veröffentlichten Arbeiten mit quantitativen Angaben zur Chromaufnahme in Hefe. (Burkeholder und Mertz [173] sowie Anderson et al. [189][191] geben keine quantitativ auswertbaren Daten an):

Tabelle 5: Chromaufnahme in Hefe bei verschiedenen Autoren 1978 - 2000

	Jahr	Nährmedium ¹	Kulturbedingungen	Cr-Verbindung	Chromkonz. im Medium [mg/L]	Chromgehalt der Hefe [ng/g] ²	Gesamtchromaufnahme	Referenz
Kumpulainen et al.	1978	synth.	anaerob	CrCl ₃	0,0078	27,8	0,3%-0,7%	[190]
					0,63	1714		
					0,78	1571		
					0,78	1357		
Kumpulainen et al.	1978	synth.	anaerob	CrCl ₃	0,05	64,3	1,3%	[184]
					0,15	89,3	0,57%	
					0,40	1039	2,24%	
			aerob		0,80	2475	2,41%	
					0,50	1428	1,25%	
					1,00	2500	1,06%	
					2,00	4285	0,88%	
4,00	8571	0,80%						
Davies et al.	1985	synth.	n.a.	CrAcetat	1,00	5930	3,4%	[185]
Holdsworth et al.	1988	synth.	n.a.	CrAcetat	1,00	10.000	5%	[192]
Holdsworth et al.	1990	synth.	n.a.	CrAcetat	0,0104	80	3,8%	[186]
					1,00	10.000	5%	
Weseloh	1991	synth.	aerob	CrCl ₃	0,0002	0,84	n.a.	[193]
					0,20	1,72	n.a.	
					1,00	4,2	1,2%	
Hegóczki et al.	1997	nat.	aerob	CrCl ₃	10	100.000	n.a.	[187]
					20	200.000		
					50	700.000		
					50	1.600.000		
					100	3.300.000		
					100	2.850.000		
					200	4.200.000		
Batic et al. ³	2000	synth.	aerob?	KCr(SO ₄) ₂	5,2	451.000	n.a.	[188]

¹synth.: es wird ein Medium mit genau definierter Zusammensetzung eingesetzt; nat.: im Nährmedium wird Hefeextrakt als Zusatz verwendet

²ggf. wird von Feucht- auf Trockengewicht umgerechnet (Faktor 3,57 [194])

³Verwendung von *Candida intermedia*

In der graphischen Darstellung (Abb. 7) zeigt sich trotz aller Unterschiede dieser Studien hinsichtlich Zusammensetzung des Nährmediums, Inkubationsbedingungen, Inkubationsdauer und eingesetzter Chromverbindung und der im Einzelfall großen Schwankungsbreite der Resultate bei den jeweiligen Autoren ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen der Chromkonzentration im Nährmedium und dem Chromgehalt der Hefe über mehr als 6 Größenordnungen:

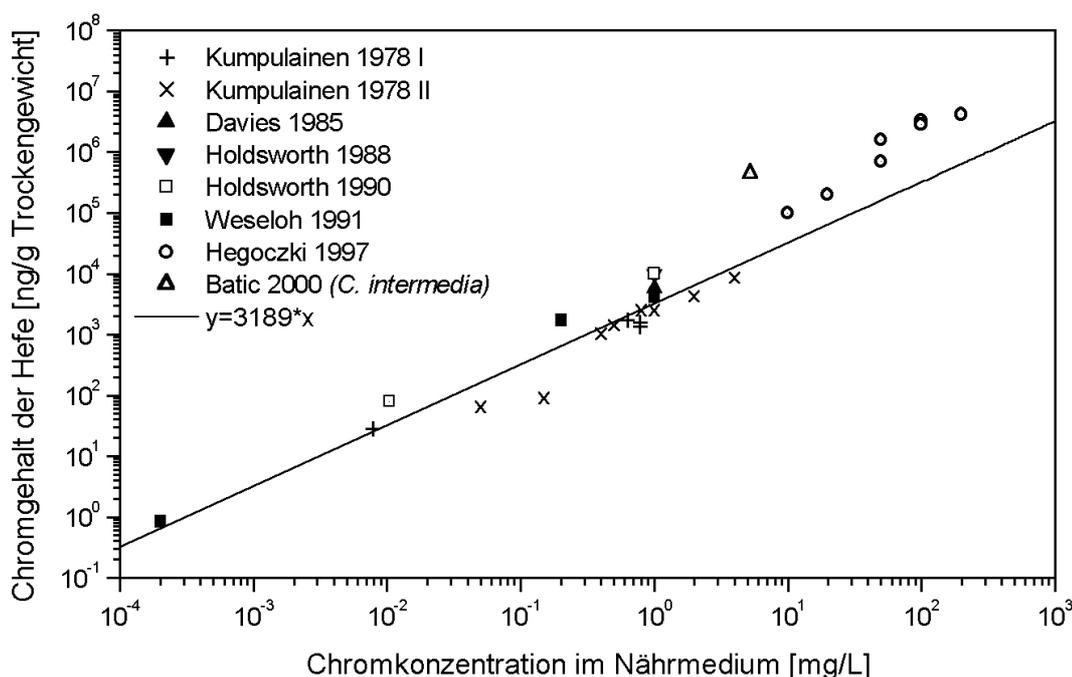


Abb. 7: Zusammenhang zwischen Chromkonzentration in Nährmedium und Chromgehalt der Hefe bei verschiedenen Autoren. Angaben in Feuchtweg wurden ggf. auf Trockengewicht umgerechnet (Faktor 3,57). Die durch den Ursprung gehende Gerade $y=3189 \cdot x$ entspricht einem angenommenen Biokonzentrationsfaktor von 1 (die Chromkonzentration in der Hefe entspricht der Konzentration des äußeren Mediums) (Dichte von Hefe als 1,12 angenommen [195]).

Dieser ungefähr lineare Zusammenhang legt nahe, daß in einem weiten Bereich der Chromkonzentration im Nährmedium unabhängig von den Kulturbedingungen der gleiche Mechanismus einer Absorption bzw. Adsorption von Chrom in/auf Hefe wirksam ist. Es zeigt sich außerdem, daß die Konzentration von Chrom innerhalb der Hefe im Wesentlichen der Konzentration des umgebenden Nährmediums entspricht. Von

einer „Akkumulation“ von Chrom durch Hefe kann also in diesem Zusammenhang nicht gesprochen werden.

2.2.6.4.2. *Saccharomyces cerevisiae* und Diabetes

Erkenntnisse über eine blutzuckersenkende Wirkung von Bierhefe reichen ins vorletzte Jahrhundert zurück [189]. Bereits vor der erstmalig erfolgreichen Anwendung von Pankreasextrakten zur Behandlung von depankreatisierten Hunden im Jahre 1921 durch Banting und Best [196] berichteten Euler und Svanberg [197] im Jahre 1916 von einer Senkung des Blutzuckers zweier Diabetiker nach subkutaner Injektion von Hefeextrakten. Vahlen [198] konnte 1919 Hefeextrakte gewinnen, die in der Lage waren, die Gärung von Hefe zu beschleunigen und nach oraler Verabreichung den Blutzucker zweier Diabetiker „erheblich herabzudrücken“. Collip [199] demonstrierte 1923 die blutzuckersenkende Wirkung von Hefe- und verschiedenen Pflanzenextrakten nach subkutaner Injektion in Kaninchen und depankreatisierten Hunden. Hutchinson et al. sowie Winter und Smith [200] gewannen Hefeextrakte, die nach subkutaner Injektion bei Kaninchen und Diabetikern eine Wirkung „ähnlich der von Insulin“ zeigten [201]. Über einen „insulinartigen Körper in der Hefe“ berichtete später ebenfalls Euler nach *in vitro*- Versuchen mit Froschmuskulatur, konnte allerdings *in vivo* keine signifikante Wirkung seiner Hefeextrakte auf den Blutzucker von Kaninchen feststellen [202]. Während die vorstehenden Erkenntnisse als insulinmimetische Wirkung von Hefeextrakten gedeutet wurden, konnten Glaser und Halpern [203] die blutzuckersenkende Wirkung von Insulin bei Kaninchen durch 16- stündige Inkubation in gekochtem Hefepreßsaft verstärken. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der anderen Autoren zeigte der Hefepreßsaft allein bei ihren Versuchen keine Wirkung.

2.2.6.4.3. Versuche zur Isolation von Fraktionen mit GTF- Aktivität aus Bierhefe

Angesichts des der Bierhefe zugesprochenen außergewöhnlichen hohen Gehalts an „Glukosetoleranzfaktor“ bzw. biologisch aktiven Chromverbindungen gab es in den Jahren nach 1970 zahlreiche Versuche, das „aktive Prinzip“ aus Bierhefe zu isolieren. Zur Verfolgung der Aufreinigung und Überprüfung der Wirksamkeit der Extrakte wur-

den meist der von Mertz und Schwarz bereits 1961 eingeführte Assay mit epididymalem Fettgewebe aus Ratten [168], seine Variante mit einzelnen Adipozyten [170] oder der 1967 vorgeschlagene Assay mit Bierhefe selbst [173] eingesetzt. Im Adipozyten-Assay wird gewöhnlich die durch Insulin stimulierte Veratmung von zugesetzter Glukose zu CO_2 in Gegenwart der Testsubstanz(en) bestimmt. Beim Hefe-Assay wird die Tatsache ausgenutzt, daß Substanzen mit angenommener GTF- Aktivität (einschließlich anorganischem Chrom(III)) die Fermentation der Hefe beschleunigen. Auf diese Weise wurden seit 1973 17 Arbeiten dokumentiert, die sich mit der Extraktion des chromhaltigen Glukosetoleranzfaktors aus Bierhefe befassen. Die meisten dieser Arbeiten orientieren sich an dem bereits 1959 von Schwarz und Mertz [99] erwähnten und 1974 erstmals detaillierter beschriebenen [204] Verfahren zur Extraktion des Glukosetoleranzfaktors aus Bierhefe. Dieses Verfahren geht von Trockenhefe aus, umfaßt eine Extraktion mit 50%igem Ethanol in der Hitze nebst Adsorption des Extraktes auf Aktivkohle. Das von der Aktivkohle adsorbierte Material wird mit einer Mischung aus konzentrierter Ammoniaklösung und Ether eluiert, im Vakuum konzentriert, mit Ether gewaschen und nacheinander über eine Dowex-50- Kationentauschersäule, eine Anionentauscher- Säule (nicht näher dokumentiert) und eine Gelfiltrationssäule aufgereinigt. In der 1977 veröffentlichten Variante [138] wird das von der Aktivkohle eluierte Material nach Vakuumkonzentration 18 Stunden lang im Rückfluß mit 5 M HCl gekocht, die Salzsäure anschließend im Vakuum entfernt und erneut mit Ether gewaschen. Nur wenige Autoren versuchten, aus Hefe native Chromkomplexe unter schonenderen Bedingungen zu gewinnen. Tabelle 6 gibt eine Übersicht über die bisher dokumentierten Versuche, chromhaltige Verbindungen aus Bierhefe zu isolieren:

nächste Doppelseite:

Tabelle 6: Übersicht über die bisher dokumentierten Versuche, chromhaltige Verbindungen aus Bierhefe zu fraktionieren:

Tabelle 6: Übersicht über die bisher dokumentierten Versuche, chromhaltige Verbindungen aus Bierhefe zu fraktionieren:

	Jahr	Ausgangsprodukt:	1. Extraktion:	weitere Probenverarbeitung:	Aufreinigung:	Cr-Best.:	Fraktionen: [MW, Ladung]	Ref.:
Votava et al.	1973	Hefe	BuOH/H ₂ O 50%	Gefriertrocknung	Sephadex G25/Tris-HCl Dowex-50W/NaCl	⁵¹ Cr	(-)400-600	[205]
Toepfer	1974	Hefe, getrocknet	EtOH/H ₂ O 50%	Aktivkohle/NH ₄ OH-Ether	DOWEX-50 Sephadex			[206]
Toepfer et al.	1977	Hefe	auskochen in EtOH/H ₂ O 50%	Aktivkohle/NH ₄ OH HCl	Dowex-50-X8/NH ₄ OH	n.a.	10*(+)	[138]
Kumpulainen et al.	1978	Hefe	Zellaufschluß EtOH/H ₂ O 50%		Sephadex G25/H ₂ O Dowex 50WX8/NH ₄ OH Sephadex QAE A25/NH ₄ CO ₃ TLC/BuOH/EtOAc/H ₂ O	⁵¹ Cr	(+)234,(+)300, (+)493,(-)142, (-)234	[190]
Mirsky et al.	1980	Hefe-Extr.	BuOH/H ₂ O 50%	Dialyse (MWCO 3500)	DEAE-11/NH ₄ Cl Dowex 50WX8/NH ₄ OH	n.a.	(+)	[177]
Blincoe et al.	1983	Hefe	auskochen in EtOH/H ₂ O 50%	Aktivkohle/NH ₄ OH HCl	Sephadex G25/K ₂ HPO ₄	⁵¹ Cr	(+)	[207]
		Hefe	BuOH/H ₂ O 50%	Dialyse (MWCO 3500)	DEAE-11/NH ₄ Cl Sephadex G25/K ₂ HPO ₄	⁵¹ Cr	(+)	
		Hefe	Zellaufschluß, H ₂ O		Sephadex G25/K ₂ HPO ₄	⁵¹ Cr	(-)	
Starich et al.	1983	Hefe	Zellaufschluß, Na ₂ HPO ₄ 0,01M		Sephadex G-25 DEAE-Sephacel/HPO ₄ ²⁻	⁵¹ Cr	(-) ~2600	[82]
Haylock et al.	1983	Hefe-Extr.	H ₂ O		Dowex 50W-X12/Na ₃ PO ₄ Dowex 1-X8/Tris-HCl Sephadex G15	AAS	4*(+) 4*(0) 3*(-)	[176]
Haylock et al.	1983	Hefe	Zellaufschluß BuOH/H ₂ O 50%		Dowex 50W-X12/Na ₃ PO ₄ Dowex 1-X8/Tris-HCl Sephadex G15	⁵¹ Cr	1*(+) 6*(0) 3*(-)	[208]
		Hefe	Zellaufschluß		Whatman DE-23/Tris-HCl Sephadex G25	AAS	2*(-)	
Held et al.	1984	Hefe, getrocknet	NH ₄ OH 0,1M	Dialyse	Dowex 1 Sephadex G15 DE Cellulose ? SE Cellulose ? Ion-Pair HPLC ?	GFAAS	(-)900	[209]

Davies et al.	1985	Hefe	NH ₄ OH 0,2M/BuOH 14%	Gefriertrocknung	Whatman DEAE 22/HCl DEAE Sephacel Dowex 50W-X2/TEAc Dowex 50W-X8/NH ₄ OH Dowex 50W-X2/NH ₄ OH BioGel P4/NH ₄ OH	GFAAS ⁵¹ Cr	zahlreiche	[185]
Hwang et al.	1987	Hefe	Zellaufschluß ¹	Dialyse (MWCO 3500)	Whatman SE53/NH ₄ OH BioGel P2	⁵¹ Cr	5	[210]
Holdsworth et al.	1988	Hefe	Trocknung NH ₄ OH 0.5M	Gefriertrocknung	BioGel P4/NH ₄ OH DEAE Sephadex A25/HCl	⁵¹ Cr	5*(+)	[192]
Holdsworth et al.	1990	Hefe	Trocknung NH ₄ OH 0.5M	Gefriertrocknung	BioGel P4/NH ₄ OH DEAE Sephadex A25/HCl Dowex 50	GFAAS ⁵¹ Cr	4*(+) 1*(-) <1300	[186]
Simonoff et al.	1992	Hefe	BuOH/H ₂ O		DEAE Cellulose/HCl Dowex 50WX8/TEA DEAE Sephacel/? Dowex 50WX2/TEA BioGel P4	PIXE	11*(-)	[211]
Beran et al.	1993	Hefe-Extrakt	H ₂ O		Sephadex G50 HPLC-RP18/Tris	GFAAS AAS	1(?)	[212]
Beran et al.	1995	Hefe-Extrakt	H ₂ O		HPLC-RP8/MeOH	GFAAS AAS	2	[213]

¹Zellaufschluß durch wiederholtes Einfrieren/Auftauen in 9mol/L Harnstoff

Abkürzungen: n.a.: nicht angegeben; EtOH: Ethanol; BuOH: Butanol; NH₄OH: wäßrige Ammoniaklösung; TEA: Triethylamin ; TEAc: Triethylaminacetat; Tris: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan; MW: Molekulargewicht; MWCO: Molecular weight cut-off (Dialyse); TLC: Thin layer chromatography; PIXE: Particle induced X-ray emission; GFAAS: Graphite furnace atom absorption spectrometry; AAS: Atom absorption spectrometry

Grundsätzlich ist zu unterscheiden zwischen der Verwendung kommerzieller, getrockneter Hefeextrakte und der von frischer, ggf. selbst gezogener Hefe als Ausgangsmaterial. Der Einsatz von ^{51}Cr als radioaktiver Tracer zur zuverlässigen Verfolgung des Chromgehalts während der Aufarbeitung schließt die Verwendung kommerzieller Ware aus.

Trotz der relativ einheitlichen Vorgehensweise bei den Extraktionsprozeduren sind die Ergebnisse der Fraktionierungen insgesamt sehr uneinheitlich. Die Anzahl der in frischer Hefe oder in Hefeextrakten aufgefundenen Fraktionen schwankt zwischen einer und mehr als 30 [185]. Das Molekulargewicht reicht von 142 bis ca. 2600; es werden offensichtlich neutrale Fraktionen sowie Fraktionen mit positiver und negativer Ladung beschrieben.

Mit schonenderen Methoden und unter Verwendung von frischer Hefe als Ausgangsmaterial haben vor allem Votava [205], Blincoe [207] und Starich [82] gearbeitet. Diese Autoren verzichteten im Gegensatz zu anderen auf die Anwendung von Ionenaustauschchromatographie mit entsprechend drastischen Elutionsmitteln. Im Gegensatz zu den anderen Arbeiten wurde hier nur jeweils eine anionische Chromfraktion mit Molekulargewichten von 400-600 oder 2600 isoliert. Es scheint so, daß die Anwendung wenig schonender Verfahren zum Zerfall der Chromverbindungen und zu nachfolgender Bildung von Artefakten führt, deren Art, Anzahl und biologische Aktivität empfindlich von der Methode der Aufarbeitung abhängt.

Die wesentlichen Arbeiten über die Entdeckung und die Eigenschaften des „Glukosetoleranzfaktors“ stammen von Mertz und Schwarz [99] und beinhalten gleichsam eine Definition dessen, was unter einem „Glukosetoleranzfaktor“ zu verstehen ist (Kapitel 2.2.6). Es ist denkbar, daß der „Glukosetoleranzfaktor“ erst bei einer bestimmten Prozedur der Extraktion entsteht bzw. aus einem inaktiven Vorläufer „aktiviert“ wird, so daß das nativ in Hefe enthaltene Material ohne eine bestimmte Vorbehandlung keine *in vitro* GTF- Aktivität aufweist. Es kann jedoch als sicher angenommen werden, daß die Anwendung der ursprünglich von Mertz et al. vorgeschlagenen Prozeduren der Aufarbeitung von Hefeprodukten, wie sie oben beschrieben wurden, kein nativ in Hefe vorhandenes chromhaltiges Material liefern kann. Zur Auflösung dieser Problematik erschien es angebracht, eine Prozedur zur Fraktionierung und Speziation der ursprünglich in Hefe vorhandenen Chromkomplexe zu entwickeln, um deren chemische Reaktionen und physiologische Eigenschaften besser verstehen zu können. Die physiologi-

schen Vorgänge in Hefe sollten außerdem direkte Relevanz für den Metabolismus von Chrom(III) in höheren Organismen bis hin zum Menschen haben und hier gewonnene analytische Erkenntnisse sollten sich direkt auf andere komplexe biologische Matrizes übertragen lassen. Eine leistungsfähige Methode, die die Speziationsanalytik von Chromverbindungen in Bierhefe gestattet, könnte ferner dazu beitragen, jenseits der diskutierten Bedeutung von Chrom als „essentiellm Spurenelement“ weitere Erkenntnisse über den Metabolismus der dreiwertigen Kationen Eisen und Aluminium zu liefern.

2.3. Methoden zur Untersuchung der Aufnahme von Chrom(III) in Bierhefe und zur Fraktionierung komplexer chromhaltiger Verbindungen aus Bierhefe und Nährmedium

Der Kenntnisstand über die Existenz und den Metabolismus des dreiwertigen Chroms in biologischen Matrizes ist unbefriedigend. Der Versuch der Separation und Analyse der vorkommenden Spezies blieb bisher ohne durchgreifenden Erfolg. Einerseits kamen häufig wenig leistungsfähige Trennverfahren zur Anwendung, andererseits wurde der möglicherweise sensiblen Natur der natürlich vorkommenden Chromkomplexe keine Rechnung getragen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, ein sowohl leistungsfähiges als auch schonendes Trennverfahren zu entwickeln und auf ein in Hinblick auf den Chrommetabolismus relevantes Problem anzuwenden. Bierhefe ist durch ihre problemlose Aufzucht im Labormaßstab und die Möglichkeit, Aufnahme und Verbleib von Chrom anhand des radioaktiven Tracers ^{51}Cr nachzuweisen, ein ideales Modell für die Entwicklung und Erprobung von Methoden zur Speziation von Chromverbindungen in biologischen Matrizes.

Bisherige Arbeiten über den chromhaltigen Glukosetoleranzfaktor gingen allgemein von einem niedrigen Molekulargewicht dieser Substanz aus. Die von Mertz [204] aufgrund eigener Arbeiten für die Struktur des „Glukosetoleranzfaktors“ vorgeschlagenen einkernigen Chromkomplexe weisen Molekulargewichte zwischen 370 und 570 auf.

Das zuerst von Yamamoto et al. [92] und später von Davis und Vincent [91] in Säugern gefundene „LMWCr“ (low-molecular-weight chromium-binding substance) wird mit einem Molekulargewicht von 1450 beschrieben. Im Mittelpunkt des Interesses der vorliegenden Arbeit stand daher vor allem die Fraktionierung niedermolekularer Chromspezies.

Leistungsfähige Methoden zur Trennung von komplexen Stoffgemischen aus biologischen Matrices stellen vor allem die Gelelektrophorese, die Kapillarelektrophorese und die Ionenchromatographie sowie die Chromatographie auf Umkehrphasen (Reversed-Phase Chromatography) dar. Die Gelelektrophorese auf quervernetzten Polyacrylamidgelen eignet sich aufgrund der Porenstruktur der verwendeten Gele nur zur Trennung von höhermolekularen Stoffgemischen ab einem Molekulargewicht von 1000 Dalton aufwärts [214]. Die Kapillarelektrophorese (in Form der „free zone capillary electrophoresis“) eignet sich zwar hervorragend auch zur hochaufgelösten Trennung niedermolekularer ionischer Substanzen, weist aber aufgrund der eingesetzten sehr geringen Substanzmengen relativ schlechte relative Nachweisgrenzen auf. Zur Fraktionierung der niedermolekularen Chromspezies aus Bierhefe kommen daher von vornherein lediglich flüssigchromatographische Methoden in Betracht. Vor einer chromatographischen Auftrennung des aus Hefe gewonnenen Stoffgemisches ist es jedoch notwendig, die Matrix durch vorgeschaltete Aufreinigung soweit als möglich zu vereinfachen.

An die anzuwendenden Methoden sind folgende Anforderungen zu stellen:

Sämtliche Arbeitsschritte sind auf die möglicherweise instabile Natur der Chromkomplexe abzustimmen. Insbesondere hohe und niedrige pH- Werte sowie der Einsatz starker Komplexbildner in den eingesetzten Medien sind zu vermeiden. Bei Verwendung des radioaktiven ^{51}Cr als Tracer ist der konsequente Ausschluß von Kontaminationen durch Chrom und andere Schwermetalle, insbesondere bei der Aufarbeitung der Proben, vermutlich nicht zwingend notwendig. Dennoch sind externe Kontaminationen durch Schwermetalle nach Möglichkeit zu minimieren, da sie entweder den Stoffwechsel der Hefe beeinflussen oder durch Austauschprozesse mit der Analyse des radioaktiv markierten Chroms interferieren könnten. Eine mögliche spätere Umstellung des Analysenverfahrens auf inaktive Analysemethoden wird außerdem dadurch erleichtert.

2.3.1. Hefekultur

Ein wohldefiniertes System der Hefekultur ist Voraussetzung für reproduzierbare Untersuchungen des Metabolismus von Hefe. Dazu gehören die Auswahl einer geeigneten Heferasse und die Kultur unter reproduzierbaren Bedingungen in einem chemisch definierten Nährmedium.

2.3.1.1. Auswahl der Heferasse

Bisherige Arbeiten zur Isolation des „Glukosetoleranzfaktors“ aus Hefe sind meist wenig konkret in der Beschreibung der eingesetzten Heferasse. Mertz und Schwarz sprechen in ihren Veröffentlichungen von 1957 und 1959 von „Brewer’s yeast“ [98][99]. Andere Autoren verwenden ebenfalls unspezifiziert „Brewer’s Yeast“ oder „*Sacharomyces cerevisiae*“ und „*Saccharomyces carlsbergensis*“. Eine genaue Bezeichnung der verwendeten Rasse gibt lediglich Anderson 1978 mit „*Saccharomyces carlsbergensis* ATCC¹ 9080“ [189]. Die „Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ (DSMZ, Braunschweig) führt unter der Rubrik „*Saccharomyces cerevisiae*“ über 40 verschiedene Rassen auf. Für die vorliegende Arbeit wurde ausschließlich eine „Musterrasse“ der Art „*Saccharomyces cerevisiae*“ (obergärige Bierhefe aus der „Oranjeboom“- Brauerei, Rotterdam, als „Type Strain“ bezeichnet [215]) mit der Bezeichnung DSM 70449 (entsprechend ATCC 18824, CBS² 1171, NCYC³ 505, NRRL⁴ Y-12632) der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ eingesetzt.

¹ American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA

² Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande

³ National Collection of Yeast Cultures, ReNo Ltd, Institute of Food Research Norwich Laboratory, Norwich Research Park, Norwich, Großbritannien

⁴ ARS Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois, USA

2.3.1.2. Wahl des Kulturmediums

Obwohl viele Autoren auf diesem Gebiet komplex zusammengesetzte Nährmedien (z.B. Sabouraud's Flüssigmedium [205]) eingesetzt haben, erschien es aus Gründen der Reproduzierbarkeit und Kontrollierbarkeit sinnvoller, ein rein synthetisches Nährmedium zu wählen. Komplexe Nährmedien bestehen wenigstens zum Teil aus Nährstoffen, die aus natürlichen Quellen gewonnen werden, wie z.B. Proteinhydrolysate (Peptone), Malz- oder/und Hefeextrakte, die verschiedene störende Begleitstoffe in wechselnden Konzentrationen enthalten können. Dazu gehören Bruchstücke von Proteinen, möglicherweise aber auch Substanzen mit GTF- Aktivität [185]. Vorversuche zeigten, daß die Kontamination von Nährmedien aus derartigen Rohstoffen mit Chrom erheblich sein kann [193]. Die Vielfalt der Inhaltsstoffe in komplexen Nährmedien könnte sich von daher ebenfalls auf die Anzahl der im Nährmedium gebildeten Chromverbindungen auswirken. Nur die Verwendung vollsynthetischer Nährmedien ermöglicht die Kontrolle aller relevanten Parameter einer Hefekultur.

Die Wahl der im Nährmedium befindlichen Chromkonzentration könnte eine wesentliche Bedeutung hinsichtlich Art und Ausbeute der von der Hefe gebildeten Chromverbindungen haben. Schwarz und Mertz setzten in ihren frühen Arbeiten gewöhnliche Bierhefe ein, aus denen sie GTF- Extrakte isolierten [99]. In Fällen, in denen Hefe zwecks Extraktion chromhaltiger Verbindungen in chromhaltigen Nährmedien gezogen wurden, sind Chromkonzentrationen im Medium von nahezu „Null“ (nur radioaktives ^{51}Cr , kein extra zugesetzter Träger) [190][210] und 1 mg/L [185] verwendet worden. Bei höheren Konzentrationen als 1 mg/L wurde vereinzelt bereits von Wachstumshemmungen berichtet (siehe Kapitel 2.2.6.4). Sofern die Isolation von im weitesten Sinne „wägbaren“ Mengen einer Chromverbindung gelingen soll, darf die „physische“ Chrommenge im Nährmedium nicht zu gering sein. Bei Einsatz höherer Chromkonzentrationen ist mit der Induktion von „Abwehrmechanismen“ der Hefe als metabolische Reaktion auf den durch Chrom verursachten Streß zu rechnen. Hierdurch könnte die Bildung von speziellen, der Entgiftung dienenden „Scavenger- Molekülen“ angeregt werden, so daß sich bei höheren Chromkonzentrationen das Spektrum der *in vivo* gebildeten Chromverbindungen ändert. Die ursprünglichen Ergebnisse von Schwarz und Mertz [99] zeigen zudem, daß offensichtlich Extrakte aus Hefen, die ohne „Chromstreß“ auf gewöhnlichen, nicht besonders chromhaltigen Nährmedien gezogen wurden, ausgeprägte GTF- Eigenschaften aufweisen. Es wurde daher in der vorliegenden Arbeit für die Hefekulturen, ähnlich wie in den Arbeiten von Davies et

liegenden Arbeit für die Hefekulturen, ähnlich wie in den Arbeiten von Davies et al. [185] und Holdsworth et al. [186][192], eine Chromkonzentration im Nährmedium von 1 mg/L eingesetzt, die an der Grenze der auf Hefe toxischen Wirkung in synthetischen Nährmedien liegt.

Chromabsorption, Chromadsorption und die Art und Anzahl der in Hefe gebildeten Chromspezies könnte durch die Art der dem Nährmedium zugesetzten Chromverbindung beeinflusst werden. Anderson et al. berichteten über eine die Chromaufnahme der Hefe hemmende Wirkung von Komplexbildnern im Nährmedium [191]. Der Einsatz verschiedener Chromkomplexe mit Nikotinsäure, Glutathion, Cystein und Glutaminsäure hatte keinen Einfluß auf die Chromaufnahme der Hefe [189]. Davies et al. [185] und Holdsworth [192][186] setzten im Gegensatz zu allen anderen Autoren Chrom(III)-Azetat ein, ohne daß sich die von ihnen berichteten Daten über die Chromaufnahme der Hefe signifikant von den Daten der Autoren unterscheiden, die CrCl_3 als Zusatz im Nährmedium eingesetzt haben (siehe Abb. 7). Dennoch ist aufgrund dieser Ergebnisse nicht auszuschließen, daß sich spezielle, bisher nicht untersuchte Chromkomplexe hinsichtlich ihres Metabolismus und ihrer Aufnahme in die Hefe unterscheiden.

Angesichts der widersprüchlichen Aussagen hinsichtlich der Eigenschaften der in Hefe befindlichen Chromkomplexe erschien es sinnvoll, in der vorliegenden Arbeit, wie auch in der Mehrzahl vergleichbarer Arbeiten, als Chromverbindung im Nährmedium CrCl_3 (bzw. die in sauren wäßrigen Lösungen tatsächlich vorliegenden Cr(III)-Aqua-komplexe) zu verwenden, um die Vergleichbarkeit dieser Studie mit ähnlichen Arbeiten zu gewährleisten.

2.3.1.3. Kulturbedingungen

Nur unter aeroben Wachstumsbedingungen sind die komplexen Stoffwechselfunktionen der Hefe zur Veratmung der Glukose aktiv. Anaerobe Stoffwechselwege lassen sich daneben bei *S. cerevisiae* nie vollständig unterdrücken. Sofern Chrom(III) in Bierhefe eine biochemische Funktion ausübt, ist eine Aktivierung des zugrunde liegenden Stoffwechselweges vor allem unter aeroben Bedingungen wahrscheinlich. In

der vorliegenden Arbeit wurde die Hefe daher stets unter aeroben Bedingungen kultiviert.

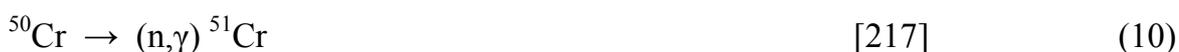
Für die Kulturdauer bzw. den Zeitpunkt der Zellernte finden sich in den bisherigen Arbeiten sehr unterschiedliche Angaben, die zudem aufgrund unterschiedlicher Kulturbedingungen hinsichtlich Temperatur, Nährmedium und aeroben/anaeroben Konditionen nicht vergleichbar sind. Anderson [189] fand in synthetischem Medium bei 26°C ein Maximum des Chromgehalts von Hefe nach 10 Tagen. In dieser Zeit sollte die „stationäre Phase“ der Hefeentwicklung, die durch den Verbrauch der vorliegenden Nährstoffe gekennzeichnet ist, erreicht worden sein. Eigene Vorversuche [193] zeigten hingegen nur einen geringen Einfluß der Kulturdauer auf den Chromgehalt der Hefe. Während der „stationären Phase“ der Hefeentwicklung treten in der Kultur nur noch geringe und im Gegensatz zur vorher häufig sehr stürmisch verlaufenden Wachstumsphase recht langsame Veränderungen auf, so daß die hier vorliegenden „quasistabilen“ Verhältnisse nur noch eine geringe Abhängigkeit von der vorhergegangenen Entwicklung der Kultur aufweisen sollten. Die „stationäre Phase“ stellt daher einen definierten, über eine gewisse Zeit stabilen Zustand einer Hefekultur dar. Entsprechend diesen Überlegungen und den Ergebnissen von Anderson [189], nach denen das Maximum der Chromaufnahme von Hefe nach etwa 10 Tagen erreicht wurde, wurde in der vorliegenden Arbeit die Hefe daher nach Erreichen der „stationären Phase“ aufgearbeitet.

2.3.2. Tracereexperimente mit ^{51}Cr

Die qualitative und quantitative Verfolgung der Chromaufnahme in die Hefezellen mit Hilfe von radioaktivem ^{51}Cr stellt eine sehr nachweisstarke Methode dar. Der besondere Vorteil der Tracertechnik liegt in der Vermeidung von Störungen durch das Einschleppen von externen Chrommengen. Mit Hilfe von ^{51}Cr lassen sich sowohl die Aufnahme von Chrom in die Hefezellen als auch die nachfolgenden Schritte der Aufarbeitung und Speziationsanalyse quantitativ mit hoher Zuverlässigkeit verfolgen. Nachteilig ist, daß bei Einsatz der Tracertechnik eine Vergrößerung des Arbeitsmaßstabs („Scale up“) durch die dann notwendigen großen Mengen an Radioaktivität nicht ohne weiteres machbar ist. Dadurch ist der Einsatz der Tracermethoden auf die im Labormaßstab beherrschbaren Volumina und Radioaktivitätsmengen beschränkt.

2.3.2.1. Eigenschaften von ^{51}Cr

Natürliches Chrom ist ein Gemisch aus den vier Isotopen ^{50}Cr (0,0431), ^{52}Cr (0,8376), ^{53}Cr (0,0955) und ^{54}Cr (0,0238) (relative Häufigkeiten in Klammern) [216]. Für Traceruntersuchungen hat nur das Isotop ^{51}Cr Bedeutung. Der übliche Zugang besteht in der Neutronenaktivierung von ^{50}Cr (entweder im natürlichen Isotopengemisch oder angereichert) mit thermischen Neutronen nach der Reaktion



^{51}Cr zerfällt mit einer Halbwertszeit von 27,702 Tagen durch K-Einfang mit einer Wahrscheinlichkeit von 90,12% ohne Emission von γ -Strahlung direkt in ^{50}V . Zu 9,88% entsteht in Folge des K-Einfangs zunächst $^{50\text{m}}\text{V}$, das sich mit kurzer Verzögerung unter Emission eines γ -Quants der Energie 320,0852 keV stabilisiert. Das dabei zunächst in einem elektronisch angeregten Zustand entstehende ^{50}V geht nach Emission eines Auger-Elektrons und einer Serie von Röntgenquanten in den stabilen Grundzustand über [218][219].

2.3.2.2. Dimensionierung der Traceransätze

Je höher die spezifische Aktivität (d.h., die „Menge“ an Radioaktivität pro Masseneinheit des Tracers) ist, mit desto größerer Empfindlichkeit läßt sich die Masse des Tracers quantitativ bestimmen. Da die eingesetzte Gesamtmenge an Chrom, mit der die Hefekulturen versehen werden, bereits feststeht (Kap. 2.3.1.2), besteht Spielraum lediglich hinsichtlich der Höhe der eingesetzten Aktivität. Unter der gut begründeten Annahme (siehe Kap. 2.2.6.4), daß die Hefe ca. 1% des Chroms aus der Kultur aufnimmt, beträgt die Chromkonzentration der Hefe-Biomasse bei einer Hefeausbeute von 8 g aus 1 L Nährmedium 1,25 $\mu\text{g/g}$ Hefe (Feuchtgewicht). Daraus lassen sich (bei einer Dichte der Hefe von 1,12g/mL) maximal 0,9 mL Hefeextrakt (unverdünnt) mit einer Chromkonzentration von höchstens 1,4 $\mu\text{g/mL}$ gewinnen. Das praktikable Probenvolumen für die HPLC beträgt 20 μL , entsprechend 28 ng Chrom. In einem Chromatographielauf können (bei Einsatz des verwendeten Fraktionssammlers) 170 Fraktionen gesammelt werden. Im „worst-case“-Szenario verteilt sich das Chrom auf alle

170 Fraktionen gleichmäßig, was einer Chrommenge von $28\text{ng}/170 = 165\text{ pg}$ pro Fraktion entspricht. Die Nachweisgrenze des verwendeten Szintillationsdetektors wurde für ^{51}Cr bei einer Meßzeit von 10 Minuten zu ca. 4 Bq bestimmt. Aus der Mindestaktivitätsmenge von 4 Bq für 165 pg Chrom ergibt sich eine Mindestaktivitätskonzentration von $24 \cdot 10^6\text{ Bq/mg Cr}$ in jeweils 1 L Hefekultur. Da während der Aufarbeitung mit erheblichen Verlusten zu rechnen ist und außerdem das bei Ansatz der Kultur vorhandene Chrom mit einer Halbwertszeit von 27,7 Tagen zerfällt, erschien es günstig, diesen Wert an den bereits von Davies et al. [185] eingesetzten Wert von $37 \cdot 10^6\text{ Bq/mg Chrom}$ (1 mCi/mg Chrom) entsprechend $37 \cdot 10^6\text{ Bq/L}$ bei einer Chromkonzentration im Nährmedium von 1mg/L anzupassen. Zur Erhöhung der Nachweisgrenze wurde für die 5 L- Ansätze die spezifische Aktivität des Chroms im Nährmedium weiter auf $74 \cdot 10^6\text{ Bq/mg}$ verdoppelt.

2.3.3. Zellernte

Zur Gewinnung der Zellinhaltsstoffe müssen die Hefezellen vom Kulturmedium getrennt werden. Dies kann entweder durch Filtration oder durch Zentrifugation geschehen. In Vorversuchen zeigte sich, daß die Filtration durch Absaugen selbst bei Verwendung eines relativ grobporigen Glasfaserfilters sehr zeitraubend sein kann, da der rasch entstehende kompakte Zellkuchen den Durchtritt der Flüssigkeit durch den Filter stark verzögert. Größere Mengen von Hefezellen lassen sich daher am schnellsten durch Zentrifugation vom Kulturmedium abtrennen.

2.3.4. Zellaufschluß

Um die Inhaltsstoffe einer Zelle zugänglich zu machen, ist zunächst entweder ein Extraktionsverfahren oder ein Zellaufschluß notwendig. Insgesamt erschwert die Konstitution der Hefezelle diese Prozeduren, weil sie, wie Pflanzenzellen auch, von einer relativ harten Zellwand aus Polysacchariden (Glucan und Mannan) umgeben ist. Um mit Sicherheit sämtliche Inhaltsstoffe der Zelle zugänglich zu machen, sind entweder drastische Extraktionsmethoden oder ein mechanischer Aufschluß nötig.

Im Zuge der Aufarbeitung von Hefe zur Gewinnung chromhaltiger Verbindungen sind verschiedene Verfahren eingesetzt worden. Die ursprüngliche Prozedur von Schwarz und Mertz [99][204] geht von einer mit siedendem Ethanol ausgeführten Extraktion von Trockenhefe aus. Sofern frische Hefe als Ausgangsmaterial gewählt wurde, wurden zur Extraktion entweder Butanol/Wasser- Gemische [205], wäßrige Ammoniaklösung [189] oder eine Kombination aus diesen Verfahren angewandt [185]. Ein mechanischer Zellaufschluß wurde lediglich von Blincoe et al. [207], Starich et al. [82] und Haylock et al. [208] durchgeführt. Hwang et al. [210] bewirkten einen Aufschluß der Hefezellen durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen in Gegenwart von 9 M Harnstoff (Tabelle 6). Die Wirksamkeit der Extraktionsverfahren wird zwischen 100% (Extraktion mit Butanol/Wasser 1:1) [205] und 30-50% (Extraktion mit Ethanol/Wasser 1:1) [190] angegeben. Darüber hinaus schwanken die Angaben über die Wirksamkeit einer Extraktion von frischer Hefe mit Ethanol- oder Butanol- Wasser- Gemischen beträchtlich. Hwang et al. [210] untersuchten die Wirksamkeit einer Reihe von Extraktionsmethoden und konnten mit Butanol/Wasser 1:1 lediglich 43% des Chroms aus Hefe extrahieren. Ethanol/Wasser 1:1 führte zu einer Extraktionsquote von lediglich 4%. Es ist allerdings zu beachten, daß sich diese Angaben der verschiedenen Autoren offensichtlich auf die gesamte, von der Hefe aufgenommene Chrommenge beziehen und nicht zwischen löslichen und partikulär gebundenem Chrom unterschieden wurde, was eventuell die starken Diskrepanzen dieser Angaben erklären kann.

Diese Ergebnisse führten zu dem Schluß, daß eine gleichzeitig quantitative und schonende Gewinnung der löslichen, zytosolischen Chromverbindungen aus Hefe nur nach einem Aufschluß der Hefezellen möglich erscheint.

Hefen sind im Gegensatz zu tierischen Zellen oder den meisten Bakterien durch ihre harte Zellwand mechanisch sehr robuste Organismen. An die Methode zum Aufschluß von Hefe zur Gewinnung von Chromverbindungen waren folgende Anforderungen zu stellen:

- Keine Kontamination der Probe durch Schwermetalle, insbesondere Chrom.
- Möglichst keine Kontaminationen durch Fremdstoffe.
- Aufschluß unter chemisch milden Bedingungen möglich.
- Vollständiger Aufschluß in kurzer Zeit.
- Möglichst quantitative Ausbeute.
- Sichere Handhabung bei Verwendung des radioaktiven Tracers.

Angesichts dieser Voraussetzungen waren Methoden, die den Einsatz von Chemikalien im weitesten Sinne (also auch lytische Enzyme) benötigen, als ungeeignet abzulehnen. Der Aufschluß durch Autolyse der Hefezellen kommt zwar ohne Zusatz von Hilfsstoffen aus, ist allerdings sehr zeitintensiv (12 bis 24 Std.) und ist letztlich durch starken enzymatischen Abbau der Hefeinhaltsstoffe durch hefeeigene lytische Enzyme bei gleichzeitig erhöhter Temperatureinwirkung wenig schonend, was sich z.B. durch eine niedrige Ausbeute an Proteinen äußert [220]. Weiterhin ungünstig erschien der Einsatz von Hochdruckapparaturen, wie er in der „French Press“ oder der „X-Press“ [221] zum Einsatz kommen, da diese Geräte vollständig aus Edelstählen gefertigt werden, die mit dem aufzuschließenden Medium direkt in Kontakt kommen. Am Besten geeignet erschien daher der Aufschluß durch heftige mechanische Bewegung mit Glasperlen, eventuell auch in Verbindung mit Ultraschall [221]. Der Aufschluß unter Verwendung von Glasperlen mit Ultraschall liefert nach Literaturangaben allerdings häufig wechselnde Ergebnisse [221] und benötigt oft sehr lange, von häufigen Pausen unterbrochene Einwirkzeiten des Ultraschalls (60 Minuten) um eine zu starke Temperaturerhöhung zu vermeiden [222].

Der mechanische Aufschluß durch heftiges Schütteln oder Rühren hochkonzentrierter Zellsuspensionen mit Glasperlen wurde erstmals beschrieben von Curran and Evans [223] sowie Lamanna und Mallette [224]. Ein wesentlicher Nachteil der Prozedur liegt in der Notwendigkeit, die Glasperlen (ganze und zerbrochene) von der Suspension mit den aufgeschlossenen Zellen abzutrennen, was mit beträchtlichen Verlusten verbunden sein kann, insbesondere, wenn eine Verdünnung des Extrakts durch Spülpuffer vermieden werden soll. Nach eigenen Erfahrungen muß darüber hinaus mit dem Auftreten von fein dispersem Glasmehl gerechnet werden. Während der Aufschlußprozedur ist

die durch das heftige Rühren oder Schütteln entstehende Wärme durch Kühlung abzuführen. Je nach den mechanischen Gegebenheiten sind sehr kurze Aufschlußprozeduren im Bereich von Minuten möglich [221].

2.3.5. Konditionierung des Zellextrakts

Die nach dem Zellaufschluß vorliegende Suspension enthält neben groben Trümmern der Zellwände und nicht aufgeschlossenen Zellen auch Zellkerne und verschiedene Zellorganellen sowie Lipide. Zur Gewinnung der löslichen Anteile des Cytosols müssen diese partikulären Bestandteile abgetrennt werden. Dies kann durch mehrmalige, sequentielle Zentrifugation mit steigender Zentrifugalbeschleunigung bis ca. $100.000 \cdot g$ (Ultrazentrifugation) erreicht werden. Zur Abtrennung der niedermolekularen Zellbestandteile aus Mikrosomenfraktion, Lipiden und höhermolekularen Peptiden wurde das Zytosol entweder durch Ultrazentrifugation oder durch Ultrafiltration unter Verwendung von Ultrafiltrationskonzentratoren vom Typ „Centriprep[®] 10“ der Firma Amicon mit einer molekularen Trenngrenze von 10 kDa vorgereinigt. Die Trennung („Molekularfiltration“) in „Centriprep[®]“-Konzentratoren erfolgte durch Zentrifugalkraft in einer Zentrifuge. Im diesem Fall konnte auf den Einsatz einer Ultrazentrifuge zur Aufreinigung des Zytosols verzichtet werden. In einigen Versuchen wurde auf eine Vorreinigung des Zellextrakts vollständig verzichtet und das Rohhomogenat direkt mit der Gelchromatographie untersucht.

Die weitere Aufreinigung des Extrakts wurde chromatographisch durch Gelchromatographie in einem „halbpräparativen“ Maßstab vorgenommen. Da Gelchromatographie zu einer beträchtlichen Verdünnung der Probe führt, mußte anschließend durch Gefriertrocknung eine Aufkonzentrierung erreicht werden. Bei der Gelchromatographie kann auf eine ausreichende Ionenstärke im Eluenten nicht verzichtet werden (s.u.). Um eine Anreicherung dieses Elektrolyten in der Probe während der Gefriertrocknung zu verhindern, wurde mit Ammoniumazetat ein unter den Bedingungen der Gefriertrocknung flüchtiger Puffer eingesetzt.

2.3.6. Flüssigchromatographische Techniken

Die Flüssigchromatographie mit ihren verschiedenen Methoden spielt heute eine unverzichtbare Rolle bei der Trennung und Identifikation von Stoffgemischen aller Art. Die in den Biowissenschaften anfallenden Analyten sind meist wasserlöslich und ionisch, und so haben chromatographische Trennungssysteme für diese Probenarten einen wesentlichen Anteil am analytischen Methodenspektrum der Biowissenschaften. Hier sind insbesondere zu nennen die „konventionelle“ Ionenchromatographie (auch Ionenaustauschchromatographie genannt) an gebundenen Phasen (IEC), die Hochleistungs-Flüssigchromatographie an Umkehrphasen (Reversed-Phase High-Performance-Liquid Chromatography (RP-HPLC)), die Ionenpaarchromatographie an Umkehrphasen, kurz Ionenpaarchromatographie (Reversed-Phase Ion-Pair High-Performance-Liquid Chromatography (RPIP-HPCL)), die Hydrophobe- Wechselwirkungschromatographie (Hydrophobic Interaction- Chromatography (HIC) und die Gel- oder Größenausschlußchromatographie (Size-exclusion Chromatography (SEC)).

Da ionische Moleküle im allgemeinen (sofern die Moleküle nicht ausgesprochen amphiphile Eigenschaften haben) nur eine geringe Wechselwirkung mit Umkehrphasen aufweisen, kommen als Hochleistungsmethode für eine erfolgreiche chromatographische Trennung nur die Ionenchromatographie oder die Ionenpaarchromatographie in Betracht. Die Gelchromatographie hat demgegenüber eine relativ geringe Trennleistung, eignet sich aber hervorragend zur schonenden Vorreinigung oder zur Entsalzung eines Endproduktes.

Bisherige Versuche zur Fraktionierung von Chromkomplexen aus Bierhefe und anderen natürlichen Quellen haben sich erster Linie auf die „Ionenaustauschchromatographie“ an gebundenen Phasen gestützt. Auch wenn mittlerweile diese Art der Chromatographie durch Verwendung von Hochleistungsphasen mit kleinem Partikeldurchmesser deutlich an Trennleistung gewonnen hat, ist eine vollständige Elution hochgeladener Analyten oft unmöglich [225]. Entsprechend wurde über unvollständige Wiederfindung bei der Aufarbeitung von Hefeextrakten [206] und Verlusten bei der Chromatographie [226] von Hefefraktionen berichtet. Eine vollständige Elution des Analyten erfordert oft drastische Elutionsbedingungen bei hohen oder niedrigen pH- Werten oder mit relativ hochkonzentrierten Salzlösungen. Diese Bedingungen sind nicht kom-

patibel mit der möglicherweise empfindlichen Natur der zu trennenden Chromkomplexe.

Im Gegensatz dazu erlaubt die Ionenpaarchromatographie auf Umkehrphasen (RP-IPHPLC) selbst unter ungünstigen Bedingungen die vollständige Elution der Analyten durch Änderung der Polarität des Eluenten, z.B. durch einen Methanolgradienten. Quantitative Wiederfindung sollte daher im allgemeinen mit einfachen und schonenden Mitteln zu erreichen sein. Die exzellente Leistungsfähigkeit moderner Umkehrphasensysteme, wie sie sich in hoher Effizienz (hohe Anzahl der theoretischen Böden pro Säule durch schnellen Massentransfer zwischen Sorbenz und Eluent) und guter Reproduzierbarkeit äußert, sollte sich ebenfalls in der RPIP-HPLC verwirklichen lassen. Durch Variation von Art und Konzentration des verwendeten Ionenpaarreagenzes ist die Kapazität der Säule sehr flexibel an die Anforderungen anzupassen. Durch Einfache „Regeneration“ durch Spülen mit unpolarem Eluenten zur Desorption stark absorbierender Substanzen eignet sich die RPIP-HPLC besonders auch zur Chromatographie komplexer, stark matrixbelasteter Proben biologischen Ursprungs [227].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zur Abtrennung und Fraktionierung der in Bierhefe gebildeten Chromkomplexe eine Kombination von Gelchromatographie (zur schonenenden Vorreinigung des Rohextraktes) und der Ionenpaarchromatographie auf Umkehrphasen (zur Fraktionierung der Chromkomplexe) gewählt.

2.3.6.1. Gelchromatographie

Die Gelchromatographie (auch Gelfiltrationschromatographie oder Größenausschlußchromatographie (engl. size exclusion chromatography (SEC)) ist eine Methode zur Analyse, Trennung und Reinigung von Stoffgemischen hauptsächlich aufgrund unterschiedlicher Molekülgrößen und wird an granulierten Gelen oder silikatischen Sorbentien unterschiedlicher Porosität durchgeführt.

2.3.6.1.1. Prinzip und Eigenschaften

In den über 40 Jahren seit ihrer Einführung durch Porath und Flodin [228] hat die Gelchromatographie eine Schlüsselposition in der Reinigung von Enzymen, Polysacchariden, Nukleinsäuren, Proteinen und anderen biologischen Makromolekülen erreicht. Der besondere Nutzen der Gelchromatographie ist vor allem in der besonders schonenden Art der Trennung zu sehen; viele Parameter, so z.B. Ionenstärke und pH-Wert können dem Trennproblem beinahe frei angepaßt werden, um die zu trennenden, u.U. empfindlichen Moleküle möglichst gering zu belasten.

Die verwendeten Trägermaterialien bestehen aus kleinen Kügelchen mit schwammartiger Struktur und Poren von relativ einheitlichem Durchmesser. Beim Durchtritt verschiedener Moleküle ergibt sich die Trennung aus dem unterschiedlichen Eindringungsvermögen der Verbindungen in die Gelkörner. Kleine Moleküle werden in die Poren aufgenommen, während größere entweder vollkommen ausgeschlossen werden oder nur im Durchschnitt nur kurzzeitig in den Poren verweilen. So wird die Verweildauer auf der Säule durch das Eindringungsvermögen der Verbindungen in die Gelkörner bestimmt. Sie erscheinen im Säulenauslauf in der Reihenfolge abnehmender Molekülmassen [229].

Das Elutionsvolumen (V_e) einer Substanz ist die Menge an Eluat, die zwischen dem Aufgeben der Substanz und ihrem Austreten über die Säule fließt. K_d ist, wie üblich, der Verteilungskoeffizient zwischen mobiler und stationärer Phase. In der Gelchromatographie im idealen Fall ist er im wesentlichen nur von der Molekülgröße abhängig, sofern angenommen wird, daß zwischen dem Analytmolekül und dem Gel keinerlei Wechselwirkung existiert. $K_d=0$ bedeutet, daß sich die Substanz während der Passage durch die Säule ausschließlich im Eluat aufhält, also ein totaler Ausschluß aus dem Gel stattfindet. Das Elutionsvolumen der Substanz entspricht dem „äußeren“ oder „void“ Volumen V_o der Säule. Bei einem totalen Austausch stehen der Substanz alle Gelkörner offen und es wird $K_d=1$; das Elutionsvolumen entspricht dann V_t , dem totalen, der Lösung zugänglichen Volumen des Gelbettes. Damit gilt für den Distributionskoeffizienten K_d im Falle der Gelchromatographie:

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \quad (11)$$

V_o kann leicht durch die Chromatographie einer sehr hochmolekularen Substanz bestimmt werden. V_t entspricht dem Elutionsvolumen eines kleinen Analyten, dem alle Poren des Gelbetts offen stehen ($K_d=1$). In der Praxis ist allerdings V_t schwer zu bestimmen, da sich gerade kleine Analyten oft nicht ideal verhalten (s.u.). Bei gleicher Gelmatrix ist V_t allerdings proportional zu dem Gesamtvolumen des Gelbetts V_T , so daß zum Vergleich verschiedener Analyten zur Berechnung von K_d ebenfalls V_T herangezogen werden kann (K_d ist dann bei totalem Austausch allerdings kleiner als 1, da $V_T > V_t$). K_d ist im Idealfall nur von der Porencharakteristik des Gels und der Größe und Gestalt des Analyten abhängig. Insoweit ist die Gelchromatographie ein rein mechanischer, temperaturunabhängiger Prozeß. Da K_d nur von der Molekülgröße abhängig ist, kann über die Gelchromatographie das Molekulargewicht einer Substanz bestimmt werden. Dies trifft vor allem für die Trennung von Makromolekülen an schwach vernetzten, weitporigen Gelmatrizen zu. Mit dem Vernetzungsgrad nimmt aber das Ausmaß der (chemischen) Wechselwirkung zwischen der stationären Gelphase und dem zu trennenden Stoff zu, wodurch verschiedene, reversible Adsorptionsprozesse am chromatographischen Prozeß beteiligt werden [230]. Gleichzeitig wächst die Bedeutung der Wechselwirkungen mit der Gelmatrix mit abnehmender Molekülmasse [231][232]. Die Bestimmung des Molekulargewichts ist daher insbesondere im Bereich kleiner Molekulargewichte unzuverlässig.

