

**Zum analytischen Nachweis kovalent
an Hämoglobin gebundener Fremdstoffmetabolite
am Beispiel Paracetamol**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Alexander Müller
aus Rottweil

Hamburg 2009

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2005 bis Oktober 2008 im Institut für Rechtsmedizin der Universität Hamburg (Direktor Prof. Dr. med. Klaus Püschel) angefertigt.

Tag der Disputation: 29.05.2009

1. Gutachter: Prof. Dr. D. Geffken

2. Gutachter: Prof. Dr. A. Schmoldt

-Meinen Eltern gewidmet-

Danksagungen

Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Achim Schmoldt, Institut für Rechtsmedizin der Universität Hamburg, möchte ich für die Überlassung des Themas und die intensive Unterstützung ganz herzlich danken.

Herrn Professor Dr. Detlef Geffken, Institut für pharmazeutische Chemie der Universität Hamburg, danke ich ganz besonders für die Vertretung der Arbeit im Fachbereich Chemie.

Meinen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Rechtsmedizin danke ich sehr für die stets freundschaftliche und geduldige Zusammenarbeit.

Meinen beiden emsigen Korrekturleserinnen danke ich sehr für ihren unermüdlichen Einsatz.

Ein abschließendes und umfassendes Dankeschön gebührt Regina und meiner Familie.

1 Einleitung	1
1.1 Kovalente Biomoleküladdukte in der Toxikologie	1
1.1.1 Mechanistische Bedeutung	1
1.1.1.a Kovalente Nukleinsäure-Addukte	1
1.1.1.b Kovalente Proteinaddukte	2
1.1.2 Biomoleküladdukte als Dosimeter	3
1.2 Paracetamol	4
1.2.1 Historisches	4
1.2.2 Pharmakologie	5
1.2.2.a Wirkungsmechanismus	5
1.2.2.b Kinetik	5
1.2.3 Paracetamolintoxikation	6
1.2.3.a Epidemiologie	6
1.2.3.b Klinik	7
1.2.3.c Biochemie	7
1.2.3.d Diagnostik	8
1.2.3.e Behandlung	9
1.3 Fragestellung	11
1.3.1 Ziel der Arbeit	11
1.3.3 Vorgehensweise	11
2 Materialien und Geräte	13
2.1 Chemikalien	13
2.2 Geräte	14
2.3 Verbrauchsmaterialien	15
2.4 Software	15
3 Methoden	16
3.1 Flüssigkeitschromatographie/ Massenspektrometrie	16
3.1.1 RP-HPLC der Proteine und Peptide	16
3.1.2 Electrospray-Interface	17
3.1.3 Ionentransfer	17
3.1.4 Massenanalysator (Ionenfalle)	18
3.1.5 Ionendetektor	19
3.1.6 Auflösung und Genauigkeit	20

3.1.7 Proteinmassenspektrometrie	21
3.1.8 Tandemmassenspektrometrie von Peptiden	22
3.2 N-Acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI)	24
3.2.1 Darstellung	24
3.2.2 Säulenchromatographie	24
3.2.3 Gaschromatographie/ Massenspektrometrie	24
3.2.4 HPLC-UV/PDA	24
3.2.5 ESI/MS	25
3.2.6 UV/VIS	25
3.2.7 Dünnschichtchromatographie	25
3.2.8 Quantifizierung	25
3.3 Hämoglobin	27
3.3.1 Isolation von Hämoglobin	27
3.3.2 Hämoglobin Gehaltsbestimmung	27
3.3.3 Globinisolierung	28
3.3.4 HPLC- Hämoglobin	28
3.3.5 LC/MS Hämoglobin	29
3.3.6 Proteolyse	29
3.3.7 LC/MS Peptidanalyse	31
3.4 Hämoglobin-NAPQI-Addukt	32
3.4.1 In Vitro Reaktionsbedingungen	32
3.4.2 HPLC-Untersuchung des Hämoglobins nach der Reaktion mit NAPQI	32
3.4.3 LC/MS-Untersuchung des Hämoglobins nach der Reaktion mit NAPQI	32
3.4.4 V8-Protease-Verdau des Hämoglobins nach der Reaktion mit NAPQI	32
3.5 Methodenoptimierung	33
3.5.1 HPLC	33
3.5.2 Massenspektrometer	33
3.5.3 Probenvorbereitung	35
3.5.4 Kalibration	36
3.6 Untersuchung der Patientenproben	36
3.6.1 Probenherkunft	36
3.6.2 Bestimmung der Paracetamol-Konzentration	39
3.6.3 Bestimmung der NAPQI-Hämoglobin-Addukte	39
3.7 Glutathion-NAPQI-Addukt	39
3.7.1 In Vitro Reaktionsbedingungen	39
3.7.2 LC/MS(/MS) Untersuchung des Reaktionsproduktes	39

3.8 In vitro Inkubationen	39
4 Ergebnisse	40
4.1 N-Acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI)	40
4.1.1 Darstellung	40
4.1.2 Dünnschichtchromatographie	41
4.1.3 HPLC-PDA	41
4.1.4 Electrospray-MS/(MS)	42
4.1.5 GC-EI-MS	43
4.1.6 UV/VIS-Spektrometrie	46
4.1.7 Quantitative Analyse	46
4.1.8 Stabilität	47
4.2 Hämoglobin	48
4.2.1 RP-HPLC	48
4.2.2 LC/MS	50
4.2.3 Proteolyse	55
4.2.3.a Enzymatische Hydrolyse mit Trypsin	57
4.2.3.b Chemische Hydrolyse mit Ameisensäure	58
4.2.3.c Enzymatische Hydrolyse mit V8-Protease	60
4.3 Hämoglobin-NAPQI-Addukt	62
4.3.1 RP-HPLC-Globinanalyse des Reaktionsproduktes	62
4.3.2 Electrospray-MS-Analyse des Reaktionsproduktes	63
4.3.3 HPLC-Untersuchung des Reaktionsproduktes nach V8-Proteolyse	66
4.3.4 LC/MS-Untersuchung des Reaktionsproduktes nach V8-Proteolyse	68
4.3.5 LC/MS/MS-Untersuchung des Reaktionsproduktes nach V8-Proteolyse	70
4.4 Methodenoptimierung	73
4.4.1 Probenvorbereitung	73
4.4.1.a Optimierung der Inkubationszeit	73
4.4.1.b Optimierung des Enzym-Substrat-Verhältnisses	74
4.4.1.c Aufreinigung der Peptide	74
4.4.2 Optimierung LC/MS/MS-Detektion	76
4.4.2.a Chromatographie	76
4.4.2.b Tuning	77
4.4.2.c MS/MS-Detektion	78
4.4.3 Quantifizierung	80
4.4.4 Zusammenfassung der Untersuchungsmethode	82

4.5 Untersuchung der Patientenblutproben	83
4.5.1 Ergebnisse aller untersuchten Blutproben	83
4.5.2 Ergebnisse der Blutproben von Patienten mit wiederholten Blutentnahmen	88
4.5.3 Ergebnisse der Blutuntersuchungen nach Proteinpräzipitation	88
4.6 Untersuchung von in vitro Paracetamol-Inkubationen	89
4.6.1 In vitro Paracetamol/Hämoglobin-Inkubationen	89
4.6.2 Glutathion/NAPQI- Inkubation	90
4.6.3 Glutathion/PCM- Inkubation	93
4.6.4 Hämoglobin/Glutathion/PCM- Inkubation	93
5 Diskussion	95
5.1 Diskussion der Methode	95
5.1.1 In vitro Adduktbildung	95
5.1.2 Analytik des NAPQI-Hämoglobin-Adduktes	97
5.1.2.a Isolation des Hämoglobins	99
5.1.2.b Freisetzung und Nachweis des Adduktes aus dem Hämoglobin	99
5.1.2.c Freisetzung des modifizierten Peptides durch Proteolyse	101
5.1.2.d Nachweisgrenze	103
5.2 Diskussion der Ergebnisse	103
5.2.1 In vitro Adduktbildung	103
5.2.2 Diskussion der Ergebnisse am Hämoglobin aus isolierten Erythrocyten	105
5.2.3 Diskussion der Ergebnisse in hämolysierten Vollblutproben	107
5.3 Fazit	109
5.4 Ausblick	110
6 Zusammenfassung	111
6.1. Zusammenfassung	111
6.2. Summary	113
7 Literaturverzeichnis	115
Gefahrstoffe	128
Lebenslauf	129
Erklärung	130

Abbildungsverzeichnis

Abb.1	Chemische Strukturen von Acetanilid, Paracetamol und Phenacetin (von links)	4
Abb.2	Metabolismus des Paracetamols	6
Abb.3	Rumack-Matthew Nomogramm	9
Abb.4	Fließschema des experimentellen Vorgehens	12
Abb.5	Retentionsverhalten von Biphenyl und Lysozym in der RP-HPLC	16
Abb.6	Ionen-Stabilitätsdiagramm(links) sowie Aufbau (rechts) eines Ionenfallenanalysators	18
Abb.7	Schematische Darstellung der Vakuum- und Potentialverhältnisse im verwendeten Massenspektrometer	20
Abb.8	Isotopenmuster der Molekülionensignale von HLKTEAEMK (links), Insulin (Mitte) sowie bovinem Serumalbumin (rechts)	21
Abb.9	Entstehung und Benennung von Fragmentionen durch kollisionsinduzierte Dissoziation von Peptidbindungen.	22
Abb.10	Kalibrationsfunktion der Paracetamolbestimmung mittels HPLC	26
Abb.11	VIS-Absorptionsspektrum von Oxy-Hämoglobin	28
Abb.12	Massenspektrum der zur Kalibration des Massenspektrometers verwendeten Lösung aus Coffein, MRFA sowie Ultramark 1621	34
Abb.13	HPLC-UV-Chromatogramme der Syntheselösung (oben links), einer PCM-Standardlösung (oben rechts) sowie die zugehörigen UV-Spektren (jeweils darunter)	41
Abb.14	Electrospray-MS-Spektrum der Syntheselösung (5ng/μL): Fullscan-MS m/z= 100-350 (Direct infusion 5μL/min)	42
Abb.15	Electrospray-MS-Spektrum der Syntheselösung (5ng/μL): Fullscan-MS/MS m/z= 150 (links) sowie m/z=152 (rechts) (Direct infusion 5μL/min)	43
Abb.16	EI-Massenspektrum des NAPQI bei der GC/MS-Analyse (RT=9,1 min, oben) sowie Zuordnung der Fragmentionen anhand der NAPQI-Strukturformel (unten)	44
Abb.17	GC-EI-MS-Analyse der Syntheselösung: Total-Ion-Current-Chromatogramm (oben) mit den Signalen für NAPQI (RT=9,1 min) und PCM (RT=12,0 min) sowie EI-Massenspektrum von PCM (unten)	45

Abb.18	UV/VIS-Absorption der Syntheselösung. Nach Zugabe von Ascorbinsäure kommt es zur Abnahme der Absorption, bis hin zum Verschwinden des Maximums bei 370 nm.	46
Abb.19	Stabilität von NAPQI in Lösungen von Ethylacetat (oben), Toluol (Mitte) und Citratpuffer 100mM, pH 7,4 (unten)	47
Abb.20	Chromatogramm der HPLC-Hämoglobin-Analyse gemäß 3.3.4 (A)	49
Abb.21	Chromatogramme der HPLC-Hämoglobin-Analysen gemäß 3.3.4 (B) (oben), 3.3.4 (D) (Mitte) sowie 3.3.4 (E) (unten)	49
Abb.22	TIC- Chromatogramm der LC/MS-Hämoglobin-Analyse	51
Abb.23	Fullscan-MS-Spektren der Proteinsignale b, c und d (von oben nach unten) des TIC-Chromatogramms (vgl. Abb.22)	52
Abb.24	Molekülionenpeaks der Proteinsignale b, c und d (von oben nach unten) nach Dekonvolution der Fullscan-MS-Spektren des TIC-Chromatogramms (vgl. Abb.22/23)	53
Abb.25	Fullscan-MS-Spektrum nach Spektrenaddition im Retentionszeitbereich 42-44 min (oben) sowie zugehöriger Molekülionenpeak (unten).	54
Abb.26	Gemessenes Hämsignal a (links, $m/z=616,20$) sowie theoretische Isotopenpeakverteilung von $C_{34}H_{32}O_4N_4Fe$ (rechts)	54
Abb.27	LC/MS-Chromatogramm des Hämoglobins nach Trypsinhydrolyse	57
Abb.28	LC/MS-Chromatogramm des Hämoglobins nach Ameisensäurehydrolyse	58
Abb.29	LC/MS-Chromatogramm des Hämoglobins nach V8-Proteasenhydrolyse	60
Abb.30	Chromatogramm der HPLC-Analyse von Hämoglobin vor (schwarz, dunkel) und nach (rot, hell) der Inkubation mit NAPQI	62
Abb.31	Molekülionenpeaks nach Dekonvolution der Electrospray-Spektren des Signals b vor (oben) sowie nach (unten) der Inkubation mit NAPQI	63
Abb.32	Molekülionenpeaks nach Dekonvolution der Electrospray-Spektren des Signals d vor (oben) sowie nach (unten) der Inkubation mit NAPQI	64
Abb.33	Fullscan-MS-Spektrum des Signals c nach der Inkubation mit NAPQI (oben) sowie Molekülionenpeaks nach Dekonvolution der Electrospray-Spektren des Signals c vor (Mitte) und nach (unten) der Inkubation mit NAPQI	65

Abb.34	HPLC-Chromatogramme des V8-Proteasenverdaus von Hämoglobin vor (schwarz, dunkel) sowie nach (rot, hell) der Reaktion mit NAPQI	66
Abb.35	Vergrößerter Ausschnitt der HPLC-Chromatogramme der durch V8-Proteolyse entstandenen Peptide des Hämoglobins vor (schwarz, dunkel) und nach (rot, hell) der Reaktion mit NAPQI	67
Abb.36	UV-Absorptionsspektren der Hämoglobinpeptide nach Inkubation mit NAPQI und V8-Proteasenverbau bei RT 24,3 min (oben) und RT 23,3 min (unten)	67
Abb.37	LC/MS-Chromatogramme des V8-Proteasenverdaus von Hämoglobin vor (links) sowie nach (rechts) der Inkubation mit NAPQI	68
Abb.38	Fullscan-MS-Spektren des nativen, nach der Inkubation mit NAPQI in reduzierter Intensität detektierten Hämoglobinpeptids $[M+H]^+=1305,5$ (links), sowie des nach der Inkubation mit NAPQI neu entstandenen Peptids $[M+H]^+ =1454,5$ (rechts).	70
Abb.39	Tochterionen-Massenspektren der Precursorionen $m/z= 1305,5$ (oben) sowie $m/z= 1454,5$ (unten).	71
Abb.40	LC/MS-Chromatogramme (links TIC, rechts SIM $m/z= 1305,5$) des Hämoglobins nach Hydrolyse mit V8-Protease nach 0, 3, 5 und 9 Stunden Inkubationszeit	73
Abb.41	LC/MS-Chromatogramme (links TIC, rechts SIM $m/z= 1305,5$) des Hämoglobins nach Hydrolyse mit V8-Protease nach 5 Stunden bei Zusatz von 1, 2 und 5% V8-Protease (von hinten nach vorne)	74
Abb.42	LC/MS-Chromatogramme (links TIC, rechts SIM $m/z= 1305,5$) des Hämoglobins nach Hydrolyse mit V8-Protease ohne Ultrafiltration, nach 3000 Da Cut-Off und 10000 Da Cut-Off-Ultrafiltration (von hinten nach vorne)	75
Abb.43	LC/MS-Chromatogramme (links TIC, rechts SIM $m/z=1305,5$) des Hämoglobins nach Hydrolyse mit V8-Protease ohne (hinten) und mit 2% TCA (vorne)	75
Abb.44	LC/MS-Chromatogramm (TIC) der Peptidtrennung einer mit NAPQI inkubierten Hämoglobinprobe	76

Abb.45	LC/MS-Chromatogramm (TIC) der Peptidtrennung einer mit NAPQI inkubierten Hämoglobinprobe: Vergrößerte Darstellung des LC-MS-Chromatogramms von Abb.42 im Elutionsbereich der Peptide LHCDKLHVDPE (RT= 25,6 min), sowie LH(C+NAPQI)DKLHVDPE (RT= 28,0 min)	77
Abb.46	Zoom-Scan-MS-Spektrum des Peptids LH(C+NAPQI)DKLHVDPE	78
Abb.47	Tochterionenspektren der Precursorionen m/z 727,9 (rechte Spalte) sowie m/z 1454,7 (linke Spalte) bei 20% (erste Zeile), 25% (zweite Zeile) sowie 30% (dritte Zeile) relativer Kollisionsenergie	79
Abb.48	LC/MS/MS-Chromatogramm eines Kalibrators (50 pmol/mg)mit Darstellung der Ionenspuren für das Targetion sowie die beiden Qualifierionen der Peptide	80
Abb.49	Die zur Quantifizierung des NAPQI im Hämoglobin verwendete Kalibrationsfunktion. Diese wurde ermittelt durch lineare Regression aus den gemessenen Flächenverhältnissen der Kalibratoren und deren NAPQI-Gehalt gemäß Tab.15	81
Abb.50	Häufigkeiten der gemessenen Konzentrationen an NAPQI-Hb-Addukt aller untersuchter Patientenblutproben	86
Abb.51	Häufigkeiten der gemessenen Konzentrationen an freiem PCM aller untersuchter Patientenblutproben	87
Abb.52	Korrelation der Konzentrationen an freiem PCM und NAPQI-Hb-Addukten in den hämolytischen Vollblutproben	87
Abb.53	LC/MS/MS-Chromatogramm von Hämoglobin nach Inkubation ohne (oben) sowie mit (unten) Zusatz von PCM (100 mg/L)	90
Abb.54	Strukturformel des Glutathions (MW = 307,2)	91
Abb.55	LC/MS Chromatogramm des Reaktionsproduktes von Glutathion und NAPQI	91
Abb.56	Tochterionenspektren von GSH (oben) sowie der beiden Reaktionsprodukte RT= 20,6/22,6 min (unten. Die roten Pfeile zeigen die um +149 Da versetzten Tochterionen	92
Abb.57	LC/MS/MS-Chromatogramm einer Inkubation von Hämoglobin, PCM und Glutathion	94
Abb.58	Molekülmodell des Hämoglobins nach [125] (Hämgruppen sind gelb (hell) gezeichnet, Cysteinreste jeweils nur einmal dargestellt)	104

Tabellenverzeichnis

Tab.1	Beispiele direkter und indirekter genotoxischer Kanzerogene nach <i>Marquardt</i> [2]	2
Tab.2	Beispiele cytotoxischer Substanzen mit nachgewiesener kovalenter Proteinbindung [12]	3
Tab.3	Beispiele für die Verwendung von Hämoglobinaddukten als humane Biomarker [20]	4
Tab.4	Aminosäure- Reste mit ihren zugehörigen Summenformeln und Massen zur Interpretation von Fragmentationenspektren	23
Tab.5	Chromatographische Bedingungen der Globinkettentrennung	29
Tab.6	Substratspezifität der verwendeten Enzyme. Die Hydrolyse erfolgt zwischen P1 und P1'	31
Tab.7	Übersicht der Patienten, deren Blutproben zur Untersuchung verwendet wurden	37
Tab.8	Ergebnisse der NAPQI-Syntheseansätze	47
Tab.9	Berechnete und gemessene Molekülmassen der einzelnen Globinketten	51
Tab.10	Aminosäuresequenzen der humanen Globine (Swiss-Prot/TrEMBL-Datenbank)	56
Tab.11	Detektierte Peptide des Hämoglobins nach Trypsinhydrolyse	57
Tab.12	Detektierte Peptide des Hämoglobins nach Ameisensäurehydrolyse	59
Tab.13	Detektierte Peptide des Hämoglobins nach V8-Proteasehydrolyse	60
Tab.14	Detektierte Peptide des V8-Proteasenverdaus von Hämoglobin vor (erste Spalte) sowie nach (zweite Spalte) Inkubation mit NAPQI. Nach der Inkubation unverändert detektierte Peptide sind mit „+“ gekennzeichnet, Unterschiede in den Zeilen sind grau gekennzeichnet. Spalten drei und vier geben eine Zuordnung des Peptids zur Hämoglobinsequenz.	69
Tab.15	Gegenüberstellung und Interpretation der Fragmentationen des nativen, nach der Inkubation mit NAPQI in reduzierter Intensität detektierten Hämoglobinpeptids $[M+H]^+ = 1305,5$ (oben), sowie des nach der Inkubation mit NAPQI entstandenen Peptids $[M+H]^+ = 1454,5$ (unten).	72

Tab.16	Gemessene Signalflächen der Targetionen des modifizierten LHC(NAPQI)-DKLHVDPE- Peptids sowie des als internen Standard verwendeten nativen LHCDKLHVDPE-Peptids bei Inkubation von Hämoglobin mit unterschiedlichen Mengen NAPQI.	81
Tab.17	Zusammenfassung der analytischen Kenndaten der Untersuchungsmethode	82
Tab.18	Ergebnisse aller untersuchter Patientenproben mit Lab-Nr., Probenart (s= hämolytisches Vollblut, e= Erythrocyten-Hämolysat), freier PCM-Serumkonzentration [mg/mL] sowie kovalent gebundenem NAPQi [pmol NAPQI/mg Hb]	84
Tab.19	Ergebnisse der Blutproben von Patienten mit wiederholten Blutentnahmen	88
Tab.20	Ergebnisse der Untersuchung hämolytischer Vollblutproben sowie daraus durch Präzipitation gewonnener Globinproben	89
Tab.21	Ergebnisse der Inkubationsexperimente mit Hämoglobin, Glutathion und PCM	94

Abkürzungsverzeichnis

A/ Ala	Alanin
AC	Alternating Current
ACN	Acetonitril
AG	Aktiengesellschaft
AIF	Apoptose induzierender Faktor
ALT	Alaninaminotransferase
amu	Atomic Mass Unit
API	Atmospheric Pressure Ionization
AST	Aspartataminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BHT	Butylhydroxytoluol
BSA	Bovines Serumalbumin
C/ Cys	Cystein
CID	Collision Induced Dissociation
COX	Cyclooxygenase
D/ Asp	Asparaginsäure
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DTNB	5,5-Dithio-bis-2-Nitro-Benzoesäure
E/ Glu	Glutaminsäure
EC	Electrochemistry
ECD	Elektrochemischer Detektor
EI	Electron Impact Ionization
ESI	Electrospray Ionization
F/ Phe	Phenylalanin
Fa	Firma
FAC	Ameisensäure

FPIA	Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay
Fwhm	Full Width at Half Maximum
G/ Gly	Glycin
GC	Gaschromatograph
GSH	Glutathion
GSSG	Dimeres Glutathiondisulfid
H/ His	Histidin
Hb	Hämoglobin
Hb	Hämoglobin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HWZ	Halbwertszeit
i.p.	Intraperitoneal
I/ Ile	Isoleucin
IS	Interner Standard
K/ Lys	Lysin
L/ Leu	Leucin
LC/MS	Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry
LC/MS/MS	Liquid Chromatography/ Tandem Mass Spectrometry
M/ Met	Methionin
MS	Massenspektrometer
MSD	Massenselektiver Detektor
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid
N/ Asn	Asparagin
NAC	N-Acetylcystein
NAPQI	N-Acetyl-p-benzochinonimin
NCI	Negative chemische Ionisation
P/ Pro	Prolin
PCM	Paracetamol
PCM	Paracetamol

PDA	Photodioden-Array
PFPITC	Pentafluorphenylisothiocyanat
PT	Prothrombinzeit
Q/ Gln	Glutamin
R/ Arg	Arginin
Rf	Radio Frequency
RP	Reversed Phase
S/ Ser	Serin
SIM	Single Ion Mode
SmAC	Second Mitochondria Derived Activator of Caspase
SN1	Nucleophile Substitution 1. Ordnung
SN2	Nucleophile Substitution 2. Ordnung
SPE	Solid Phase Extraction
T/ Thr	Threonin
TBME	tert-Butylmethylether
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	Total Ion Current
TPCK	L-1-Tosylamido-2-phenylethyl-chloromethylketon
UKE	Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
V/ Val	Valin
VIS	Visible Light
W/ (Trp)	Tryptophan
Y/ Tyr	Tyrosin

1 Einleitung

1.1 Kovalente Biomoleküladdukte in der Toxikologie

1.1.1 Mechanistische Bedeutung

1.1.1.a Kovalente Nukleinsäure-Addukte

Kovalente Addukte zwischen Fremdstoffen oder Fremdstoffmetaboliten und zellulären Nukleinsäuren spielen eine bedeutende Rolle bei der durch genotoxische Substanzen bedingten chemischen Kanzerogenese.

Yamagiwa und Ichikawa [1] zeigten bereits im Jahre 1918 durch ihre Experimente mit Teer auf Kaninchenhaut, dass sich mit chemischen Substanzen gezielt Tumoren auslösen liessen. In der Folge wurden durch Tierexperimente zahlreiche natürliche oder synthetische Substanzen mit kanzerogener Wirkung identifiziert [2] und es begann die Untersuchung der Kanzerogenese auf biochemischer Ebene.

Miller und Miller [3] beobachteten die Ausbildung fest an Gewebe gebundener Azofarbstoffe bei Versuchstieren, die zuvor das kanzerogene p-Dimethylaminoazobenzol aufgenommen hatten. Da diese, wie die entstandenen Tumore, nur in der Leber zu finden waren und zudem ein Zusammenhang zwischen der Menge gebundener Azofarbstoffe und Tumorfrequenz bestand, wurde eine kovalente, chemische Bindung von Dimethylaminoazobenzol an zelluläre Strukturen erstmals als mechanistischer Faktor in der chemischen Kanzerogenese angesehen. *Brookes und Lawley* entdeckten 1964 schliesslich Nukleinsäuren als Zielstrukturen polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe und somit das molekulare Modell der chemischen Mutagenese [4].

Es zeigte sich, dass einige Substanzen das Potential besitzen, direkt mit Nukleinsäuren eine kovalente Bindung einzugehen (direkte Kanzerogene), während viele Chemikalien erst durch Metabolisierung zu wirksamen Kanzerogenen werden (indirekte Kanzerogene) [5].

Typische metabolische Aktivierungsreaktionen solcher indirekter Kanzerogene sind Cytochrom P450-katalysierte mikrosomale Phase-I-Reaktionen wie Epoxidierung (z.B. polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe) oder N-Hydroxylierungen (z.B. aromatische Amine). Tabelle 1 zeigt eine Übersicht solcher direkter und indirekter Kanzerogene, für die eine kovalente Bindung an Nukleinsäuren nachgewiesen ist. Gemeinsames Merkmal dieser Substanzen ist ein elektrophiles Zentrum, welches in der Lage ist, mit Nucleophilen innerhalb der Nukleinsäuren (z.B. O⁶-Guanin) eine kovalente chemische Bindung einzugehen und so deren Struktur zu verändern. Für das Ausmaß der mutagenen und in der Folge möglicherweise kanzerogenen Wirkung ist der Ort sowie der alkylierende Rest von entscheidender Bedeutung.

Tab.1: Beispiele direkter und indirekter genotoxischer Kanzerogene nach Marquardt [2]

Direkte Kanzerogene	Indirekte Kanzerogene
α -Halogenalkohole	Polycyclische Aromaten
Nitrosamide	Aromatische Amine
Alkylhalogenide	Aromatische Nitroverbindungen
Stickstoff-, Schwefelloste	Alkene
Aziridine, Epoxide	Nitrosamine
Alkylsulfate	Aldehyde
Nitrosoharnstoff	Naturstoffe [Aflatoxine, Furane]

1.1.1.b Kovalente Proteinaddukte

Kovalente Addukte zwischen Fremdstoffen oder Fremdstoffmetaboliten und zellulären Proteinen sind oftmals beteiligt an einer durch Xenobiotika induzierten Zytotoxizität. Bei Untersuchungen der durch Brombenzol verursachten Leberschädigung wurde erstmalig durch *Brodie* 1971 [6] eine kovalente Bindung von Fremdstoffmetaboliten an Proteine als wesentlicher Faktor des toxischen Geschehens postuliert.

Heute sind für eine ganze Reihe cytotoxischer Substanzen kovalente Proteinaddukte nachgewiesen, ihre mechanistische Bedeutung ist jedoch oft unklar. Tabelle 2 gibt hierüber zusammenfassend einen Überblick [7], [8].

Der Pathomechanismus der durch n-Hexan induzierten Neurotoxizität ist bisher am besten verstanden [9]: n-Hexan wird metabolisch zum γ -Diketon 2,5-Hexandion umgesetzt, dieses reagiert mit E-Amino-Gruppen aus Lysinresten kovalent unter Ausbildung von Pyrrolen. Hierbei sind hauptsächlich Lysinreste von axonalen Proteinen des Cytoskeletts betroffen, durch Oxidation des Pyrrolringes kommt es zu einer Quervernetzung von Neurofilamenten [10].

Folglich wird der cytotoxische Effekt direkt durch kovalente Bindung eines Fremdstoffmetaboliten hervorgerufen. Es ist jedoch auch möglich, dass die kovalente Bindung an Proteine indirekt eine schädliche Wirkung auslöst, wenn es bei der Bindung zur Entstehung eines Immunogens kommt. Dies ist der Fall bei einer „Halothan-Hepatitis“ [11]. Das Inhalationsnarkotikum Halothan wird mikrosomal oxidiert, über einen reaktiven Metaboliten entstehen trifluoracetylierte Leberproteine mit Antigenqualität, welche die Bildung von Antikörpern und eine Immunreaktion hervorrufen.

Bei vielen Fremdstoffen, bei denen die Ausbildung kovalenter Proteinaddukte nachgewiesen wurde, kann deren toxische Wirkung jedoch nicht nur allein dadurch erklärt werden, es müssen gleichzeitig nichtkovalente Effekte vorhanden sein, die zur Zellschädigung führen. Dies ist bei Paracetamol der Fall, worauf unter 1.2.3.b genauer eingegangen wird.

Tab.2: Beispiele cytotoxischer Substanzen mit nachgewiesener kovalenter Proteinbindung [12]

Paracetamol	Halothan
Acrylamide	Isoniazid
Allylalkohol	1-Naphthol
Benzol	Valproinsäure
Brombenzol	Schwefelkohlenstoff
Chloroform	Mitomycin C

1.1.2 Biomoleküladdukte als Dosimeter

In den 70er Jahren begann die Untersuchung von Biomoleküladdukten vor dem Hintergrund einer in vivo-Dosimetrie reaktiver Substanzen. *Ehrenberg* [13] führte 1974 das Konzept der „Tissue-Dose“, der am Wirkort auftretenden Konzentration elektrophiler Moleküle, am Beispiel des Ethylenoxids ein. Da ein Zusammenhang zwischen den Konzentrationen am Wirkort und anderen Kompartimenten besteht, können, um auf die „Tissue Dose“ zu schliessen, Biomoleküladdukte stellvertretend in Blutzellen bestimmt werden und somit Aufschluss geben über eine individuelle innere Beanspruchung eines Organismus durch reaktive Fremdstoffe bzw. Metabolite. 1976 wurden erstmals im Tierexperiment Hämoglobinaddukte von radioaktiv markiertem Ethylenoxid quantifiziert [14], wenig später gelang es, Hämoglobinaddukte des Ethylenoxids auch in Humanproben nachzuweisen [15]. Das analytische Prozedere war aufwendig, isoliertes Hämoglobin wurde vollständig hydrolysiert und die modifizierten Aminosäuren mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie nachgewiesen. Eine wesentliche Verbesserung der Analytik wurde 1986 mit der „N-Alkyl-Edman-Methode“ erreicht, bei der durch einen modifizierten Edman-Abbau das N-terminale Valin vom Hämoglobin abgetrennt wurde [16]. Fremdstoffaddukte am nucleophilen Valin konnten damit schneller, selektiver und empfindlicher nachgewiesen werden. Obgleich DNA-Addukte genotoxischer Substanzen das eigentliche Zielmolekül enthalten und in Leukozyten mit ³²P-Postlabeling-Technik sehr sensitiv nachgewiesen werden können, werden zum biochemischen Monitoring in der Routine bevorzugt Proteinaddukte verwendet [17]. Diese zeigen nicht nur eine direkte Proportionalität zu den Nukleinsäureaddukten, sondern bieten darüber hinaus eine grosse Verfügbarkeit sowie Stabilität einmal gebildeter Addukte, die im Gegensatz zu DNA-Addukten enzymatisch nicht verändert werden [18]. Dabei werden meist Hämoglobinaddukte untersucht; Tabelle 3 gibt einen Überblick gängiger Anwendungen. Aufgrund der langen Lebensdauer der Erythrocyten von etwa 120 Tagen können Addukte im humanen Hämoglobin bis zu einigen Monaten nach einer Fremdstoffexposition nachgewiesen werden [19]. Albuminaddukte haben aufgrund der Albuminhalbwertszeit von etwa 20-25 Tagen eine deutlich kürzere Lebensdauer, können aber, gerade bei hepatisch

gebildeten Fremdstoffmetaboliten, hohe Konzentrationen erreichen, bedingt durch die Albuminsynthese in der Leber sowie das Fehlen einer Membrangrenze, wie sie bei den Erythrocyten gegeben ist.

Tab.3: Beispiele für die Verwendung von Hämoglobinaddukten als humane Biomarker [20]

Ethylenoxid	2,6-Dinitrotoluol
Butadien	PHIP
Acrylnitril	2,4,6-Trinitrotoluol (TNT)
Acrylamid	1-Nitropyren
Anilin	m-Toluidin
4-Aminobiphenyl	PAH

1.2 Paracetamol

1.2.1 Historisches

Im Jahre 1886 entdeckten *Cahn und Hepp* zufällig, durch eine Verwechslung mit Naphthalin, die antipyretische Wirksamkeit des Acetanilids. Aufgrund ihrer ausgeprägten Hämatoxizität war die Substanz jedoch nicht als Arzneimittel geeignet. Das ab 1887 verfügbare Acetanilidderivat Phenacetin zeigte bei gleicher Wirksamkeit eine deutlich bessere Verträglichkeit und wurde als Analgetikum und Antipyretikum in die Therapie eingeführt. Mit zunehmender Verwendung des Phenacetins traten gehäuft analgetikainduzierte Nephropathien („Phenacetinniere“) auf, was schließlich zu weitgehenden Einschränkungen und Verboten in der Anwendung führte [21]. Bereits 1893 entdeckte *Mering* Paracetamol als Metabolit des Phenacetins, 1899 wurde es auch als Stoffwechselprodukt des Acetanilids identifiziert, jedoch erst die Arbeiten von *Brodie und Axelrod* 1948 führten letztlich zur Verwendung des Paracetamols als Arzneimittel seit den 50er Jahren [22]. Aufgrund seiner guten Verträglichkeit ist Paracetamol (englisch: „Acetaminophen“) heute eines der populärsten, nicht-verschreibungspflichtigen Schmerz- und Fiebermittel und gilt besonders in der Pädiatrie als Standardtherapeutikum.

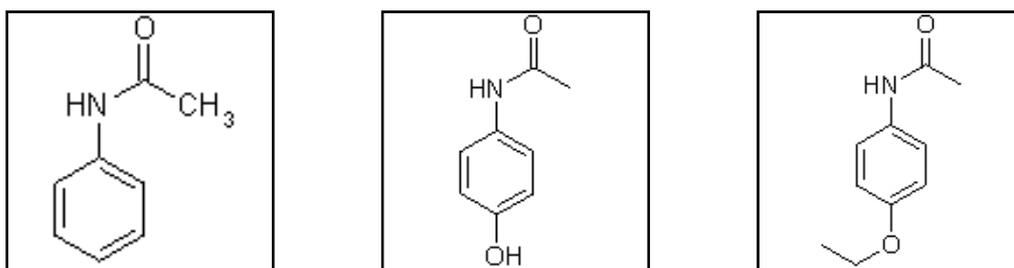


Abb.1.: Chemische Strukturen von Acetanilid, Paracetamol und Phenacetin (von links)

1.2.2 Pharmakologie

1.2.2.a Wirkungsmechanismus

In der analgetischen und antipyretischen Wirkung ist Paracetamol ähnlich der Acetylsalicylsäure, wohingegen Paracetamol in analgetischen Dosen keine antiphlogistische Wirksamkeit besitzt. Der genaue Wirkungsmechanismus der Substanz ist bis heute nicht vollständig geklärt. *Flower und Vane* erklärten 1972 die antipyretische Wirkung mit einer zentralen Hemmung der Prostaglandinsynthetase [23], die fehlende antiphlogistische Wirkung ist möglicherweise auf eine verminderte COX-Hemmung in Anwesenheit von Peroxiden in entzündetem Gewebe zurückzuführen [24]. Die klinische Bedeutung einer nachgewiesenen Hemmung der Cyclooxygenase-3 [25] ist unklar. An der analgetischen Wirksamkeit scheinen auch zentrale serotonerge Mechanismen [26] sowie möglicherweise eine indirekte Aktivierung von Cannabinoid-CB1-Rezeptoren [27] beteiligt zu sein.

1.2.2.b Kinetik

Als Analgetikum und Antipyretikum wird Paracetamol in Einzeldosen von 500-1000 mg vorwiegend oral eingenommen, die empfohlene Tagesmaximaldosis für Erwachsene beträgt 4 Gramm. Pädiatrische Dosierungen liegen bei 10-15mg/kg alle 4-6 Stunden und maximal 5 Dosen täglich. Orale Paracetamoldosen in Form von Tabletten zeigen Bioverfügbarkeiten von 60-89% [28], werden schnell resorbiert und entwickeln meist nach 45-60 Minuten die Plasmamaximalkonzentration [28]. Diese liegt bei therapeutischen Dosierungen im Bereich von 5-20 mg/L [29]. Paracetamol überquert die Blut-Hirn-Schranke sowie die Plazenta [30], ist in den meisten Körperflüssigkeiten gleichmässig mit einem Verteilungsvolumen von ungefähr 0,9 L/Kg verteilt [29]. Eine signifikante Plasmaproteinbindung ist bei therapeutischen Dosen nicht zu beobachten [29].

Paracetamol unterliegt im Organismus einer ausgiebigen Metabolisierung (s. Abb.2), lediglich ca. zwei Prozent einer verabreichten Dosis erscheinen unverändert im Urin.