Da sich die Substanz nur innerhalb (V_i) und außerhalb (V_o) der Gelkörner verteilen kann, spielt sich das Trenngeschehen nur zwischen V_i und V_o ab, und die Nutzungsgrenze ist durch die Größe dieses Volumens festgelegt. Diese Nutzungsgrenze hängt vom Vernetzungsgrad der Gele (also ihrer mittleren Porengröße) und der Säulenlänge ab. Man wählt daher den Geltyp (Vernetzungsgrad) entsprechend der Molekülgröße und arbeitet bei der Trennung komponentenreicher Gemische mit möglichst langen Säulen. Einer Säulenverlängerung sind allerdings durch die Druckstabilität des Gels Grenzen gesetzt. Der Druckabfall über das Gelbett ist proportional der Flußrate; bei wenig druckstabilen Gelen in langen Säulen muß mit Laufzeiten bis hin zu einigen

Tagen gerechnet werden. Die Anzahl der maximal durch Gelchromatographie zu trennenden Substanzen ist daher begrenzt. Hagel stellte fest [233], daß die Peak-Kapazität (d.h. die Anzahl der Substanzen, die maximal auf einer Säule basisliniengetrennt werden können) selbst bei Verwendung moderner mikropartikulärer Medien auf ca. 10 - 15 begrenzt ist. Gelchromatographie ist daher bei der Aufarbeitung komplexer Gemische im allgemeinen lediglich zur Abtrennung von Stoffgruppen geeignet.

Ein nicht zu vernachlässigender Nachteil der Gelchromatographie besteht in der der Methode eigenen Verdünnung des Analyten. Für $V_e > V_0$ ist das Peakvolumen am Auslauf der Säule immer größer als das Probenvolumen. Dies gilt vor allem bei spät eluierenden Analyten, bei denen in Abhängigkeit der Säulencharakteristik eine erhebliche Verdünnung auftritt. Eine Weiterverarbeitung im Anschluß an die Gelchromatographie ist oft nur möglich nach einem weiteren Schritt zur Aufkonzentrierung der Probe.

2.3.6.1.2. Auswahl der Trägermaterialien und Eluenten

Für die Gelchromatographie in wäßriger Lösung steht heute eine große Auswahl an Packungsmaterialien und fertig gepackten Säulen zur Verfügung. Generell unterschieden werden können Gele auf Basis natürlicher Materialien wie Dextran und Agarose, Gele auf Silikat- Basis und polymerbasierte Gele. Ein entscheidender Parameter ist weiterhin die Partikelgröße, die maßgeblich die Leistungsfähigkeit der Säule in Hinblick auf Analysengeschwindigkeit und Probenverdünnung bestimmt [233]. Das Gesamtvolumen der Säule bestimmt maßgeblich das Probenvolumen; eine Faustregel besagt, daß das Probenvolumen nicht größer als 1/3 des (mit kleinem Probenvolumen gemessenen) Basislinienvolumens eines kleinen Analyten betragen sollte, um Leistungsverluste zu vermeiden [234]. Pharmacia empfiehlt, das Probenvolumen im Bereich von 0,5%-5% des Gelbettvolumens zu halten [235]. Die maximal mögliche Durchflußgeschwindigkeit wird durch die Grenzen der mechanischen Stabilität des Gels begrenzt. Während „weiche“ Gelen wie die klassischen Dextran- Gele ein hohes Porenvolumen besitzen und störende Absorptionseigenschaften nur schwach ausgeprägt sind, erlauben deren mechanische Eigenschaften nur geringe Flußraten, was zu langen Chromatographiezeiten führt. „Harte“ Gele auf Silikatbasis hingegen weisen ausgezeichnete Flußeigenschaften bei gleichzeitig sehr geringen Korngrößen auf, was

echte Hochleistungstrennungen ermöglicht. Leider treten durch die Gegenwart nicht ausreichend abgeschirmter Silikatgruppen ihre Absorptionseigenschaften oft störend in Erscheinung [236]. Für die Fraktionierung leichter Analyten unter 1000 D sind Gele auf Silikatbasis nicht erhältlich. Die in den achtziger Jahren eingeführten „mittelharten“ Gele auf Polymerbasis bieten ausgewogene Eigenschaften hinsichtlich ihrer Absorptionseigenschaften, ihrer mechanischen Widerstandsfähigkeit und der erhältlichen Korn- und Porengrößen.

Aufgrund dieser Zusammenhänge wurde für die vorliegenden Arbeiten ein Polymergel auf Basis eines hydrophilen Vinyl- Polymers der Firma Tosoh, Typ „Toyoparl[®] HW“ ausgewählt¹. Das Gel ist in verschiedenen Korngrößen und Porengrößenverteilungen erhältlich. Aufgrund der in Hefe beobachteten Verteilungen der Molekulargewichte der Chromkomplexe wurde letztendlich zwei Gele ausgewählt: Typ HW 40 mit einem Trennungsbereich (für Proteine) von 100 D bis 10000 D und Typ HW 55 mit einem Bereich von 1000 D bis 700.000 D, jeweils der Korngröße „s“ (durchschnittlich 30 µm). Zum Einsatz kamen zu hauptsächlich analytischen Zwecken zwei Säulen der Dimensionen 1 cm * 60 cm, 1 cm * 133 cm und für eher präparative Zwecke eine Säule der Dimension 2,5 cm * 50 cm (jeweils Durchmesser * Länge).

Eine wichtige Rolle bei der Gelchromatographie spielt der Eluent. Zur Unterdrückung von Absorptionen bzw. Ionen- Ausschlußeffekten durch auf dem Gelbett vorhandene anionische Restladungen ist unbedingt auf eine ausreichende Ionenstärke des Eluenten zu achten. Für eine weitgehende Unterdrückung der ionischen Wechselwirkungen zwischen Gel und Probe ist eine Ionenstärke von mindestens 0,2 Mol/L empfehlenswert [237]. Da gleichzeitig im leicht sauren Milieu gearbeitet werden sollte, wurde als Eluent zumeist mit einer 0,2 Mol/L- Lösung von KH_2PO_4 (pH ca. 4,2) gearbeitet. Nur zur Probenvorbereitung wurde als flüchtiger Puffer Ammoniumazetat (NH_4Ac) (pH 7,0) eingesetzt.

¹ in Deutschland bis 1994 unter dem Namen „Fractogel[®]“ von der Firma Merck (Darmstadt) vertrieben

2.3.6.1.3. Abschätzung von Molekulargewichten

Da der Verteilungskoeffizient der Gelchromatographie K_d unter idealen Bedingungen lediglich von der Molekülgröße und damit der Molekülmasse des Analyten abhängig ist, läßt sich mit Hilfe bekannter Proben für den Zusammenhang zwischen K_d und dem Molekulargewicht MW eine Kalibrationskurve erstellen, mit deren Hilfe die Bestimmung der Molekulargewichte unbekannter Substanzen möglich ist. Zu diesem Zweck stand ein Satz von Molekulargewicht- Standards (Polyethylenglykole) im Bereich von 106 bis 22.000 D zur Verfügung. Da die Molekülgröße einer Probe (oder ihr „hydrodynamischer Radius“) nicht notwendigerweise proportional zu ihrer Molmasse ist, lassen sich zuverlässige Bestimmungen der Molmasse einer Probe nur bei Kenntnis ihrer Gestalt in Lösung (hydrodynamischer Radius) durchführen. Der hydrodynamische Radius ist allerdings für unbekannte Substanzen nicht bekannt und in Gemischen unbekannter Zusammensetzung einer Bestimmung nicht zugänglich. Molekulargewichte unbekannter Analyten können daher durch Vergleich mit einer Kalibrationskurve selbst unter idealen Bedingungen nur näherungsweise bestimmt bzw. „geschätzt“ werden.

2.3.6.2. Ionenpaarchromatographie

Ionenpaarchromatographie, auch als Ionen-Interaktionschromatographie, Seifenchromatographie oder dynamische Ionenaustauschchromatographie bezeichnet, ist ein typisches Beispiel für einen auf Sekundärgleichgewichten beruhenden chromatographischen Prozeß. In ihrer heute am häufigsten eingesetzten Form werden konventionelle Umkehrphasen (RP-18) mit einem amphiphilen Ionenpaarreagenz in wäßrigen Eluenten eingesetzt. Im allgemeinen können sehr hohe Auflösungen erzielt werden, auch wenn die Anzahl der theoretischen Böden pro Säule niedriger ist als bei der konventionellen Umkehrphasenchromatographie [238]. Die Vielseitigkeit dieses Systems spiegelt sich in der großen Anzahl der am chromatographischen Prozeß beteiligten Parameter wider, die in einem weiten Bereich dem Problem angepaßt werden können. Auf diese Weise lassen sich gute Trennungen von anionischen, kationischen und neutralen Analyten selbst bei sehr komplexen Matrizen erreichen.

2.3.6.2.1. Prinzip und Eigenschaften

Die Flüssigchromatographie auf Umkehrphasen (Reversed- Phase Liquid- Chromatography) ist heute die am häufigsten eingesetzte und leistungsfähigste Methode der Flüssigchromatographie. Als Umkehrphase werden meist Alkanketten mit 18- Kohlenstoffatomen (C_{18} - Phasen) eingesetzt, die chemisch an die Silanolfunktionen des Silikatträgers gebunden werden. Mit ihrer Hilfe lassen sich neutrale Komponenten in wäßrigen Eluenten anhand ihrer unterschiedlichen Affinität zur lipophilen Umkehrphase voneinander trennen. Anionische oder kationische Analyten werden wie auch stark hydrophile Substanzen (wie z.B. Zucker) im allgemeinen auf der Umkehrphase nur schwach absorbiert und daher rasch von der Säule eluiert.

Da geladene Komponenten unter diesen Bedingungen nicht oder nur schwach retardiert werden, kann über die Kontrolle ihrer Ionisierung, z.B. durch Verändern des pH-Werts, ein großer Einfluß auf die Retentionszeit der Analyten ausgeübt werden. Eine drastische Veränderung des Elutionsverhaltens von geladenen Analyten wird durch den Zusatz von amphiphilen Zusätzen zum Eluenten, sogenannten „Ionenpaarreagentien“ bewirkt. Mit ihrer Hilfe lassen sich auch Anionen und Kationen auf Umkehrphasen voneinander und von ungeladenen Analyten trennen.

Die meist eingesetzten Ionenpaarreagentien ihrerseits sind stark ionisierte Anionen oder Kationen, die gleichzeitig stark lipophile Reste tragen und damit eine hohe Affinität zur Umkehrphase aufweisen. Mit ihrer Ladung treten sie in Wechselwirkung mit den ebenfalls im Eluenten befindlichen geladenen Analyten.

Grundsätzlich sind zwei Betriebsarten möglich: entweder wird das Ionenpaarreagenz während der Chromatographie in kleiner Konzentration dem Eluenten beigelegt oder die Umkehrphase wird vor der Chromatographie mit einem langkettigen Ionenpaarreagenz mit einer mehr oder weniger dauerhaften Beschichtung versehen. In beiden Fällen resultieren Chromatographiesäulen, deren grundsätzliche Eigenschaften denen von Ionenaustauschersäulen niedriger Kapazität entsprechen.

Tatsächlich ist die Annahme einer Bildung von „Ionenpaaren“ in der mobilen Phase zur Beschreibung der Retention der „Ionenpaarchromatographie“ nicht zwingend. Generell können mindestens vier Modelle zur Beschreibung der Retention herangezogen werden [239]:

- Das klassische „Ionenpaar- Modell“ gründet sich auf die Annahme, daß zwischen dem „Ionenpaarreagenz“ und dem Analyten ein Komplex gebildet wird, der ausreichend stabil ist, die stationäre Phase zu erreichen und dessen Retentionszeit verschieden ist von der des nichtkomplexierten Analyten.
- Das Modell des „dynamischen Ionenaustauschs“ geht von der Annahme aus, daß eine Retention durch Wechselwirkungen des Analyten mit dem auf der stationären Phase adsorbierten „Ionenpaarreagenz“ im Sinne eines „Ionenaustauschs“ hervorgerufen wird. Hierbei wird die Bildung von Komplexen definierter Stöchiometrie angenommen. Der in der mobilen Phase zwischen „Ionenpaarreagenz“ und dem Analyten gebildete Komplex hingegen ist instabil und hat keine Bedeutung für die Retention des Analyten.
- Das Modell des „dynamischen Komplexaustauschs“ beschreibt die Retention als Austauschvorgang bzw. Verteilung des Analyten zwischen den Molekülen des Ionenpaarreagenzes in der mobilen Phase und den adsorbierten Molekülen des Ionenpaarreagenzes auf der stationären Phase.
- Das elektrostatische Modell der Retention beschreibt den Vorgang der „Ionenpaarchromatographie“ durch eine nichtstöchiometrische Wechselwirkung der Analyt- Ionen mit dem elektrischen Feld des auf der stationären Phase adsorbierten „Ionenpaarreagenzes“.

Abhängig von den chromatographischen Bedingungen können die Verhältnisse besser durch das eine oder andere Modell beschrieben werden. Phänomenologisch beobachtet man folgende Abhängigkeiten der Retentionszeit eines Ladung tragenden Analyten von den Chromatographiebedingungen [240]:

- Die Retentionszeit des Analyten ist in starkem Maße abhängig vom Ausmaß seiner Ionisierung (starker Einfluß von pH- Wert und Lösungseigenschaften der mobilen Phase).
- Die Retentionszeit des Analyten nimmt mit steigender Ladung zu (ähnlich wie bei konventioneller Ionenaustauschchromatographie)
- Die Retentionszeit des Analyten steigt mit wachsender Konzentration des Ionenpaarreagenzes entgegengesetzter Ladung.
- Die Retentionszeit des Analyten steigt mit wachsender Lipophilie (bzw. „Hydrophizität“) des Ionenpaarreagenzes mit entgegengesetzter Ladung.
- Die Retentionszeit des Analyten steigt linear mit der Oberflächenspannung des Eluenten an bzw. sinkt mit steigender Konzentration eines organischen Modifiers wie z.B. Methanol im wäßrigen Eluenten.

Diese Effekte können vorteilhaft zur Kontrolle der Retentionsbedingungen, z.B. in Gradientensystemen, eingesetzt werden. Daneben existieren noch vielfältige Einflüsse der Ionenstärke des Eluenten, der Art des organischen Modifiers in der mobilen Phase, der Temperatur [240] und durch zugesetzte Konkurrenz- Ionen [225], so daß die Chromatographiebedingungen sehr flexibel an das Problem angepaßt werden können.

Bedingt durch die geringe Kapazität des Ionenaustauschers (Cassidy und Elchuk geben 0,1 bis 1 Milliequivalente für eine 30 cm- lange Umkehrphasen- Säule im Gegensatz zu ca. 4 - 6 Milliequivalenten für eine entsprechende konventionelle Styroldivinylbenzolsäule [241] an) kann die Säule leicht überladen werden, was sich in schlecht reproduzierbaren Chromatogrammen, unsymmetrischen Peaks und „Peak- Splitting“ äußern kann [240][242]. Insofern ist die direkte Chromatographie von Rohextrakten auf diesen Systemen nicht ratsam, da die unübersehbare Vielfalt der darin enthaltenen Komponenten zu Störungen der Trennung führen kann.

Bei direktem Vergleich hat sich die Ionenpaarchromatographie auf Hochleistungs- Umkehrphasen der Hochleistungs- Ionenaustauschchromatographie auf gebundenen Phasen in Hinblick auf die chromatographische Leistung als mindestens ebenbürtig, wenn nicht sogar als überlegen erwiesen [227][243][244]. Verschiedene Autoren hal-

ten RP-HPLC für besonders geeignet für die Separation von Metallkomplexen, da das Trägermaterial frei von potentiellen Liganden für die Metalle sei [245][246].

Über die erste Anwendung von RP-IPHPLC zur Trennung von ionischen Metallkomplexen [247] berichteten Valenty und Behnken im Jahre 1978 [248]. 1982 separierten Cassidy und Elchuk mit Hilfe der RP-IPHPLC underivatisierte Metallkationen [241]. Zur Speziation von Chromkomplexen wurde die Methode erstmals von Lethbridge and Reeve [249] eingesetzt. Denniston und Uyeki untersuchten mit ihrer Hilfe den Metabolismus von Chromat in CHO (Chinese Hamster Ovary) -Zellen [250]. Bei Einsatz eines anionischen Ionenpaarreagenzes (Pentansulfonat) zur Speziationsanalyse von Cr(III) von Cr(VI) konnte das Auftreten mehrerer Cr(III)- Spezies beobachtet werden [251][252]. Einige Jahre später wandte Hewavitharana die Methode zur Fraktionierung von Chromkomplexen in Gerbereilösungen an [253].

2.3.6.2.2. Auswahl der Trägermaterialien und Eluenten

Als Trägermaterial für die RP-IPHPLC kommen grundsätzlich Materialien auf Polymerbasis und auf Silikatbasis in Frage. Standard- Umkehrphasen auf Silikatbasis bieten gegenüber den Trägermaterialien auf Polymerbasis den Vorteil der höheren Leistungsfähigkeit, was sich in einer größeren Trennstufenzahl pro Säule äußert. Der Nachteil der Säulen auf Silikatbasis ist in dem nicht zu vermeidenden Vorhandensein von freien, nicht veretherten Silikatgruppen im Trägermaterial zu sehen, die die Trenneigenschaften negativ beeinflussen können [254]. In Kenntnis dieser Zusammenhänge wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Standardmaterial auf Silikatbasis mit einer Octadecylsilyl- Umkehrphase gewählt, um zunächst ein besonders leistungsfähiges Material zur Verfügung zu haben. Das Glaskartuschensystem der Firma Merk bietet den Vorteil, daß der Säulen mit Ausnahme der Einlaß- und Auslaßfritten aus Glas bestehen, was die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination durch (inaktives) Chrom vermindert.

Als Ionenpaarreagenzien kamen sowohl kationische als auch anionische zum Einsatz, da mit dem Vorkommen von sowohl kationischen als auch anionischen Chromkomplexen in Bierhefe gerechnet werden mußte. Als kationisches Reagenz zur Trennung von Anionen wurde das Tetrabutylammonium- und das Cetyltrimethylammonium- Kation als Hydrogensulfat- Salz verwendet. Als Anionisches Reagenz zur Trennung von

Kationen wurden Octansulfonsäure und Dodecylsulfonsäure jeweils als Natriumsalz eingesetzt. Um die Trenneigenschaften zu verbessern, wäre es grundsätzlich sinnvoll, für die Trennung der Anionen einen möglichst hohen pH- Wert (Säuren mit niedrigerem pKa liegen vorzugsweise anionisch vor) und für die Trennung der Kationen einen möglichst niedrigen pH- Wert (Basen mit höherem pKb liegen vorzugsweise protoniert (als Kation) vor) zu wählen. Da die Trennung dennoch möglichst schonend durchgeführt werden sollte, wurde hingegen generell ein pH- Wert von 5,2 im Eluenten eingestellt. Puffersubstanz war NaH_2PO_4 , das mit Natronlauge und unter Verwendung einer pH- Elektrode auf den gewünschten (im Falle von Methanol- Wasser Mischungen „scheinbaren“ [255]) pH- Wert gebracht wurde.

Als organischer Modifier im Eluenten muß eine in einem weiten Bereich mit Wasser mischbare Substanz gewählt werden, die gleichzeitig nicht zu einer zu starken Erhöhung der Viskosität des Eluenten führt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein methanolhaltiger Eluent verwendet.

2.3.6.3. Detektion und Aufzeichnung der Chromatogramme

Das Elutionsverhalten der Proben wurde bei den beiden im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Chromatographiesystemen auf zwei verschiedene Arten verfolgt: der Chromgehalt der Fraktionen wurde über die Messung der Radioaktivität im Säuleneluat bestimmt, und die optische Absorption („optische Dichte“) des Eluats bei verschiedenen Wellenlängen im Ultraviolett- Bereich mit Hilfe entsprechender UV- Detektoren.

2.3.6.3.1. Bestimmung des Chromgehalts

Der wichtigste Parameter bei der chromatographischen Fraktionierung von Chromverbindungen ist der Chromgehalt des Säuleneluats. Der Chromgehalt wurde im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich über die Messung der Radioaktivität des als Tracer zugesetzten ^{51}Cr bestimmt. Die Radioaktivität des Säuleneluats kann grundsätzlich nach Sammeln einzelner Fraktionen schubweise unabhängig von der Durchführung der Chromatographie („Batch“- Detektion, „Off-line“) oder direkt in einem mit dem Säulen-

lenauslauf gekoppelten Detektor „On-line“ bestimmt werden. Die Vorteile der „On-line“- Detektion liegen vor allem in der sofortigen Verfügbarkeit der Daten noch während des Chromatogrammlaufs. Da jedoch die Detektionszeit (d.h., die Verweilzeit des Analyten innerhalb der Detektionszelle) stets abhängig von der Flußrate ist, lassen sich die Parameter für Detektion und Chromatographie nicht unabhängig voneinander optimieren. In der Praxis müssen hier stets Kompromisse hinsichtlich Nachweisvermögen und chromatographischer Auflösung eingegangen werden [256]. Bei der „Batch-Detektion“ nach Sammlung einzelner Fraktionen und deren Vermessung in einem separaten Detektor werden Chromatographie und Detektion des Analyten voneinander entkoppelt und können daher unabhängig voneinander optimiert werden. Zur Detektion des radioaktiven Analyten im Eluat sind sehr große Meßzeiten möglich, so daß eine optimale Nachweisgrenze und Präzision erreicht werden kann. Um die Peak- Auflösung der Chromatogramme nicht übermäßig herabzusetzen, sollten hierbei das Volumen der gesammelten Fraktionen $\frac{1}{2} \sigma_v$ eines Peaks betragen, wobei σ_v die „Volumen-Standard- Abweichung“ eines als gaußförmig angenommenen Peaks ist [257] (Abb. 8):

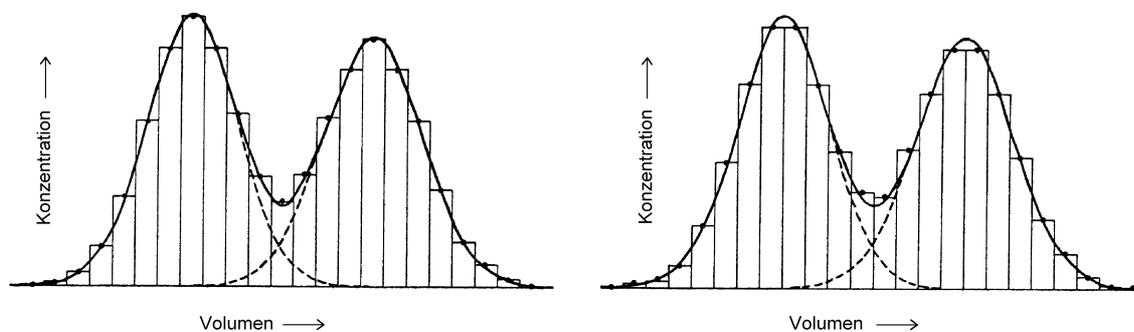


Abb. 8: Analoge Elutionskurve, Histogramm und Datenpunkte für zwei Gauß- Peaks mit gleicher Fläche getrennt auf einer Säule mit 2500 theoretischen Böden bei jeweils unterschiedlichen Startpunkten. Fraktionsgröße $\Delta V/\sigma_v = \frac{1}{2}$ (aus 257).

Bei automatisierter Fraktionssammlung kann die Fraktionsgröße während des Chromatogrammlaufs meist nicht verändert werden und sollte sich daher am Peak mit der geringsten Breite orientieren. Andererseits ist die Summe der zu sammelnden Fraktionen aus praktischen Gründen zu begrenzen, so daß auch hier zwischen maximaler Auflö-

sung und dem zur Messung erforderlichen Zeitbedarf abgewogen werden muß. Gegebenenfalls kann auch nur der interessierende Teil des Chromatogrammes fraktionsweise gesammelt und ausgewertet werden. Ein wesentlicher Nachteil der „Off-line“- Detektion ist in der großen Zeitspanne zu sehen, die zwischen der Durchführung der Chromatographie und dem Vorliegen der Daten vergeht und die mehrere Tage betragen kann.

Um die Vorteile beider Detektionssysteme zu nutzen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die γ - Strahlung des ^{51}Cr gleichzeitig sowohl „On-line“ direkt am Säulenauslauf als auch „Off-line“ nach Sammlung von Fraktionen in einem automatischen Fraktionsammler und deren Vermessung in einem Gammaskpektrometer mit automatischem Probenwechsler gemessen. Beide Detektionssysteme arbeiteten auf Basis eines NaI/Tl- Szintillationsdetektors im Einkanalmodus, da eine hohe Energieauflösung bei der Markierung mit einem Einzelnuclid nicht notwendig ist. Dabei lieferte der „On-line“- Detektor (bei ausreichender Aktivität der Probe) bereits während der Laufzeit des Chromatogramms Daten über Retentionszeit und Peakform; die „Off-Line“ gesammelten Fraktionen ermöglichten selbst bei geringen Probenaktivitäten noch eine einfache quantitative und qualitative Auswertung des Chromatogramms. Die quantitative Auswertung der Chromatogramme hinsichtlich des Chromgehalts wurde dabei ausschließlich „Off-Line“- über die gesammelten Fraktionen vorgenommen. Hierzu wurde die Zählrate der Fraktionen direkt mit der Zählrate von ^{51}Cr von radioaktiven Standards verglichen, die einem definierten Chromgehalt der Probe äquivalent waren. Um die einzelnen Fraktionen einer bestimmten Elutionszeit des Chromatogramms zweifelsfrei zuordnen zu können, wurde der Fraktionswechsel des Fraktionssammlers im Chromatogramm zusammen mit den anderen Daten (On-line Radioaktivität und UV- Absorption) aufgezeichnet.

2.3.6.3.2. Verfolgung der Chromatogramme über die optische Dichte (UV- Absorption)

Die UV- Absorption der Chromatogramme liefert wertvolle Informationen über den Verlauf der Chromatographie und den Zustand des Chromatographiesystems und kann darüber hinaus Hinweise auf die Zusammensetzung des Eluats geben. Im allgemeinen wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 254 nm bestimmt, da hier die meisten

biologischen Moleküle Absorption zeigen. Diese Wellenlänge entspricht gleichzeitig der Wellenlänge von älteren UV- Detektoren mit fester Wellenlänge (wesentliche Emissionslinie von Quecksilberdampflampen), so daß ein Vergleich mit älteren Arbeiten leichter möglich ist.

2.3.6.3.3. Aufzeichnung der Chromatogramme

Die Daten des UV- Detektors, des On-Line- Radioaktivitätsdetektors und die Wechselimpulse des Fraktionssammlers wurden mit Hilfe eines Computersystems unter Verwendung eines hausintern vorliegenden Programms aufgezeichnet. Die ^{51}Cr - Zählraten der gesammelten Fraktionen wurden aufgezeichnet, unter Verwendung selbstgeschriebener Software in Stoffmengen (Cr) umgerechnet und in Form eines Balkendiagramms als Chromatogramm dargestellt.

2.3.7. Auswertung

Die Quantifizierung des Chrms erfolgte ausschließlich über die Vermessung der Radioaktivität des zugesetzten ^{51}Cr mit einem NaI/Tl- Szintillationsdetektor mit Probenwechsler Typ Berthold BF 5300 über die Auswertung der 320 keV- Gammaline. Das Detektionssystem war dabei mit einem Einkanalanalysator ausgestattet.

Die statistischen Schwankungen der Meßwerte bei Zählereignissen, wie sie z.B. bei der Auswertung von Kernstrahlung anfallen, genügen sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Zählraten einer Poisson- Verteilung. Der statistische Fehler wird allein durch die Gesamtanzahl der gezählten Zerfallsereignisse bestimmt [258]. Wurden in einer bestimmten Zeitspanne Z Impulse registriert, so beträgt die zugehörige Standardabweichung

$$\sigma_z = \sqrt{Z} \quad (12)$$

Dieser Zusammenhang gilt im Falle des o.a. Detektionssystems auch für die Zählereignisse des Nulleffekts. Die sich als Differenz aus der Zahl der insgesamt registrierten Impulse Z_g und der durch den Nulleffekt verursachten Impulse Z_0 mit den Mittelwerten $Z_0 < Z_g$

$$Z_w = Z_g - Z_0 \quad (13)$$

ergebende Zahl der Nettoimpulse Z_w genügt nicht mehr einer Poisson-Verteilung, läßt sich jedoch für alle praktisch vorkommenden Werte der Differenz beider Variabler mit sehr guter Präzision durch die einfache Gauß'sche Normalverteilung mit dem Mittelwert $Z_g - Z_0$ und der Standardabweichung

$$Z_w = \sqrt{Z_g + Z_0} \quad (14)$$

entsprechend dem Fehlerfortpflanzungsgesetz annähern [258].

Zur Orientierung wurde die sich daraus ergebende einfache Standardabweichung in die Darstellung der Radiochromatogramme eingezeichnet.

Die quantitative Verfolgung der Aufarbeitungen der Hefe erforderte neben der Ermittlung der in den Proben enthaltenen Chrommenge auch jeweils Wägevorgänge zur Bestimmung von Probenanteilen. Diese Wägungen wurden stets an Feuchtmaterial vorgenommen. Der durch das Wägen von durch Zentrifugation gewonnenem Feuchtmaterial mit einem relativ schlecht definierten Wassergehalt entstehende Fehler ist schwer einzuschätzen und übersteigt bei weitem den durch den Fehler der Wage und der Chrombestimmung verursachten Fehler. Es ist zudem nicht sicher, ob der durch den schwankenden Wassergehalt der Proben bestimmte Fehler überhaupt durch eine Normalverteilung beschrieben werden kann. Auf die Angabe von Einzelfehlern im Rahmen der Verfolgung der Aufarbeitung wurde daher verzichtet, da die statistisch erfaßbaren Anteile nicht den lediglich abzuschätzenden Gesamtfehler bestimmen.

2.3.8. Massenspektrometrische Methoden

Zur Strukturaufklärung von ionischen Metallkomplexen oder metallhaltigen Proteine kommen nur Methoden in Betracht, die die Analyse schwer verdampfbarer Proben erlauben. Geeignet sind vor allem die Matrix- unterstützte Laser- Desorptions- Ionisations-Massenspektrometrie (Matrix- Assisted Laser- Desorption/Ionisation Mass-Spectrometry (MALDI-MS)), die Elektrospray- Massenspektrometrie (Electrospray-Ionisation Mass- Spectrometry (ESI-MS)) und die Plasmadesorptions- Massenspektrometrie (PD-MS).

2.3.8.1. Matrix- unterstützte Laser- Desorptions- Ionisations- Massenspektrometrie (MALDI-MS)

Die MALDI-MS wurde erstmals 1988 von Karas und Hillenkamp [259] vorgestellt. Hierbei wird die zu untersuchende Probe mit einem 100- bis 1000- fachen Überschuß einer sogenannten Matrix verdünnt und im Vakuum des Massenspektrometers einem intensiven Puls kurzweiliger Laserstrahlung von wenigen Nanosekunden Dauer ausgesetzt. Die Einkopplung der für die Desorption und Ionisation der Moleküle erfolgt über resonante elektronische Anregung der UV- absorbierenden Matrixmoleküle. Dabei handelt es sich in der Regel um kleine aromatische Verbindungen, die bei der entsprechenden Laserwellenlänge eine hohe Absorption besitzen. Die angeregte Matrix überträgt ihre Energie schnell und effizient, z.B. durch Protonentransfer, auf die Probenmoleküle und führt zu einer schonenden Ionisierung. Durch die hohe Energie der Laserbestrahlung werden die ionisierten Probenmoleküle desorbiert und anschließend in einem elektrischen Feld beschleunigt. Die Massentrennung wird in den meisten Fällen über ein Flugzeitmassenspektrometer realisiert (MALDI- TOF). Im Ergebnis wird die Probe nach der Masse ihrer Komponenten aufgetrennt. Durch die schonende Ionisierung lassen sich auch hochmolekulare Peptide ohne Fragmentierung ionisieren. Die Analyse niedermolekularer Proben unter 1000 Da wird allerdings durch Matrixeinflüsse behindert. Es gibt daher bislang nur wenige Beispiele für den Einsatz der MALDI-MS zur Speziationsanalyse anorganischer Verbindungen und Komplexe. MALDI-MS wurde zur Analyse von Organo- Arsenverbindungen [260] und von anorganischen Clustern [261] eingesetzt.

2.3.8.2. Plasmadesorptions- Massenspektrometrie (PD-MS)

Die Plasmadesorptions- Massenspektrometrie (PD-MS) wurde bereits 1974 von Torgerson et al. vorgestellt [262]. Hierbei werden die Probenmoleküle in einem durch energiereiche Spaltfragmente einer ^{252}Cf - Quelle erzeugten Mikroplasma ionisiert und in die Gasphase überführt [263]. Durch diese sehr schonende Methode der Ionisierung lassen sich auch nichtflüchtige Moleküle, wie z.B. Proteine, bis zu einer Masse von 35 kDa ohne Fragmentierung nachweisen. Wie die jüngere MALDI-MS, so wird auch die PD-MS meist als Flugzeit- Massenspektrometer realisiert, was eine höhere Empfindlichkeit der Methode auf Kosten der Massenauflösung mit sich bringt. Neben Proteinen und Peptiden wurden auch Glykolipide, Phospholipide, Oligosaccharide, Lipopolysaccharide und Glykoproteolipide sowie Medikamente in Körperflüssigkeiten erfolgreich analysiert [263]. Im Gegensatz zur MALDI-MS ist bei der PD-MS die Gegenwart einer Matrix nicht erforderlich. Es sind daher auch Moleküle unterhalb von 1000 Da bis herab zu etwa 200 Da zu analysieren. Mayer setzte PD-MS erstmals zur Analyse schwerflüchtiger Chrom(III)- Komplexe ein [127].

2.3.8.3. Elektrospray- Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die Eignung der Elektrospray- Ionisation zur Massenspektrometrie von kleinen Molekülen wurde in den achtziger Jahren praktisch zeitgleich von Yamashita und Fenn [264] und Aleksandrov et al. [265] demonstriert. 1988 zeigten Meng et al. das große Potential der Methode zur Massenspektrometrie von Proteinen [266]. Bei der Elektrospray- Massenspektrometrie wird die (wässrige) Probenlösung mit Hilfe einer Pumpe durch die Spitze einer feinen Kapillare gepreßt, an der eine hohe Spannung von einigen kV anliegt. Durch die Einwirkung der Hochspannung werden Ladungsträger auf den aus der Kapillarspitze austretenden Flüssigkeitströpfchen abgelagert, die zu einer Zerstäubung der Tröpfchen führen. Hierbei wird das Lösungsmittel rasch verdampft und die Probenmoleküle durch die verbleibende Ladung ionisiert. Die so gebildeten lösungsmittelfreien Ionen gelangen durch die Einwirkung des hohen elektrischen Feldes und die Sogwirkung des Vakuums in das Massenspektrometer. Bedingt durch die kontinuierliche Zulieferung von Ionen werden hier standardmäßig kontinuierlich arbeitende Massenanalytoren eingesetzt, wengleich auch bereits Flugzeitmassenspek-

trometer kommerziell erhältlich sind. Die Elektrospray- Ionisierung ist eine extrem schonende Ionisierungsmethode, die die Analyse von hochmolekularen Proteinen und nicht kovalent gebundenen, lockeren Assoziaten als Ganzes erlaubt. Neben der geringen Tendenz zur Fragmentierung ist die Bildung mehrfach geladener Probenmoleküle charakteristisch. Eine fortgeschrittene Ausführung des kontinuierlich arbeitenden ESI-Massenspektrometers ist das „Triple- Quadrupole“- Gerät, das durch den Einsatz dreier voneinander unabhängiger, hintereinandergeschalteter Quadrupol- Massenfilter die Durchführung von CID- (Collision-Induced Decay) MS-MS Experimenten sowie von Scans der Elternionen („Parent-Ion Scans“) erlaubt. Die von Wilm und Mann [267] entwickelte „Nano- Quelle“ erlaubt die Analyse von mikromolaren Konzentrationen bei einer Flußrate von 20-40 nL/Minute. Analysiert werden können sowohl geladene als auch polare und unpolare neutrale Moleküle von unter 100 Da bis über 100 kDa. In der jüngeren Vergangenheit wurde das Potential der ESI- MS vermehrt zur Speziationsanalyse von Schwermetallen und Metalloiden genutzt [75][268][269][270][271] [272][273].

3. VERSUCHE ZUR AUFNAHME VON CHROM(III) IN BIERHEFE UND ZUR FRAKTIONIERUNG KOMPLEXER CHROMHALTIGER VERBINDUN- GEN AUS BIERHEFE UND NÄHRMEDIUM

Aufnahme und Zustand des dreiwertigen Chroms in Bierhefe sind seit vielen Jahren Gegenstand von Diskussionen. Nach den grundlegenden Arbeiten von Mertz [204] und später von Davis und Vincent [91] wurden für die Struktur der biologisch aktiven Chromverbindungen ausschließlich niedermolekulare Chromkomplexe mit Molekulargewichten unter 1500 Da vorgeschlagen. Nur spärliche Informationen sind zudem in der Literatur über die Chromaufnahme von Hefe und seine intrazelluläre Verteilung zu finden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von Chrom in Hefe zu quantifizieren sowie Anzahl, Art und nach Möglichkeit Konstitution der in Bierhefe vorhandenen niedermolekularen Chromkomplexe insbesondere in Hinblick auf die Natur des postulierten „Glukosetoleranzfaktors“ aufzuklären. Neben der Speziationsanalyse der dreiwertigen Chromverbindungen in Bierhefe selbst war die Frage nach den Zustand des Chroms im verbrauchten Nährmedium von Interesse, da es sich hierbei einerseits um Chromverbindungen handeln könnte, die von der Hefe ins Nährmedium ausgeschieden werden, andererseits aber auch um „*ex vivo*“ gebildete Chromkomplexe mit anderen Bestandteilen des Nährmediums und des Hefestoffwechsels.

Die Methode zur Fraktionierung chromhaltiger Verbindungen aus Bierhefe umfaßte folgende Arbeitsschritte:

- Bereitstellung des mit radioaktivem ^{51}Cr - markierten Untersuchungsobjektes *Saccharomyces cerevisiae*.
- Ernte der Zellen und Bestimmung ihres Chromgehalts.
- Aufschluß der Zellen.
- Konditionierung der Proben.
- Erste chromatographische Charakterisierung.
- Vorreinigung.
- Fraktionierung mittels hochauflösender Ionenpaarchromatographie.

Da das verbrauchte Nährmedium im Gegensatz zum Zellextrakt eine wesentlich einfachere Matrix darstellt, war eine besondere Probenvorbereitung hier nicht notwendig. Die Auftrennung konnte direkt mittels Ionenpaarchromatographie erfolgen.

3.1. Allgemeine Beschreibung der durchgeführten Experimente

Bierhefe wurde in einem vollsynthetischen, mit radioaktiv markiertem ^{51}Cr - versetzten Kulturmedium mit definiertem Chromgehalt gezogen, die Zellen wurden geerntet, mechanisch aufgeschlossen und die löslichen Inhaltsstoffe mit Hilfe von Gelchromatographie und Ionenpaarchromatographie getrennt.

Die Hefekultur und große Teile der chromatographischen Analyse wurden ausschließlich unter Verwendung nichtmetallischer Geräte durchgeführt (d.h. insbesondere in Glas- und Kunststoffgefäßen) , um ungewollte Metallkontaminationen zu vermeiden. Besondere Reinigungsprozeduren, wie sie in der Ultrapurenanalytik üblich sind, wurden nicht angewandt. Sofern der Einsatz metallfreier Geräte nicht möglich war, kamen Geräte aus Aluminium und Titan zum Einsatz. Weiterhin wurden nur Chemikalien der höchsten erhältlichen Reinheitsstufen verwendet.

3.1.1. Wahl des Kulturmediums

Zur Hefekultur wurde aus den in Kapitel 2.3.1.2 genannten Gründen ein vollsynthetisches Standardmedium nach Campbell [13] mit kleineren Modifikationen eingesetzt. Tabelle 7 zeigt seine Zusammensetzung:

Tabelle 7: Nährmedium für die Hefekulturen

Glukose-Monohydrat	:	10	g/L
Ammoniumsulfat	:	3,5	g/L
L-Asparagin	:	1,5	g/L
L-Histidin	:	10	mg/L
L-Methionin	:	10	mg/L
L-Tryptophan	:	10	mg/L
KH_2PO_4	:	1,0	g/L
K_2HPO_4	:	0,2	g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$:	0,5	g/L
NaCl	:	0,5	g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$:	0,5	g/L
H_3BO_3	:	500	$\mu\text{g/L}$
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$:	400	$\mu\text{g/L}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$:	400	$\mu\text{g/L}$
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$:	200	$\mu\text{g/L}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$:	200	$\mu\text{g/L}$
KI	:	100	$\mu\text{g/L}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$:	40	$\mu\text{g/L}$
myo-Inositol	:	10	mg/L
Kalzium-Pantothenat	:	2	mg/L
Nikotinsäure	:	400	$\mu\text{g/L}$
Pyridoxin-HCl	:	400	$\mu\text{g/L}$
Thiamin-HCl	:	400	$\mu\text{g/L}$
Riboflavin	:	200	$\mu\text{g/L}$
Biotin	:	20	$\mu\text{g/L}$
Folsäure	:	2	$\mu\text{g/L}$

Gegenüber Campbell wurde statt Glukose die gleiche Menge Glukose- Monohydrat eingesetzt (10 g/L Glukose- Monohydrat entsprechen 9,1 g/L Glukose); die Konzentration an Methionin und Tryptophan wurde von 20 mg/L auf 10 mg/L halbiert und der

Wachstumsfaktor p-Aminobenzoesäure ganz weggelassen, um ein zu rasches und damit vorwiegend anaerobes Wachstum der Hefe zu verhindern. Der pH- Wert dieses Nährmediums betrug nach Zugabe des salzsauren radioaktiven Standards ca. 5,5. Der Gesamtchromgehalt der Nährmedien wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht eigens überprüft. Durchgeführte Bestimmungen an identischen Medien mit Hilfe der Graphitrohr-AAS ergaben einen Chromgehalt von deutlich weniger als 2 µg/L [193]. Dieser Wert liegt nahezu drei Größenordnungen unterhalb der nachträglich zugesetzten Chrommenge (s.u.) und ist daher zu vernachlässigen.

3.1.2. Kulturbedingungen

Zur Gewinnung von Hefe mit radioaktiv markiertem Chrom wurden Ansätze in zwei verschiedene Größen durchgeführt: 0,2 L und 0,5 L. Dabei wurde die Hefe aerob als 0,2 L- Ansatz in 0,5 L Kulturflaschen oder als 5- L Ansatz in einer 10 L Laborglasflasche bei Raumtemperatur auf einem Rotationschütteltisch kultiviert.

Die Kulturen wurden aus Starterkulturen mit einer Zelldichte von $60 \cdot 10^6$ bis $90 \cdot 10^6$ Zellen/mL mit entweder 50 µL (200 mL- Kultur) oder 1 mL (5 L- Kultur) beimpft. Abb. 9 zeigt die typische Wachstumskurve der Hefekulturen im verwendeten Nährmedium:

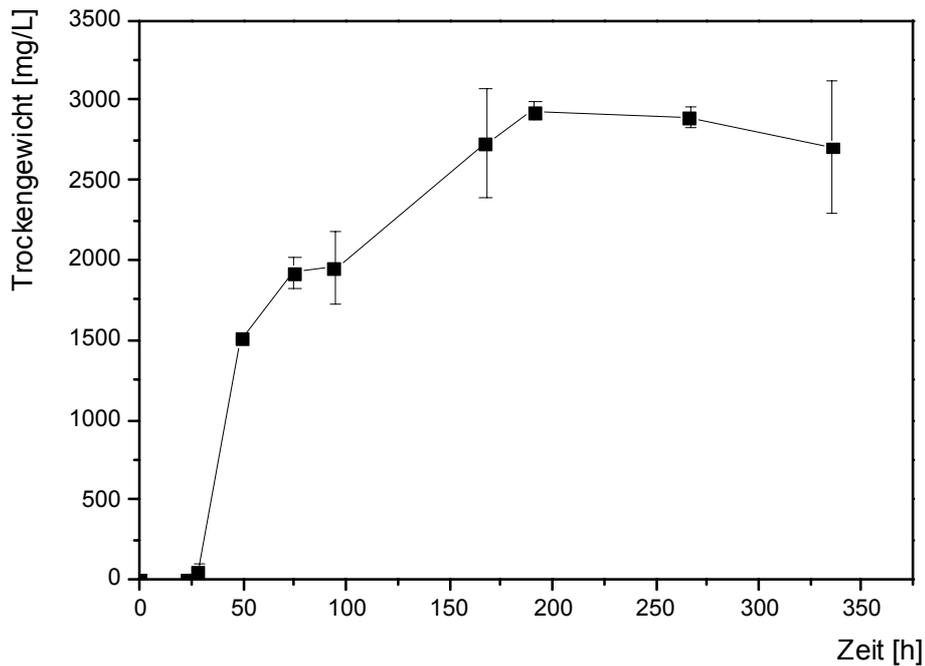


Abb. 9: Typisches zweiphasiges Wachstum von Bierhefe (*S. carlsbergensis*) im verwendeten Nährmedium ($T_r \approx 22^\circ\text{C}$). Mittelwert aus zwei Kulturen (Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung) [193]. Die relativ großen Fehler resultieren aus Variationen in der Entwicklung der beiden Kulturen und Unsicherheiten der Probennahme durch teilweise Verklumpung der Zellen.

Unter den gewählten Bedingungen ist nach etwa acht Tagen war das Wachstum der Hefe abgeschlossen und die Kultur geht in die stationäre Phase über. Die durchschnittliche Ausbeute in 20 Ansätzen betrug 8,1 g Hefe(Feuchtgewicht)/L (Median) (ca. 2,7 g Trockengewicht/L), entsprechend 0,28 g Hefe(Trockengewicht)/g Glukose.

3.1.3. Zugabe des Tracers

Der Tracer wurde zusammen mit der berechneten Menge an Träger unmittelbar nach Zugabe der Impflösung über einen Sterilfilter (0,2 μm) dem bereits sterilisierten Hefenährmedium hinzugegeben.

3.1.4. Zellernte

Am Ende der Wachstumsphase nach 8 bis 10 Tagen wurden die Hefezellen vom Kulturmedium getrennt und anschließend aufgearbeitet.

Zur Ernte der Zellen wurden die Kulturen aus den 0,2 L- Ansätzen über eine Saugflasche und einen Glasfaser- Filter abgesaugt und der Zellkuchen (ca. 1-1,5 g) anschließend mit kaltem 0,2 M KH_2PO_4 gewaschen. Die großen Ansätze (5 L) wurden bei 4°C in mehreren Durchläufen in 250 mL- Zentrifugenbechern abzentrifugiert und anschließend die Gesamtmenge Hefe (ca. 40 g) mit kaltem 0,2 M KH_2PO_4 gewaschen, um Reste des anhaftenden Kulturmediums zu entfernen.

3.1.5. Mechanischer Aufschluß der Hefezellen mit Glasperlen

Zum Aufschluß der Hefezellen wurde der mechanische Aufschluß durch Glasperlen gewählt. Kontaminationen durch Schwermetalle wurden durch Auswahl geeigneter Werkstoffe für die Aufschlußapparatur vermieden.

Durch die Verwendung unterschiedlicher Ansatzgrößen bei der Hefekultur war es nötig, zwei verschiedene Systeme zum Aufschluß der Hefezellen zu konstruieren:

- Für kleine Volumina bis etwa 3 g Hefe- Feuchtgewicht wurde, angeregt durch den Vorschlag von Catley [221], auf Basis eines Labor- Kleinmixers für Reagenzgläser („Heidolph- Reax“) ein geschlossenes System mit Kühlmantel (für Eis- Wasserkühlung) konstruiert.
- Größere Volumen von ca. 40 g Hefe- Feuchtgewicht wurde mit Hilfe einer Rührwerkskugelmühle ähnlich Novotný [274] aufgeschlossen.

Beide Geräte zeigten sich in der Lage, konzentrierte Suspensionen von Hefezellen innerhalb von 10-15 Minuten und ohne zusätzliche Kontaminationen durch Chrom oder andere Schwermetalle aufzuschließen. Dabei erwies sich das System für kleine Volu-

mina als verhältnismäßig störanfällig und lieferte gelegentlich unvollständig aufgeschlossene Suspensionen, was eine quantitative Auswertung dieser Versuchsgänge teilweise unmöglich machte. Eine hervorragende Leistungsfähigkeit hingegen bewies das für größere Volumen konstruierte Gerät, das mit guter Reproduzierbarkeit nahezu vollständig (> 98%) aufgeschlossene Zellsuspensionen lieferte.

3.1.6. Konditionierung des Zellextrakts

Das Rohhomogenat wurde auf zwei verschiedene Arten gereinigt:

- wiederholte Zentrifugation bei bis zu $48.000 \cdot g$ mit anschließender Ultrazentrifugation bei $100.000 \cdot g$
- wiederholte Zentrifugation bei bis zu $48.000 \cdot g$ mit anschließender Filtration über einen $1,2 \mu\text{m}$ - Spritzenfilter und Ultrafiltration über Ultrafiltrations- Konzentratoren vom Typ „Centriprep[®] 10“ der Firma Amicon (nominale Trenngrenze 10 kDa)

Im zweiten Fall wurde das vorgereinigte Rohhomogenat weiter mit Hilfe der Gelchromatographie auf Toyopearl HW 40s unter Verwendung des flüchtigen Puffers Ammoniumacetat bei pH 7,0 aufbereitet. Da die zu diesem Zweck zur Verfügung stehende Säule (Dimensionen $2,5 \text{ cm} \cdot 50 \text{ cm}$) für das aufzureinigende Probenvolumen zu klein war, mußte die Gesamtmenge der Probe mit Mehrfachinjektionen aufbereitet werden. Die geschnittenen Fraktionen wurde gefriergetrocknet und in einer geringen Menge Wasser aufgenommen. Dieser insgesamt durch Ultrafiltration und Gelchromatographie vorbereitete Extrakt stellte das Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen mittels Ionenpaarchromatographie und Gelchromatographie dar.

3.2. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Chromaufnahme von Hefe insgesamt sowie der Anteil des an die Zellwand der Hefe adsorbierten Chroms bestimmt und die im Zytosol gelöst vorliegenden Anteile des Chroms mit Hilfe von Gelchromatographie und Ionenpaarchromatographie fraktioniert.

3.2.1. Aufnahme von Chrom in Batchkulturen von *S. cerevisiae*

In einem Teil der Versuche wurde die Aufnahme des zugesetzten Cr(III) in Hefezellen quantitativ verfolgt. Der Chromgehalt des Nährmediums betrug bei diesen Versuchen stets 1 mg/L. Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse aus insgesamt 11 Ansätzen:

Tabelle 8: Aufnahme von Chrom in Batchkulturen von *S. cerevisiae*

Aufarbeitung:	Volumen	Ausbeute	Ausbeute rel.	Chromgehalt (relativ, Feuchtgewicht)	Anteil am Gesamtchrom
920411	0,2 L	1,21 g	6,05 g/L	0,57 µg/g	0,34%
930120a	0,2 L	1,45 g	7,25 g/L	2,47 µg/g	1,79%
930120b	0,2 L	1,65 g	8,30 g/L	2,23 µg/g	1,85%
930129a	0,2 L	1,80 g	9,0 g/L	2,05 µg/g	1,85%
930129b	0,2 L	1,76 g	8,80 g/L	1,93 µg/g	1,70%
930408	0,2 L	1,74 g	8,70 g/L	2,03 µg/g	1,76%
930416a	0,2 L	1,58 g	7,9 g/L	1,84 µg/g	1,45%
930416b	0,2 L	1,53 g	7,65 g/L	2,35 µg/g	1,80%
930611	0,2 L	1,65 g	8,25 g/L	1,60 µg/g	1,32%
940711	5 L	46 g	9,2 g/L	4,4 µg/g	4,1%
950828	5 L	40 g	8,0 g/L	0,94 µg/g	0,74%

Der Median der Aufnahme von Chrom in 11 Versuchen beträgt damit 2,03 µg/g, was umgerechnet auf Trockengewicht 7,25 µg/g entspricht. Damit war die Chromkonzentration in der Hefe („brutto“, d.h. sowohl absorbiertes als auch adsorbiertes Chrom) ca.

zweifach höher als die Chromkonzentration im Nährmedium. Der Median des Anteils des insgesamt aus dem Medium aufgenommenen Chroms beträgt 1,76%.

3.2.2. Fraktionierung niedermolekularer Chromverbindungen aus Hefe

Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war die Anwendung einer Methode zur schonenden Fraktionierung chromhaltiger Verbindungen aus Bierhefe, um damit neue Erkenntnisse einerseits hinsichtlich Bindung und Metabolismus von Chrom in Hefe, andererseits über die Existenz eines chromhaltigen Glukosetoleranzfaktors zu gewinnen.