Der überwiegende Teil wird nach Glucuronidierung (40-67%) und Sulfatierung (30%) in Form inaktiver und nicht toxischer Konjugate renal und biliär ausgeschieden [31]. Ein geringerer Teil (5-9%) des Paracetamols wird mikrosomal zu N-Acetyl-p-Benzochinonimin oxidiert, neben Cyp2E1 sind hieran auch andere Cytochrom-P450-abhängige mischfunktionelle Oxidasen (1A2, 2A6, 3A4) beteiligt [32]. N-Acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI) ist ein sehr reaktives Intermediat mit elektrophilen sowie oxidierenden Eigenschaften und wird schnell mit Glutathion zu 3-[Glutathion-S-yl]-Paracetamol umgesetzt, welches weiter zur entsprechenden Merkaptursäure metabolisiert und ausgeschieden wird [29].

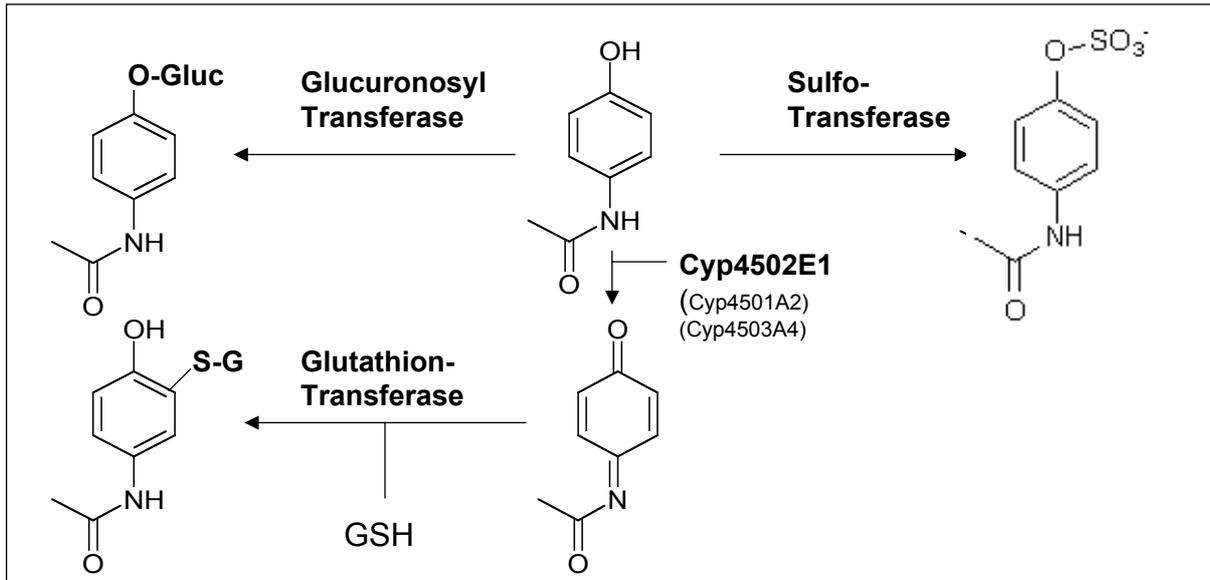


Abb.2: Metabolismus des Paracetamols

1.2.3 Paracetamolintoxikation

1.2.3.a Epidemiologie

Erstmalig wurde 1966 über das Auftreten schwerer Leberschädigungen im Zusammenhang mit Paracetamolüberdosierungen berichtet [33, 34], ab Mitte der 70er Jahre war in vielen Ländern ein epidemieartiger Anstieg an Paracetamolvergiftungen zu verzeichnen.

Waren beispielsweise in England und Wales 1977 noch 144 Todesfälle auf Paracetamol zurückzuführen, waren es 1997 bereits 500 Fälle jährlich, was zu dieser Zeit ungefähr einem Sechstel aller strassenverkehrsbedingten Todesfälle entsprach [35].

In den USA war in den Jahren 1995 bis 1999 die Paracetamolintoxikation die häufigste Intoxikation überhaupt und verursachte jährlich mehr als 26000 Klinikeinweisungen [31]. Bis heute ist Paracetamol dort auch wichtigster ätiologischer Faktor des akuten Leberversagens [36]. Annähernd zehn Prozent aller Anrufe bei den Giftinformationszentren betreffen Paracetamol-Ingestionen, auch in Deutschland. [37].

Die Mehrheit der Paracetamolvergiftungen ist durch suizidal motivierte Einnahme einer einzelnen akuten Überdosis bedingt. Akzidentelle Intoxikationen treten häufiger auch durch Kummulation bei mehrfacher Einnahme relativ hoher Einzeldosen insbesondere bei Kindern auf [38], [39]. Diese Intoxikationen zeigen gegenüber den beabsichtigten Paracetamolvergiftungen eine höhere Mortalität [38].

1.2.3.b Klinik

Das klinische Bild einer Paracetamolintoxikation, wie sie bereits ab Dosierungen von ca. 6 g bei einem Erwachsenen beobachtet wurde, zeigt einen mehrphasigen Verlauf:

In einer initialen Phase von etwa 24 Stunden entwickeln sich häufig unspezifische Symptome wie Übelkeit, Erbrechen, Schwindel und Schwäche [39]. Die folgende 24-72-stündige Latenzphase verläuft nahezu symptomfrei und täuscht über die Schwere des toxischen Geschehens hinweg, das sich auf biochemischer Ebene entwickelt. Initial zeigt sich laborchemisch ein Transaminasenanstieg, der nach ca. 3 Tagen zum Bild des akuten Leberversagens mit Bilirubinanstieg, PT-Verlängerung, Hypoglykämie, Gerinnungsstörungen, hepatischer Enzephalopathie und Ikterus fortschreitet [40].

Sehr häufig entwickelt sich zusätzlich ein Nierenversagen mit tubulären Nekrosen [41]. Prothrombinzeiten von mehr als 100 s, ausgeprägte Enzephalopathie, metabolische Azidose ($\text{pH} < 7,3$) sowie eine Paracetamol-Halbwertszeit von mehr als vier Stunden gelten als schlechte prognostische Faktoren. Hirnödem und Multiorganversagen sind die häufigsten Todesursachen [31], [42], [43].

1.2.3.c Biochemie

Die biochemischen Vorgänge, die der durch Paracetamol induzierten Hepatotoxizität zugrunde liegen, sind trotz umfangreicher Untersuchungen bis heute nicht vollständig geklärt. Erwiesen ist, dass es bei Aufnahme toxischer Dosen an Paracetamol zu einer vermehrten mikrosomalen Bildung von NAPQI in der Leber und in der Folge zu einer Abnahme des hepatischen Glutathions kommt [44]. Im Urin steigt der Anteil an Cystein sowie Mercaptursäuremetaboliten stark an [45]. Nach Erschöpfung des Glutathiongehalts erfolgt eine kovalente Bindung des NAPQI an Cysteinylreste von Proteinen der Hepatozyten in Form einer Michael-Addition [46]. Glutathionerschöpfung und kovalente Bindung gelten als kritischer Schritt in der Entstehung der Lebernekrose. Es besteht eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der kovalenten NAPQI-Bindung und der Hepatotoxizität im Tierexperiment [47], [48]. Wurde die kovalente Bindung anfänglich mit radioaktiv markiertem Paracetamol [43] sowie mit immunologischen Methoden [49], [50] nachgewiesen, gelang schließlich durch die Verwendung spezifischerer, massenspektrometrischer Methoden eine eindeutige Identifizierung von Proteinen, die durch NAPQI kovalent verändert wurden [51], [52]. Dabei konnten NAPQI auch an extrahepatischen Proteinen wie Hämoglobin [53] nachgewiesen werden. Für einige Enzyme, die durch NAPQI verändert wurden, liess sich eine Aktivitätsänderung nachweisen, deren Bedeutung aber unklar ist [54], [55].

Auch das 3'-OH-Acetanilid, ein Regioisomer des Paracetamols, zeigt eine dem Paracetamol vergleichbare kovalente Proteinbindung und führt zur Glutathionerschöpfung der Leber, entfaltet jedoch keine Hepatotoxizität [56]. Deshalb gilt die kovalente Bindung an

Leberproteine nicht als alleinige Ursache der toxischen Wirkung. Aufgrund der starken Bindung des NAPQI an mitochondriale Proteine ist jedoch eine Beteiligung an der initial auftretenden mitochondrialen Dysfunktion der Hepatocyten wahrscheinlich [57]. Eine starke Anreicherung von Glutathiondisulfiden sowie Nitrotyrosin innerhalb der Mitochondrien deutet zudem auf starke oxidative Belastung dieser Zellkompartimente hin [58], [59]. Zusammen mit einer Störung der zellulären Calciumhomöostase sowie einer Ausschüttung proapoptotischer BCL2-Proteine [57] kommt es zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, einer Unterbrechung der ATP-Synthese sowie einer Freisetzung Apoptose induzierender Faktoren (AIF, Endonuclease G, Cytochrom C, sMAC) aus den Mitochondrien. Dabei ist im Zellkern ein Abbau von DNA zu beobachten [60]. Zudem bewirkt die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration eine Aktivierung von Calpain-Proteasen, und damit eine Proteolyse von Strukturproteinen [57].

Morphologische Studien zeigten, dass die geschädigten, zentrilobular gelegenen Hepatozyten an einer (onkotischen) Nekrose zugrundegehen [61].

1.2.3.d Diagnostik

Die Erkennung einer Paracetamolvergiftung ist in der Klinik anfangs erschwert durch das Fehlen einer initialen, richtungsweisenden Symptomatik und die erst spät einsetzenden Zeichen einer schweren Leberschädigung.

Sowohl bei absichtlichen als auch akzidentellen Überdosierungen werden häufig falsche Angaben gemacht. Vielfach bestehen zudem wegen des initialen Erbrechens nach höheren Dosierungen Unsicherheiten hinsichtlich der tatsächlich aufgenommenen Menge [62].

Eine Ermittlung der Paracetamolkonzentration im Blut gilt heute diagnostisch als Mittel der Wahl, es stehen colorimetrische [63], immunologische [64] und chromatographische [65] Analysenverfahren zur Verfügung. Es besteht eine Korrelation zwischen dem zeitlichen Verlauf der Paracetamolserumkonzentration und dem Risiko einer Leberschädigung. Das von *Rumack und Matthew* [66] erstellte semilogarithmische Nomogramm erlaubt, ausgehend von einer einzelnen Konzentrationsbestimmung im Blut, eine Aussage hinsichtlich einer zu erwartenden Hepatotoxizität sowie einer möglichen Therapieindikation. Voraussetzung ist ein hinreichend genau bekannter Einnahmezeitpunkt, zudem gilt die Beziehung nur bei Aufnahme einer einzelnen, nicht-retardierten Paracetamoldosis [31], [66]. Aufgrund der äußerst raschen Abnahme der Paracetamolserumkonzentration (Halbwertszeit 2 bis maximal 4 Stunden) ist eine zeitnahe Bestimmung wichtig. Zum Zeitpunkt der Manifestation der Leberschädigung sind, aufgrund der ausgeprägten Latenz der Vergiftung, Serumkonzentrationen häufig nicht mehr zu detektieren und problematisch zu interpretieren [67].

Handelt es sich bei leicht erhöhten „Leberwerten“ (Transaminasen, Bilirubin, Gerinnungszeit) des klinisch-chemischen Labors nur um Zeichen eines schon länger bestehenden, unspezifischen Leberschadens oder um den Beginn eines fulminanten Leberversagens

durch eine Überdosis Paracetamol, das eine lebensrettende Lebertransplantation erforderlich macht? In dieser Situation wäre es hilfreich, einen besser geeigneten Parameter einer Intoxikation bestimmen zu können, wobei langlebigen Metaboliten oder Addukten des toxischen NAPQI eine besondere Rolle zukommen könnte.

Der bei einer Vergiftung verstärkt gebildete reaktive Paracetamolmetabolit NAPQI (vgl. 1.2.3.c) zeigt eine kovalente Bindung auch an Proteine ausserhalb der Leber, was immunologisch (jedoch lediglich bei einem einzigen Patienten mit schwerer PCM-induzierter Leberschädigung ($AST > 6000 \text{ IU/L}$)) nachgewiesen wurde [68]. Unspezifisch makromolekular gebundenes Cysteinyl-PCM konnte auch bei Patienten mit geringer ausgeprägten Leberschädigungen detektiert werden [67],[69] und zeigte eine Korrelation mit dem Ausmaß des Leberschadens [70]. Tierexperimentell wurde eine Bindung von NAPQI am Hämoglobin beobachtet [53].

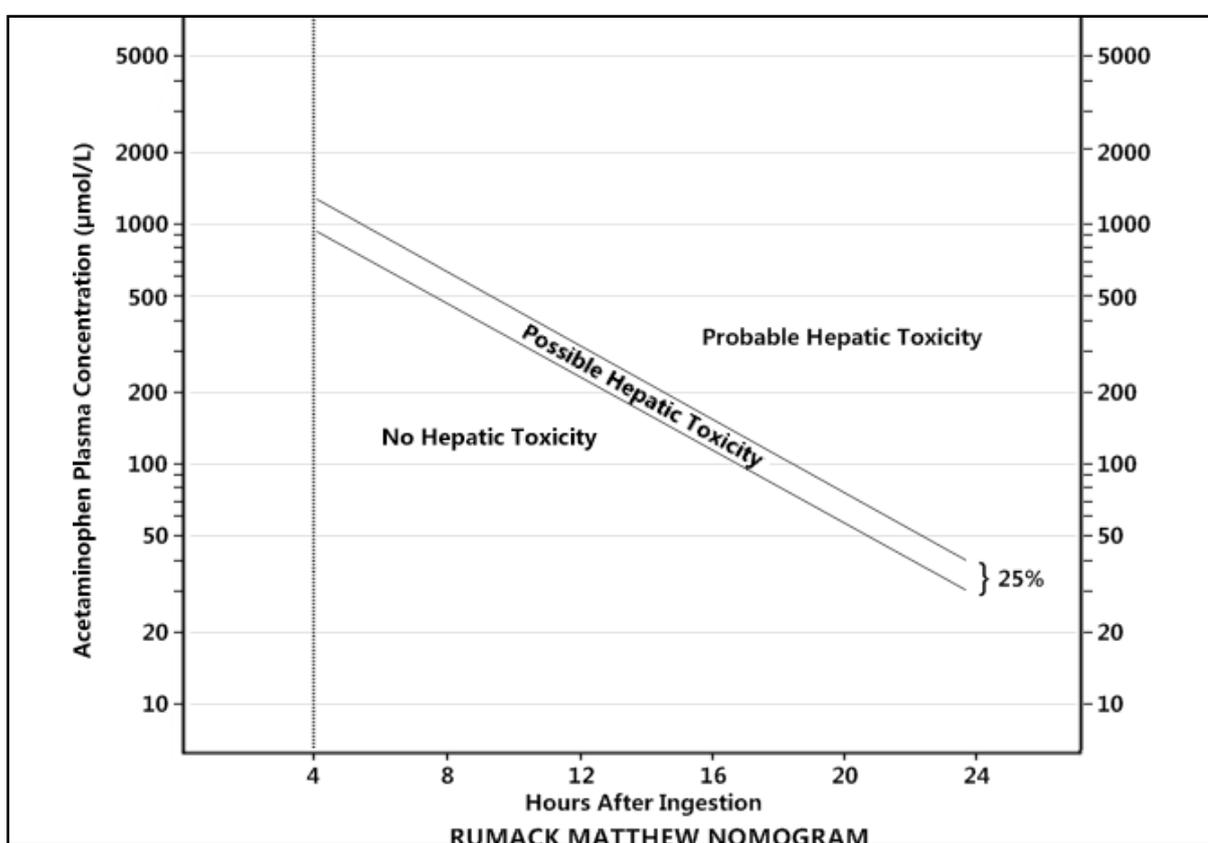


Abb.3: Rumack-Matthew Nomogramm

1.2.3.e Behandlung

Unspezifische Giftelimination:

Bei Paracetamoldosen von mehr als 100 mg/kg und einer nicht länger als 4 Stunden zurückliegenden Aufnahme ist eine Magenspülung angezeigt [71], [72]. Zur Effektivität des induzierten Erbrechens als primäre Giftelimination existieren unterschiedliche Meinungen [71], [73]. Aktivkohle verringert signifikant die Resorption von Paracetamol, jedoch nur, wenn

eine äußerst frühzeitige Applikation erfolgt. Bei einer sofortigen Kohlegabe nach Paracetamolingerestion konnte eine Abnahme der resorbierten Paracetamolmenge um mehr als 60% nachgewiesen werden, bei Applikation nach einer Stunde ungefähr noch eine Reduktion von 20%. Aktivkohle muss in grossem Überschuss vorhanden sein [74].

Spezifische Antidottherapie:

Nachdem bereits früh eine Abhängigkeit der Lebertoxizität vom hepatischen Glutathionangebot nachgewiesen und dessen protektive Bedeutung auf biochemischer Ebene bekannt war [44], ergaben sich hieraus Ansätze für eine wirkungsvolle Therapie. Eine Gabe von Glutathion selbst erwies sich als ineffektiv, da dieses schlecht zellgängig ist. So konnte nur mit unrealistisch hohen Dosen im Tierexperiment eine Verminderung der Toxizität beobachtet werden [72], [75], [76]. Dafür zeigten Cystein, Cysteamin, Methionin, N-Acetylcystein sowie Dimercaprol und Penicillamin experimentell eine gute Wirksamkeit und wurden klinisch untersucht. 1973 wurden erstmals Patienten nach Paracetamolvergiftung erfolgreich mit Cysteamin, das 4-10h nach Ingestion intravenös verabreicht wurde, behandelt [77]. Oral verabreichtes Methionin erwies sich bei früher Applikation als etwas weniger effektiv und konnte zudem durch eine zu späte Verabreichung oder verzögerte Resorption zu Komplikationen führen [72]. Behandlungen mit Dimercaprol [78] und Penicillamin [79] waren nicht erfolgreich, während sich bald N-Acetylcystein zum Mittel der Wahl entwickelte, da es sich durch die beste Wirksamkeit bei einem Minimum an unerwünschten Effekten auszeichnete [80]. Die Therapie mit N-Acetylcystein ist intensiv klinisch untersucht worden [81]. Dabei zeigte sich, dass der Zeitpunkt der Antidotgabe der entscheidende Faktor für einen Therapieerfolg ist. Eine Lebertoxizität wurde bei Patienten, die eine Behandlung zwischen 10 und 24 Stunden nach Paracetamolingerestion erhielten, etwa viermal häufiger beobachtet als bei Patienten die innerhalb von 10 Stunden behandelt wurden [82]. Bei zunehmendem Zeitabstand profitierten immer weniger Patienten, eine Indikation zur N-Acetylcysteintherapie besteht nach Studienlage bis mindestens 24 h [82]. N-Acetylcystein kann oral oder intravenös verabreicht werden. Bei der oralen Applikation werden 1330 mg/kg N-Acetylcystein über einen Zeitraum von 72 Stunden verabreicht, auf eine Initialdosis von 140 mg/kg folgen 17 Erhaltungsdosen von je 70 mg/kg im Abstand von 4 Stunden. Zur intravenösen Therapie werden insgesamt 300 mg/kg N-Acetylcystein in 20h verwendet, nach einer Initialdosis von 150mg/kg über 15 Minuten folgen 50mg/kg innerhalb von vier und 100mg/kg in den anschliessenden 16 Stunden als Erhaltungsdosen [31]. Orale und intravenöse Therapie gelten bei einer Behandlung bis 10 Stunden nach Ingestion als gleich effektiv [83].

Als unerwünschte Nebenwirkungen können anaphylaktische Reaktionen wie Hautausschläge, Angioödeme, Hypotension und Bronchospasmen auftreten [84], diese sind jedoch insgesamt selten und überwiegend bei intravenöser Therapie häufiger zu beobachten. Aufgrund seines schlechten Geschmacks ruft oral verabreichtes N-Acetylcystein häufig Übelkeit und Erbrechen hervor.

1.3 Fragestellung

1.3.1 Ziel der Arbeit

In der Situation, dass bei unklarem Einnahmezeitpunkt und Dosis die PCM-Konzentration im Serum niedrig ist, aber Anzeichen für eine Leberschädigung vorliegen, wäre es hilfreich, einen Parameter zu finden, der eine PCM-induzierte, fortschreitende Leberschädigung beweisen könnte. Ein solcher Parameter könnte ein langlebiger Metabolit oder ein spezifisches Addukt des lebertoxischen Metaboliten NAPQI sein. Aus tierexperimentellen Untersuchungen ist zu folgern, dass bei PCM-Vergiftungen NAPQI-Addukte am Hämoglobin entstehen: *Axworthy et al* applizierten 1984 Mäusen hepatotoxische Dosen an ¹⁴C-markiertem Paracetamol [53]. Die Radioaktivität wurde hauptsächlich in der Leber, zu einem geringeren Teil (ca. 8%) jedoch auch im Hämoglobin der Mäuse zurückgehalten. Bei einer Vorbehandlung der Versuchstiere mit Cyp450-Induktoren zeigte sich im Experiment ein proportionaler Anstieg der ¹⁴C-Bindung sowohl in der Leber als auch im Hämoglobin, woraus geschlossen werden konnte, dass das in den Erythrocyten gebundene NAPQI hepatischen Ursprungs war.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob sich auch beim Menschen NAPQI-Addukte des Hämoglobins auffinden und als (Früh-) Zeichen einer PCM-Intoxikation auswerten lassen. Dabei wären Hämoglobinaddukte insbesondere auch wegen der einfachen Isolierung und der zu erwartenden langen Halbwertszeit ein günstiger Parameter.

1.3.3 Vorgehensweise

Nach Gewinnung und Charakterisierung der Edukte NAPQI und Hämoglobin sollte zunächst die Adduktbildung *in vitro* durchgeführt werden. Mit Hilfe chromatographischer und massenspektrometrischer Analyseverfahren sollte dann das Reaktionsprodukt auf Globinebene untersucht werden.

Um Bindungsorte und NAPQI-Modifikationen im Globin zu lokalisieren, sollte das Globin schließlich mit geeigneten Verfahren in kleinere Peptide gespalten werden („Peptide Mapping“) und die durch NAPQI modifizierten Peptide identifiziert werden.

Daraus war eine spezifische und sensitive Methode zum qualitativen und quantitativen Nachweis dieser modifizierten Peptide, basierend auf „Peptide-Mapping“, zu entwickeln. Mit dieser sollten schließlich Blutproben von Patienten nach Paracetamolvergiftung auf spezifische, durch NAPQI kovalent modifizierte Peptide, untersucht werden und hierüber das im Hämoglobin kovalent gebundene NAPQI bestimmt werden. Abb.4 zeigt in Form eines Fließschemas den Arbeitsablauf. Dieses wird als „Wegweiser“ im Ergebnisteil vor den entsprechenden Kapiteln wieder aufgegriffen.

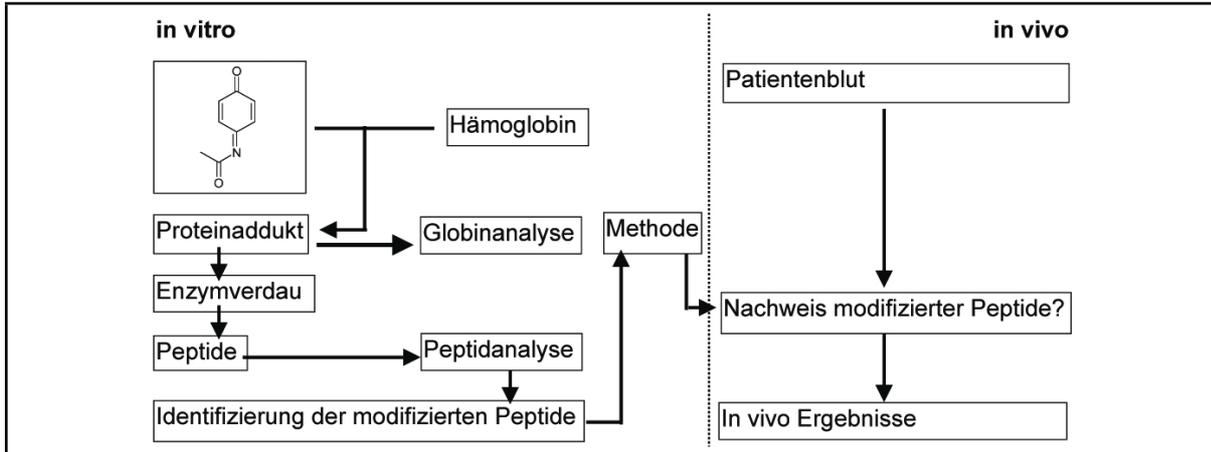


Abb.4: Fließschema des experimentellen Vorgehens

2 Materialien und Geräte

2.1 Chemikalien

Lösungsmittel

Acetonitril Ultra HPLC Grade, Mallinckrodt Baker, Deventer (NL)
Aceton Baker Analyzed, Mallinckrodt Baker, Deventer (NL)
Diethylether p.A., Merck, Darmstadt
Methanol Chromasolv, Riedel-de Haen, (CH)
Toluol p.A., Merck, Darmstadt
Tert-Butylmethylether p.A., Merck, Darmstadt
Wasser Lichrosolv, Merck, Darmstadt

Additive

Trifluoressigsäure UVAsol, Merck, Darmstadt
Ameisensäure puriss.p.A., Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumacetat p.A., Merck, Darmstadt

Sonstige

Salzsäure 1mol/L, p.A. Merck, Darmstadt
Ammoniumcarbonat p.A. Merck, Darmstadt
Silbernitrat p.A. Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid p.A., Merck, Darmstadt
Paracetamol minimum 99% Sigma-Aldrich, Steinheim
Ultramark 1621, Alfa Aesar, Heyston (GB)
MRFA (Met-Arg-Phe-Ala) Research Plus Inc, Marasquan, N.J. (USA)
Coffein, Sigma-Aldrich, Steinheim
Endoproteinase GluC Staph. aureus, Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin TPCK-behandelt, Merck, Darmstadt
Citronensäure-Monohydrat p.A., Merck, Darmstadt
Ascorbinsäure p.A., Sigma-Aldrich, Steinheim
Hämoglobin, deoxygeniert, lyophilisiert, Sigma-Aldrich, Steinheim
Glutathion, min. 99%, Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, p.A., Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid 1mol/L, p.A. Merck, Darmstadt
Butylhydroxytoluol p.A., Sigma-Aldrich, Steinheim
Helium 5.0, TMG, Krefeld
Stickstoff 5.0 TMG, Krefeld

2.2 Geräte

Zentrifugen

Omnifuge 2.0 RS, Heraeus Kendro, Langenselbold
Centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg
Speedvac RVC 2-18, Christ, Osterode

Waagen

R160 P, Sartorius Ag, Göttingen
PL200, Mettler-Toledo GmbH, Giessen

UV-Detektoren

Cary 50 Bio UV-Visible Spectrophotometer, Varian, Darmstadt
UV6000 LP, Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Spectro Monitor D, Variable Wavelength Detector, Milton Roy, Pont
Saint Pierre (F)

HPLC-Pumpen

Finnigan Surveyor LC Pump, Thermo Fisher Scientific, Dreieich
ConstaMetric 3200 MS, Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Spectra System P4000, Thermo Fisher Scientific, Dreieich
600E, Waters, Milford, MA (USA)

Massenspektrometer

Finnigan LCQ duo, Thermo Fisher Scientific, Dreieich
5974 Mass Selective Detector, Agilent Technologies, Waldbronn
5970 Mass Selective Detector, Agilent Technologies, Waldbronn
5972 Mass Selective Detector, Agilent Technologies, Waldbronn

Gaschromatographen

6890 N Network GC System, Agilent Technologies, Waldbronn
5890 Series II Gas Chromatograph, Agilent Technologies, Waldbronn

Trennsäulen

Factor Four Capillary Column, VF-5MS 30mx0,25mm ID,
Varian, Darmstadt
Lichrospher 125-4 RP18 (5µm), Merck, Darmstadt
Lichrospher 250-4 RP18 (5µm), Merck, Darmstadt
Polaris, 250x4 mm (5µm), Varian, Darmstadt
Symmetry C4 300 250-4 (5µm), Waters, Milford, MA (USA)
Symmetry RP18, 125-2 (5µm), Waters, Milford, MA (USA)

Inkubator

Kendro B 6060, Kendro, Langenselbold

pH-Meter

pH-Meter 765 Calimatic, Knick GmbH Co KG, Berlin
GAT Ionode IJ/44 DIN, Gamma Analystechnik GmbH, Bremerhaven

Mixer

Vortex Genie 2, Scientific Industries, New York (USA)
Eppendorf Mixer 5432, Eppendorf, Hamburg

SPE

Baker SPE 12G 7018-94, Mallinckrodt Baker, Deventer (NL)

2.3 VerbrauchsmaterialienUltrafiltration

Microcon Ultracel YM3, 3000 MWCO, Millipore, Bedford, MA (USA)
Centrisart I, cut-off 10000, Sartorius Ag, Göttingen

SPE

Bond Elut C18, 100mg 1ml, Varian, Darmstadt

Immunanalytik

Acetaminophen Assay, Abbott, Wiesbaden

Sonstige

DC-Alufolien 20x20 cm Kieselgel 60 F 254, Merck, Darmstadt
Kieselgel 60 zur Flash-Chromatographie, Merck, Darmstadt
Merckoquant, kolometrischer Peroxidtest, Merck, Darmstadt

2.4 Software

Mag Tran 1.02 : A universal Algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ration spectra.

Molecular Weight Calculator 6.40, Matthew Monroe

FindPept, Swiss Institute of Bioinformatics

PeptideMass, Swiss Institute of Bioinformatics

PeptideCutter, Swiss Institute of Bioinformatics

3 Methoden

3.1 Flüssigkeitschromatographie/ Massenspektrometrie

Die wichtigsten Aspekte der Untersuchungstechnik, insbesondere des hierbei eingesetzten Analysengerätes (Finnigan LCQ duo), sollen im Folgenden kurz beschrieben werden:

3.1.1 RP-HPLC der Proteine und Peptide

Die Trennung niedermolekularer organische Verbindungen in RP-HPLC-Systemen beruht im wesentlichen auf unterschiedlichen Verteilungsvorgängen dieser Substanzen zwischen den beiden Phasen des Systems. Polypeptide und Proteine hingegen zeigen auf RP-Trennsäulen Wechselwirkungen in Form eines Adsorptions/Desorptions-Mechanismus.

Sie adsorbieren nach Eintritt in die Trennsäule an die hydrophobe Phase, bleiben dort gebunden, bis der Anteil des organischen Eluenten einen kritischen Wert übersteigt und eluieren dann schlagartig von der Säule. Deshalb ist zur Trennung von Polypeptiden und Proteinen an RP-Phasen ein Fließmittelgradient erforderlich, bei dem während der Analyse kontinuierlich die Polarität des Eluenten verringert wird. Abb.5 zeigt das unterschiedliche Verhalten eines kleinen organischen Moleküls (Biphenyl) sowie eines Proteins (Lysozym) an einer Umkehrphase. Bei Erhöhung des organischen Eluenten sinkt die Retention des Biphenyls langsam, die des Lysozyms fällt nach Überschreiten einer kritischen Konzentration des Acetonitrils innerhalb eines geringen Konzentrationsbereiches sehr rasch ab.

Bei der Trennung eines Gemisches an Polypeptiden bzw. Proteinen besitzt deshalb die Steigung des Gradienten eine wesentlich grössere Bedeutung als bei der Trennung niedermolekularer organischer Verbindungen. Die höchsten chromatographischen Auflösungen werden mit extrem flachen Gradienten erzielt.

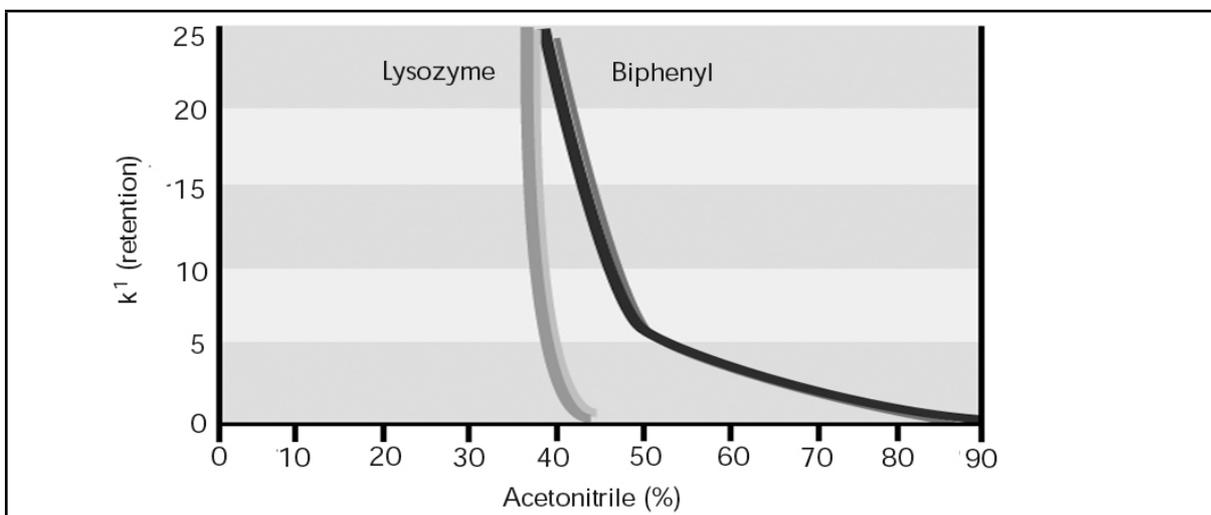


Abb.5: Retentionsverhalten von Biphenyl und Lysozym in der RP-HPLC [85]

3.1.2 Electrospray-Interface

Das Electrospray-Interface bildet die Schnittstelle zwischen dem flüssigkeitschromatographischen und dem massenspektrometrischen System. Es transferiert Ionen aus der flüssigen Phase in die Gasphase, entfernt dabei die mobile Phase. Hierzu wird der Eluent mit Hilfe eines Gasstroms an einer Kapillare, an die eine hohe Spannung (2-6 kV) angelegt wird, zerstäubt. Die bei Atmosphärendruck gebildeten und durch die Spannung geladenen Flüssigkeitströpfchen werden durch eine beheizte Kapillare („Heated Capillary“) in das Massenspektrometer geführt, wo durch differentielles Abpumpen ein Vakuumgradient erzeugt wird. Bedingt durch das Vakuum sowie Wärme kommt es zu einer fortschreitenden Verkleinerung der geladenen Flüssigkeitströpfchen und schliesslich zur Desorption geladener Moleküle.

Die Effizienz dieses Prozesses hängt dabei maßgeblich von der Tröpfchengröße, der Oberflächenladung und Oberflächenspannung sowie der Flüchtigkeit des verwendeten Eluenten ab.

Da die Ionen, die aus den geladenen Tröpfchen desorbieren, bereits in der flüssigen Phase gebildet werden müssen, eignet sich die Electrospray-Ionisierung zur Ionisation polarer Analyte, die kleine Ionen (z.B. H^+/Na^+) anlagern oder abspalten können. Proteine und Peptide können aufgrund der vorhandenen Aminogruppen in Lösung leicht protonierte Molekülonen bilden und sind somit bei ausreichend niedrigem pH-Wert des Eluenten mittels positivem Electrospray ionisierbar. Bei Vorliegen mehrerer Aminosäurereste ist durch die Aufnahme mehrerer Protonen die Bildung höher geladener Ionen möglich.

Electrospray-Interfaces arbeiten bei Flussraten von wenigen Nanolitern bis einem Milliliter Eluentenfluss pro Minute und sind somit geeignet zur Kopplung eines Massenspektrometers an unterschiedlichste Flüssigkeitschromatographie- und Electrophoresesysteme.

3.1.3 Ionentransfer

Im Electrospray gebildete Ionen werden durch die beheizte Kapillare mit Hilfe eines Potential- und Druckgefälles bewegt. Abb.7 zeigt typische Potential- und Druckverhältnisse des verwendeten Massenspektrometers (Finnigan LCQ).

Mit Hilfe einer Linse („Tube-lens“) werden die Ionen nach Austritt aus der beheizten Kapillare zum Skimmer beschleunigt. Durch Anlegen einer hohen Spannung in diesem Bereich können Ionen durch Kollision mit ihrer Umgebung fragmentiert werden („in-source-CID“). Der Skimmer, eine um wenige Millimeter zur Austrittsöffnung der beheizten Kapillare angebrachte, kleine und scharf begrenzte Öffnung, verhindert den Eintritt ungeladener und größerer Partikel in den Analysator. Durch ein Linsensystem zweier Transmissions-Multipole („Rf-only-Octapole“) wird der Ionenstrahl fokussiert und zum Analysator geleitet.

3.1.4 Massenanalysator (Ionenfalle)

Das Prinzip des Ionenfallen- Massenanalysators beruht auf der unterschiedlichen, vom Masse/Ladungs-Verhältnis abhängigen Beweglichkeit von Ionen in oszillierenden elektrischen Feldern. Die Ionenfalle besteht aus einer zur Mitte hin verjüngten Ringelektrode sowie zwei hyperbolen Endkappen mit jeweils einer Öffnung. Eintretende Ionen werden durch einen geringen Druck (1 mTorr) an Heliumgas zwischen den Elektroden verlangsamt. Durch überlagerndes Anlegen hochfrequenter Wechselspannung (Rf-Voltage) sowie Gleichspannung (DC-Voltage) zwischen Endkappen und Ringelektrode können Ionen auf stabilen Bewegungsbahnen in der Ionenfalle gehalten werden. Abb.6 zeigt ein für Ionenfallen typisches Stabilitätsdiagramm. Durch kontinuierliche Erhöhung der an der Ringelektrode anliegenden Wechselspannung werden die Bewegungsbahnen der akkumulierten Ionen destabilisiert, was den Austritt derselben in Reihenfolge aufsteigender m/z -Werte aus der Falle bewirkt („Scan“).

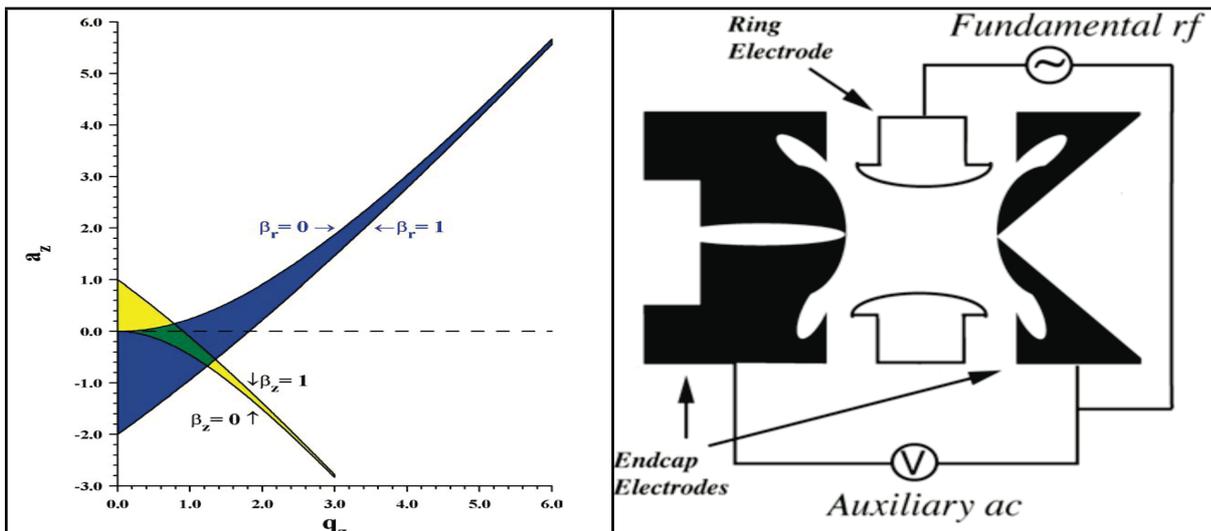


Abb.6: Ionen-Stabilitätsdiagramm (links) sowie Aufbau (rechts) des Ionenfallenanalysators [86]

Alternativ können auch Ionen bestimmter m/z -Werte durch Resonanzfrequenzen angeregt werden. Dabei wird an die Endkappen ein zweites Wechselfeld angelegt und dessen Frequenz so lange erhöht, bis das gewünschte Ion in Resonanz tritt und aus der Falle befördert wird. Isolation von Ionen eines definierten m/z -Wertes („Parent Ions“) und Energiezufuhr in Form einer Potentialerhöhung führt zur Kollision der isolierten Ionen mit Heliumatomen, wodurch es zu Fragmentierungen kommen kann. Nach Akkumulation der entstandenen Fragmente kann ein Scan dieser Fragmente, die aus einem definierten „Parent-Ion“ entstanden sind, durchgeführt werden („Produkt-Ionen“- oder „Tochter-Ionen“-Scan). Da Ionenfallen räumlich begrenzt sind, können bei gleichzeitiger Anwesenheit einer zu grossen Zahl an Ionen diese miteinander interagieren, was zu einem Verlust der Auflösung sowie fehlerhaften Massenspektren führt. Deshalb ist es nötig, die Ionen-

population innerhalb der Falle zu kontrollieren („Automatic Gain Control“). Hierzu wird ein kurzer „Prescan“ vor dem eigentlichen analytischen Scan ausgeführt, der die Zahl der anwesenden Ionen feststellt und daraus die optimale Füllzeit („Injection Time“) der Ionenfalle für den analytischen Scan ermittelt.

Die Steuerung des Massenanalysators erfolgt unter Verwendung von Computerprogrammen, so dass mehrere unterschiedliche Scanmodi („Scan-Events“) bei einer Analyse kombiniert werden können. Folgende Scan-Modi konnten hierzu verwendet werden:

-„Fullscan-MS“: Aufnahme von kontinuierlichen Massenspektren eines auswählbaren Massenbereichs innerhalb der Messgrenzen (m/z 50-2000).

-„Fullscan-MS/MS“: Aufnahme von Tochterionenspektren nach Isolation eines Precursorions. Dabei kann durch Vergrößerung des Resonanzwechselfeldes der Anregungsbereich des Precursorions erweitert werden, so dass Fragmentationen, die durch einfache Abspaltung von Wasser oder Ammoniak entstehen, weiter fragmentieren („Wide Band Activation“).

-„Zoom-Scan-MS“: Da die Auflösung der Ionenfalle abhängig ist von der Zeit, wie lange sich die Ionen auf stabilen Bewegungsbahnen befinden, kann durch eine Verlangsamung der Scangeschwindigkeit das spektrale Trennvermögen des Analysators verbessert werden.

-„Data Dependent Scan“: Aus einem initialen „Fullscan-MS“ abgeleiteten kontinuierlichen Massenspektrum wird automatisch als darauffolgendes Scanevent ein „Fullscan-MS/MS“ (oder ein „Zoom-Scan-MS“) eines Ions durchgeführt, wenn dieses im Spektrum einen vorgegebenen Schwellenwert überschreitet. Damit ist es möglich, innerhalb einer Analyse von einer Vielzahl an Precursorionen Tochterionenspektren zu gewinnen. Durch eine Refraktärzeit des Analysators für bereits untersuchte Precursorionen wird eine mehrfache Aufnahme verhindert.

3.1.5 Ionendetektor

Nach Austritt der Ionen aus dem Massenanalysator werden diese zu einer Konversionsdynode mit +/- 15 kV beschleunigt. Beim Aufprall der Ionen auf diese Dynode entstehen durch Kollision Sekundärteilchen, welche Elektronen, Kationen, Anionen und auch Neutralteilchen sein können. Im Positivmodus werden positiv geladene Ionen zur -15 kV-Dynode beschleunigt, herausgeschlagene negativ geladene Sekundärteilchen werden durch die hyperbole Form der Dynode fokussiert und zum Elektronenmultiplier hin beschleunigt. Dort führt der Aufprall der Sekundärteilchen zur Freisetzung von Elektronen, welche durch ein positives Potentialgefälle innerhalb des trichterförmigen Multipliers beschleunigt werden.

Die Elektronen erzeugen ihrerseits Kollisionen am Multiplier und damit eine kaskadenartigen Freisetzung von Sekundärelektronen, aus der ein messbarer, der Teilchenzahl proportionaler, elektrischer Strom entsteht.

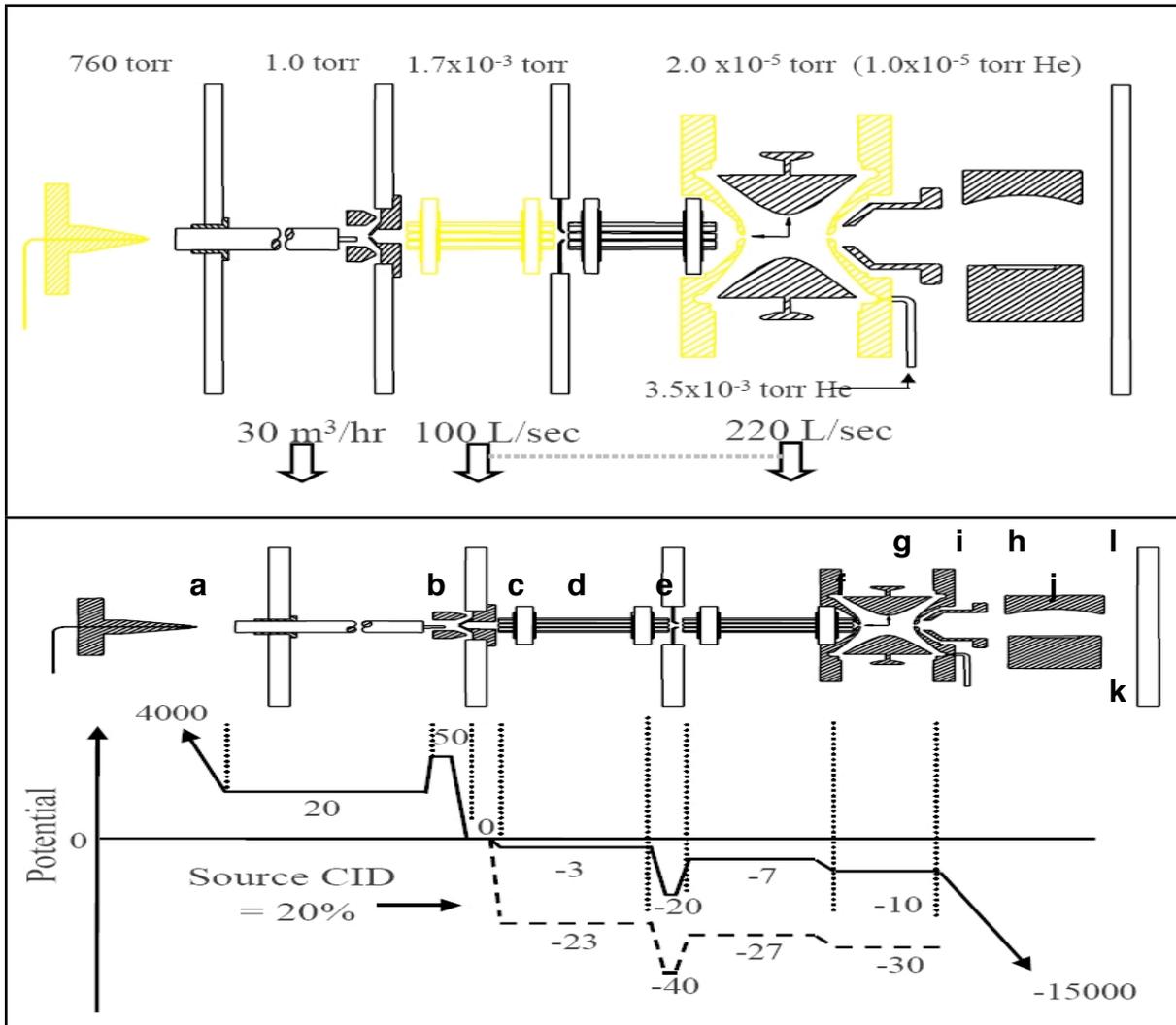


Abb.7: Schematische Darstellung der Vakuum- und Potentialverhältnisse im verwendeten Massenspektrometer (Finnigan LCQ). a= Electrospray-Needle, b=beheizte Kapillare, c=Tube lens, d=Skimmer, e, f=Oktapole, g, h,=Endkappenelektroden, i= Ringelektrode, j=Ausgangslinse, k=Konversionsdynode, l=Elektronenmultiplier [87]

3.1.6 Auflösung und Genauigkeit

Der Ionenfallenmassenanalysator erreicht im „Fullscan“-Modus ($5500 \text{ amu}/\text{sec}$) $\text{FWHM}=0,5$, womit die Signalbreite eines m/z -Signals auf halber Höhe beschrieben ist. Hieraus ergibt sich eine „Unit-Resolution“ über den Bereich $m/z=50-2000$, das heißt jeder messbare nominale m/z -Wert kann von $m/z \pm 1$ unterschieden werden. Für einfach geladene Ionen ist somit eine Auflösung des Isotopenprofils möglich, nicht jedoch bei mehrfach geladenen Ionen. Eine Erhöhung der Auflösung kann beim „Zoom-Scan“ ($280 \text{ amu}/\text{sec}$, $\text{FWHM}=0,15$) erreicht werden (s.o.), wodurch eine Auflösung der Isotopenpeaks von bis zu vierfach geladenen

Ionen möglich ist. Die Massengenauigkeit beträgt im Scan-Modus $\pm 0,05$ m/z und im „Zoom-Scan“-Modus $\pm 0,02$ m/z.

3.1.7 Proteinmassenspektrometrie

Bei der massenspektrometrischen Analyse niedermolekularer Substanzen, wie beispielsweise der GC/MS-Analytik im toxikologischen Labor, wird üblicherweise mit den nominellen Atommassen und damit mit ganzzahligen m/z-Werten gearbeitet. Bei der Analyse grosser Moleküle wie Polypeptide oder Proteine ist dies nicht möglich, da der durch Rundung der Atommassen entstehende Fehler sehr stark kumuliert. Deshalb muß die natürliche Isotopenverteilung der Elemente bei der Analyse berücksichtigt werden. Es ergeben sich, abhängig vom Molekulargewicht, größere Abweichungen zwischen der exakten und relativen Masse eines Moleküls, bei Proteinen üblicherweise etwa 0,06%. Abb.8 zeigt die theoretischen Signalmuster des Molekülpeaks eines Nonapeptids (HLKTEAEMK), eines kleineren Proteins (Insulin) sowie eines grossen Proteins (BSA). Daraus ist ersichtlich, dass zur Bestimmung der exakten Masse grosser Proteine eine sehr hohe Auflösung (BSA= $R > 60000$) zur Darstellung der Isotopenverteilung nötig ist. Gleichzeitig ist die korrekte Identifizierung des ersten Isotopensignals im Spektrum, welches sehr klein sein kann, erforderlich. Die Bestimmung der relativen Molekülmasse hingegen kann durch Ermittlung des Zentroids aus der Gesamtheit der Isotopensignale erfolgen und ist deshalb auch mit Massenspektrometern niedrigerer Auflösung möglich. Ionenfallenmassen-analysatoren besitzen einen begrenzten m/z-Messbereich (hier: m/z=50-2000). Die Bestimmung von Proteinen mit Molekülmassen grösser 2000 Da wird dadurch ermöglicht, dass im Electrospray durch Aufnahme mehrerer Protonen mehrfach geladene ($z > 1$) Ionen entstehen, deren m/z-Werte wiederum im Messbereich liegen. So zeigt ein Protein üblicherweise ein Muster an m/z-Signalen unterschiedlichen Ladungszustandes, aus denen durch Dekonvolution ein Molekülpeak abgeleitet werden kann.

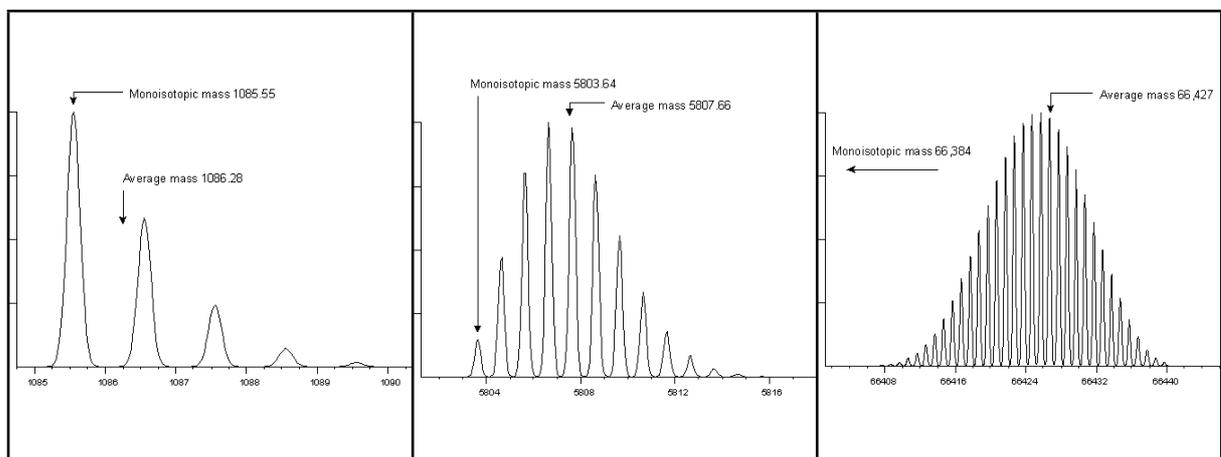


Abb.8: Isotopenmuster der Molekülionensignale von HLKTEAEMK (links), Insulin (Mitte) sowie bovinem Serumalbumin (rechts)

3.1.8 Tandemmassenspektrometrie von Peptiden

Bei der Fragmentierung von isolierten Precursorionen innerhalb einer Ionenfalle ist die zur kollisionsaktivierten Dissoziation bereitgestellte Energie gering (<30 eV). Daher kommt es bei der Fragmentierung von Peptiden zu einer bevorzugten Fragmentierung von Amidbindungen [88]. Da Peptide aus einer begrenzten Zahl an wiederholenden Struktureinheiten, den Aminosäuren bestehen, zeigen ihre Fragmentionenmassenspektren Ionenserien, deren Massendifferenzen („Residue-Massen“, Tab.4) auf die Aminosäuresequenz des Peptides schliessen lassen. Da Fragmentierungen sowohl in N-terminaler als auch in C-terminaler Richtung möglich sind, entstehen eine Vielzahl unterschiedlicher Fragmentionen. Zur einheitlichen Benennung wird heute die Nomenklatur nach *Roepstorff und Fohlmann* [89] verwendet. Diese geht von einem Bruch der Peptidbindungen aus. Die Fragmentionen, die den C-Terminus enthalten, werden als x,y,z-Ionen und Fragmentionen, die den N-Terminus enthalten als a,b,c-Ionen bezeichnet. Tiefgestellte Ziffern geben die Nummer der Aminosäure bezüglich des jeweiligen Terminus an. Mehrfach geladene Fragmentionen werden mit einer hochgestellten Ladungszahl gekennzeichnet (Abb.9). Die Niedrigenergie-Stoßaktivierung liefert für einfach, doppelt und auch dreifach geladene Peptide bis zu einem Molekulgewicht von 3000 Da fragmentreiche und interpretierbare Tochterionenspektren. Bei größeren (>3000 Da) oder stärker geladenen Precursorionen ist eine Bestimmung der Sequenz durch Tochterionenspektroskopie hingegen häufig nicht möglich. Dies liegt daran, dass nicht genügend Energie zur Fragmentierung bereitgestellt werden kann, oder weil geladene Aminosäurereste in der Mitte des Peptids nur zu einigen wenigen, bevorzugten Fragmentierungen führen [90].

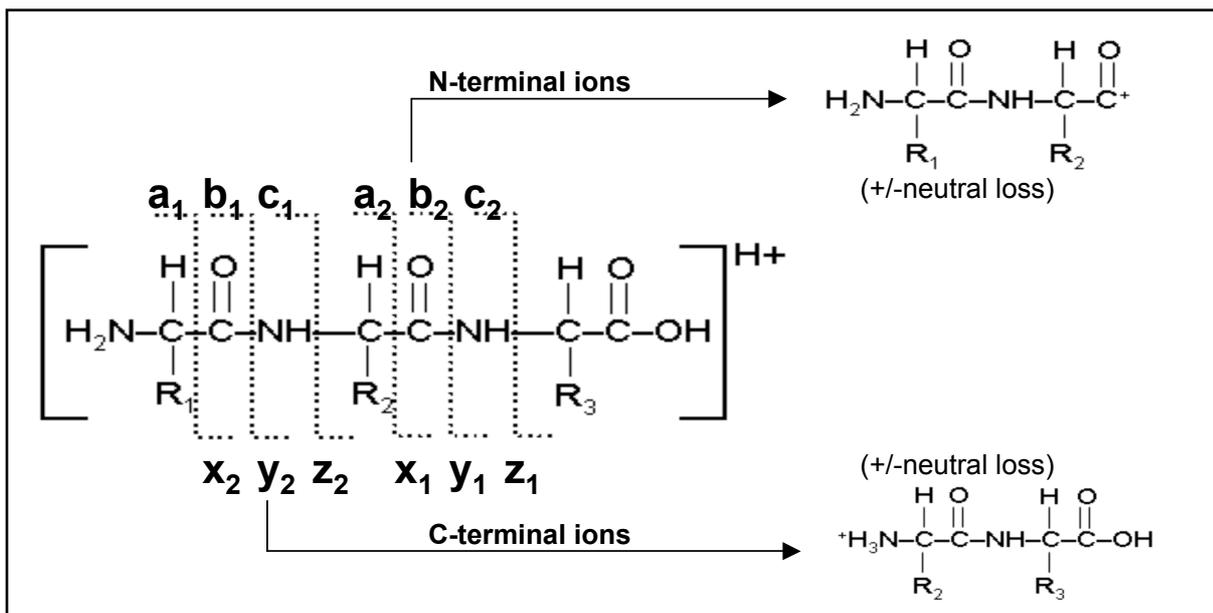


Abb 9: Entstehung und Benennung von Fragmentionen durch kollisionsinduzierte Dissoziation von Peptidbindungen

Tab.4: Aminosäure- Reste mit ihren zugehörigen Summenformeln und Massen zur Interpretation von Fragmentationenspektren

Aminosäure-Abkürzung		Summenformel Rest	Monoisotopische Masse Rest	Mittlere Masse Rest
Gly	G	C ₂ H ₃ NO	57,021464	57,05
Asp	D	C ₄ H ₅ NO ₃	115,02694	115,1
Ala	A	C ₃ H ₅ NO	71,037114	71,08
Gln	Q	C ₅ H ₈ N ₂ O ₂	128,05858	128,1
Ser	S	C ₃ H ₅ NO ₂	87,032029	87,08
Lys	K	C ₆ H ₁₂ N ₂ O	128,09496	128,2
Pro	P	C ₅ H ₇ NO	97,052764	97,12
Glu	E	C ₅ H ₇ NO ₃	129,04259	129,1
Val	V	C ₅ H ₉ NO	99,068414	99,07
Met	M	C ₅ H ₉ NOS	131,04048	131,2
Thr	T	C ₄ H ₇ NO ₂	101,04768	101,1
His	H	C ₆ H ₇ N ₃ O	137,05891	137,1
Cys	C	C ₃ H ₅ NOS	103,00919	103,1
Phe	F	C ₉ H ₉ NO	147,06841	147,2
Leu	L	C ₆ H ₁₁ NO	113,08406	113,2
Arg	R	C ₆ H ₁₂ N ₄ O	156,10111	156,2
Ile	I	C ₆ H ₁₁ NO	113,08406	113,2
Tyr	Y	C ₉ H ₉ NO ₂	163,06333	163,2
Asn	N	C ₄ H ₆ N ₂ O ₂	114,04293	114,1
Trp	W	C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O	186,07931	186,2

3.2 N-Acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI)

3.2.1 Darstellung

2,0 g AgNO₃ wurden in 200 mL Wasser gelöst und unter Eiskühlung mit 0,673 g KOH in kleinen Portionen versetzt. Das ausgefallene Ag₂O wurde nach 15 Minuten filtriert, bis zur Neutralität des Eluats gewaschen und bei 80°C für 2 Stunden getrocknet.

CHCl₃ wurde frisch destilliert und über Natriumsulfat getrocknet.

Zur Oxidation wurden 1 g Paracetamol und 1,536 g frisch gefälltes Ag₂O in einer Achatschale fein zerrieben, danach in 50 mL CHCl₃ überführt und für 90 Minuten bei Raumtemperatur ultrabeschallt. Alternativ zu CHCl₃ wurden Ethylacetat, Acetonitril sowie Toluol als Reaktionslösungsmittel verwendet.

3.2.2 Säulenchromatographie

20 x 200 mm Glassäulen wurden mit Kieselgel 60 präpariert (100 mm Trennstrecke) und mit Diethylether konditioniert.

Nach Aufgabe der Syntheselösungen wurde mit Diethylether eluiert und fraktioniert. Die Fraktionen (je 10 mL) wurden dünnschichtchromatographisch untersucht, die produkthaltigen Fraktionen wurden vereinigt und unter Vakuum bei Raumtemperatur eingeeengt.

3.2.3 Gaschromatographie/ Massenspektrometrie

Trägergas:	Helium 5.0, 1mL/min	Temperaturprogramm
Injektor:	1µl, Splitless, 280°C	Initial: 0-2 min 70°C
Detektor:	70 eV EI, MSD 280°C/ m/z 30-350	Ramp 1: 15°C/min bis 180°C Ramp 2: 50°C/min bis 300°C Final: 300°C bis 20 min

Es wurden alle Lösungen vor der Analyse 1:50 im Ausgangslösungsmittel verdünnt.

3.2.4 HPLC-UV/PDA

Zur Untersuchung der NAPQI-Syntheselösung wurde eine isokratische RP-HPLC-Methode mit geringem organischen Anteil in der mobilen Phase verwendet.

Der Eluent wurde vor jeder Messung frisch angesetzt und die Trennsäule für 60 Minuten equilibriert. Proben wurden vor der Injektion 1:10 mit dem Eluenten verdünnt und bei 12000*g zentrifugiert. Um Verschleppungen zu vermeiden wurde die Probenschleife nach jeder Injektion mit Ethylacetat sowie Ethanol gespült und eine Leerinjektion durchgeführt.

Trennsäule: Lichrospher RP18, 150x4,6 mm, 5µm	Fluss: 1.0 mL/min
Eluent: 90% 100 mM Citratpuffer pH 7.4 10% Methanol	Injektion: 20 µL
	Detektion: UV 220-600 nm

3.2.5 ESI/MS

Zur Untersuchung mittels Electrospray-MS wurde die Syntheselösung nach 1:100-Verdünnung in Acetonitril/Wasser (80:20) mit einem Fluss von 5µL/min über eine Spritzenpumpe direkt in die Ionenquelle infundiert.

ESI-Needle: +4 kV	Gas: Sheath 20 arb/ Aux 0 arb
Capillary: 180°C/ 10V	Tube Lens: +25V

3.2.6 UV/VIS

UV-Spektren der Syntheselösung wurden in Quatzküvetten im Scanmodus von 200-500 nm aufgenommen. Das Einstrahlphotometer wurde vor der Messung über den gesamten Scanbereich mit dem jeweils verwendeten Lösungsmittel abgeglichen.

3.2.7 Dünnschichtchromatographie

Stationäre Phase: Kieselgel 60	Probenvolumen: 5µL
Mobile Phase: Ethylacetat	Detektion: Fluoreszenz 254 nm

3.2.8 Quantifizierung

Da keine Reinsubstanz zur Quantifizierung des NAPQI zur Verfügung stand wurde dieses indirekt nach Reduktion zu Paracetamol bestimmt. Dabei wurden jedem Ansatz zehn Milligramm Ascorbinsäure zugesetzt und für zwanzig Minuten geschüttelt. Das entstandene Paracetamol wurde mittels HPLC (unter Verwendung einer externen Kalibrationsfunktion (Kalibrationsbereich 5-100 mg/L)) quantifiziert. Die Kalibratoren wurden durch Einwaagen von Paracetamol als wässrige Lösungen vor der Messung frisch hergestellt.

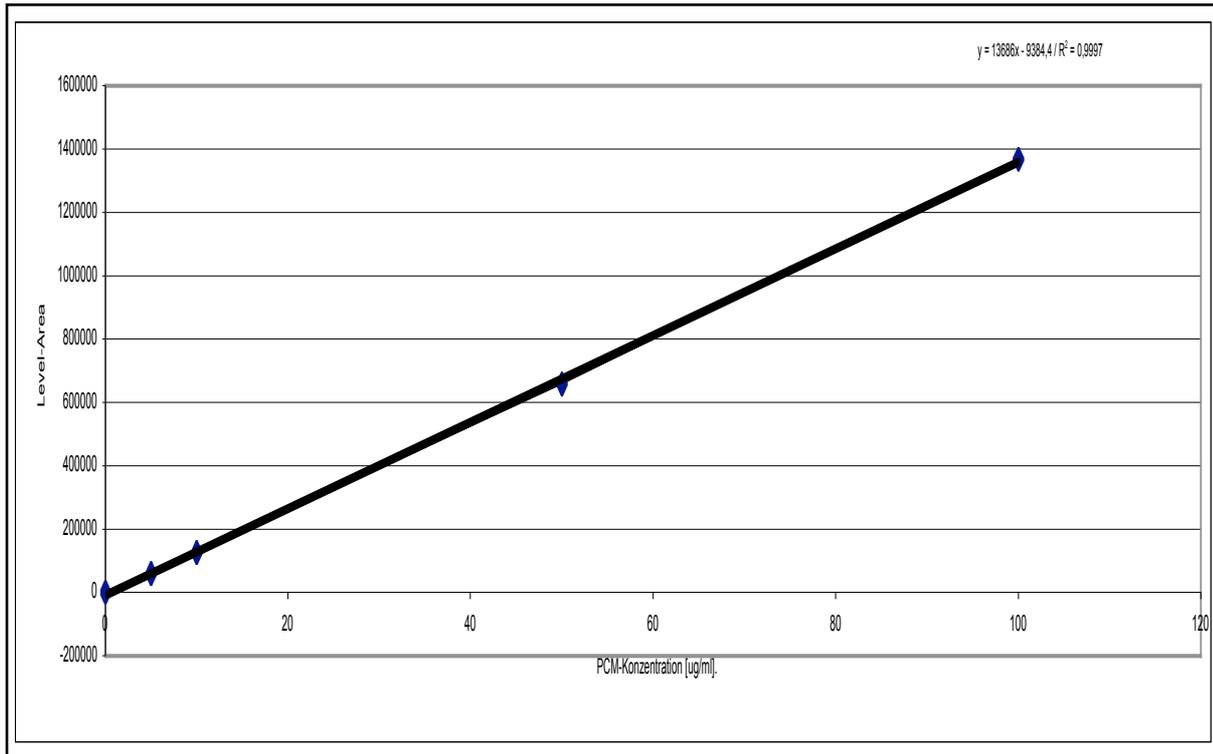


Abb.10: Kalibrationsfunktion der Paracetamolbestimmung mittels HPLC

3.3 Hämoglobin

3.3.1 Isolation von Hämoglobin

Hämoglobin aus intakten Erythrocyten:

Aus Blutproben, die durch Zusatz von EDTA ungerinnbar gemacht worden waren, wurden die Erythrocyten isoliert. Hierzu wurde nach Zentrifugation der Probe bei 3000*g das Blutplasma entfernt und die Erythrocyten dreimal mit dem zehnfachen ihres Volumens an 0,9% NaCl- Lösung gewaschen.

Nach der letzten Zentrifugation wurden die so gereinigten Erythrocyten mit dem doppelten Volumen demineralisiertem Wasser versetzt und für fünf Minuten geschüttelt.

Die bei der Hämolyse anfallenden Zellreste wurden durch Zentrifugation bei 15000*g (20 Minuten) abgetrennt. Alle Schritte, einschliesslich der Zentrifugation, wurden bei 4°C durchgeführt, die erhaltenen Hämolysate wurden aliquotiert bei -20°C gelagert.

Hämoglobin aus hämolytischen (Patienten-) Vollblutproben:

Blutproben ohne Zusatz von antikoagulierenden Stoffen („Serumröhrchen“), wie sie routinemässig im toxikologischen Labor des Instituts für Rechtsmedizin untersucht werden, zeigen bereits nach relativ kurzer Zeit eine starke Hämolyse. Dabei kommt es zu einer Zerstörung der Erythrocytenmembranen und zum Austritt von Hämoglobin. Somit war es nicht mehr möglich, Erythrocyten aus diesen Proben zu isolieren und zu waschen. Die Proben wurden eins zu eins mit demineralisiertem Wasser verdünnt und bei 4°C für 60 Minuten zentrifugiert (15000*g). Die Lösungen, die neben Hämoglobin auch Serumbestandteile enthielten, wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.3.2 Hämoglobin Gehaltsbestimmung

Die Ermittlung des Hämoglobingehaltes der verwendeten Hämolysate bzw. Hämoglobinlösungen erfolgte spektralphotometrisch nach [91]. Die Hämolysate wurden hierzu 1 zu 1000 mit Wasser verdünnt, durch fünfminütiges Begasen mit Sauerstoff wurde Hämoglobin vollständig oxygeniert. Anschliessend erfolgte die photometrische Messung am Absorptionsmaximum von 540 nm (s. Abb.11). Mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten $E^{540}=14,47 \text{ Lmmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ wurde die Hämoglobinkonzentration bestimmt. Zur Überprüfung der Methode wurde kommerziell erhältliches Kontrollmaterial mit bekanntem Hämoglobingehalt (high: 13,2-14,2 g/dL; low 6,6-7,6 g/dL) mitgeführt.

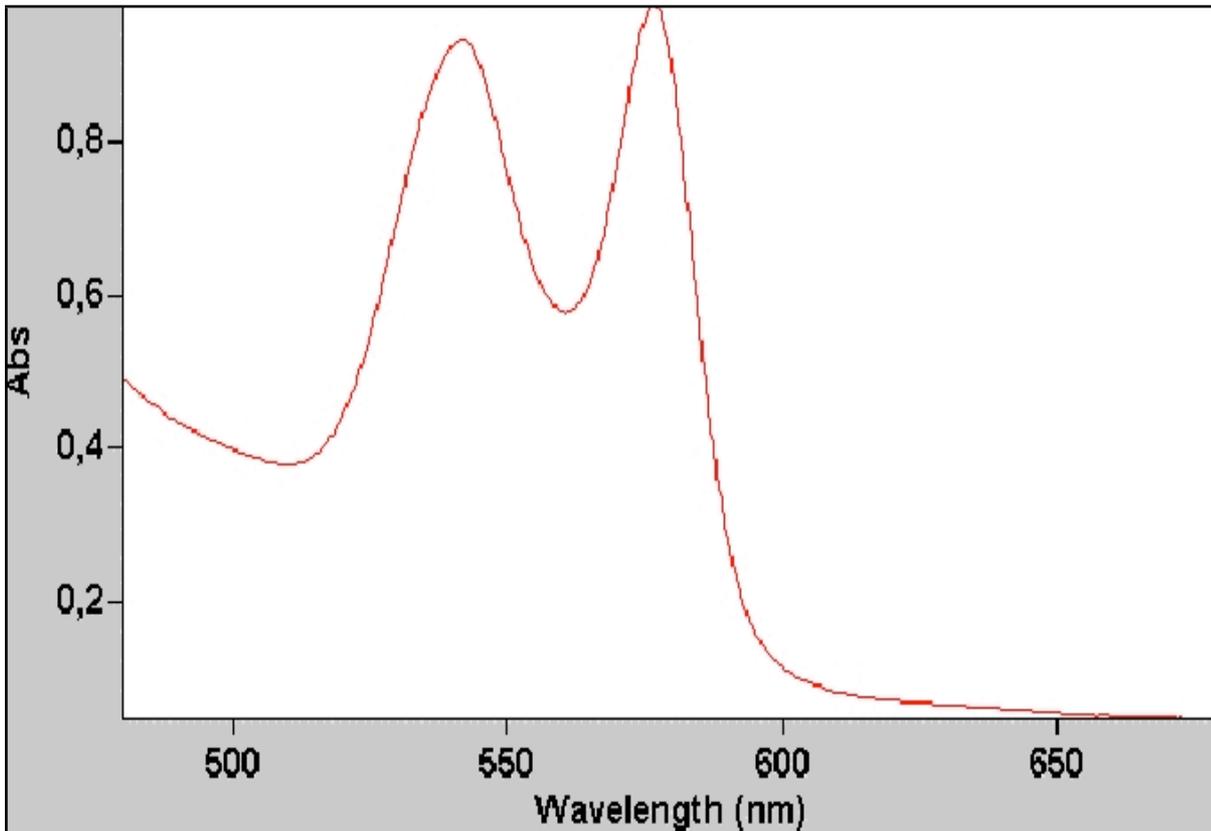


Abb.11: VIS-Absorptionsspektrum von Oxy-Hämoglobin

3.3.3 Globinisolation

Zur Gewinnung von hämfreiem Globin wurde die Aceton/HCl-Methode verwendet [92].

1 mL Hämolyt wurde tropfenweise unter Ultraschall zu 50 mL -20°C kaltem, 1% HCl enthaltendem Aceton gegeben und nach 10 Minuten bei -20°C zentrifugiert. Der rosafarbene Niederschlag wurde in der Kälte (-20°C) mit Aceton/1%HCl gewaschen bis er einheitlich weiß gefärbt und der Überstand farblos war. Danach folgten je ein Waschschrift mit -20°C Aceton sowie -20°C tert-Butylmethylether. Nach Trocknung unter Stickstoff wurde das weiße Globinpulver bei -20°C gelagert.

3.3.4 HPLC- Hämoglobin

Zur Trennung der Globinketten des Hämoglobins wurden die in Tab.5 aufgeführten chromatographischen Bedingungen verwendet, die UV-Detektion erfolgte bei 220 nm. Laufmittel wurden vor der Analyse für jeweils 15 Minuten mit Helium entgast. Die Trennsäule wurde zu Beginn eines Gradientenlaufs 15 Minuten mit der initialen Gradientenzusammensetzung equilibriert, zudem erfolgte zur Konditionierung bei jeder Analyse ein Gradientenlauf vorab.

Tab.5: Chromatographische Bedingungen der Globinkettentrennung

Bedingung	Trennsäule	Eluent A	Eluent B	Gradient	Injektion
A	Lichrospher RP 18 25 0x 4,6 mm (5µm)	0,1 % Ameisensäure in Wasser	0,1% Ameisen- säure in Acetonitril	10%B - 70%B in 60 Minuten bei 1ml/min	20µL
B	Lichrospher RP 18 25 0x 4,6 mm (5µm)	0,1 % Trifluoressigsäure/ 35% Acetonitril/ 65% Wasser	0,1% Trifluoressig- säure 45% Acetonitril 55% Wasser	0% B- 100% B in 60 Minuten bei 1ml/min	20µL
C	Waters Symmetry C18, 150 x 2,1 mm (5µm)	0,1% Trifluoressigsäure/ 37% Acetonitril/ 63% Wasser	0,1% Trifluoressig- säure 50% Acetonitril 50% Wasser	20% B -100 % B in 60 Minuten bei 0,2ml/min	5µL
D	Waters Symmetry C18, 150 x 2,1 mm (5µm)	0,1% Trifluoressigsäure/ 37% Acetonitril/ 63% Wasser	0,1% Trifluoressig- säure 50% Acetonitril 50% Wasser	20% B -60 % B in 80 Minuten bei 1ml/min	5µL
E	Waters Symmetry 300 C4, 250 x 4,6 mm (5µm)	0,1% Trifluoressigsäure/ 37% Acetonitril/ 63% Wasser	0,1% Trifluoressig- säure 50% Acetonitril 50% Wasser	20% B -60 % B in 80 Minuten bei 1ml/min	20µL

3.3.5 LC/MS Hämoglobin

Zur LC/MS-Analyse wurde der HPLC-Fluss von 1,0 mL/min (3.3.4 (E)) direkt in die Electrospray-Quelle des Massenspektrometers geleitet. Massenspektren wurden im Fullscan-MS ($m/z = 400-2000$) aufgenommen. Zur Dekonvolution der Signale mehrfach geladener Ionen nach der Analyse wurde ein Computerprogramm verwendet [93].