3.2.2.1. Schonende Extraktion von Chrom aus Hefe

Nach Erreichen der stationären Phase 9-10 Tage nach der Beimpfung wurde die Hefe durch Zentrifugation oder Filtration geerntet, mit wäßriger kalter 0,2 M KH_2PO_4 gewaschen, in etwa der doppelten Menge kalter 0,2 M/L KH_2PO_4 resuspendiert und mit Hilfe der Kugelmühle mit Glasperlen mechanisch aufgeschlossen. Nach dem Aufschluß wurde die Suspension, die neben den zytosolischen Bestandteilen der Hefe noch Zellkerne und die Trümmer der Zellwände enthielt, von den Glasperlen getrennt und anschließend zentrifugiert. In einem Teil der Aufarbeitungen wurde im Pellet der Chromgehalt der Membranfraktion quantitativ bestimmt. Bei den Aufarbeitungen im kleinen Maßstab (0,2 L Ansätze, Hefeausbeute ca. 1.6 g) wurde das Homogenat über Spritzenfilter filtriert und anschließend direkt mit Hilfe der Gelchromatographie untersucht. Die Ansätze im größeren Maßstab (5 L Ansätze, Hefeausbeute ca. 40 g) wurden zur weiteren Reinigung erneut zentrifugiert. In einem der beiden 5 L Ansätze wurde das Zentrifugat ultrafiltriert (Ausschlußgrenze nominell 10 kDa). Der Rückstand, der die hochmolekularen Zellbestandteile einschließlich der Mikrosomenfraktion und der Lipide enthielt, wurde verworfen und das jetzt klare, leicht gelbliche Ultrafiltrat (Fraktion AII, s.u.) portioniert eingefroren. Zur weiteren Aufreinigung wurde das Ultrafiltrat portionsweise aufgetaut und über eine größere Gelsäule mit dem flüchtigen Puffer Ammoniumazetat chromatographiert, wobei die gesamte Radioaktivität in

Ammoniumazetat chromatographiert, wobei die gesamte Radioaktivität in einem einzigen Peak eluierte. Die vereinigten Fraktionen wurden schließlich unter Verflüchtigung des Puffers gefriergetrocknet. Der hellbraune Rückstand (insgesamt 55 mg) wurde in etwas Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung portioniert eingefroren (Fraktion AIII). Eine Übersicht gibt Abb. 10:

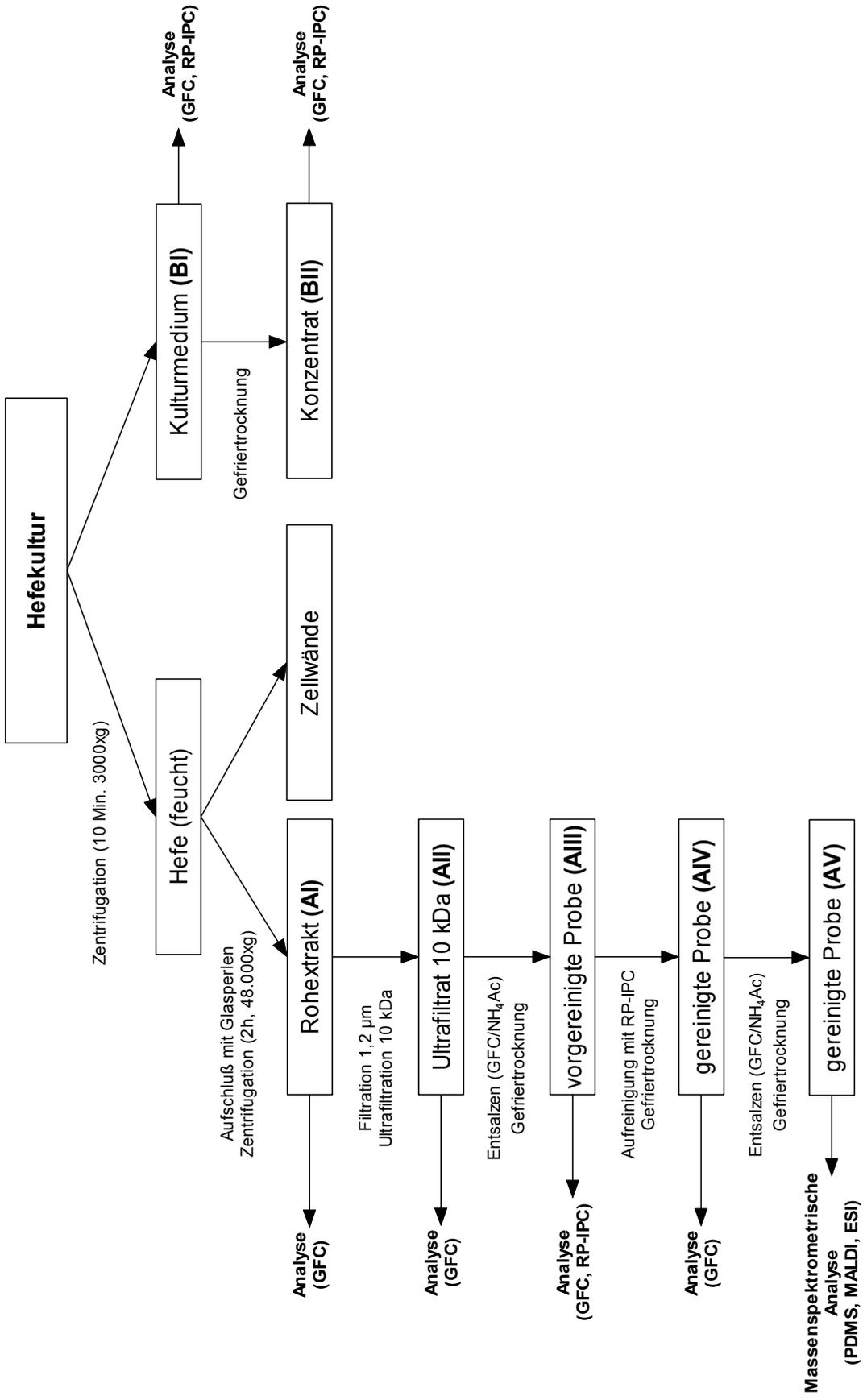


Abb. 10: Übersicht über die Aufarbeitung der Hefe und des verbrauchten Kulturmediums

Die quantitativen Aspekte der Aufarbeitung der größeren Ansätze (5 L) zeigt Tabelle 9:

Tabelle 9: Vergleich der Aufarbeitung der Hefezellen in zwei verschiedenen Ansätzen

		Ansatz 1	Ansatz 2
1	Ausbeute Hefe (Feuchtgewicht)	46 g	40 g
2	End- pH- Wert des Nährmediums	5,3	4,9
3	Chromgehalt in der Hefe (total)	202 µg	37 µg
4	Chromgehalt in der Hefe, relativ (bezogen auf Feuchtgewicht)	4,4 µg/g	0,9 µg/g
5	Anteil des an Hefe gebundenen Chroms am Gesamtchrom	4,1%	0,7%
6	Chrom in der zytosolischen Fraktion (Überstand nach Zentrifugation)	12%	53%
7	Partikulär gebundenes Chrom (berechnet aus 6)	88%	47%
8	Chromkonzentration im Zytosol (geschätzt)	0,5 µg/g	0,5 µg/g

Zwischen den beiden Ansätzen bestanden offensichtlich deutliche Unterschiede in der Verteilung des Chroms zwischen Zellwand und Zytosol. Die gesamte, mit Hefe assoziierte Chrommenge war in Ansatz 1 mit 4,4 µg/g mehr als viermal so groß wie in Ansatz 2 mit 0,9 µg/g. Dem gegenüber war die Chromkonzentration im Zytosol, die nach Abtrennung der partikulären Fraktion aus dem Feuchtgewicht der Zellen geschätzt werden kann, letztendlich bei beiden Ansätzen gleich groß und mit 0,5 µg/g etwa halb so hoch wie die Chromkonzentration im Kulturmedium (1 µg/g). Die in Ansatz 1 mit Hefe assoziierte größere Chrommenge befand sich also hauptsächlich in der partikulären Fraktion, in der sich überwiegend Bestandteile der Zellwand finden. Wie sich bei der Aufarbeitung zeigte, ergaben sich darüber hinaus hinsichtlich der offensichtlichen Verteilung der Chromspezies keinerlei Unterschiede zwischen Ansatz 1 und Ansatz 2.

3.2.2.2. Reinigung der partikulären Fraktion

Bei einem 5 L Ansatz wurde die direkt nach dem Zellaufschluß gewonnene Membranfraktion, die neben den Bestandteilen der Zellwand auch andere leicht sedimentierende Anteile aus dem Zytosol (vor allem die Kernfraktion) enthielt, durch wiederholte kurze Zentrifugationen nebst anschließender Resuspension in 0,2 M KH_2PO_4 von diesen Beimengungen befreit. Die nachstehende Graphik zeigt, wie durch die Aufreinigung der spezifische Chromgehalt gegenüber dem Chromgehalt der Hefe insgesamt (Positi-

on 0) mit zunehmendem Reinheitsgrad der Membranfraktion ansteigt, da durch die Waschungen offensichtlich Anteile mit geringerem Chromgehalt (insbesondere die Kernfraktion) entfernt wurden:

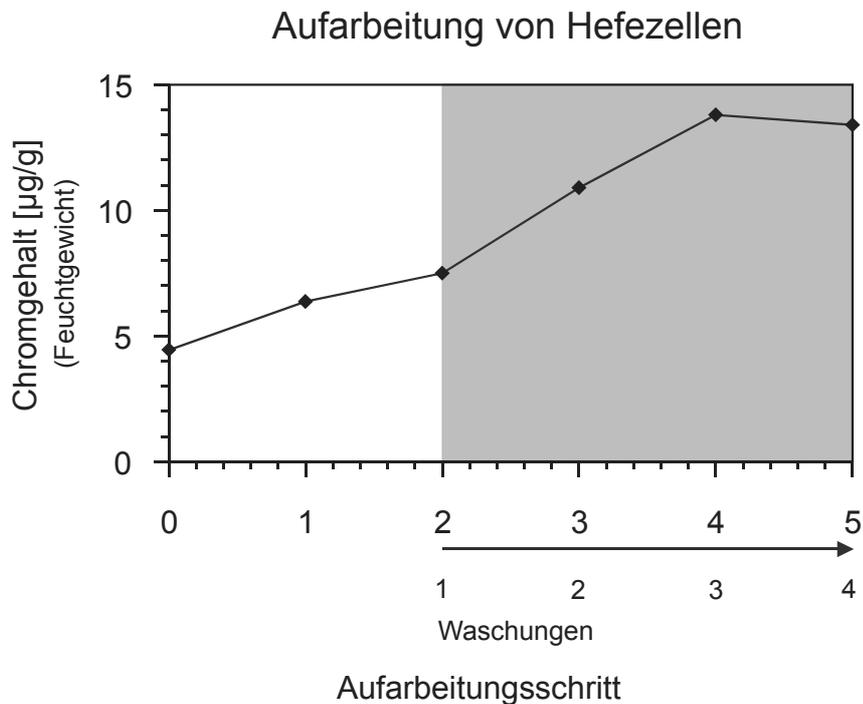


Abb. 11: Chromgehalt der Hefe (Position 0) und der Membranfraktion (Pos. 1-5) mit zunehmender Reinheit (Pos. 2-5: insgesamt 4 Waschschrte).

3.2.2.3. Fraktionierung und Charakterisierung chromhaltiger Verbindungen aus Hefe mit Hilfe der Gelchromatographie

Die im Zellextrakt vorliegenden Chromspezies wurden zunächst durch Gelchromatographie auf Toyopearl HW 40s charakterisiert. Auf diesem Medium wurden verschiedene Eluenten auf ihre Eignung überprüft. Zum Zweck der Bestimmung der Molmasse der hochmolekularen Fraktion wurde außerdem ein Chromatogramm auf einer 60 cm

Gelsäule mit Toyopearl HW 55s aufgenommen. Der Einfluß verschiedener Eluenten sowie von wäßriger Ammoniaklösung zur Extraktion der Hefe sowie von Fällungstechniken zur Aufreinigung des Rohextrakts wurde ebenfalls mit Hilfe der Gelchromatographie dokumentiert.

3.2.2.3.1. Einfluß verschiedener Eluenten

Gelchromatographie ladungstragender Substanzen nach einem überwiegenden Größenausschlußmechanismus ist auf Toyopearl- Sorbentien (und allen anderen Materialien) nur in Eluenten mit ausreichender Ionenstärke möglich. Neben dem standardmäßig verwendeten 0,2 M KH_2PO_4 (pH ca. 4,2) wurden auch 0,2 M Phosphatpuffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) bei pH 6,7 und 0,2 M NaCl- Lösung erprobt. Die folgenden Chromatogramme wurden mit Toyopearl HW 40s auf einer Säule der nominalen Dimension 2,5 cm · 50 cm durchgeführt. Abb. 12 zeigt zunächst zum Vergleich das Chromatogramm mit einer 0,2 M KH_2PO_4 - Lösung als Eulenten (die Retentionszeiten der drei Chromatogramme unterscheiden sich etwas, da jeweils mit neu gepackten Säulen gearbeitet werden mußte):

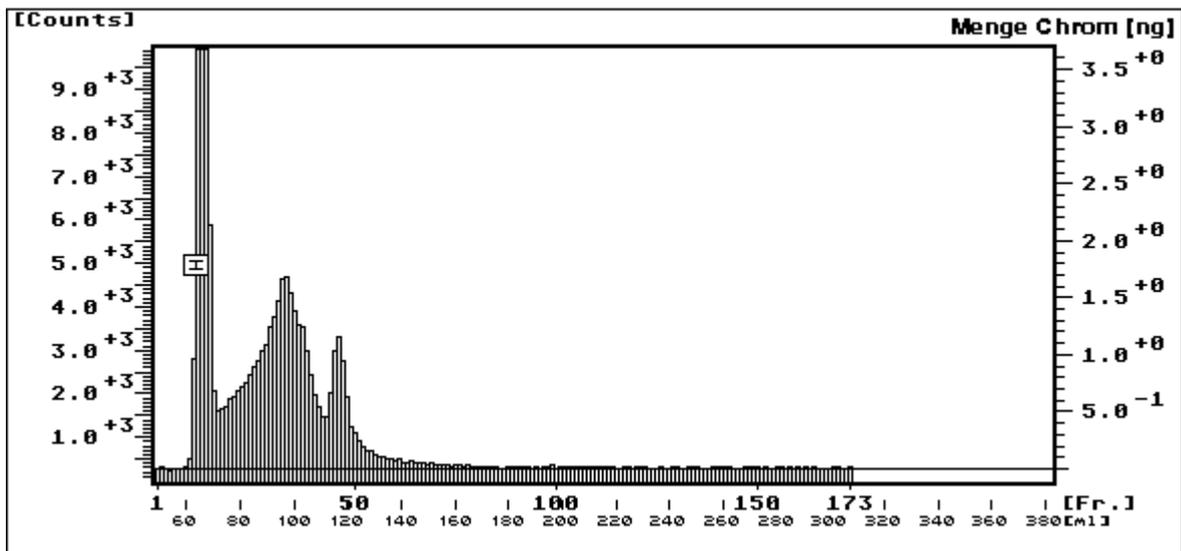


Abb. 12: Chromatogramm eines Hefeextrakts auf Toyopearl HW 40s.

Säule Toyopearl HW 40s, 2,5cm*50cm; Eluent: 0,2 M KH_2PO_4 , 2,5 mL/min.. Probe: 490 μL ;
 Fraktionsgröße: 1,5 mL

Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler (σ) einer einzelnen Chrombestimmung aufgrund der Zählstatistik der Radioaktivität (Poisson- Statistik) in der Mitte der Ordinate

Abb. 13 zeigt, daß bereits bei einer Erhöhung des pH- Werts um ca. 2 Einheiten im gleichen Puffersystem deutliche Veränderungen im Elutionsmuster auftreten, was auf erste Veränderungen der vorliegenden Spezies hindeutet:

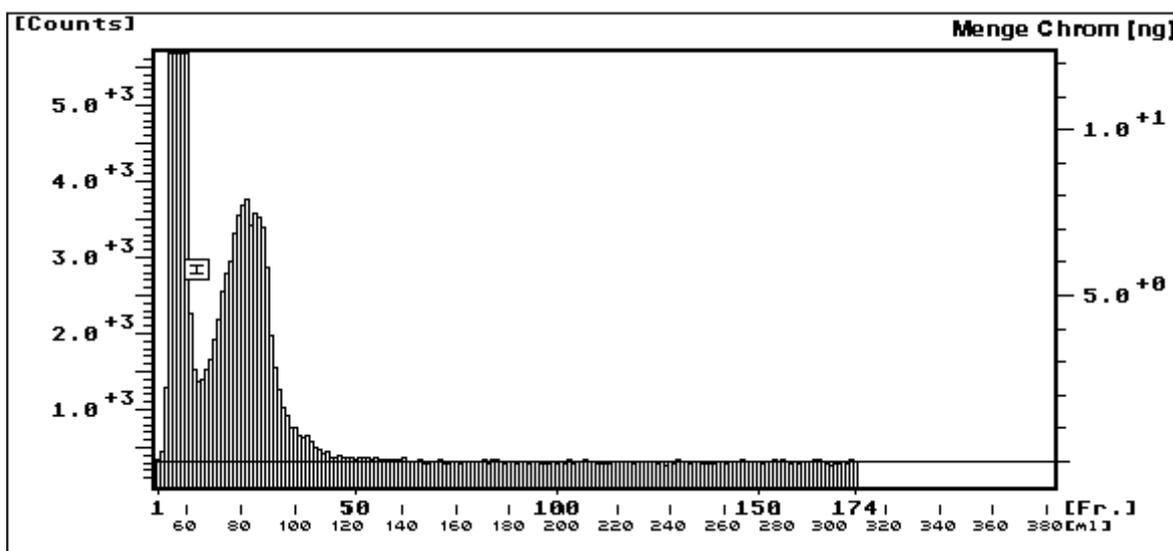


Abb. 13 Chromatogramm eines Hefeextrakts auf Toyopearl HW 40s.

Säule Toyopearl HW 40s, 2,5cm*50cm; Eluent: 0,2 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 6,74, 2,5 mL/min.. Probe: 2,4 mL; Fraktionsgröße: 1,5 mL

Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler (σ) einer einzelnen Chrombestimmung aufgrund der Zählstatistik der Radioaktivität (Poisson- Statistik) in der Mitte der Ordinate

Die Verwendung eines reinen Kochsalz- Puffers (0,2 M NaCl) hingegen führt zu einem ähnlichen Ergebnis wie der Einsatz des leicht sauren KH_2PO_4 . Allerdings ist die Retentionszeit des dritten Peaks deutlich zu kleineren Zeiten hin verschoben, wodurch sich insgesamt ein schlechteres Trennergebnis ergibt:

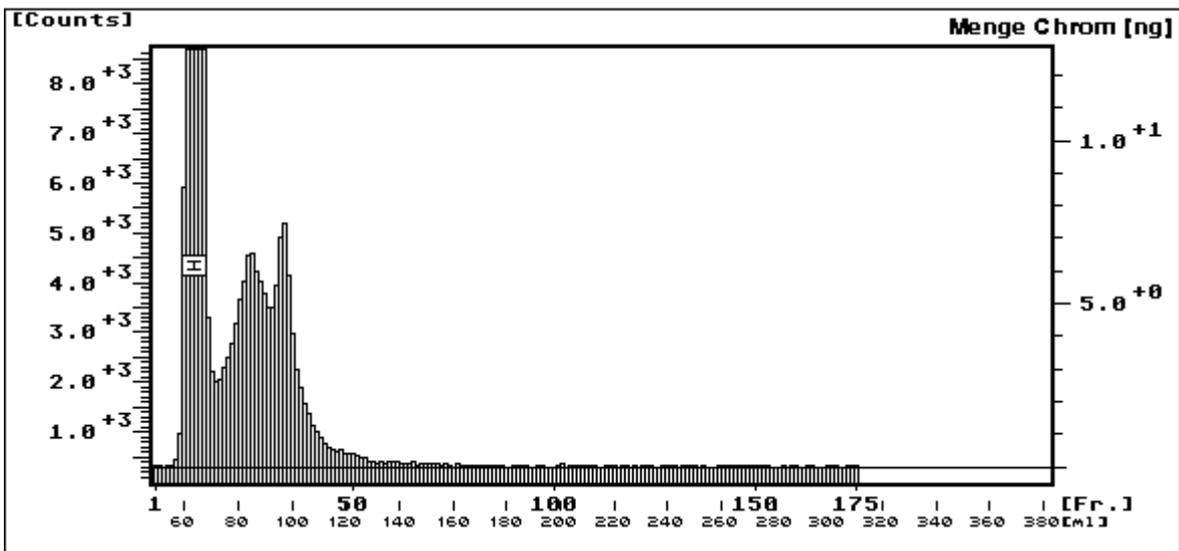


Abb. 14: Chromatogramm eines Hefeextrakts auf Toyopearl HW 40s.

Säule Toyopearl HW 40s, 2,5cm*50cm; Eluent: 0,2 M NaCl, 2,5 mL/min.. Probe: 2,4 mL;
Fraktionsgröße: 1,5 mL

Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler (σ) einer einzelnen Chrombestimmung aufgrund der Zählstatistik der Radioaktivität (Poisson- Statistik) in der Mitte der Ordinate

Es ist festzustellen, daß bereits eine Erhöhung des pH- Werts um zwei Einheiten bei Verwendung eines Phosphatpuffers während des Chromatogramms zu einer Veränderung der Speziesverteilung führt. Mit KH_2PO_4 gegenüber NaCl als Eluent bei pH 4,2 kann allerdings bei der Trennung von Chromspezies aus Hefeextrakten das bessere Trennergebnis erzielt werden.

3.2.2.3.2. Abschätzung des Molekulargewichts

Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurden die Rohextrakte unter Verwendung gesondert kalibrierter Säulenpackungen chromatographiert (siehe Kapitel 5.11.5). Das Molekulargewicht der höhermolekularen Fraktion konnte hierbei nur unter Einsatz eines grobporigeren Gels mit höherer Ausschlußgrenze bestimmt werden. Zur Verbesserung der Trennung und Erhöhung der Genauigkeit wurde die Säulenlänge zur Bestimmung der niedermolekularen Fraktionen auf 133 cm nahezu verdoppelt. Die Abb. 15 und Abb. 16 zeigen das Radiochromatogramm des Hefe- Rohextraktes AI (aus

Abb. 10) direkt nach dem Zellaufschluß auf Toyopearl HW 55s (Trennbereich 1000 bis 100.000 D, Säulenlänge 60 cm) und HW 40s (Trennbereich 100 bis 5.000 D, Säulenlänge 133 cm):

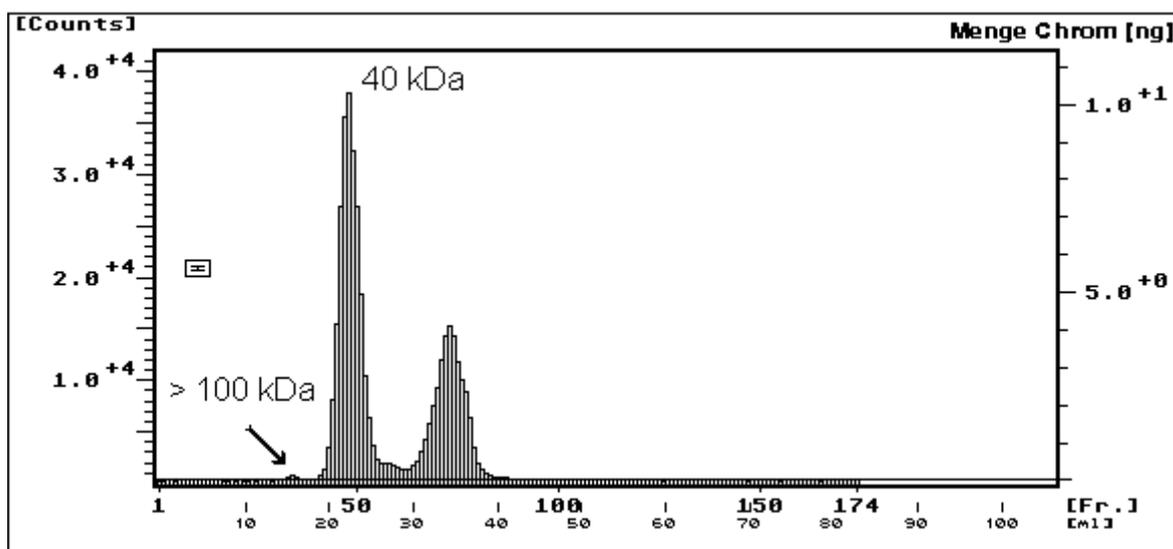


Abb. 15: Gelchromatographie des Hefe- Rohextrakts AI (Toyopearl HW 55s)

Bedingungen: Säule Toyopearl HW 55s, 1cm*60cm; Eluent: 0,2 M KH_2PO_4 , 0,5 mL/min..
 Probe: 490 μL ; Fraktionsgröße: 0,5 mL. Der Pfeil weist auf eine geringe Menge einer Chromfraktion ≥ 100 kDa hin.

Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler (σ) einer einzelnen Chrombestimmung aufgrund der Zählstatistik der Radioaktivität (Poisson- Statistik) in der Mitte der Ordinate.

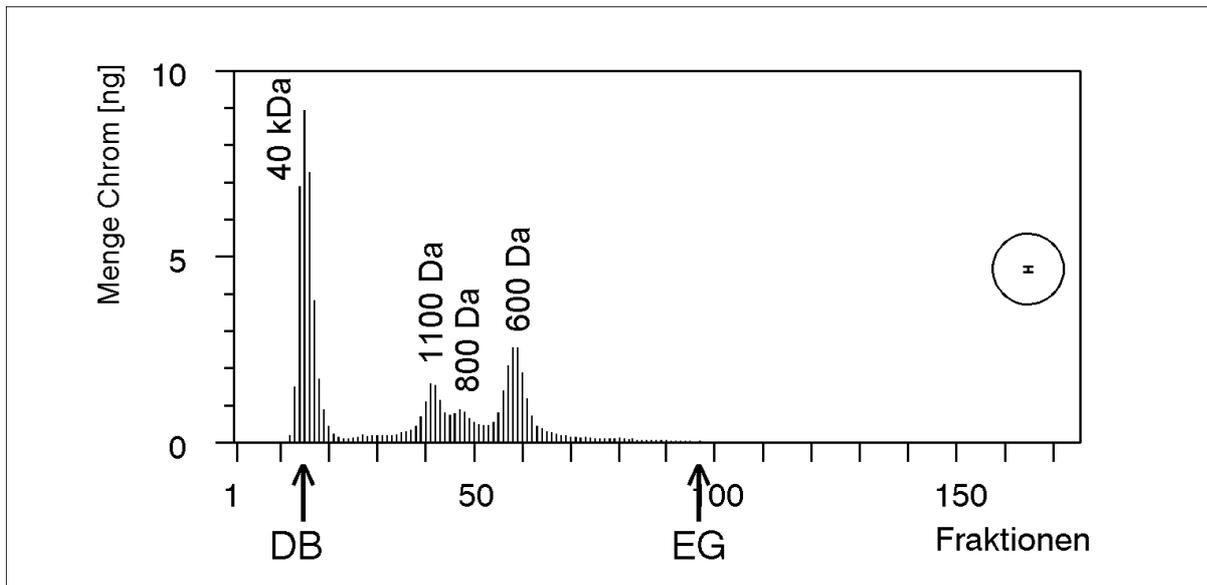


Abb. 16: Gelchromatographie des Hefe- Rohextrakts AI (Toyopearl HW 40s)

Säule Toyopearl HW 40s, 1cm*133cm; Eluent: 0,2 M KH_2PO_4 , 0,5 mL/min.. Probe: 490 μL ; Fraktionsgröße: 0,5 mL. DB und EG markieren das Elutionsvolumen von Dextran-Blau (V_0) bzw. Ethylenglykol (V_t).

Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler (σ) einer einzelnen Chrombestimmung aufgrund der Zählstatistik der Radioaktivität (Poisson- Statistik) in der Mitte der Ordinate.

Die Abschätzungen des Molekulargewichtes wurden durch Vergleich mit einer Kalibrierkurve mit Hilfe von Polyethylenglykolstandards auf der gleichen Säule gewonnen (siehe Kapitel 5.11.5). Die zur Berechnung von K_d notwendige Kenngröße V_0 (Gleichung (11) aus Kapitel 2.3.6.1.1) konnte aus den Chromatogrammen (UV- Absorption) selbst entnommen werden, da die Hefeextrakte genügend hochmolekulare, zusammen mit dem Totvolumen eluierende Bestandteile enthielten. Aufgrund der großen, der Methode innewohnenden Ungenauigkeit wurden die Angaben für die Molekulargewichte auf volle 100 Da gerundet. Unter der Annahme eines Fehlers des Elutionsvolumens von $\pm 500 \mu\text{L}$ (entsprechend ± 1 Minute oder ± 1 Fraktion), ergeben sich über die Kalibrierkurve (Kapitel 5.11.5) folgende Bereiche für das resultierende Molekulargewicht:

- Fraktion 40000 Da : 34674 Da - 50118 Da (mittlerer Wert: 40738 Da)
- Fraktion 1100 Da : 1047 - 1175 Da (mittlerer Wert: 1071 Da)
- Fraktion 800 Da : 794 - 851 Da (mittlerer Wert: 831 Da)
- Fraktion 600 Da : 562 - 603 Da (mittlerer Wert: 575 Da)

3.2.2.3.3. Versuche zur Extraktion von Hefe mit wäßriger Ammoniaklösung

Zur Extraktion chromhaltiger Komplexe aus Bierhefe und deren weiterer Verarbeitung wurde in anderen Arbeiten häufig mit wäßrigen Ammoniaklösungen gearbeitet. Es wurde untersucht, ob diese Prozeduren das Spektrum der vorhandenen Chromspezies verändern. Zu diesem Zweck wurden mit ^{51}Cr markierte Hefezellen mit einer 0,3 molaren Ammoniaklösung 1,5 Stunden geschüttelt, die Hefezellen abfiltriert und der Extrakt nach Neutralisation mit Phosphorsäure auf Toyopearl HW 40s chromatographiert:

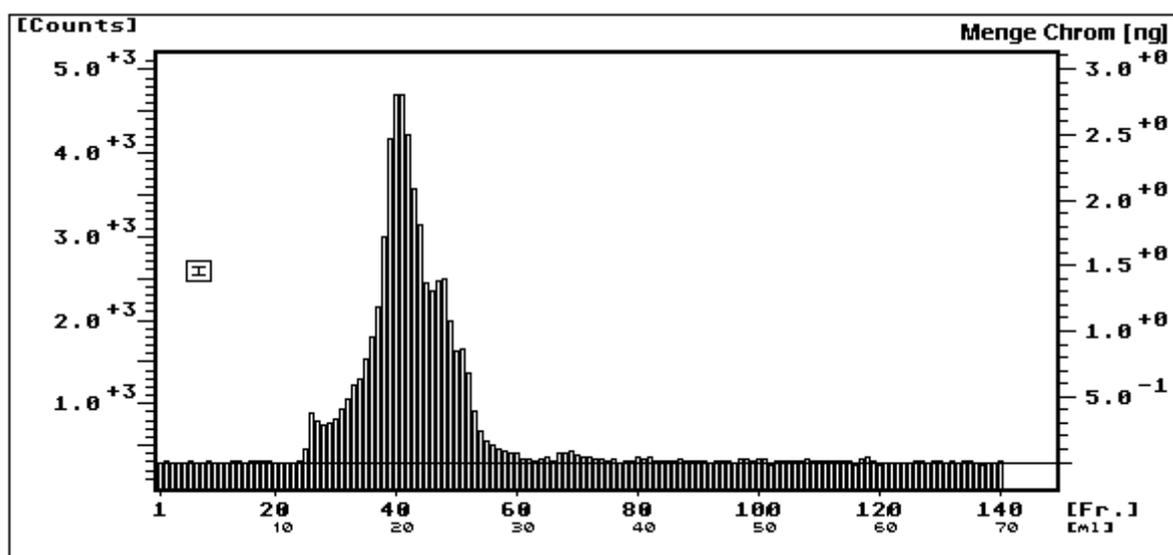


Abb. 17: Gelchromatographie eines ammoniakalischen Hefe- Extrakts.

Bedingungen: Säule Toyopearl HW 40s, 1 cm*60 cm; Eluent: 0,2 M KH_2PO_4 , 0,5 mL/min..
 Probe: 490 μL ; Fraktionsgröße: 0,5 mL.

Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler (σ) einer einzelnen Chrombestimmung aufgrund der Zählstatistik der Radioaktivität (Poisson- Statistik) in der Mitte der Ordinate.

Zum Vergleich ist in Abb. 18 das Chromatogramm des nicht behandelten Rohextrakts, chromatographiert unter gleichen Bedingungen dargestellt:

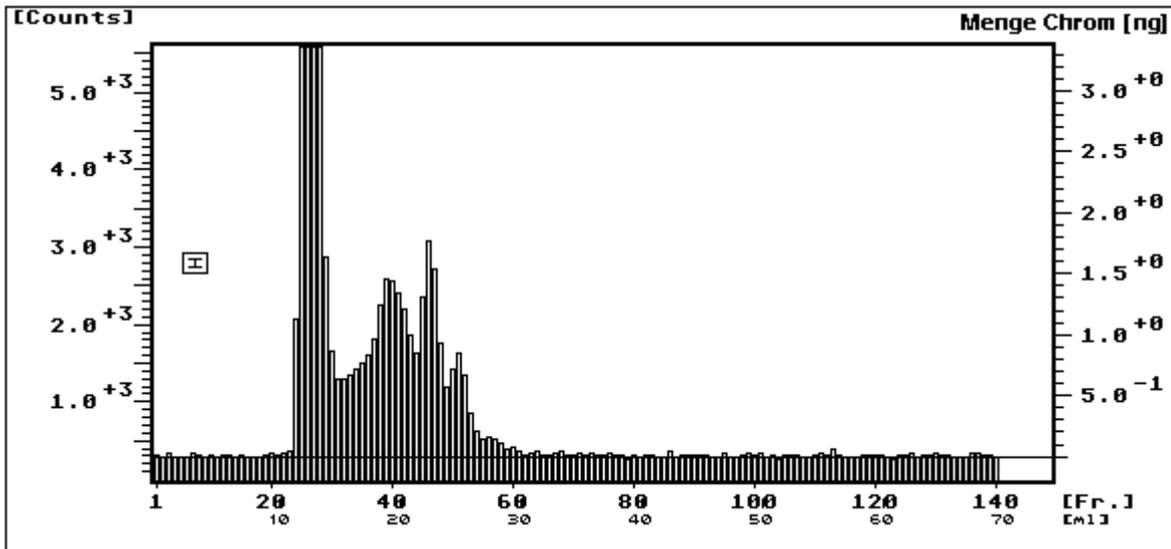


Abb. 18: Gelchromatographie eines unbehandelten Hefe- Extrakts.

Bedingungen: Säule Toyopearl HW 40s, 1 cm*60 cm; Eluent: 0,2 M KH₂PO₄, 0,5 mL/min..

Probe: 490µL; Fraktionsgröße: 0,5 mL.

Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler (σ) einer einzelnen Chrombestimmung aufgrund der Zählstatistik der Radioaktivität (Poisson- Statistik) in der Mitte der Ordinate.

Abgesehen vom Fehlen des hochmolekularen Anteils des zytosolischen Chroms sind auch im niedermolekularen Bereich deutliche Veränderungen im Elutionsmuster der Chromspezies sichtbar. Wässrige Ammoniaklösung extrahiert nur den niedermolekularen Anteil der Chromspezies und führt darüber hinaus zu Veränderungen in der Speziesverteilung.

Weiterhin wurde untersucht, ob eine Änderung des pH- Werts bzw. die Zugabe von wässrigen Ammoniaklösungen zu Hefeextrakten zu einer Veränderung der dort vorliegenden Chromspezies führt. Dazu wurde der Hefeextrakt mit 3 molarer Ammoniaklösung eine Stunde lang inkubiert und nach Neutralisation mit Phosphorsäure und Filtration (zum Abtrennen der kolloid ausgefallenen Proteine) chromatographiert. Abb. 19 zeigt das Ergebnis:

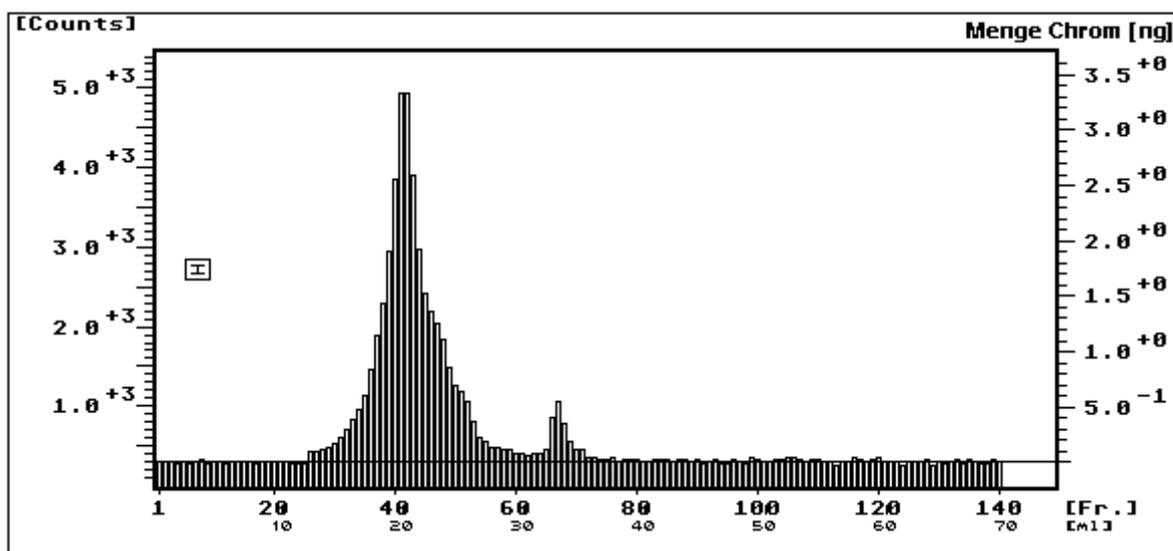


Abb. 19: Gelchromatographie eines mit wäßriger 3 M Ammoniaklösung behandelten Hefe- Extrakts (identischer Extrakt wie Abb. 18).

Säule Toyopearl HW 40s, 1 cm*60 cm; Eluent: 0,2 M KH_2PO_4 , 0,5 mL/min.. Probe: 490 μL ; Fraktionsgröße: 0,5 mL.

Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler (σ) einer einzelnen Chrombestimmung aufgrund der Zählstatistik der Radioaktivität (Poisson- Statistik) in der Mitte der Ordinate.

Durch diese Prozedur kommt es zu einer erheblichen Veränderung der vorliegenden Chromspezies. Ein Teil dieser Veränderungen (insbesondere der Verlust des hochmolekularen Anteils) ist vermutlich auf Verluste durch Mitfällungen mit den während der Neutralisation ausfallenden Proteinen zurückzuführen. Darüber hinaus fällt aber das Auftreten einer neuen Spezies bei einem Retentionsvolumen von ca. 34 mL auf.

Insgesamt läßt sich aus diesen Untersuchungen schließen, daß die Extraktion von Hefe oder die Behandlung von Hefeextrakten mit wäßrigen verdünnten Ammoniaklösungen zu einer deutlichen Veränderung der vorliegenden Chromspezies führt.

3.2.2.3.4. Eignung von Fällungstechniken zur Aufarbeitung von Hefeextrakten

Eine gängige Methode zur Abtrennung von Proteinen aus zellulären Matrizen stellt der Einsatz von Fällungsreagenzien dar . In der Regel werden diese Methoden zur Abtren-

nung der Proteine eingesetzt. Es wurde überprüft, ob sich derartige Arbeitsweisen auch zur Gewinnung der niedermolekularen Chrombestandteile eignen. Hierzu wurden die Proteine in Hefe-Rohextrakten mit Methanol und mit konzentrierter Ammoniumsulfat-Lösung ausgefällt und abfiltriert bzw. abzentrifugiert. Das Filtrat wurde dann mittels Gelchromatographie untersucht. Abb. 20 zeigt das resultierende Chromatogramm:

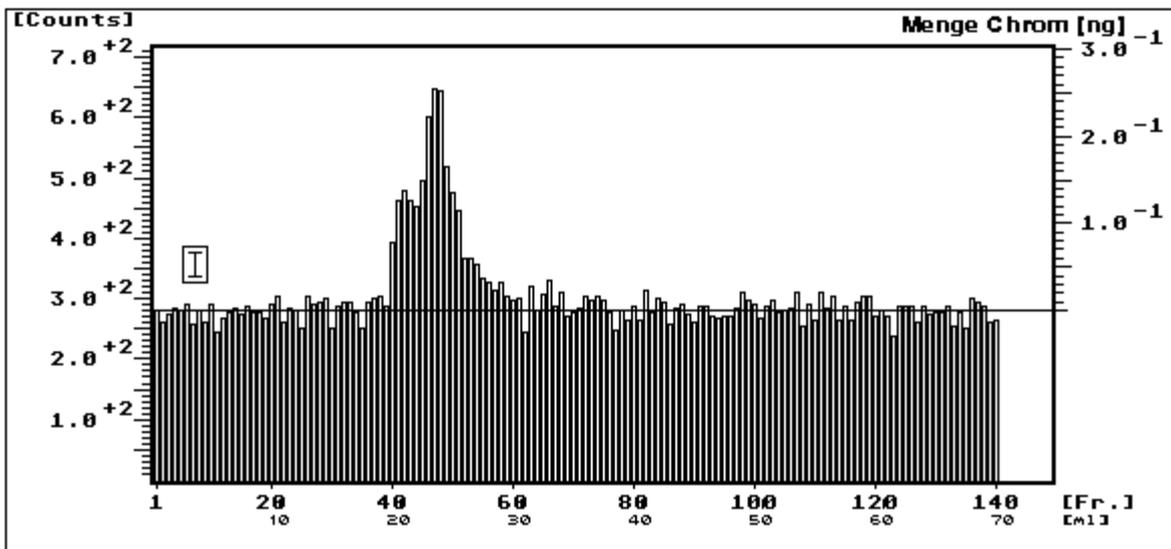


Abb. 20: Gelchromatographie eines Hefe- Extrakts nach Ausfällung der Proteine mit Methanol.
 Säule Toyopearl HW 40s, 1 cm*60 cm; Eluent: 0,2 M KH_2PO_4 , 0,5 mL/min.. Probe: 490 μL ;
 Fraktionsgröße: 0,5 mL.
 Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler (σ) einer einzelnen Chrombestimmung aufgrund der Zählstatistik der Radioaktivität (Poisson- Statistik) in der Mitte der Ordinate.

Neben dem (zu erwartenden) vollständigen Verlust des hochmolekularen Anteils der Chromspezies fällt eine deutliche Veränderung der Verteilung der niedermolekularen Chromspezies auf. Insgesamt konnten nach Methanolfällung lediglich 15% der Gesamtmenge von Chrom im Hefeextrakt wiedergewonnen werden.

Die Fällung mit konzentrierter Ammoniumsulfatlösung erwies sich als vollkommen ungeeignet, da das nach der Fällung im Überstand verbleibende Reagenz zu einer starken Störung der Gelchromatographie führte (Zerstörung des Gelbetts durch vorüber-

gehende Änderung der Hydratation bei Durchlauf der Probe) und keine Methoden für eine selektive Abtrennung des Salzes zur Verfügung stehen.

3.2.2.4. Ultrafiltration und Gelchromatographie zur verlustarmen Vorreinigung des Hefe- Rohextrakts

Gegenüber den vorgenannten Fällungsmethoden stellt Ultrafiltration eine sehr schonende und weitgehend störungsfreie Methode zur Abtrennung der hochmolekularen Bestandteile des Zytosols dar. Das Gelchromatogramm des Ultrafiltrats zeigt erwartungsgemäß die Abtrennung der hochmolekularen Chromspezies. Die Chromspezies im niedermolekularen Bereich bleiben demgegenüber unverändert, wie der Vergleich von Abb. 21 mit Abb. 16 zeigt:

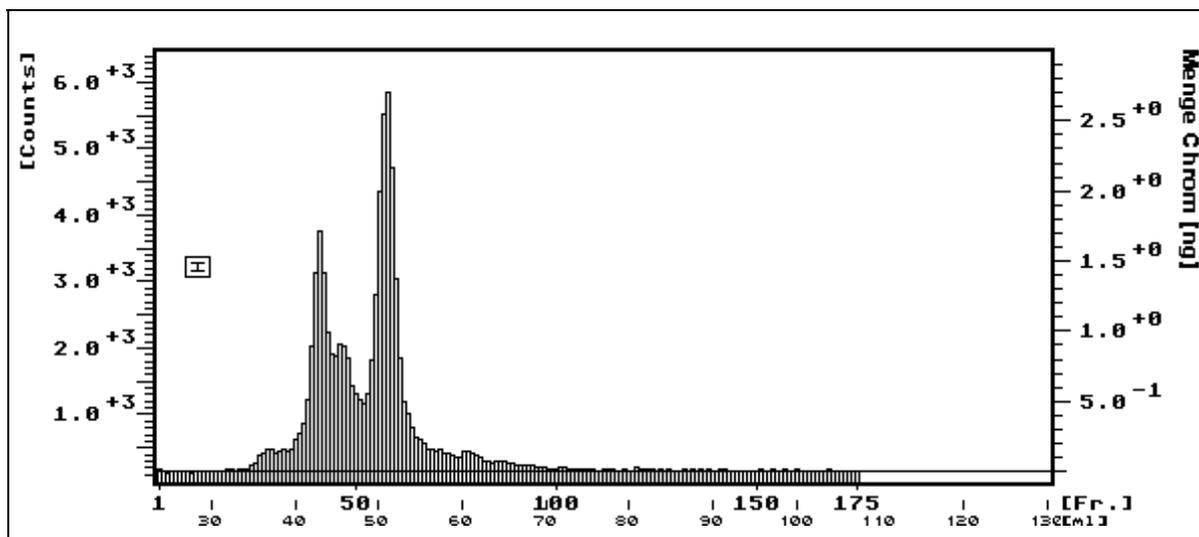


Abb. 21: Gelchromatogramm des Ultrafiltrats vom Hefe- Rohextrakt auf Toyopearl HW 40s (AII in Abb. 10)

Bedingungen: Säule Toyopearl HW 40s, 1cm*133cm; Eluent: 0,2 M KH₂PO₄, 0,5 mL/min.. Probe: 490µL; Fraktionsgröße: 0,5 mL.

Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler (σ) einer einzelnen Chrombestimmung aufgrund der Zählstatistik der Radioaktivität (Poisson- Statistik) in der Mitte der Ordinate.

Nach der Abtrennung der hochmolekularen Bestandteile der zytosolischen Matrix (> 10 kDa) durch Ultrafiltration befindet sich noch ein großer Anteil niedermolekularer Substanzen im Extrakt. Da diese Bestandteile, viele davon vermutlich ionisch, die Ionenaenchromatographie stören können, wurden diese Anteile durch Gelchromatographie auf einer größeren Säule (Dimensionen 2,5 cm · 50 cm) abgetrennt, sofern sie unter diesen Bedingungen nicht mit den Chromspezies koeluiieren. Unter Verwendung des bei Gefriertrocknung flüchtigen Puffers Ammoniumazetat werden die niedermolekularen Chromspezies als ein einziger Peak eluiert. Nach Gefriertrocknung zeigt das Gelchromatogramm des so weiter gereinigten Rohextrakts gegenüber AII (Abb. 10, Chromatogramm Abb. 21) nur geringe Veränderungen:

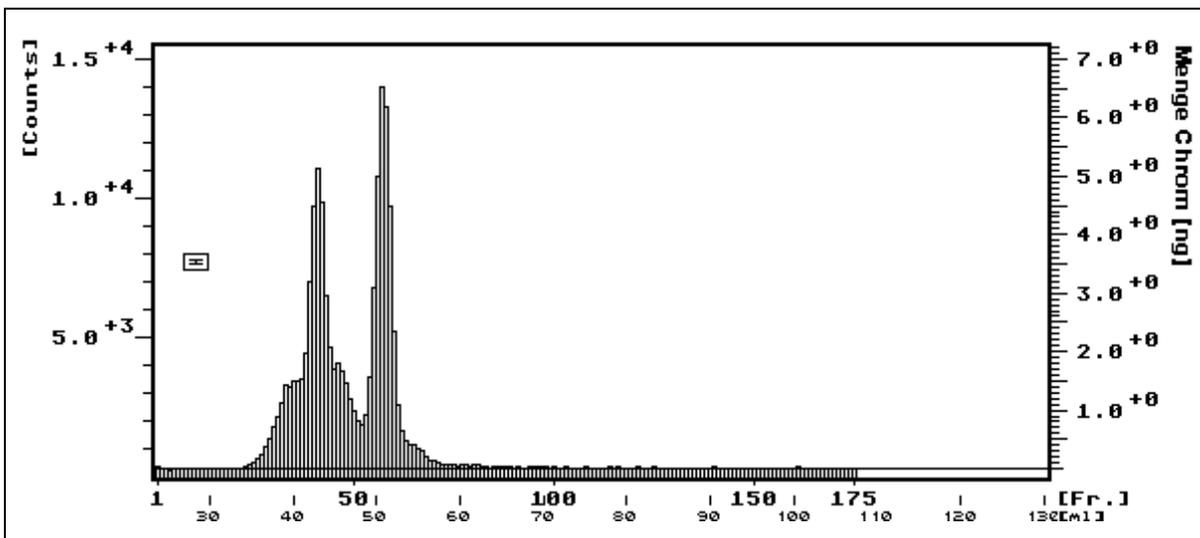


Abb. 22: Gelchromatogramm des über Gelchromatographie aufgereinigten Ultrafiltrats, (AIII in Abb. 10):

Bedingungen: Säule Toyopearl HW 40s, 1cm*133cm; Eluent: 0,2 M KH_2PO_4 , 0,5 mL/min..

Probe: 490 μL ; Fraktionsgröße: 0,5 mL.

Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler (σ) einer einzelnen Chrombestimmung aufgrund der Zählstatistik der Radioaktivität (Poisson- Statistik) in der Mitte der Ordinate.

Aus diesen Chromatogrammen wird deutlich, daß die Integrität des niedermolekular gebundenen Chrms die zweistufige Prozedur der Vorreinigung (Ultrafiltration und

Gelchromatographie in NH_4Ac nebst Gefriertrocknung) offensichtlich ohne größere Veränderungen übersteht.

3.2.2.5. Analyse des vorgereinigten Hefeextrakts mit Hilfe der Ionenpaarchromatographie

Die Gelchromatographie stellt ein verhältnismäßig wenig selektives Instrument zur Analyse von komplexen Stoffgemischen dar (Kapitel 2.3.6.1). Der Gelchromatographie weit überlegen ist die Chromatographie auf Umkehrphasen bzw. ihre Variante zur Trennung von Ionen, die Ionenpaarchromatographie (Kapitel 2.3.6.2).

Der vorgereinigte Extrakt AIII (Abb. 10) wurde mit Hilfe der Ionenpaarchromatographie weiter untersucht. Abb. 23 zeigt das Chromatogramm unter isokratischen Bedingungen mit einem Methanolanteil von 22,5% (v/v) im Eluenten:

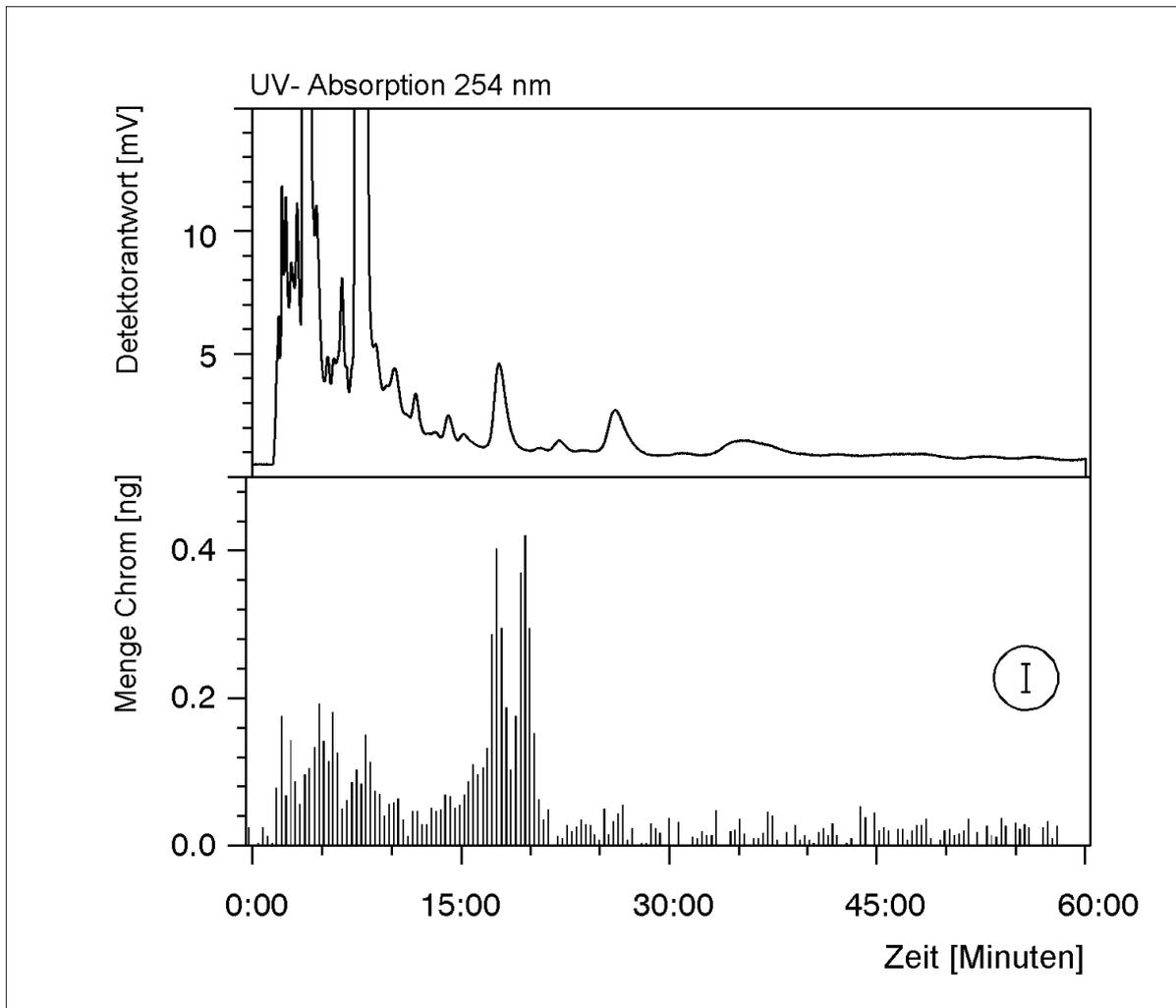


Abb. 23: Ionenpaarchromatographie des vorgereinigten Hefeextrakts AIII (s. Abb. 10).