ESI-Needle: +4,5 kV

Gase: Sheath 80 arb/ Aux 0 arb

Capillary: 270°C/ 10V

Tube Lens: +5V

3.3.6 Proteolyse

Trypsin:

Trypsin ist eine pankreatische Serin-Endoproteinase (23,8 kDa) mit hoher Hydrolysespezifität für C-terminale Peptidbindungen von Arginin und Lysin. Bei Nachbarschaft von Prolin C-terminal zur Hydrolyseposition findet eine Spaltung nur bei bestimmten Aminosäurekonstellationen der Umgebung statt (Tab.6).

Das Enzym besitzt ein pH-Optimum von pH= 7,5-8,0. Verwendet wurde ein mit L-1-Tosylamido-2-phenylethyl-chloromethylketon (TPCK) behandeltes Trypsin, bei dem eine durch Kontamination vorhandene Chymotrypsin-Aktivität gehemmt wird.

Das lyophilisierte Enzym wurde unmittelbar vor Verwendung in einer Konzentration von 1µg/µl in wässriger Lösung angesetzt. Hämoglobin (1mg) wurde in 100 mM Ammoniumcarbonat (0,1 mL) gelöst und ein pH-Wert von 8,5 eingestellt. Nach Zusatz von 10µg Trypsin erfolgte die Proteolyse bei 37°C über Nacht (12 h).

Ameisensäure:

Aspartylreste zeigen eine bevorzugte Hydrolyse gegenüber anderen Aminosäureresten in Proteinen unter pH-Bedingungen, bei denen die Aspartyl-β-Carboxylgruppe gerade noch undissoziiert gehalten wird.

Dieses Prinzip wurde 1967 von *Schultz* erstmalig beschrieben [94]. Um den pH-Wert bei der Hydrolyse unterhalb des pK_a der β-Carboxylgruppe zu halten, wird verdünnte Salzsäure oder Ameisensäure verwendet, wobei sich 2%ige Ameisensäure pH 2,0 bei 108°C für 2 Stunden als optimal erwiesen hat [95]. Deshalb wurden wässrige Hämoglobinlösungen (1 mL) in einer Konzentration von 10 mg/mL mit je 20 µL Ameisensäure versetzt. Die so erhaltenen Lösungen wurden in Bördelgefäßen fest verschlossen im Trockenschrank bei 108°C für zwei Stunden inkubiert.

Endoproteinase GluC (V8-Protease):

Die aus *Staphylococcus aureus* gewonnene Serinendopeptidase (27 kDa, [96]) besitzt zwei pH-Optima, eines bei pH 4,0 und eines bei pH 7,8.

Das Enzym spaltet Proteine C-terminal an Glutamat- und Aspartatresten. In Puffern, die kein Phosphat enthalten, erfolgt die Hydrolyse ausschliesslich an Glutamatresten.

V8-Protease ist sehr stabil, da die Proteasenstruktur hauptsächlich durch elektrostatische Wechselwirkungen und nicht durch Wasserstoffbrücken oder β-Strukturen bedingt ist.

So behält das Enzym seine Aktivität in Gegenwart vieler denaturierender Reagenzien wie Harnstoff (6M), Guanidin-HCl (5,5M) sowie Natriumlaurylsulfat (0,5%).

Lyophilisierte Endoproteinase GluC von *Staphylococcus aureus* wurde in demineralisiertem Wasser zu einer Konzentration von 1µg/µL rekonstituiert und aliquotiert zu je 20 µg bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

Hämoglobin (1mg) wurde in 100mM Ammoniumacetat (0,1mL) gelöst und auf einen pH-Wert von 4,0 eingestellt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für sechs Stunden.

Tab.6: Substratspezifität der verwendeten Enzyme. Die Hydrolyse erfolgt zwischen AS1 / AS1`

Aminosäure-(AS)-sequenz	AS3	AS2	AS1	AS1`	AS2`	AS3`
<i>Trypsin</i>			K/R	nicht P		
		M	R	P		
		W	K	P		
<i>Ameisensäure</i>				D		
			D			
V8			E			

3.3.7 LC/MS Peptidanalyse

Trennsäule: Waters Symmetry RP18
250 x 2,1 mm, 5µm

Eluent A: 0,1% Ameisensäure in Wasser

Gradient: 5% B-70% B in 40 min

Eluent B: 0,1% Ameisensäure in Acetonitril

Flussrate: 0,2 mL/min

Injektion: 5 µL

ESI-Needle: +4,5 kV

Capillary: 220°C/ 10 V

Gas: Sheath 80 arb/ Aux 30 arb

Tube Lens: 25 V

Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte im Fullscan-MS ($m/z = 200-2000$). Zur Ermittlung der Peptidmassen aus mehrfach geladenen Signalen $[M+xH]^{x+}$ wurde ein Dekonvolutionsprogramm verwendet. Zudem erfolgte eine Überprüfung des ermittelten Ladungszustandes anhand der Signale von Natriumaddukten oder, wenn möglich, über den Abstand der Isotopenpeaks, die in erhöhter Auflösung („Zoom Scan“) durch „data dependent scanning“ beobachtet wurden.

Die Zuordnung der gefundenen Peptidmassen mit den theoretisch zu erwartenden erfolgte mit den Computerprogrammen FindPept sowie PeptideMass des Schweizer Instituts für Bioinformatik.

Hierzu wurden die Sequenzinformationen des Globins aus der SWISS-PROT/TrEMBL-Datenbank verwendet.

3.4 Hämoglobin-NAPQI-Addukt

3.4.1 In Vitro Reaktionsbedingungen

Die Reaktion von NAPQI mit Hämoglobin wurde im Inkubator bei 37°C in 100 mM Citratpuffer pH=7,4 durchgeführt. Es wurden je 18 mg Hämoglobin (300 nmol) mit unterschiedlichen Mengen NAPQI für je 1h inkubiert. Die maximale zugesetzte NAPQI-Menge betrug 45 µg (300 nmol). Die Lösungen wurden nach 1h zentrifugiert und direkt zur weiteren Untersuchung verwendet.

3.4.2 HPLC-Untersuchung des Hämoglobins nach der Reaktion mit NAPQI

Zur Untersuchung der Globinketten nach der Reaktion mittels HPLC-PDA wurden die unter 3.3.4 (E) bereits beschriebenen chromatographischen Bedingungen verwendet.

Die Detektion erfolgte durch Aufnahme der UV-Spektren von 200-600 nm bei 10 Hz.

3.4.3 LC/MS-Untersuchung des Hämoglobins nach der Reaktion mit NAPQI

Zur Untersuchung der Globinketten nach der Reaktion mittels LC/MS wurden die bereits unter 3.3.4/ 3.3.5 beschriebenen Bedingungen verwendet.

3.4.4 V8-Protease-Verdau des Hämoglobins nach der Reaktion mit NAPQI

Die Proteolyse mittels Endoproteinase GluC wurde analog zu den unter 3.3.6 beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

HPLC-PDA- Untersuchung der Peptide

Trennsäule: Waters Symmetry RP18
250 x 2,1 mm, 5µm

Eluent A: 0,1% Trifluoressigsäure/ 95%
Wasser/ 5% Acetonitril

Gradient: 10% B-70% B in 80 min

Eluent B: 0,1% Trifluoressigsäure/ 20%
Ameisensäure in Acetonitril

Flussrate: 1,0 mL/min

Injektion: 20 µL

Die Detektion erfolgte durch Aufnahme der Absorptionsspektren von 220-600 nm bei 10Hz.

LC/MS- Untersuchung der Peptide

ESI-Needle: +4,5 kV

Capillary: 270°C/ 10 V

Gase: Sheath 80 arb/ Aux 30 arb

Tube Lens: 25 V

Die zur LC/MS verwendeten chromatographischen Bedingungen entsprechen denen der HPLC-PDA-Untersuchung.

LC/MS/MS- Untersuchung der Peptide:

Zur Aufnahme der Tochterionen-Spektren von Peptiden wurde die Ionenfalle im Fullscan-MS/MS/-Modus betrieben. Precursor-Ionen wurden entweder manuell oder durch „Data-Dependent-Scanning“ automatisch mit einer Isolationsbreite von $m/z=1,5$ isoliert und innerhalb der Ionenfalle fragmentiert.

Die kollisionsinduzierte Dissoziation mit Helium 5.0 erfolgte dabei mit einer relativen Kollisionsenergie von 50% unter Verwendung von „Wide-Band-Activation“, bei der es zu einer zusätzlichen Anregung der $[M-NH_3+H]^+$ bzw. $[M-H_2O+H]^+$ -Ionen und damit zu fragmentreicheren Spektren kommt. Für den Tochterionen-Scan wurde der maximal mögliche Scanbereich, der von m/z des Precursors abhängig ist, gewählt.

3.5 Methodenoptimierung

3.5.1 HPLC

Da Trifluoressigsäure im Electrospray eine erhebliche Ionensuppression [97] und somit einen starken Empfindlichkeitsverlust verursacht, wurde zur Elution der Peptide 0,1% Ameisensäure im Acetonitrilgradienten als Modifier verwendet.

Durch den Einbau eines steuerbaren Rheodyne-Ventils zwischen Trennsäule und der Ionenquelle konnte zudem der HPLC-Fluss nur zur gewünschten Zeit in das Massenspektrometer geleitet werden, was die Matrixbelastung deutlich verringerte und die Injektion grösserer Probenvolumina ermöglichte.

3.5.2 Massenspektrometer

Kalibration:

Die externe Kalibration erfolgte dabei mit einer Lösung von Coffein, dem Tetrapeptid MRFA sowie Ultramark 1621, einem Gemisch fluorierter Phosphazine. Diese wurde mit einem konstanten Fluß von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ direkt in die Elektrospray-Quelle eingeleitet. Mit Hilfe der m/z -Signale 195,088 (Coffein), 524,265 (MRFA), 1221,991 (Ultramark), 1521,972 (Ultramark) und 1821,953 (Ultramark) erfolgte eine 5-Punkt-Kalibration über den Meßbereich.

Dabei wurden automatisch die zur Isolation, dem Auswurf sowie der MS/MS-Aktivierung der betreffenden Ionen benötigten Spannungsformen ermittelt und als Kalibration gespeichert. Darüber hinaus erfolgte über das Multiplierpotential eine automatische Kalibration des Sekundärelektronenstroms.

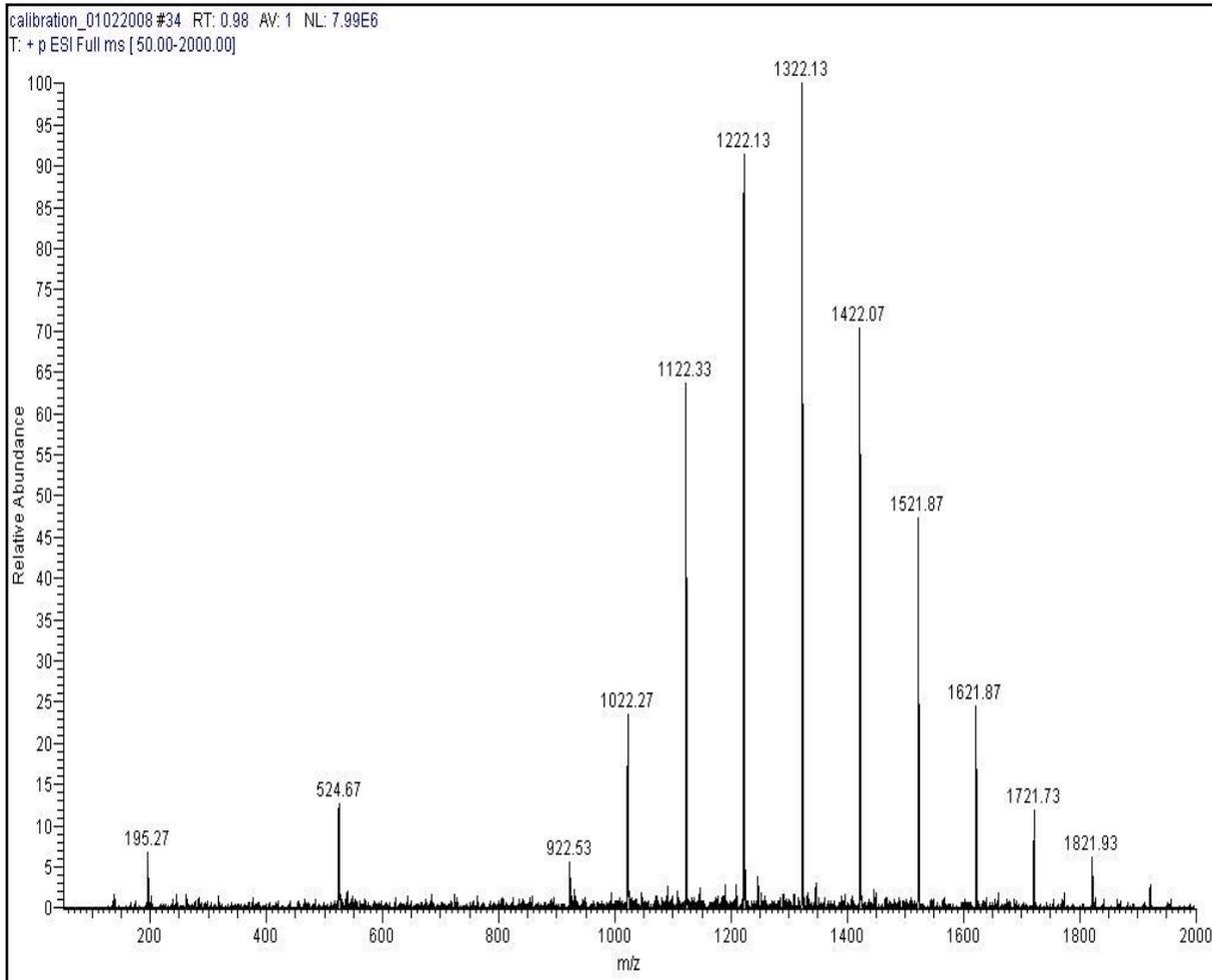


Abb.12: Fullscan-Massenspektrum der zur Kalibration des Massenspektrometers verwendeten Lösung aus Coffein, MRFA sowie Ultramark 1621 (direct infusion)

Tuning:

Um eine optimale Sensitivität des Massenspektrometers im LC/MS-Betrieb zu erreichen, wurde das Tetrapeptid MRFA in einer Konzentration von 1mg/L hinter der Trennsäule in den HPLC-Fluss infundiert.

Die Gradientenzusammensetzung betrug dabei 50% Eluent A und 50% Eluent B. Unter Beobachtung des protonierten MRFA-Moleküls ($m/z = 524.3$) wurden zunächst manuell Gasflüsse (Sheath/AUX-Gas) und Temperatur der Electrosprayquelle so eingestellt, dass ein maximales und stabiles Signal erhalten wurde.

Anschließend wurden die Spannungen der ESI-Quelle (Capillary, Tube Lens, ESI needle) sowie der Ionenoptik (Multipole und Linsen) angepasst. Die Ermittlung des jeweils optimalen Wertes erfolgte hierbei halbautomatisch, wobei das Gerät den jeweiligen Parameter mit vorgegebener Steigung in einem definierten Bereich variierte und den Signalverlauf gleichzeitig aufzeichnete. Hieraus konnte das jeweilige Maximum für den einzustellenden Parameter abgeleitet werden.

MS/MS-Detektion:

Zur MS/MS- Detektion modifizierter Peptide erfolgten zunächst Zoom-Scan-Aufnahmen der Precursorionen zur Festlegung des Precursorisolationbereiches. Zur Optimierung der kollisionsinduzierten Dissoziation (CID) wurden sowohl von $[M+H]^+$ -Ionen sowie $[M+2H]^{2+}$ -Ionen der betreffenden Peptide Tochterionenspektren bei verschiedenen relativen Kollisionsenergien aufgenommen. Hierzu diente ein Kalibrationsstandard mit 100 pg NAPQI pro mg Hämoglobin, der unter variierenden CID-Bedingungen mehrfach injiziert wurde.

Für die Analysenmethode wurden die zur Detektion der modifizierten Peptide benötigten MS/MS-Scans durch das Steuerprogramm des Massenspektrometers alternierend geschaltet. Die maximal zulässige Füllzeit der Ionenfalle wurde auf 500 ms (bei nur einem Microscan) beschränkt, um eine ausreichende Zahl MS/MS-Scans (>12) über den jeweiligen chromatographischen Peak des betreffenden Peptides zu erhalten.

3.5.3 Probenvorbereitung

Inkubationszeit:

Zur Ermittlung der optimalen Inkubationszeit wurde je 1 mg natives Hämoglobin in 100 μ L Ammoniumacetat 100 mM/pH 4,0 mit 20 μ g Endoproteinase GluC versetzt und im Inkubator bei 37°C inkubiert. Nach 0, 3, 5 und 9 Stunden wurden die Proben mit der unter 3.4.4 beschriebenen LC/MS- Methode analysiert.

Enzym/Substratverhältnis

Zur Ermittlung des optimalen Enzym/Substrat-Verhältnisses wurde je 1mg natives Hämoglobin in 100 μ L Ammoniumacetat 100 mM/pH 4,0 mit 10, 20 und 50 μ g Endoproteinase GluC versetzt und im Inkubator bei 37°C für 5 Stunden inkubiert. Es folgte die Untersuchung mit der unter 3.4.4 beschriebenen LC/MS- Methode.

TCA-Fällung

Zur Abtrennung größerer Peptide nach erfolgter Proteolyse wurde eine Fällung mit Trichloressigsäure durchgeführt. Nach Zugabe von Trichloressigsäure (2%) zum Enzymverdau nach der Inkubation erfolgte eine Zentrifugation bei 12000*g für 10 Minuten.

Ultrafiltration

Zur Aufreinigung bzw. zur Abtrennung grösserer Peptide wurde eine Ultrafiltration durchgeführt. Verwendet wurden Zentrifugalfiltergeräte mit 3000 Da und 10000 Da Cut Off. Die Filter wurden vor Verwendung für 30 Minuten mit Wasser benetzt und je zweimal mit Wasser zentrifugiert, um enthaltenes Glycerin zu entfernen.

Die Filtration der Proben erfolgte bei 12000*g (3000 Da-Membran) bzw. 3000*g (10000 Da-Membran) für 90 Minuten.

3.5.4 Kalibration

Zur Quantifizierung der NAPQI-Hämoglobin-Addukte wurde eine Kalibrationsfunktion erstellt. Hämoglobin wurde mit verschiedenen Konzentrationen an NAPQI gemäß 3.4.1 inkubiert. Als interner Standard wurde das native Peptid verwendet. Die Kalibration erfolgte durch Korrelation der Signalflächenverhältnisse des modifizierten Zielpeptides zum nativen Zielpeptid mit der zugesetzten Menge an NAPQI. Anhand der ermittelten Regressionsfunktion wurde so aus den gemessenen Signalverhältnissen unbekannter Proben deren Adduktmenge bestimmt.

3.6 Untersuchung der Patientenproben

3.6.1 Probenherkunft

Zur Untersuchung von Patienten mit unklaren akuten Vergiftungen steht das toxikologische Labor des Instituts für Rechtsmedizin am UKE durchgehend mit einer schnellen Analytik den umliegenden medizinischen Einrichtungen zur Verfügung. Dabei wird zur Beurteilung von akuten Intoxikationen in aller Regel Patientenblut untersucht. Zur Anwendung kommen immunologische sowie physikalisch-chemische Analysenverfahren (Gaschromatographie/Massenspektrometrie, HPLC). Sämtliche eingesandte Blutproben von Vergiftungsfällen, bei denen Paracetamol nachgewiesen werden konnte oder bei welchen der Verdacht einer Paracetamolbeteiligung bestand, wurden im Zeitraum Oktober 2005 bis Januar 2008 asserviert und für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen verwendet. Dabei handelte es sich bei den in der Laborroutine untersuchten Proben um Blutproben ohne antikoagulierende Zusätze („Serumröhrchen“), aus denen keine Erythrocytenisolate sondern vielmehr hämolytische Vollblutproben zu gewinnen waren. Bei schweren, nachgewiesenen oder bekannten Paracetamolintoxikationen wurden darüber hinaus nachträglich Blutproben aus den Kliniken aquiriert, die in EDTA-stabilisierten Blutröhrchen abgenommen wurden. Aus diesen konnten Erythrocyten isoliert, gewaschen und lysiert werden, wodurch Hämoglobin in hoher Reinheit gewonnen wurde. So standen für einige Patienten mehrere, zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommene Blutproben (Vollblut oder Erythrocytenlysate) zur Verfügung, insgesamt 85 Proben von 58 Patienten, davon 65 hämolytische Vollblutproben und 20 EDTA-stabilisierte Proben. Bei den Patienten BSO, DS, TA und DY konnten mehrere, nach PCM-Ingestion hintereinander abgenommene Proben („Serumröhrchen“) untersucht werden, wobei sich die genauen Zeitpunkte der Blutentnahmen allerdings nicht immer rekonstruieren ließen.

Tab.7 zeigt in der Übersicht die Patienten, deren Blutproben zur Untersuchung verwendet wurden, aufgeführt sind Alter, Geschlecht, eventuell verfügbare anamnestische Angaben zur PCM-Einnahme sowie weitere toxikologische Befunde bei vorliegenden Mischintoxikationen.

Tab.7: Übersicht der Patienten, deren Blutproben zur Untersuchung verwendet wurden (PCM als Gesamtdosis in g oder mg/kg Körpergewicht, BE= Blutentnahme, p.l.= post Ingestionem)

Patient	Alter	m/f	Anamnestische Angaben	Weitere Fremdsubstanzen im Serum [mg/L]
AC	15	f	BE 4h p.l.	
BA	36	f	BE 4h p.l.	Salicylate 86,4
BB	16	f	PCM 140mg/kg KG	-
BJ	2	m	-	-
BK	32	f	BE <10h p.l.	-
BP	2	m	-	-
BS	1	f	-	-
BSO	13	f	PCM 16g	-
BUA	16	f	BE 20h p.l.	-
BW1	82	f	-	-
CA	21	f	-	Diazepam, Lorazepam
CI	59	f	PCM >80mg/kg KG	
CK	48	f	-	Promethazin 2,5, Diazepam 0,3
CL	33	f	-	120 mg/dL Ethanol, Tetrazepam 1,9
CS	41	f	-	-
DA			-	-
DN	19	f	-	-
DS	16	f	-	-
DY2	16	f	PCM 9g, BE 8h p.l.	-
EM	44	f	verstorben	Flupirtin 2,0, Tilidin 1,0, Opiate
FK1	33	f	-	Salicylate 270, Benzodiazepine
GI	2	f	-	-
GM	16	f	-	-
GV	15	f	PCM 260mg/kg KG, BE 4h p.l.	Salicylate 284,8
HI	61	f	-	-
HL	15	f	PCM 70mg/kg KG, BE 4h p.l.	-
HM	17	f	-	-
HP	27	m	-	-
IR	2	m	-	-
JE	1	f	PCM 125mg/kg KG	-

Patient	Alter	m/f	Anamnestische Angaben	Weitere Fremdsubstanzen im Serum [mg/L]
JT	16	f	BE 5h p.l.	Ethanol 60 mg/dL
KJ	16	f	-	-
KS	32	f	PCM 24g	Ethanol 190 mg/dL
KV	14	f		
LE			PCM 25g, BE 36h p.l.	-
LM	5	m	-	-
MA	44	f	Leberversagen	-
MF	19	f	PCM 10-15g	Benzodiazepine
MJ	39	f	Leberversagen, Entzug	Clomethiazol, Benzodiazepine
MK	21	f	PCM 20g	-
NG1	30	f	Leberversagen	
OA	0	f	PCM 375 mg (protrahiert)	-
ÖB	31	m	14g PCM 14g BE <6h p.l.	-
PS	36	m	-	diverse Medikamente
PSY	27	f	-	
PT	2	m	-	-
RA	15	f	-	-
SJ	15	f	PCM 7,5g BE <11h p.l.	-
SL	15	f	BE >36h p.l.	-
SS1	15	f	PCM 280mg/kg KG	-
TA1	18	f	PCM 3g	Amitryptilin 0,5 , Salicylate 68,2L
	15	f	PCM 120mg/kg KG, BE 16h p.l.	-
WF			-	-
WS	39	f	-	Tricyclische Antidepressiva
YJ	16	f	-	-
ZA	17	f	PCM 6g, BE 4,5h p.l.2.00	-
ZF	19	f	-	-
ZS	24	f	PCM 770mg/kg KG, BE <6h p.l.	

3.6.2 Bestimmung der Paracetamol-Konzentration

Zur Bestimmung der Paracetamol-Konzentration in den verschiedenen Patientenmaterialien (Serum, Plasma, hämolytisches Blut) wurde ein Fluoreszenzpolarisations-immunoassay (FPIA, TDx Abbott) verwendet.

3.6.3 Bestimmung der NAPQI-Hämoglobin-Addukte

Nach Hämoglobinisolation (3.3.1) und Gehaltsbestimmung (3.3.2) wurden Proben zu je 1 mg Hämoglobin in 0,1 mL 100 mM Ammoniumacetat pH 4,0 gelöst. Nach Zusatz von 50 µg Endoproteinase GluC wurde für 4h bei 37°C inkubiert. Die Ultrafiltration (3000 Da cut-off) erfolgte bei 12000*g für 90 Minuten. Nach Zugabe von 5µL Acetonitril zum Eluat wurde dieses direkt zur LC/MS- Analyse verwendet.

3.7 Glutathion-NAPQI-Addukt

3.7.1 In Vitro Reaktionsbedingungen

Die Reaktion zwischen Glutathion (GSH) sowie NAPQI wurde analog zur Reaktion mit Hämoglobin (3.4.1) durchgeführt. Dabei wurden bei der Inkubation bis zu äquimolare Mengen an NAPQI zugesetzt. Glutathion-Stammlösungen (10mg/L) sowie Verdünnungen wurden in Wasser unmittelbar vor Versuchsbeginn angesetzt.

3.7.2 LC/MS(/MS) Untersuchung des Reaktionsproduktes

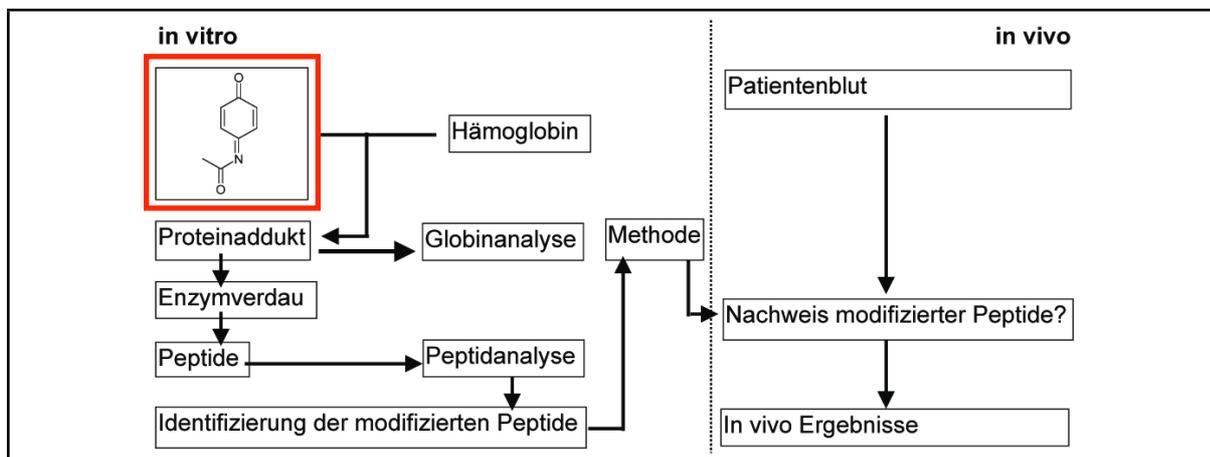
Das Reaktionsprodukt wurde mittels LC/MS(/MS) nachgewiesen, wobei die unter 3.4.1/3.4.2 beschriebenen Bedingungen verwendet wurden. Zusätzlich zu den Fullscan-MS/MS-Scanevents der Hämoglobin-Precursor-Peptide wurden solche für GSH und GSH-NAPQI in die bestehende Methode eingefügt.

3.8 In vitro Inkubationen

In vitro Inkubationsversuche von Glutathion, Hämoglobin, Deoxyhämoglobin und Globin mit PCM wurden in 100 mM Citratpuffer pH=7,4 für jeweils 24 Stunden im Inkubator bei 37°C durchgeführt. Stammlösungen der Substanzen (10 µg/µL) wurden unmittelbar zuvor durch Einwiegen und Lösen in Wasser angesetzt. Die jeweilige Zusammensetzung der Proben sind im Ergebnisteil unter 4.6.4 aufgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 N-Acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI)



Im Folgenden wird die Darstellung und Analyse des NAPQI zusammengefasst.

4.1.1 Darstellung

Das für die Arbeit benötigte N-Acetyl-p-benzochinonimin wurde zunächst in Anlehnung an die Methode von *Dahlin und Nelson* hergestellt, wobei eine Umsetzung von Paracetamol mit frisch gefälltem Silberoxid in CHCl_3 erfolgte [98]. Der Reaktionsverlauf wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt, wobei neben dem Edukt ($R_f=0,08$) eine intensiv gelb gefärbte Bande ($R_f=0,38$) sowie zwei weitere schwache Banden ($R_f=0,46/0,23$) zu beobachten waren. Die intensive Bande färbte sich nach einigen Minuten außerhalb der Entwicklungskammer dunkelbraun. Der Reaktionsansatz war nach Zentrifugation stark gelb gefärbt und wurde zunächst mittels Säulenchromatographie (Kieselgel 60, Diethylether) aufgereinigt. Hierbei ergaben sich erhebliche Schwierigkeiten beim Einengen des Reaktionsansatzes sowie der Eluatfraktionen: Bei Verdampfen des Lösungsmittels (CHCl_3 bzw. Diethylether) bei Raumtemperatur unter Vakuum am Rotationsverdampfer kam es zu einem plötzlichen Auftreten eines unlöslichen dunkelbraunen Niederschlages sowie einer Entfärbung der zuvor gelben Lösungsmittelphase. Vermutlich handelte es sich hierbei um eine Polymerisation, da der entstandene Niederschlag nicht wieder in Lösung gebracht werden konnte. Deshalb wurde dem Ansatz sowie dem Säuleneluat nach Abtrennen des Silberoxides 50 mg Butylhydroxytoluol zugesetzt. Auch hierdurch liess sich jedoch das Problem nicht beheben, zudem trat der unerwünschte Niederschlag auch bei längerem Stehenlassen (12 h bei 4°C) der Reaktionslösung auf. Daraufhin wurden die Reaktion in kleinerem Ansatz (100 mg PCM/ 250 mg Ag_2O) in anderen Lösungsmitteln wiederholt, hierzu wurden jeweils 4 mL Ethylacetat, Acetonitril sowie Toluol verwendet. Nach der Zentrifugation des Reaktionsgemisches waren

die Überstände des Ethylacetat- sowie des Acetonitrilansatzes kräftig gelb gefärbt, während der Toluolansatz lediglich eine schwache Gelbfärbung zeigte. Nach 12h Lagerung bei 4°C war es bei den beiden erstgenannten wiederum zum Auftreten des dunkelbraunen Niederschlages gekommen, während der Toluolansatz nach wie vor eine schwache Gelbfärbung ohne Niederschlag zeigte. Zu den weiteren Untersuchungen wurde deshalb die Reaktion in Toluol durchgeführt.

4.1.2 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtplatte der Toluol-Reaktionslösung nach der Reaktion zeigte bei der Entwicklung mit Ethylacetat eine einzelne (gelbliche) Bande ($R_f=0,36$), die sich an der Luft rasch bräunlich verfärbte.

4.1.3 HPLC-PDA

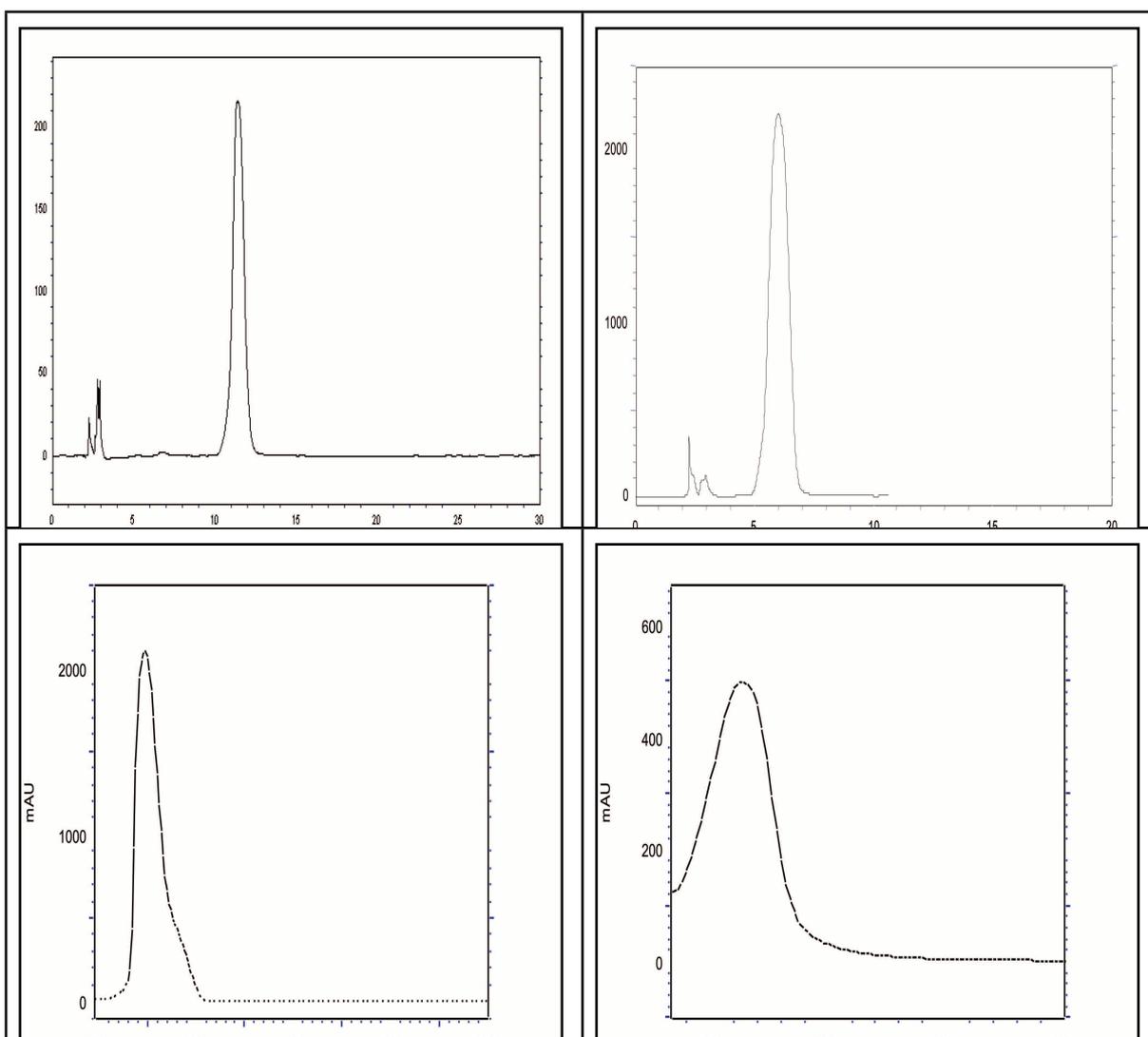


Abb.13: HPLC-UV-Chromatogramme der Syntheselösung (oben links), einer PCM-Standardlösung (oben rechts) sowie deren zugehörige UV-Spektren (jeweils darunter)

Wie aus der Dünnschichtchromatographie zu erwarten, zeigte auch das HPLC-Chromatogramm der Syntheselösung nur ein einzelnes Signal mit homogenem UV-Spektrum und damit die Anwesenheit einer einzelnen Verbindung an. Die Verbindung besaß mit einer Retentionszeit von 11,5 Minuten (Abb.13, oben links) im RP-Phasensystem eine bedeutend geringere Polarität als PCM (RT=6,2 Minuten, Abb.13, oben rechts). Das Edukt Paracetamol ist in der Syntheselösung nicht mehr zu erkennen. Das UV-Spektrum des Signals bei RT= 11,5 Minuten zeigt ein Absorptionsmaximum von 263 nm (Abb.13, unten links), was gegenüber dem Absorptionsmaximum des PCM (245 nm, Abb.13, unten rechts) deutlich bathochrom verschoben ist.

4.1.4 Electrospray-MS/(MS)

Das (+) Electrospray-Massenspektrum (Abb.14) der verdünnten Syntheselösung zeigte ein $[M+H]^+$ Ion erwartungsgemäss bei $m/z=150$, ein $[2M+H]^+$ bei $m/z=299$ sowie das, durch Fragmentierung innerhalb der API-Quelle oder dem Skimmer/Multipol-Bereich („in-Source-CID“) entstandene $[M-C_2H_2O+H]^+$ bei $m/z=108$. Kollisionsinduzierte Fragmentierung des $[M+H]^+$ innerhalb der Ionenfalle liefert ein einzelnes Tochterion $[M-C_2H_2O+H]^+$ bei $m/z=108$, das durch Verlust der Acetylgruppe entsteht (Abb.15, links). Gleichzeitig war im Fullscan-Massenspektrum deutlich Paracetamol zu erkennen mit den charakteristischen $m/z=152$ ($[M+H]^+$) sowie $m/z=110$ ($[M-C_2H_2O+H]^+$), die circa 70% der Signalintensität der NAPQI-Ionen aufwiesen. Nach Isolation des $m/z=152$ und kollisionsinduzierter Fragmentierung innerhalb der Ionenfalle entstanden als Tochterionen $m/z=110$ (100%, $[M-C_2H_2O+H]^+$) sowie $m/z=134$ ($[M-H_2O+H]^+$) und $m/z=90$ (Abb.15 rechts). Das bei der ESI-MS beobachtete Paracetamol muss bei der Ionisation in erheblichem Maße durch Reduktion aus NAPQI entstanden sein, da die infundierte NAPQI-Syntheselösung, wie durch HPLC-PDA (4.1.3) nachgewiesen, das Edukt Paracetamol nicht enthält.