Bedingungen: Säule Merck Lichrospher[®] RP-18, 3mm * 150mm + Vorsäule 3mm

Isokratische Elution: Probe: 20 μ L; Eluent A: 0,05 M NaH₂PO₄, 5mM TBAHS, pH 5,2; Eluent B: 0,05 M NaH₂PO₄, 5mM TBAHS, Methanol 50% (v/v), pH 5,2; Mischung von 55%A und 45% B; 0,5 mL/min.; ca. 165 μ L pro Fraktion.

Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler (σ) einer einzelnen Chrombestimmung aufgrund der Zählstatistik der Radioaktivität (Poisson- Statistik) in der Mitte der Ordinate.

Ein wesentlicher Anteil des Chroms (50%) wird in Form zweier gut separierter Peaks eluiert. Die Wiederfindungsrate des Chroms beträgt 85%. Eine bessere Trennung dieser Chromfraktionen von anderen Verunreinigungen, die sich als Signal des UV- Detektors zeigen, konnte durch Gradientenelution mit einem linearen Methanolgradienten von 0 bis 50% erreicht werden, wie in Abb. 24 gezeigt wird:

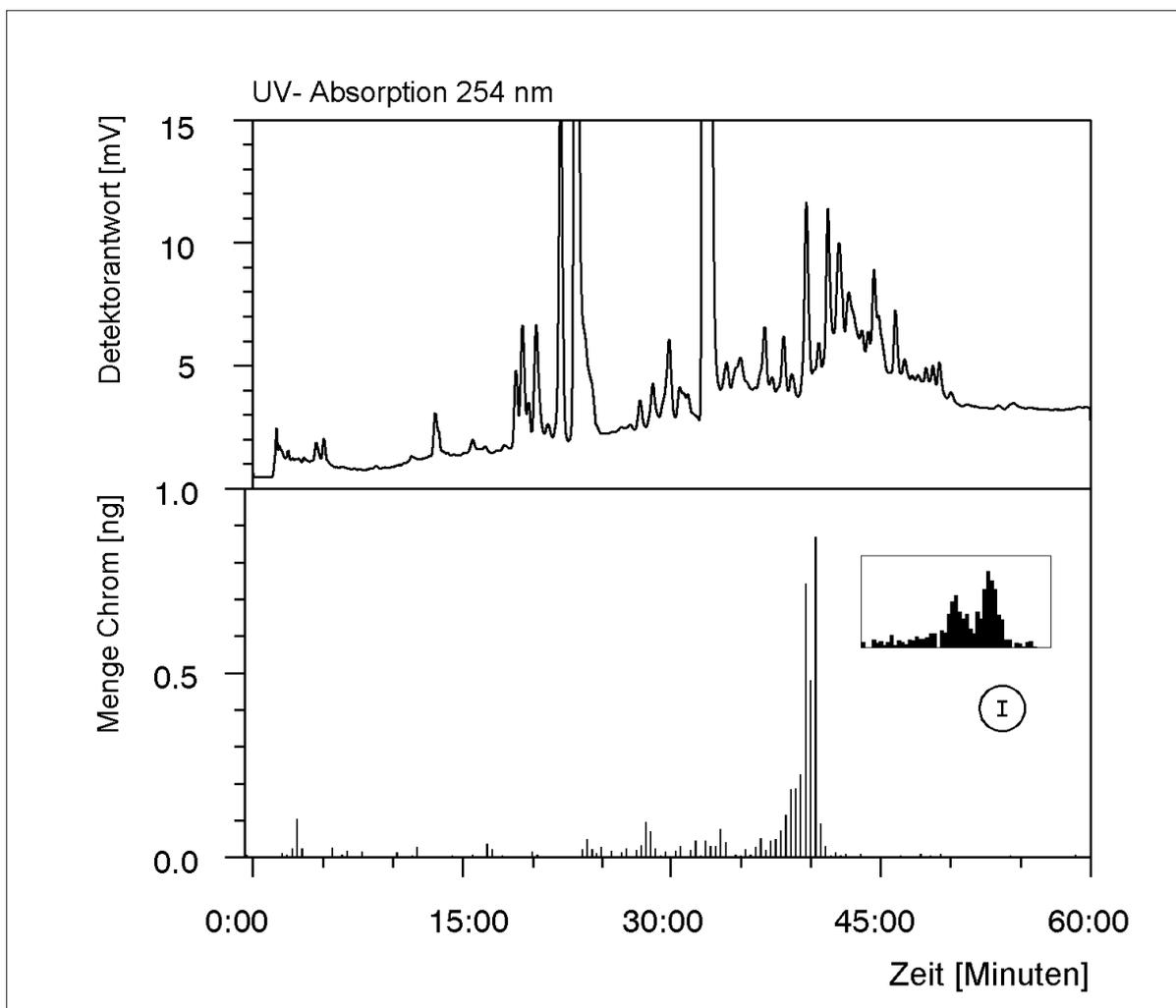


Abb. 24: Ionenpaarchromatographie des vorgereinigten Hefeextrakts AIII (s. Abb. 10)

Bedingungen: Säule Merck Lichrospher® RP-18, 3mm * 150mm + Vorsäule 3mm

Gradientenelution: Probe: 20 μ L; Eluent A: 0,05 M NaH₂PO₄, 5mM TBAHS, pH 5,2; Eluent B: 0,05 M NaH₂PO₄, 5mM TBAHS, Methanol 50% (v/v), pH 5,2; 0% A \rightarrow 100% B in 60 Minuten; 0,5 mL/min.; ca. 170 μ L pro Fraktion.

Einsatz: 2 Tropfen/Fraktion unter gleichen Bedingungen

Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler (σ) einer einzelnen Chrombestimmung aufgrund der Zählstatistik der Radioaktivität (Poisson- Statistik) in der Mitte der Ordinate.

Abb. 25 zeigt zum Vergleich unter identischen Bedingungen die Elution einer wäßrigen, gealterten Lösung von ⁵¹CrCl₃ mit dem Unterschied, daß zur Erhöhung der Auflösung zwei Tropfen pro Fraktion gesammelt wurden. Gezeigt sind nur die ersten ca.

5 mL des Chromatogrammlaufs mit dem Peak von $^{51}\text{Cr}(\text{III})$. Nach dieser Zeit konnte keine weitere, von der Säule eluierte Aktivität gemessen werden:

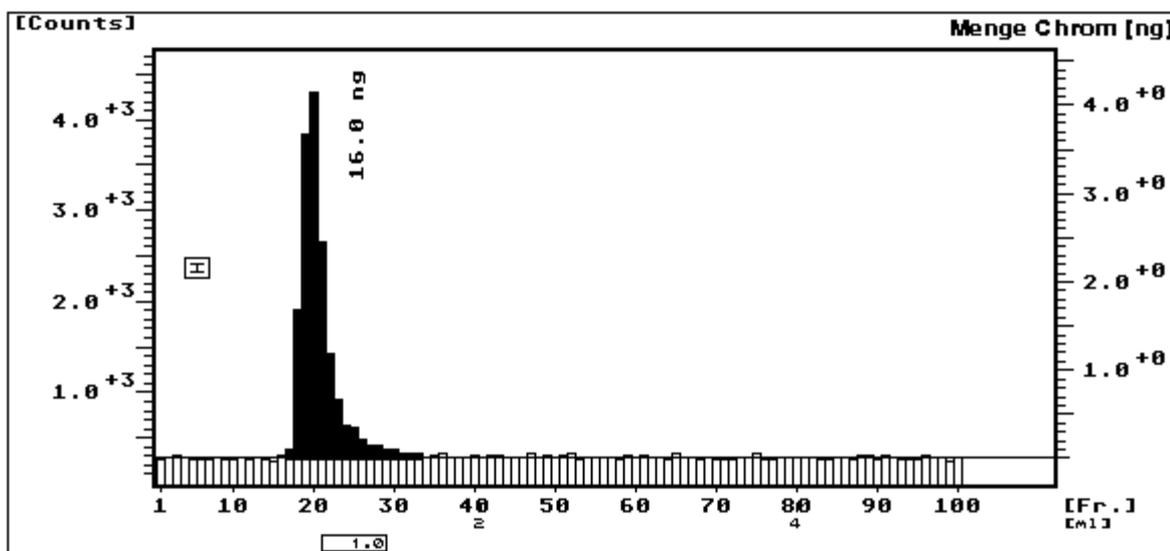


Abb. 25: Ionenpaarchromatographie von $^{51}\text{CrCl}_3$

Bedingungen: Säule Merck Lichrospher[®] RP-18, 3mm * 150mm + Vorsäule 3mm

Gradientenelution: Probe: 20 μL ; Eluent A: 0,05 M NaH_2PO_4 , 5mM TBAHS, pH 5,2; Eluent B: 0,05 M NaH_2PO_4 , 5mM TBAHS, Methanol 50% (v/v), pH 5,2; 0% A \rightarrow 100% B in 60 Minuten; 0,5 mL/min.; 2 Tropfen (ca. 50 μL) pro Fraktion.

Die im Peak eluierte Aktivität entspricht $(16,0 \pm 0,4)$ ng Chrom (Wiederfindung 80%, Fehlerangabe bezogen auf $1,96 \cdot \sigma$ (95 %- Konfidenzintervall)). Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler (σ) einer einzelnen Chrombestimmung aufgrund der Zählstatistik der Radioaktivität (Poisson- Statistik) in der Mitte der Ordinate.

Die Wiederfindungsrate in diesem Fall (Elution von CrCl_3 unter Verwendung des kationischen Ionenpaarreagenzes TBAHS bei pH 5,2) betrug 80%.

Bei der Gradientenelution des Hefeextrakts (Abb. 24) betrug die Wiederfindungsrate hinsichtlich des injizierten Gesamtchroms lediglich 43%. Die Ursache ist wahrscheinlich in einer teilweisen Zersetzung einer der chromhaltigen Substanzen während der Chromatographie zu suchen, wie es sich im Chromatogramm durch geringe Mengen verschleppter Aktivität andeutet. Sofern bei der Sammlung der Fraktionen mit hinreichend hoher Auflösung gearbeitet wird, sind auch bei der Gradientenelution die annähernd basisliniengetrenten Chrompeaks zu erkennen.

Die sich bei der Gelchromatographie zeigenden zwei Peaks mit zusätzlich angedeuteten Schultern, die auf weitere Spezies hindeuten (Abb. 22), ergaben also bei der Ionenpaarchromatographie zwei scharfe, gut voneinander getrennte Doppelpeaks (Abb. 24). Allerdings repräsentieren diese Peaks lediglich etwa 40-50% des insgesamt auf die Säule gegebenen Chrms. Die restliche Menge verteilte sich diffus über die gesammelten Fraktionen. Es stellt sich also die Frage, ob diese Anteile des Chrms weiteren Spezies zuzuordnen sind oder Zerfallsprodukte der beiden deutlich detektierten Spezies darstellen.

3.2.2.6. Überprüfung der Fraktionierung durch Reinjektionsversuche

Um zu zeigen, daß die beiden Chrompeaks der Ionenpaarchromatographie keine während der Chromatographie gebildeten Artefakte darstellen und um der Frage nach Herkunft der Chromverluste nachzugehen, wurden die beiden Chrompeaks der Ionenpaarchromatographie durch Mehrfachinjektion jeweils kleiner Proben (insgesamt 65 Injektionen von je 20 µL) durch ein mit einem Stufengradienten zeitoptimiertes Verfahren isoliert und die vereinigten Fraktionen (AIV in Abb. 10) nach Gefriertrocknung mit der Gelchromatographie untersucht. Wie Abb. 26 zeigt, wird hierbei, unter identischen Bedingungen der Chromatographie, ein in wesentlichen Zügen der Fraktion AIII (Abb. 22) entsprechendes Elutionsmuster erzeugt:

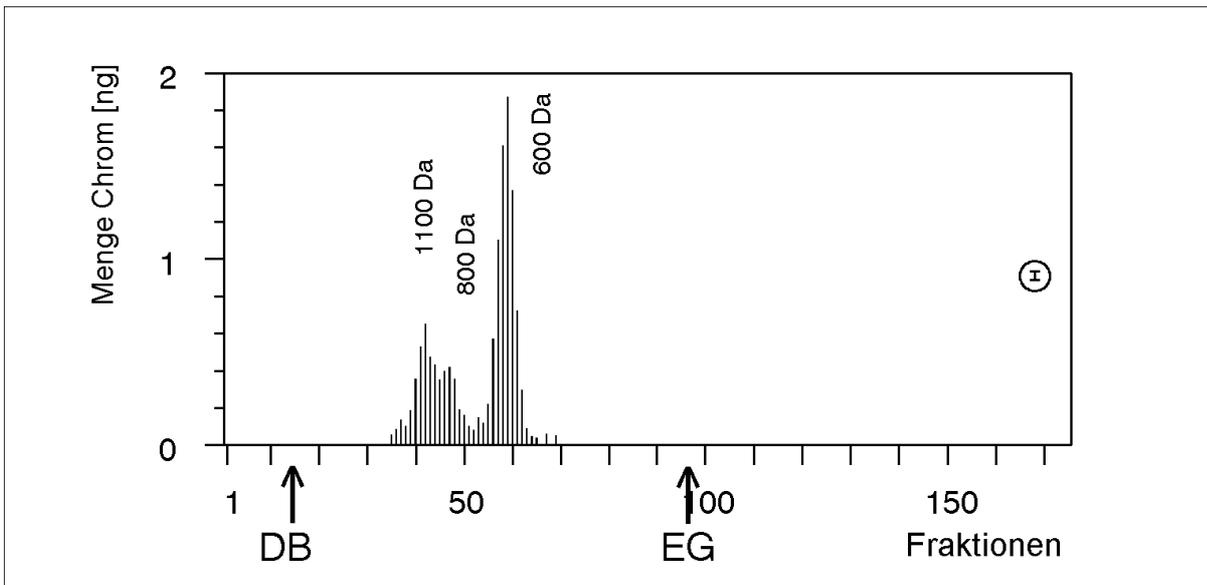


Abb. 26: Gelchromatogramm des über Ionenaarchromatographie aufgereinigten Extrakts (AIV in Abb. 10):
 Bedingungen: Säule Toyopearl HW 40s, 1cm*133cm; Eluent: 0,2 M KH_2PO_4 , 0,5 mL/min..
 Probe: 490 μL ; Fraktionsgröße: 0,5 mL. Nur die relevanten chromhaltigen Fraktionen wurden vermessen und dargestellt.
 Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler (σ) einer einzelnen Chrombestimmung aufgrund der Zählstatistik der Radioaktivität (Poisson- Statistik) in der Mitte der Ordinate

Die beiden, gemeinsam geschnittenen Peaks der Ionenaarchromatographie repräsentieren hierbei den vollen Satz von drei, nur teilweise aufgelösten Peaks der Gelchromatographie. Dabei zeigt sich allerdings die im Peak bei 1100 Da befindliche Chrommenge im Verhältnis deutlich vermindert. Dies deutet darauf hin, daß die Verluste an Chrom, die während der Ionenaarchromatographie auftreten, im wesentlichen auf einen teilweisen Zerfall der Spezies bei 1100 Da zurückzuführen sein dürften.

Ein Widerspruch besteht zwischen den Ergebnissen der Ionenaarchromatographie und der Gelchromatographie, da erstere zwei Peaks zeigt, und letztere mindestens drei Peaks zumindest vermuten läßt. Es ist allerdings eher unwahrscheinlich, daß die sehr leistungsfähige Ionenaarchromatographie mindestens einen Peak vollständig nicht auflöst. So muß angenommen werden, daß die Anzahl der niedermolekularen Chromspezies, wie sie beispielsweise durch die Chromatogramme in Abb. 21 (AII) und Abb. 26 (AIV) nahegelegt werden, auf Artefakten beruhen und tatsächlich eher durch die

beiden Peaks der Ionenpaarchromatographie (Abb. 23 und Abb. 24 (AIII)) repräsentiert wird.

3.2.2.7. Quantitative Aspekte der Aufarbeitung gemäß Schema in Abb. 10

Von den dem Nährmedium zugegebenen 5000 μg Chrom(III) wurden lediglich 19,6 μg insgesamt in die Hefezellen aufgenommen. Davon konnten 13 μg tatsächlich in Form des Hefeextraks gewonnen werden (AI in Abb. 10). Von diesen 13 μg Chrom entfallen ca. 50% auf den hochmolekularen Anteil (40 kDa- Fraktion), so daß aus 40 g Hefe (Feuchtgewicht) von vornherein lediglich 6,5 μg niedermolekulare Chromverbindungen zu gewinnen waren. Tatsächlich wurde aber nicht die gesamte zur Verfügung stehende Menge weiterverarbeitet, so daß einschließlich der Verluste während der Ultrafiltration letztendlich noch 4,5 μg Chrom der niedermolekularen Fraktion gewonnen werden konnten. Davon wurden 60% dem nächsten Schritt, der Aufreinigung durch Gelchromatographie, zugeführt. Hierbei betrug die Wiederfindungsrate 71%, so daß als Gesamtmenge nach Gefriertrocknung (mit geringen weiteren Verlusten) noch 1,9 μg Chrom in insgesamt 55 mg Trockensubstanz resultierten. Dies entspricht gegenüber der ursprünglichen Konzentration der niedermolekularen Chromanteile in der Hefe, bezogen auf das Hefe- Trockengewicht (6,5 μg Chrom auf 11,2 g Hefe), einer Aufreinigung um den Faktor 60. Diese Menge wurde in insgesamt 5 mL Wasser aufgenommen, so daß für eine einzelne Injektion für die Ionenpaarchromatographie (20 μL) weniger als 8 ng Chrom zur Verfügung standen, was bei der ursprünglich eingesetzten spezifischen Aktivität von 370 MBq/5 mg Chrom zum Zeitpunkt des Ansatzes der Kultur einer Aktivität von weniger als 600 Bq entspricht. Da die Hefekultur selber und die anschließende Aufarbeitung bis zu vier Wochen dauern kann, war die durch den radioaktiven Zerfall des Chroms nach dieser Zeit vorliegende Menge Radioaktivität (bei einer Halbwertszeit von ^{51}Cr von 27,7 Tagen) tatsächlich um ca. 50% niedriger. Die dann noch vorhandene Aktivität kleiner 300 Bq erwies sich jedoch als ausreichend zur Verfolgung der Chromatogramme und Quantifizierung der jeweiligen Chrommengen, sofern die Fraktionen einzeln gesammelt und vermessen wurden. Hierbei waren regelmäßig Meßzeiten von mindestens 10 Minuten pro Fraktion notwendig.

3.2.2.8. Weitere Untersuchungen mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden

Um weitere Informationen über die Natur der extrahierten Chrom(III)- Komplexe zu gewinnen, wurde die aufgereinigte Fraktion AIV (Abb. 10) erneut mit Hilfe von Gelchromatographie unter Verwendung des flüchtigen Puffers Ammoniumazetat entsalzt, gefriergetrocknet und der (mit bloßem Auge nicht sichtbare) Rückstand in 700 μL Wasser aufgenommen. Der Chromgehalt (auf Basis des Tracers ^{51}Cr) dieser Probe betrug 39 $\text{pg Cr}/\mu\text{L}$ (entsprechend 0,7 $\text{pMol Chrom}/\mu\text{L}$). Diese Probe wurde mit Plasmadesorptions- Massenspektrometrie (PD-MS) und Elektrospray- MS direkt untersucht. Für die Durchführung der Matrix- unterstützten Laserdesorptions/Ionisations- Flugzeitmassenspektrometrie (MALDI-TOF- MS) und für weitere Untersuchungen mit Hilfe der Elektrospray- Massenspektrometrie im negativen Modus wurde ein Teil dieser Probe (200 μL) in einem Vakuumkonzentrator zur Trockne eingedampft und anschließend in 10 μL Wasser aufgenommen, so daß eine Chromkonzentration von ca. 800 $\text{pg}/\mu\text{L}$ resultierte. Da die fragliche(n) Substanz(en) deutlich anionischen Charakter aufwies(en) (wie durch die Ionenpaarchromatographie bewiesen werden konnte), sollten mit den angewandten, wenig fraktionierenden MS- Methoden eindeutige Ergebnisse vor allem beim Nachweis negativer Ionen erzielt werden können. Abb. 27 zeigt das Plasmadesorptions- Massenspektrum der entsalzten Fraktion AV für positive Ionen:

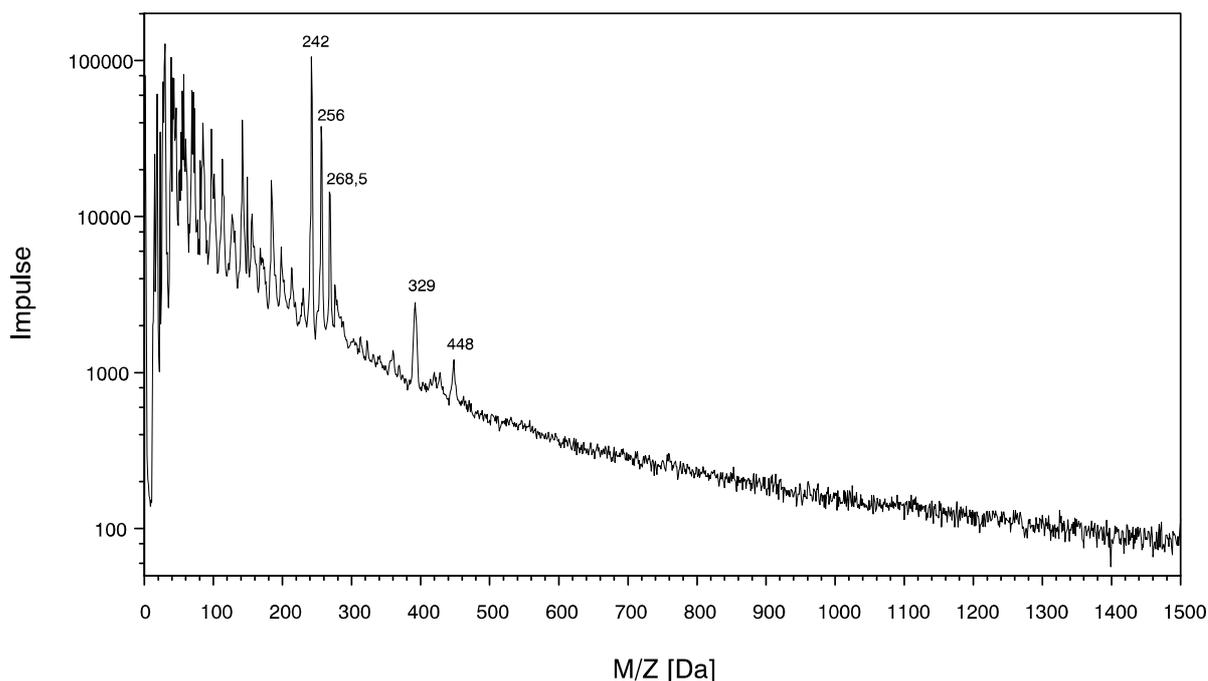


Abb. 27: PD-MS- Spektrum von Fraktion AV auf Nitrozellulose- Träger (positive Ionen).
Eigenbau- Gerät der Arbeitsgruppe Jungclas (Marburg) [275].

Im PD-MS- Spektrum sind entgegen den Erwartungen keine Signale im Massenbereich oberhalb von 443 Da zu beobachten. Zahlreiche Peaks im unteren Massenbereich entstammen z.T. der Trägermembran oder lassen sich ohne weitere Informationen nicht bestimmten Strukturen zuordnen.

Abb. 28 zeigt das MALDI-TOF- Spektrum von Fraktion AV mit der Matrix Dihydroxybenzoesäure (DHB) für positive Ionen:

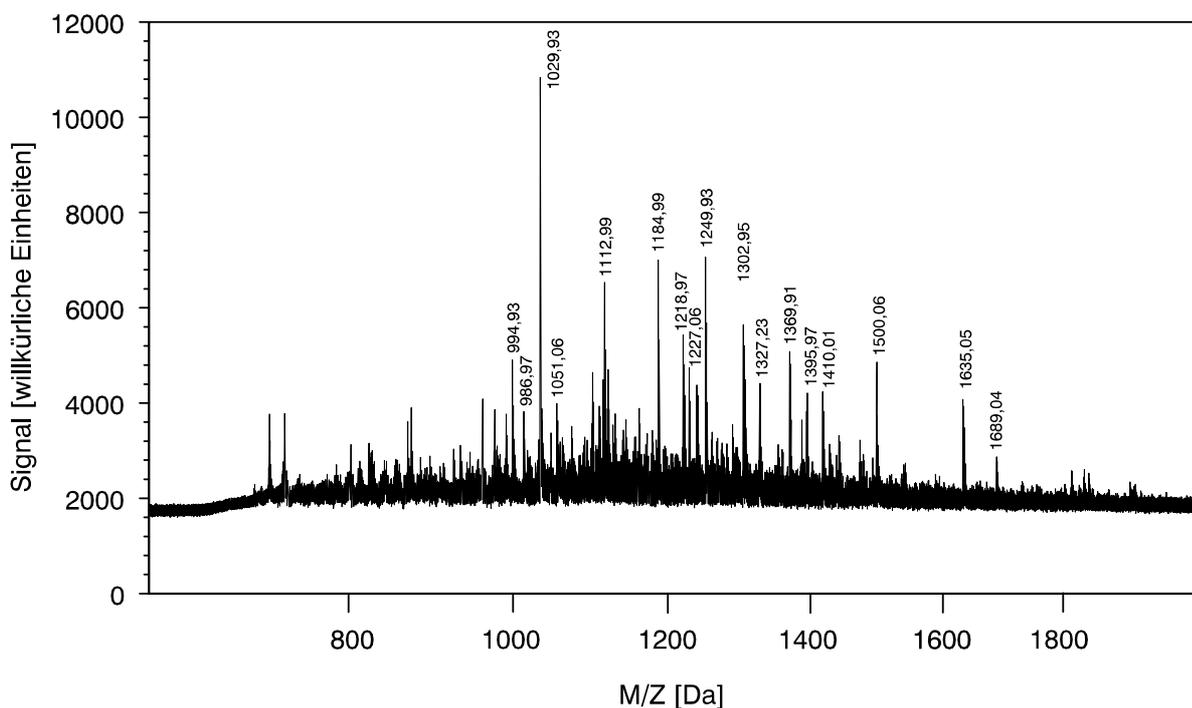


Abb. 28: MALDI-TOF- Spektrum von Fraktion AV mit Di-hydroxybenzoesäure (DHB, Molgewicht 154,03 Da) als Matrix (Reflektor- Modus, 14 Schüsse, positive Ionen).
Gerät: Bruker Reflex mit Modifikationen (Arbeitsgruppe Mann, EMBL (Heidelberg)).

Im interessierenden Massenbereich zwischen 600 und 2000 Da treten zahlreiche Peaks auf, die nicht direkt auf Matrixeinflüsse zurückzuführen sind (das vergleichbare Massenspektrum von Di-hydroxybenzoesäure zeigt im gezeigten Massenbereich keine Peaks). Im Falle kovalent gebundener Moleküle treten bei der MALDI-MS hauptsächlich einfach ionisierte, nicht fragmentierte Molekülionen in Erscheinung. Die Fragmentierungsmuster von Komplexverbindungen hingegen sind bisher noch nicht untersucht worden. Das Auflösungsvermögen des Geräts reichte nicht aus, um über das charakteristische Muster der Isotopenverteilung von Chrom mit seinen vier natürlich vorkommenden Isotopen auf einen eventuellen Chromgehalt der einzelnen Peaks schließen zu können. Ohne weitergehende Kenntnisse über das Verhalten von Komplexverbindungen unter den Ionisierungsbedingungen der MALDI-MS ist dieses Massenspektrum nicht interpretierbar.

Die verwendete Matrix Dihydroxybenzoesäure („DHB“) ergab im Vergleich mit den anderen getesteten Matrices Trans-3,5-dimethoxy-4-hydroxymzimtsäure („Sinapinic

acid“), α -cyano-4-Hydroxycimtsäure („Cyano“) und 2,4,5 Trihydroxyacetophenon („THAP“) das übersichtlichste Massenspektrum. Die Betriebsart zum Nachweis negativer Ionen war zur Zeit der Untersuchungen nicht verfügbar.

Abb. 29 zeigt das Elektrospray- Massenspektrum von Fraktion AV im positiven Modus (Nachweis positiver Ionen):

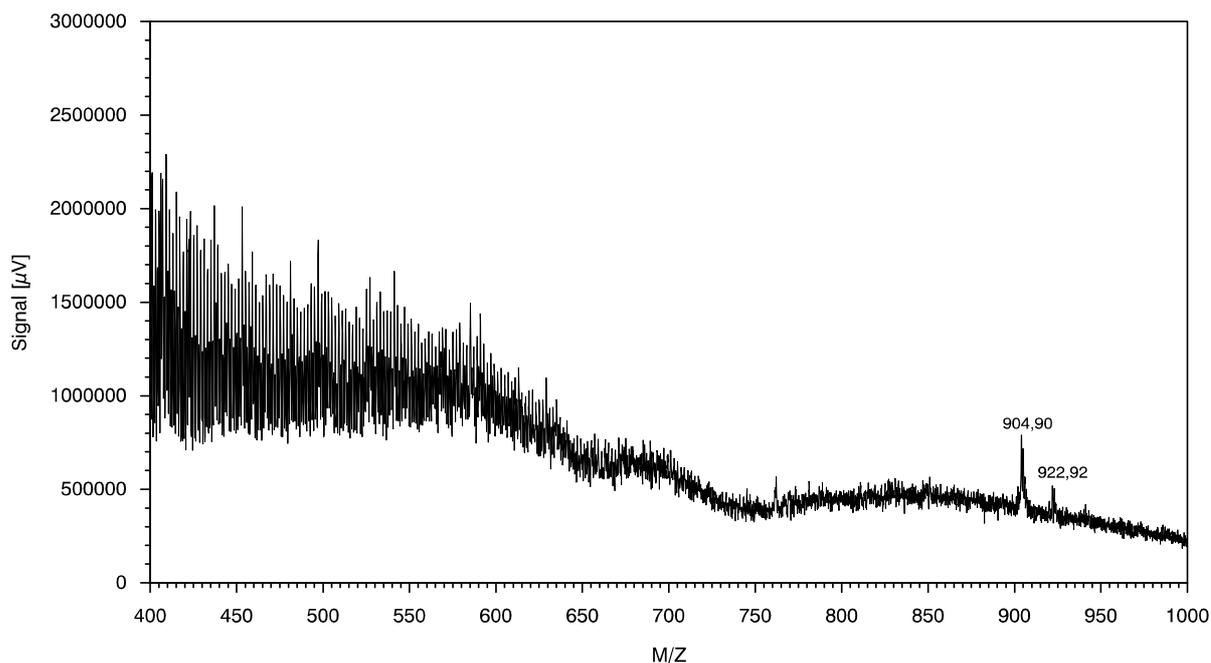


Abb. 29: Elektrospray- Massenspektrum von Fraktion AV (Q1- Scan, positive Ionen).

Gerät: Perkin-Elmer Sciex API III mit Nano- Quelle [267] und weiteren Modifikationen [276] (Arbeitsgruppe Mann, EMBL (Heidelberg)).

Neben einem stark verrauschten unteren Massenbereich, der wahrscheinlich von einer diskontinuierlichen Förderung der Probenlösung herrührt, sind bei 905 und 923 Da zwei Peaks zu beobachten. Damit liegen diese Peaks in dem bereits mittels Gelchromatographie für diese Probe bestimmten Bereich zwischen 600 und 1100 Da. Die Differenz zwischen beiden Peaks von 18 Da deutet auf einen Verlust eines Wassermoleküls des Peaks bei 923 Da hin, wie es bei Elektrospray- Massenspektren häufig zu beobachten ist.

Von dieser Probe konnte zusätzlich ein „Parent- Ion- Scan“ der Masse 52 (häufigstes Chrom- Isotop) durchgeführt werden. Hiermit lassen sich selbst aus stark verrauschten Spektren noch sinnvolle Informationen gewinnen. Das Ergebnis zeigt Abb. 30:

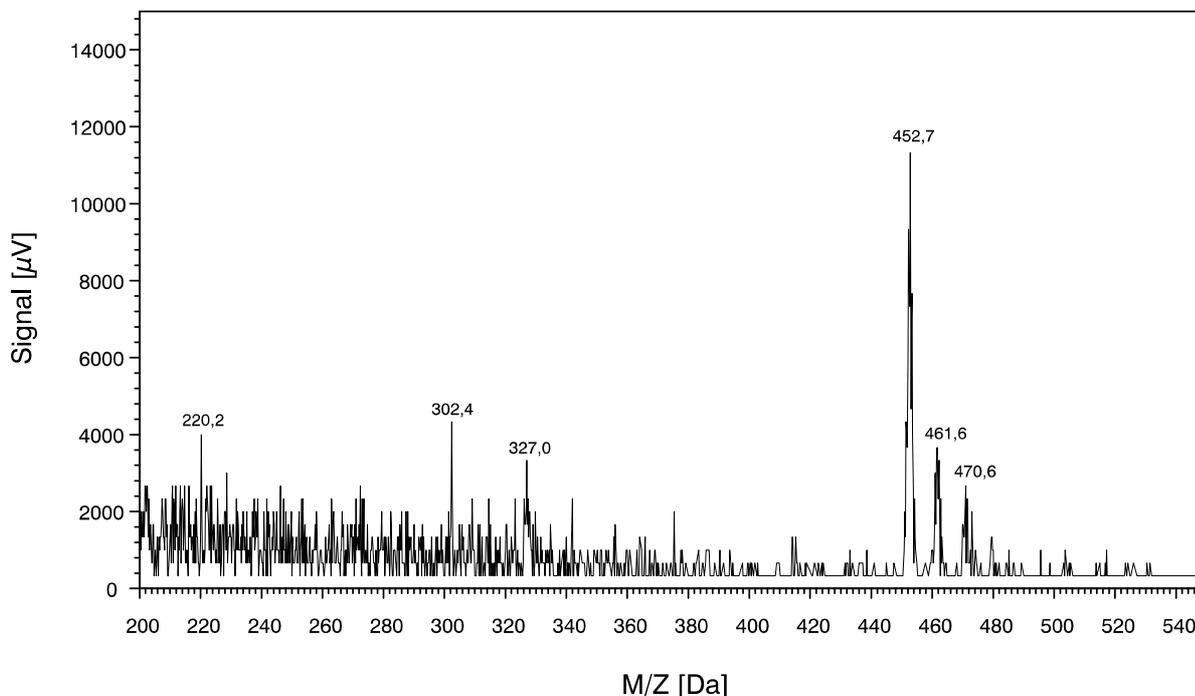


Abb. 30: Elektrospray- Massenspektrum von Fraktion AV (Elternionen von $M/Z = 52$, positive Ionen).
Gerät: s.o.

Obwohl der Elternionenscan der Masse von Chrom (52) nahelegt, daß die Spezies bei M/Z 452,7 mindestens ein Chromatom enthält, ist dieses Ergebnis noch nicht beweiskräftig. Leider reichte das Auflösungsvermögen des Quadrupol- Massenspektrometers nicht aus, um aus der genauen Isotopenverteilung auf die Gegenwart von Chrom schließen zu können. Es scheint, als ob das Signal bei M/Z 452,7 eine doppelt protonierte Spezies von M/Z 904,9 (Abb. 29) darstellt. Sofern also das Signal bei M/Z 452,7 Chrom enthält, ist M/Z 904,9 ebenfalls chromhaltig. Die Masse bei M/Z 922,9 (Abb. 29) entspricht wahrscheinlich M/Z 904,9 + 1 H_2O . Damit ist ebenfalls klar, daß die Ladung dieser Spezies +1 beträgt. Wie aus Abb. 30 hervorgeht, existiert offensichtlich auch noch eine Spezies mit zwei angelagerten Wassermolekülen. Es muß aber betont werden, daß es sich hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit nicht um die Abspaltung von Wasser aus dem Molekülion handelt, sondern um an das Molekülion angelagertes

Wasser, das unter den Bedingungen im Massenanalysator, ggf. durch Stoßprozesse wieder abgegeben wird.

Abb. 31 zeigt das Elektrospray- Massenspektrum der Fraktion AV im negativen Modus (Nachweis negativer Ionen) Die Probe ist gegenüber der für die Massenspektren in den Abb. 29 und Abb. 30 verwendeten Probe im Vakuumkonzentrator um den Faktor 20 aufkonzentriert worden:

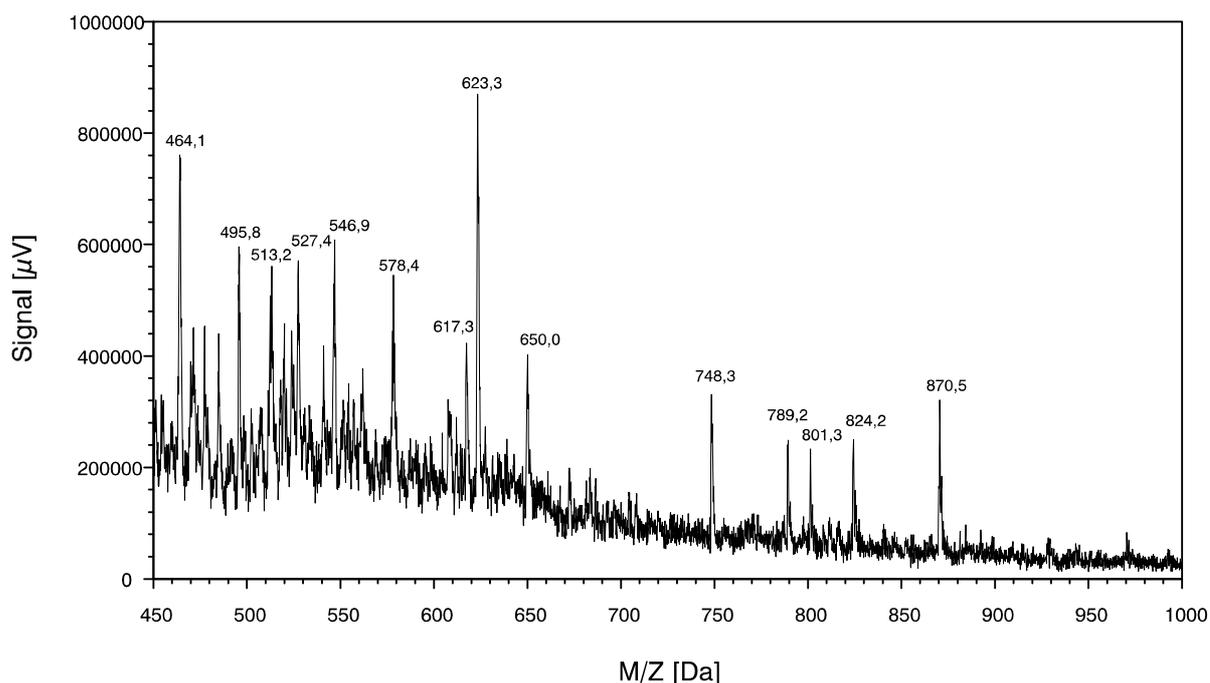


Abb. 31: Elektrospray- Massenspektrum von Fraktion AV (Q1- Scan, negative Ionen).
Gerät: s.o.

Interessant sind hier die fünf einzeln auftretenden Peaks oberhalb von 700 Da. Anhand der auftretenden Massendifferenz von lediglich 12 Da zwischen dem Peak bei 789,2 und dem bei 801,3 Da ist zu schließen, daß es sich hierbei wahrscheinlich um mindestens zwei verschiedene Substanzen handelt. Die Beziehungen zwischen den fünf Peaks sind ohne weitere Informationen nicht aufzuklären. Rein rechnerisch könnte der Peak bei 870,5 Da durch Verlust eines Chromatoms aus dem Peak bei 922,92 Da in Abb. 29 entstanden sein. Da hierbei ebenfalls die Ladung des Moleküls negativ werden muß, könnte dies das vollständige Fehlen dieser Peaks im positiven Modus erklären. Auch in diesem Fall könnte erst durch den Einsatz eines Geräts mit hoher Mas-

senauflösung ein eventueller Chromgehalt der entsprechenden Ionen bewiesen bzw. widerlegt werden. Der Bezug des ESI- Massenspektrums im negativen Modus zu dem im positiven Modus ist darüber hinaus unklar. Der Modus zum Nachweis negativer Ionen erwies sich zum Zeitpunkt der Messungen als wenig stabil, so daß weitergehende MS-MS- Untersuchungen nicht verwirklicht werden konnten.

Insgesamt ließen sich durch die Anwendung der verschiedenen massenspektrometrischen Methoden keine weiteren Informationen zu den in der Probe vorliegenden Chrom(III)komplexen gewinnen. Vor allem die MALDI- TOF war offensichtlich hinreichend empfindlich, um auch bei Nachweis positiver Ionen sinnvolle Massenspektren zu zeigen. Das überraschend komplexe Spektrum konnte allerdings nicht interpretiert werden, da die Fragmentationsmuster der ursprünglich anionischen Moleküle in Zusammenwirken mit der Matrix nicht bekannt sind. Hinsichtlich der MALDI-TOF- Massenspektrometrie von Übergangsmetall- Komplexionen existieren in der Literatur nur wenige Beispiele [261][277].

Aufgrund der anionischen Natur der in der Probe befindlichen Chromkomplexe sollten vor allem im Anionen- Modus relevante Massenspektren zu beobachten sein. Dies gilt vor allem für die Elektrospray- MS, da die Probe hier direkt aus der Lösung in die Gasphase überführt wird. Die Betriebsarten zum Nachweis negativer Ionen lieferten zum Zeitpunkt der Untersuchungen (Juni 1996 - Februar 1997) allerdings entweder keine brauchbaren Massenspektren (PD-MS), waren nicht verfügbar (MALDI-TOF-MS) oder erwiesen sich als technisch problematisch und instabil (ESI- MS). Ohne zusätzliche Informationen über die Natur und Reinheit der vorliegenden Probe sind die gezeigten Massenspektren daher auch in ihrer Summe kaum interpretierbar.

3.2.3. Versuche zur Fraktionierung niedermolekularer Chromverbindungen aus dem Nährmedium der Hefekultur

Es ist allgemein bekannt, daß von Mikroorganismen bestimmte Substanzen ihres Stoffwechsels in das umgebende Kulturmedium abgegeben werden. Es ist daher denkbar, daß von der Hefe gebildete Chromkomplexe in das Kulturmedium abgegeben

werden oder sich stabile Chromkomplexe aus Substanzen bilden, die von der Hefe in das Kulturmedium ausgeschieden werden. Sofern diesen Chromkomplexen eine physiologische Wirkung zukäme, könnte dieser Vorgang beispielsweise für das Brauwesen Bedeutung haben.

Das verbrauchte Kulturmedium, das nach Abtrennen der Hefe noch mindestens 95% des Gesamtchroms enthält, wurde daher zunächst mit den bereits zur Fraktionierung von Chromkomplexen im Zytosol angewandten Methoden untersucht. Die Ergebnisse können direkt miteinander verglichen werden. Die Versuche zur Analyse des verbrauchten Nährmediums sind schematisch in Abb. 10 (Kapitel 3.2.2.1) gezeigt. Die Größenausschlußchromatographie ermöglicht es, die Molekülmassen der vorliegenden Komplexe abzuschätzen und gleichzeitig eine Übersicht über die vorhandenen Fraktionen zu gewinnen. Die Ionenpaarchromatographie als Methode mit sehr hoher Trennleistung sollte in der Lage sein, Chromkomplexe auch aus sehr komplexen Mischungen voneinander zu trennen. Um darüber hinaus zu einer näheren Charakterisierung des Chroms im Nährmedium zu gelangen, ist die Gewinnung der entsprechenden Chromkomplexe in größeren Mengen bis hinauf zu einem Milligramm notwendig. Dazu ist eine Konzentration des in relativ großer Verdünnung (ca. 1 mg/L) vorliegenden Gesamtchroms notwendig. Als schonendes Verfahren wurde hierfür die Gefriertrocknung eingesetzt.

3.2.3.1. Charakterisierung mit Hilfe von Größenausschluß- und Ionenpaarchromatographie

Das filtrierte Kulturmedium wurde zunächst direkt ohne weitere Vorbehandlung mit Hilfe von Größenausschlußchromatographie und Ionenpaarchromatographie untersucht. Abb. 32 zeigt das Gelchromatogramm des Kulturmediums:

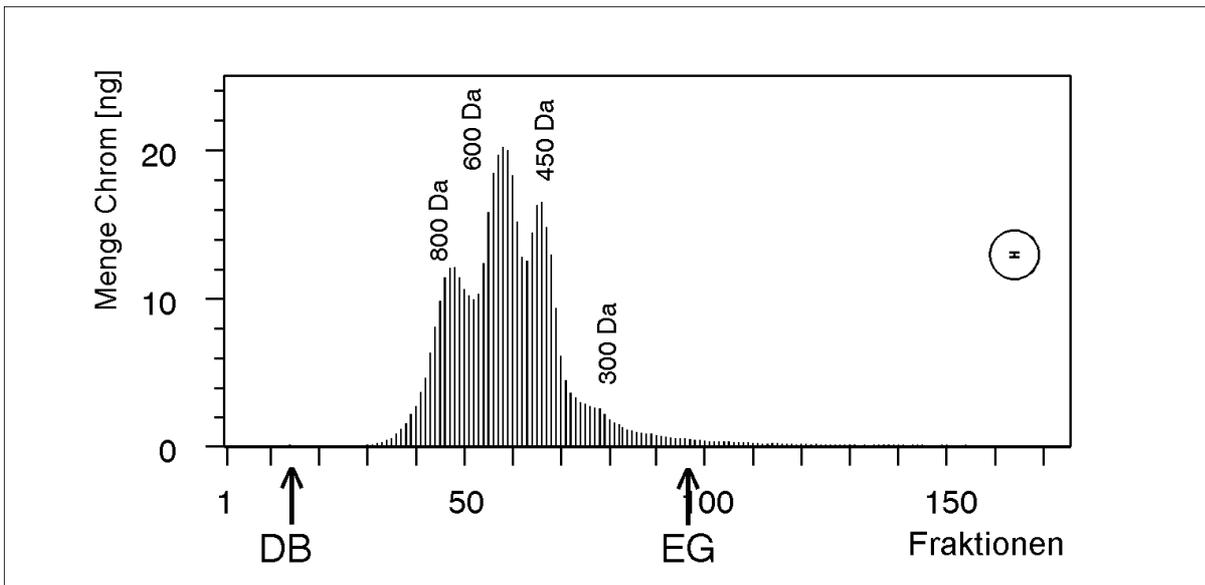


Abb. 32: Gelchromatogramm des verbrauchten, ^{51}Cr -haltigen Nährmediums (Direktinjektion von BI (s. Abb. 10)).

Bedingungen: Säule Toyopearl HW 40s, 1cm*133cm; Eluent: 0,2 M KH_2PO_4 , 0,5 mL/min.. Probe: 490 μL ; Fraktionsgröße: 0,5 mL. DB und EG markieren das Elutionsvolumen von Dextran-Blau (V_0) bzw. Ethylenglykol (V_t).

Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler (σ) einer einzelnen Chrombestimmung aufgrund der Zählstatistik der Radioaktivität (Poisson- Statistik) in der Mitte der Ordinate.

Die Zuordnung der Elutionsvolumina zu den einzelnen Molekülmassen wurde analog zu Kapitel 3.2.2.3.2 durch Vergleich mit einer Kalibrierkurve aus Polyethylenglykolstandards vorgenommen. Die zur Berechnung von K_d notwendige Kenngröße V_0 (Gleichung (11) aus Kapitel 2.3.6.1.1) konnte ebenfalls aus den Chromatogrammen (UV- Absorption) selbst entnommen werden, da auch im Nährmedium noch Spuren von hochmolekularen, zusammen mit dem Totvolumen eluierenden Bestandteilen gegenwärtig waren. Aufgrund der großen, der Methode innewohnenden Ungenauigkeit wurden die Angaben für die Molekulargewichte auf volle 100 Da gerundet. Bei einem angenommenen Fehler von $\pm 500 \mu\text{L}$ bei der Bestimmung des Elutionsvolumens (entsprechend ± 1 Minute oder ± 1 Fraktion), ergaben sich folgende Bereiche für das resultierende Molekulargewicht:

- Fraktion 800 Da : 776 Da - 851 Da (mittlerer Wert: 812 Da)
- Fraktion 600 Da : 550 - 603 Da (mittlerer Wert: 575 Da)
- Fraktion 450 Da : 427 - 457 Da (mittlerer Wert: 437 Da)
- Fraktion 300 Da : 257 - 282 Da (mittlerer Wert: 269 Da)

Die im Kulturmedium vorhandene Chrommenge verteilte sich - bei nahezu quantitativer Wiederfindung - über einen Bereich von 300 bis 800 Da. Damit ist das Chrom im Kulturmedium im allgemeinen an Moleküle mit etwas geringerer Molekülmasse gebunden als das niedermolekular gebundene Chrom im Zytosol der Hefe (Abb. 13).

Das Ionenpaarchromatogramm des Kulturmediums zeigt Abb. 33:

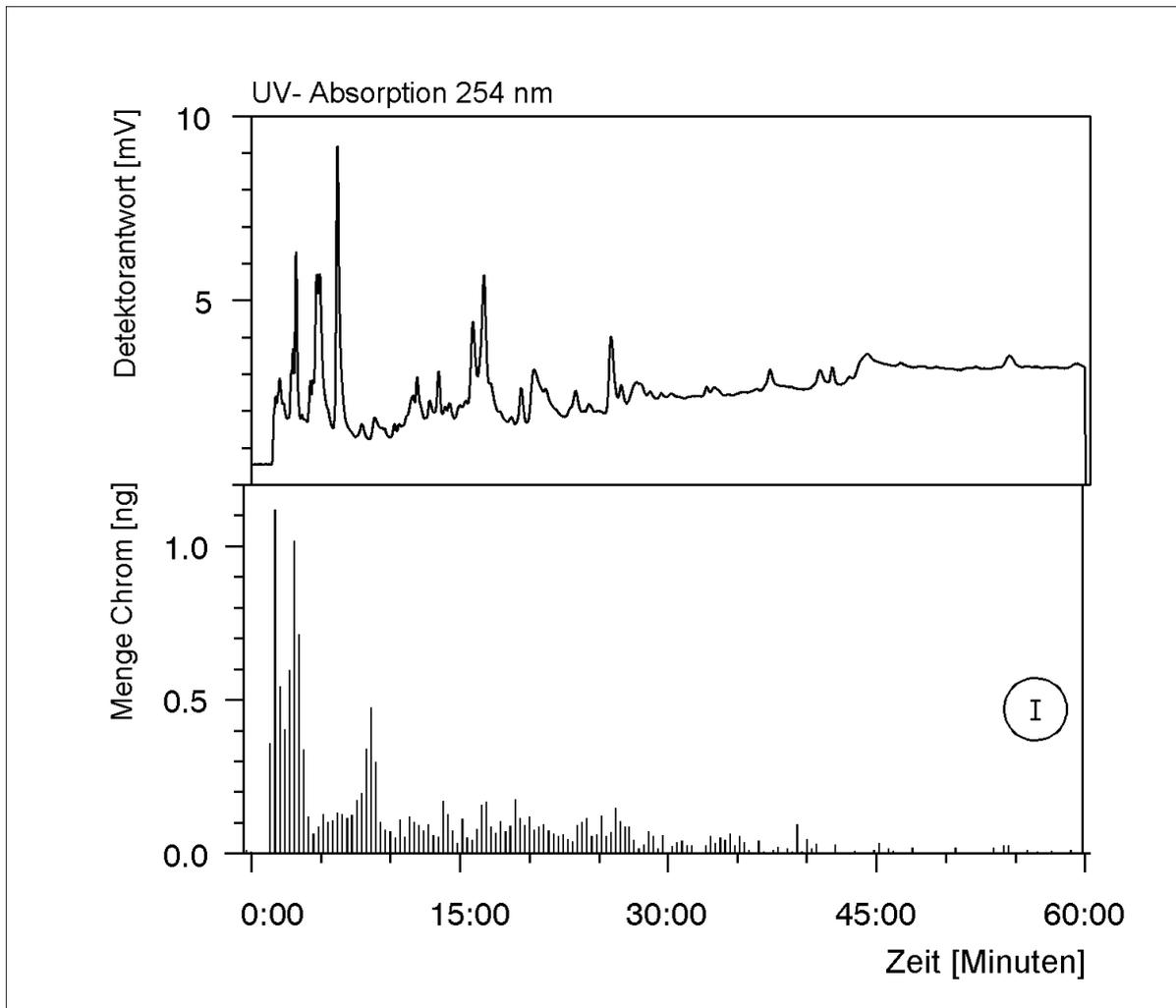


Abb. 33: Ionenpaarchromatographie des verbrauchten, ^{51}Cr -haltigen Nährmediums (Direktinjektion von BI (s. Abb. 10)).

Bedingungen: Säule Merck Lichrospher[®] RP-18, 3mm * 150mm + Vorsäule 3mm

Gradientenelution: Probe: 20 μL ; Eluent A: 0,05 M NaH_2PO_4 , 5mM TBAHS, pH 5,2; Eluent B: 0,05 M NaH_2PO_4 , 5mM TBAHS, Methanol 50% (v/v), pH 5,2; 0% A \rightarrow 100% B in 60 Minuten; 0,5 mL/min.; ca. 165 μL pro Fraktion.

Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler (σ) einer einzelnen Chrombestimmung aufgrund der Zählstatistik der Radioaktivität (Poisson- Statistik) in der Mitte der Ordinate.

Hier sind die Unterschiede zum unter gleichen Bedingungen chromatographierten He-feextrakt (Abb. 24) besonders augenfällig. Die wesentlichen Anteile des Chroms im Kulturmedium werden unter Verwendung des kationischen Ionenpaarreagenzes Tetra-butylammoniumhydrogensulfat nur wenig retardiert und eluieren bereits in weniger als 10 Minuten. Etwa 40% der Gesamtmenge eluieren nach dieser Zeit diffus und ohne

daß ausgeprägte Peaks erkennbar wären. Die Wiederfindungsrate betrug ca. 75%. Ähnliche Resultate wurden mit dem stärker hydrophoben und bei Anionen im allgemeinen zu stärkerer Retention führenden kationischen Ionenpaarreagenz Cetyltrimethylammoniumhydrogensulfat erzielt. Auch der Einsatz des anionischen Ionenpaarreagenzes Natriumoctylsulfat (zur Chromatographie von Kationen) führte zu keiner wesentlichen Retention der Chromkomplexe. Unter diesen Bedingungen wurde nahezu die Gesamtmenge an Chrom wurde mit dem Totvolumen der Säule in einem Peak eluiert.

3.2.3.2. Versuche zur Konditionierung des Nährmediums

Um den Chromgehalt im Nährmedium aufzukonzentrieren, wurde versucht, die Gesamtmenge durch Gefriertrocknen in zwei Schritten soweit wie möglich einzuengen. Abb. 34 zeigt das Gelchromatogramm des verbrauchten Nährmediums nach Gefriertrocknung:

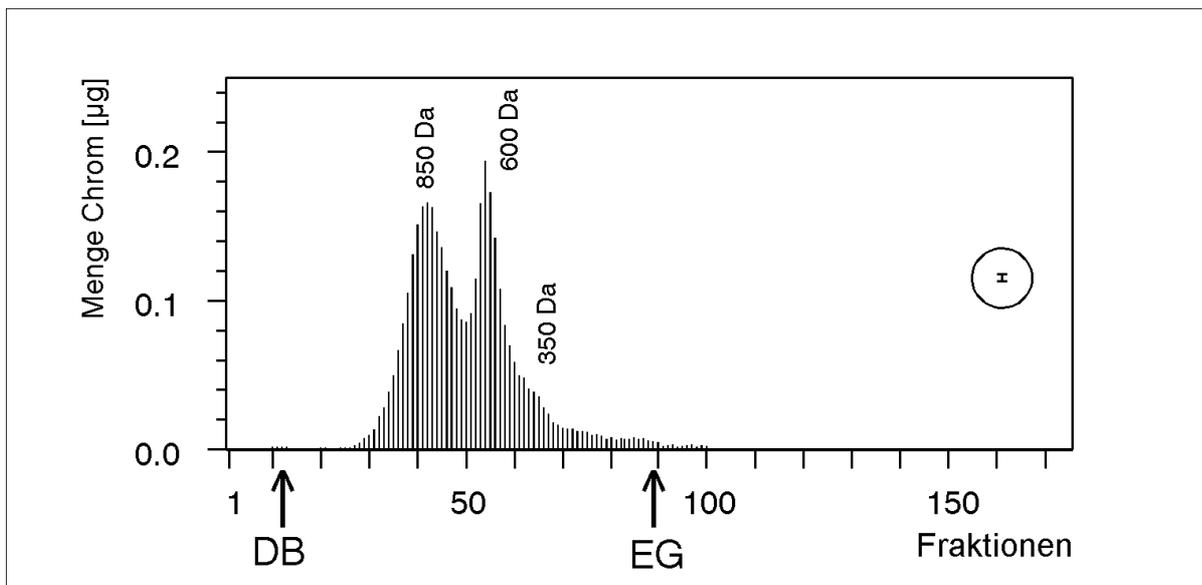


Abb. 34: Gelchromatogramm des verbrauchten, ^{51}Cr -haltigen Nährmediums nach Gefriertrocknung (BII (s. Abb. 10)).

Bedingungen: Säule Toyopearl HW 40s, 1cm*133cm; Eluent: 0,2 M KH_2PO_4 , 0,5 mL/min..

Probe: 490µL; Fraktionsgröße: 0,5 mL. DB und EG markieren das Elutionsvolumen von Dextran-Blau (V_0) bzw. Ethylenglykol (V_t).

Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler (σ) einer einzelnen Chrombestimmung aufgrund der Zählstatistik der Radioaktivität (Poisson- Statistik) in der Mitte der Ordinate.

Abb. 35 zeigt das Ionenpaarchromatogramm des verbrauchten Nährmediums nach Gefriertrocknung:

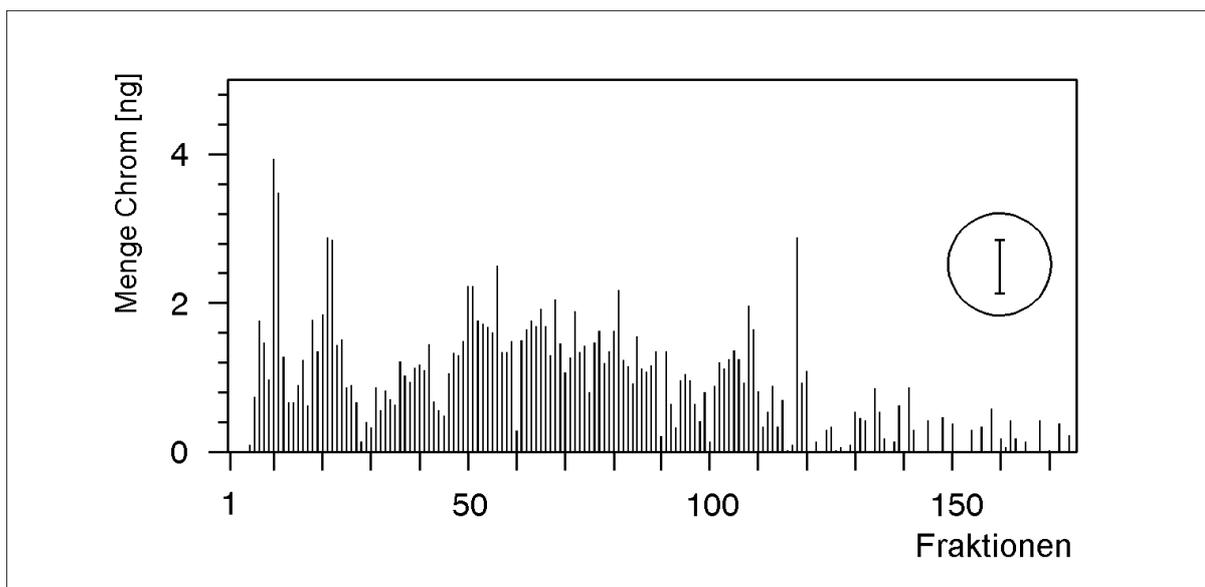


Abb. 35: Ionenpaarchromatogramm des verbrauchten, ^{51}Cr -haltigen Nährmediums nach Gefriertrocknung (BII (s. Abb. 10)).

Bedingungen: Säule Merck Lichrospher[®] RP-18, 3mm * 150mm + Vorsäule 3mm

Gradientenelution: Probe: 20 μL ; Eluent A: 0,05 M NaH_2PO_4 , 5mM TBAHS, pH 5,2; Eluent B: 0,05 M NaH_2PO_4 , 5mM TBAHS, Methanol 50% (v/v), pH 5,2; 0% A \rightarrow 100% B in 60 Minuten; 0,5 mL/min.; ca. 165 μL pro Fraktion.

Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler (σ) einer einzelnen Chrombestimmung aufgrund der Zählstatistik der Radioaktivität (Poisson- Statistik) in der Mitte der Ordinate.

Aufgrund der relativ gleichmäßigen Verteilung des Chroms über nahezu das gesamte Chromatogramm (Abb. 35) ist der Chromgehalt der einzelnen Fraktionen verhältnismäßig gering und fällt in die Nähe der Nachweisgrenze, wodurch sich eine große Meßunsicherheit ergibt.

Allein die Gefriertrocknung veränderte offensichtlich den Bindungszustand des Chroms radikal, wie sich durch Vergleich der Gelchromatogramme (Abb. 34 und Abb. 32) und vor allem der Ionenpaarchromatogramme (Abb. 35 und Abb. 33) erkennen läßt.

Diese Veränderungen der im Nährmedium vorliegenden Chromspezies werden offensichtlich durch die gleichzeitig während der Aufkonzentration stark steigende Ionenstärke bewirkt. Schonendere Möglichkeiten zur selektiven Abtrennung des Chroms von den im Kulturmedium vorhandenen Salzen sind nicht bekannt. Angesichts des damit offenbarten instabilen Bindungszustands des Chroms im Nährmedium wurde von einer weiteren Aufbereitung des Konzentrats abgesehen.

4. DISKUSSION

Nachdem Schwarz und Mertz 1959 die Existenz eines vitaminähnlichen, chromhaltigen „Glukosetoleranzfaktors“ in Bierhefe postuliert hatten, wurden von Mertz und anderen Autoren zahlreiche Versuche zur Isolation dieser Substanz aus Bierhefe unternommen. Bis heute ist über die Natur der Chromkomplexe, die von in chromhaltigen Nährmedien gezogener Bierhefe gebildet werden, nichts bekannt.

Wesentliches Ziel dieser Untersuchungen war es daher, die von Hefe nach Aufnahme von Chrom(III) gebildeten Chromverbindungen zu bilanzieren, neue Methoden zu ihrer Isolierung und Analyse zu entwickeln und Erkenntnisse über ihre Eigenschaften zu gewinnen.

4.1. Die Aufnahme von dreiwertigem Chrom in Bierhefe

Die Gesamt- Chromaufnahme in Bierhefe umfaßt sowohl den in die Zelle aufgenommen als auch den an der Zellwand angelagerten Anteil an Chrom. Bei letzterem handelt es sich überwiegend um einen Prozeß der „Chemisorption“, der ähnlich dem Prozeß des „Ionenaustauschs“ an Ionenaustauscherharzen unabhängig von der Stoffwechselenergie der Hefe auch mit nicht lebensfähigen Zellen oder sogar lediglich separierten Bestandteilen der Zellwand abläuft [278][279][280][281][282][283][284].

Obwohl die Gesamt- Chromaufnahme in Hefe in den eigenen Versuchen zwischen 0,57 µg/g und 4,1 µg/g Feuchtgewicht (entsprechend zwischen 2,03 µg/g und 15,8 µg/g Trockengewicht) um den Faktor 7 schwankte (Tabelle 8), liegt sie doch in etwa im Rahmen bisheriger Ergebnisse, wie ein Vergleich mit Abb. 7 zeigt. Eine Erklärung für die relativ große Schwankungsbreite der Ergebnisse, die an sich unter jeweils nahezu gleichen Bedingungen zustande gekommen sind, kann nicht gegeben werden. Wie die Analyse der zellulären Verteilung zeigt (s.u.), ist eine scheinbar größere

Chromaufnahme durch einen deutlich höheren Anteil der Adsorption an der Zellwand der Hefe vollständig erklärbar. Leider sind aus der Literatur keine quantitativen Angaben hinsichtlich des Verhältnisses von an die Zellwand angelagertem zu in die Zelle aufgenommenem Chrom(III) bekannt. Es ist daher nicht möglich, Vergleiche zu ziehen. Es scheint, daß das meiste partikulär gebundene Chrom in der Hefe, das nach Zellaufschluß und Zentrifugation bei $48.000 \cdot g$ im Niederschlag gefunden wird, an die Zellwände gebunden ist, wie der zunehmende Chromgehalt der Membranfraktion bei steigendem Reinheitsgrad zeigt (Abb. 11). Die Biosorption von Kationen an Zellwände von Hefe ist bereits seit langem bekannt [285]. Der Vorgang der Biosorption ist allgemein stark abhängig von feinen Änderungen des Nährmediums (pH, Ionenstärke, Co- Ionen) und der Zusammensetzung der Zellwand, die wiederum selbst abhängig von den Kulturbedingungen [283][286] ist. An sich unbedeutende Änderungen in den Kulturbedingungen können einen deutlichen Effekt auf die Biosorption von Chrom zeigen, während die Chromaufnahme in die Zelle unter metabolischer Kontrolle steht oder einfach nur von Diffusionsvorgängen abhängig ist [287]. Dies könnte die relativ hohe Schwankungsbreite der Ergebnisse hinsichtlich des Gesamtchromgehalts der Hefe erklären.

Es ist möglich, daß unter geeigneten Bedingungen der Anteil des lediglich an die Zellwand gebundenen Chroms wesentlich höher sein kann als in den vorliegenden Untersuchungen, insbesondere unter Bedingungen, in denen die Chromkonzentration im Nährmedium sehr viel höher liegt als 1 mg/L (Abb. 7). Es sogar denkbar, daß bei geeigneter Zusammensetzung des Nährmediums und bei eher neutralen pH- Werten schwer lösliche kolloide Hydroxokomplexe des Chroms ausfallen oder das im Kulturmedium vorhandene Chrom mit anderen Bestandteilen (z.B. Phosphat) schwerlösliche Niederschläge bildet, die an die Zellmembran adsorbiert werden. Diese an Hefe adsorbierten Anteile von Chrom(III) sollten dennoch keinerlei biologische Bedeutung haben. Sofern nur der Gesamtchromgehalt der Hefe bestimmt wird, scheint der Anteil des durch Biosorption adsorbierten Chroms häufig den Gesamtchromgehalt der Hefe zu bestimmen. In Anbetracht des recht geringen Anteils an Chrom, der tatsächlich in die Hefe aufgenommen wird und am Hefemetabolismus teilnimmt, ist unklar, wo die Quelle für das postulierte „bioaktive“ Chrom zu suchen ist. Tatsächlich sind in der Vergangenheit viele Aufarbeitungen von Bierhefe von kommerziell erhältlichen autolytierten oder thermolysierten Produkten ausgegangen. Es ist möglich, daß, wie bereits von Beran et al. [212] bemerkt wurde, während der Lyse das an die Zellwand gebun-

dene Chrom freigesetzt wird und mit gleichzeitig aus der lysierten Zelle austretenden Substanzen niedrigmolekulare Komplexe bildet, die die biologischen Wirkungen zeigen, die im allgemeinen dem „Glukosetoleranzfaktor“ zugeschrieben werden.

Aus den eigenen Untersuchungen ergibt sich, daß in den zwei Fällen, in denen zuverlässige Daten über die zelluläre Verteilung des Chroms gewonnen wurden, trotz offensichtlich großer Unterschiede im Gesamt- Chromgehalt die geschätzte Chromkonzentration im Zytosol der Hefe im Rahmen der (geschätzten) Meßgenauigkeit von ca. 0,1 µg/g konstant bei 0,5 µg/g und damit bei genau 50% der Konzentration des Chroms im Nährmedium lag. Da das an die Zellwand angelagerte Chrom von der Hefe nicht tatsächlich aufgenommen worden ist, beträgt der „Biokonzentrationsfaktor“, d.h. das Verhältnis der intrazellulären Chromkonzentration zu der in der Umgebung, bei einer Chromkonzentration von 1mg/L im Kulturmedium lediglich 0,5. Dreiwertiges Chrom wird also von Hefe nicht akkumuliert, sondern ausgeschlossen. Ein aktiver Transport von Chrom in die Zelle hinein unter Aufwand von Stoffwechselenergie entgegen einem Konzentrationsgradienten scheint daher bei der untersuchten Chromkonzentration im Kulturmedium nicht zu existieren. Aus dem Verhältnis zwischen dem mit Hefe assoziierten Chrom und der Chromkonzentration im Kulturmedium über einen weiten Konzentrationsbereich (Abb. 7, Kapitel 2.2.6.4.1) kann geschlossen werden, daß auch bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen von Chrom(III) im Kulturmedium kein anderer Mechanismus der Akkumulation wirksam ist. Offen bleibt die Frage, wie dreiwertiges Chrom tatsächlich in die Zelle gelangt, da bisher lediglich Transporter für ein- und zweiwertige Kationen bekannt sind. Die Existenz eines Transportmechanismus' für dreiwertige Kationen wurde vor kurzer Zeit erstmals postuliert [288]. Eine Relevanz für den Hefemetabolismus ist bisher nicht abzusehen.

Chrom hat für Bierhefe vermutlich keine physiologische Bedeutung. Ein Bedarf für Chrom konnte bisher nicht gezeigt werden [124][289]. Die berichtete Stimulation der Fermentationsgeschwindigkeit von Glukose durch Chrom(III)salze [173] zeigte sich unabhängig vom Chrom- Status der Hefe [289]. Es muß aber eingeschränkt werden, daß der Nachweis von Chrom in komplexen Matrices, wie z.B. einem Kulturmedium, im Spurenbereich mit großen Schwierigkeiten verbunden ist [290]. Eine Wachstumsdepression von *S. carlsbergensis* war bei einer Chromkonzentration im Nährmedium von weniger als 2 µg/L (entsprechend 2 ppb) nicht nachweisbar [193] und konnte auch in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Für das Fehlen eines Bedarfs der

Bierhefe für Chrom spricht weiterhin der nahezu lineare Zusammenhang zwischen dem Chromgehalt der Hefe und dem des Nährmediums über sechs Größenordnungen (Abb. 7, Kapitel 2.2.6.4.1), was auf einen unveränderten Mechanismus der Aufnahme bzw. Adsorption von Chrom über einen weiten Konzentrationsbereich hindeutet. Die von Bierhefe intrazellulär gebildeten Komplexverbindungen von Chrom(III) müssen daher entweder andere Metallionen aus ihren Bindungen verdrängen, oder es werden von der Hefe spezielle Moleküle neugebildet, die der Entgiftung der aufgenommenen Chrom(III)- Ionen dienen. Es ist dabei unwahrscheinlich, daß die von der Zelle zum Unschädlichmachen von Chrom(III) gebildeten Liganden ausschließlich diesem Zweck dienen.

4.2. Chromspezies in Bierhefe

Bis heute wurden sehr wenige Versuche unternommen, die möglicherweise empfindlichen Chromkomplexe aus Bierhefe in ihrem natürlichen Zustand zu isolieren und zu identifizieren. Die meisten Prozeduren zur Gewinnung chromhaltiger Komplexe aus Bierhefe orientierten sich methodisch an den Arbeiten von Schwarz und Mertz Ende der fünfziger Jahre zur Isolation des „Glukosetoleranzfaktors“ [99] (Tabelle 6), so daß kaum Vergleichsmöglichkeiten zu den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten bestehen.

Aus Kenntnis der Redoxpotentiale und des zellulären Metabolismus von Cr(VI) ist bekannt, daß weder Chrom(II) noch Chrom(VI) im zellulären Milieu thermodynamisch stabil sind und längere Zeit existieren können. In sofern erscheint es extrem unwahrscheinlich, daß in Hefeextrakten andere Oxidationstufen von Chrom als die dreiwertige eine Rolle spielen.

4.2.1. Erkenntnisse aus der Gelchromatographie

Aus den Ergebnissen der Gelchromatographie (Kapitel 3.2.2.3.2) läßt sich schließen, daß im Extrakt des Zytosols bis zu vier Chromspezies mit Molekulargewichten von 40 kD und 1 kD vorliegen.

Die Existenz einer höhermolekularen Chromspezies in *S. cerevisiae* mit einem Molekulargewicht von ca. 40 kDa, die ungefähr 50% der von der Hefe aufgenommenen Chrommenge enthält (Kapitel 3.2.2.7), war bisher nicht bekannt. Wie aus der Symmetrie der Peakform der 40 kDa- Fraktion auf Toypearl HW 55s geschlossen werden kann (Abb. 15), repräsentiert diese Fraktion wahrscheinlich nur eine einzige chromhaltige Spezies. Da im Rahmen dieser Arbeit vor allem niedermolekulare Chromverbindungen im Mittelpunkt des Interesses standen, wurden keine weiteren Versuche zur Identifizierung dieser Substanz unternommen. Über die Identität dieser Substanz lassen sich daher nur Vermutungen anstellen. Im Jahre 1994 wurde von Nowalk et. al. erstmals über das Vorkommen einer Transferrin- ähnlichen Substanz in der pathogenen Hefe *Neisseria* berichtet [291]. Tesfa-Selase und Hay konnten 1996 eine Transferrin-ähnliche Substanz aus der pathogenen Hefe *Cryptococcus neoformans* isolieren und teilweise charakterisieren [292]. Die Autoren schließen, daß ihr eisenbindendes Protein mit einem Molekulargewicht von 80 kDa „ein neuartiges Protein sein könnte, das entweder als Rezeptor dient oder eine direkte Rolle als Eisentransporter oder eisenbindendes Protein in dieser Hefe besitzt“. Auch wenn sich diese Erkenntnisse nicht ohne weiteres auf die Bierhefe *S. cerevisiae* übertragen lassen, ist durch die Arbeiten von Nowalk et al. und Tesfa-Selase und Hay das Vorkommen Transferrin- ähnlicher Proteine in Hefe erstmals belegt worden. In diesem Zusammenhang sind die bereits seit längerem bekannten Eigenschaften von Säugertransferrin [77] zu erwähnen, das mit hoher Affinität auch dreiwertiges Chrom binden kann. Ein Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Chrom(III) in Hefe und ihrem Eisenstoffwechsel ist daher nicht auszuschließen. So hat Beran [212] eine wechselseitige Abhängigkeit des Eisen- und Chromgehalts von Hefe festgestellt. Es spricht daher einiges dafür, daß es sich bei der im Hefeextrakt aufgefundenen höhermolekularen Substanz tatsächlich um ein bisher unbekanntes Transferrin- Analog handelt. Die Abweichung im Molekulargewicht von den in dieser Arbeit geschätzten 40 kDa und den ca. 80 kDa für Transferrin liegen im Rahmen der mit dieser Methode erreichbaren Genauigkeit. Eine weitere Erhärtung der Annahme, daß es sich bei dieser Substanz tatsächlich um ein Transferrin- Analog aus

Hefe handelt, könnte durch chromatographischen Vergleich mit einer Probe Säugersäuretransferrin erreicht werden.

Im Gelchromatogramm der Chromatographie des Hefextrakts auf dem Gel mit der Ausschlußgröße von 100 kDa (Abb. 15) ist zu erkennen, daß jenseits der 40 kDa-Grenze geringe Mengen von Chrom an noch größere Moleküle gebunden sind. Eine weitere Diskriminierung in diesem Molekulargewichtsbereich war mit dieser Säule nicht möglich. Es ist anzunehmen, daß es sich bei diesen Chromspezies mit sehr hohem Molekulargewicht größer 100 kDa um keine einzelnen Spezies, sondern um Chrommenge handelt, die diffus an höhermolekulare Strukturen gebunden vorliegen und zusammen an der Ausschlußgrenze der Säule (V_0) eluiert werden.

In früheren Untersuchungen zur Identität des Glukosetoleranzfaktors wurde zur Extraktion der Hefe und zur Elution von Ionenaustauschersäulen häufig Ammoniaklösung eingesetzt. Es sollte hier untersucht werden, ob eine derartige Behandlung zu einer Änderung im Spektrum der Spezies im Hefextrakt führt. Abb. 17 und Abb. 19 zeigen, daß einerseits die Extraktion mit wäßriger 0,3 molarer Ammoniaklösung, andererseits aber auch die Behandlung von Hefextrakten mit 3 molarer Ammoniaklösung zu deutlichen Veränderungen in der Verteilung der Spezies führen. Insbesondere war es nicht möglich, mit Ammoniaklösungen nennenswerte höhermolekulare Anteile des gebundenen Chroms aus der Hefe zu extrahieren. Dies bestätigt den Verdacht, daß die in anderen Arbeiten angewandten Methoden die ursprünglich vorhandenen Chrom(III)- Komplexe in Hefextrakten zerstören.

Das Auffinden niedermolekularer Chromspezies mit einem durch Gelchromatographie abgeschätzten Molekulargewicht zwischen 600 und 1100 Da befindet sich zumindest zum Teil im Einklang mit den Ergebnissen anderer Autoren und steht nicht im Widerspruch zur Existenz des chromhaltigen Glukosetoleranzfaktors mit einem postulierten Molekulargewicht von ca. 600 Da [204]. Da die Gelchromatographie eine zwar schonende, aber letztlich wenig selektive Trennmethode ist (Kapitel 2.3.6.1), wurde zur näheren Untersuchung der niedermolekularen Chromspezies mit der Ionenpaarchromatographie eine leistungsfähigere Trennungs- und Analysenmethode herangezogen.

4.2.2. Erkenntnisse aus der Ionenpaarchromatographie

Die Ionenpaarchromatographie ist in besonderem Maße empfindlich gegenüber einer Überladung der Säule. Zur Analyse der niedermolekularen Chromkomplexe mittels Ionenpaarchromatographie mußte der Hefeextrakt daher zunächst durch Gelchromatographie vorgereinigt werden, um einen Großteil eventuell störender Substanzen des Hefeextrakts abzutrennen.

Das Elutionsverhalten des so aufgereinigten Extrakts zeigte eindeutig ionische Eigenschaften. Unter den Bedingungen der „gewöhnlichen“ Umkehrphasenchromatographie, also unter Verzicht auf den Zusatz eines amphiphilen Ionenpaarreagenzes, konnte keine Retention des Analyten erreicht werden. Anionische Ionenpaarreagenzien wie Octansulfonsäure und Dodecylsulfonsäure, die Ionenpaare¹ mit Kationen bilden, führten ebenfalls zu keiner Retention der radioaktiv markierten Chromverbindungen. Erst durch den Einsatz kationischer Ionenpaarreagenzien, wie z.B. das Tetrabutylammonium- Kation, das Ionenpaare mit Anionen bildet, konnte eine starke Retention der markierten Chromverbindungen beobachtet werden. Es kann also mit Sicherheit angenommen werden, daß die extrahierten niedermolekularen Chromkomplexe zumindest unter den Bedingungen der Ionenpaarchromatographie bei dem verwendeten pH- Wert von 5,2 als Anionen vorliegen.

Im entsprechenden Chromatogramm traten zwei verschiedene Peaks chromhaltiger Substanzen auf (Abb. 24), die erst bei einem Methanolgehalt im Eluenten von ca. 22% von der Säule eluiert werden konnten. Diese starke Retention deutet auf eine Mehrfachladung des Analyten hin (Kapitel 2.3.6.2.1). Zur Kompensation der Ladung des dreifach positiv geladenen Chrom- Kations müssen also pro gebundenem Chrom-Atom mindestens fünf negative Ladungen im Molekül vorhanden sein.

Im Chromatogramm (Abb. 24) ist weiterhin der geringe Unterschied der Retentionszeit der beiden Peaks auffällig. Da zwei Peaks auch unter isokratischen Bedingungen auftreten (Abb. 23), kann ein Artefakt, wie er als „Peak splitting“ bei der Ionenpaarchromatographie im Falle einer Überladung der Säule auftritt, sicher ausgeschlossen

¹ Wie in Kapitel 2.3.6.2.1 dargelegt, ist das tatsächliche Vorliegen von Ionenpaaren unter den gewöhnlichen Bedingungen der „Ionenpaarchromatographie“ hypothetisch. Aus Gründen der Anschaulichkeit soll aber im Rahmen dieser Arbeit an diesem Begriff festgehalten werden.

werden. Der Unterschied in der Retentionszeit der beiden Peaks deutet auf eine große Ähnlichkeit der beiden eluierten Substanzen hin. Es könnte sich dabei z.B. um Isomere handeln. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, daß beide Peaks im Rahmen der Meßgenauigkeit die gleiche Menge Chrom repräsentieren.

Wie man aus den Chromatogrammen der Ionenpaarchromatographie der vorgereinigten Hefeextrakte sehen kann, ist die Auflösung der Ionenpaarchromatographie viel besser als die konventioneller Ionenaustauschmethoden [176][177]. Das Auftreten eines Peaks in einem Chromatogramm deutet generell lediglich auf das Vorhandensein *mindestens* einer Substanz hin. Unter den gewählten Ionenpaarchromatographischen Bedingungen zeigen sich die beiden chromhaltigen Peaks sehr gleichmäßig geformt ohne Anzeichen von Schultern. Die Ionenpaarchromatographie gibt damit zumindest keinerlei Hinweise auf das Vorliegen von weiteren chromhaltigen Substanzen, die sich unter den eluierten Peaks verbergen könnten.

Die Wiederfindungsrate bezüglich des Gesamtchroms betrug bei isokratischer Elution etwa 85% und bei Gradientenelution etwa 45%. Der Anteil der als Peak eluierten Chrommenge an der injizierten Gesamtchrommenge lag allerdings nahezu unabhängig von den Elutionsbedingungen jeweils bei 43% unter isokratischen Bedingungen bzw. 40% bei Gradientenelution. Der restliche Anteil (40% der Gesamtchrommenge) wird offensichtlich bis zu der Retentionszeit der beiden Chrompeaks hin verteilt eluiert. Da unter den gewählten Bedingungen die Chrompeaks im Falle der Gradientenelution erst nach etwa 40 Minuten eluiert werden, verteilt sich die diffus eluierte Chrommenge auf eine größere Anzahl von Fraktionen, wodurch die Nachweisgrenze z.T. unterschritten wird und das diffus eluierte Chrom dem Nachweis entgeht, was die niedrigere Wiederfindung im Falle der Gradientenelution erklärt. Dieser teilweise Zerfall eines Teils der Chromkomplexe könnte durch die Wechselwirkung mit nicht derivatisierten Silanolgruppen des Chromatographieträgers verursacht worden sein, die auf silikatischen Trägermaterialien stets noch vorhanden sind. Der Einsatz von polymeren Trägermaterialien in der Umkehrphasenchromatographie könnte den beobachteten Zerfall eines Teils der Chromspezies verhindern und so die Wiederfindungsrate erhöhen.

Damit stellt sich die Frage, ob die verlorengegangene Chrommenge aus dem teilweisen Zerfall der beobachteten zwei Peaks stammt oder ob noch weitere Spezies vorhanden sind, die unter den Bedingungen der Ionenpaarchromatographie nicht erfolgreich getrennt werden können. Es wurde daher versucht, die eluierten Peaks aufzufangen

und anschließend erneut einer Trennung mit Hilfe der Gelchromatographie zu unterwerfen. Da für die Ionenpaarchromatographie lediglich eine analytische Säule zur Verfügung stand, wurden zur Gewinnung einer ausreichenden Substanzmenge in einem zeitoptimierten Verfahren (Stufengradient statt kontinuierlicher Gradient) die Peaks von insgesamt 65 Injektionen von jeweils 20 µL Probe gesammelt und die vereinigten Proben nach Abdampfen des Methanolanteils im Vakuum bei Raumtemperatur durch Gefriertrocknung rekonzentriert. Die anschließend durchgeführte Gelchromatographie (Abb. 26) zeigt, daß ein dem Chromatogramm der ursprünglichen Probe des Hefeextrakts sehr ähnliches Ergebnis erzielt wird (Abb. 22). Es fällt auf, daß die Größe des Peaks bei 1100 Da deutlich vermindert wurde. Dieser Verlust kann allerdings den Gesamtverlust an Chrom bei der Ionenpaarchromatographie von 60% nicht erklären. Da ansonsten keine wesentlichen Änderungen im Elutionsmuster zu erkennen sind, liegt der Schluß nahe, daß die bei der Durchführung der Ionenpaarchromatographie auftretenden Chromverluste auf Kosten der eluierten Peaks gehen und nicht einer oder mehreren weiteren Chromspezies zuzuordnen sind. Die Verminderung der Größe des 1100 Da- Peaks ist damit allerdings nicht zu erklären. Es könnte sein, daß die sich bei der Gelchromatographie zeigenden Peaks Substanzen repräsentieren, die miteinander zumindest teilweise im Gleichgewicht stehen und dieses Gleichgewicht durch die Trennung per Ionenpaarchromatographie nebst anschließender Gefriertrocknung gestört wird.

Aus den Versuchen zur Ionenpaarchromatographie ist damit zu schließen, daß die resultierenden zwei chromhaltigen anionischen Peaks den wesentlichen Teil der niedermolekularen Chromverbindungen darstellen. Eine Reinjektion der beiden Peaks liefert in der Gelchromatographie ein Elutionsmuster mit mindestens drei Peaks, das dem der ursprünglichen Probe der frisch aufbereiteten Hefe sehr stark ähnelt. Fraglich ist in diesem Zusammenhang allerdings, wieso eine Reinjektion von zwei Peaks aus der als sehr trennscharf bekannten Ionenpaarchromatographie mindestens drei Peaks in der Gelchromatographie liefert. Da die Gelchromatographie eine sehr schonende Methode ist, erscheint es denkbar, daß die beobachteten drei Spezies lediglich sehr labile Addukte darstellen, die während der Chromatographie auf der Säule intermediär gebildet werden. Unabhängig davon könnte in Betracht gezogen werden, daß die während der Ionenpaarchromatographie eluierten zwei Peaks Isomere einer einzigen Substanz sind (s.o), so daß in dem untersuchten Hefeextrakt möglicherweise lediglich eine einzige, anionische Substanz mit einem Molekulargewicht zwischen 600 und 1100 Da existiert.

Weder bei der Gelchromatographie noch bei der Ionenpaarchromatographie konnte in irgendeiner Weise eine Entsprechung zwischen der UV- Absorption (bei 254 oder 280 nm) und dem Chromgehalt der Chromatogramme beobachtet werden. Der Grund hierfür könnte in der geringen Konzentration der Chromkomplexe in den auf die Säulen gegebenen Proben (ca. 10 ng Chrom/mL) und dem Fehlen von UV- absorbierenden Gruppen in den komplexierenden Liganden liegen.

4.2.3. Erkenntnisse aus den massenspektrometrischen Methoden

Die präsentierten Massenspektren (Kapitel 3.2.2.7) der gereinigten Probe AV (Abb. 10, Kapitel 3.2.2.1) scheinen insgesamt wenig miteinander gemeinsam zu haben, obwohl stets die gleiche Probe untersucht wurde. Für die Untersuchung von anorganischen Komplexen, insbesondere Chrom(III)- Komplexen, mit Hilfe der MALDI- TOF- Massenspektrometrie liegen so gut wie keine Erfahrungen vor. Die Eignung der Plasmasorption- Massenspektrometrie für die Aufklärung der Struktur von Chrom(III)- Komplexen wurde von Mayer gezeigt [127]. Über den Einsatz von ESI-MS zur Speziationsanalyse von anorganischen Komplexen existiert eine geringe Anzahl von Arbeiten (Kapitel 2.3.8.3).

Es zeigte sich, das die Empfindlichkeit der PD-MS für die Untersuchung der vorliegenden Probe nicht ausreichend war (Abb. 27). Aus den Ergebnissen der Gelchromatographie (Abb. 16) kann für die relevanten Chrom(III)- Komplexe eine Masse zwischen 600 und 1100 Da abgeschätzt werden. Die im PD-MS- Spektrum gezeigten Peaks befinden sich demgegenüber in einem zu niedrigen Massenbereich.

Bei der Interpretation der MALDI-TOF- Spektren muß beachtet werden, daß hier auch Addukte des Analyten mit der Matrix Dihydroxybenzoesäure (Molmasse 154,03 Da) auftreten können. Ein Teil der Peaks des MALDI-TOF- Massenspektrums (Abb. 28) liegt in einem zu hohen Massenbereich. Die Vielzahl der in Erscheinung tretenden Peaks erschwert die Interpretation erheblich.

Die Bildung von Addukten und von mehrfach geladenen Molekülonen ist charakteristisch für das ESI- Massenspektrum. Unter den gewählten Bedingungen sollte die Bildung von Molekülfragmenten praktisch nicht in Erscheinung treten. Der einzige beobachtbare Peak des Elektrospray- Massenspektrums im positiven Modus (Abb. 29) liegt mit 904,90 Da in dem Bereich, der für auch durch die Gelchromatographie vorhergesagt wird. Die unter diesen Bedingungen gezeigte positive Ladung des Ions steht allerdings nicht im Einklang mit den Ergebnissen der Ionenpaarchromatographie, die eindeutig eine negative Ladung des Chrom(III)- Komplexes belegen. Es ist allerdings möglich, daß es sich hierbei um eine mehrfach protonierte Form des Molekülonen handelt. Der Verlust eines weiteren Protons ist dann prinzipiell im Massenspektrum nicht beobachtbar, weil die Spezies dann ungeladen vorliegt und so dem Nachweis entgeht. Ein Elternionenscan der Masse von 52 zeigt, daß M/Z 904,90 mit dieser Masse des häufigsten Chromisotops in Verbindung gebracht werden kann (Abb. 30). Angesichts der schlechten Qualität des Massenspektrums ist diese Schlußfolgerung allerdings mit Vorsicht zu betrachten.

Das ESI-MS Massenspektrum im negativen Modus zeigt demgegenüber ein vollständig anderes Bild (Abb. 31). Die beiden Peaks bei M/Z 904,90 und 922,92 Da fehlen. Im relevanten Massenbereich oberhalb von 700 Da treten statt dessen fünf zuvor nicht zu beobachtende Peaks zwischen M/Z 748,3 und M/Z 870,5 Da in Erscheinung. Es ist unklar, ob es sich hierbei um negativ geladene Fragmente der Masse bei M/Z 904,90 Da handelt. Da die Tendenz zur Fragmentierung bei Elektrospray- Ionisation allgemein nur gering ist, liegt hier jedoch der Verdacht nahe, daß diese Peaks andere Substanzen repräsentieren. Leider konnten im negativen Modus keine weitergehenden Untersuchungen (z.B. Elternionenscan) durchgeführt werden, so daß die Frage nach dem Chromgehalt dieser Substanzen offen bleibt.

4.2.4. Schlußfolgerungen

Während der Nachweis niedermolekularer Chrom(III)- Verbindungen in Hefeextrakten im Einklang mit den Ergebnissen anderer Autoren steht und der Existenz des postulierten chromhaltigen Glukosetoleranzfaktors mit einem Molekulargewicht von ungefähr 600 Da entspricht [204], steht der eindeutig anionische Charakter der gefundenen Ver-

bindungen im Widerspruch zu den Ergebnissen der meisten anderen Arbeiten und den ursprünglich von Schwarz und Mertz [99] sowie Toepfer et al. [138] veröffentlichten Thesen. Votava et al. jedoch [205] fanden in Extrakten aus Bierhefe lediglich eine einzige anionische Substanz mit einem Molekulargewicht zwischen 600 und 800 Da. Ebenso konnte Blincoe [207] in Hefeextrakten lediglich anionische Chromkomplexe nachweisen. Beide Autoren gingen von frischer Hefe aus und extrahierten sie entweder mit Butanol/Wasser- Mischungen (Votava) oder nur mit Wasser nach Zellaufschluß (Blincoe). Auch in Pflanzenextrakten und anderen natürlichen Matrices (Tabelle 2) wurden ausschließlich anionische Chromkomplexe aufgefunden. Es ist daher naheliegend anzunehmen, daß das Auffinden kationischer Chrom(III)- Komplexe in Extrakten von Bierhefe auf die Anwendung zu drastischer Extraktions- und Reinigungsprozeduren zurückzuführen ist. In gleicher Weise dürfte die große Anzahl derartiger Substanzen, wie sie beispielsweise von Toepfer et al. [138], Kumpulainen et al. [190] oder Holdsworth und Neville [186] aufgefunden wurden, auf einen unspezifischen Zerfall einer oder mehrerer Vorläufersubstanzen hindeuten.

Über die Art der in der vorliegenden Arbeit aufgefundenen Chrom(III)- Komplexe aus Bierhefe kann gegenwärtig nur spekuliert werden. Die durch Elektrospray- Massenspektrometrie in einem Fall bestimmte Masse von 902,9 (= 904,9 - 2H⁺) ist zunächst als rein spekulativ anzusehen und muß durch weitere Experimente abgesichert werden. Durch Vergleiche des Verhaltens der Chrom(III)- Verbindungen unter bestimmten chromatographischen Bedingungen kann nur das Vorliegen bestimmter Chrom(III)- Salze- und - Komplexe ausgeschlossen werden:

- CrCl₃ (bzw. die sich daraus in wäßriger Lösung bildenden gemischten Aqua-chlorokomplexe) zeigten erwartungsgemäß mit dem kationischen Ionenpaarreagenz Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBAHS) keine Retention im Umkehrphasen- System (Abb. 25).
- Evans und Pouchnik schlossen aus chromatographischen Daten auf das Vorliegen von Pyridin-2-Carbonsäure (Pikolinsäure)- Komplexen in Extrakten aus Bierhefe [293]. Tris(Pyridin-2-carbonato)Chrom(III) (Chrom-Trispikolinat) zeigt als ungeladene Spezies allerdings im Unterschied zu den in dieser Arbeit extrahierten Chromkomplexen bereits unter den Bedingungen der Umkehrphasen- Chromatographie ohne Zusatz eines Ionenpaarreagenzes eine deutliche Retention. Damit kann das Vorliegen von Chrom- Trispikolinat in den im Rahmen

dieser Arbeit gewonnenen Hefeextrakten ausgeschlossen werden. Die Komplexe mit einem geringeren Gehalt an Pikolinsäure (wie z.B. Pyridin-2-Carbonato-dihydroxo-diaqua Chrom(III) [293]) sind je nach pH- Wert entweder ebenfalls ungeladen oder kationisch und sollten sich daher ebenfalls von den aus Hefe gewonnenen Chromkomplexen hinsichtlich ihres Retentionsverhaltens unterscheiden.

- Aufgrund der großen Menge an Nikotinsäure, die in gereinigten Hefeextrakten assoziiert mit Chrom gefunden wird, wurde über das Vorliegen biologisch aktiver Chrom- Nikotinsäurekomplexe spekuliert [294]. Beim Vergleich der Retentionzeiten eines Chrom(III)-Nikotinsäure- Präparats¹ (synthetisiert nach den Angaben von Evans und Pouchnik [293]) mit den aus Hefeextrakt gewonnenen Chromkomplexen konnte unter gleichen Bedingungen allerdings keine Übereinstimmung gefunden werden, wie ein Vergleich der Chromatogramme in den im folgenden gezeigten Abb. 24 (Kapitel 3.2.2.5) und Abb. 36 zeigt:

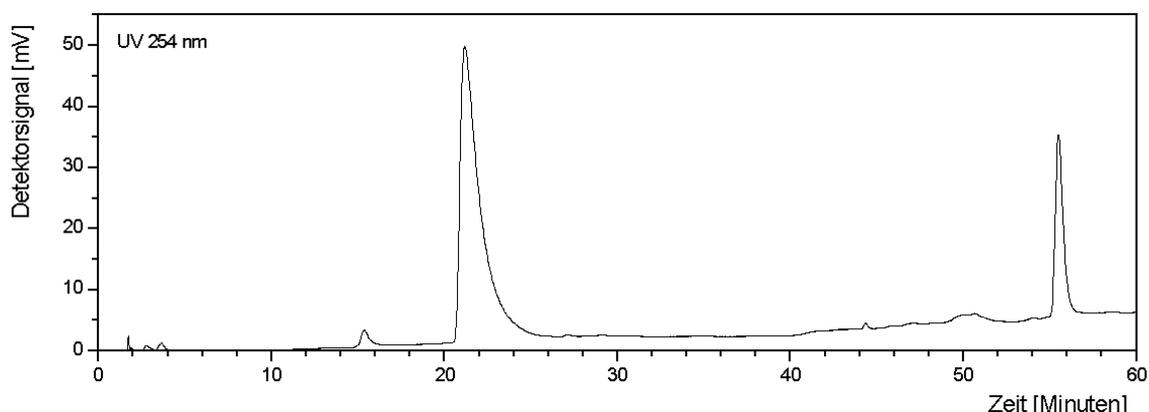


Abb. 36: Ionenpaarchromatographie von Chrom(III)- Nikotinat (0,8 mg/mL)

Bedingungen: Säule Merck Lichrospher[®] RP-18, 3mm * 150mm + Vorsäule 3mm

Gradientenelution: Probe: 20 μ L; Eluent A: 0,05 M NaH₂PO₄, 5mM TBAHS, pH 5,2; Eluent B: 0,05 M NaH₂PO₄, 5mM TBAHS, Methanol 50% (v/v), pH 5,2; 0% A \rightarrow 100% B in 60 Minuten; 0,5 mL/min.

¹ Die üblicherweise durch Zusammengeben von Chrom(III) und Nikotinsäure gewonnenen Präparate sind nicht kristallisierbar. Ihnen kommt nach neueren Erkenntnissen keine einheitliche Struktur zu [295].

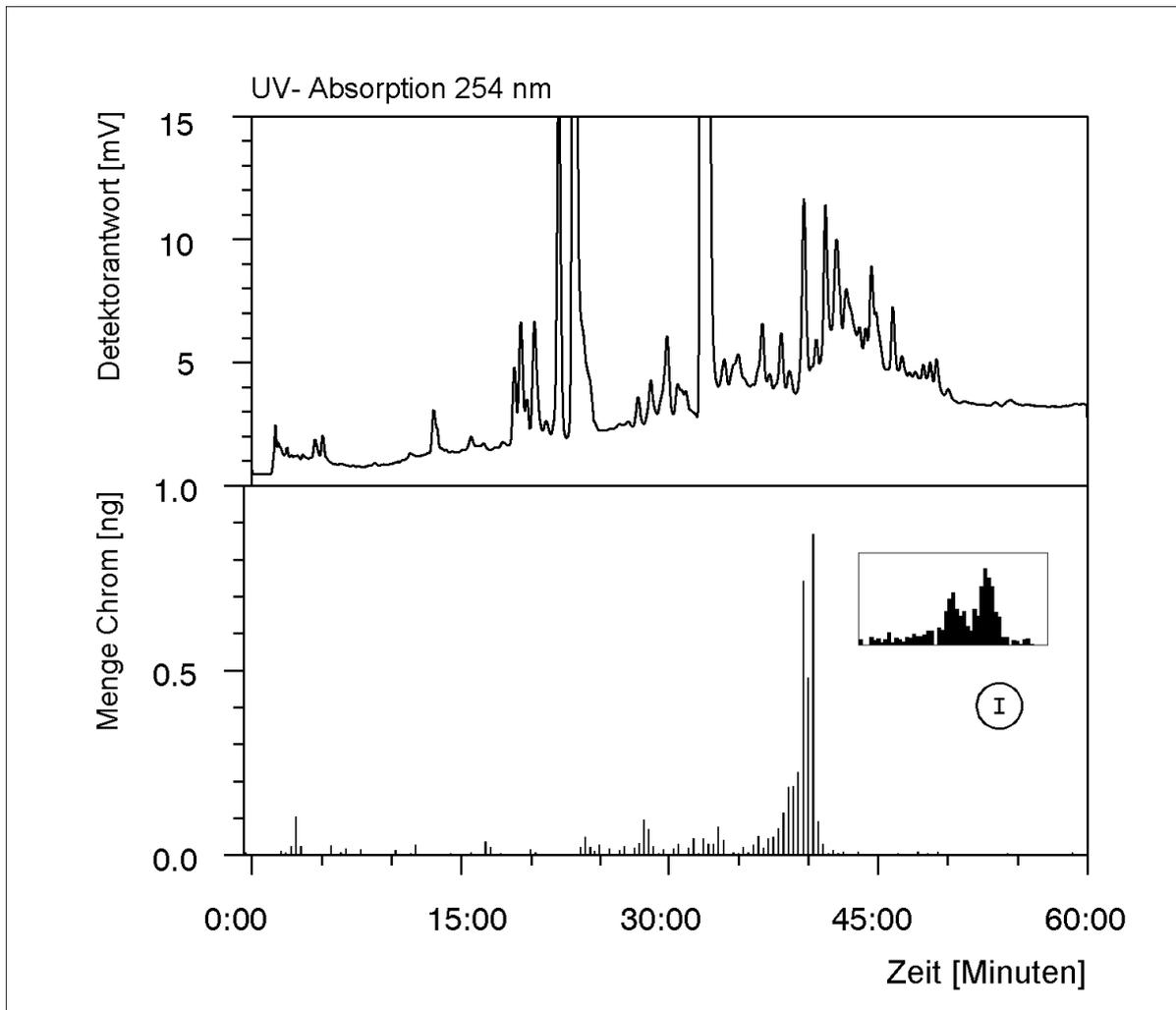


Abb. 24: Ionenpaarchromatographie des vorgereinigten Hefeextrakts AIII (s. Abb. 10)

Bedingungen: Säule Merck Lichrospher® RP-18, 3mm * 150mm + Vorsäule 3mm

Gradientenelution: Probe: 20µL; Eluent A: 0,05 M NaH₂PO₄, 5mM TBAHS, pH 5,2; Eluent B: 0,05 M NaH₂PO₄, 5mM TBAHS, Methanol 50% (v/v), pH 5,2; 0% A → 100% B in 60 Minuten; 0,5 mL/min.; ca. 170µL pro Fraktion.

Einsatz: 2 Tropfen/Fraktion unter gleichen Bedingungen

Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler (σ) einer einzelnen Chrombestimmung aufgrund der Zählstatistik der Radioaktivität (Poisson- Statistik) in der Mitte der Ordinate.

- Von Lyon et al. [90] wurde Kaliumtrisoxalatochromat(III) in Extrakten der Südseemyrte (*Leptospermum scoparium*) gefunden. Das Vorkommen dieses Komplexes in den hier gewonnenen Hefeextrakten kann aufgrund der unterschiedlichen gelchromatographischen Retentionszeiten gegenüber den in dieser Arbeit

gewonnenen markierten ^{51}Cr -haltigen Hefeextrakten und von Kaliumtrioxalatochromat(III) ausgeschlossen werden, wie der Vergleich der beiden Chromatogramme in Abb. 37 a) und b) zeigt:

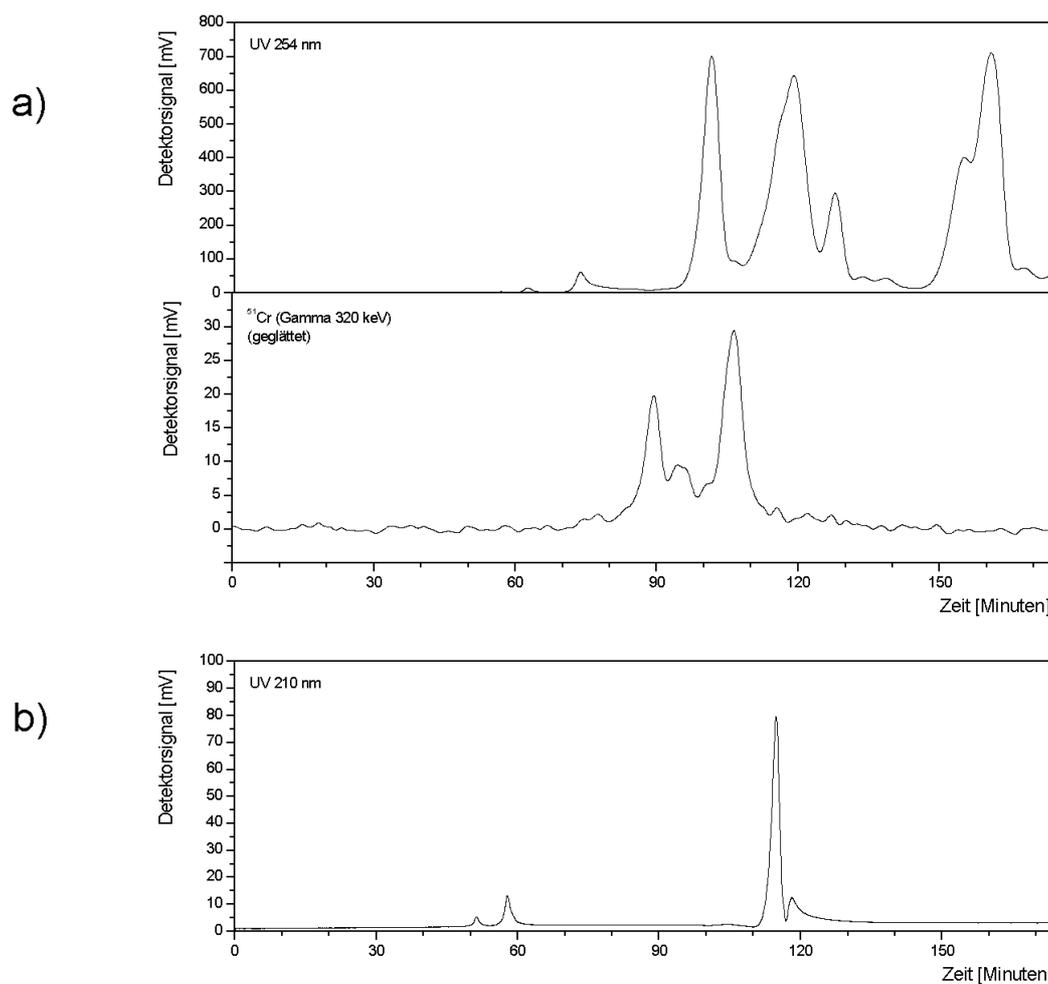


Abb. 37: a) Gelchromatogramm des 10 kDa Ultrafiltrats vom Hefe- Rohextrakt auf Toyopearl HW 40s (identisches Chromatogramm zu Abb. 21 mit online- Detektion der Radioaktivität von ^{51}Cr)

b) Gelchromatogramm von Kaliumtrioxalatochromat(III), 10 mg/L

Bedingungen: Säule Toyopearl HW 40s, 1cm*133cm; Eluent: 0,2 M KH_2PO_4 , 0,5 mL/min..
Probe: 490 μL .

- Davis und Vincent [91] berichteten über die Isolation eines anionischen Chromkomplexes in Milligrammengen, der in ihren Versuchen *in vitro* die Insulinwirkung steigerte, ein Molekulargewicht von 1480 Da besitzt und natürlicherweise u.a. in Rinderleber vorkommt. Obwohl es möglich erscheint, daß es Übereinstimmungen zwischen den in dieser Arbeit extrahierten Chromkomplexen und der Verbindung von Davis und Vincent gibt, berichteten die Autoren, daß sich ihre Verbindung von konventionellen Umkehrphasen- Säulen nicht eluieren läßt, was nicht dem Verhalten der in dieser Arbeit gewonnenen Chromkomplexe aus Hefeextrakten entspricht.

Es ist erstaunlich, daß trotz der Eigenschaft von Chrom(III), mit nukleophilen Liganden, wie sie in biologischen Matrices häufig vorkommen, leicht Verbindungen einzugehen, lediglich bis zu drei niedermolekulare Chromkomplexe nachgewiesen werden konnten. Dies deutet darauf hin, daß Chrom(III), sofern es in die Zelle gelangt ist, rasch von bestimmten Molekülen gebunden wird und so unspezifische Bindungen an metabolisch wichtige Strukturen der Zelle verhindert werden. Diese Interpretation stimmt gut mit den Befunden von Kunst und Roomans [296] überein, die mit Hilfe der Elektronenstrahlmikrosonde in in Gelatine- eingebetteten Gefrierschnitten von Hefe nach der Absorption eine rasche Aufnahme verschiedener Metallkationen, darunter auch Chrom(III), durch Polyphosphat- haltige Granülen beobachteten. Das Vorkommen großer Mengen an Polyphosphat in Bierhefe konnte bereits 1947 von Wiame [297] nachgewiesen werden. Diese Bindung von Chrom(III) an Polyphosphat könnte auch das Fehlen jeder wesentlichen UV- Absorption der in Hefeextrakten gefundenen Chromkomplexe zwischen 254 und 280 nm während der Chromatographie erklären. Polyphosphat- Granülen dienen neben Phytochelatinen und Metallothioneinen bei einigen Pilzarten der Entgiftung von Schwermetallionen [298]. Die Beteiligung an Mechanismen der Schwermetalldetoxifikation auch bei anderen biologischen Spezies wird diskutiert [299]. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von niedermolekularen Phosphatverbindungen, insbesondere Diphosphat, am inter- und intrazellulären Transport von Eisen [300][301] sowie an der Bindung von dreiwertigem Eisen innerhalb der Hefevakuole [302]. Die intrazelluläre Bindung von Chrom(III) an Polyphosphat in Hefe würde also keinen ungewöhnlichen Weg des Transports sowie der Entgiftung und intrazellulären Lagerung dieses Metallions darstellen.