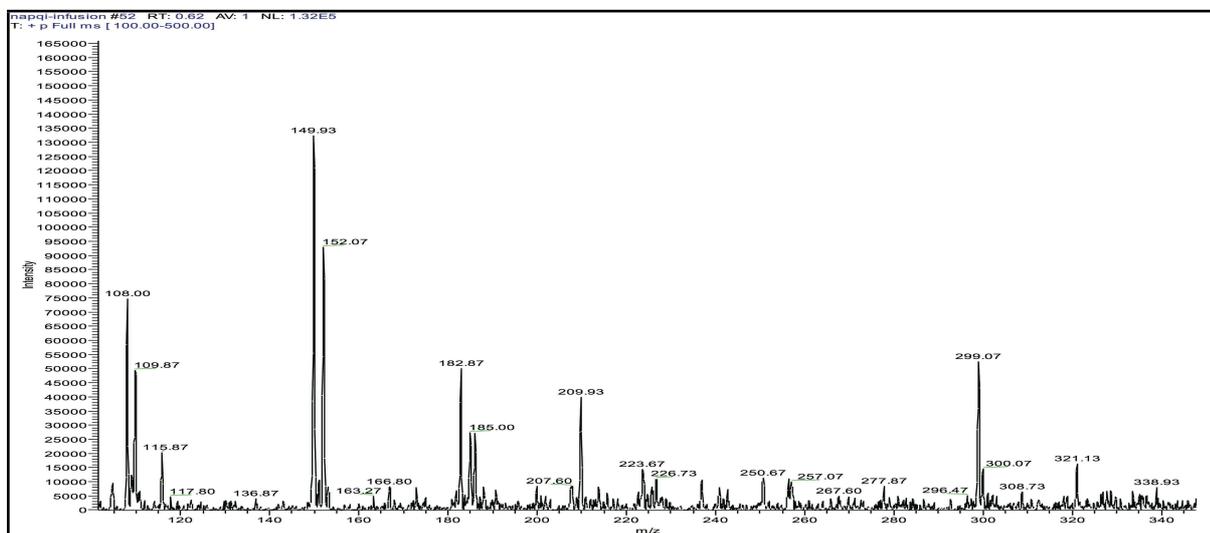


Abb.14: Electrospray-MS-Spektrum der Syntheselösung (5ng/µL): Fullscan-MS m/z=100-350

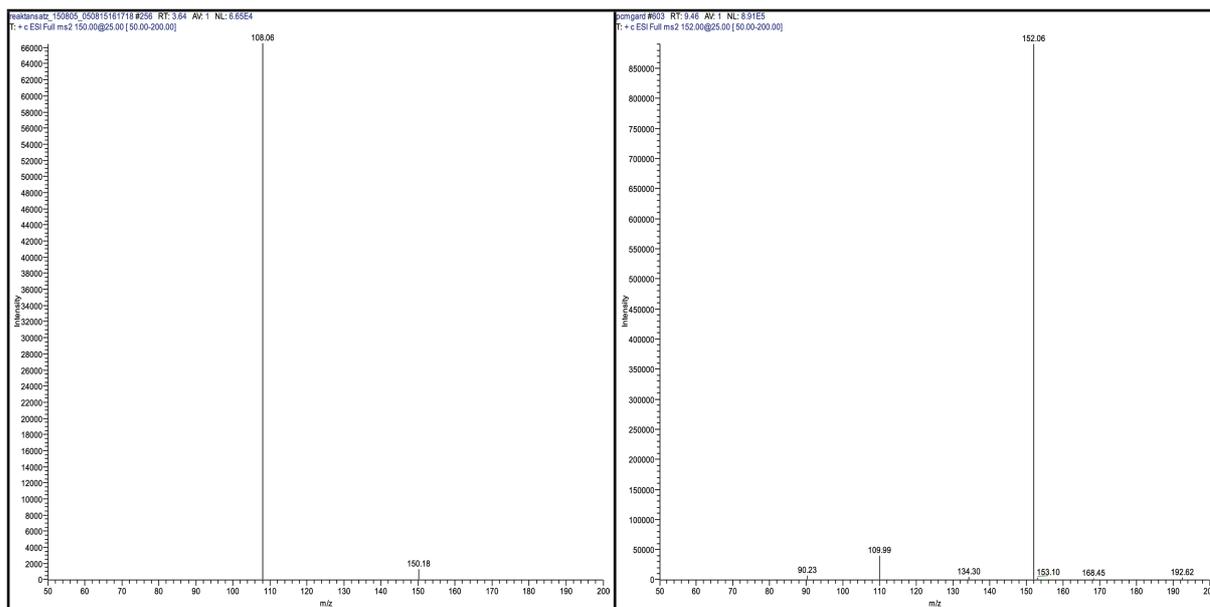


Abb.15: Electrospray-MS-Spektrum der Syntheselösung (5ng/ μ L) / 5ul/min: Fullscan-MS/MS $m/z=150$ (links) sowie $m/z=152$ (rechts). (Direct-Infusion 5 μ L/min)

4.1.5 GC-EI-MS

Bei der GC/MS-Analyse der Syntheselösung zeigten sich im Chromatogramm des Total Ion Current (TIC) zwei dominierende Signale (Abb.17, oben). Bei einer Retentionszeit von 9,1 Minuten eluierte das NAPQI.

Das Massenspektrum (Abb.16, oben) zeigte neben dem Moleküllion (M^+) $m/z=149$ auch Fragmentionen, die durch Spaltungen in der Seitenkette entstanden waren: $m/z=134$ (M^+-CH_3) und $m/z=107$ (M^+-CH_2CO). Weitere Fragmentionen ($m/z=121, 54, 52$) erklärten sich durch Abspaltung der Carbonylkohlenstoffe (CO) aus dem chinoiden Ringsystem, wodurch letztlich ionisiertes Cyclobutadien ($m/z=52$) gebildet wurde. Zusammenfassend ist die Fragmentierung des NAPQI-Moleküllions in Abb.16 dargestellt. Das Massenspektrum des NAPQI zeigte neben diesen, durch Fragmentierung erklärbaren Ionen, jedoch in geringerem Umfang (ca. 15% der Intensität) auch ein ($M+2$) $^+$ - sowie ein ($M+2-CH_2CO$) $^+$ -Ion.

Dies liess darauf schliessen, dass bei der Ionisierung in der Ionenquelle, nach erfolgter chromatographischer Trennung und vor Eintritt in den Massenanalysator, NAPQI teilweise (<15%) zu PCM reduziert wurde. Diese Reduktion fand jedoch in deutlich geringerem Umfang statt als bei der ESI (4.1.4). Das Signal bei RT= 12,0 min zeigte das Massenspektrum des Paracetamols (Abb.17, unten), welches mit dem Paracetamol-massenspektrum (Eintrag 825) der „Pfleger-Maurer-Weber“-Massenspektren-bibliothek übereinstimmt (> 99%). Da die Syntheselösung, wie mittels HPLC-PDA nachgewiesen (4.1.3), kein Paracetamol enthielt, musste auch die Injektion in den Gaschromatographen zur Bildung von Paracetamol aus NAPQI geführt haben, in deren Folge es dann zur chromatographischen Trennung von Paracetamol und NAPQI und dem Auftreten zweier Detektorsignale kommen konnte. Das Paracetamolsignal besass dabei im TIC-

Chromatogramm eine grössere Fläche als das NAPQI-Signal, was auf einen erheblichen Umfang der Reduktion im Einlaß des GC hindeutete. Die EI-Massenspektren von NAPQI und PCM zeigten unterschiedliche Intensitäten der Ionen M^+ , (M^+-CH_3) und (M^+-CH_2CO) . So wies das Molekülradikalkation des NAPQI eine deutlich höhere relative Intensität auf als das des Paracetamols, was auf eine höhere Stabilität schliessen liess.

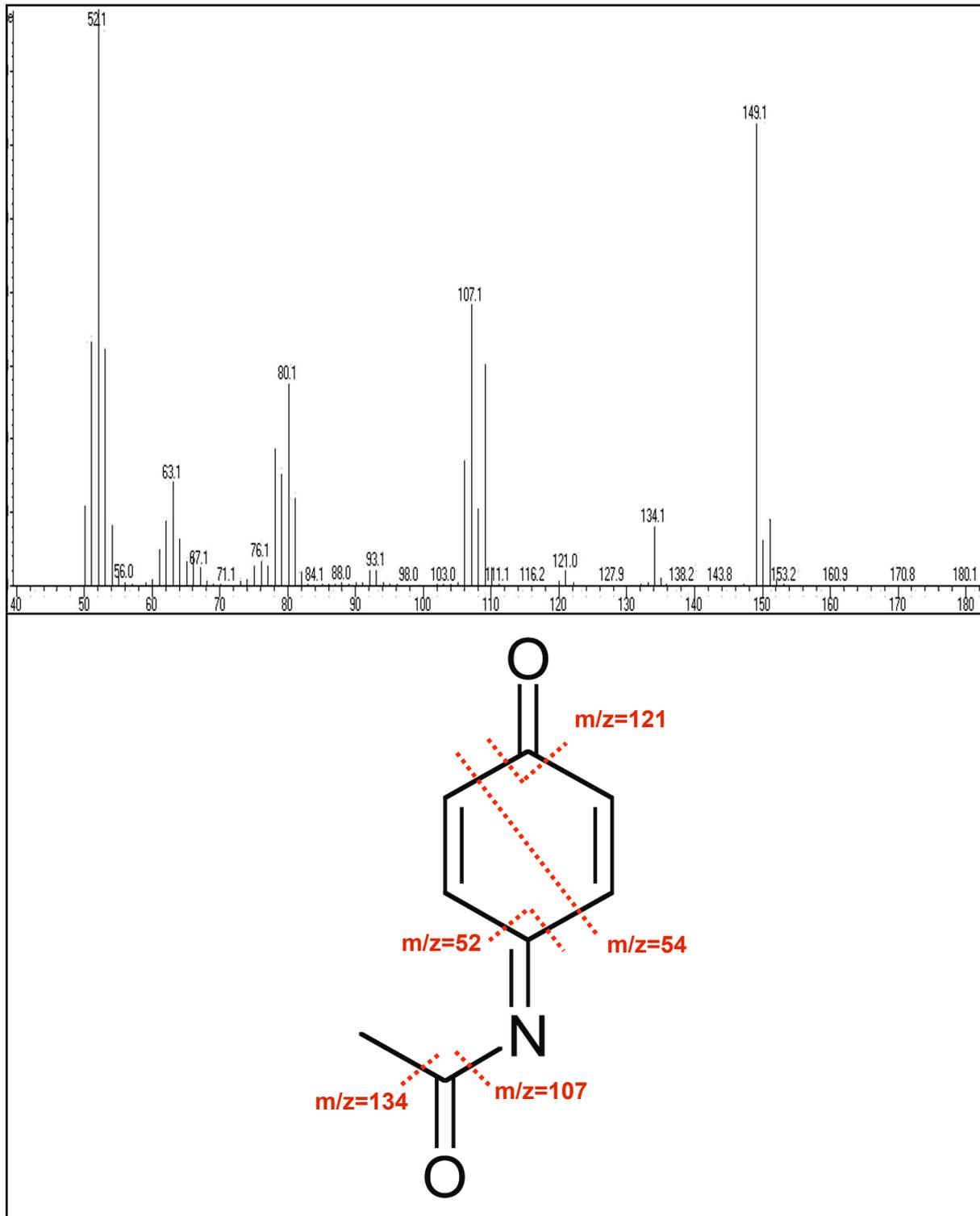


Abb.16: EI-Massenspektrum des NAPQI bei der GC/MS-Analyse (RT=9,1 min, oben) sowie Zuordnung der Fragmentionen anhand der NAPQI-Strukturformel (unten)

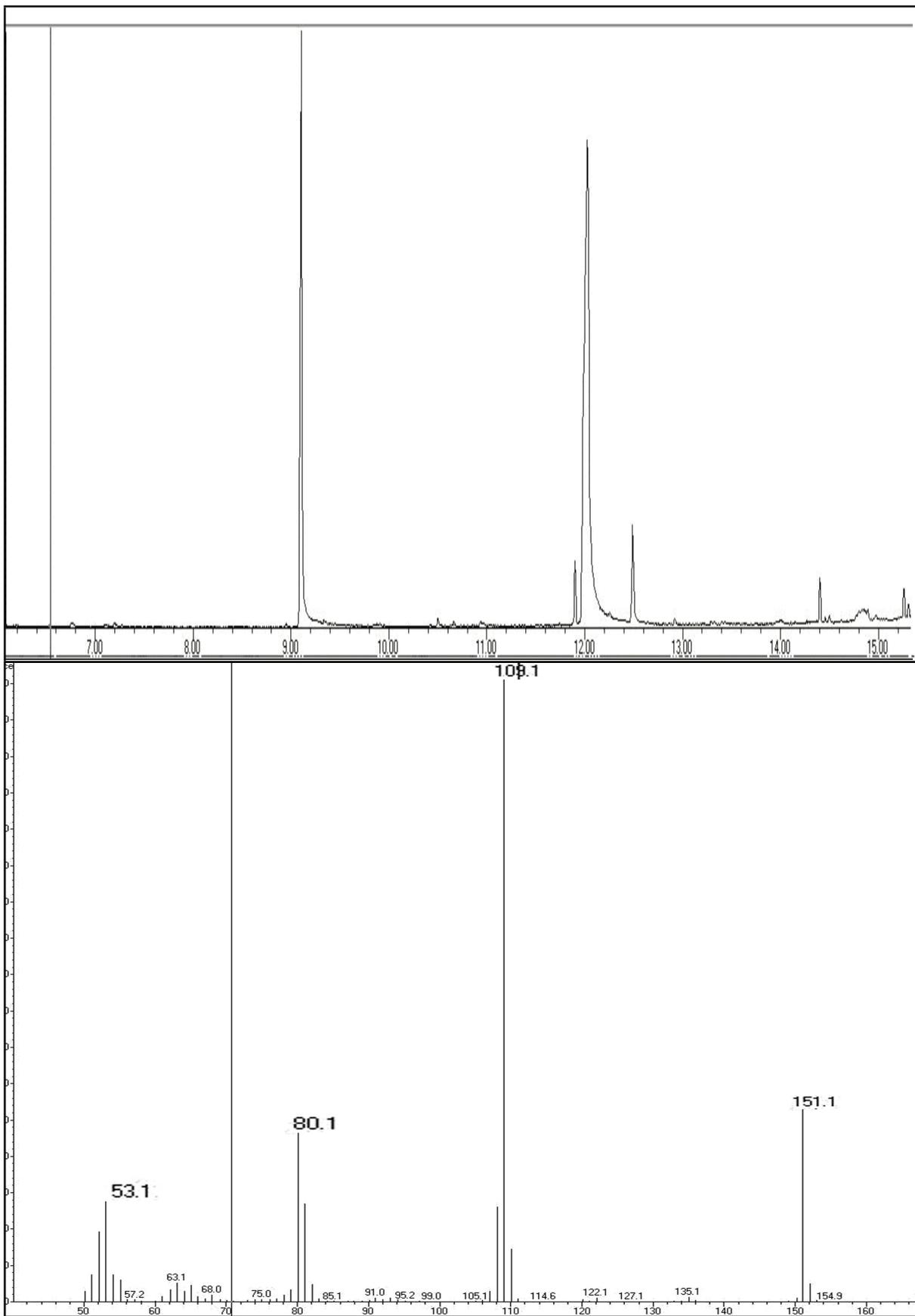


Abb.17: GC-EI-MS-Analyse der Syntheselösung: Total-Ion-Current-Chromatogramm (oben) mit den Signalen für NAPQI (RT=9,1 min) und PCM (RT=12,0 min) sowie EI-Massenspektrum von PCM).

4.1.6 UV/VIS-Spektrometrie

Die UV/VIS-Untersuchung der Syntheselösung zeigte neben dem Absorptionsmaximum bei 263 nm auch eines bei 370 nm (Abb.18). Da das Syntheseprodukt Paracetamol bei dieser Wellenlänge keine Absorption aufweist, konnte hier NAPQI selektiv photometrisch erfasst werden. Nach Zugabe von Ascorbinsäure zeigte sich eine rasche Abnahme der Absorption bei 370 nm, was auf eine Reduktion des chinoiden Systems zurückzuführen war.

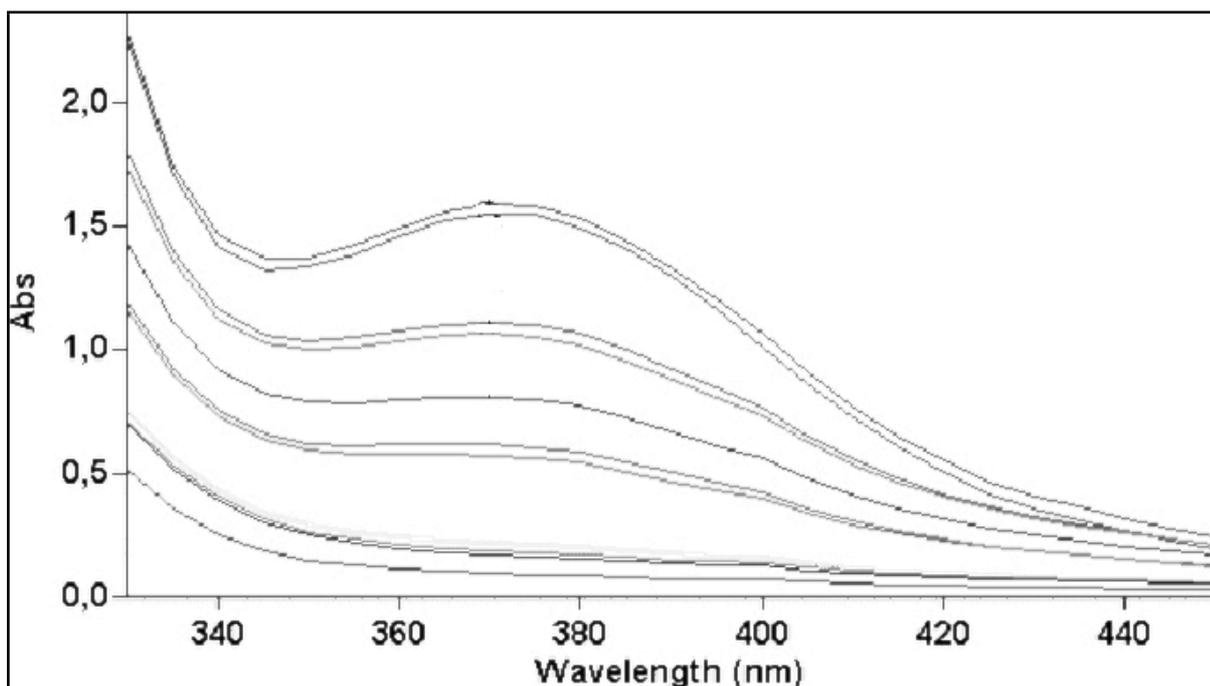


Abb.18: UV/VIS-Absorption der Syntheselösung: Nach Zugabe von Ascorbinsäure kommt es zur Abnahme der Absorption bei 370 nm.

4.1.7 Quantitative Analyse

Die Quantifizierungen mittels HPLC (3.1.8) in fünf Syntheseansätzen (je 200 mg Paracetamol in Toluol) ergaben im Mittel Konzentrationen von 3,3 mg/mL NAPQI, was einer Reaktionsausbeute von durchschnittlich 13% entsprach (Tab.8).

Tab.8: Ergebnisse der NAPQI-Syntheseansätze

Ansatz	NAPQI-Konz [mg/mL]	Volumen [mL]	Ausbeute [%]
1	2,9	4	11,6
2	3,7	4	14,7
3	2,8	4	11,1
4	3,8	4	15,2
5	3,1	4	12,5

4.1.8 Stabilität

Zur Stabilitätsprüfung wurden NAPQI-Lösungen in Toluol, Ethylacetat sowie Citratpuffer (100 mM/pH=7,4) mehrfach hintereinander untersucht. Abb.19 zeigt die Signalintensitäten des NAPQI in Abhängigkeit von der Zeit bei Raumtemperatur in Ethylacetat (GC/MS), Toluol (GC/MS) sowie in Puffer (HPLC).

Somit konnte das NAPQI in Toluol gelöst und bei -20°C in ausreichender Reinheit gelagert werden.

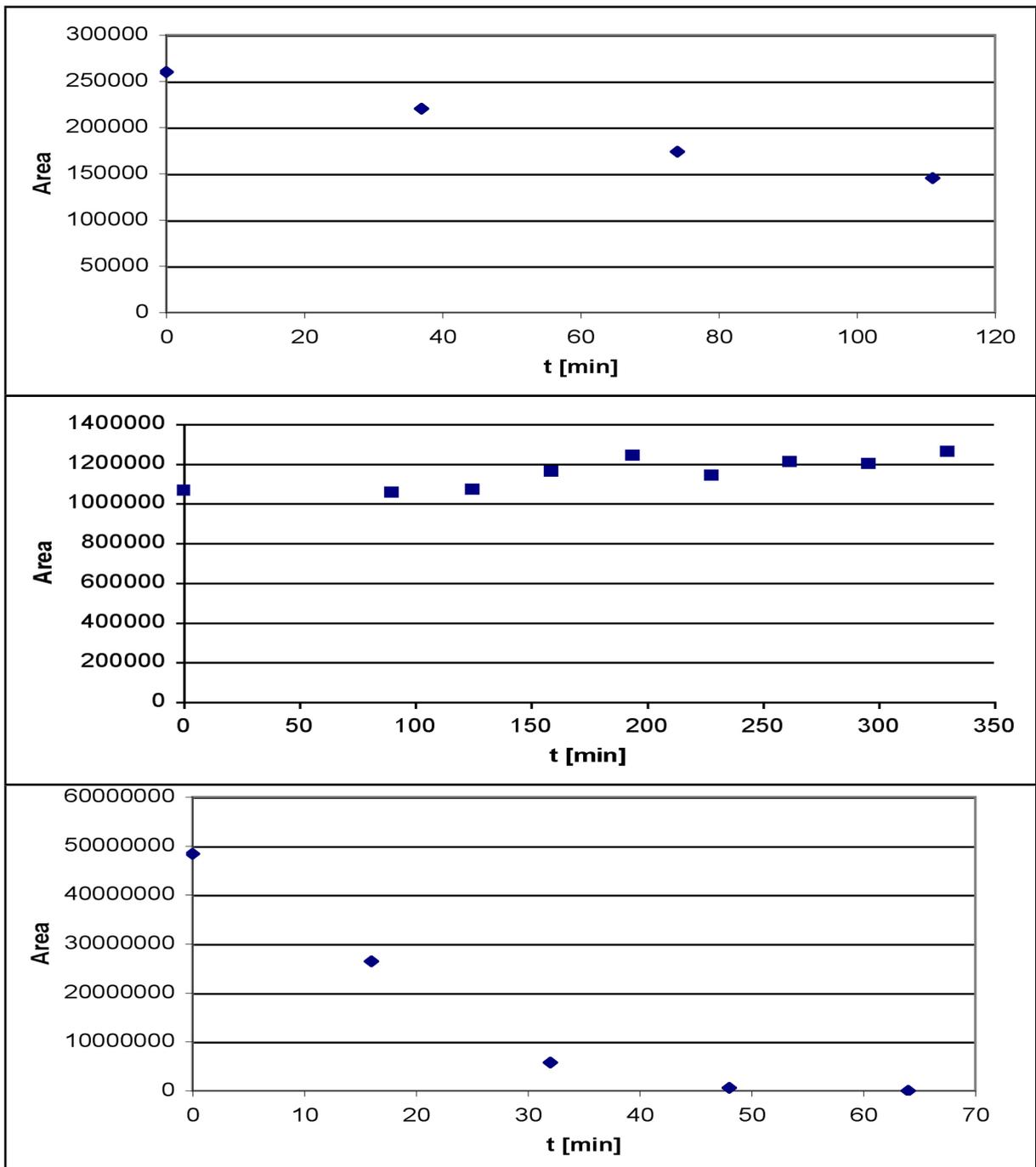
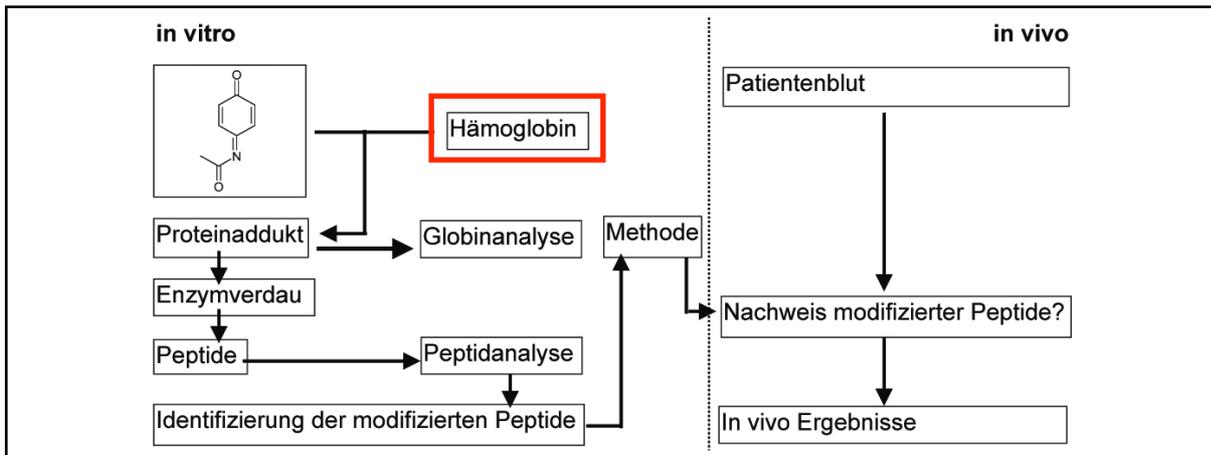


Abb.19: Stabilität von NAPQI in Lösungen von Ethylacetat (oben), Toluol (Mitte) und Citratpuffer 100mM, pH 7,4 (unten)

4.2 Hämoglobin



Die Gewinnung des Hämoglobins aus Blutproben wurde bereits im Methodenteil unter 3.3.1 beschrieben. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Analyse von nativem Hämoglobin (Globintrennung sowie Proteolysen) zusammengefasst.

4.2.1 RP-HPLC

Es wurde zunächst eine Globinkettentrennung mit den im toxikologischen Labor verwendeten HPLC-Standardmaterialien (Trennsäule, Modifier, 3.3.4 (A)) versucht.

Hierbei eluierten die Globinketten als sehr breite Peaks (Peakbasisbreite >10 min). Das Häm war hierbei nicht von den Globinfraktionen getrennt (Abb.20).

Durch Verwendung von Trifluoressigsäure und Abflachung des Acetonitrilgradienten (3.3.4 (B)/(C)) verbesserte sich die Peakform der Globine (Peakbasisbreite < 5 min). Es kam zu einer deutlichen Abtrennung des Häms, jedoch zu keiner chromatographischen Auflösung der Globinketten (Abb.21, oben und Mitte).

Erst durch Austausch der verwendeten RP18-Trennsäule gegen eine C4-Trennsäule mit großer Porenweite (300A) sowie einer sehr starken Verflachung des Acetonitrilgradienten (0,065% Acetonitril/min) konnte schliesslich eine chromatographische Auftrennung der Hämoglobinbestandteile erreicht werden.

Abb.21 (unten) zeigt ein typisches HPLC-UV-Chromatogramm des Hämoglobins mit drei dominierenden Signalen a (13,4%), b (39,6%) und c (41,2%), die zusammen über 94% der gesamten Signalfäche stellen. Daneben finden sich drei kleinere Peaks d (3,0%), e (1,3 %) sowie f (1,5%). Dabei eluierten die Banden b, c, d, e und f im Retentionszeitbereich von 34-46 Minuten, während Bande a eine wesentlich kürzere Retentionszeit (16,2 min) aufwies.

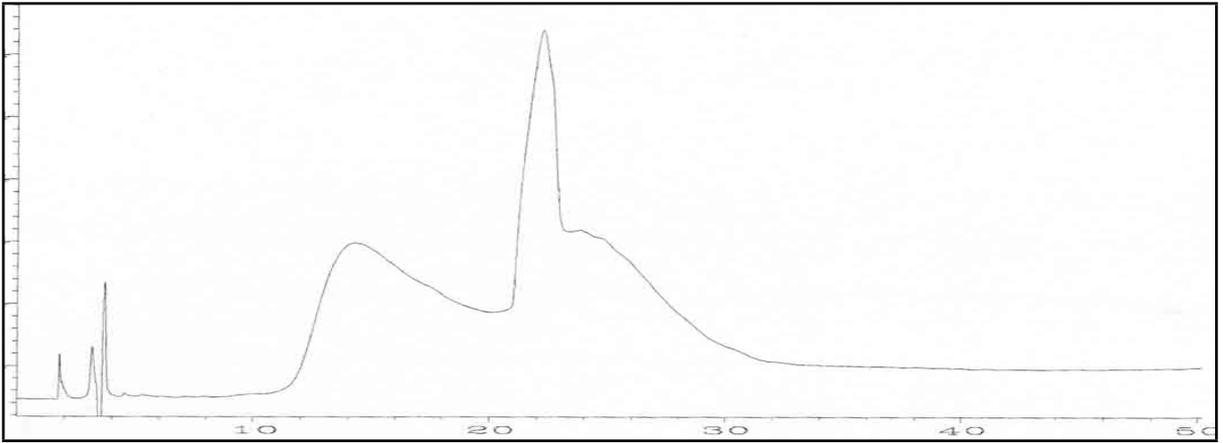


Abb.20: Chromatogramm der HPLC-Hämoglobin-Analyse gemäß 3.3.4 (A)

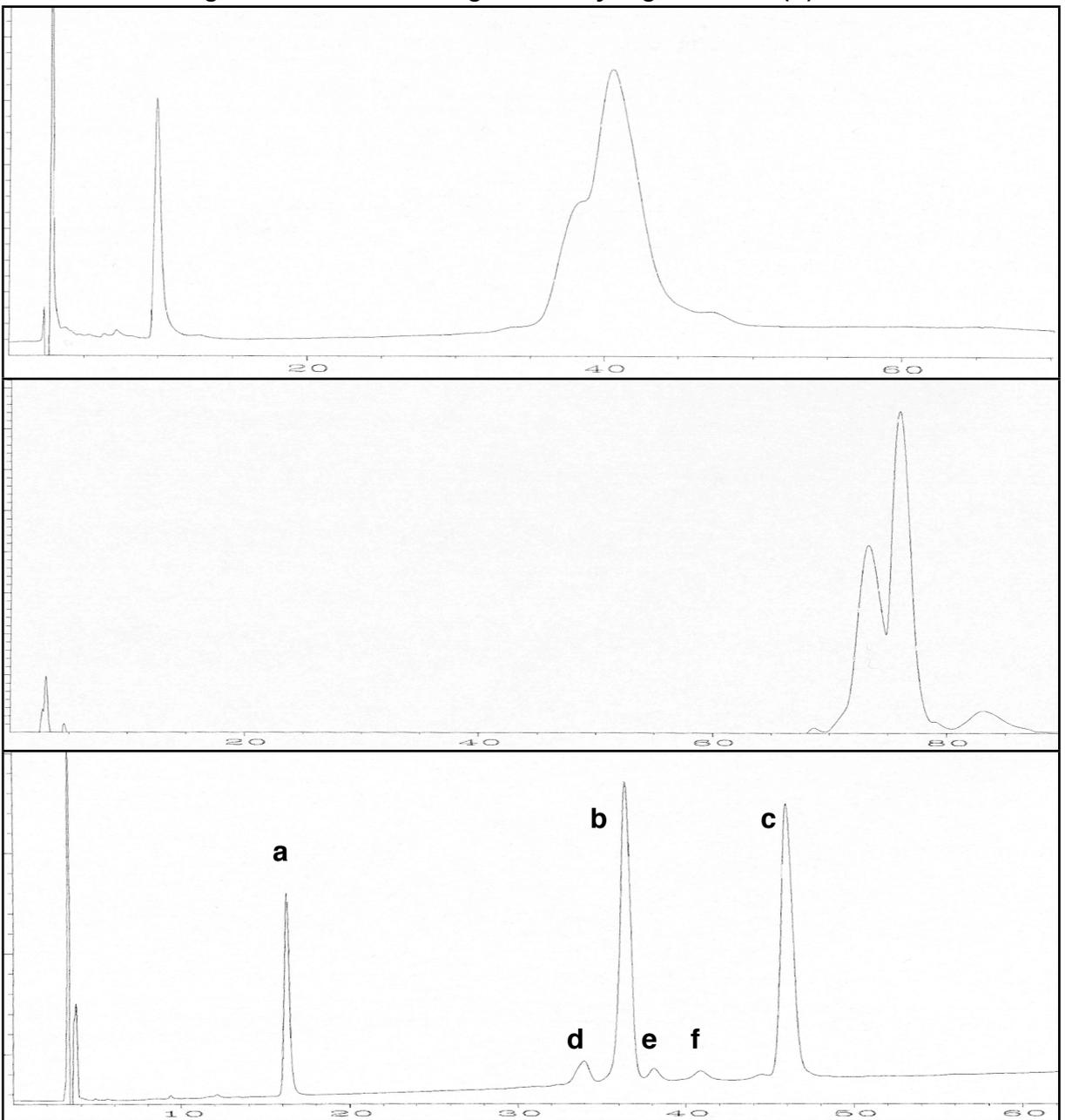


Abb.21: Chromatogramme der HPLC-Hämoglobin-Analysen gemäß 3.3.4 (B) (oben), 3.3.4 (D) (Mitte) sowie 3.3.4 (E) (unten)

4.2.2 LC/MS

Das TIC-Chromatogramm des Hämoglobins (Abb.22) zeigte vier dominierende chromatographische Peaks a,b,c und d.

Das TIC-Signal bei RT=8 Minuten stellte keinen chromatographischen Peak dar (Signalform mit senkrechtem Anstieg), sondern entstammte dem Schaltvorgang des HPLC-Flusses zur Electropray-Quelle.

Etwa 90 Prozent der Signalfäche der chromatographischen Peaks entfielen auf die Signale c (32,8%) sowie d (56,3%), während a (3,9%) sowie b (7,0%) deutlich geringere Anteile ausmachten.

Bei dem früh eluierenden Signal a handelte es sich um eine niedermolekulare Verbindung, die nur ein einzelnes Signal ($m/z = 616,2$) im Elektrospray-Massenspektrum zeigte. Dieses konnte der prosthetischen Gruppe des Hämoglobins („Häm“) zugeordnet werden. Abb.26 zeigt das für a gemessene m/z -Signal (links) sowie das aus der Summenformel $C_{34}H_{32}O_4N_4Fe$ berechnete m/z -Signal (rechts). Es bestand Übereinstimmung hinsichtlich Lage ($\Delta m/z < 0,02$) und Intensitäten der Isotopensignale.

Bei den Fraktionen b, c und d handelte es sich um Proteine (erkennbar am Auftreten vieler mehrfach geladener $[M+xH]^{x+}$ im m/z -Bereich 400-2000). Abb.23 zeigt die gemessenen Massenspektren dieser Signale, Abb.24 deren durch Dekonvolution berechneten Molekülionenpeaks. Die Signale c und d zeigten hierbei homogene Massenspektren, deren $[M+xH]^{x+}$ -Ionen sich durch Dekonvolution auf ein einzelnes Molekülion zurückführen ließen. Als relative Molekülmassen wurden $c = 15865,7$ Da und $d = 15124,3$ Da ermittelt (Abb.23/24 Mitte, unten).

Das Spektrum der Fraktion b war im Gegensatz hierzu nicht homogen, es zeigte zwei unterschiedliche Signalgruppen, die durch Dekonvolution zwei Molekülionen (15863,0 Da/ 16171 Da) mit deutlichem Massenunterschied ($\Delta m = 308$ Da) ergaben (Abb. 23/24, oben).

Das in Abb.25 abgebildete Proteinsignal zeigte ein kleines Signal/Rausch-Verhältnis, was im TIC keinen Peak erzeugte und nur durch Aufsummierung („Average“) der Scans im Retentionszeitbereich 42-44 Minuten erkennbar wurde und eine relative Molekülmasse von 15921,3 Da besaß.

Tab.9 zeigt die Zuordnung der entsprechenden Globinanteile von humanem Hämoglobin A zu den ermittelten Proteinmassen. So ließen sich die beiden intensivsten Signale des TIC-Chromatogramms bei der LC/MS-Analyse den beiden Hauptkomponenten des Hämoglobins, dem α -Globin (d) und β -Globin (c), zuordnen. Dabei ergab die Bestimmung der relativen Molekülmasse aus dem Zentroid der $[M+xH]^{x+}$ -Signale Abweichungen von +1,3 Da bzw. +1,8 Da gegenüber den anhand der Aminosäuresequenz berechneten relativen Molekülmassen. Bei (b) handelte es sich um Glutathionyl- β -Globin ($\Delta M = 1,3$ Da), welches bei der Ionisierung teilweise den Glutathionylrest abspaltete, so dass ein heterogenes $[M+xH]^{x+}$ -Signalmuster entstand (Abb.23, oben). Das δ -Globin, welches im Hämoglobin A zu etwa 2% (HbA2, $\alpha_2\delta_2$)

vorhanden ist, konnte nur durch Spektrenaddition detektiert werden. Aufgrund des schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses ergab sich bei der Dekonvolution eine deutlich grössere Abweichung (2,8 Da) zum berechneten Wert, als bei den übrigen Signalen (Abb.25)

Tab.9: Berechnete und gemessene Molekülmassen der einzelnen Globinketten

Globin	exakte Molekülmasse [Da]	relative Molekülmasse [Da]	Messwert [Da]
α -Globin	15116,8847106	15126,17522	15124,3 (d)
β -Globin	15857,2492884	15867,02336	15865,7 (c)
δ -Globin	15914,2489712	15924,1007	15921,3
Glutathionyl- β -Globin	16162,3174414	16172,33208	16171 (b)

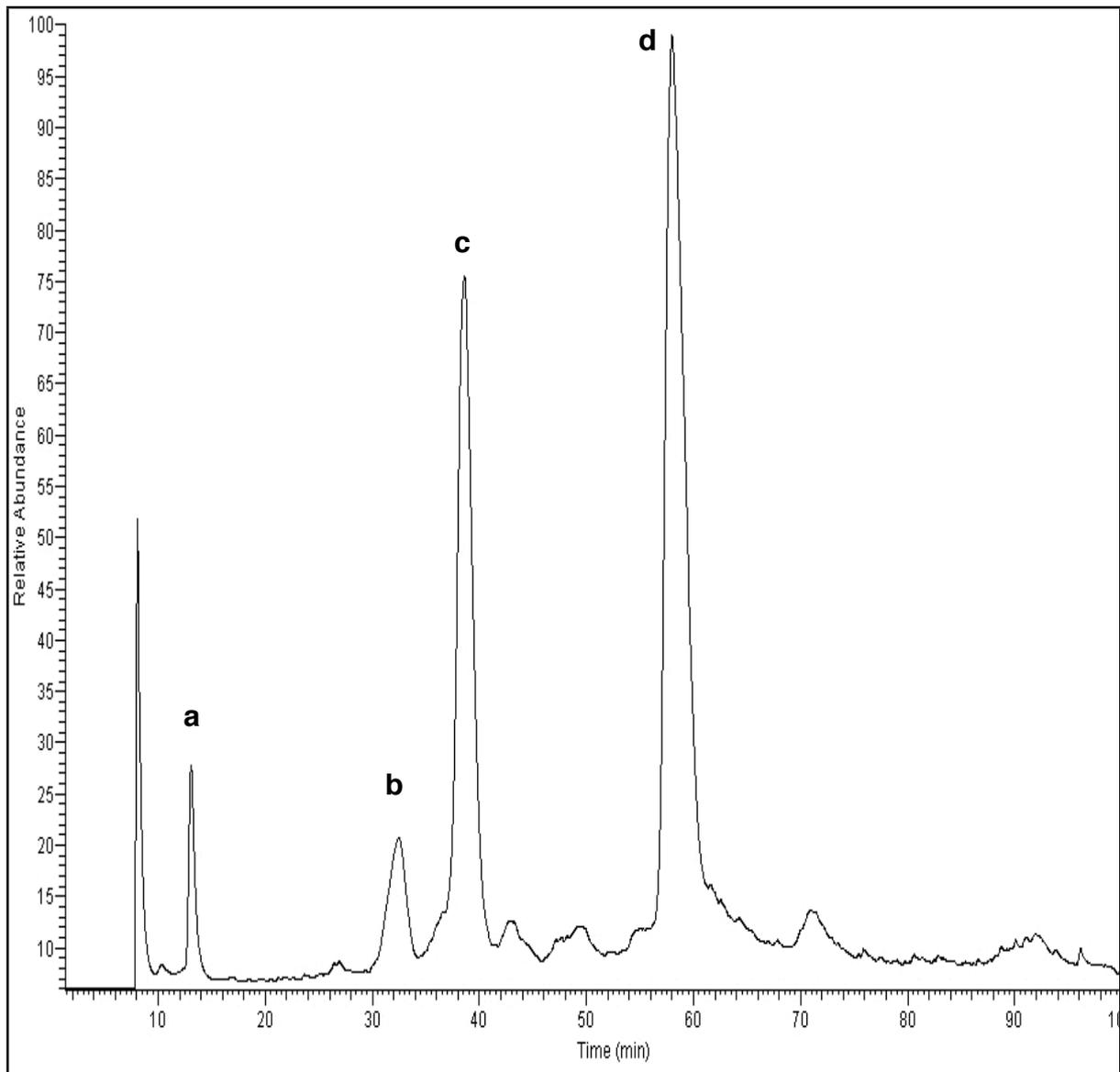


Abb.22: TIC-Chromatogramm der LC/MS-Hämoglobin-Analyse

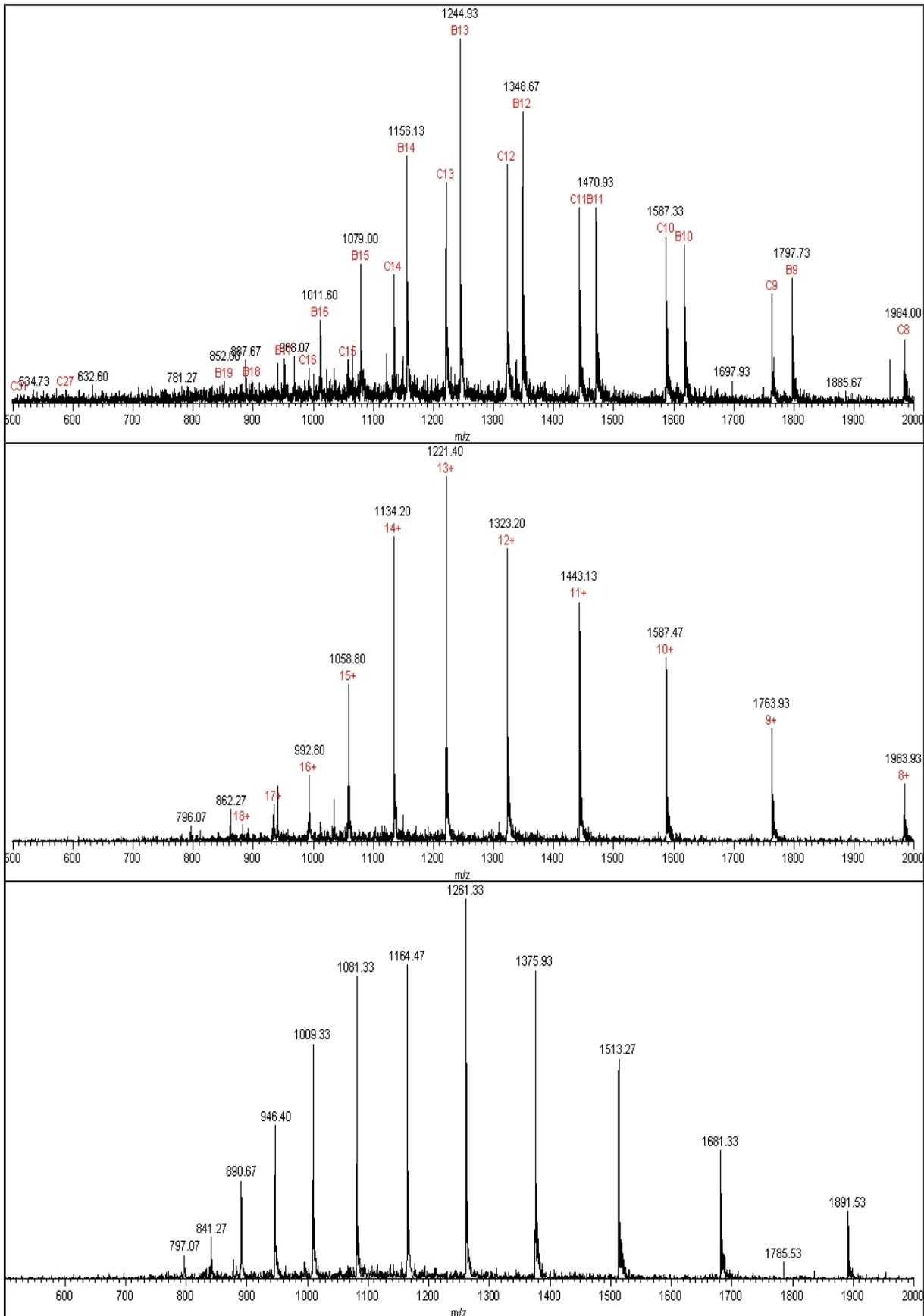


Abb.23: Fullscan-MS-Spektren der Proteinsignale b, c und d (von oben nach unten) des TIC-Chromatogramms (vgl. Abb.22)

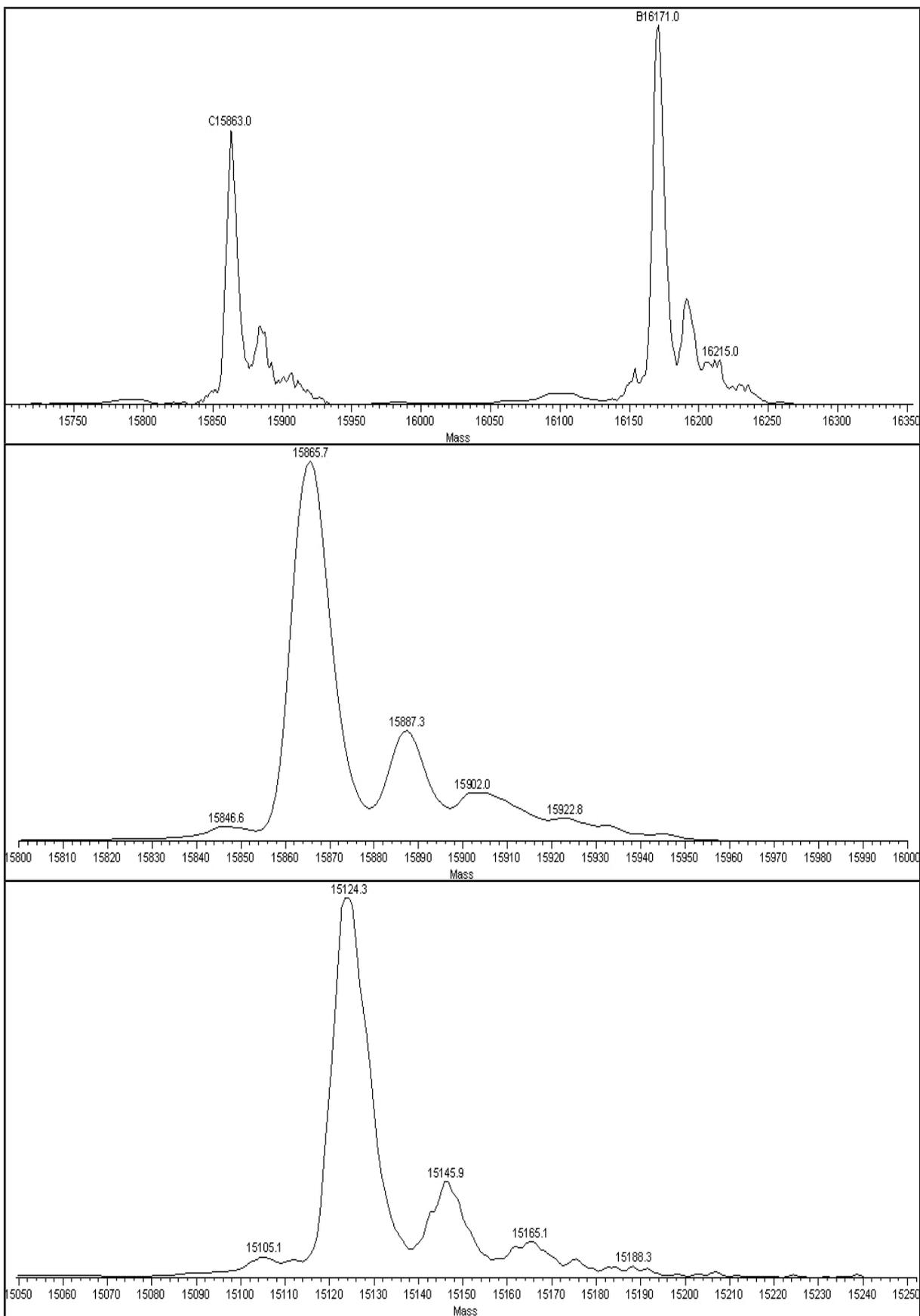


Abb.24: Molekülionenpeaks der Proteinsignale b, c und d (von oben nach unten) nach Dekonvolution der Fullscan-MS-Spektren des TIC-Chromatogramms (vgl. Abb.22/23)

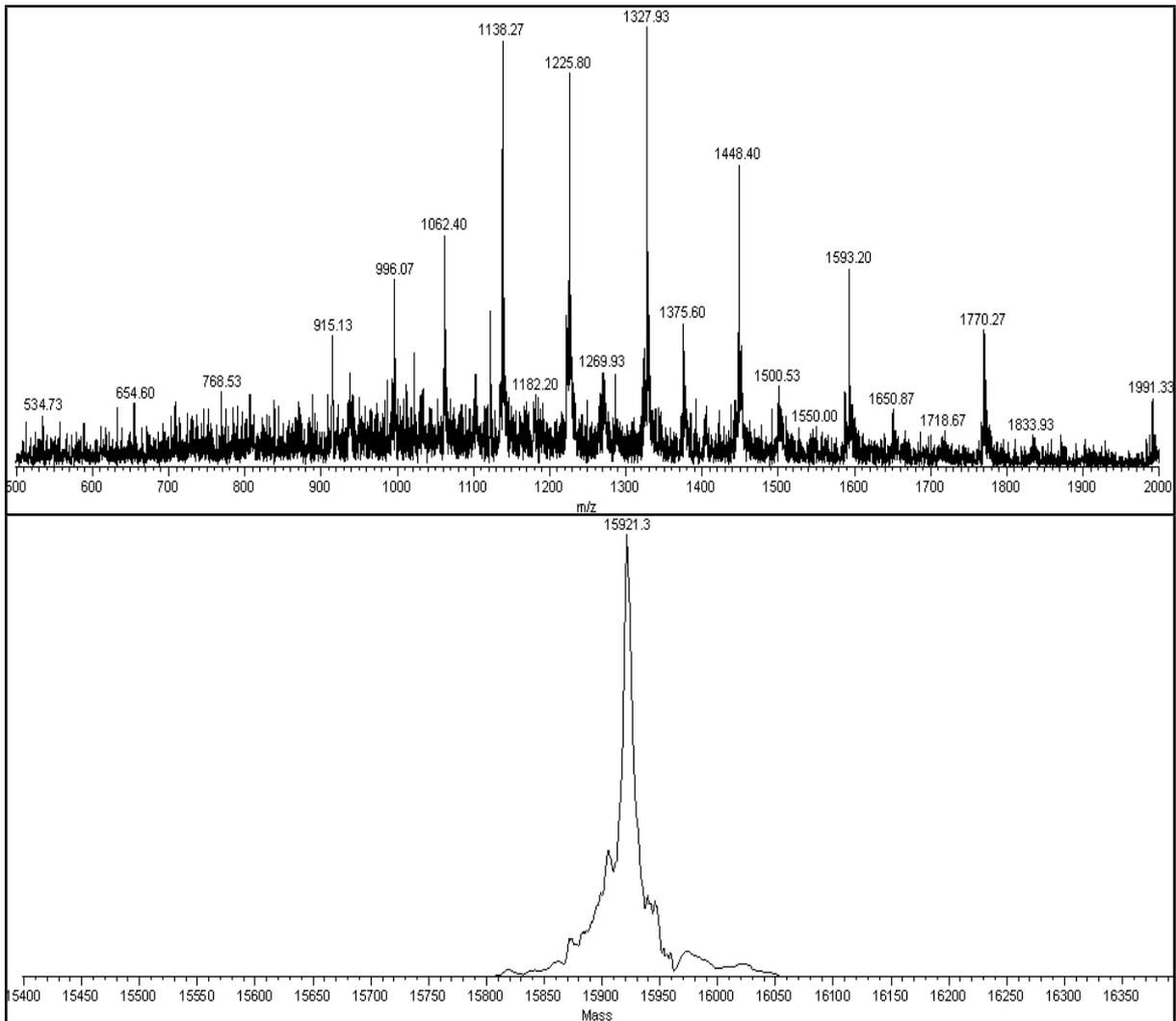


Abb.25: Fullscan-MS-Spektrum nach Spektrenaddition im Retentionszeitbereich 42-44 min (oben) sowie zugehöriger Molekülionenpeak (unten).

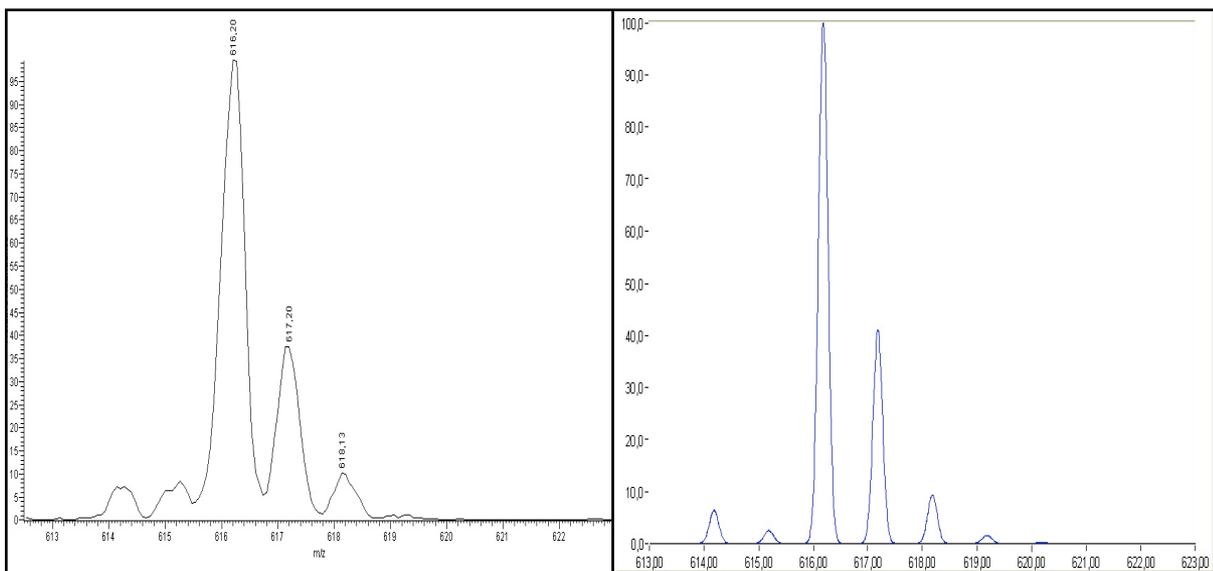


Abb.26: Gemessenes Häm signal a (links, m/z=616,20) sowie theoretische Isotopenpeakverteilung von $C_{34}H_{32}O_4N_4Fe$ (rechts)

4.2.3 Proteolyse

Zur Proteolyse des Hämoglobins wurden drei unterschiedliche Methoden untersucht, zwei enzymatische Verfahren (Trypsin, V8-Protease) sowie eine chemische Hydrolyse mit Ameisensäure.

Hierzu wurden die Hydrolysate mittels LC/MS analysiert und die Molekülmassen der entstandenen Oligopeptide ermittelt. Diese wurden, wenn möglich, mit den aus der Aminosäuresequenz berechneten Peptiden abgeglichen und den entsprechenden Sequenzabschnitten zugeordnet.

Die Ergebnisse sind unter 4.2.3.a-c zusammenfassend aufgeführt, sie zeigen jeweils eine Abbildung des TIC-Chromatogramms der LC/MS-Analyse sowie eine angeschlossene Tabelle. In dieser sind die für die bezeichneten Peptidsignale gemessenen $[M+H]^+$ -Ionen (Spalte 2), sowie der dazu passenden Sequenzabschnitte (Spalte 3) mit ihrer Position (Spalte 4) im jeweiligen Globin aufgeführt. Bei den mit „*“ markierten Peptiden handelt es sich um methylierte Peptide.

Die Berechnung der $[M+H]^+$ -Werte der Hämoglobinpeptide sowie deren Abgleich mit den gemessenen $[M+H]^+$ -Werten wurde mit einem Computerprogramm durchgeführt. Dieses verwendete für die Berechnungen die Aminosäuresequenzen der Globinketten (ohne Varianten), die aus der „Swiss Prot/TrEMBL“-Datenbank entnommen wurden und die in Tab. 10 zusammenfassend aufgeführt sind.

Adultes Hämoglobin besteht dabei fast ausschliesslich aus tetramerem $\alpha_2\beta_2$ (HbA1).

ζ - und ϵ -Globinketten sind Bestandteile der embryonalen Hämoglobine Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$), Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$). Die γ -Globinketten finden sich in fetalem Hämoglobin (HbF, $\alpha_2\gamma_2$) sowie im embryonalen Hämoglobin Portland ($\zeta_2\gamma_2$). Das Hämoglobin $\alpha_2\delta_2$ (HbA2) kommt zu etwa 2,5% im adulten Hämoglobin vor.

Zur Untersuchung der Peptide nach Proteolyse wurden nur die Aminosäuresequenzen von α - und β -Globin berücksichtigt, da diese beiden >97% des gesamten adulten Hämoglobins darstellen, welches zur Adduktbildung *in vitro* verwendet wurde.

Die Addition der Sequenzabschnitte der nachgewiesenen Peptide zeigte, dass bei der Proteolyse mit Trypsin (4.2.3.a) 79% der α -Globinkette und 73% der β -Globinkette wiedergefunden werden konnten. Es fehlten die Sequenzabschnitte $\alpha(100-127)$ sowie $\beta(83-120)$.

Die Analyse der Peptidsequenzen der Ameisensäurehydrolyse ergaben in ihrer Summe die vollständige Aminosäuresequenz des α -Globins während sich nur 79% der β -Globinsequenz wiederfanden. Es fehlte hierbei der Sequenzbereich $\beta(22-51)$.

Die Peptide, die durch V8-Proteasenhydrolyse aus Hämoglobin gewonnen wurden, erlaubten in ihrer Summe schließlich eine vollständige Sequenzwiedergabe von α - und β -Globin und waren somit am besten geeignet, mögliche Modifikationen am Protein zu erfassen.

Tab.10: Aminosäuresequenzen der humanen Globine (Swiss-Prot/TrEMBL-Datenbank)

<p>α-Globin (HbA_human/P69905_01): 141 AS</p> <p>VLSPADKTN VKAAWGKVGGA HAGEYGAEAL ERMFLSFPTT KTYFPHFDLS HGSAQVKGHG KKVADALTNA VAHVDDMPNA LSALSDLHAH KLRVDPVNFK LLSHCLLVTL AAHLPAEFTP AVHASLDKFL ASVSTVLTSK YR</p>
<p>β-Globin (HbB_human/P68871): 146 AS</p> <p>VHLTPEEKS AVTALWGKVN VDEVGGEALG RLLVVYPWTQ RFFESFGDLS TPDVAMGNPK VKAHGKKVLG AFSDGLAHLN NLKGTFFATLS ELHCDKLHVD PENFRLLGNV LVCVLAHHFG KEFTPPVQAA YQKVVAGVAN ALAHKYH</p>
<p>δ-Globin (HbD_human/P02042): 146 AS</p> <p>VHLTPEEKT AVNALWGKVN VDAVGGEALG RLLVVYPWTQ RFFESFGDLS SPDAVMGNPK VKAHGKKVLG AFSDGLAHLN NLKGTFFSGLS ELHCDKLHVD PENFRLLGNV LVCVLARNFG KEFTPQMCAA YQKVVAGVAN ALAHKYH</p>
<p>ϵ-Globin (HbE_human/P02100): 146 AS</p> <p>VHFTAEEKA AVTSLWSKMN VEEAGGEALG RLLVVYPWTQ RFFDSFGNLS SPSAILGNPK VKAHGKKVLT SFGDAIKNMD NLKPAFAKLS ELHCDKLHVD PENFKLLGNV MVIILATHFG KEFTPEVQAA WQKLVSAVAI ALAHKYH</p>
<p>ζ-Globin (HbAZ_human/P02008): 141 AS</p> <p>SLTKTERTI IVSMWAKIST QADTIGTETL ERLFLSHPQT KTYFPHFDLH PGSAQLRAHG SKVVAAVGDA VKSIDDIGGA LSKLSELHAY ILRVDPVNFK LLSHCLLVTL AARFPADFTA EAHAAWDKFL SVVSSVLTEK YR</p>
<p>γ1-Globin (HBG1_human/P69892): 146 AS</p> <p>GHFTEEDKA TITSLWGKVN VEDAGGETLG RLLVVYPWTQ RFFDSFGNLS SASAIMGNPK VKAHGKKVLT SLGDAIKHLD DLKGTFAQLS ELHCDKLHVD PENFKLLGNV LVTVLAIHFG KEFTPEVQAS WQKMVTAVAS ALSSRYH</p>
<p>γ2-Globin (HbG2_human/P69891): 146 AS</p> <p>GHFTEEDKA TITSLWGKVN VEDAGGETLG RLLVVYPWTQ RFFDSFGNLS SASAIMGNPK VKAHGKKVLT SLGDAIKHLD DLKGTFAQLS ELHCDKLHVD PENFKLLGNV LVTVLAIHFG KEFTPEVQAS WQKMVTGVAS ALSSRYH</p>

4.2.3.a Enzymatische Hydrolyse mit Trypsin

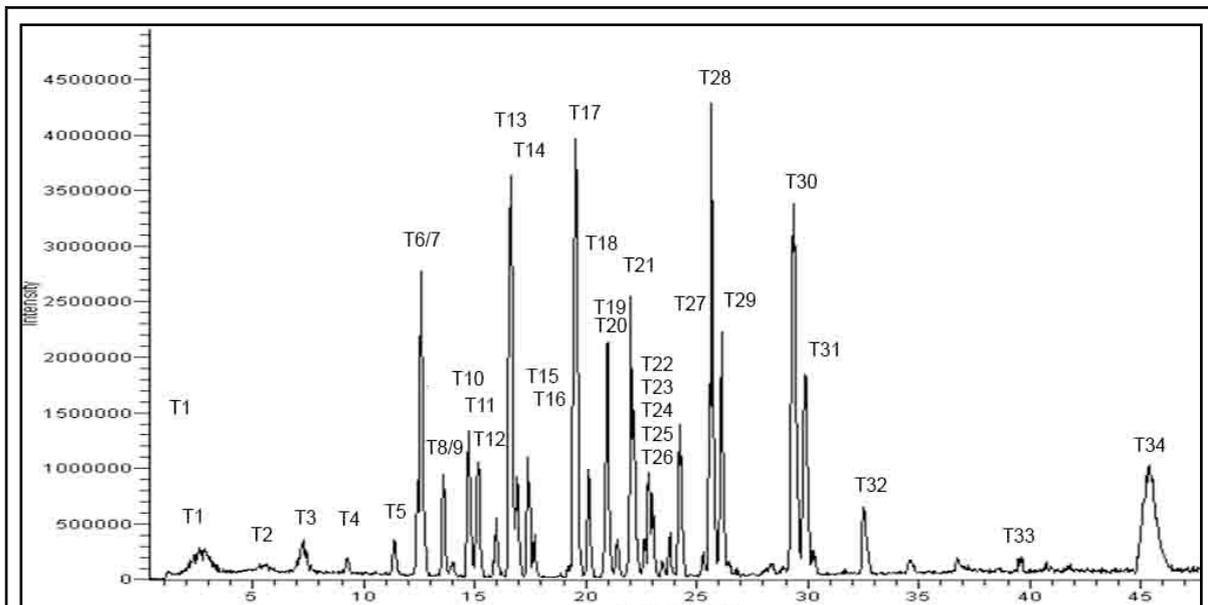


Abb.27: LC/MS-Chromatogramm des Hämoglobins nach Trypsinhydrolyse

Tab.11: Detektierte Peptide des Hämoglobins nach Trypsinhydrolyse

Signal	[M+H] ⁺	Sequenz	Position
T1	952,4	VHLTPEEK	β1-8
T2	1171,5	VLSPADKTNVK	α1-11
T3	966,4	VHLTPEEK*	β1-8
T4	1185,1	VLSPADKTNVK*	α1-11
T5	818,4	VDPVNFK	α93-99
T6	1149,5	VVAGVANALAHK	β133-144
T7	1530,1	VGAHAGEYGAEALER	α17-31
T8	1543,5	VGAHAGEYGAEALER*	α17-31
T9	832,3	VDPVNFK*	α93-99
T10	1449,5	VVAGVANALAHKYH	β133-146
T11	1378,5	EFTPPVQAAYQK	β121-132
T12	1392,2	EFTPPVQAAYQK*	β121-132
T13	1314,5	VNVDEVGGEALGR	β18-30
T14	932,5	SAVTALWGK	β9-17
T15	1328,7	VNVDEVGGEALGR*	β18-30
T16	946,2	SAVTALWGK*	β9-17

Signal	[M+H] ⁺	Sequenz	Position
T17	1834,1	TYFPHFDLSHGSAQVK	α41-56
T18	1848,3	TYFPHFDLSHGSAQVK*	α41-56
T19	1071,2	MFLSFPTTK	α32-40
T20	1085,1	MFLSFPTTK*	α32-40
T21	1274,2	LLVVYPWTQR	β31-40
T22	1798,4	KVLGADFSDGLAHLNLK	β66-82
T23	2561,4	-	
T24	2575,2	-	
T25	2075,3	FFESFGDLSTPDAVMGNPK**	β41-59
T26	1252,7	FLASVSTVLTSK	α128-139
T27	1669,4	VLGADFSDGLAHLNLK	β67-82
T28	2059,1	FFESFGDLSTPDAVMGNPK	β41-59
T29	2072,8	FFESFGDLSTPDAVMGNPK*	β41-59
T30	3126,1	KVADALTNVAHVDDMPNALSALSDDLHAAK	α61-90
T31	2997,7	VADALTNVAHVDDMPNALSALSDDLHAAK	α62-90
T32	616,5	HÄM	
T33	4234,4	LLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSK	α100-139
T34	713,2	-	-

4.2.3.b Chemische Hydrolyse mit Ameisensäure

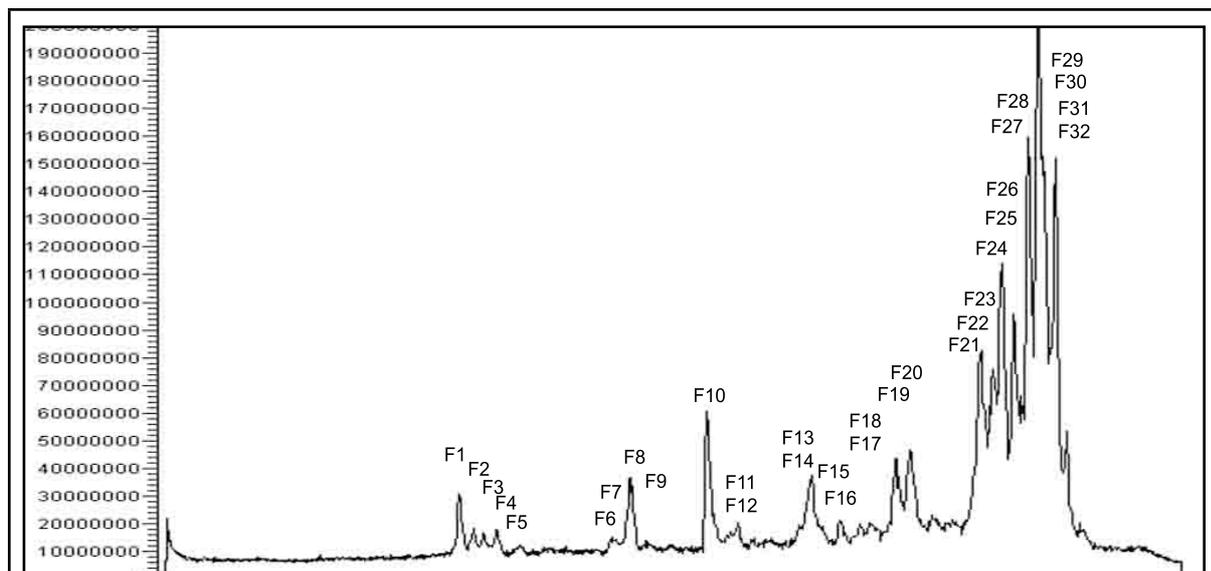


Abb.28: LC/MS-Chromatogramm des Hämoglobins nach Ameisensäurehydrolyse

Tab.12: Detektierte Peptide des Hämoglobins nach Ameisensäurehydrolyse

Signal	[M+H] ⁺	Sequenz	Position
F1	2040,3	(DAVMGNPKVKAHGKKVLGAFSD)-D	(β52-73)-D
F2	1010,7	(ALTNAVAHV)+D	(α64-73)+D
F3	2155,4	DAVMGNPKVKAHGKKVLGAFSD	β52-73
F4	895,2	ALTNAVAHV	α64-73
F5	1107,5	-	
F6	2711,5	LSHGSAQVKGHGKKVAD	α48-63
F7	1055,4	-	
F8	2628,8	-	
F9	2744,5	-	
F10	1700,8	KFLASVSTVLTSKYR	α127-141
F11	1955,8	-	
F12	1648,7	NLKGTFATLSELHCD	(β80-93)+D
F13	1973,8	MPNALSALSDLHAHKLRV	(α76-93)
F14	2088,6	DMPNALSALSDLHAHKLRVD)-D	(α75-94)-D
F15	1533,7	(DNLKGTFATLSELHCD)-D	(β79-94)-D
F16	2126,9	-	
F17	2223,6	-	
F18	2203,3	DMPNALSALSDLHAHKLRVD	α75-94
F19	2088,5	DMPNALSALSDLHAHKLRVD)-D	α75-94
F20	2293,4	VHLTPEEKSAVTALWGKVNVD	β1-21
F21	2178,9	VHLTPEEKSAVTALWGKVVN	β1-10
F22	2733,8	GLAHLNHLKGTFATLSELHCDKLHV	β74-98
F23	6162,1	(DKTNVKAAWGKVG AHAGEYGAEALERMFLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGKKVAD)-D	(α6-64)-D
F24	6276,2	DKTNVKAAWGKVG AHAGEYGAEALERMFLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGKKVAD	α6-64
F25	4460,8	(DKTNVKAAWGKVG AHAGEYGAEALERMFLSFPTTKTYFPHFD)-D	(α6-47)-D
F26	4575,6	DKTNVKAAWGKVG AHAGEYGAEALERMFLSFPTTKTYFPHFD	α6-47
F27	5043,1	VLSPADKTNVKAAWGKVG AHAGEYGAEALERMFLSFPTTKTYFPHF	α1-46
F28	5157,9	VLSPADKTNVKAAWGKVG AHAGEYGAEALERMFLSFPTTKTYFPHFD	α1-47

Signal	[M+H] ⁺	Sequenz	Position
F29	3311,3	(DPVNFKLLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLD)-D	(α94-126)-D
F30	3427,1	DPVNFKLLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLD	α94-126
F31	5157,1	DPENFRLLGNVLVCVLAHHFGKEFTPPVQAAYQKVVAGVANALAHKYH	β99-146
F32	5108	DPVNFKLLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR	α94-141

4.2.3.c Enzymatische Hydrolyse mit V8-Protease

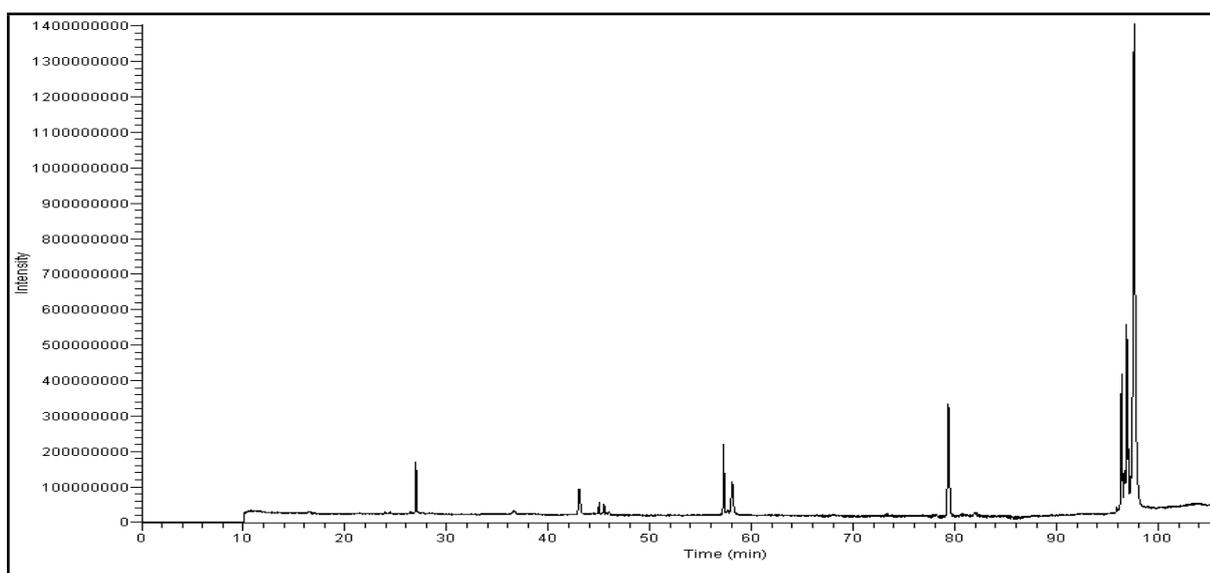


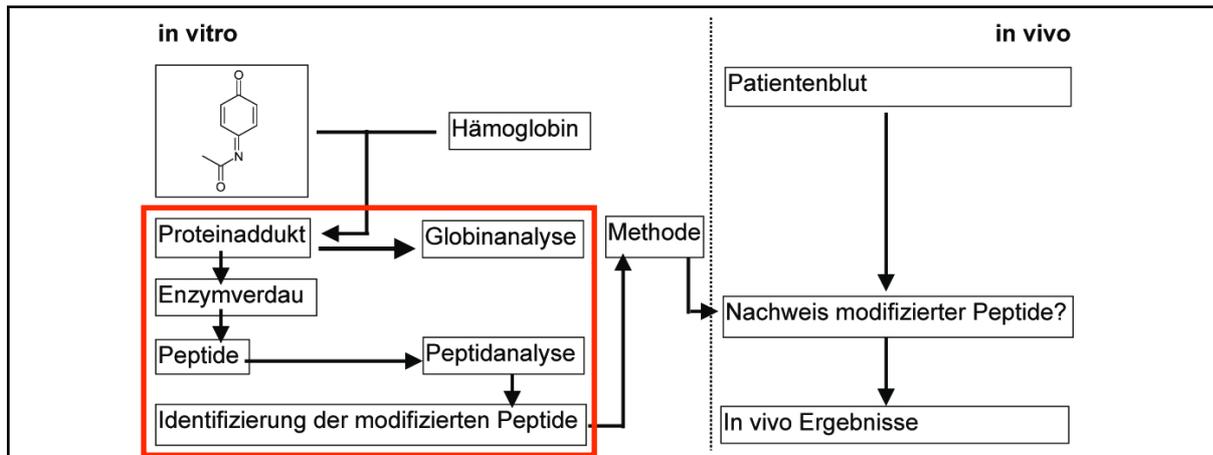
Abb.29: LC/MS-Chromatogramm des Hämoglobins nach Hydrolyse mit V8-Protease

Tab.13: Detektierte Peptide des Hämoglobins nach Hydrolyse mit V8-Protease

Signal	[M+H] ⁺	Sequenz	Position
G1	695,3	VHLTPE	β1-6
G2	1306,5	LHCDKLHVDPE	β91-101
G3	752,3	YGEALE	α24-30
G4	2307,7	VLSPADKTNVKAAWGKVGAHAGE	α1-23
G5	2727,9	VLSPADKTNVKAAWGKVGAHAGEYGAE	α1-27
G6	3041,2	VLSPADKTNVKAAWGKVGAHAGEYGAEAL	α1-30
G7	1701,1	-	
G8	1745,6	EKSAVTALWGKVVNDE	β7-22
G9	4826	(G11- H2O)	
G10	2423	VHLTPEEKSAVTALWGKVVNDE	β1-22

Signal	[M+H] ⁺	Sequenz	Position
G11	4844	SFGDLSTPDAVMGNPKVKAHGKKVLGAFSDGLAHL DNLKGT F ATLSE	β44-90
G12	2136,4	-	
G13	12104,8	RMFLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGKKVADALTNAVAHV DDMPNALSALS DLHAHKL RVPVNFKLLSHCLLVTLAAHLPAEF TPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR	α31-141
G14	4929,9	NFRLLGNVLVCVLAHHFGKEFTPPVQAAYQKVVAGVANALAHK YH	β102-146
G15	2681	F TPPVQAAYQKVVAGVANALAHKYH	β122-141
G16	2096,3	ALGRLLVVYPWTQRFFE	β27-43
G17	2266	NFRLLGNVLVCVLAHHFGKE	β102-121

4.3 Hämoglobin-NAPQI-Addukt



Die Darstellung des Adduktes wurde im Methodenteil unter 3.4.1. beschrieben. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Analyse des Hämoglobin-NAPQI-Addukt zusammengefasst. Diese erfolgte zunächst auf Globinebene (4.3.1 /4.3.2). Nach enzymatischem Verdau erfolgte eine Analyse der entstandenen Peptide (4.3.3 /4.3.4) und schließlich die Identifizierung der durch NAPQI modifizierten Peptide (4.3.5).