Über das Auftreten einer höhermolekularen Chromspezies in Bierhefe ist in der Literatur bisher nichts berichtet worden. Das (geschätzte) Molekulargewicht der Verbindung von 40 kDa und ihre Eigenschaft, dreiwertiges Chrom zu binden, spricht dafür, daß es sich hierbei um Transferrin oder ein ähnliches Protein handeln könnte. Über das Vorkommen von Transferrin und seine Funktion in *Saccharomyces* gibt es bisher keine Erkenntnisse. Möglicherweise sind die Analogien zwischen einfachen Hefen und höheren Organismen hinsichtlich des Eisenmetabolismus noch größer, als bisher angenommen wird.

Aus den MALDI-TOF- und den ESI-MS- Massenspektren ergibt sich, daß in der mit Hilfe von Gel- und Ionenpaarchromatographie isolierten Probe noch nennenswerte Mengen von Verunreinigungen vorhanden sein müssen. Diese Verunreinigungen können von Bestandteilen der Hefe herrühren, könnten aber auch durch Verunreinigungen des im letzten Schritt der Aufarbeitung eingesetzten flüchtigen Puffers Ammoniumazetat eingeschleppt worden sein. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob zusätzliche Stufen der Aufreinigung erforderlich sind, um die für die Massenspektrometrie erforderliche hohe Reinheit der Fraktionen zu gewährleisten.

4.3. Chromspezies im verbrauchten Nährmedium der Hefekultur

Die Ausscheidung pharmakologisch relevanter Wirkstoffe durch Zellen in das Kulturmedium ist eine bekannte Tatsache. Es sollte daher überprüft werden, ob von der Hefe Chromkomplexe in das Kulturmedium ausgeschieden werden bzw. ob sich im Kulturmedium aus Ausscheidungsprodukten der Hefe und dem dort vorliegenden Chrom(III) stabile Komplexverbindungen bilden. Zu diesem Zweck wurde das Kulturmedium ohne Vorbehandlung den gleichen chromatographischen Verfahren wie die Hefeextrakte unterworfen.

Bei Vergleich des Elutionsmusters des verbrauchten Nährmediums (Abb. 32) mit dem des Extrakts aus Hefezellen (Abb. 16) zeigten sich bei der Gelchromatographie auf den ersten Blick nur geringe Unterschiede, wenn man vom Vorkommen des höhermo-

lekular gebundenen Chromanteils absieht. Im verbrauchten Nährmedium scheinen vier Chromspezies mit Molekulargewichten zwischen 300 und 800 Da zu existieren, während im Hefeextrakt drei Peaks mit Molekulargewichten zwischen 600 und 1100 Da auftreten. Das Ionenpaarchromatogramm des Kulturmediums (Abb. 33) zeigt allerdings im Vergleich zum entsprechenden Chromatogramm des Hefeextrakts (Abb. 24) ein vollständig anderes Erscheinungsbild. Aus diesen Chromatogrammen ergeben sich keinerlei Hinweise auf Chromkomplexe im Nährmedium, die denen in der Hefe entsprechen. Diese Beobachtung steht in Kontrast zu den Resultaten von Davies et al. [185], Kumpulainen et al. [190] und Haylock et al. [208], die ebenfalls das verbrauchte Nährmedium untersuchten und zumindest Ähnlichkeiten zwischen den Chromkomplexen aus Bierhefe und dem Kulturmedium feststellten. Während der Ionenpaarchromatographie wurde der größte Anteil des Chroms im Chromatogramm mit relativ geringer Retention innerhalb der ersten 5 mL eluiert, bei gleichzeitig sehr niedriger Auflösung zwischen den wenigstens vier unterschiedlichen Chromspezies. Hierbei erreicht die Wiederfindungsrate 80%. Wie ein Vergleich mit Abb. 25 zeigt, liegt ein nennenswerter Anteil an CrCl_3 bzw. Chrom(III)-hexaaquaion offensichtlich nicht vor. Weder mit einem anionischen Ionenpaarreagenz (Octansulfonsäure) noch ohne Ionenpaarreagenz konnte eine nennenswerte Retention der im Kulturmedium vorliegenden Chromkomplexe erreicht werden. Ähnlich wie im Fall des Hefeextrakts (Kapitel 4.2.2) muß daraus geschlossen werden, daß es sich bei diesen Substanzen bei dem gegebenen pH-Wert von 5,2 ebenfalls um anionische Verbindungen handelt. Der Grund für die niedrige Retentionszeit bei Verwendung kationischer Ionenpaarreagenzien ist unklar. Es könnte sein, daß es sich zumindest bei einem Teil der Substanzen um Zwitterionen handelt, die zusammen mit den gewählten Ionenpaarreagenzien nur schwach am hydrophoben Träger der Chromatographiesäule binden.

Nach der Aufkonzentration durch Gefriertrocknung im Verhältnis 8:1 von 5000 mL auf 600 mL haben sich das Gelchromatogramm (Abb. 34) und das Ionenpaarchromatographie-Chromatogramm (Abb. 35) drastisch verändert. Im Gelchromatogramm scheint sich die Verteilung der Chromspezies allgemein zu höheren Retentionszeiten, also zu niedrigeren Molekulargewichten, verschoben zu haben. Im Ionenpaarchromatogramm werden nur noch 25% der Chromspezies innerhalb der ersten 5 mL eluiert und die restlichen 75% verteilen sich mehr oder weniger gleichmäßig über die nächsten 15 mL des Elutionsvolumens. Dies deutet darauf hin, daß allein durch den Prozeß der Gefriertrocknung eine starke Veränderung der vorliegenden Spezies stattgefunden

hat. Der Grund dafür ist vermutlich in der während der Konzentrierung stark ansteigenden Ionenstärke im Kulturmedium zu suchen, wodurch die Gleichgewichte zwischen Kationen und ihren Liganden in der Lösung verschoben werden. Die thermodynamische Stabilität der anfangs vorliegenden Chromspezies scheint also recht gering und eine Aufarbeitung deshalb mit grundsätzlichen Schwierigkeiten verbunden zu sein.

4.4. Bewertung und Ausblick

Die Existenz eines chromhaltigen „Glukosetoleranzfaktors“ (GTF) mit Bierhefe als einer seiner ergiebigsten Quellen wurde zuerst von Schwarz und Mertz Ende der fünfziger Jahre postuliert. Seitdem wurden zahlreiche Versuche zu seiner Isolation unternommen, ohne daß eine Substanz mit den postulierten Eigenschaften gewonnen werden konnte.

Auch die vorliegende Arbeit kann die Existenz von in Bierhefe nativ vorliegenden Komplexen des dreiwertigen Chroms mit Eigenschaften eines bislang hypothetischen „Glukosetoleranzfaktors“ nicht stützen. Es bleibt aber offen, ob nicht spezielle Prozeduren der Vorbehandlung von chromhaltiger Bierhefe bzw. ihren Extrakten erst sekundär zur Bildung biologisch aktiver chromhaltiger Komplexe führen.

Insgesamt gesehen muß die Existenz eines speziellen Glukosetoleranzfaktors für den Metabolismus von Chrom im menschlichen und tierischen Organismus nicht zwingend gefordert werden. Die Annahmen, die ursprünglich zur Forderung nach einem chromhaltigen Glukosetoleranzfaktors führten, gelten bereits seit den achtziger Jahren als überholt (Kapitel 2.2.6.1). Die Anzahl der fundierten Studien, die *in vivo* eine positive Wirkung von Bierhefe-Extrakten auf den Glukose- und Lipidmetabolismus feststellten, ist überschaubar (Kapitel 2.2.6). Von insgesamt sechs als methodisch fundiert anzusehenden Studien an Ratten oder Mäusen konnten nur in zwei Studien positive Wirkungen von Bierhefe-Extrakten gezeigt werden. Von den insgesamt acht als methodisch fundiert einzuschätzenden Humanstudien waren lediglich in drei Studien positive Effekte zu verzeichnen. Von diesen wurde nur in einer Studie [149] über einen positiven Einfluß der Supplementation mit Chromhefe auf Insulinsensitivität und Blutglu-

kose berichtet. Die anderen beiden Studien konnten eine Verbesserung des Lipidstatus nachweisen [162][164]. Leider sind gerade die Humanstudien sehr heterogen, was die Auswahl der Versuchspersonen und die experimentellen Bedingungen angeht. Dadurch lassen sich die Ergebnisse nur schwer vergleichen. Die Experimente von Schwarz und Mertz in den fünfziger Jahren an Ratten, die den Ausgangspunkt für die weiteren Untersuchungen hinsichtlich der Bedeutung von Chrom als essentiellm Spurenelement bildeten und zur Forderung nach der Existenz des chromhaltigen Glukosetoleranzfaktors führten, konnten später nicht mehr reproduziert werden, ohne daß grundlegende Veränderungen des Versuchsprotokolls vorgenommen wurden [303][304]. Angesichts der großen experimentellen Probleme, die es heute bereitet, deutliche Symptome von Chrommangel in den meisten Tierarten zu erzeugen, ist es fraglich, ob Schwarz und Mertz und später auch Schroeder [305][306] tatsächlich mit Chrommangeltieren gearbeitet haben, insbesondere da sie den behaupteten niedrigen Chromgehalt der Diäten analytisch nicht kontrollieren konnten [307].

Im Unterschied zu den *in vivo*- Studien konnten Hefeextrakte vor allem *in vitro* im häufig eingesetzten Assay- System mit epididymalen Fettgewebe aus Ratten eine besondere Wirksamkeit gegenüber einfachen Chrom(III)- Salzen zeigen [128]. In einem später eingesetzten verbesserten Assay, in dem statt Fettgewebe einzelne Adipozyten eingesetzt wurden, konnte für Chrom(III)- chlorid und Chrom(III)- Azetat, im Gegensatz zu Hefeextrakten, keinerlei Wirkung mehr in Hinblick auf eine Verstärkung der Insulinwirkung demonstriert werden [170]. Zusammen mit dem Hefe- Assay (Kapitel 2.2.6.3) wurden diese Testsysteme routinemäßig zur Verfolgung der Aufreinigungszeduren für den Glukosetoleranzfaktor eingesetzt. Leider sind jedoch die *in vitro* Testsysteme mit Adipozyten sehr störanfällig. Zahlreiche Substanzen sind in der Lage, in diesen Tests entweder die Wirkung von Insulin zu verstärken oder selbst eine insulinmimetische Wirkung auszuüben [308][309][310][311]. Die Eignung des Hefe- Assays zur Bestimmung der Aktivität des Glukosetoleranzfaktors wurde daher grundsätzlich in Frage gestellt [289] und Ammonium- Kationen, die als Begleitsubstanz bei den häufig verwendeten ammoniakalischen Elutionen von Anionentauschersäulen in den Produkten auftreten, als ein Störfaktor beschrieben [312]. Eine dem Glukosetoleranzfaktor entsprechende Aktivität, die im Hefe- Assay wirksam ist, konnte auch in Autolysaten von Bierhefe in Form von Peptiden und Aminosäuren gefunden werden [313]. Sämtliche bisher eingesetzten Assay- Systeme reagieren also unspezifisch auf diverse Substanzen und sind daher für Aktivitätstest des Glukosetoleranzfaktors in komplexen

Stoffgemischen, wie sie z.B. Hefeextrakte darstellen, ungeeignet. Selbst die nach den üblichen Verfahren aus Hefe gewonnenen Fraktionen mit vorgegeblicher GTF- Aktivität erwiesen sich als höchst unrein [313]. Es ist daher nur folgerichtig, daß mehrere Autoren im Zuge der Aufreinigung der Hefeextrakte eine Trennung der biologischen Aktivität vom Chromgehalt feststellten [192][209][211]. Angesichts der Tatsache, daß für die Identifizierung des Glukosetoleranzfaktors und die Überprüfung seiner Aktivität durchgängig ungeeignete Verfahren angewandt wurden, ist lediglich von untergeordneter Bedeutung, daß die gängigen Verfahren zur Extraktion und Aufreinigung der „aktiven“ Hefeextrakte unweigerlich zu einer Zersetzung von Chromkomplexen führen müssen [314]. Vor diesem Hintergrund ist die Existenz eines chromhaltigen „Glukosetoleranzfaktors“ in Bierhefe auf Basis des heutigen Kenntnisstands grundsätzlich in Frage zu stellen. Auch in der vorliegenden Arbeit konnten keine Hinweise auf den ursprünglich postulierten „Glukosetoleranzfaktor“ gefunden werden. Die Frage nach der Bedeutung von Chrom als essentiellem Spurenelement bleibt aber von diesen Erkenntnissen unberührt.

Eine Identifizierung der in Hefeextrakten vorliegenden Chromspezies konnte in Rahmen dieser Arbeit nicht erreicht werden. Die gesamte in 40 g Hefe in Form niedermolekularer Chromspezies vorliegende Chrommenge betrug weniger als 10 µg. Um die Struktur dieser noch unbekanntenen Substanzen aufklären zu können, müßte die vorhandene Substanzmenge deutlich gesteigert werden. Dafür kommen zwei Möglichkeiten in Betracht: Entweder wird die Menge der mit ^{51}Cr radioaktiv markierten Hefe deutlich vergrößert oder der Chromgehalt des Kulturmediums deutlich erhöht. Die Erhöhung der Chromkonzentration im Kulturmedium ist nur begrenzt möglich. Bereits bei der zehnfachen Konzentration, wie sie in den gegenwärtigen Untersuchungen zum Einsatz kam, trat eine erste wachstumshemmende Wirkung auf. Eine weitere Erhöhung der Chromkonzentration im Nährmedium ist nur bei Verwendung speziell adaptierter Hefe möglich. Fraglich ist dabei allerdings, ob diese Anpassungsmechanismen der Hefe das Spektrum der gebildeten Chromspezies verändern. Eine Vergrößerung der zur Verfügung stehenden Substanzmenge kann über eine Steigerung der Hefeausbeute außerdem durch eine Erhöhung der Glukosekonzentration im Nährmedium oder durch Verwendung größerer Ansätze erreicht werden. Sofern der Chromgehalt wie in der vorliegenden Arbeit über eine Markierung mit ^{51}Cr bestimmt werden soll, stößt die Verwendung größerer Ansätze aufgrund der dann notwendigen großen Mengen an Radioaktivität an Grenzen. Insgesamt erscheint es zunächst ratsam, für weitere Versuche

zur Identifizierung der Chromspezies die Gesamtmenge der von Hefe gebildeten Chromspezies zu erhöhen durch eine Erhöhung der Chromkonzentration des Kulturmediums auf 10 mg/L kombiniert mit einer Vermehrung der Hefeausbeute um den Faktor 10 durch eine zehnfach erhöhte Glukosekonzentration. Auf diese Weise könnte die für weitere Experimente zur Verfügung stehende Menge der niedermolekularen Chromspezies ohne grundlegende Änderungen der Arbeitsweise wahrscheinlich um den Faktor 100 auf bis zu 1 mg erhöht werden, vorausgesetzt, daß sich das Spektrum der unter diesen Bedingungen gebildeten Chromspezies nicht wesentlich verändert.

Der Metabolismus von Chrom und der genaue Ort seiner behaupteten biologischen Funktion sind nach wie vor unklar. In dieser Hinsicht ist eine genaue Kenntnis des Verhaltens von Chrom im Stoffwechselgeschehen höherer Organismen notwendig. Voraussetzung dafür sind Fortschritte in der Speziationsanalyse von dreiwertigem Chrom. Die vorliegende Arbeit zeigt, daß mit geeigneten Methoden neue Erkenntnisse über das Vorliegen von Chromspezies in biologischen Matrices gewonnen werden können. Chemische Ähnlichkeiten von Chrom(III) und Eisen(III) und mögliche Gemeinsamkeiten zwischen Chrom- und Eisenstoffwechsel lassen erwarten, daß die gleichen Methoden, die in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung gekommen sind und die die Analyse von Chromspezies erlauben, sich auch zur Speziationsanalyse bisher unbekannter, niedermolekularer, intrazellulär vorkommender Eisenkomplexe [315][316] eignen.

5. EXPERIMENTELLES

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Bierhefe in einem Nährmedium definierter Zusammensetzung mit Zusatz von radioaktivem $^{51}\text{CrCl}_3$ gezogen und deren chromhaltige Inhaltsstoffe nach Aufschluß der Zellen mit Hilfe chromatographischer Methoden analysiert.

5.1. Allgemeine Laborausüstung

Die Arbeiten wurden im Isotopenlabor des Instituts für Anorganische und Angewandte Chemie der Universität Hamburg ausgeführt. Zur Durchführung der Arbeit standen neben den laborüblichen Arbeitsflächen auch Digestorien zur Verfügung. Um eine unnötige Strahlenexposition des Experimentators und anderer anwesender Personen durch γ -Strahlungsemissionen zu vermeiden, wurde ^{51}Cr stets in mit Bleiziegeln- und -Platten abgeschirmten Bereichen gehandhabt.

Weiterhin standen folgende Geräte zur Verfügung:

- Reinstwasseranlage „Milli-Q™ Plus mit CFOF 01205- Kartuschen- Set (mit spezifischen Leitfähigkeiten unter 56 nS) der Firma Millipore GmbH, Eschborn.
- Gefriertrocknungsanlage Christ Alpha 1-4 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode) mit einer Vakuumpumpe Vacuubrand RD4 (Vacuubrand GmbH, Wertheim) für größere Mengen Flüssigkeit in Rundkolben.
- Gefriertrocknungsanlage Hetosicc CD4 mit thermostatisierten Heizplatten (30°C) MTC 5 (Heto-Holten A/S, Allerød, Dänemark) mit einer Vakuumpumpe Pfeiffer-Balzars Duo004B (Pfeiffer Vacuum GmbH, Aßlar) für kleine Mengen.
- Kühlzentrifuge „Sorvall Superspeed RC 2B“ (Sorvall- Dupont de Nemours (Deutschland) GmbH, Bad Homburg) mit den Rotoren GSA und SS 34. Hierfür wurden Zentrifugationsröhrchen aus Polycarbonat (Nalgene-Nunc International,

Rochester, New York) verwendet. Die Adapter für die „Centrifree“- Ultrafiltrationseinheiten wurden in der feinmechanischen Werkstatt der chemischen Institute (Universität Hamburg) aus Polypropylen angefertigt.

- Ultrazentrifüge Beckman Typ L8-70 UZ (Beckman Deutschland, Unterschleißheim) mit einem Ti-70- Rotor.
- pH- Meter Typ 740 der Firma Knick (Berlin) mit pH- Elektrode Ingold U 402 M3 (Mettler-Toledo GmbH, Giessen).
- Kolbenhubpipetten der Firma Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH (Hamburg) mit festen und variablen Volumina zwischen 50 μ L und 1000 μ L mit Einweg- Pipettenspitzen von den Firmen Eppendorf -Netheler-Hinz und Sarstedt GmbH (Nümbrecht).

Folgendes Verbrauchsmaterial wurde verwendet:

- Einwegspritzen von B. Braun (Melsungen).
- Standard- Reaktionsgefäße (1,5 mL) von Sarstedt (selbststehend) und Brand (Wertheim).
- PVC- Einweghandschuhe (gepudert) von B.Braun („Manyl“).

5.2. Allgemeine Arbeitstechniken

Die Hefe wurde in einem Kulturmedium mit einem Chromgehalt von 1 mg/L gezogen. Die Gefahr einer unabsichtlichen Kontamination durch zusätzlich eingeschleppte Chrommengen war daher gering. Zur Sicherheit wurde dennoch auf Werkzeuge und Geräte aus Edelstahl verzichtet. Die verwendeten Laborbecher, Meßzylinder etc. waren aus Kunststoff oder Laborglas gefertigt. Zur Abmessung der Chemikalien kamen Spatel und Löffel aus Titan, Glas, Aluminium oder Kunststoff zum Einsatz.

Die verwendeten Werkzeuge und Geräte wurden durch mehrtägiges Einweichen in Extran[®] (Merck AG Darmstadt) in deioniertem Wasser bei 60-80°C und anschließende mechanische Handreinigung nebst Spülen in deionisiertem Wasser gesäubert. Die Ge-

räte und Werkzeuge für die Hefekultur wurden zusätzlich mit Reinstwasser gespült. Glasgeräte zur Aufnahme der HPLC- Puffer wurden zusätzlich kurz mit etwas Methanol (HPLC- Qualität) ausgeschüttelt.

Kleine Mengen aufgeschlossener Hefeproben wurden mit Spritzenfiltern „Spartan 30/A“ (0,2 µm und 1,2 µm Porengröße, Filtermembran aus Regeneratzellulose), Spartan 3/30 (0,2 µm Porengröße, Filtermembran Polyamid) sowie „FP 030/30“ (0,2 µm Porengröße, Filtermembran aus Zelluloseazetat) (alle Schleicher & Schüll GmbH, Dassel) filtriert. Sterilfiltration kleiner Mengen Flüssigkeit wurden mit „Minisart NML“ (Porengröße 0,2 µm, Filtermembran aus Zelluloseazetat, Sartorius AG, Göttingen) durchgeführt.

Die Glasperlen für den Zellaufschluß (Natron-Kalk- Glas (0,4- 0,5 mm) B. Braun, Melsungen) wurden vor Verwendung mehrere Stunden erst mit Extran[®], dann dreimal mit verdünnter Salpetersäure (Merck „Suprapur“) ausgekocht und schließlich mit Reinstwasser säurefrei gespült.

5.3. Zubereitung des Nährmediums

Die Nebenbestandteile des Nährmediums wurden in Form von sterilfiltrierten 100-fachen Konzentraten in Reinstwasser angesetzt. Zur Sterilfiltration kam ein Filtrationsgerät der Firma Nalge aus Polysulfon (Temperaturbeständigkeit bis 160°C) mit einer 0,22 µm- Membran aus Zelluloseacetat zum Einsatz. Das Filtrationsgerät wurde vor Verwendung drei Stunden im Trockenschrank bei 160°C sterilisiert. Die Nebenbestandteile des Nährmediums wurden in geeigneter Weise in vier Lösungen kombiniert. Dies waren im einzelnen:

- Salzmischung I:

KH_2PO_4	100 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	50 g/L
NaCl	50 g/L

- Salzmischung II:

CaCl ₂ · 6 H ₂ O	50 g/L
H ₃ BO ₃	50 mg/L
MnSO ₄ · H ₂ O	40 mg/L
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	40 mg/L
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	20 mg/L
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	20 mg/L
KI	10 mg/L
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	4 mg/L
+ 3 ml HCl 30%	

- Zusatz- Stickstoffquelle:

L- Histidin	1 g/L
L- Methionin	1 g/L
L- Tryptophan	1 g/L

- Wachstumsfaktoren:

Myo- Inositol	1 g/L
Calcium- Pantothenat	200 mg/L
Nikotinsäure	40 mg/L
Pyridoxin-HCl	40 mg/L
Thiamin-HCl	40 mg/L
Riboflavin	20 mg/L
Biotin	2 mg/L
Folsäure	200 µg/L

Die Wachstumsfaktoren- Mischung wurde im Dunkeln im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Zum Ansatz des fertigen Nährmediums wurden die berechneten Mengen der Konzentrate volumetrisch abgemessen und zu etwa 90% des notwendigen Gesamtvolumens an Reinstwasser gegeben. Die berechnete Menge Glukosemonohydrat, Ammoniumsulfat (als Konzentrat 350 g/L) und L- Asparagin wurde abgewogen bzw. in einem Meßzylinder abgemessen, der Mischung hinzugefügt und nach Auflösung in einem Autoklaven mindestens 20 Minuten bei 121°C sterilisiert. Nach dem Abkühlen und sterilem Verschließen war das vorbereitete Nährmedium im Dunkeln praktisch unbegrenzt haltbar. Vor Verwendung wurde zunächst das Konzentrat der Wachstumsfaktoren, anschließend die vorbereitete Tracerlösung und der inaktive Träger über einen Sterilfilter (0,2 µm) hinzugegeben und schließlich mit sterilem Reinstwasser auf die Gesamtmenge aufgefüllt.

Bei Ansatz der 5 L- Kulturen wurden vor dem Sterilisieren zur Anhebung des pH-Werts zusätzlich noch 5,25 mL einer wäßrigen Lösung von K_2HPO_4 der Konzentration 200 g/L, entsprechend 1,05 g K_2HPO_4 , hinzugefügt.

5.4. Markierungen mit ^{51}Cr

Der radioaktive Tracer ^{51}Cr wurde entweder von der Firma Amersham-Buchler, Braunschweig, bezogen oder durch Aktivierung von Reinstchrom im Forschungsreaktor Petten des „Joint Research Centre“ der Kommission der Europäischen Gemeinschaften, Petten, Niederlande, gewonnen.

5.4.1. Tracer der Firma Amersham-Buchler

Für die beiden 5 L- Ansätze wurden insgesamt zwei Chargen von ^{51}Cr mit folgenden Spezifikationen bezogen:

1. Ansatz (28.06. 1994): Chromium-51, Code CJS.2, Lot 191AB

Gesamtvolumen der Lösung: 2,875 mL, 0,087 M HCl mit 117,3 µg Chrom als CrCl₃

Gesamtaktivität am 11.07. 1994: 370 MBq (10 mCi)

2. Ansatz (11.08. 1995): Chromium-51, Code CJS.2, Lot 198AB

2 Portionen mit jeweils 185 MBq (5 mCi)

Gesamtvolumen der Lösung: 3,8 mL, 0,11 M HCl mit 104,9 µg Chrom als CrCl₃

Gesamtaktivität am 28.08. 1995: 370 MBq (10 mCi)

Die Tracer wurden zusammen mit der berechneten Menge an CrCl₃- Trägerlösung (Titrisol Standardlösung 1 g/L (Merck, Darmstadt)) über einen Sterilfilter dem Kulturmedium zugefügt. Hierbei wurde zuerst die Tracerlösung durch den Filter gegeben und anschließend mit Hilfe der Trägerlösung gewaschen.

5.4.2. Durch Bestrahlung von Reinstchrom gewonnene Tracer

Für die Tracer der 200 mL- Ansätze wurde Reinstchrom (16-22 Mesh Reinheit 99,995%, Alfa- Ventron GmbH Karlsruhe) zunächst mit 30%iger Salzsäure „Suprapur“ (Merck, Darmstadt) kurz angeätzt, gründlich mit Reinstwasser gespült und getrocknet.

Das geätzte Reinstchrom wurde in Portionen von 5 mg auf 0,5% (= 25 µg) genau abgewogen, in Suprasil- Ampullen (Heraeus, Hanau) eingeschmolzen und im Forschungsreaktor des „Joint Research Centre“ der Kommission der Europäischen Gemeinschaften in Petten in den Positionen „RIF“ und „HIFI“ mit Neutronenflußdichten zwischen $2 \cdot 10^{14}$ und $4 \cdot 10^{14}$ thermischen Neutronen $\cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ bis zu 25 Tage lang (maximal ein Betriebszyklus) bestrahlt. Dabei wurde eine Gesamtaktivität bis zu 2 GBq

für jeweils 5 mg Chrom erreicht. Nach Bestrahlungsende wurde die Quarzampulle aufgesägt und das darin befindliche Chrom nach Zufügen von 100 µL 30%iger Salzsäure „Suprapur“ (Merck, Darmstadt) innerhalb von 24 Stunden aufgelöst. Da nach dem Bestrahlungsprozeß eine starke Passivierung des Reinstchroms vorlag, die auch durch die Prozedur des Anätzens vor der Bestrahlung nicht verhindert werden konnte, mußte nach Zufügen der Salzsäure das in der aufgesägten Ampulle befindliche Chrom mit Hilfe einer Pasteur- Pipette mechanisch kurz durchgerührt werden. Das schließlich gelöste Chrom(III)-chlorid wurde anschließend quantitativ in einen 50 mL- Meßkolben überführt, mit Reinstwasser aufgefüllt und in ein 50 ml- Polypropylen- Weithalsgefäß überführt. Die genaue spezifische Aktivität dieser Lösungen wurde auf einem γ -Meßplatz mit Hilfe eines Reinstgermanium- Detektors (Canberra, Frankfurt/M.) nach Verdünnung 1:10.000 bestimmt. Tabelle 10 zeigt eine Übersicht:

Tabelle 10: Übersicht über die tatsächlich erhaltenen Aktivitäten zum Zeitpunkt der Messungen nach Bestrahlung von 5,0 mg Reinstchrom im Forschungsreaktor des „Joint Reserch Centre“ in Petten nach eigener Bestimmung:

Datum der Messung:	Gesamtaktivität:	Menge Chrom	Spez. Aktivität:	Verwendung für Ansatz:
05.02. 1992	820 MBq	4,9 mg	167 GBq/g	920411
08.01. 1993	1,96 GBq	5,0 mg	393 GBq/g	930120a,b 930129a,b 930408 930416a,b
28.05. 1993	602 MBq	5,0 mg	120 GBq/g	930611

Bei Ansatz der Kultur wurde die zum jeweiligen Zeitpunkt einer Aktivität von $7,4 \cdot 10^6$ Bq entsprechende Menge radioaktiver Chrom(III)-chlorid- Lösung abpipettiert, dem Kulturmedium (200 mL) hinzugefügt und anschließend im Autoklaven sterilisierter inaktiver Träger (CrCl_3 - Lösung 1 g/L „Titrisol“ (Merck, Darmstadt) zu einer Gesamtchromkonzentration von 1 mg Chrom/L im Nährmedium zugegeben, so daß sich unabhängig von der bereits zerfallenen Menge ^{51}Cr eine konstante spezifische Aktivität des eingesetzten CrCl_3 von $37 \cdot 10^6$ Bq \cdot mg $^{-1}$ Chrom ergab.

5.5. Gamma- Meßtechnik

Zur Messung der Radioaktivität des ^{51}Cr standen für die Radiochromatographie ein $3'' \cdot 3''$ NaI/Tl- Szintillationdetektor mit Bohrloch (Durchmesser der Bohrung 16 mm) als Durchflußdetektor (Canberra) und ein weiterer $3'' \cdot 3''$ NaI/Tl- Szintillationdetektor mit Bohrloch und Probenwechsler (Berthold Gammaszint BF 5300, Laboratorium Prof. Dr. Berthold GmbH & Co KG, Bad Wildbad) zur Verfügung.

Der Durchflußdetektor wurde lediglich orientierend für qualitative Zwecke eingesetzt und war mit einer selbstgefertigten Durchflußzelle in Form einer Teflon- Kapillare mit einem Volumen von 488 μL ausgestattet. Zur Abschirmung der Umgebungsstrahlung wurde der Detektor in eine passende Bleiburg eingestellt. Das Signal wurde über ein Ratemeter dem Auswertungssystem zugeleitet. Das Detektionssystem bestand aus folgenden Komponenten:

- Detektor 3 MW 3/3 mit Vorverstärker 2007 P (Canberra-Packard GmbH, Dreieich)
- Hochspannungsnetzteil 3102/2 (Canberra-Packard)
- Verstärker Canberra 1413 (Canberra-Packard)
- Einkanalanalysator TC 440 (Tennelec GmbH, Unterhaching)
- Ratemeter N-R-107 N (Wenzel Elektronik)

Die Effizienz des Detektors wurde mit Hilfe einer bekannten Aktivität von 25 kBq zu 53% bestimmt. Unter Verwendung der Probenschleife betrug die Effizienz noch ca. 27%. Die Einstellungen des Ratemeters wurden der jeweiligen Meßsituation angepaßt. Standardmäßig wurde in einem Meßbereich von 100 ips (entsprechend 500 mV Ausgangsspannung) bei einer Zeitkonstante von 3,3 μs gearbeitet. Der Arbeitsbereich des Einkanalanalysators wurde vor jedem Experiment mit Hilfe einer ^{51}Cr - Probe überprüft.

Die quantitativen Auswertungen des Chromgehalts der aus Hefe gewonnenen Extrakte und Fraktionen wurden ausnahmslos mit dem $3'' \cdot 3''$ NaI/Tl- Zweikanal- Szintillationdetektor mit Bohrloch und Probenwechsler (Berthold Gammaszint BF 5300) ausge-

führt. Die Totzeit des Detektors wurde mit Hilfe von ^{51}Cr - Proben mit bekannter Aktivität bestimmt. Abb. 38 zeigt den Zusammenhang zwischen der theoretischen Zählrate eines ^{51}Cr - Präparats (Aktivität der Probe unter Berücksichtigung der Emissionswahrscheinlichkeit) und der gemessenen Zählrate:

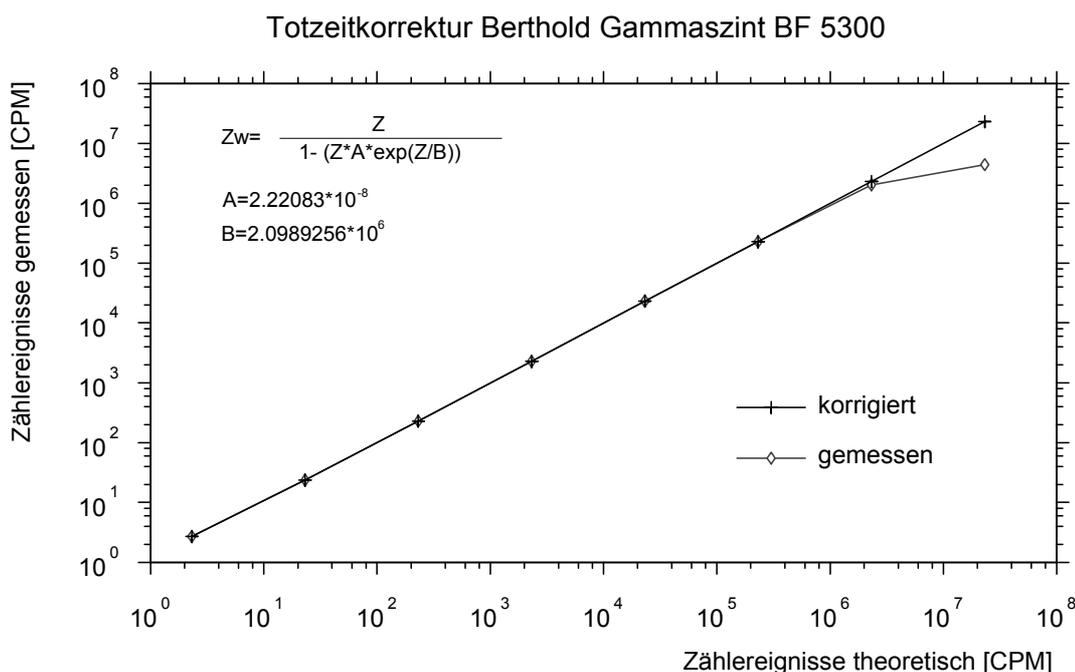


Abb. 38: Zusammenhang zwischen der theoretischen Zahl der Zählereignisse und der gemessenen Zählrate bei dem γ - Detektor Berthold BF 5300 und der Wirkung der Korrekturfunktion (Berechnung der „wahren“ Zählrate Z_w) für ^{51}Cr .

Eine Totzeitkorrektur ist demnach erst ab etwa 10^5 Zählereignissen pro Minute notwendig. Die Detektoreffizienz wurde mit Hilfe einer bekannten Aktivität (Kalibration über den Canberra- Meßplatz) zu 49% bestimmt. Vor jeder Serie von Messungen wurde der Arbeitsbereich des Einkanalanalysators auf die 320 keV- γ - Linie des ^{51}Cr optimal eingestellt. Die beiden Meßkanäle des Instruments unterschieden sich etwas in der Untergrundzählrate. Für alle Messungen wurden daher die Ergebnisse des besseren Kanals (Kanal 2) herangezogen. Der Untergrund von Kanal 2 betrug bei den Messungen von ^{51}Cr 13 - 15 Impulse/Minute. Nach DIN 25482 Teil 1 (1989) [317] und den dort tabellierten Werte für die Quantile der Standard- Normalverteilung (s.u.) ergibt sich

mit einem Untergrund von 15 Impulsen/Minute der Erwartungswert für die Nachweisgrenze der Nettozählrate r_n^* für eine Einzelmessung von $t_b = 10$ Minuten Dauer, sofern die Meßdauer für die Bestimmung des Untergrunds $t_0 = t_b$ angenommen wird, aus der Näherungsformel

$$r_n = (k_{1-\alpha} + k_{1-\beta}) \sqrt{r_0 \left(\frac{1}{t_0} + \frac{1}{t_b} \right)} \quad (15)$$

mit $k_{1-\alpha} \equiv$ Quantil der Standard-Normalverteilung für Fehler 1. Art (falsch positive Annahme eines Probenbeitrags mit einer Wahrscheinlichkeit von höchstens α) = 1,645 (für eine Fehlerwahrscheinlichkeit von 0,05 (5%- Niveau))

$k_{1-\beta} \equiv$ Quantil der Standard-Normalverteilung für Fehler 2. Art (falsch negative Annahme eines Probenbeitrags von höchstens β) = 1,645 (für eine Fehlerwahrscheinlichkeit von 0,05 (5%- Niveau))

$r_0 \equiv$ Erwartungswert der Nulleffektzählrate (15 Impulse/Minute)

zu $r_n^* = 9,87$ Impulse/Minute.

Dies entspricht bei einer Emissionswahrscheinlichkeit der 320 keV- Linie von ^{51}Cr von 9,88% und der Detektoreffizienz von 49% bei der angenommenen Meßzeit von jeweils 10 Minuten für die Bruttozählrate und die Zählrate des Untergrunds einer Nachweisgrenze von 3,4 Bq. Bei der eingesetzten spezifischen Aktivität des Chroms von $74 \cdot 10^6$ Bq/mg Cr ergibt sich daraus eine massenbezogene Nachweisgrenze für Chrom von 46 pg.

Zur Überprüfung der Aktivität der selbst aktivierten Proben wurde ein γ - Meßplatz mit Reinstgermaniumdetektor (Canberra) verwendet. Hierfür wurden die aktivierten Proben nach Verdünnung von 1:10000 in einer 20 mL- Geometrie (Liquid- Szintillationsgefäß aus Polypropylen der Firma Zinsser) auf einem Canberra- γ - Meßplatz mit folgender Konfiguration vermessen:

- Detektor „Canberra 7229P“ mit Kryostat „Model 7500“
- Vorverstärker „Canberra 200 1C“
- Verstärker „Canberra 2020“
- Vielkanalanalysator „Canberra Series 35+“
- Datenanalyse über einen „IBM PC AT“ mit „Spektran AT V. 3.02“

Die notwendige Geometrie wurde unter Verwendung von Standards der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt (PTB) (Braunschweig) kalibriert (Mischlösung 1 90/634).

5.6. Kultivierung der Hefe

Die Hefe wurde unter soweit möglich unter sterilen Bedingungen gehandhabt. Sofern Manipulationen an offenen Gefäßen notwendig waren, wurden diese in einer Sterilbox durchgeführt. Alle Kulturen, einschließlich der 5 L- Ansätze, wurden auf einem Rotationsschütteltisch (Firma Gerhadt) kultiviert. Die Kulturflaschen wurden mit Kapsenberg- Kappen aus Aluminium verschlossen, um Gasaustausch zu ermöglichen. Für die 5 L- Ansätze wurde mit Hilfe einer 10 L- Laborflasche ein metallfreies Kulturgefäß konstruiert, das über einen mehrfach durchbohrten Stopfen mit einer kleinen Membranluftpumpe über einen Watte- und einen Sterilfilter (hydrophob 0,45 µm) konstant belüftet wurde (ca. 1 L/Min.) (Abb. 39):

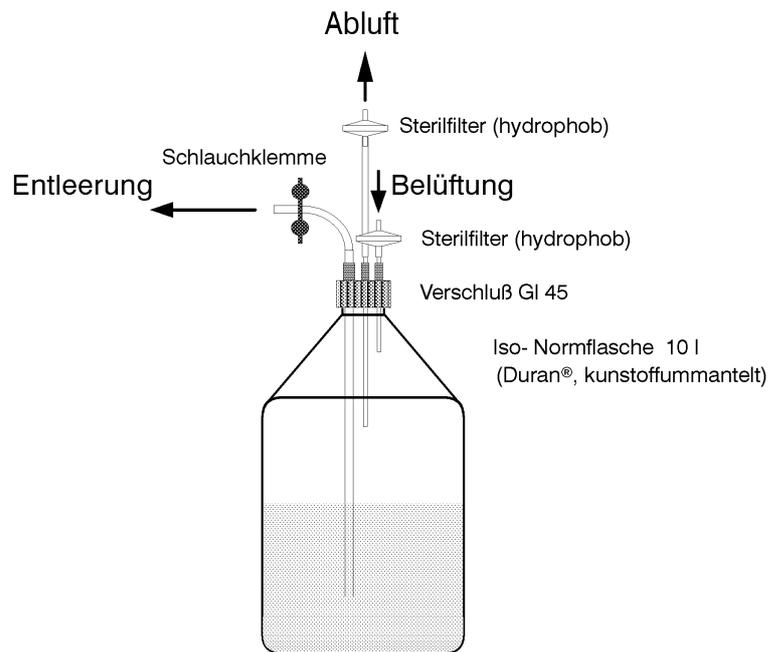


Abb. 39: Kulturgefäß für die 5 L- Hefekulturen

Die eingesetzte Heferasse „DSM 70449“ der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ (DSM, Braunschweig) wurde in Form von Schrägagar- Kulturröhrchen bezogen. Die Starterkulturen mit einem Volumen von 100 mL wurden im Standardnährmedium in 250 mL- Laborglasflaschen angesetzt, bei denen der Schraubdeckel während der Wachstumsphase der Kultur nur lose verschlossen und mit Aluminiumfolie abgedeckt wurde. Die Starterkulturen wurden unter Verwendung von Einmal- Impfösen aus Polystyrol von den Schrägagar- Kulturen beimpft. Nach Abschluß der Wachstumsphase nach zwei Wochen wurde das Laborglas durch Verschrauben fest verschlossen und die Hefe bis zur Verwendung im Kühlschrank bei ca. 4°C bis zu 3 Monate gelagert. Die Starterkulturen erreichten wie die Hauptkulturen eine Zelldichte von $60 \cdot 10^6$ bis $90 \cdot 10^6$ Zellen/mL.

5.7. Bestimmung der Biomasse

Die Zelldichte wurde nach gründlichem Aufschütteln der zu messenden Suspension in einer daraus entnommenen Probe mit Hilfe eines Hemocytometers nach Thoma durch Auszählen bei 400- facher Vergrößerung bestimmt.

Das Feuchtgewicht sedimentierter Zellen oder Zellbestandteile wurde entweder direkt aus der Auswage zuvor tariertter Zentrifugenröhrchen oder durch Entnahme und Auswage eines Anteils des Sediments bestimmt. Der Fehler bei dieser Prozedur hängt maßgeblich vom Wassergehalt des Sediments ab und ist schwer abzuschätzen. Es kann jedoch angenommen werden, daß hier eine Genauigkeit von 10% erreicht werden kann.

5.8. Zellernte

Am Ende der Wachstumsphase nach 8 bis 10 Tagen wurden die Hefezellen vom Kulturmedium getrennt und anschließend aufgearbeitet.

Zur Ernte der Zellen wurden die Kulturen aus den 0,2 L- Ansätzen über einen Filtrationsapparat im Wasserstrahlvakuum über einen Glasfaser- Filter (Typ Whatman GFC) abgesaugt und der Zellkuchen (ca. 1-1,5 g) anschließend mit jeweils zwei Portionen von jeweils 50 mL kalter 0,2 M KH_2PO_4 gewaschen. Die großen Ansätze (5 L) wurden bei 14°C in mehreren Durchläufen in 250 mL- Zentrifugenbechern bei 6000 upm abzentrifugiert (Zentrifuge Sorvall Superspeed RC-2B, Rotor GSA), da das maximale Fassungsvermögen des Rotors $6 \cdot 0,25 \text{ L} = 1,5 \text{ L}$ betrug. Schließlich wurde die Gesamtmenge Hefe (ca. 40 g) unter gleichen Bedingungen insgesamt drei Mal in insgesamt 650 mL kalter 0,2 M KH_2PO_4 gewaschen.

Das Zentrifugat (verbrauchtes Nährmedium) wurde, sofern eine weitere Aufarbeitung geplant war, über einen Glasfaser- Filter (Whatman GFC, Durchmesser 47 mm (Whatman Scientific Ltd., Springfield Mill, Maidstone (Großbritannien))) filtriert und bis zur Verwendung tiefgefroren (-18°C).

5.9. Zellaufschluß

Das Aufschlußgerät für kleine Mengen Hefe (bis 3 g Feuchtgewicht) auf Basis eines „Heidolph- Reax“- Mixers (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach) zeigt Abb. 40:

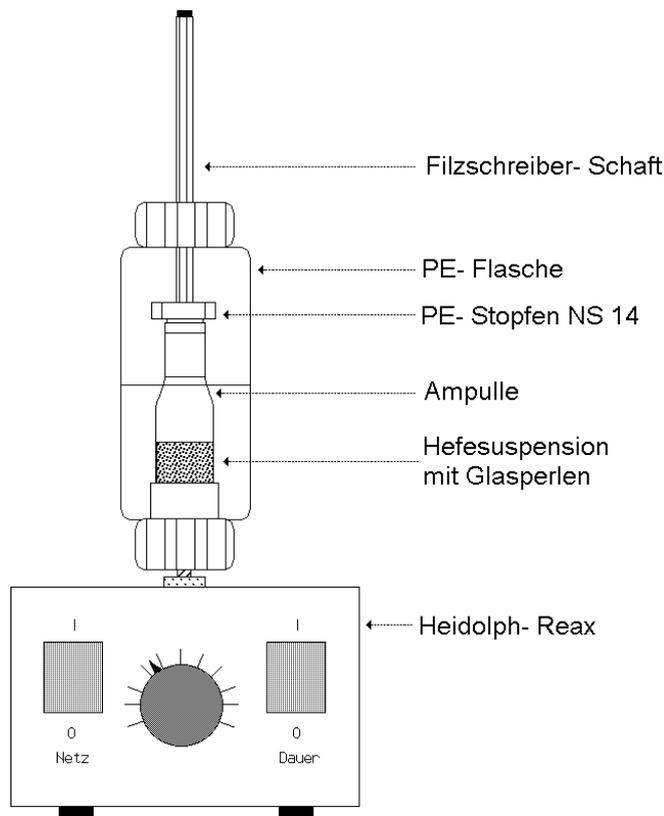


Abb. 40: Apparatur zum Aufschluß kleiner Mengen Hefe mit Glasperlen

Für den Aufschluß kleiner Mengen (1 bis 3 g Feuchtgewicht) wurde die Hefe in konzentrierter Suspension von ca. 5 mL in kalter 0,2 M KH_2PO_4 mit vorgekühlten Glasperlen (0,4 - 0,5 mm) im Volumenverhältnis 1:1 vermischt, in die dickwandige vorgekühlte Schüttelampulle (mit NS 14 · 20 Schliff) gegeben und verschlossen. Das Polyethylengefäß wurde zu ca. 2/3 mit Eiswasser gefüllt, die Behälter zusammengesetzt und mit dem Triebzapfen des Whirl-Mixers verschraubt. Anschließend wurde ein

dickwandiger Vakuum- Gummischlauch über den Schaft des Filzschreibers geschoben und am anderen Ende nach Einschieben einer kurzen Stativstange in einer Techno-klammer befestigt. Die Hefe wurde dann zusammen mit den Glasperlen unter stetiger Kühlung 15 Minuten lang geschüttelt. Anschließend wurde die aufgeschlossene Suspension mit Hilfe einer Pasteur-Pipette von den Glasperlen abpipettiert, wobei sich etwa 60% der Gesamtmenge wiedergewinnen ließen.

Für den Aufschluß größerer Mengen von Hefe (ca. 40 g Feuchtgewicht) wurde eine Rührwerkskugelmühle ähnlich der von Novotný [274] unter Verwendung von Planflanschkolben angefertigt. Abb. 41 zeigt das Gerät:

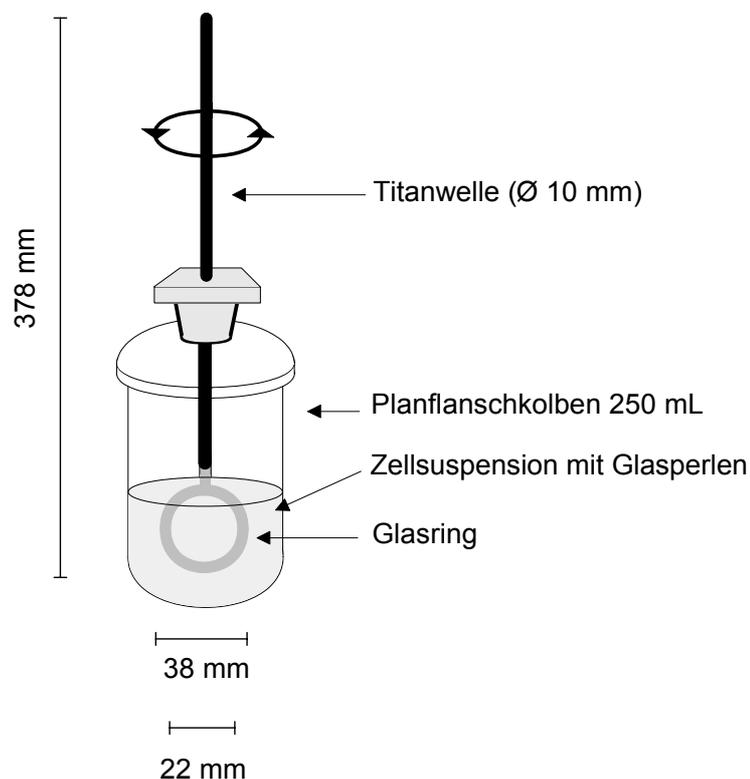


Abb. 41: Rührwerkskugelmühle zum Aufschluß größerer Mengen Hefe mit Glasperlen. Die angegebenen Maße beziehen sich auf die Abmessungen der Rührwelle. Während des Aufschlusses wurde das Gerät in einem 5 L- Eimer mit Eiswasser gekühlt.

Das Gerät wurde durch einen 180W- Universalmotor (Morat R 270, Framo Geräte-technik Franz Morat KG (GmbH&Co), D-79871 Eisenbach) mit separatem Drehzahl-steller (Nolta Typ 82.2.0003 40W-600W, Nolta GmbH, 35091 Cölbe)) angetrieben. Mit dieser Rührwerkskugelmühle konnten in kurzer Zeit ohne wesentliche Tempera-turerhöhung hohe Aufschlußgrade erzielt werden, wie Abb. 42 zeigt:

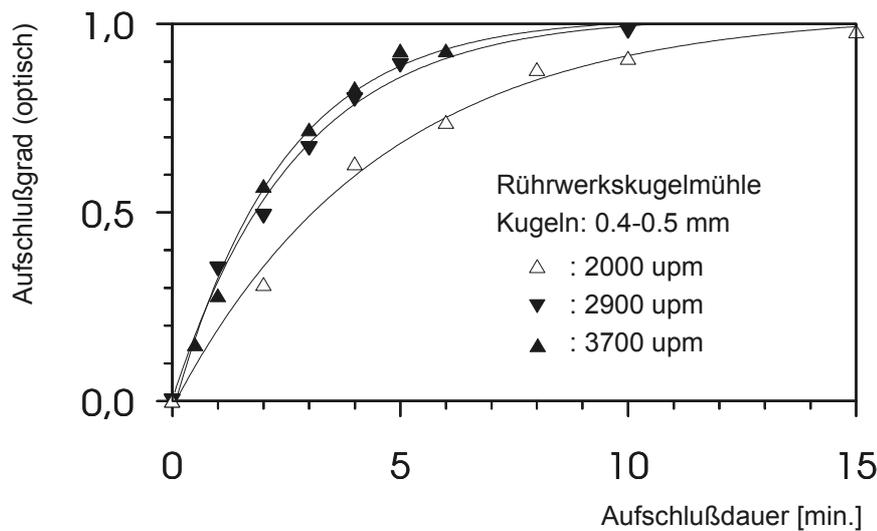


Abb. 42: Mikroskopisch bestimmter Aufschlußgrad der Hefe in der Rührwerkskugelmühle in Abhän-gigkeit von der Aufschlußdauer. Die Messung der Drehzahl erfolgte optoelektronisch mit ei-nem selbstgebauten analogen Drehzahlmeßgerät.

Die Hefe wurde im Verhältnis 2,5:1 mit kalter 0,2 M KH_2PO_4 vermischt und zusam-men mit eisgekühlten Glasperlen (0,4 - 0,5 mm) im Verhältnis 1:1 zur Suspension 10 Minuten bei 2900 U/min. unter Eiskühlung gerührt. Anschließend wurde die Suspensi-on entweder mit Hilfe einer Pipette und Saugflasche aus den Glasperlen abgesaugt (Ausbeute ca. 40%) oder durch Absaugen über eine Glasfritte (G3) von den Glasperlen getrennt (Ausbeute ca. 75%).

5.10. Ultrafiltration mit Hilfe von „Centricon“- UF-Zentrifugenröhrchen

Zur Aufreinigung des Rohhomogenats wurden in einem Fall Ultrafiltrations- Konzentratoren der Firma Amicon vom Typ „Centriprep[®] 10“ mit einer nominalen Trenngrenze von 10 kD eingesetzt. „Centriprep[®]“- Konzentratoren können pro Röhrchen 5-15 mL Lösung aufnehmen und sind mit einer Amicon Ultrafiltrationsmembran Typ YMT ausgestattet. Die Trennung („Molekularfiltration“) erfolgt durch Anwendung der Zentrifugalkraft in einer Zentrifuge (Sorvall Superspeed RC-2B, Rotor GSA) bei $3000 \cdot g$ über 10 Std. bei einer Temperatur von 4°C . Dadurch war eine effektive Abtrennung hochmolekularer Substanzen aus dem filtrierten Rohhomogenat ohne Verdünnung der Probe und bei minimalen Verlusten möglich. Vor Gebrauch wurden die Membranen der Konzentratoren mit 10 mL Reinstwasser gespült, um Spuren von Glycerin und Natriumazid zu entfernen.

5.11. Chromatographie

Die Aufreinigung und Analyse der Hefeextrakte wurde mittels Gelchromatographie und Ionenpaarchromatographie auf Umkehrphasen durchgeführt. Hierfür standen zwei metallfreie, aber ansonsten konventionelle Chromatographiestände zur Verfügung. Sämtliche Eluentenwege bestanden, soweit nicht anders angegeben, aus „metallfreien“ Materialien (Teflon, PEEK, Titan).