4.3.1 RP-HPLC-Globinanalyse des Reaktionsproduktes

Zur Untersuchung des Reaktionsproduktes von Hämoglobin und NAPQI auf Globinebene wurde, wie unter 4.2.1 beschrieben, eine RP-HPLC-Analyse vor (Abb.30, schwarz) und nach der Reaktion (Abb.30, rot, hell) durchgeführt. Es zeigten sich hierbei zunächst keine Veränderungen an den Signalen (a), (b) sowie (d). Im Bereich des Signals (c) war jedoch eine Veränderung in Form einer deutlichen Schulterbildung zu beobachten.

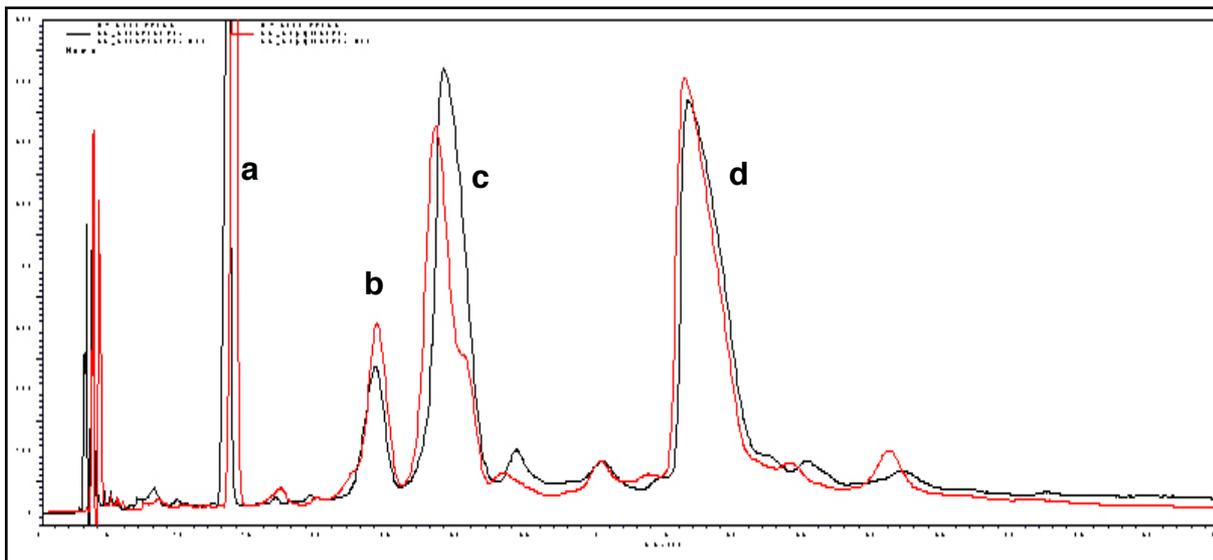


Abb.30: Chromatogramm der HPLC-Analyse von Hämoglobin vor (schwarz, dunkel) und nach (rot, hell) der Inkubation mit NAPQI

4.3.2 Electrospray-MS-Analyse des Reaktionsproduktes

Die Electrospray-Massenspektren des Hämoglobins vor der Reaktion mit NAPQI ergaben nach Dekonvolution der $[M+xH]^{x+}$ -Ionen der Proteinsignale Molekulgewichte von 15127,5 Da für Signal (d), 15866,9 Da für (c) und 15862 / 16171 Da für (b) (Abb.31-33). Nach der Reaktion mit NAPQI konnte an den Signalen a (Häm), b (15862,4 / 16170 Da) und d (15126,6/15127,5 Da) keine Veränderung festgestellt werden, während das Electrospray-Massenspektrum (Abb.33, oben) von (c) nach der Reaktion zwei Signalgruppierungen enthielt, die bei der Dekonvolution zwei Komponenten mit Molekulgewichten von 15867 Da sowie 16016 Da ergaben (Abb.33, unten). Diese unterschieden sich somit um 149 Da, was dem Molekulgewicht eines einzelnen NAPQI entsprach. Somit war klar, dass NAPQI kovalent an die β -Globinbande des Hämoglobins gebunden wurde, das α -Globin (Bande d der HPLC) blieb unverändert.

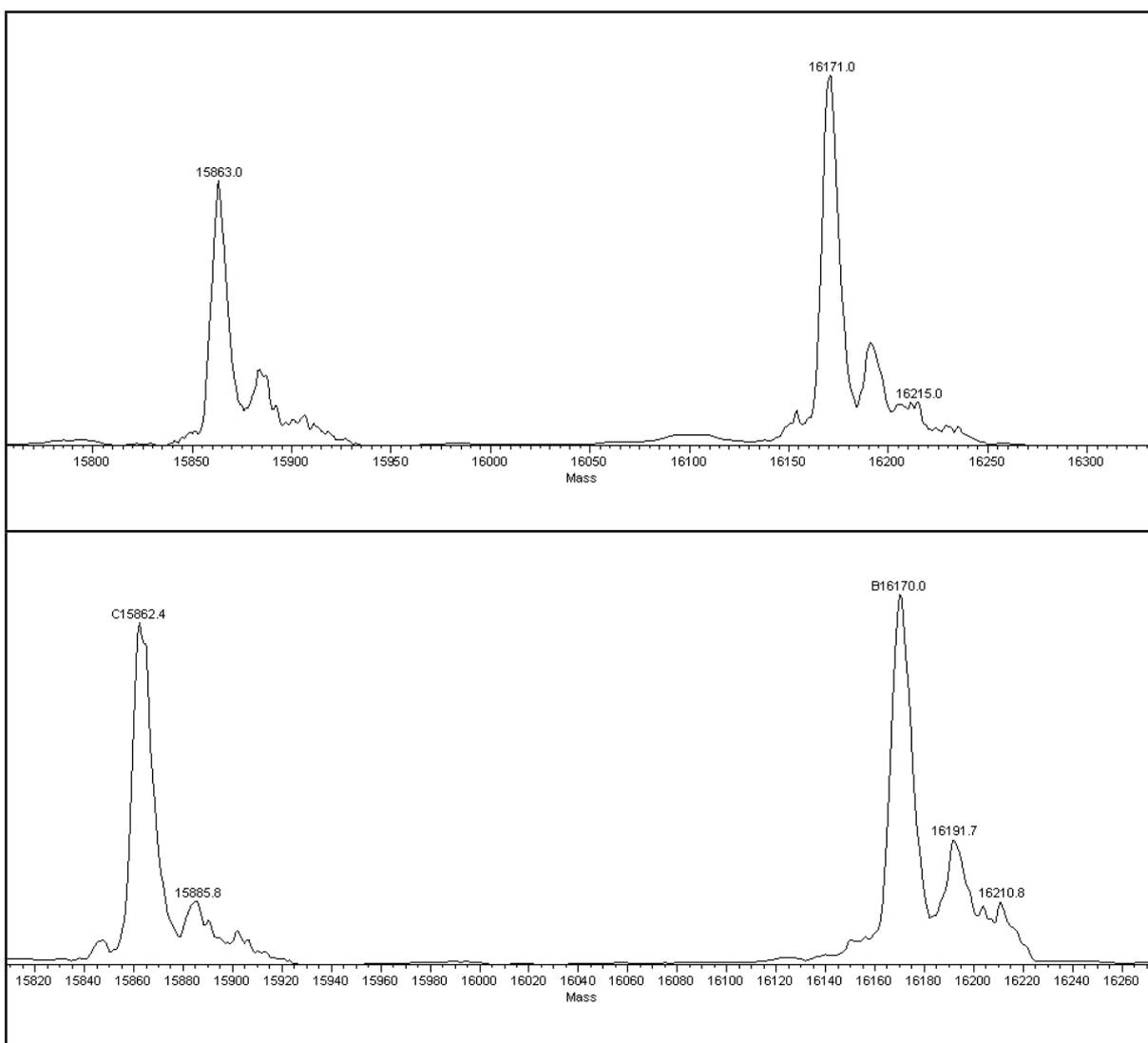


Abb.31: Molekülionenpeaks nach Dekonvolution der Electrospray-Spektren des Signals b vor (oben) sowie nach (unten) der Inkubation mit NAPQI

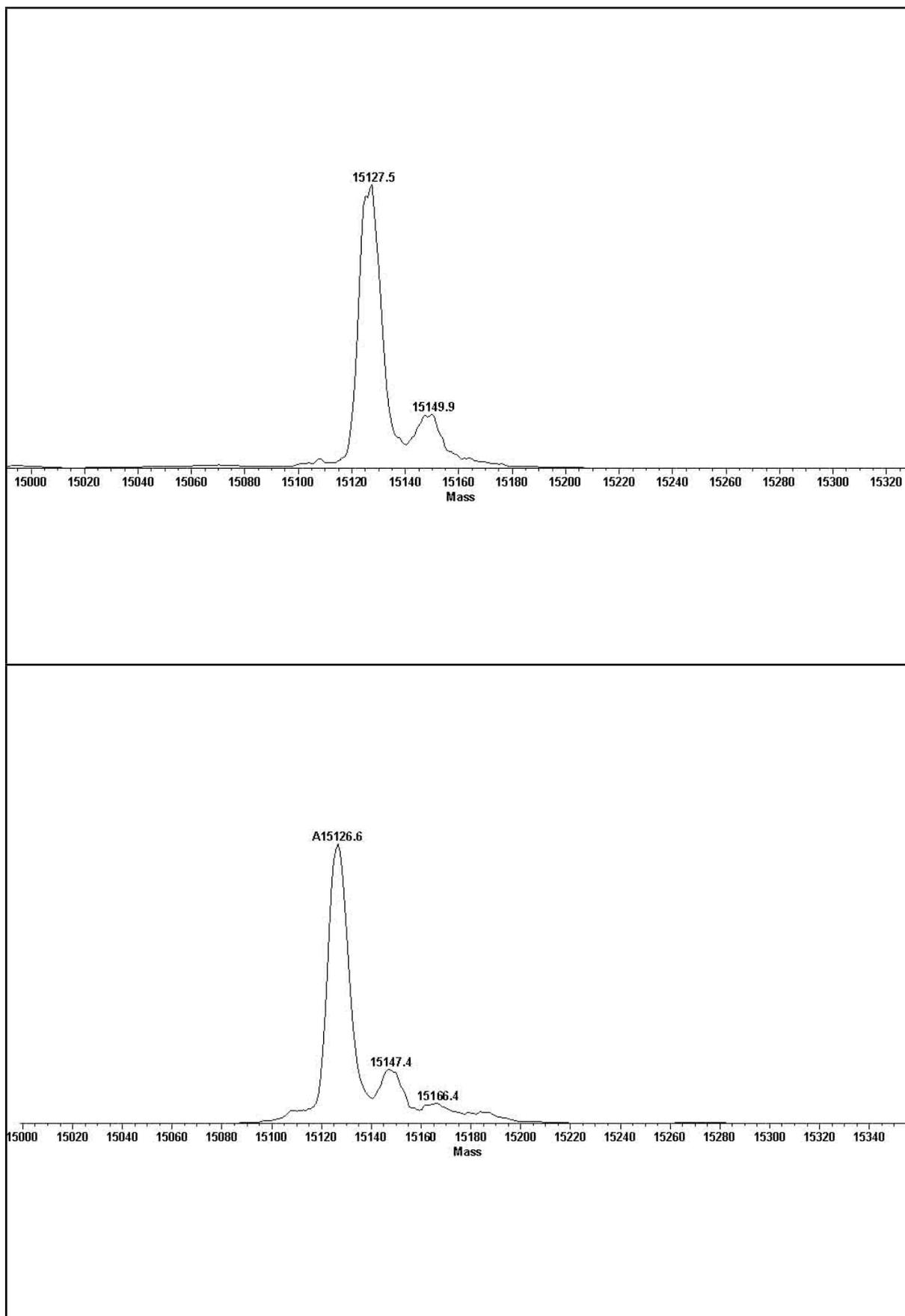


Abb.32: Molekülionenpeaks nach Dekonvolution der Electrospray-Spektren des Signals d vor (oben) sowie nach (unten) der Inkubation mit NAPQI

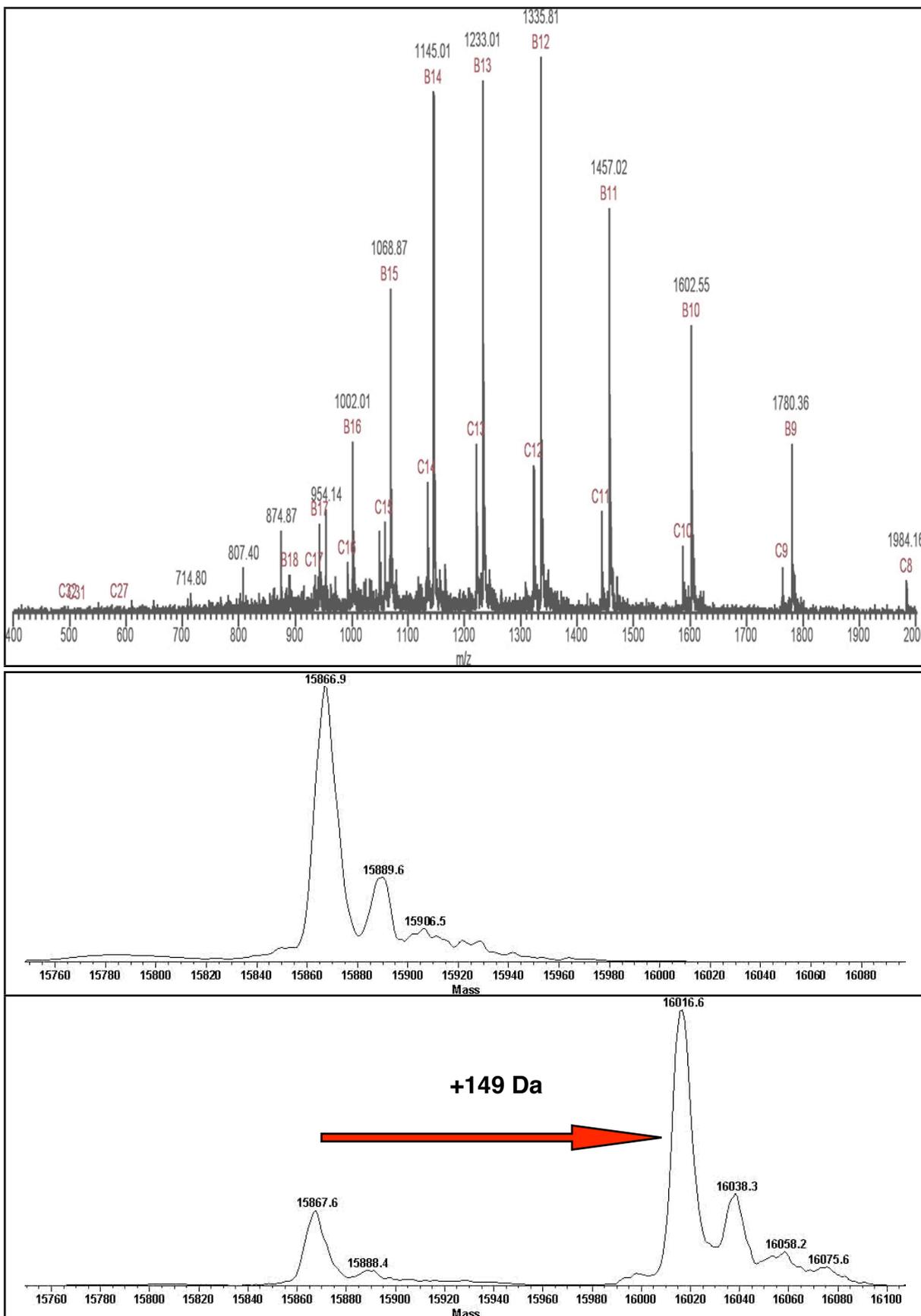


Abb.33: Fullscan-MS-Spektrum des Signals c nach der Inkubation mit NAPQI (oben) sowie Molekülionenpeaks nach Dekonvolution der Electrospray-Spektren des Signals c vor (Mitte) und nach (unten) der Inkubation mit NAPQI

4.3.3 HPLC-Untersuchung des Reaktionsproduktes nach V8-Proteolyse

Zur Lokalisierung der Bindungsstellen des NAPQI innerhalb des Hämoglobins wurde der V8-Proteasenverdau (3.3.4/ 4.2.3.c) des Hämoglobins vor und nach der Reaktion mit NAPQI durchgeführt. Die entstandenen Peptide wurden mittels HPLC (3.3.4) untersucht.

Dabei zeigten die Chromatogramme des Hämoglobins vor (Abb.34 schwarz, dunkel) und nach (Abb.34 rot, hell) der Reaktion mit NAPQI unterschiedliche Signalmuster lediglich im Bereich zwischen 20 und 25 Minuten Retentionszeit (siehe Pfeile in Abb.34).

Dieser Bereich ist in Abb.35 vergrößert dargestellt, wobei zu sehen ist, dass nach der Reaktion mit NAPQI ein zusätzliches Signal bei einer Retentionszeit von 24,3 Minuten entstand, während das Signal des nativen Hämoglobins bei einer Retentionszeit von 22,3 Minuten nach der Reaktion nur noch in geringer Intensität (ca. 16%) vorhanden war. Dabei bestand ein deutlicher Unterschied zwischen den UV-Spektren dieser beiden Signalen, die in Abb.36 übereinanderliegend dargestellt sind. So zeigte das nach der Inkubation mit NAPQI neu entstandene Peptid (RT=24,3 min, oberes Spektrum) zusätzliche Absorptionsmaxima bei 250 und 292 nm gegenüber dem Hämoglobinpeptid vor der Reaktion mit NAPQI (RT=22,3 min, unteres Spektrum). Somit mußte es, sollte ein struktureller Zusammenhang dieser Peptide vorliegen, durch NAPQI zur Einführung eines ausgedehnten Chromophors in das Peptid gekommen sein.

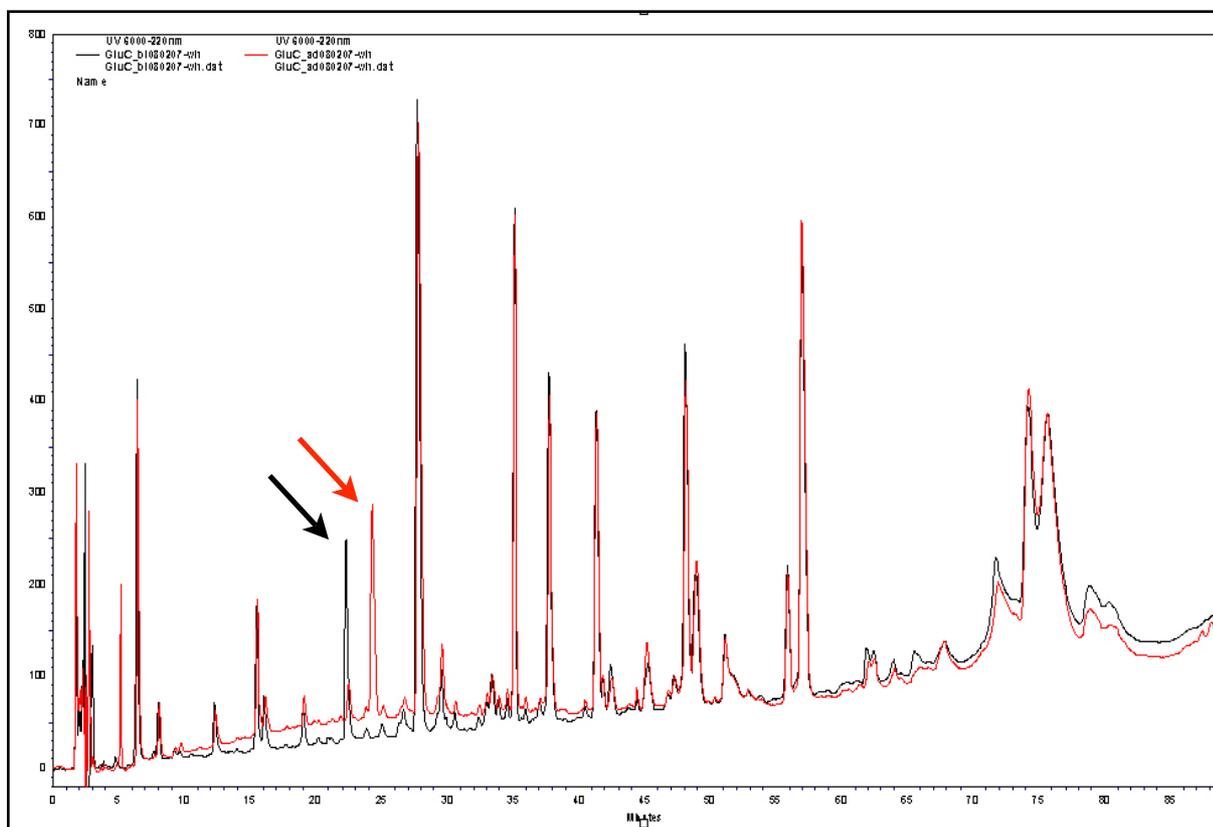


Abb.34: HPLC-Chromatogramme des V8-Proteasenverdaus von Hämoglobin vor (schwarz, dunkel) sowie nach (rot, hell) der Reaktion mit NAPQI

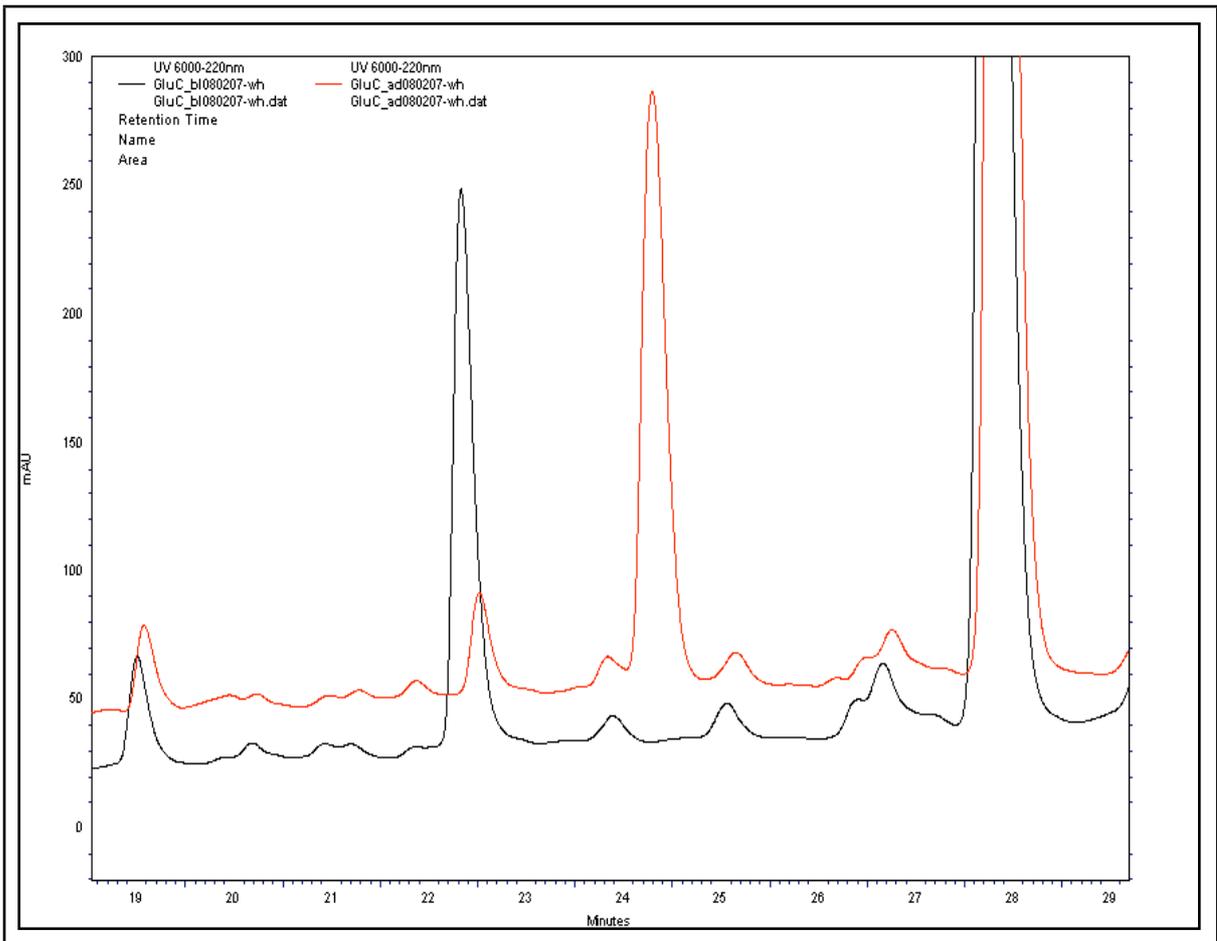


Abb.35: Vergrößerter Ausschnitt der HPLC-Chromatogramme der durch V8-Proteolyse entstandenen Peptide des Hämoglobins vor (schwarz, dunkel) und nach (rot, hell) der Reaktion mit NAPQI

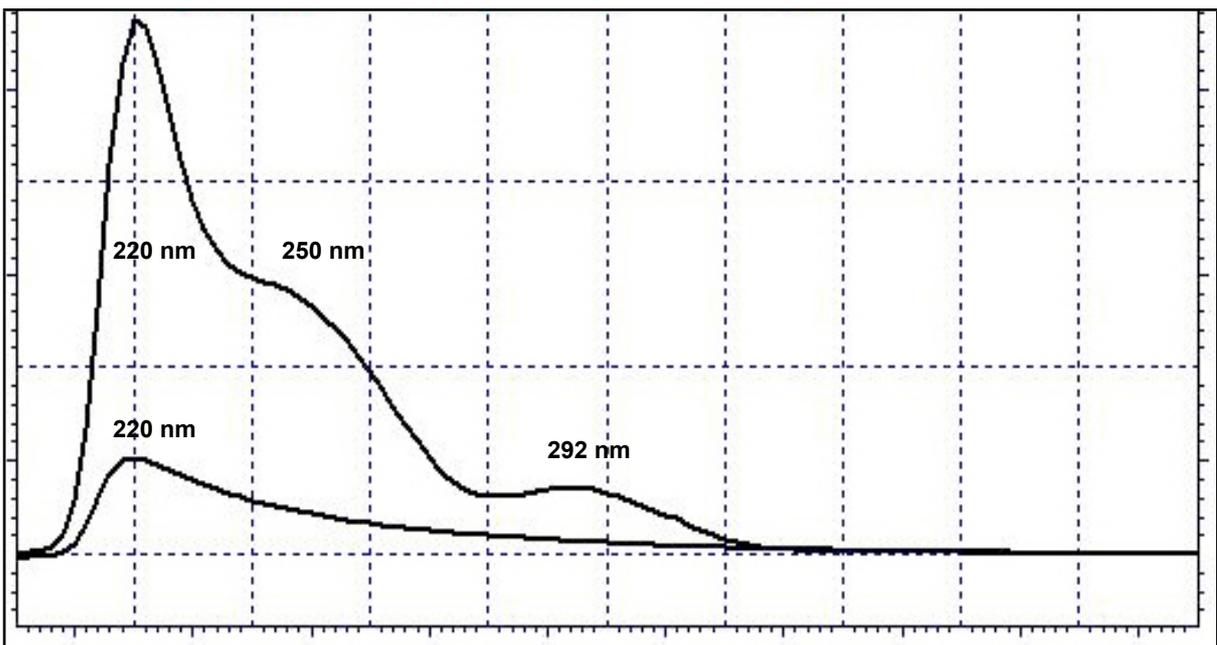


Abb.36: UV-Absorptionsspektren der Hämoglobinpeptide nach Inkubation mit NAPQI und V8-Proteasenverdau bei RT 24,3 min (oben) und RT 22,3 min (unten)

4.3.4 LC/MS-Untersuchung des Reaktionsproduktes nach V8-Proteolyse

Bei der LC/MS-Untersuchung des V8-Proteaseverdaus von Hämoglobin (Abb.37) vor und nach der Reaktion mit NAPQI wurden die $[M+H]^+$ -Ionen aller detektierten Signale verglichen. Dabei waren Abweichungen im Peptidmusters gegenüber den unter 4.2.3.c aufgeführten Ergebnissen zu beobachten, die durch zusätzliche Hydrolysestellen (neben Glu) bedingt waren und bei Verwendung einer neuen Charge V8-Protease auftraten.

In Tab.14 sind die Ergebnisse zusammenfassend dargestellt. Alle $[M+H]^+$ -Ionen des unveränderten Hämoglobins waren auch nach der Reaktion mit NAPQI nachweisbar (mit „+“ in Spalte zwei, Tab.14 gekennzeichnet).

Es zeigte sich jedoch eine Intensitätsminderung des Peptids mit $[M+H]^+ = 1305,4$ (Tab.14, Zeile 8), welches nach der Reaktion nur noch ca. 16% seiner ursprünglichen Signalintensität aufwies. Der Vergleich mit den theoretisch möglichen $[M+H]^+$ -Werten von Hämoglobin-peptiden, basierend auf den Aminosäuresequenzen von α - und β -Globin, ergab nur ein mögliches übereinstimmendes Peptid mit der Sequenz LHCDKLHVDPE. Dieses entsprach den Aminosäuren 91-103 des β -Globins.

Darüber hinaus wurde nach der Inkubation mit NAPQI ein neu entstandenes, im Hämoglobin vor der Inkubation nicht vorhandenes Peptid detektiert (Tab.14, Zeile 10).

Dieses zeigte ein $[M+H]^+$ -Ion von 1454,5 und wies somit einen Massenunterschied von +149 Da gegenüber dem nativen LHCDKLHVDPE-Peptid auf. Abb.38 zeigt die zugehörigen Fullscan-Massenspektren.

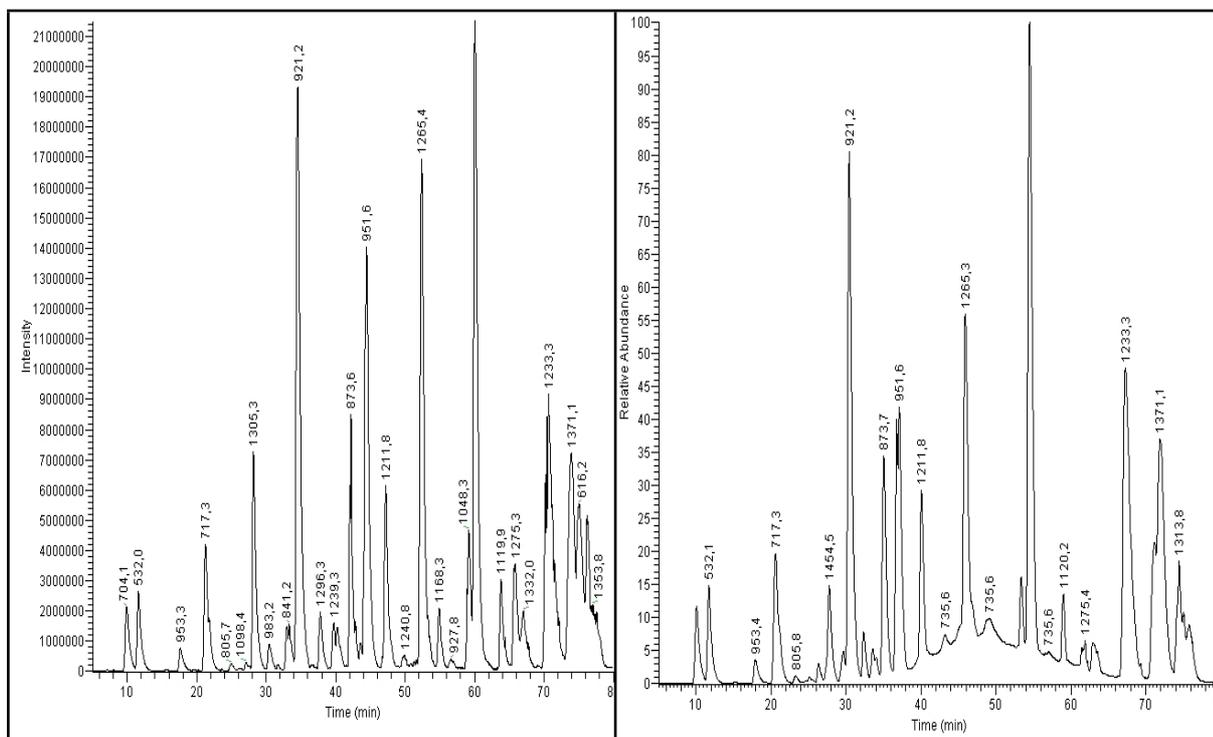


Abb.37: LC/MS-Chromatogramme des V8-Proteasenverdaus von Hämoglobin vor (links) sowie nach (rechts) der Inkubation mit NAPQI

Tab.14: Detektierte Peptide des V8-Proteasenverdaus von Hämoglobin vor (erste Spalte) sowie nach (zweite Spalte) Inkubation mit NAPQI. Nach der Inkubation unverändert detektierte Peptide sind mit „+“ gekennzeichnet, Unterschiede in den Zeilen sind grau gekennzeichnet. Spalte drei gibt eine Zuordnung des Peptids zur Hämoglobinsequenz.

[M+H] ⁺ vor NAPQI-Inkubation	[M+H] ⁺ nach NAPQI-Inkubation	Sequenzzuordnung
704,1	+	AHAGEYG
532	+	AEALE
953,3	+	NALAHKYH
695,2	+	VHLTPE
1123,4	+	VANALAHKYH
1610,4	+	LHC-(GSH)-DKLHVDPE
1076,4	+	- (Keratin?)
1305,4	+ (schwach)	LHCDKLHVDPE
1964,9	+	-
-	1454,5	
1680,8	+	NPKVKAHGKKVLGAFS
1737,8	+	GNPKVKAHGKKVLGAFS
1840,7	+	VLSPADKTNVKAAWGKVG
1296,3	+	SFGDLSTPDAVMG
1239,3	+	SFGDLSTPDAVM
2667,4	+	klein
1745,6	+	EKSAVTALWGKVNVDPE
2959,9	+	SFGDLSTPDAVMGNPKVKAHGKKVLGAFS
1902	+	DGLAHLNLDLKGTFATLSE
2422,6	+	VHLTPEEKS AVTALWGKVN VDE
2528,6	+	VLSPADKTNVKAAWGKVG/AHAGEYG
2135,4	+	
2335,6	+	ALERMFLSFPTTKTYFPHF
2095,6	+	
2437,8	+	VGGEALG RLLVVPWTQ RFFE
3357	+	

[M+H] ⁺ vor NAPQI-Inkubation	[M+H] ⁺ nach NAPQI-Inkubation	Sequenzzuordnung
3824	+	NFRL LGNV LVCVLAHHFG KEFTPPVQAA YQKVVAG
3994,3	+	NFRL LGNV LVCVLAHHFG KEFTPPVQAA YQKVVAGVA
4929	+	NFRL LGNV LVCVLAHHFG KEFTPPVQAA YQKVVAGVAN ALAHKYH
616,2	+	Heme
9591,8	+	
6564,2	+	
6764	+	
7644,5	+	
84002	+	

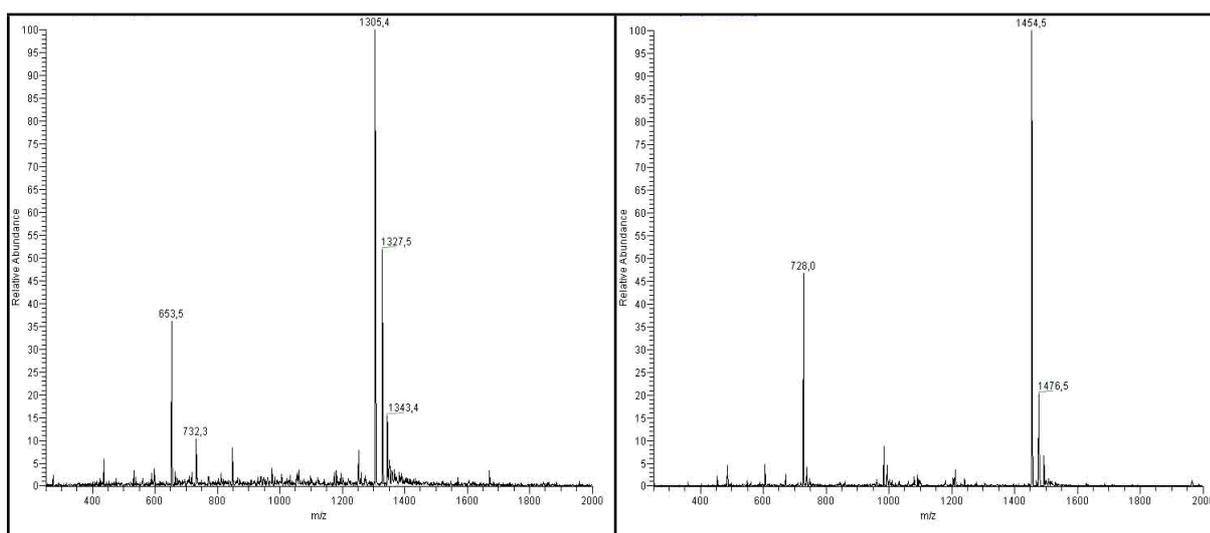


Abb.38: Fullscan-MS-Spektren des nativen, nach der Inkubation mit NAPQI in reduzierter Intensität detektierten Hämoglobinpeptids [M+H]⁺=1305,5 (links), sowie des nach der Inkubation mit NAPQI neu entstandenen Peptids [M+H]⁺=1454,5 (rechts).