5.11.1. Gelchromatographie

Die Gelchromatographie wurde auf Toyopearl HW 40s (Tosoh- Haas GmbH, Stuttgart) bzw. Fractogel HW 40s (Merck, Darmstadt) oder Toyopearl (Fractogel) HW 55s durchgeführt. Zur Anwendung kamen ausschließlich Mitteldruck- Glassäulen Typ „Superformance“ (Merck) der Dimension $1 \text{ cm} \cdot 60 \text{ cm}$ oder $1 \text{ cm} \cdot 133 \text{ cm}$ (Kopplung

zweier 60 cm- Säulen) bzw. 1,6 cm · 60 cm (jeweils Durchmesser · Länge) zum Einsatz. Für hauptsächlich präparative Zwecke wurde eine Glassäule der Dimension 2,5 cm · 50 cm (Kronwald GmbH, Sinsheim) eingesetzt. Die Säulen wurden entsprechend den Vorgaben des Herstellers nach der „Slurry- Technik“ bei konstanter Flußrate unter Verwendung des Eluenten (0,2 M KH_2PO_4) gepackt. Für die Packung der „Superformance“- Säulen wurde dabei ein Füllrohr eingesetzt. Der Zustand der Säulen wurde nach der Packung und außerdem regelmäßig überprüft mit Hilfe einer Standardprobe bestehend aus Dextran- Blau 120 mg/L, Kaliumtrisoxalatochromat(III) ($\text{K}_3[\text{Cr}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]$) 10 mg/L, CrCl_3 27 mg/L und NaN_3 22 mg/L. Um Algenwachstum zu unterdrücken, wurden die Säulen mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt.

Die verwendeten Eluenten 0,2 M KH_2PO_4 und 0,2 M NH_4Ac wurden in Reinstwasser angesetzt und anschließend mindestens 12 Stunden auf ca. 60°C erwärmt, um gelöste Gase weitgehend auszutreiben.

Zur Förderung des Eluenten wurden ausschließlich metallfreie HPLC- und MPLC-Pumpen der Firma Besta HD-2-400 (Besta- Technik für Chromatographie GmbH, Wilhelmsfeld) und Gynkotek M300Ti (Titan- Version) (Gynkotek GmbH, Germering) eingesetzt. Der maximale Betriebsdruck der Gelsäulen betrug 7 Bar. Die Probenaufgabe geschah über ein metallfreies Sechshebe- Ventil (Material Teflon, Hersteller unbekannt) für Mitteldruck- Chromatographie. Die benötigten Probenschleifen wurden aus Teflonschlauch selbst gefertigt und ihr Volumen durch Auswiegen einer eingeschlossenen Menge Wasser im montierten Zustand bestimmt.

In Arbeitspausen wurden die Säulen mit reduzierter Flußrate (0,05 mL/Min.) gespült. Während längerer Arbeitspausen (>24h) wurden die Säulen mit 0,2 M KH_2PO_4 unter Zusatz von NaN_3 in einer 0,05%igen Lösung gespült und aufbewahrt. Zur Schonung der Säulen wurden die Hefe- Extrakt- Proben bei der Injektion durch einen 0,2 µm Spritzenfilter Spartan 30/A“ (Schleicher & Schüll GmbH, Dassel) filtriert.

5.11.2. Ionenpaarchromatographie

Die Ionenpaarchromatographie wurde auf einem „Lichrospher[®]- Glaskartuschensystem (Merck), 3 mm · 150 mm mit Vorsäule 3 mm · 3 mm (Durchmesser · Länge)

durchgeführt. Die Ein- und Auslaßfritten bestanden aus Edelstahl, der Säulenmantel aus Glas. Die Probenaufgabe erfolgte über ein metallfreies Sechsweg- Ventil (Rheodyne 7125, Cotati (USA), Titan- Ausführung) über einen 0,2 µm Spritzenfilter. (Minisart NML).

Die verwendeten Eluenten wurden nach der Mischung kontinuierlich mit Helium 4.0 entgast. Die verwendeten Säulen wurden regelmäßig mit 90%igem Methanol/Wasser (v/v) gespült, um Verunreinigungen zu entfernen.

Zur Eluentenförderung wurde die metallfreie Niederdruck- Gradientenpumpe Gynkotek M480Ti (Gynkotek GmbH, Germering, Titan- Version) eingesetzt.

5.11.3. Detektion

Für die Detektion am Auslauf der Chromatographie- Säulen standen ein γ - Durchflußdetektor (siehe Kapitel 5.5) und ein UV-Vis- Detektor Gynkotek SP6V (identisch zu Shimadzu SP6V) zur Verfügung. Der UV- Detektor besaß als einziges der verwendeten Geräte Solvent- Leitungen aus Edelstahl. Zur Detektion der Radioaktivität des ^{51}Cr siehe Kapitel 5.5. Zur Sammlung der Fraktionen wurde ein Fraktionssammler Typ Redifrac (Pharmacia, Heidelberg) eingesetzt. Eine Übersicht über die Kombination der Detektoren gibt Abb. 43:

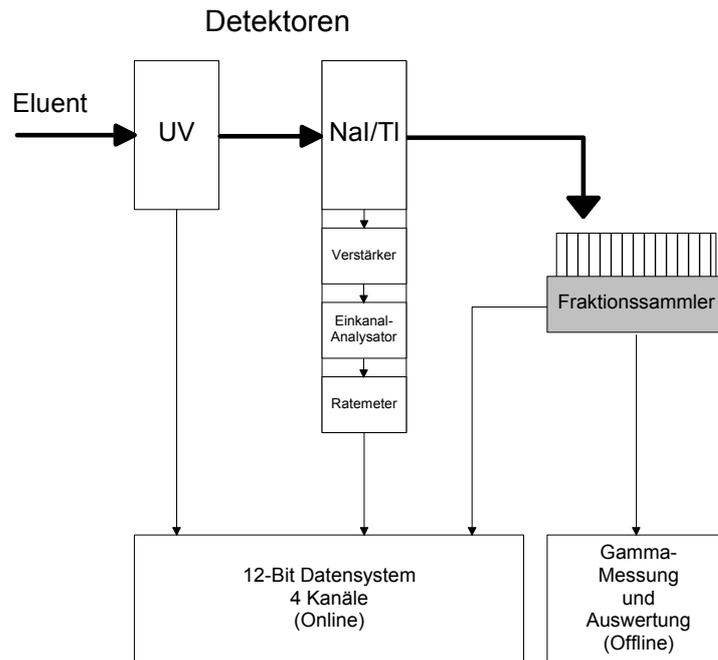


Abb. 43: Eingesetztes Detektionssystem für die Säulenchromatographie

Durch die sequentielle Anordnung der Detektionssysteme im Säulenauslauf ergab sich eine zeitliche Verzögerung der Detektorantwort der einzelnen Detektoren, die bei der Korrelation der einzelnen Daten untereinander zu berücksichtigen war. Diese „Offset“-Werte wurden durch Injektion einer Probe radioaktiven $^{51}\text{CrCl}_3$ ohne zwischengeschaltete Chromatographiesäule bestimmt:

a) Offset- Werte der Konfiguration bis Ende 1994:

UV- Detektor	: 0 μL
γ - Durchflußdetektor	: + (320 \pm 20) μL (gegenüber UV- Detektor)
Fraktionssammler	: + (1039 \pm 30) μL (gegenüber UV- Detektor)

b) Offset- Werte ab 1995:

UV- Detektor	: 0 μL
γ - Durchflußdetektor	: + (250 \pm 30) μL (gegenüber UV- Detektor)
Fraktionssammler	: + (1305 \pm 30) μL (gegenüber UV- Detektor)

(Fehlerangaben geschätzt). Bei einer Flußrate von 0,5 ml/min. erfolgt die Detektorantwort des γ - Durchflußdetektors mit etwa 30 Sekunden Verzögerung. Das Signalmaximum trifft am Fraktionssammler mit etwa 2,5 Minuten Verzögerung ein, was bei 1 Fraktion/Minute ca. 2-3 Fraktionen entspricht.

5.11.4. Aufzeichnung und Verarbeitung der Chromatographiedaten

Die von den Detektoren gelieferten Daten wurden über einen 12-Bit AD- Wandler mit automatischer Meßbereichsumschaltung (Auflösung 1,3 μ V) einem Atari ST- Computer zugeleitet und dort mit Hilfe einer eigens entwickelten Software ausgewertet bzw. dargestellt (F&A Gibau, Hamburg). Die gesammelten Fraktionen wurden in einem NaI/Tl- Szintillationsdetektor mit Einkanalanalysator Berthold BF 5300 bei jeweils konstanter Meßzeit für die einzelnen Fraktionen vermessen.

Die nachfolgende Auswertung der Zählraten wurde zur Vereinfachung routinemäßig mit einem selbstgeschriebenen Programm in Omikron.Basic (Omikron Soft & Hardware GmbH, Pforzheim) auf einem Atari ST (Atari, Sunnyvale, Kalifornien (USA)) unter Berücksichtigung der empirisch ermittelten Detektortotzeit und dem Zerfall des Nuklids durchgeführt. Der Chromgehalt der Proben wurde dabei nach Untergrundkorrektur durch Vergleich mit zeitlich in unmittelbarem Zusammenhang gemessenen Standardproben bestimmt. Der Meßfehler wurde auf Grundlage der Poisson- Statistik aus den Zählraten der Untergrundmessungen, der Standardmessungen und der Probe nach Anwendung des Fehlerfortpflanzungsgesetzes ermittelt. Um Einflüsse einer eventuellen Drift des Instruments zu minimieren, wurde bei länger dauernden Meßreihen, wie sie sich bei der Auswertung der zahlenmäßig umfangreichen Fraktionen eines Chromatographielaufs ergaben, innerhalb der Meßreihe mehrere Standardproben mitgemessen. Die Meßzeit für die Vermessung einer einzelnen Fraktion betrug je nach Aktivität der Proben zwischen 10 und 40 Minuten.

5.11.5. Abschätzung der Molekulargewichte

Die Molekulargewichte einzelner Chromfraktionen wurden mittels Gelchromatographie durch Vergleich mit einer Kalibrationskurve aus Polyethylenglykolstandards (Polymer- Laboratories (Shropshire, Großbritannien), deutscher Vertrieb bei Mache-rey-Nagel, Düren) geschätzt. Für die Bestimmung des Ausschlußvolumens V_o wurde Dextran-Blau (Molekulargewicht 2 MDa) verwendet. Im niedermolekularen Bereich wurde eine Gelsäule mit Toyopearl HW 40s der Dimension 1 cm · 133 cm eingesetzt. Im hochmolekularen Bereich kam eine Säule mit Toyopearl HW 55s der Dimension 1 cm · 60 cm (jeweils Durchmesser · Länge) zum Einsatz. Zur Aufnahme der Kalibra-tionskurve wurden die Polyethylenglykolstands in einer Konzentration von ca. 5% in Wasser oder dem Eluenten gelöst und auf die Säule gegeben. Die Detektion der im UV- Bereich nur schwach absorbierenden Proben wurde bei 210 nm vorgenommen.

5.11.5.1. Bestimmung von Molekulargewichten auf Toyopearl HW 55s (hochmolekulare Fraktion):

Abb. 44 zeigt die Kalibrationskurve von Toyopearl HW 55s in einer Säule mit den Dimensionen 1 cm · 60 cm:

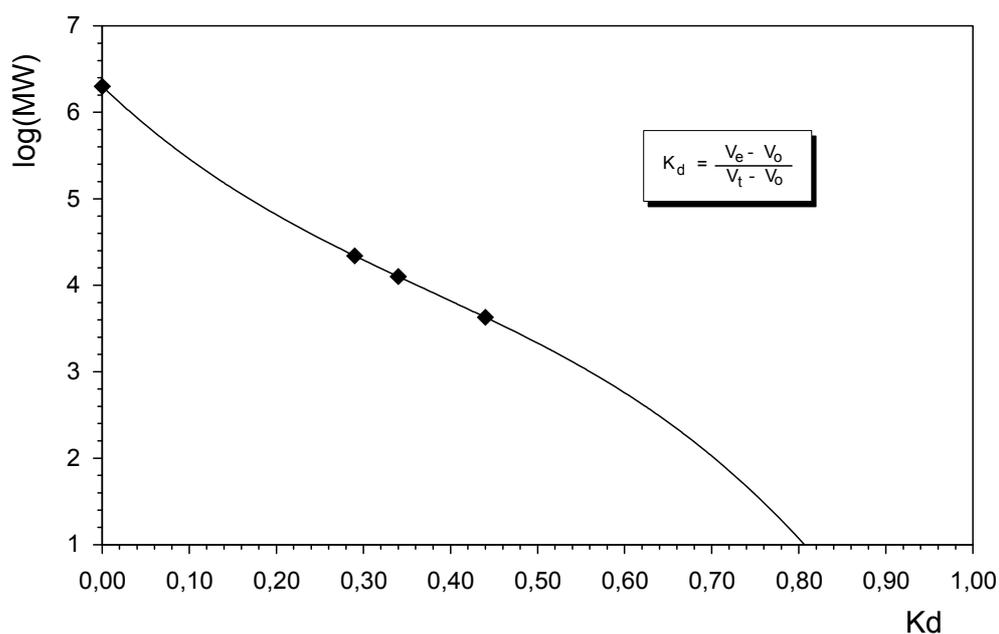


Abb. 44: Molekulargewichts- Kalibration von Toyopearl HW 55s 1 cm · 60 cm;
Eluent: 0,2 M KH_2PO_4 , 0,5 mL/min.. Proben: jeweils 100 μL in Wasser.

Zur Kalibration dieser Säule wurden verwendet: PEG 4250, PEG 12600, PEG 22000, Dextran- Blau 2 MDa. Zur Definition von K_d siehe Kapitel 2.3.6.1.1.

Das Elutionsvolumen der entsprechenden Fraktion konnte aufgrund ausreichender Aktivität der Probe in diesem Fall nach der Ausgabe des On-line Radioaktivitätsdetektors bestimmt werden. Nach der entsprechenden Korrektur des Elutionsvolumens von - 320 μL auf die Skala des UV- Detektors (siehe Kapitel 5.11.3) ergeben sich mit $V_o = 16,07$ mL und $V_t = 47,12$ mL anhand der Kalibrierungskurve folgende Werte für die Molmasse, wenn für das Elutionsvolumen eine Spannweite von $\pm 0,5$ mL angenommen wird:

Elutionsvolumen $V_e = (23,39 \pm 0,5)$ mL; $K_d = (0,236 \pm 0,016)$

Fraktion 40000 Da : 34674 Da - 50118 Da (mittlerer Wert: 40738 Da)

5.11.5.2. Bestimmung von Molekulargewichten auf Toyopearl HW 40s (niedermolekulare Fraktionen)

Abb. 45 zeigt die Kalibrationskurve von Toyopearl HW 40s in einer Säule mit den Dimensionen 1 cm · 133 cm:

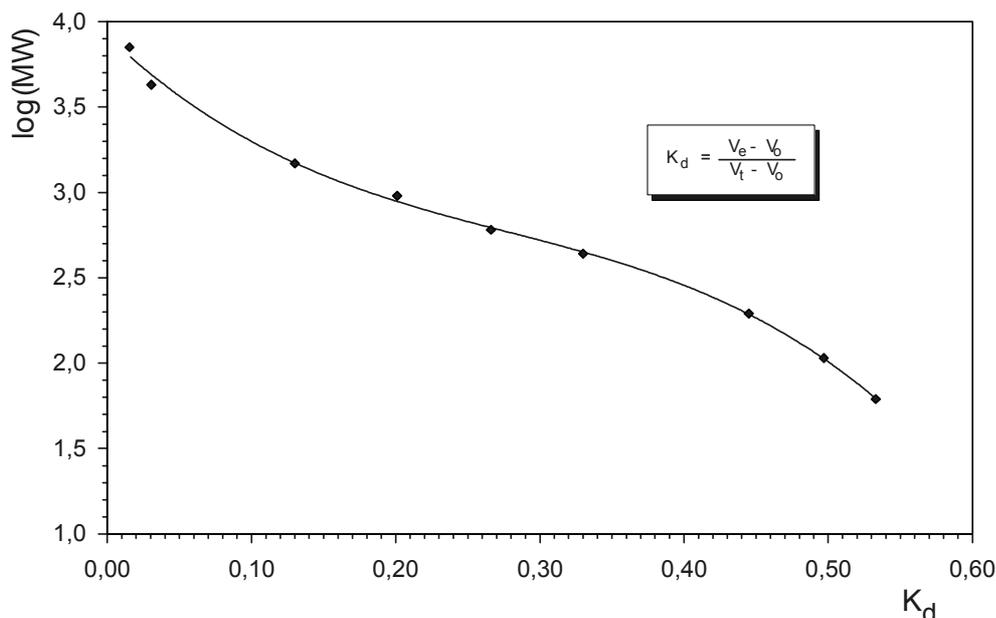


Abb. 45: Molekulargewichts- Kalibration von Toyopearl HW 40s 1 cm · 133 cm;
Eluent: 0,2 M KH_2PO_4 , 0,5 mL/min.. Proben: jeweils 490 μL im Eluenten.

Zur Kalibration dieser Säule wurden verwendet: Ethylenglykol 62 Da; Diethylenglykol 106 Da; PEG 194, PEG 440, PEG 600, PEG 960, PEG 1470, PEG 4250, PEG 7100. Zur Definition von K_d siehe Kapitel 2.3.6.1.1.

5.11.5.2.1. Fraktionen aus dem Hefeextrakt

Das Elutionsvolumen wurde in diesem Fall nach dem aus den gesammelten Fraktionen rekonstruierten Chromatogramm berechnet. Nach der entsprechenden Korrektur des Elutionsvolumens von -1305 μL auf die Skala des UV- Detektors (siehe Kapitel 5.11.3) ergeben sich mit $V_0 = 29,94$ mL und $V_t = 104,46$ mL anhand der Kalibrati-

onskurve folgende Werte für die Molmasse, wenn für das Elutionsvolumen eine Spannweite von $\pm 0,5$ ml (entsprechend einer Fraktion) angenommen wird:

- Elutionsvolumen $V_e = (43,76 \pm 0,5)$ mL; $K_d = (0,171 \pm 0,007)$
 \Rightarrow 1047 - 1175 Da (mittlerer Wert: 1071 Da, gerundet 1100 Da)
- Elutionsvolumen $V_e = (46,56 \pm 0,5)$ mL; $K_d = (0,209 \pm 0,007)$
 \Rightarrow 794 - 851 Da (mittlerer Wert: 831 Da, gerundet 800 Da)
- Elutionsvolumen $V_e = (52,09 \pm 0,5)$ mL; $K_d = (0,283 \pm 0,007)$
 \Rightarrow 562 - 603 Da (mittlerer Wert: 575 Da, gerundet 600 Da)

5.11.5.2.2. Fraktionen aus dem Nährmedium

Das Elutionsvolumen der entsprechenden Fraktion konnte aufgrund ausreichender Aktivität der Probe in diesem Fall nach der Ausgabe des On-line Radioaktivitätsdetektors bestimmt werden. Nach der entsprechenden Korrektur des Elutionsvolumens von - 250 μ L auf die Skala des UV- Detektors (siehe Kapitel 5.11.3) ergeben sich mit $V_o = 29,71$ mL und $V_t = 104,46$ mL anhand der Kalibrationskurve folgende Werte für die Molmasse, wenn für das Elutionsvolumen eine Spannweite von $\pm 0,5$ ml angenommen wird:

- Elutionsvolumen $V_e = (46,11 \pm 0,5)$ mL; $K_d = (0,215 \pm 0,007)$
 \Rightarrow 776 - 851 Da (mittlerer Wert: 812 Da, gerundet 800 Da)
- Elutionsvolumen $V_e = (51,10 \pm 0,5)$ mL; $K_d = (0,282 \pm 0,007)$
 \Rightarrow 550 - 603 Da (mittlerer Wert: 575 Da, gerundet 600 Da)
- Elutionsvolumen $V_e = (54,96 \pm 0,5)$ mL; $K_d = (0,334 \pm 0,007)$
 \Rightarrow 427 - 457 Da (mittlerer Wert: 437 Da, gerundet 450 Da)
- Elutionsvolumen $V_e = (60,51 \pm 0,5)$ mL; $K_d = (0,408 \pm 0,007)$
 \Rightarrow 257 - 282 Da (mittlerer Wert: 269 Da, gerundet 300 Da)

5.12. Massenspektrometrie

Die Versuche wurden extern in folgenden Arbeitsgruppen durchgeführt:

- PD-MS: Arbeitsgruppe Dr. H. Jungclas, Philipps- Universität, Marburg (Dr. L. Schmidt).
- MALDI- MS: Arbeitsgruppe Dr. M. Mann (Protein and Peptide Group, EMBL (Heidelberg)) (Dr. A. Podtelezhnikov).
- ESI- MS: Arbeitsgruppe Dr. M. Mann (Protein and Peptide Group, EMBL (Heidelberg)) (Dr. A. Podtelezhnikov).

5.13. Chemikalien

In diesem Kapitel werden die Bezugsquellen und Qualitäten der eingesetzten Chemikalien sowie eine Liste der Gefahrstoffe angegeben.

5.13.1. Eingesetzte Chemikalien

Verwendete Abkürzungen:

- „Fluka“: Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm
- „Merck“: Merck KGaA, Darmstadt
- „Serva“: Serva Feinbiochemikalien GmbH, Heidelberg
- „Mallinckrodt“: Mallinckrodt Speciality Chemicals Co. (Paris, Kentucky (USA)) (Deutscher Vertrieb: Promochem GmbH, Wesel)
- „Alfa- Ventron“: Alfa-Ventron GmbH, Karlsruhe

Ammoniak- Lösung 25%	Merk „p.A.“
Ammoniumazetat (NH_4Ac)	Fluka „Bioselect“
Ammoniumsulfat (NH_4SO_4)	Merck „für biochemische Zwecke“
L-Asparagin	Fluka „Bioselect“
Biotin	Fluka „Bioselect“
Borsäure (H_3BO_3)	Fluka „Chemika“
Tetra-n-butylammoniumhydrogensulfat	Merck „Lichropur [®] “
n-Cetyltrimethylammoniumhydrogensulfat	Merck „Lichropur [®] “
Chrom	Alfa- Ventron
Chrom(III)- chlorid- Hexahydrat ($\text{CrCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	Merck „Titrisol“
Dextran- Blau	Serva
Dodecan-1-sulfonsäure Natriumsalz	Merck „Lichropur [®] “
Eisen(III)-chlorid- Hexahydrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	Fluka „Chemika“
Folsäure	Fluka „Bioselect“
Glukose- Monohydrat	Merck „für biochemische Zwecke“
	Fluka „Bioselect“
L-Histidin	Fluka „Bioselect“
Kaliumdihydrogensulfat (KH_2PO_4)	Merck „für biochemische Zwecke“
	Merck „für biochemische Zwecke“
Di-Kaliumhydrogensulfat (K_2HPO_4)	Merck „für biochemische Zwecke“
	Merck „p.A.“
Kaliumhydroxid (KOH)	Fluka „p.A.“
Kaliumiodid (KI)	Fluka „Bioselect“
Kalziumchlorid- Hexahydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	Fluka „Bioselect“
Kalziumpanthotenat	Fluka „Chemika“
Kupfersulfat- Pentahydrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)	Fluka „Bioselect“
Magnesiumsulfat- Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	Fluka „Chemika“
Mangansulfat- Monohydrat ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Fluka „Chemika“
Methanol (MeOH)	Mallinckrodt „ChromAR [®] HPLC“
	Fluka „Bioselect“
L-Methionin	Fluka „Bioselect“
Myo- Inositol	Fluka „Bioselect“

Natriumazid (NaN_3)	Fluka „purum“
Natriumchlorid (NaCl)	Merck „für biochemische Zwecke“
Natriummolybdat- Monohydrat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Fluka „Chemika“
Nikotinsäure	Fluka „Bioselect“
Octan-1-sulfonsäure Natriumsalz	Merck „Lichropur [®] “
Pyridoxin- Hydrochlorid	Fluka „Bioselect“
Riboflavin	Fluka „Bioselect“
Salzsäure 30%ig (HCl)	Merck „suprapur“
Thiamin- Hydrochlorid	Fluka „Bioselect“
L-Tryptophan	Fluka „Bioselect“
Zinksulfat- Monohydrat ($\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Fluka „Chemika“

Kaliumtrisoxalatochromat ($\text{K}_3[\text{Cr}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]$) wurde nach einer gängigen Literaturvorschrift aus $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ und Oxalsäure präpariert [318].

Tris(Pyridin-2-Carbonato)Chrom(III) (Chrom-Trispikolinat) und das Chrom(III)- Nikotinsäure- Präparat wurden dankenswerter Weise von Dr. Wilhelm Herdering, Universität Hamburg, zur Verfügung gestellt (synthetisiert nach den Vorschriften von Evans und Pouchnik [293]).

5.13.2. Sicherheitshinweise für die eingesetzten Gefahrstoffe

- **Ammoniak- Lösung 25%**

Gefahrstoffkennzeichen: Xi (reizend)

R- und S- Sätze: R36/37/38; S2-26

Entsorgung: Nach Neutralisation Sammelbehälter für wässrige Salzlösungen.

- **Chrom(III)chlorid- Hexahydrat ($\text{CrCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$):**

Gefahrstoffkennzeichen: Xn (gesundheitsschädlich)

R- und S- Sätze: R22; S24/25

Entsorgung: Nach Ansäuern in den Sammelbehälter für schwermetallhaltige saure Lösungen.

- **Eisen(III)chlorid- Hexahydrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$):**

Gefahrstoffkennzeichen: Xn (gesundheitsschädlich, reizend)

R- und S- Sätze: R22-38-41; S26-39

Entsorgung: Nach Ansäuern in den Sammelbehälter für schwermetallhaltige saure Lösungen.

- **Extran[®]**

Gefahrstoffkennzeichen: Xn (gesundheitsschädlich)

R- und S- Sätze: R36/38; S2-26

Entsorgung: Keine gesonderte Entsorgung erforderlich.

- **Kaliumhydroxid (KOH):**

Gefahrstoffkennzeichen: C (ätzend)

R- und S- Sätze: R35; S26-37/39-45

Entsorgung: Sammelbehälter für Laugen.

- **Kalziumchlorid- Hexahydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$):**

Gefahrstoffkennzeichen: Xi (reizend)

R- und S- Sätze: R36; S22-24

Entsorgung: Sammelbehälter für wässrige Salzlösungen.

- **Mangansulfat- Monohydrat ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$):**

Gefahrstoffkennzeichen: Xn (gesundheitsschädlich); N (Ökotoxisch)

R- und S- Sätze: R48/20/22-51; S22-61

Entsorgung: Sammelbehälter für wässrige Salzlösungen.

- **Methanol:**

Gefahrstoffkennzeichen: T (giftig)

R- und S- Sätze: R11-23/25; S2-7-16-24

Entsorgung: Sammelbehälter für halogenfreie organische Lösungsmittel.

- **Natriumazid (NaN_3):**

Gefahrstoffkennzeichen: T+ (sehr giftig); N (Ökotoxisch)

R- und S- Sätze: R28-32-50/53; S28.1-45-60-61

Entsorgung: Delaborieren mit Jod/Natriumthiosulfat- Lösung, dann Sammelbehälter für wäßrige Salzlösungen.

- **Octan-1-sulfonsäure Natriumsalz:**

Gefahrstoffkennzeichen: Xi (reizend)

R- und S- Sätze: R36/38

Entsorgung: Sammelbehälter für wäßrige Salzlösungen.

- **Salzsäure (HCl)**

Gefahrstoffkennzeichen: C (ätzend)

R- und S- Sätze: R34-37; S26-36/37/39-45

Entsorgung: Sammelbehälter für anorganische Säuren.

- **Zinksulfat- Monohydrat ($\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$):**

Gefahrstoffkennzeichen: Xi (reizend); N (Ökotoxisch)

R- und S- Sätze: R36/38-50/53; S22-25-60-61

Entsorgung: Sammelbehälter für wäßrige Salzlösungen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Seit den Untersuchungen von Mertz und Schwarz in den späten fünfziger Jahren wird Chrom in seiner dreiwertigen Form als ein essentielles Spurenelement für Menschen und Tiere mit Bedeutung für die Insulinwirkung angesehen. Die metabolisch aktive Form von Chrom wird, wie ursprünglich von Mertz und Schwarz vorgeschlagen, für eine besondere Form von organisch komplexiertem dreiwertigem Chrom gehalten, dem aufgrund seines vorgeschlagenen Effekts auf den Glukosemetabolismus der Name „Glukosetoleranzfaktor“ gegeben wurde. *In vitro*- Assays legten nahe, daß die wirksamsten Quellen für biologisch aktive Chromverbindungen einige Nahrungsmittel, insbesondere Extrakte von Niere, Leber, Schwarzem Pfeffer und Bierhefe sind. Bis heute sind zahlreiche Versuche, die biologisch aktiven Chromkomplexe vor allem aus Bierhefe zu isolieren, nicht erfolgreich gewesen.

Wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war es, erstmals natürlich in der Hefe vorkommende Komplexe des dreiwertigen Chroms unter schonenden Bedingungen zu isolieren. Unter Berücksichtigung der möglichen Instabilität der in der Hefe vorliegenden Chrom(III)- Komplexe gegenüber alkalischen oder sauren Bedingungen wurden zur Extraktion der Bierhefe, Aufarbeitung der Extrakte und zur Chromatographie hohe Salzkonzentrationen, stark komplexierende Puffersubstanzen und extreme pH- Werte vermieden. Im Gegensatz zu anderen Arbeiten, bei denen herkömmliche Methoden der Ionenchromatographie Verwendung fanden, wurde die Ionenpaarchromatographie auf Umkehrphasen (RPIP-HPLC) als wesentliche Trennmethode für die Fraktionierung von Chromverbindungen aus Bierhefe eingesetzt.

Zur Gewinnung der intrazellulär vorliegenden Chrom(III)- Komplexe wurde Bierhefe aerob in Gegenwart von 1 mg/L $^{51}\text{CrCl}_3$ kultiviert. Nach der Ernte wurden die Zellen mit einer Rührwerkskugelmühle in kalter 0,2 M KH_2PO_4 aufgeschlossen. Lediglich etwa 0,6 bis 4% des Chroms aus dem Nährmedium konnten nach Ende der Kultur mit Hefe assoziiert vorgefunden werden, 10 bis 50% davon befanden sich in löslicher Form in der zytosolischen Fraktion der Hefe. Dieser zytosolische Anteil des Chroms ließ sich durch Gelchromatographie auf Toyopearl[®] TSK HW 40s bzw. Toyopearl[®] TSK HW 55s (Eluent 0,2 M KH_2PO_4) in eine hochmolekulare (ca. 40 kDa) und bis zu

drei niedermolekulare chrombindende Fraktionen (600, 800 und 1100 Da) auftrennen. Das niedermolekular gebundene Chrom eluierte nach Ionenpaarchromatographie (Merck Lichrospher[®] mit einem wäßrigen Methanol/0,05 M KH₂PO₄- Gradienten unter Verwendung von 5 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat als amphiphiles Ionenpaarreagenz) in Form zweier deutlich getrennter anionischer Peaks. Verschiedene massenspektrometrische Methoden (Plasmadesorptions- Massenspektrometrie (PD-MS), Elektrospray- Massenspektrometrie (ESI-MS) und Matrix-unterstützte Laser-Desorptions/Ionisations- Massenspektrometrie (MALDI-MS) konnten keine weiteren Hinweise auf die Art der Substanzen im Zytosol der Hefe geben.

Im verbrauchten Nährmedium wurde das Auftreten einiger weiterer Chrom-bindender Fraktionen (300-800 Da) beobachtet, die sich von den Fraktionen aus der Hefe und auch von anorganischem Chrom(III) klar unterschieden. Wie anhand der Elutionsprofile der Gelchromatographie und der Ionenpaarchromatographie festgestellt werden konnte, erwies sich keine dieser Fraktionen als stabil genug, um durch Gefriertrocknung des verbrauchten Nährmediums aufkonzentriert werden zu können.

Die Ergebnisse stehen in deutlichem Widerspruch zu den Ergebnissen vorheriger Arbeiten, die z.T. über eine Anreicherung von Chrom in Bierhefe berichteten und einen wesentlichen Anteil des an Hefe gebundenen Chroms in Form kationischer Komplexe auffanden. Verschiedene Befunde in Hinblick auf Anzahl und Eigenschaften von aus Bierhefe isolierten chromhaltigen Fraktionen müssen ihre Ursache entweder in der Verwendung unterschiedlicher Heferasen, unterschiedlichen Kulturbedingungen oder in unterschiedlichen Prozeduren zur Isolation, Aufarbeitung und Analyse haben. Es erscheint daher möglich, daß die meisten der chrombindenden Fraktionen, die von anderen Autoren beschrieben wurden, Artefakte darstellen, die sich während rauher Isolationsprozeduren gebildet haben und die zumindest teilweise von an die Zellwand adsorbiertem und anschließend wieder freigesetzten Chrom abstammen.

Gestützt durch die Erkenntnisse anderer Autoren, die einerseits das Vorkommen größerer Mengen von Polyphosphat in Hefe nachgewiesen und andererseits die Beteiligung von Polyphosphat an der zytosolischen Bindung von Metallkationen gezeigt haben, könnte die offensichtlich nur geringe UV- Absorption der durch Ionenpaarchromatographie getrennten Substanzen in Verbindung mit dem Fehlen charakteristischer Peaks in den massenspektroskopischen Experimenten auf das Vorliegen von einfachen Chrom(III)- Polyphosphat- Komplexen im Zytosol der Hefe hindeuten.

7. SUMMARY

Since the investigations of Mertz and Schwarz in the late fifties chromium in the trivalent form is believed to be an essential trace element for man and animal, with significance for the effects of the hormone insulin. The metabolic active form of chromium, as originally proposed by Mertz and Schwarz, is thought to be some form of organically complexed trivalent chromium, called "Glucose-Tolerance-Factor" (GTF) due to its proposed effects on glucose metabolism. *In-vitro* assay methods gave rise to the opinion that certain foodstuffs, especially extracts of kidney, liver, black pepper and brewer's yeast are the most potent sources of biologically active chromium compounds. However, numerous attempts to identify biologically active chromium complexes, in particular from brewer's yeast, have been unsuccessful up to now.

The fundamental goal of the present work was to isolate naturally occurring complexes of trivalent chromium from brewer's yeast under smooth conditions, a task which has never been tried before. Taking into account the presumably delicate structure of the chromium(III)- complexes from brewer's yeast against alkaline or acid conditions, particular emphasis was given to gentle treatments in yeast extraction, preparation of the extracts and chromatography. In this context high salt concentrations, strong complexing buffer agents and extreme pH values were avoided. In contrast to other workers, who employed conventional methods of ionchromatography, in the presented work reversed-phase ion-pair chromatography on HPLC-columns (RPIP- HPLC) was used for the first time for the main separation procedure of chromium compounds from yeast and liquid broth.

For the extraction of the intracellular existing chromium(III)- complexes from the cells, Brewer's yeast was grown aerobically in the presence of 1 mg/L $^{51}\text{CrCl}_3$. After harvest, cells were disintegrated by grinding in a glass-bead mill in cold 0.2 M KH_2PO_4 . 0.6 to 4% of total chromium were found to be associated with yeast cells in several batches, 10% to 50% of it in the cytosolic fraction. One high-molecular-weight (40 kDa) and up to three low-molecular-weight chromium binding fractions (600, 800 and 1100 Da) in the cytosolic fraction could be separated from each other by size-exclusion chromatography on Toyopearl[®] TSK HW 40s or Toyopearl[®] TSK HW 55s

resp. with 0.2 M KH_2PO_4 as eluent. Low-molecular-weight chromium resulted in two clearly separated peaks of anionic chromium-containing compounds if subjected to reversed-phase ion-pair chromatography (Merck Lichrospher[®] with aqueous methanol/0.05 M KH_2PO_4 gradient with tetrabutylammoniumhydrogensulfate as amphiphilic ion-pair reagent). Various mass spectrometric methods (plasmadesorption- mass spectrometry (PD-MS), electrospray mass spectrometry (ESI-MS) and matrix-assisted laser-desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) failed to give further information about the nature of the isolated substances from yeast cytosol.

Several chromium-binding fractions (300-800 Da), which showed to be clearly distinct from the fractions detected in yeast extracts and from Cr(III) as well, were found to be present in the spent culture medium. None of them was found to be stable enough to be concentrated by freeze-drying, as judged from elution profiles of size-exclusion chromatography and reversed-phase ion-pair chromatography.

These results are in remarkable contrast to the results of previous publications, some of which reported an enrichment of chromium in yeast and found a major part of the yeast chromium bound to cationic complexes. Different findings in respect to the number and properties of chromium compounds from brewer's yeast must have their origin either in the employment of different yeast strains, different culture conditions or in different isolation procedures. Hence it is possible, that most of the chromium binding compounds from brewer's yeast reported by previous workers are artifacts, which had been build up during rough isolation procedures, and which were at least partly derived from cell-wall adsorbed and subsequently deliberated chromium.

Other authors had shown on the one hand the occurrence of major amounts of polyphosphates within yeasts and on the other hand the involvement of polyphosphates in the sequestration of metal cations in the cytosol. These findings, together with the obviously low UV- absorption of the isolated substances under the conditions of ion-pair chromatography and the lack of characteristic peaks during mass spectrometry might indicate the presence of simple chromium(III)- polyphosphate complexes in yeast cytosol.

8. LITERATUR

- [1] Dörfelt, H. (Hrsg)
Lexikon der Mykologie
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart u.a. 1989
- [2] Van der Walt, J.P.
The Typological Yeast Species, and its Delimitation
in: The yeasts (Rose, A.H.; Harrison, J.S.; (Hrsg.)), Vol. 1 (Biology of Yeasts),
2. Auflage 1987, Academic Press, London u.a., S. 116
- [3] Goffeau, A.; Barrell, B.G.; Bussey, H.; Davis, R.W.; Dujon, B.; Feldmann, H.;
Galibert, F.; Hoheisel, J.D.; Jacq, C.; Johnston, M.; Louis, E.J.; Mewes, H.W.;
Murakami, Y.; Philippsen, P.; Tettelin, H.; Oliver, S.G.;
Life with 6000 genes
Science 274(5287):546, 563-7 (1997)
- [4] Venter, J.C.; Adams, M.D.; Myers, E.W. et al.;
The sequence of the human genome
Science 291(5507):1304-51 (2001)
- [5] Hieter, P.; Bassett Jr., D.E.; Valle, D.;
The yeast genome – a common currency
Nat. Gen. **13**(3), 253-5 (1996)
- [6] Sheth, S.; Brittenham, G.M.;
Genetic disorders affecting proteins of iron metabolism: clinical implications.
Annu. Rev. Med. **51**, 443-64 (2000)
- [7] Kosman, D.J.;
Transition Metal Ion Uptake in Yeasts and Filamentous Fungi
in: Winkelmann, G.; Winge, D.R. (Hrsg.): Metal ions in fungi (Mycology series;
Vol. 11); Marcel Dekker Inc. New York 1994, S. 30
- [8] Lesuisse, E.; Labbe, P.;
Reductive Iron Assimilation in Saccharomyces cerevisiae
in: Winkelmann, G.; Winge, D.R. (Hrsg.): Metal ions in fungi (Mycology series;
Vol. 11); Marcel Dekker Inc. New York 1994, S. 150

- [9] de Silva, D.M.; Askwith, C.C.; Kaplan, J.;
Molecular mechanisms of iron uptake in eukaryotes
Physiol. Rev. **76**(1), 31-47 (1996)
- [10] Fiechter, A.; Käppeli, O.; Meussdoerffer, F.;
Batch and Continuous Culture
in: The yeasts (Rose, A.H.; Harrison, J.S.; (Hrsg.)), Vol. 3 (Metabolism and Physiology of Yeasts), 2. Auflage 1987, Academic Press, London u.a., S. 114
- [11] siehe [10], S. 102
- [12] Kocková-Kratochvílová, A.;
Yeasts and Yeast-like Organisms
VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim 1990, S. 369
- [13] Campbell, I.;
Culture, storage, isolation and identification of yeasts
in: Campbell, I.; Duffus, J.H. (Hrsg.): Yeast - a practical approach, IRL Press, Oxford u.a. 1988, S. 2
- [14] Sigler, K.; Knotková, A.; Kotyk, A.;
Factors governing substrate-induced generation and extrusion of protons in the yeast saccharomyces cerevisiae
Biochim. Biophys. Acta **643** 572-82 (1981)
- [15] Sigler, K.; Kotyk, A.; Knotková, A.; Opekarová, M.;
Processes involved in the creation of buffering capacity and in substrate-induced proton extrusion in the yeast Saccharomyces cerevisiae
Biochim. Biophys. Acta **643** 583-92 (1981)
- [16] Kirchgeßner, M.;
Ernährungsphysiologische Grundlagen der Spurenelementversorgung
in: Spurenelemente und Ernährung (Wolfram, G.; Kirchgeßner, M. (Hrsg.)),
Wiss. Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1990, S. 135-49
- [17] Mertz, W.;
The Essential Trace Elements
Science **213**, 1332-38 (1981)

- [18] Cotzias, C.G.;
Importance of trace substance in environmental health as exemplified by manganese.
Proc. First Annual Conf. Trace Subst. in Environmental Health. (Hemphill, I.D.D. (Hrsg.)). Columbia, Mo. (1967), S. 5-19
(zit. nach: Underwood, E.J.; Mertz, W.; *Introduction*, in: Trace Elements in Human and Animal Nutrition, 5th. Ed. (Vol. 1) (Mertz, W. (Hrsg.)), Academic Press Inc. 1987, S. 1-19)
- [19] Mertz, W.;;
Essential Trace Metals: New Definitions Based on New Paradigms
Nutr. Rev. **51**(10), 287-95 (1993)
- [20] Venchikow, A.I.;;
[Über die physiologisch aktiven Mengen eines Mikroelements und die ihre Wirkung bestimmenden Mechanismen]
Vopr. Pitaniya **6**, 3-11 (1960)
- [21] Underwood, E.J.; Mertz, W.;;
Introduction
in: Trace Elements in Human and Animal Nutrition, 5th. Ed. (Vol. 1) (Mertz, W. (Hrsg.)), Academic Press Inc. 1987, S. 1-19
- [22] Kirchgeßner, M.; Reichlmayr-Lais, A.M.;;
Estimates of Trace Element Requirements from Suboptimal Status by Biochemical and Metabolic Criteria
Trace Elements in Man and Animals 5 (Mills, C.F.; Bremner, I.; Chesters, J.K. (Hrsg.)), Commonwealth Agricultural Bureaux 1985, S. 884-91
- [23] Gardiner, P.H.E.;;
The chemical speciation of trace elements in biomedical specimens: Analytical techniques
Trace Element analysis in biological specimens (Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry, Vol. 15) (Herber, R.M.F.; Stoepler, M. (Hrsg.)), Elsevier: Amsterdam etc. 1994, 185-212
- [24] Templeton, D.M.; Ariese, F.; Cornelis, R.; Danielsson, L.G.; Muntau, H.; van Leeuwen, H.P.; Łobiński, R.;;
Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements.
Pure Appl. Chem. **72**(8):1453-70 (2000)

- [25] Anderson, R.A.;
Nutritional Role of Chromium
Sci. tot. Env. **17**, 13-29 (1981)
- [26] Wiberg, E.;
Holleman-Wiberg, Lehrbuch der Anorganischen Chemie
81.-90. Auflage 1976, Walter de Gruyter, Berlin, S. 867
- [27] Krauskopf, K.B.;
Introduction to Geochemistry
McGraw-Hill, New York, 2nd. Ed. 1979
(zit. nach Losi, M.E.; Amrhein, C.; Frankenberger Jr., W.T.;: *Environmental Biochemistry of Chromium*; (Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol. 166), S. 92
- [28] Gauglhofer, J.; Bianchi, V.;
Chromium
in: Merian, E. (Hrsg.): *Metals and Their Compounds in the Environment*,
VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1991, S. 853-78
- [29] Bertine, K.K.; Goldberg, B.D.;
Fossil fuel combustion and the major sedimentary cycle
Science 171:233-5 (1971)
(zit. nach Losi, M.E.; Amrhein, C.; Frankenberger Jr., W.T.;: *Environmental Biochemistry of Chromium*; (Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol. 166), S. 92
- [30] Adriano, D.C.;
Trace elements in the terrestrial environment
Springer-Verlag, New York, 1986, S. 156-80
(zit. nach Losi, M.E.; Amrhein, C.; Frankenberger Jr., W.T.;: *Environmental Biochemistry of Chromium*; (Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol. 166), S. 92
- [31] Bowen, H.J.M.;
Environmental chemistry of the Elements
Academic Press, New York 1979
(zit. nach Losi, M.E.; Amrhein, C.; Frankenberger Jr., W.T.;: *Environmental Biochemistry of Chromium*; (Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol. 166), S. 92

- [32] Roskill Consulting Group
The Economics of Chromium
Roskill Information Services (Hrsg.), 9th. Edition, London 2000
- [33] Hamilton, J.W.; Wetterhahn, K.E.;
Chromium
in: Seiler, H.G.; Sigel, H.; Sigel, A. (Hrsg.), Handbook on toxicity of inorganic compounds, Marcel Dekker, New York 1988, S. 239-50
- [34] Nieboer, E.; Jusys, A.A.;
Biologic chemistry of chromium
in: Nriagu, J.O.; Nieboer, E.; (Hrsg.): Chromium in the natural and human environment (Advances in Environmental Science and Technology (Nriagu, J.O. (Hrsg.), Vol. 20); Wiley & Sons, New York u.a. 1988, S. 21-79
- [35] Huffman Jr., E.W.D.;
Chromium: Essentiality to plants. Forms and distribution in plants and availability of plant chromium to rats
Ph.D. Thesis, Cornell University, Ithaca, 1973
(zit. nach: Cary, E.E.; *Chromium in air, soil and natural waters* in Langård, S. (Hrsg.): Biological and environmental aspects of chromium (Topics in environmental health Vol 5), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam 1982, S. 49-64)
- [36] Pearson, R.G.;
Hard and Soft Acids and Bases
J. Am. Chem. Soc. **85**(22), 3533-9 (1963)
- [37] Nieboer, E.; Richardson, D.H.S.;
The replacement of the nondescript term 'heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions
Environm. Pollut. (B) **1**:3-26 (1980)
- [38] Jander, G.; Blasius, E.;
Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie
11. Auflage 1979, S. Hirzel Verlag, Stuttgart, S. 287

- [39] Earley, J.E.; Cannon, R.D.;
Aqueous chemistry of chromium(III)
in: Carlin, R.L. (Hrsg.), *Transition Metal Chemistry*; Marcel Dekker Inc., New York, Vol. 1, S. 33-109
(zit. nach [34])
- [40] Burgess, J.;
Kinetic Aspects of Chemical Speciation
Analyst **117**, 605-11
- [41] Cotton, F.A.; Wilkinson, G.;
Anorganische Chemie
Verlag Chemie, 3. Aufl. (dt.) 1974, Weinheim, S. 889
- [42] Xu, F.-C.; Krouse, H.R.; Swaddle, T.W.;
Conjugate Base Pathway for Water Exchange on Aqueous Chromium(III): Variable-Pressure and -Temperature Kinetic Study
Inorg. Chem. **24**(3), 267-70 (1985)
- [43] Banerjea, D.; Chaudhuri, S.D.;
Kinetic studies on the formation of metal chelates II. Reaction of hexa-aquo-chromium(III) ion with glycine and the nature of the product formed in weakly acidic aqueous solution
J. inorg. nucl. Chem. **30**, 871-80 (1968)
- [44] Earley, J.E.; Alexander, W.;
Carbon Dioxide Catalysis of Reactions of Chromium(III). I. Oxygen Exchange of Hydroxopentaamminechromium(III) Ion
J. Am. Chem. Soc. **92**(8), 2294-7 (1970)
- [45] Fleischer, E; Krishnamurthy, M.;
Substitutionally Labile Chromium(III) (Letter)
J. Am. Chem. Soc. **93**(15), 3784-6 (1971)
- [46] Barrett, J.; O'Brien, P.;
Chromium(III) and the glucose tolerance factor
Polyhedron **4**(1), 1-14 (1985)
- [47] Burgess, J.;
Metall ions in solution
Ellis Horwood Ltd., Chichester 1978, S. 269

- [48] siehe [47], S. 264
- [49] Rai, D.; Sass, B.M.; Moore, D.A.;
Chromium(III) Hydrolysis Constants and Solubility of Chromium(III) Hydroxide
Inorg. Chem. **26**(3), 345-9
- [50] von Meyenburg, U.; Široký, O.; Schwarzenbach, G.;
Deprotonation of metal aquo ions. II. Aquochromium(III) ion. Structure of active chromium hydroxide
Helv. Chim. Acta **56**(3), 1099-114 (1973)
- [51] Rotzinger, F.P.; Stünzi, H.; Marty, W.;
Early Stages of the Hydrolysis of Chromium(III) in Aqueous Solution. 3. Kinetics of Dimerization of the Deprotonated Aqua Ion
Inorg. Chem. **25**(4), 489-95 (1986)
- [52] Drljaca, A.; Spiccia, L.;
Early stages of the hydrolysis of chromium(III) in aqueous solution – X. Kinetics of formation of trimer from monomer and dimer
Polyhedron **14**(12), 1653-60 (1995)
- [53] Stünzi, H.; Spiccia, L.; Rotzinger, F.P.; Marty, W.;
Early Stages of the Hydrolysis of Chromium(III) in Aqueous Solution. 4. Stability Constants of the Hydrolytic Dimer, Trimer, and Tetramer at 25°C and I=1.0 M
Inorg. Chem. **28**(1), 66-71 (1989)
- [54] Rollinson, C.L.; Rosenbloom, E.;
Reactions of Chromium(III) with Biological Substances
Physiol. and Bioch. of Food Components Vol. 5 (Proc. Int. Congr. Nutr. 7th.), Vieweg- Verlag, Braunschweig 1967
- [55] Parand, A.; Royer, A.C.; Cantrell, T.L.; Weitzel, M.; Memon, N.; Vincent, J.B.; Crowder, M.W.;
DNA nicking by a trinuclear chromium complex
Inorg. Chim. Acta **268**, 211-9

- [56] Handbook of Analytical Chemistry (Meites, L. (Hrsg.)), 1st Ed. 1963, McGraw-Hill Book Company, Inc., New York u.a.
- [57] Kirilin, W.G.; Cai, J.; Thompson, S.; Diaz, D.; Kavanagh, T.J.; Jones, D.P.; *Glutathione redox potential in response to differentiation and enzyme inducers* Free Radical Biol. Med. **27**(11/12), 1208-18 (1999)
- [58] Hornig, D.; *Distribution of ascorbic acid metabolites and analogues in man and animals* Ann. NY Acad. Sci. **258**, 103-18
(zit. nach: Sun, Y.; Ramirez, J.; Woski, S.A.; Vincent, J.B.; *The binding of trivalent chromium to low-molecular-weight chromium-binding substance (LMWCr) and the transfer of chromium from transferrin and chromium picolinate to LMWCr*; J. Biol. Inorg. Chem. **5**, 129-36)
- [59] Shi, X.; Chiu, A.; Chen, C.T.; Halliwell, B.; Castranova, V.; Vallyathan, V.; *Reduction of chromium and its relationship to carcinogenesis* J. Toxicol. Environm. Health B **2**, 87-104 (1999)
- [60] Connett, P.H.; Wetterhahn, K.E.; *Metabolism of the Carcinogen Chromate by Cellular Constituents* Struct. Bonding **54**, 93-124 (1983)
- [61] Karlson, P.; *Kurzes Lehrbuch der Biochemie* Georg Thieme Verlag, Stuttgart u.a., 12. Auflage 1984, S. 284, 300
- [62] Ozawa, T.; Hanaki, A.; *Spin-trapping studies on the reactions of Cr(III) with hydrogen peroxide in the presence of biological reductants: is Cr(III) non-toxic?* Biochem. Intern. **22**(2), 343-52 (1990)
- [63] Sugden, K.D.; Geer, R.D.; Rogers, S.J.; *Oxygen Radical-Mediated DANN Damage by Redox-Active Cr(III) Complexes* Biochemistry **31**(46), 11262-31
- [64] Shi, X.; Leonard, S.S.; Liu, K.J.; Zang, L.; Gannett, P.M.; Rojanasakul, Y.; Castranova, V.; Vallyathan, V.; *Cr(III)-mediated hydroxyl radical generation via Haber-Weiss cycle* J. Inorg. Biochem. **69**, 263-8 (1998)

- [65] Levis, A.G.; Bianchi, V.;
Mutagenic and cytogenic effects of chromium compounds
in: Biological and environmental aspects of chromium (Topics in environmental health Vol 5) (Langård, S. (Hrsg.)), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam 1982, S. 197
- [66] Ganrot, P.O.;
Metabolism and Possible Health Effects of Aluminum
Environm. Health Perspect. **65**, 363-441 (1986)
- [67] Gammelgaard, B.; Jøns, O.;
Metal ion distribution in the main biofluids
in: Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluid (Bioinorganic Medicine, Vol. 1), Berthon, G.; (Hrsg.), Marcel Dekker Inc. New York u.a., 1995, S. 51
- [68] Harris, D.C.;
Different metal-binding properties of the two sites of human transferrin.
Biochemistry **16**(3), 560-4
- [69] Moshtaghie, A.A.; Ani, M.; Bazrafshan, M.R.;
Comparative binding study of aluminium and chromium to human transferrin. Effect of iron.
Biol. Trace Elem. Res. **32**, 39-46 (1992)
- [70] Stryer, L.;
Biochemie
korr. Nachdruck der 5. Auflage (dt.), Spektrum Verlag Heidelberg u.a. 1991, S. 416
- [71] Mertz, W.;
Chromium Occurrence and Function in Biological Systems
Phys. Rev. **49**(2), 163-239
- [72] Kaiwar, S.P.; Srinivasa Raghavan, M.S.; Rao, C.P.;
Transition-metal Saccharide Chemistry and Biology: Synthesis, Characterisation, Redox Behaviour, Biointeraction and Data Correlations of Dinuclear Chromium(III) Complexes
J. Chem. Soc. Dalton Trans. 1995(10), 1569-76 (1995)

- [73] Martin, R.B.; Mariam, Y.H.;
Interactions between metal ions and nucleic bases, nucleosides, and nucleotides in solution
In: Sigel, H. (Hrsg.), *Metal Ions in Biological Systems Vol. 8 (Nucleotides and derivatives: their ligating ambivalency)*; Marcel Dekker Inc., New York, S. 57-116
- [74] De Pamphilis, M.L.; Cleland, W.W.;
Preparation and properties of chromium(III)-nucleotide complexes for use in the study of enzyme mechanisms
Biochemistry **12**(19), 3714-24 (1973)
- [75] Madhusudanan, K.P.; Katti, S.B.; Vijayalakshimi, R.; Nair, B.U.;
Chromium(III) interactions with nucleosides and nucleotides: a mass spectrometric study
J. Mass Spectrom. **34**(8), 880-4 (1999)
- [76] Davis, M.H.;
Isolation of some chromium-containing peptides from tanned rat tail tendon soluble collagen
J. Soc. Leather Trades' Chem. **56**(7), 237-45 (1972)
- [77] Hopkins, L.L. jr.; Schwarz, K.;
Chromium(III) Binding to Serum Proteins, specifically Siderophilin
Biochim. Biophys. Acta **90**, 484-91 (1964)
- [78] Huffman jr., E.W.D.; Allaway, W.H.;
Chromium in Plants: Distribution in Tissues, Organelles, and Extracts and Availability of Bean Leaf Cr to Animals
J. Agric. Food Chem. **21**, 982-6 (1973)
- [79] Blincoe, C.;
Investigations of the Chemical Form of Chromium in Lucerne
J. Sci. Food Agric. **25**(8), 973-9 (1974)
- [80] Lahouti, M.; Peterson, P.J.;
Chromium accumulation and distribution in crop plants
J. Sci. Food Agric. **30**(2), 136-42 (1979)
- [81] Starich, G.H.; Blincoe, C.;
Properties of a Chromium Complex from Higher Plants
J. Agric. Food Chem. **30**, 458-62 (1982)

- [82] Starich, G.H.; Blincoe, C.;
Dietary chromium - forms and availabilities
Sci. Total Environ. **28**, 443-54 (1983)
- [83] Yamamoto, A.; Wada, O.; Ono, T.;
Isolation of a biologically active low-molecular-mass chromium compound from rabbit liver
Eur. J. Biochem. **165**, 627-31 (1987)
- [84] Denniston, M.L.; Uyeki, E.M.;
Distribution and HPLC study of chromium-51 binding sites in Chinese hamster ovary cells
J. Toxicol. Environ. Health **21**(3), 375-86 (1987)
- [85] Suzuki, Y.;
Anion-exchange high-performance liquid chromatography of water-soluble chromium(VI) and chromium(III) complexes in biological materials
J. Chromatogr. **415**(2), 317-24 (1987)
- [86] Yamamoto, A.; Wada, O.; Suzuki, H.;
Separation of biologically active chromium complex from cow colostrum
Tohoku J. Exp. Med. **152**(3), 211-9 (1988)
- [87] Borguet, F.; Cornelis, R.; Lameire, N.;
Speciation of chromium in plasma and liver tissue of endstage renal failure patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis
Biol. Trace Elem. Res. **27**, 449-60 (1990)
- [88] Milacic, R.; Stupar, J.;
Simultaneous Determination of Chromium(III) Complexes and Chromium(VI) by Fast Protein Anion-exchange Liquid Chromatography-Atomic Absorption Spectrometry
Analyst **119**, 627-32 (1994)
- [89] Borguet, F.; Cornelis, R.; De Langhe, J.; Lambert, M.-C.; Lameire, N.;
Study of the chromium binding in plasma of patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis
Clin. Chem. Acta **238**(1), 71-84 (1995)
- [90] Lyon, G.L.; Peterson, P.J.; Brooks, R.R.;
*Chromium-51 Distribution in Tissues and Extracts of *Leptospermum scoparium**
Planta **88**, 282-7 (1969)

- [91] Davis, C.M.; Vincent, J.B.;
Isolation and Characterization of a Biologically Active Chromium Oligopeptide from Bovine Liver
Arch. Biochem. Biophys. **339**(2), 335-43 (1997)
- [92] Yamamoto, A.; Wada, O.; Ono, T.;
A low-molecular-weight, chromium-binding substance in mammals
Toxicol. Appl. Pharmacol. **59**, 515-23 (1981)
- [93] Wada, O.; Wu, G.Y.; Yamamoto, A.; Manabe, S.; Ono, T.;
Purification and chromium-excretory function of low-molecular-weight, chromium-binding substances from dog liver
Environ. Res. **32**, 228-39 (1983)
- [94] Davis, C.M.; Sumrall, K.H.; Vincent, J.B.;
A Biologically Active Form of Chromium may Activate a Membrane Phosphotyrosine Phosphatase (PTP)
Biochemistry **35**(39), 12963-9 (1996)
- [95] Davis, C.M.; Vincent, J.B.;
Chromium Oligopeptide Activates Insulin Receptor Tyrosine Kinase Activity
Biochemistry **36**(15), 4382-5 (1997)
- [96] Schwarz, K.;
Production of Dietary Necrotic Liver Degeneration Using American Torula Yeast
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **77**, 818-823 (1951)
- [97] Mertz, W.; Schwarz, K.;
Relation of glucose tolerance factor to impaired intravenous glucose tolerance of rats on stock diets
Am. J. Physiol. **196**, 614-8 (1959)
- [98] Schwarz, K.; Mertz, W.;
A Glucose Tolerance Factor and its Differentiation from Factor 3 (Letter)
Arch. Biochem. Biophys. **72**, 515-8 (1957)
- [99] Schwarz, K.; Mertz, W.;
Chromium(III) and the Glucose Tolerance Factor (Letter)
Arch. Biochem. Biophys. **85**, 292-5 (1959)

- [100] Schroeder, H.A.;
Diabetic-like serum glucose levels in chromium-deficient rats
Life Sci. 4, 2057-62 (1965)
- [101] Schroeder, H.A.;
Chromium deficiency in rats: a syndrome simulating diabetes mellitus with retarded growth
J. Nutr. **88**, 439-45
- [102] Schroeder, H.A.; Balassa, J.J.;
Influence of chromium, cadmium, and lead on rat aortic lipids and circulating cholesterol
Am. J. Physiol. **209**, 433-7 (1965)
(zit. nach: Mertz, W.; *Chromium Occurrence and Function in Biological Systems*, Physiol. Rev. **49**(2), 163-239 (1968))
- [103] Schroeder, H.A.;
Serum cholesterol levels in rats fed thirteen trace elements
J. Nutr. **94**, 475-80
(zit. nach: Mertz, W.; *Chromium Occurrence and Function in Biological Systems*, Physiol. Rev. **49**(2), 163-239 (1968))
- [104] Alberti, K.G.; Zimmet, P.Z.;
Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications - provisional report of a WHO consultation
Diabet. Med. **15**, 539-53 (1998)
- [105] Lillioja, S.; Mott, D.M.; Spraul, M.; Ferraro, R.; Foley, J.E.; Ravussin, E.; Knowler, W.C.; Bennett, P.H.; Bogardus, C.;
Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus
New Eng. J. Med. **329**(27), 1988-92 (1993)
- [106] Jackson, R.A.;
Mechanisms of Age-Related Glucose Intolerance
Diabetes Care **13**(Suppl. 2), 9-19 (1990)
- [107] Glinsmann, W.H.; Mertz, W.;
Effect of trivalent chromium on glucose tolerance
Metabolism **15**, 510-20 (1966)

- [108] Sherman, L.; Glennon, J.A.; Brech, W.J.; Klomberg, G.H.; Gordon, E.S.;
Failure of trivalent chromium to improve hyperglycemia in diabetes mellitus
Metabolism **17**, 439-42 (1968)
- [109] Schroeder, H.A.;
The role of chromium in mammalian nutrition
Am. J. Clin. Nutr. **21**, 230-44 (1968)
- [110] Levine, R.A.; Streeten, D.H.P.; Doisy, R.J.;
Effects of oral chromium supplementation on the glucose tolerance of elderly human subjects
Metabolism **17**, 114-25 (1968)
- [111] Hopkins, L.L.; Price, M.G.;
Effectiveness of chromium(III) in improving the impaired glucose tolerance of middle-aged Americans
In: Western Hemisphere Nutrition Congr., Abstracts Vol. II, Puerto Rico, 1968,
S. 40, 41
(zit. nach: [126])
- [112] Mertz, W.;
Biological role of chromium
Fed. Proc. **26**(1), 186-93 (1967)
- [113] Anderson, R.A.;
Recent Advances in the Clinical and Biochemical Manifestations of Chromium Deficiency in Human and Animal Nutrition
J. Trace Elem. Exptl. Med. **11**, 241-50 (1998)
- [114] Anderson, R.A.;
Chromium, Glucose Intolerance and Diabetes
J. Am. Coll. Nutr. **17**(6), 548-55 (1998)
- [115] Anderson, R.A.;
Chromium and parenteral nutrition
Nutrition **11**(1 Suppl.), 83-86 (1995)
- [116] Anderson, R.A.;
Nutritional Role of Chromium
Sci. Tot. Env. **17**, 13-29 (1981)

- [117] Lukaski, H.C.;
Chromium as a supplement
Annu. Rev. Nutr. **19**, 279-302 (1999)
- [118] National Research Council, Board on Agriculture, Committee on Animal Nutrition (Hrsg.):
The Role of Chromium in Animal Nutrition
National Academy of Sciences, Washington D.C. 1997
- [119] Panel of Micronutrients, Food and Nutrition Board
Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc
National Academy Press, Washington D.C. 2001, 6-1 - 6-22
- [120] Marschner, H.;
Mineral Nutrition of Higher Plants
2nd Ed. 1995, Academic Press, London u.a., S. 435
- [121] Huffman jr., E.W.D.; Allaway, W.H.;
Growth of Plants in Solution Culture Containing Low Levels of Chromium
Plant Physiol. **52**, 72-5 (1973)
- [122] Bertrand, D.; de Wolf, A.;
Le chrome, oligoélément dynamique pour les végétaux supérieurs
Compt. rend. **261**, 5616-7 (1965)
- [123] Bollard, E.G.;
Involvement of Unusual Elements in Plant Growth and Nutrition
in: Läuchli, A.; Bielecki, R.L. (Hrsg.): *Inorganic Plant Nutrition*, (Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol 15B (Pirson, A.; Zimmermann, M.H. (Hrsg.))), S. 715 & 727
- [124] Jones, R.P.; Greenfield, P.F.;
A review of yeast ionic nutrition. Part I: Growth and Fermentation Requirements
Process Biochem. **19**(2), 48-52, 54-8 (1984)
- [125] Mertz, W.;
Effects and Metabolism of Glucose Tolerance Factor
Nutr. Rev. **33**(5), 129-35 (1975)

- [126] Mertz, W.;
Chromium Occurrence and Function in Biological Systems
Physiol. Rev. **49**(2), 163-239 (1968)
- [127] Mayer, M.;
*Darstellung von Chrom(III) Nicotinylopeptidkomplexen zur Untersuchung der
glucosetoleranzsteigernden Wirkung von dreiwertigem Chrom*
Dissertation, Universität Hamburg 1992, S. 14
- [128] Mertz, W.; Roginski, E.E.;
Chromium Metabolism: the glucose tolerance factor
in: Mertz, W.; Cornatzer, W.E. (Hrsg.): *Newer trace elements in nutrition*,
Marcel Dekker, Inc. New York 1973, 123-53
- [129] Mertz, W.; Roginski, E.E.; Feldman, F.J.; Thurman, D.E.;
Dependence of chromium transfer into the rat embryo on the chemical form
J. Nutr. **99**, 363-7 (1969)
- [130] Polansky, M.M.; Bryden, N.A.; Anderson, R.A.;
Serum chromium as an indicator of chromium status of humans (Abstract)
Fed. Proc. **43**(2), 472 (A 1092) (1984)
- [131] Morris, B.W.; Blumsohn, A.; Mac Neil, S.; Gray, T.A.;
The trace element chromium - a role in glucose homeostasis
Am. J. Clin. Nutr. **55**(5), 989-91 (1992)
- [132] Anderson, R.A.; Polansky, M.M.; Bryden, N.A.;
*Strenuous Running: acute effects on chromium, copper, zinc, and selected cli-
nical parameters in urine and serum of male runners*
Biol. Trace Elem. Res. **6**, 327-36 (1984)
- [133] Anderson, R.A.; Polansky, M.M.; Bryden, N.A.; Roginski, E.E.; Patterson,
K.Y.; Reamer, D.C.;
*Effect of exercise (running) on serum glucose, insulin, glucagon, and chro-
mium excretion*
Diabetes **31**(3), 212-6 (1982)
- [134] Anderson, R.A.; Bryden, N.A.; Polansky, M.M.; Reiser, S.;
Urinary chromium excretion and insulinogenic properties of carbohydrates
Am. J. Clin. Nutr. **51**(5), 864-8 (1990)

- [135] Anderson, R.A.; Bryden, N.A.; Polansky, M.M.; Thorp, J.W.;
Effects of carbohydrate loading and underwater exercises on circulating cortisol, insulin and urinary losses of chromium and zinc
Eur. J. Appl. Physiol. **63**, 146-50 (1991)
- [136] Ravina, A.; Slezak, L.; Mirsky, N.; Anderson, R.A.;
Control of steroid-induced diabetes with supplemental chromium
J. Trace Elem. Exp. Med. **12**(4), 375-8 (1999)
- [137] Morris, G.S.; Hegsted, M.; Hasten, D.;
Methods in Chromium Dietary Supplementation and Deficiency
in: Watson, R.R. (Hrsg.): Trace Elements in Laboratory Rodents (Methods in Nutrition Research (Watson, R.R.; Wolinsky, I.; (Hrsg.)), CRC Press, Inc., Boca Raton u.a. 1996, S. 277-85
- [138] Toepfer, E.W.; Mertz, W.; Polansky, M.M.; Roginski, E.E.; Wolf, W.R.;
Preparation of Chromium-Containing Material of Glucose Tolerance Factor Activity from Brewer's Yeast Extracts and by Synthesis
J. Agric. Food Chem. **25**(1), 162-6 (1977)
- [139] Liu, V.J.K.; Morris, J.S.;
Relative chromium response as an indicator of chromium status
Am. J. Clin. Nutr. **31**, 972-6 (1978)
- [140] Pyke, M.;
Yeast Preparations
in: Roman, W. (Hrsg.): Yeasts (Biologia et industria Vol. I (Roman, W. (Hrsg.)), Dr. W. Junk, Publishers, Den Hague 1957, S. 211-228
- [141] Tuman, R.W.; Doisy, R.J.;
Metabolic Effects of the Glucose Tolerance Factor (GTF) in Normal and Genetically Diabetic Mice
Diabetes **26**(9), 820-6 (1977)
- [142] Tuman, R.W.; Bilbo, J.T.; Doisy, R.J.;
Comparison and Effects of Natural and Synthetic Glucose Tolerance Factor in Normal and Genetically Diabetic Mice
Diabetes **27**(1), 49-56 (1978)
- [143] Stoecker, B.J.; Li, Y.-C.; Wester, D.B.; Chan, S.-B.;
Effects of Torula and Brewer's Yeast Diets in Obese and Lean Mice
Biol. Trace Elem. Res. **14**, 249-54 (1987)

- [144] Flatt, P.R.; Juntti-Berggren, L.; Berggren, P.-O.; Gould, B.; Swanston-Flatt, S.K.;
Failure of glucose tolerance factor-containing brewer's yeast to ameliorate spontaneous diabetes in C57BL/KsJ DB/DB mice
Diabetes Res. **10**, 147-51 (1989)
- [145] Mirsky, N.;
Glucose Tolerance Factor Reduces Blood Glucose and Free Fatty Acids Levels in Diabetic Rats
J. Inorg. Biochem. **49**, 123-8 (1993)
- [146] Freiberg, J.M.; Schneider, T.R.; Streeten, D.H.P.; Schneider, A.J.;
Effects of Brewer's Yeast on Glucose Tolerance (Abstract)
Diabetes **24**(4), 433 (1975)
- [147] Doisy, R.J.; Streeten, D.H.P.; Freiberg, J.M.; Schneider, A.J.;
Chromium Metabolism in Man and Biochemical Effects
in: Prasad, A.S.; Oberleas, D. (Hrsg.): Trace Elements in Human Health and Disease Vol. II (Essential and Toxic Elements), Academic Press, New York u.a. 1976, S. 79-104
- [148] Riales, R.;
Influence of brewer's yeast on lipoprotein cholesterol concentrations – a preliminary report
in: Shapcott, D.; Hubert, J. (Hrsg.), Chromium in Nutrition and Metabolism (Dev. Nutr. Metab. 2), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam u.a. 1979, S. 199-212
- [149] Offenbacher, E.G.; Pi-Sunyer, F.X.;
Beneficial Effect of Chromium-rich Yeast on Glucose Tolerance and Blood Lipids in Elderly Subjects
Diabetes **29**, 919-25
- [150] Polansky, M.M.; Anderson, R.A.; Bryden, N.A.; Glinsmann, W.H.;
Chromium (Cr) and brewer's yeast supplementation of human subjects: effect on glucose tolerance, serum glucose, insulin and lipid parameters (Abstract)
Fed. Proc. **41**(2), 391 (Abstract 709) (1982)
- [151] Elwood, J.C.; Nash, D.T.; Streeten, D.H.P.;
Effect of High-Chromium Brewer's Yeast on Human Serum Lipids
J. Am. Coll. Nutr. **1**, 263-74 (1982)

- [152] Grant, A.P.; McMullen, J.K.;
The effect of brewer's yeast containing glucose tolerance factor on the response to treatment in type 2 diabetics. A short controlled study
Ulster Med. J. **51**(2), 110-4 (1982)
- [153] Hunt, A.E.; Allen, K.D.; Smith, B.A.;
Effect of chromium supplementation on hair chromium concentration and diabetic status (Abstract)
Fed. Proc. **42**, 925 (Abstract 3705) (1983)
- [154] Rabinowitz, M.B.; Gonick, H.C.; Levin, S.R.; Davidson, M.B.;
Effects of Chromium and Yeast Supplements on Carbohydrate and Lipid Metabolism in Diabetic Men
Diabetes Care **6**(4), 319-27 (1983)
- [155] Wang, M.C.; Fox, E.A.; Stoecker, B.J.; Menendez, C.E.,
Chromium supplementation and serum cholesterol levels in adults (Abstract)
Fed. Proc. **43**(2), 471 (Abstract 1088)
- [156] Elias, A.N.; Grossman, M.K.; Valenta, L.J.;
Use of the artificial beta cell (ABC) in the assessment of peripheral insulin sensitivity: effect of chromium supplementation in diabetic patients
Gen. Pharmac. **15**(6), 535-9 (1984)
- [157] Vinson, J.A.; Bose, P.;
The effect of a high chromium yeast on the blood glucose control and blood lipids of normal and diabetic human subjects
Nutr. Rep. Intern. **30**(4), 911-8 (1984)
- [158] Offenbacher, E.G.; Rinko, C.J.; Pi-Sunyer, F.X.;
The effects of inorganic chromium and brewer's yeast on glucose tolerance, plasma lipids, and plasma chromium in elderly subjects
Am. J. Clin. Nutr. **42**, 454-61 (1985)
- [159] Vinson, J.A.; Hsiao, K.-H.;
Comparative effect of various forms of chromium on serum glucose: an assay for biologically active chromium
Nutr. Rep. Intern. **32**(1), 1-7 (1985)

- [160] Cheng, N.-Z.; Jiang, G.-R.; Xu, X.-Y.; Zhang, M.-F.; Hu, X.-L.; Zhao, Z.-L.; Zhang, G.-W.; Wang, J.-F.; Yin, C.-R.; Wang, X.-F.; Lian, X.-Z.; Bei, Z.-Z.; *The effects of high and low chromium yeast supplementation on glucose metabolism of noninsulin dependent diabetic patients*
in: Hurley, L.S.; Keen, C.L.; Lönnerdal, B.; Rucker, R.B. (Hrsg.): Trace Elements in Man and Animals 6, Plenum Press, New York u.a. 1988, S. 389-90
- [161] Clausen, J.;
Chromium Induced Clinical Improvement in Symptomatic Hypoglycemia
Biol. Trace Elem. Res. **17**, 229-36 (1988)
- [162] Wang, M.M.; Fox, E.A.; Stoecker, B.J.; Menendez, C.E.; Chan, S.B.;
Serum cholesterol of adults supplemented with brewer's yeast or chromium chloride
Nutr. Res. **9**, 989-998 (1989)
- [163] Jiang, G.R.; Cheng, N.Z.; Zhang, M.F.; Xu, X.Y.;
The effects of high-chromium yeast supplementation on serum lipid of adults
in: Momcilovic, B. (Hrsg.): Trace Elem. Man Animal 7th. 1991, 18-1
- [164] Roeback, J.R.; Hla, K.M.; Chambless, L.E.; Fletcher, R.H.;
Effects of Chromium Supplementation on Serum High-Density Lipoprotein Cholesterol Levels in Men Taking Beta-Blockers
Ann. Intern. Med. **115**(12), 917-24 (1991)
- [165] Uusitupa, M.I.J.; Mykkänen, L.; Siitonen, O.; Laakso, M.; Sarlund, H.; Kolehmainen, P.; Räsänen, T.; Kumpulainen, J.; Pyörälä, K.;
Chromium supplementation in impaired glucose tolerance of elderly: effects on blood glucose, plasma insulin, C-peptide and lipid levels
Br. J. Nutr. **68**, 209-16 (1992)
- [166] Li, Y.-C.;
Effects of Brewer's Yeast on Glucose Tolerance and Serum Lipids in Chinese Adults
Biol. Trace Elem. Res. **41**, 341-7 (1994)
- [167] Trow, L.G.; Lewis, J.; Greenwood, R.H.; Sampson, M.J.; Self, K.A.; Crews, H.M.; Fairweather-Tait, S.J.;
Lack of Effect of Dietary Chromium Supplementation on Glucose Tolerance, Plasma Insulin and Lipoprotein Levels in Patients with Type 2 Diabetes
Int. J. Vitam. Nutr. Res. **70**(1), 14-18 (2000)

- [168] Mertz, W.; Roginski, E.E.; Schwarz, K.;
Effect of trivalent Chromium Complexes on Glucose Uptake by Epididymal Fat Tissue of Rats
J. Biol. Chem. **236**(2), 318-22
- [169] Mertz, W.; Thurman, D.E.;
Effects of yeast fractions on glucose metabolism of rat tissue in vitro (Abstract)
Fed. Proc. **27**, 482 [A 1493] (1968)
- [170] Anderson, R.A.; Brantner, J.H.; Polansky, M.M.;
An Improved Assay for Biologically Active Chromium
J. Agric. Food Chem. **26**(5), 1219-1221 (1978)
- [171] Toepfer, E.W.; Mertz, W.; Roginski, E.E.; Polansky, M.M.;
Chromium in Foods in Relation to Biological Activity
J. Agric. Food Chem. **21**, 69-73 (1973)
- [172] Khan, A.; Bryden, N.A.; Polansky, M.M.; Anderson, R.A.;
Insulin Potentiating Factor and Chromium Content of Selected Foods and Spices
Biol. Trace Elem. Res. **24**(3), 183-8 (1990)
- [173] Burkeholder, J.N.; Mertz, W.;
Properties and Effects of Chromium(III) Fractions Obtained from Brewer's Yeast
Proc. Int. Congr. Nutr., 7th., Meeting Date 1966, Vol. 5, Friedrich Vieweg und Sohn, Braunschweig 1967, S. 701-5
- [174] Anderson, R.A.; Bryden, N.A.;
Concentration, Insulin Potentiation, and Absorption of Chromium in Beer
J. Agric. Food Chem. **31**(2), 308-11 (1983)
- [175] Offenbacher, E.G.; Pi-Sunyer, F.X.;
Effects of pH and temperature on chromium concentration in water and fruit juices exposed to stainless steel (Abstract)
Fed. Proc. **41**(2), 391 [A 712] (1982)
- [176] Haylock, S.J.; Buckley, P.D.; Blackwell, L.F.;
Separation of Biologically Active Chromium-containing Complexes from Yeast Extracts and other Sources of Glucose Tolerance Factor (GTF) Activity
J. Inorg. Biochem. **18**, 195-211 (1983)

- [177] Mirsky, N.; Weiss, A.; Dori, Z.;
Chromium in Biological Systems, I. Some Observations on Glucose Tolerance Factor in Yeast
J. Inorg. Biochem. **13**, 11-21 (1980)
- [178] Eddy, A.A.;
Aspects of the Chemical Composition of Yeast
in: Cook, A.H. (Hrsg.), *The Chemistry and Biology of Yeasts*, Academic Press Inc., New York u.a. 1958, S. 157-249
- [179] International Atomic Energy Agency (IAEA)
The IAEA Database of Natural Matrix Reference Materials
Stand: Juli 2000
<http://www.iaea.or.at/programmes/nahunet/e4/nmrm/index.thm>
- [180] Hébert, M.A.;
Toxicité des sels de chrome, d'aluminium et de magnésium; leur action sur diverses fermentation. Comparaison avec les propriétés analogues des terres rares
Bull. Soc. Chim. France **I**, 1026-32 (1907)
- [181] White, J.; Munns, D.J.;
Inhibitory effect of common elements towards yeast growth
J. Inst. Brew. **57**, 175-9 (1951)
- [182] Frey, S.W.; DeWitt, W.G.; Bellomy, B.R.;
The Effect of Several Trace Metals on Fermentation
Am. Soc. Brew. Chem., Proc. 199-205 (1967)
- [183] Hartelius, V.;
The influence of chromium on yeast spore germination and yeast growth
Compt.-rend. Lab. Carlsberg, Sér. physiol. **25**(16), 382-88
- [184] Kumpulainen, J.; Koivistoinen, P.;
Effects of Glucose and Chromium(III) Concentrations in the Medium on the Uptake of ⁵¹Cr by Brewer's Yeast
Bioinorg. Chem. **8**, 431-8 (1978)
- [185] Davies, D.M.; Holdsworth, E.S.; Sherriff, J.L.;
The isolation of Glucose Tolerance Factors from Brewer's Yeast and Their Relationship to Chromium
Biochem. Med. **33**, 297-311 (1985)

- [186] Holdsworth, E.S.; Neville, E.;
Effects of extracts of high- and low-chromium brewer's yeast on metabolism of glucose by hepatocytes from rats fed on high- or low-Cr diets
Br. J. Nutr. **63**, 623-30 (1990)
- [187] Hegóczki, J.; Suhajda, Á.; Janzsó, B.; Vereczkey, G.;
Preparation of chromium enriched yeasts
Acta Alimentaria **26**(4), 345-58 (1997)
- [188] Batic, M.; Raspor, P.;
Effect of cultivation mode on a bioprocess for chromium yeast biomass enrichment
Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol. **439**(Suppl.), R73-5 (2000)
- [189] Anderson, R.A.; Polansky, M.M.; Roginski, E.E.; Mertz, W.;
Factors Affecting the Retention and Extraction of Yeast Chromium
J. Agric. Food Chem. **26**(4), 858-61 (1978)
- [190] Kumpulainen, J.; Koivistoinen, P.; Lahtinen, S.;
Isolation, Purification, and Partial Chemical Characterization of Chromium(III) Fractions Existing in Brewer's Yeast and Sabouraud's Liquid Medium
Bioinorg. Chem. **8**, 419-429 (1978)
- [191] Anderson, R.A.; Polansky, M.M.; Brantner, J.H.; Roginski, E.E.;
Chemical and Biological Properties of Biologically Active Chromium
in: Kirchgeßner, M. (Hrsg.): Trace Elem. Metab. Man Anim., Proc. Int. Symp., 3rd. Meeting Date 1977, Arbeitskreis Tierernährungsforschung Weihenstephan, Inst. f. Ernährungsphysiol., Freising-Weihenstephan, S. 269-71 (1978)
- [192] Holdsworth, E.S.; Neville, E.;
Extracts of brewer's yeast contain GABA which enhances activation of glycogen synthetase by insulin in isolated rat hepatocytes
Biochem. Intern. **17**(6), 1107-16 (1988)
- [193] Weseloh, G.;
Isolation chromhaltiger Verbindungen aus Bierhefe
Diplomarbeit, Universität Hamburg 1991
- [194] siehe [12], S. 132
- [195] siehe [12], S. 134

- [196] Banting, F.G.; Best, C.H.;
The Internal Secretion of the Pancreas
J. Lab. Clin. Med. **7**(5), 465-80 (1922)
- [197] Euler, H.; Svanberg, O.;
Über den Zusammenhang zwischen Kohlenhydrat- und Phosphatstoffwechsel bei Diabetes
Biochem. Z. **76**, 326-34 (1916)
- [198] Vahlen, E.;
Über Metabolin und Antibolin aus Hefe
Hoppe-Seylers' Z. Phys. Chem. **106**, 133-77 (1919)
- [199] Collip, J.B.;
Glucokinin.. A new hormone present in plant tissue
J. Biol. Chem. **56**, 513-43 (1923)
- [200] Hutchinson, H.B.; Smith, W.; Winter, L.B.;
Studies on carbohydrate metabolism. II. On the preparation of an anti-diabetic hormone from yeast. Part I.
Biochem. J. **17**, 683-92 (1923)
- [201] Winter, L.B.; Smith, W.;
Some problems of diabetes mellitus
Br. Med. J. **1923 I**, 711-15 (1923)
- [202] von Euler, U.;
Ein insulinartiger Körper in der Hefe
Biochem. Z. **194**, 197-203 (1928)
- [203] Glaser, E.; Halpern, G.;
Über die Aktivierung des Insulins durch Hefepreßsaft
Biochem. Z. **207**, 377-83 (1929)
- [204] Mertz, W.; Toepfer, E.W.; Roginski, E.E.; Polansky, M.M.;
Present knowledge of the role of chromium
Fed. Proc. **33**(11), 2275-80 (1974)
- [205] Votava, H.J.; Hahn, C.J.; Evans, G.W.;
Isolation and partial characterization of a ⁵¹Cr complex from brewer's yeast
Biochem. Biophys. Res. Commun. **55**(2), 312-9 (1973)

- [206] Toepfer, E.W.;
Separation from yeast of chromium containing material possessing glucose tolerance factor (GTF) activity (Abstract)
Fed. Proc. **33**, 659 (A 2536) (1974)
- [207] Blincoe, C.; Bieser, M.; Starich, G.H.;
Comparison of the Chemical States of Chromium in Yeast and Higher Plants
(Poster)
Inorg. Chim. Acta **79**, 223 (1983)
- [208] Haylock, S.J.; Buckley, P.D.; Blackwell, L.F.;
The Relationship of Chromium to the Glucose Tolerance Factor. II
J. Inorg. Biochem. **19**, 105-17 (1983)
- [209] Held, D.D.; Gonzalez-Vergara, E.; Goff, H.M.;
Isolation of a non-chromium insulin-enhancing factor from brewer's yeast
(Abstract)
Fed. Proc. **43**(2), 472 (Abstract 1095) (1984)
- [210] Hwang, D.L.; Lev-Ran, A.; Papoian, T.; Beech, W.K.;
Insulin-like Activity of Chromium-Binding Fractions from Brewer's Yeast
J. Inorg. Biochem. **30**, 219-25 (1987)
- [211] Simonoff, M.; Shapcott, D.; Alameddine, S.; Sutter-Dub, M.T.; Simonoff, G.;
The Isolation of Glucose Tolerance Factors from Brewer's Yeast and Their Relation to Chromium
Biol. Trace Elem. Res. **32**, 25-38 (1992)
- [212] Beran, M.; Paulíček, V.;
Characterization of biologically active Cr-compounds from yeast product diastabil
Potr. Vědy **11**(4), 259-63 (1993)
- [213] Beran, M.; Stahl, R.; Beran jr., M.;
Glycaemic Activity of Chromium(III)- β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Complex and Its Presence in Yeast Extracts
Analyst **120**, 979-81 (1995)
- [214] Schägger, H.; von Jagow, G.;
Tricine-sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa.
Anal. Biochem. **166**(2), 368-79 (1987)

- [215] Yarrow, D.;
Genus 22. Saccharomyces Meyen ex Reess
 in: Kreger-van Rij, N.J.W. (Hrsg.): The yeasts - a taxonomic study, 3rd. rev. enl. ed., Elsevier Science Publishers B.V. - Amsterdam 1984, S. 379
- [216] Handbook of Chemistry and Physics (Lide, D.R. (Hrsg.)), 86nd Ed. 2001, CRC Press LLC, Boca Raton u.a., 11-62
- [217] Handbook of Radioactive Nuclides (Wang, Y. (Hrsg.)), The Chemical Rubber Co., Cleveland 1963
- [218] Table of Isotopes (Firestone, R.B.; Shirley, V.S.; (Hrsg.)), 8th Ed., Vol. I, John Wiley & Sons Inc., New York u.a. 1996
- [219] Chu, S.Y.F.; Ekström L.P.; and Firestone, R.B.;
WWW Table of Radioactive Isotopes
 database version 1999-02-28 from URL
<http://nucleardata.nuclear.lu.se/nucleardata/toi/>
- [220] Knorr, D.; Shetty, K.J.; Kinsella, J.E.;
Enzymatic lysis of yeast cell walls
 Biotechnol. Bioeng. **21**, 2011-21 (1979)
 (zit. nach: Schütte, H.; Kula, M.-R.: Cell Disruption and Isolation of Non-Secreted Products, in: Stephanopoulos, G. (Hrsg.), Bioprocessing (Rehm, H.-J.; Reed, G. (Hrsg.), Biotechnology Vol. 3, 2. Aufl. 1993), VCH-Verlags-gesellschaft mbH, Weinheim u.a., S. 505-26)
- [221] Catley, B.J.;
Isolation and analysis of cell walls
 in : Campbell, I.; Duffus, J.H. (Hrsg.): Yeast - a practical approach, IRL Press, Oxford u.a. 1988, S. 163-83
- [222] Bartnicki-Garcia, S.; Nickerson, W.J.;
Isolation, composition, and structure of cell walls of filamentous and yeast-like forms of mucor rouxii
 Biochim. Biophys. Acta **58**, 102-19 (1962)
- [223] Curran, H.R.; Evans, F.R.;
The killing of bacterial spores in fluids by agitation with small inert particles
 J. Bacteriol. **43**, 125-38 (1942)

- [224] Lamanna, C.; Mallette, M.F.;
Use of glass beads for the mechanical rupture of microorganisms in concentrated suspensions
J. Bacteriol. **67**, 503-4 (1953)
- [225] Kirk, A.D.; Hewavitharana, A.K.;
Reversed-Phase Chromatographic Separation of Highly Charged Inorganic Cations and Anions Using Ion Interaction Reagents and Competing Ions
Anal. Chem. **60**(8), 797-801 (1988)
- [226] Polansky, M.M.;
Properties of synthetic nicotinic acid-chromium complexes and purified concentrates from brewers' yeast (Abstract)
Fed. Proc **33**, 659 (A 2538) (1974)
- [227] Kremmer, T.; Boldizsár, M.; Holczinger, L.;
Comparison of high-performance ion-exchange and ion-pair liquid chromatographic methods for the separation of tumour cell nucleotides
J. Chromatogr. **415**, 53-63 (1987)
- [228] Porath, J.; Flodin, P.;
Gel filtration: a method for desalting and group separation
Nature **183**, 1657-59 (1959)
- [229] Laurent, T.C.; Killander, J.;
A theory of gel filtration and its experimental verification
J. Chromatogr. **14**, 317-30 (1964)
- [230] Wasternack, C.;
Gelchromatographie niedermolekularer Verbindungen
Pharmazie **27**(2), 67-79 (1972)
- [231] Volet, G.; Lesec, J.;
Non-exclusion effects in aqueous SEC: behaviour of some polyelectrolytes using on-line mass detectors
J. Liquid Chrom. **17**(3), 559-77 (1994)
- [232] Hillman, D.E.; Heathcote, C.;
Size exclusion chromatography of small molecules
in: Hunt, B.J.; Holding, S.R. (Hrsg.): *Size exclusion chromatography*, Blackie and Son Ltd., Glasgow 1989, S. 133-169

- [233] Hagel, L.;
Peak capacity of columns for size-exclusion chromatography
J. Chromatogr. **591**, 47-54 (1992)
- [234] Yau, W.W.; Kirkland, J.J.; Bly, D.D.;
Modern Size exclusion chromatography
Wiley-Interscience, New York 1979, S. 240
(zit. nach Malawer, E.G.: Introduction to Size Exclusion Chromatography; in:
Handbook of size exclusion chromatography (Wu, Chi-San (Hrsg.)) (Chroma-
tographic science series 69); Marcel Dekker, New York u.a. 1995, S. 1-24)
- [235] Pharmacia LKB Biotechnology (Hrsg.)
Gel filtration. Theory and practice
1990
- [236] Malawer, E.G.;
Introduction to Size Exclusion Chromatography
in: Wu, C.-S. (Hrsg.); Handbook of size exclusion chromatography (Chroma-
tographic Science series Vol. 69), Marcel Dekker Inc., New York u.a. 1995, S.
1-24
- [237] Meehan, E.;
Semirigid Polymer Gels for Size Exclusion Chromatography
in: Wu, C.-S. (Hrsg.); Handbook of size exclusion chromatography (Chroma-
tographic Science series Vol. 69), Marcel Dekker Inc., New York u.a. 1995, S.
25-46
- [238] Zappoli, S.; Morselli, L.; Osti, F.;
*Application of ion interaction chromatography to the determination of metal
ions in natural water samples*
J. Chromatogr. A **721** 269-77 (1996)
- [239] Melander, W.R.; Horváth, C.;
Theory of Ion-Pair Chromatography
in: Hearn, M.T.W.(Hrsg.): Ion-Pair Chromatography (Chromatographic sci-
ence series 31), Marcel Dekker Inc. New York u.a. 1985, S. 27-75
- [240] Hearn, M.T.W.;
Introduction to Ion-Pair Chromatography of Simple Bases and Acids
in: Hearn, M.T.W.(Hrsg.): Ion-Pair Chromatography (Chromatographic sci-
ence series 31), Marcel Dekker Inc. New York u.a. 1985, S. 1-26

- [241] Cassidy, R.M.; Elchuk, S.;
Dynamically Coated Columns for the Separation of Metal Ions and Anions by Ion Chromatography
Anal. Chem. **54**(9), 1558-63 (1982)
- [242] Francesconi, K.A.; Micks, P.; Stockton, R.A.; Irgolic, K.J.;
Quantitative determination of arsenobetaine, the major water-soluble arsenical in three species of crab, using high pressure liquid chromatography and an inductively coupled argon plasma emission spectrometer as the arsenic-specific detector.
Chemosphere **14**, 1443-53 (1985)
- [243] Barkley, D.J.; Bennett, L.A.; Charbonneau, J.R.; Pokrajac, L.A.;
Applications of high-performance ion chromatography in the mineral processing industry
J. Chromatogr. **606**, 195-201 (1992)
- [244] Perrett, D.; Bhusate, L.; Patel, J.; Herbert, K.;
Comparative Performance of Ion Exchange and Ion-paired Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography for the Determination of Nucleotides in Biological Samples
Biomed. Chromatogr. **5**, 207-11 (1990)
- [245] Suzuki, K.T.; Sunaga, H.; Aoki, Y.; Yamamura, M.;
Gel permeation, ion-exchange and reversed-phase columns for separation of metallothioneins by high-performance liquid chromatography-atomic absorption spectrophotometry.
J. Chromatogr. **281**, 159-66 (1983)
- [246] Lobinski, R.; Chassaing, H.; Szpunar, J.;
Analysis for metallothioneins using coupled techniques.
Talanta **46**, 271-89 (1998)
- [247] Willeford, B.R.; Veening, H.;
High-performance liquid chromatography: applications to organometallic and metal coordination compounds.
J. Chromatogr. **251**, 61-88 (1982)
- [248] Valenty, S.J.; Behnken, P.E.;
Determination of Tris(2,2'-bipyridyl)Ruthenium(II) Derivatives by Reverse Phase Paired-Ion High Performance Liquid Chromatography.
Anal. Chem. **50**(7), 834-7 (1978)

- [249] Lethbridge, J.W.; Reeve, R.N.;
High-performance liquid chromatography in the study of some reactions of chromium(III) complexes
J. Chromat. **314**, 387-95 (1984)
- [250] Denniston, M.L.; Uyeki, E.M.;
Distribution and HPLC study of chromium-51 binding sites in chinese hamster ovary cells
J. Toxicol. Environm. Health **21**(3), 375-86 (1987)
- [251] LaFreniere, K.E.; Fassel, V.A.; Eckels, D.E.;
Elemental Speciation via High-Performance Liquid Chromatography Combined with Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopic Detection: Application of a Direct Injection Nebulizer.
Anal. Chem. **59**(6), 879-87 (1987)
- [252] Roychowdhury, S.B.; Koropchak, J.A.;
Thermospray Enhanced Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy Detection for Liquid Chromatography.
Anal. Chem. **62**(5), 484-9 (1990)
- [253] Hewavitharana, A.K.;
A fast and efficient HPLC method for the separation of chromium complexes in chrome tanning solutions
J. Soc. Leather Technol. Chem. **77**, 143-6 (1993)
- [254] Micallef, S.; Couillard, Y.; Campbell, P.G.C.; Tessier, A.;
An evaluation of the HPLC-Gel chromatographic method for analyzing metallothioneins in aquatic organisms.
Talanta **39**(9), 1073-9 (1992)
- [255] Gelsema, W.J.; De Ligny, C.L.; Remijnse, A.G.; Blijleven, H.A.;
pH- measurements in alcohol-water mixtures, using aqueous standard buffer solutions for calibration.
Rec. Trav. Chim. Pay-Bas **85**, 647-60 (1966)
- [256] Sieswerda, G.B.; Poppe, H.; Huber, J.F.K.;
Flow versus batch detection of radioactivity in column liquid chromatography.
Anal. Chim. Acta **78**, 343-58 (1975)

- [257] Huber, J.F.K.; van Urk-Schoen, A.M.; Sieswerda, G.B.;
Micro-Preparative Operation of High Speed Column-Liquid Chromatography in Chemical Analysis.
Z. Anal. Chem. **264**(4), 257-66 (1973)
- [258] Weise, L.;
Statistische Auswertung von Kernstrahlungsmessungen
Verlag R. Oldenbourg München u.a. 1971, S. 17-24
- [259] Karas, M.; Hillenkamp, F.;
Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10.000 daltons
Anal. Chem. **60**(20), 2299-301 (1988)
- [260] Pergantis, S.A.; Cullen, W.A.; Eigendorf, G.K.;
Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry for the analysis of organoarsenic compounds of environmental interest
Biol. Mass Spectrom. **23**(12), 749-55 (1994)
- [261] Hung, H.-M.; Han, C.-C.; Lin, S.-H.;
On the investigation of the preparation of inorganic ionic clusters by laser desorption ionization
J. Cluster Sci. **6**(4), 533-48 (1995)
- [262] Torgerson, D.F.; Skowronski, R.P.; Macfarlane, R.D.;
New approach to the mass spektroskopy of nonvolatile compounds
Biochem. Biophys. Res. Commun. **60**(2), 616-21 (1974)
- [263] Jungclas, H.; Schmidt, L.; Fritsch, H.-W.; Köhl, P.;
²⁵²Cf-Plasma-Desorptions-Massenspektrometrie
BioTec März 1990, 30-3 (1990)
- [264] Yamashita, M.; Fenn, J.B.;
Electrospray Ion Source. Another Variation on the Free-Jet Theme
J. Phys. Chem. **88**, 4451-9 (1984)
- [265] Aleksandrov, M.L.; Gall, L.N.; Krasnov, N.V.; Nikolaev, V.I.; Pavlenko, V.A.; Shkurov, V.A.; Baram, G.I.; Grachev, M.A.; Knorre, V.D.; Kusner, Y.S.;
Direct coupling of a microcolumn liquid chromatograph and a mass spectrometer
Bioorg. Khim. **10**(5), 710-2 (1984)

- [266] Meng, C.K.; Mann, M.; Fenn, J.B.;
Of Protons or Proteins - "A beam's a beam for a' that"
Z. Phys. D - Atoms, Molecules and Clusters **10**, 361-8 (1988)
- [267] Wilm, M.; Mann, M.;
Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source
Anal. Chem. **68**(1), 1-8 (1996)
- [268] Katta, V.; Chowdhury, S.K.; Chait, B.T.;
Electrospray Ionization: A New Tool for the Analysis of Ionic Transition-Metal Complexes
J. Am. Chem. Soc. **112**, 5348-9
- [269] Colton, R.; Traeger, J.C.;
The application of electrospray mass spectrometry to ionic inorganic and organometallic systems
Inorg. Chim. Acta **201**(2), 153-5 (1992)
- [270] van den Bergen, A.; Colton, R.; Percy, M.; West, B.O.;
Electrospray Mass Spectrometric Study of $[M_3O(RCOO)_6L_3]^+$ Cations ($M=Cr, Fe; L=H_2O$)
Inorg. Chem. **32**, 3408-11 (1993)
- [271] Jaquinod, M.; Leize, E.; Potier, N.; Albrecht, A.-M.; Shanzer, A.; Van Dorsselaere, A.;
Characterization of Non-covalent Complexes by Electrospray Mass Spectrometry
Tetrahedron Lett. **34**(17), 2771-4 (1993)
- [272] Agnes, G.R.; Stewart, I.I.; Horlick, G.;
Elemental speciation measurements with electrospray mass spectrometry: an assessment
Appl. Spectrosc. **48**(11), 1347-59 (1994)
- [273] Andersen, U.N.; McKenzie, C.J.; Bojesen, G.;
Analysis of Multiply Charged Oxo-Bridged Complexes by Electrospray Ionization Mass Spectrometry
Inorg. Chem. **34**, 1435-9 (1995)
- [274] Novotný, P.;
A simple rotary disintegrator for micro-organisms and animal tissues
Nature **202**(4930), 364-6 (1964)

- [275] Danigel, H.; Jungclas, H.; Schmidt, L.;
A californium-252 fission fragment-induced desorption mass spectrometer: design, operation and performance
Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys. **52**(2-3), 223-40 (1983)
- [276] Mann, M.; Wilm, M.S.;
Error-Tolerant Identification of Peptides in Sequence Databases by Peptide Sequence Tags
Anal. Chem. **66**(24), 4390-9 (1994)
- [277] Hutchens, T.W.; Nelson, R.W.; Yip, T.-T.;
Recognition of transition metal ions by peptides
FEBS Lett. **296**(1), 99-102 (1992)
- [278] Lyons, T.P.; Hough, J.S.;
Cation-Binding by Yeast Cell Walls
Biochem. J. 119,10P (Proc. Biochem. Soc.) (1970)
- [279] Brady, D.; Duncan, J.R.;
Binding of heavy metals by the cell walls of Saccharomyces cerevisiae
Enzyme Microb. Technol. **16**, 633-8 (1994)
- [280] Brady, D.; Stoll, A.D.; Starke, L.; Duncan, J.R.;
Chemical and Enzymatic Extraction of Heavy Metal Binding Polymers from Isolated Cell Walls of Saccharomyces cerevisiae.
Biotechnol. Bioeng. **44**, 297-302 (1994)
- [281] Brady, D.; Duncan, J.R.;
Bioaccumulation of metal cations by Saccharomyces cerevisiae.
Appl. Microbiol. Biotechnol. **41**, 149-154 (1994)
- [282] Blackwell, K.J.; Singleton, I.; Tobin, J.M.;
Metal cation uptake by yeast: a review
Appl. Microbiol. Biotechnol. **43**(4), 579-84 (1995)
- [283] Singleton, I.; Tobin, J.M.;
Fungal interactions with metals and radionuclides for environmental bioremediation
Symp. Br. Mycol. Soc. **20**, 282-98 (1996)

- [284] Morley, G.F.; Sayer, J.A.; Wilkinson, S.C.; Gharieb, M.M.; Gadd, G.M.;
Fungal sequestration, mobilization and transformation of metals and metalloids.
Symp. Br. Mycol. Soc. **20**, 235-56 (1996)
- [285] Rothstein, A.; Hayes, A.D.;
The relationship of the cell surface to metabolism XIII: The cation-binding properties of the yeast cell surface
Arch. Biochem. Biophys. **63**, 87-99 (1956)
- [286] Engl, A.; Kunz, B.;
Biosorption of Heavy Metals by Saccharomyces cerevisiae: Effects of Nutrient Conditions
J. Chem. Tech. Biotechnol. **63**, 257-61 (1995)
- [287] Gadd, G.M.;
Accumulation of metals by microorganisms and algae
in: Biotechnology - A Comprehensive Treatise, Vol 6b, VCH- Verlagsgesellschaft, Weinheim 1988, S. 401-33
- [288] Attieh, Z.K.; Mukhopadhyay, C.K.; Seshadri, V.; Tripoulas, N.A.; Fox, P.L.;
Ceruloplasmin ferroxidase activity stimulates cellular iron uptake by a trivalent cation-specific transport mechanism
J. Biol. Chem. **274**(2), 1116-23 (1999)
- [289] Haylock, S.J.; Thornton, R.J.; Buckley, P.D.; Blackwell, L.F.;
Effect of Chromium on the Rate of Carbon Dioxide Evolution from Saccharomyces cerevisiae
Exp. Mycol. **6**, 335-44 (1982)
- [290] Reimers, C.;
Entwicklung, Optimierung und Anwendung eines spurenanalytischen Verfahrens zur Bestimmung von Chrom in ausgewählten pflanzlichen Lebensmitteln
Dissertation, Universität Hamburg 1993, S. 116
- [291] Nowalk, A.J.; Burroughs Tencza, S.; Mietzner, T.A.;
Coordination of Iron by the Ferric Iron-Binding Protein of Pathogenic Neisseria Is Homologous to the Transferrins
Biochemistry **33**(43), 12769-75

- [292] Tesfa-Selase, F.; Hay, R.J.;
Partial characterization and identification of a transferrin-like molecule of pathogenic yeast cryptococcus neoformans
J. Gen. Appl. Microbiol. **42**, 61-70 (1996)
- [293] Evans, G.W.; Pouchnik, D.J.;
Composition and biological activity of chromium-pyridine carboxylate complexes
J. Inorg. Biochem. **49**, 177-87 (1993)
- [294] Mertz, W.;
Biological function of nicotinic acid (NA) - chromium complexes
Fed. Proc. **33**, 659 (Abstract 2535) (1974)
- [295] Broadhurst, C.L.; Schmidt, W.F.; Reeves, J.B. III; Polansky, M.M.; Gautschi, K.; Anderson, R.A.;
Characterization and structure by NMR and FTIR spectroscopy, and molecular modelling of Chromium(III) picolinate and nicotinate complexes utilized for nutritional supplementation.
J. Inorg. Biochem. **66**(2), 119-30 (1997)
- [296] Kunst, L.; Roomans, G.M.;
Intracellular localization of heavy metals in yeast by x-ray microanalysis
Scanning Electron Microsc. 1985(I), 191-9
- [297] Wiame, J.M.;
Étude d'une substance polyphosphorée, basophile et métachromatique chez les levures
Biochim. Biophys. Acta **1**, 247-55 (1947)
- [298] Galli, U.; Schuepp, H.; Brunold, C.;
Heavy-Metal Binding by Mycorrhizal Fungi
Physiol. Plant. **92**(2), 364-8
- [299] Morrison, G.M.P.; Batley, G.E.; Florence, T.M.;
Metal speciation and toxicity
Chem. Brit. **25**, 791-5 (1989)
- [300] Nilsen, T.; Romslo, I.;
Pyrophosphate as a ligand for delivery of iron to isolated rat-liver mitochondria
Biochim. Biophys. Acta **766**(1), 233-9 (1984)

- [301] Weaver, J.; Pollack, S.; Zhan, H.;
Low molecular weight iron from guinea pig reticulocytes isolated by Sephadex G-25 chromatography
Eur. J. Haematol. **43**(4), 321-7 (1989)
- [302] Raguzzi, F.; Lesuisse, E.; Crichton, R.R.;
Iron storage in Saccharomyces cerevisiae
FEBS Letters **231**(1), 253-8 (1988)
- [303] Striffler, J.S.; Law, J.S.; Polansky, M.M.; Bhatena, S.J.; Anderson, R.A.;
Chromium Improves Insulin Response to Glucose in Rats
Metabolism **44**(10), 1314-20 (1995)
- [304] Striffler, J.S.; Polansky, M.M.; Anderson, R.A.;
Dietary Chromium Decreases Insulin Resistance in Rats Fed a High-Fat, Mineral-Imbalanced Diet
Metabolism **47**(4), 396-400 (1998)
- [305] Schroeder, H.A.;
Diabetic-like Serum glucose levels in chromium deficient rats
Life Sci. **4**(21), 2057-62 (1965)
- [306] Schroeder, H.A.;
Chromium Deficiency in Rats: A Syndrome Simulating Diabetes Mellitus with Retarded Growth
J. Nutr. **88**, 439-45 (1966)
- [307] Offenbacher, E.G.; Pi-Sunyer, F.X.; Stoecker, B.J.;
Chromium
in: Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements (O'Dell, B.; Sunde, R.A. (Hrsg.)) (Clinical Nutrition in Health and Disease (Maculin, L.J. (Hrsg.))), Marcel Dekker Inc., New York u.a. 1997, S. 389-411
- [308] Gliemann, J.;
Assay of insulin-like activity by the isolated fat cell method. I. Factors influencing the response to crystalline insulin
Diabetologia **3**(4), 382-8
- [309] Stearns, D.M.;
Isolation and In Vitro Analysis of Biologically Active Chromium
in: Watson, R.R. (Hrsg.): Trace Elements in Laboratory Rodents (Methods in Nutrition Research (Watson, R.R.; Wolinsky, I. (Hrsg.))), CRC Press, Inc., Boca Raton u.a. 1996, S. 287-300

- [310] Urumow, T.; Wieland, O.H.;
On the Nature of the Glucose Tolerance Factor from Yeast
Horm. metabol. Res. **16** (Suppl.), 51-54 (1984)
- [311] Berrio, L.F.; Polansky, M.M.; Anderson, R.A.;
Insulin Activity: Stimulatory Effects of Cinnamon and Brewer's Yeast as Influenced by Albumin
Horm. Res. **37**, 225-9 (1992)
- [312] Zhan, G.; Zhou, B.;
Some problems in the bioactivity assay for glucose tolerance factor
Kexue Tongbao (Foreign Lang. Ed.), **33**(23), 2005-6 (1988)
- [313] O'Donoghue, E.M.; Cooper, J.A.; Jackson, T.G.; Shepherd, P.R.; Buckley, P.D.; Blackwell, L.F.;
Identification of peptides from autolysates of Saccharomyces cerevisiae that exhibit glucose tolerance factor activity in a yeast assay
Int. J. Biochem. **22**(8), 841-6 (1990)
- [314] Sumrall, K.H.; Vincent, J.B.;
Is glucose tolerance factor an artifact produced by acid hydrolysis of low-molecular-weight chromium-binding substance?
Polyhedron **16**(23), 4171-77 (1997)
- [315] Crichton, R.R.; Ward, R.J.;
Iron species in iron homeostasis and toxicity
Analyst **120**(3), 693-7 (1995)
- [316] Vyoral, D.; Petrak, J.; Hradilek, A.;
Separation of cellular iron containing compounds by electrophoresis
Biol. Trace Elem. Res. **61**(3), 263-75 (1998)
- [317] DIN 25482 Teil 1
Nachweisgrenze und Erkennungsgrenze bei Kernstrahlungsmessungen
April 1989
- [318] Handbuch der Präparativen Anorganischen Chemie (Brauer, G. (Hrsg.)),
Band III, 3. Auflage, F. Enke Verlag, Stuttgart 1981, S. 1514

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Es handelt sich hierbei um meinen ersten Promotionsversuch.

Berlin, den 14. Dezember 2001

A handwritten signature in black ink, reading "Rudolf Wiese". The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke extending to the right.