4.3.5 LC/MS/MS-Untersuchung des Reaktionsproduktes nach V8-Proteolyse

Zur Identifizierung der Peptide [M+H]⁺=1305,4 sowie 1454,5 und zur weiteren Lokalisierung der Bindungsstellen wurden Tochterionen-Massenspektren aufgenommen (Abb.39).

Das Tochterionenenspektrum des [M+H]⁺=1454,5-Peptids zeigte teilweise identische Fragmentationen wie das des [M+H]⁺=1305,4-Peptids, die in Tab.15 mit schwarzen (dunklen) Pfeilen markiert sind. Hierbei handelte es sich um die Ionen b₂, y₂, y₃, y₄, y₅, y₆, y₇ und y₈, deren jeweilige Aminosäurezusammensetzung in Spalte 3 bzw. 4 der Tab.15 aufgeführt sind. Daneben fanden sich Fragmentationen des [M+H]⁺=1454,5-Peptids, die sich wie der Precursor um 149 Da von den Fragmentationen des [M+H]⁺=1305,4-Peptids unterschieden, jedoch

gleiche m/z -Abstände und damit gleiche Aminosäuresequenz besaßen. Diese sind in Tab.15 mit roten (hellen) Pfeilen markiert, es handelte sich um b3, b4, b5, b6, b7, b8, b9, y9 und y11. Anhand der Aminosäurereste (Spalte 3/4, Tab.15) ist zu erkennen, dass alle um 149 Da veränderte Fragmentationen das Cystein 93 enthielten, während alle Fragmentationen, die das Cystein 93 nicht enthielten, unveränderte Massen aufwiesen. Somit war die Modifikation am Cystein 93 erfolgt, so dass es sich bei dem nach Inkubation von Hämoglobin mit NAPQI neu gebildeten $[M+H]^+ = 1454,5$ -Peptid um das Peptid LH(C+NAPQI)DKLHVDPE handelte.

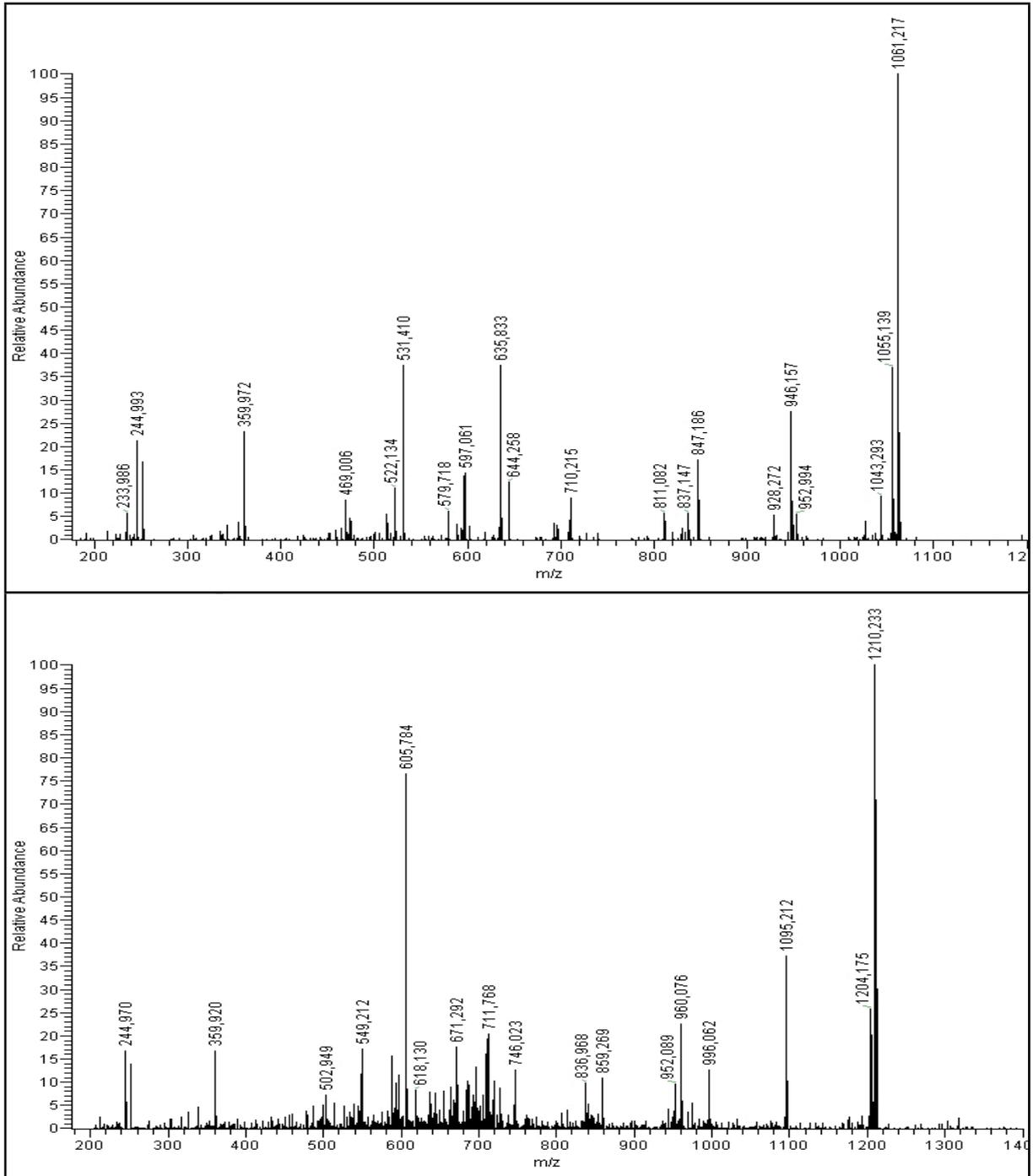


Abb.39: Tochterionen-Massenspektren der Precursorionen $m/z= 1305,5$ (oben) sowie $m/z= 1454,5$ (unten).

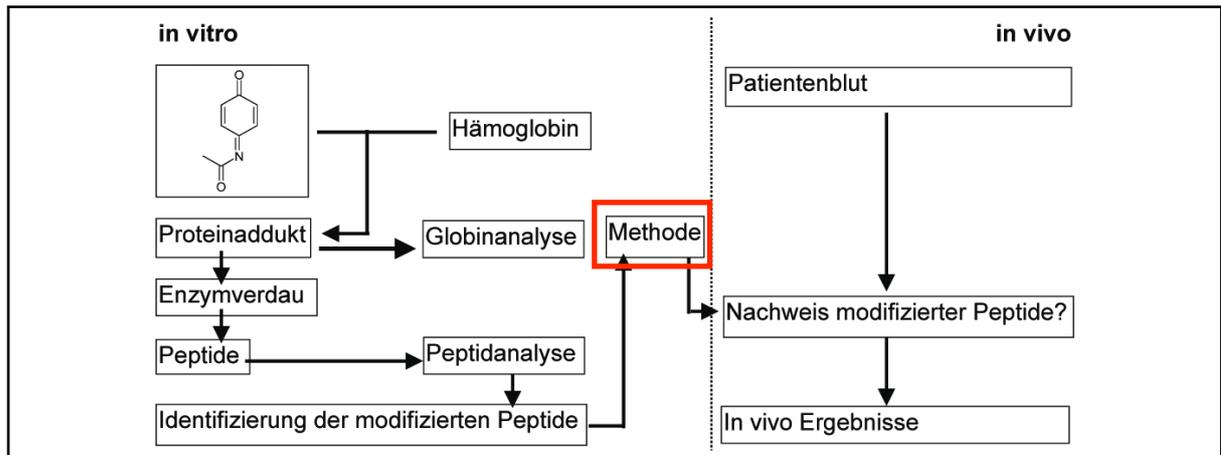
Tab.15: Gegenüberstellung und Interpretation der Fragmentationen des Hämoglobinpeptides $[M+H]^+=1305,5$ (oben), sowie des nach der Inkubation mit NAPQI neu entstandenen Peptids $[M+H]^+=1454,5$ (unten).

b-Ion	m/z	Aminosäuren	Aminosäuren	m/z	y-Ion
b1		L	LHCDKLHVDPE	1305,63	y11
b2	251,15	LH	HCDKLHVDPE		y10
b3	354,16	LHC	CDKLHVDPE	1055,48	y9
b4	469,19	LHCD	DKLHCDPE	952,47	y8
b5	597,28	LHCDK	KLHVDPE	837,45	y7
b6	710,37	LHCDKL	LHVDPE	709,35	y6
b7	847,42	LHCDKLH	HVDPE	596,27	y5
b8	946,49	LHCDKLHV	VDPE	459,21	y4
b9	1061,52	LHCDKLHVD	DPE	360,14	y3
b10		LHCDKLHVDP	PE	245,11	y2
b11		LHCDKLHVDPE	E		y1

b-Ion	m/z	Aminosäuren	Aminosäuren	m/z	y-Ion
b1		L	LHCDKLHVDPE	1454,5	y11
b2	251,15	LH	HCDKLHVDPE		y10
b3	503,01	LHC	CDKLHVDPE	1204,14	y9
b4	617,99	LHCD	DKLHCDPE	952,47	y8
b5	746,06	LHCDK	KLHVDPE	837,45	y7
b6	859,23	LHCDKL	LHVDPE	709,35	y6
b7	995,92	LHCDKLH	HVDPE	596,27	y5
b8	1095,08	LHCDKLHV	VDPE	459,21	y4
b9	1210,21	LHCDKLHVD	DPE	360,14	y3
b10		LHCDKLHVDP	PE	245,11	y2
b11		LHCDKLHVDPE	E		y1

Diagramm zur Gegenüberstellung der Fragmentationen: Rote Pfeile markieren die Verschiebung der b-Ionen um +149 m/z (z.B. von 251,15 auf 503,01). Schwarze Pfeile markieren die Verschiebung der y-Ionen um +149 m/z (z.B. von 360,14 auf 509,33).

4.4 Methodenoptimierung



Um bei der Analyse der Blutproben hinsichtlich der Qualität und Empfindlichkeit zu optimalen Ergebnissen zu kommen, soll im Folgenden ein Abschnitt über durchgeführte Optimierungen der Versuchs- und Analysenbedingungen eingeschoben werden.

4.4.1 Probenvorbereitung

4.4.1.a Optimierung der Inkubationszeit

Die V8-Protease zeigte eine schnelle Proteolyse des Hämoglobins (Abb.40, links), nach 5 Stunden waren keine intakten Globinketten mehr im Ansatz nachweisbar. Ebenfalls nach 5 Stunden erreichte die Intensität des Peptids LHCDKLHVDPE (Abb.40, rechts) ein Maximum, nach 9 Stunden war eine deutliche Abnahme zu beobachten. Deshalb wurde eine Inkubationszeit von 5 Stunden für die Untersuchungsmethode gewählt.

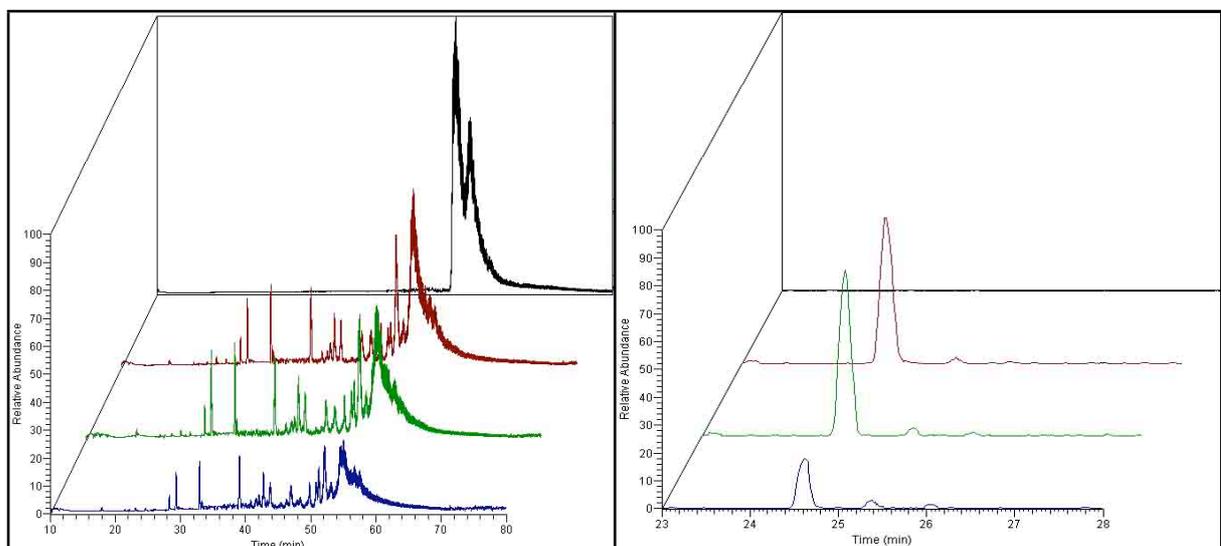


Abb.40: LC/MS-Chromatogramme (links TIC, rechts SIM m/z 1305,5) des Hämoglobins nach Hydrolyse mit V8-Protease nach 0, 3, 5 und 9 Stunden Inkubationszeit (von hinten nach vorne)

4.4.1.b Optimierung des Enzym-Substrat-Verhältnisses

Es zeigte sich, bei konstanter Inkubationszeit von 5h, eine deutliche Abhängigkeit des Hämoglobinabbaus von der Enzymkonzentration (Abb.41, links). Ebenso führte der Zusatz einer grösseren Enzymmenge zu einer Erhöhung der Ausbeute des LHCDKLHVDPE-Peptides (Abb.41, rechts). Deshalb wurden für die Untersuchungsmethode fünf Prozent V8-Protease zur Proteolyse des Hämoglobins verwendet.

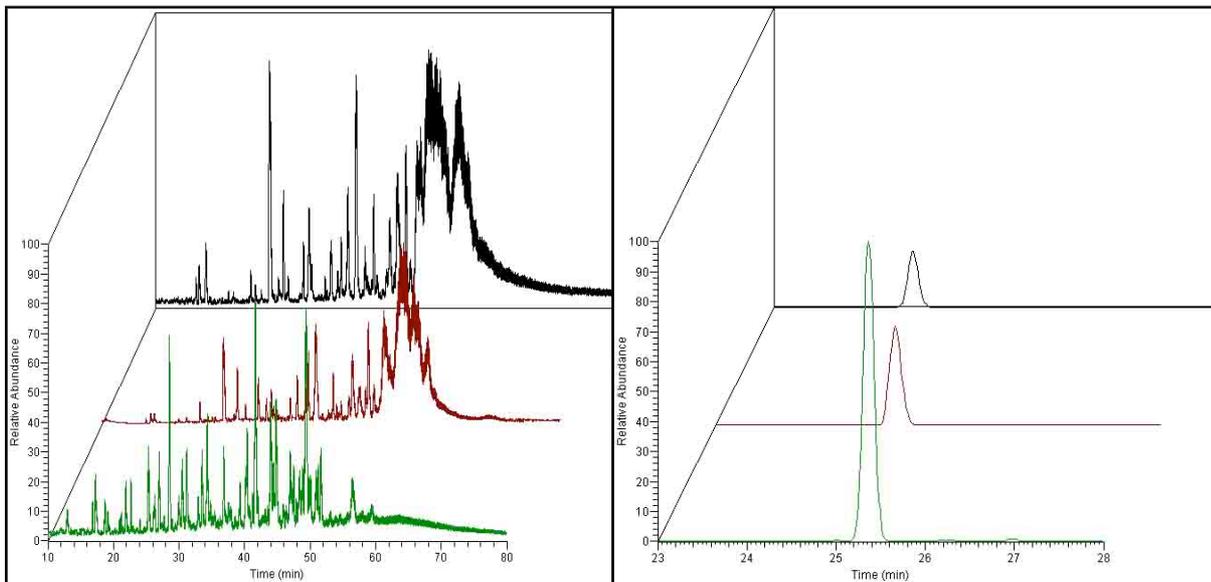


Abb.41: LC/MS-Chromatogramme (links TIC, rechts SIM m/z 1305,5) des Hämoglobins nach Hydrolyse mit V8-Protease nach 5 Stunden bei Zusatz von 1, 2 und 5% V8-Protease (von hinten nach vorne)

4.4.1.c Aufreinigung der Peptide

Um den Enzymverdau, der nach der Inkubation dunkelbraun und nicht trübe erschien, für die LC/MS-Analyse aufzureinigen, wurden eine Ultrafiltration sowie eine Fällung mit TCA versucht.

Die zu untersuchenden Peptide ($[M+H]^+=1305,5$ bzw. $1454,5$) sollten klein und somit gut filtrierbar sein. Eine Ultrafiltration nach beendeter Proteolyse führte sowohl bei Verwendung einer 10000 Da- wie auch einer 3000 Da Cut-off-Membran zu farblosen und klaren Lösungen.

Dabei waren im LC/MS-Chromatogramm die spät eluierenden grossen Peptide deutlich reduziert (Abb.42, links), während es zu keinen signifikanten Verlusten des LHCDKLHVDPE-Peptides kam (Abb.42, rechts).

Eine Fällung durch Zusatz von zwei Prozent TCA führte ebenfalls zu einer deutlichen Verbesserung der Probenqualität, war aber mit deutlichen Verlusten des LHCDKLHVDPE-Peptides verbunden (Abb.43). Deshalb wurde zur Aufreinigung der Peptidproben bei der Untersuchungsmethode eine Ultrafiltration mit 3000 Da Cut-off durchgeführt.

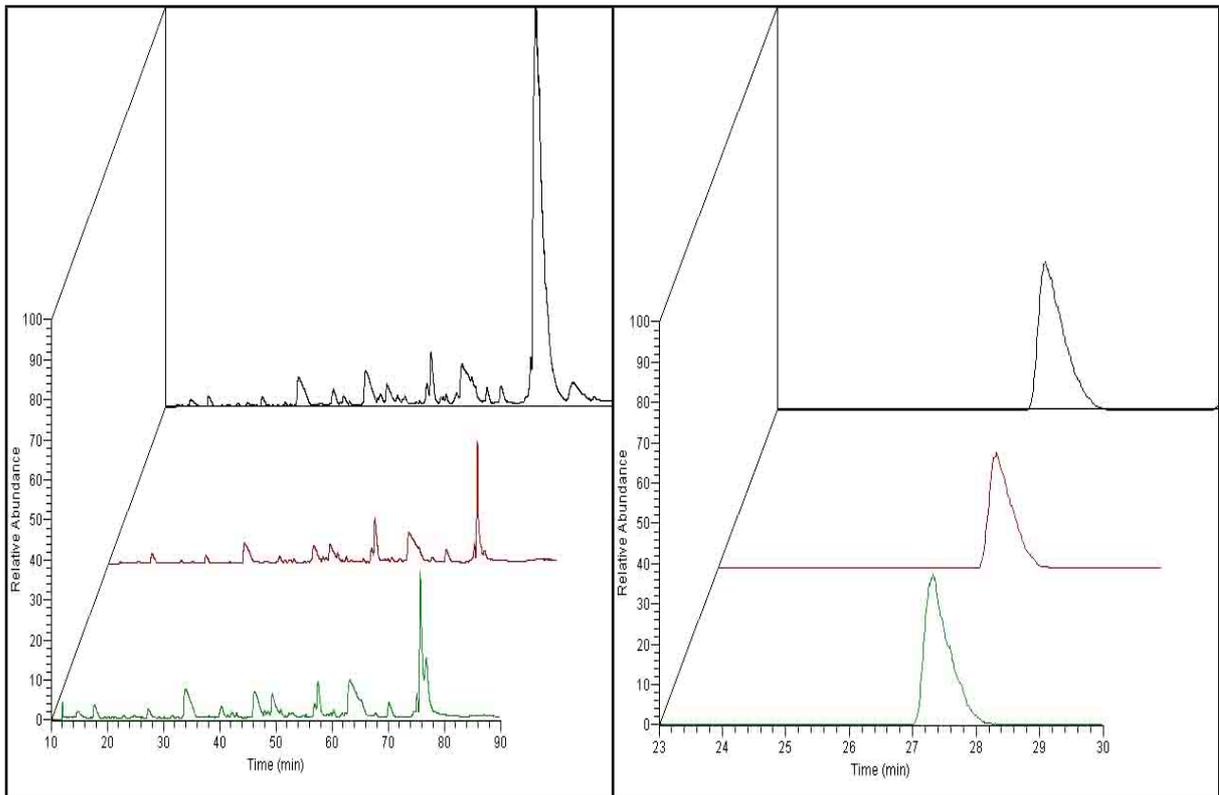


Abb.42: LC/MS-Chromatogramme (links TIC, rechts SIM m/z 1305,5) des Hämoglobins nach Hydrolyse mit V8-Protease ohne Ultrafiltration, nach 3000 Da Cut-off- und 10000 Da Cut-off-Ultrafiltration (von hinten nach vorne)

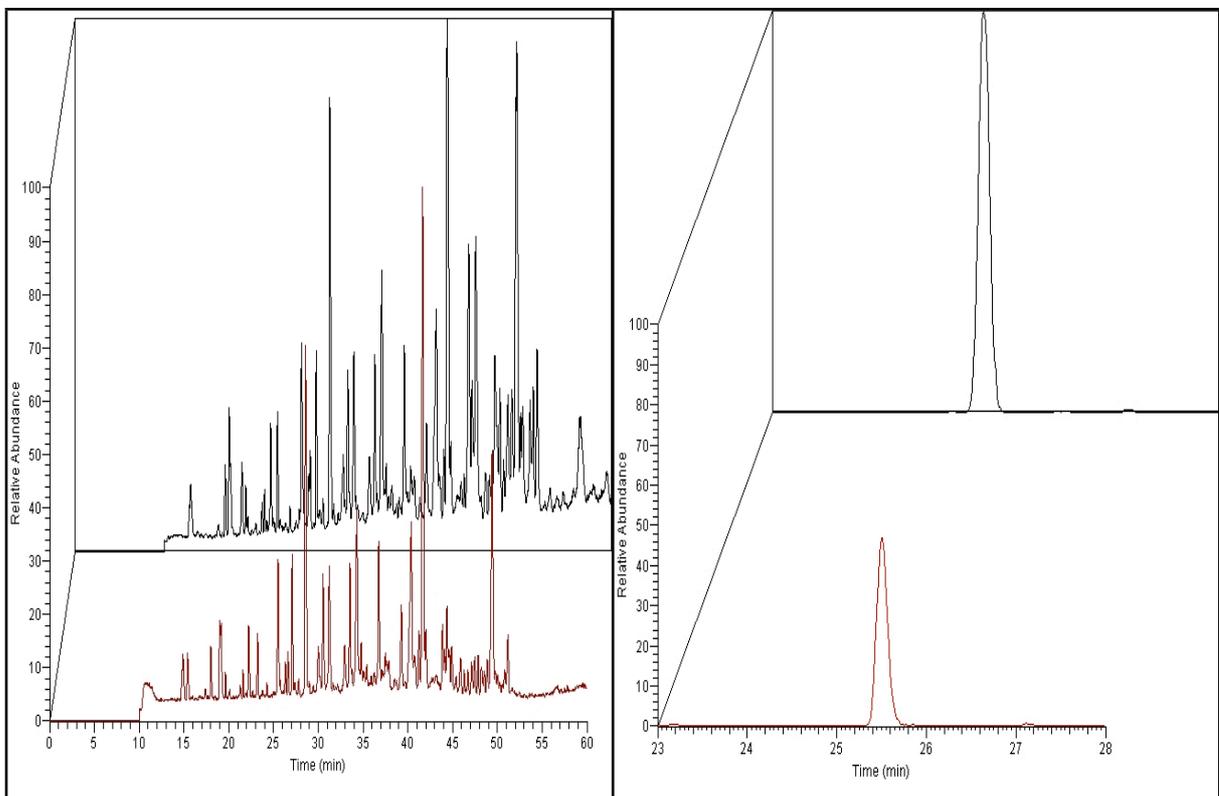


Abb.43: LC/MS-Chromatogramme (links TIC, rechts SIM m/z 1305,5) des Hämoglobins nach Hydrolyse mit V8-Protease ohne (hinten) und mit 2% TCA (vorne)

4.4.2 Optimierung LC/MS/MS-Detektion

4.4.2.a Chromatographie

Die Verwendung von 0,1% Ameisensäure im Eluenten und dem unten beschriebenen Acetonitrilgradienten führte zu der in Abb.44 gezeigten Peptidtrennung (TIC-Chromatogramm). Hierbei eluierten alle Peptide über einen Zeitraum von circa 40 Minuten bei einem Gradienten von 60 Minuten.

Die Peptide LHCDKLHVDPE sowie LH(C+NAPQI)DKLHVDPE zeigten Retentionszeiten von 25,6 bzw. 28,0 Minuten und waren somit ausreichend zeitlich getrennt, um die MS/MS-Detektion der beiden Peptide in zwei Zeitsegmente zu unterteilen. Es erfolgte keine Koelution anderer Peptide im Retentionszeitfenster $\pm 0,2$ Minuten, die Peakbreite betrug 0,3-0,4 Minuten bei Injektion von 500 μg auf die Trennsäule, so dass auf eine weitere Optimierung der chromatographischen Trennung verzichtet wurde (Abb.45).

Durch ein zeitlich steuerbares Säulenschaltventil wurde der HPLC-Fluss nur im erwarteten Retentionszeitfenster 24-29 Minuten in die Electrosprayquelle geleitet, was die Matrixbelastung des Massenspektrometers um $>90\%$ (geschätzt aus den Signalfächern) reduzierte.

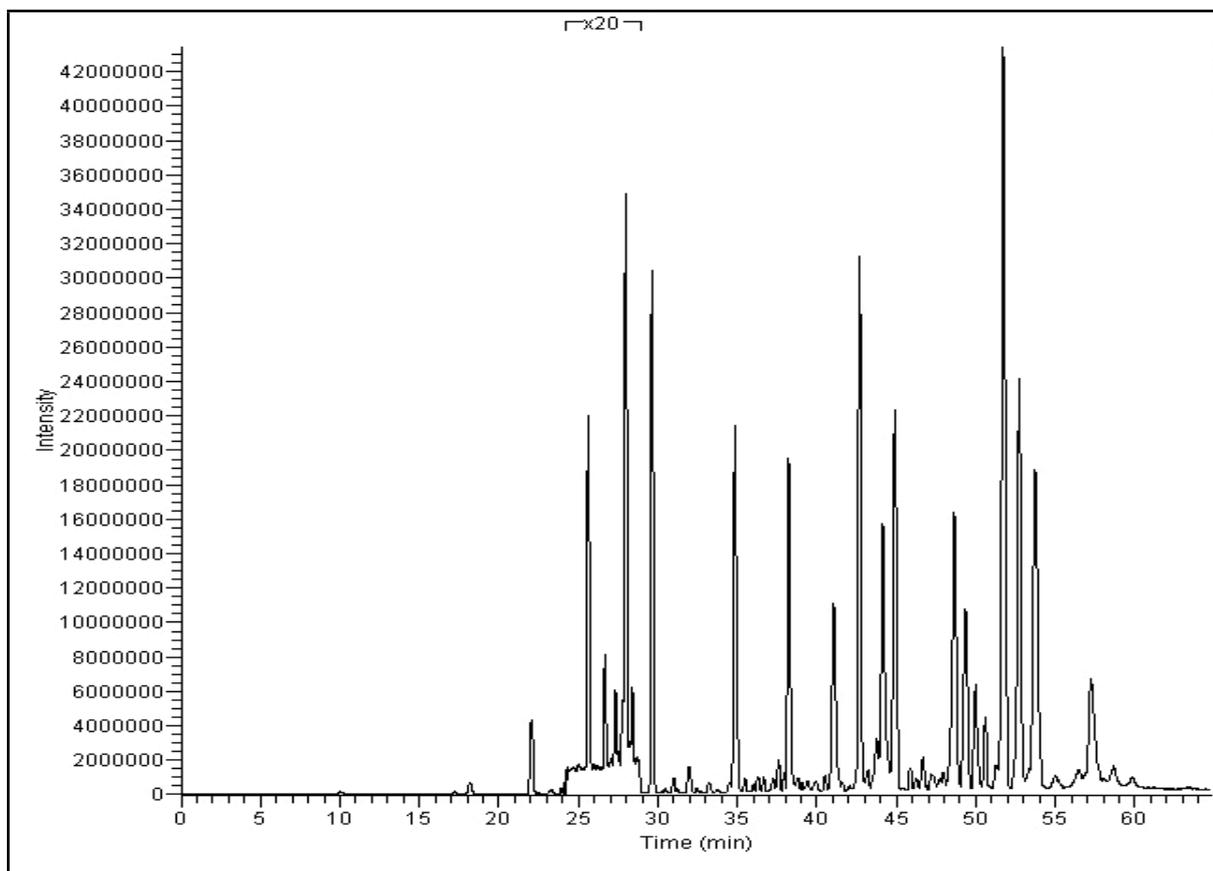


Abb.44: LC/MS-Chromatogramm (TIC) der Peptidtrennung einer mit NAPQI inkubierten Hämoglobinprobe

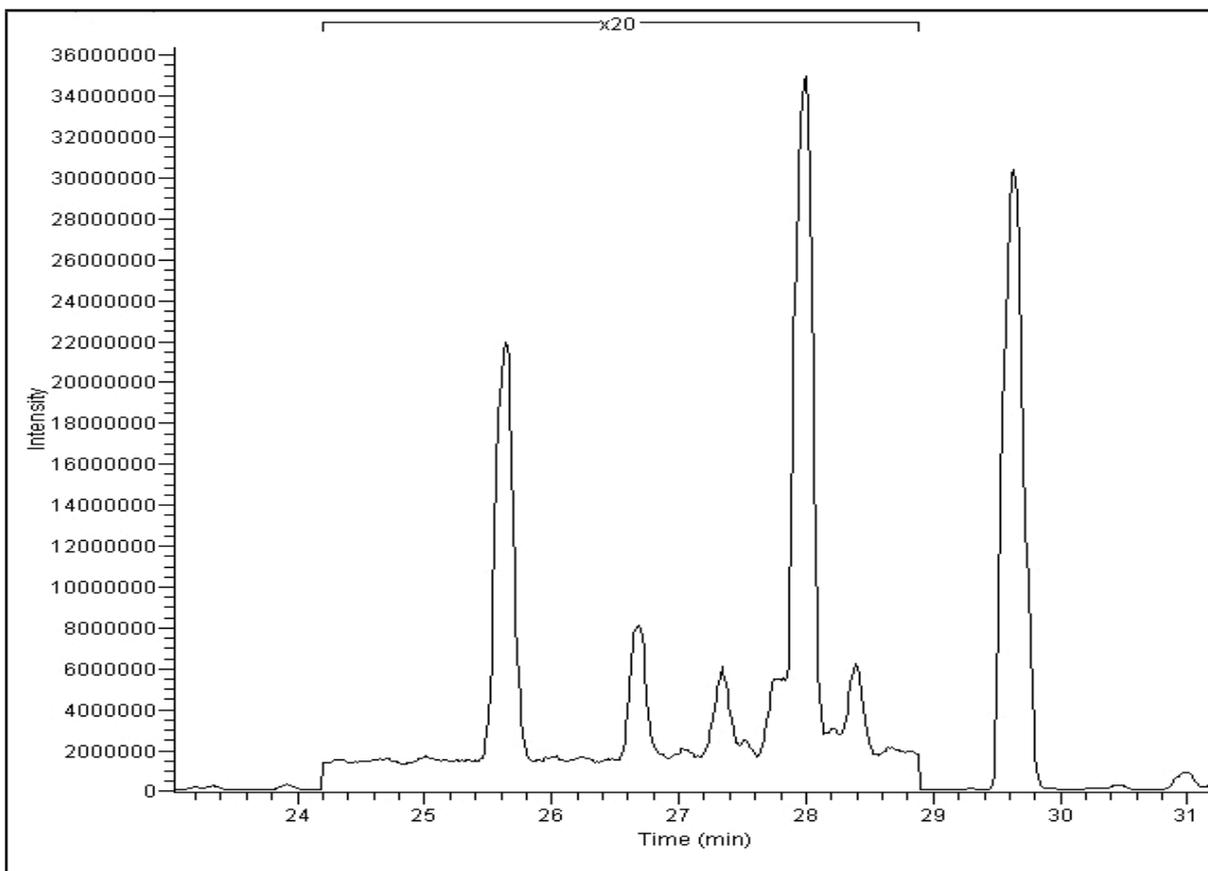


Abb.45: LC/MS-Chromatogramm (TIC) der Peptidtrennung einer mit NAPQI inkubierten Hämoglobinprobe: Vergrößerte Darstellung des LC-MS-Chromatogramms von Abb.42 im Elutions-bereich der Peptide LHCDKLHVDPE (RT= 25,6 min), sowie LH(C+NAPQI)DKLHVDPE (RT= 28,0 min)

Chromatographische Bedingungen:

Trennsäule:

Varian Polaris C18, 250 x 2 mm, 5µm

Eluent A:

0,1% Ameisensäure/ 95% Wasser/ 5%

Acetonitril

Eluent B:

0,1% Ameisensäure/ 5% Wasser/ 95%

Acetonitril

Fluss:

0,2 mL/min

Injektion:

50 µL

Gradient:

0-5 min: 100% A

55 min 60%B

60 min 90%B

4.4.2.b Tuning

Die Tuning-Prozedur des Massenspektrometers (wie unter 3.4.2 beschrieben) ergab folgende Einstellung:

Gas:

Sheath 80, Aux 20

Heated Capillary:

220°C / 10 V

Tube Lens:

2V

Multipole:

Multipol 1:-3 V / Multipol 2:-7 V

Interpol Lens:

-16 V

Trap Offset:

-10V

Dynode:

-15 kV

Multipller:

-800 V

4.4.2.c MS/MS-Detektion

Die Zoomscan-MS-Aufnahmen des V8-Proteaseverdaus von Hämoglobin nach der Reaktion mit NAPQI zeigten unter optimierten Bedingungen zwei Signale für das modifizierte LHCDKLHVDPE-Peptid, ein $[M+H]^+$ -Ion bei m/z 1454,70 sowie das $[M+2H]^{2+}$ -Ion bei m/z 727,92 (Abb.46). Zur MS/MS-Analyse wurden von beiden Precursorionen Tochterionenspektren mit unterschiedlicher Kollisionsenergie aufgenommen (Abb.47).

Das Tochterionenspektrum mit der größten Zahl und höchsten Intensität der Fragmente wurde durch Fragmentierung des doppelt geladenen Precursors bei 25 Prozent relativer Kollisionsenergie erhalten. Diese Bedingungen wurden deshalb zur MS/MS-Analyse in der Untersuchungsmethode verwendet.

Das intensivste Fragmention $m/z=1210$ (b9) diente dabei als „Target“-Ion zur Quantifizierung, die Fragmentionen $m/z=1095$ (b8) und $m/z=360$ (y3) als „Qualifier“-Ionen zum Identitätsnachweis (Abb.48).

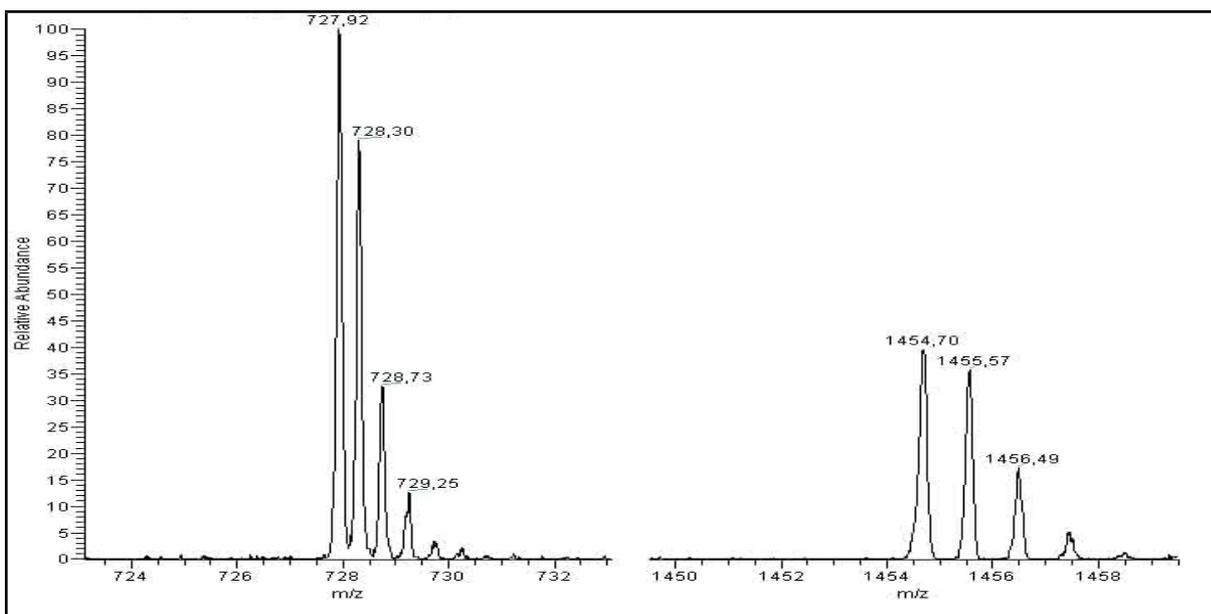


Abb.46.: Zoom-Scan-MS-Spektrum des Peptids LH(C+NAPQI)DKLHVDPE

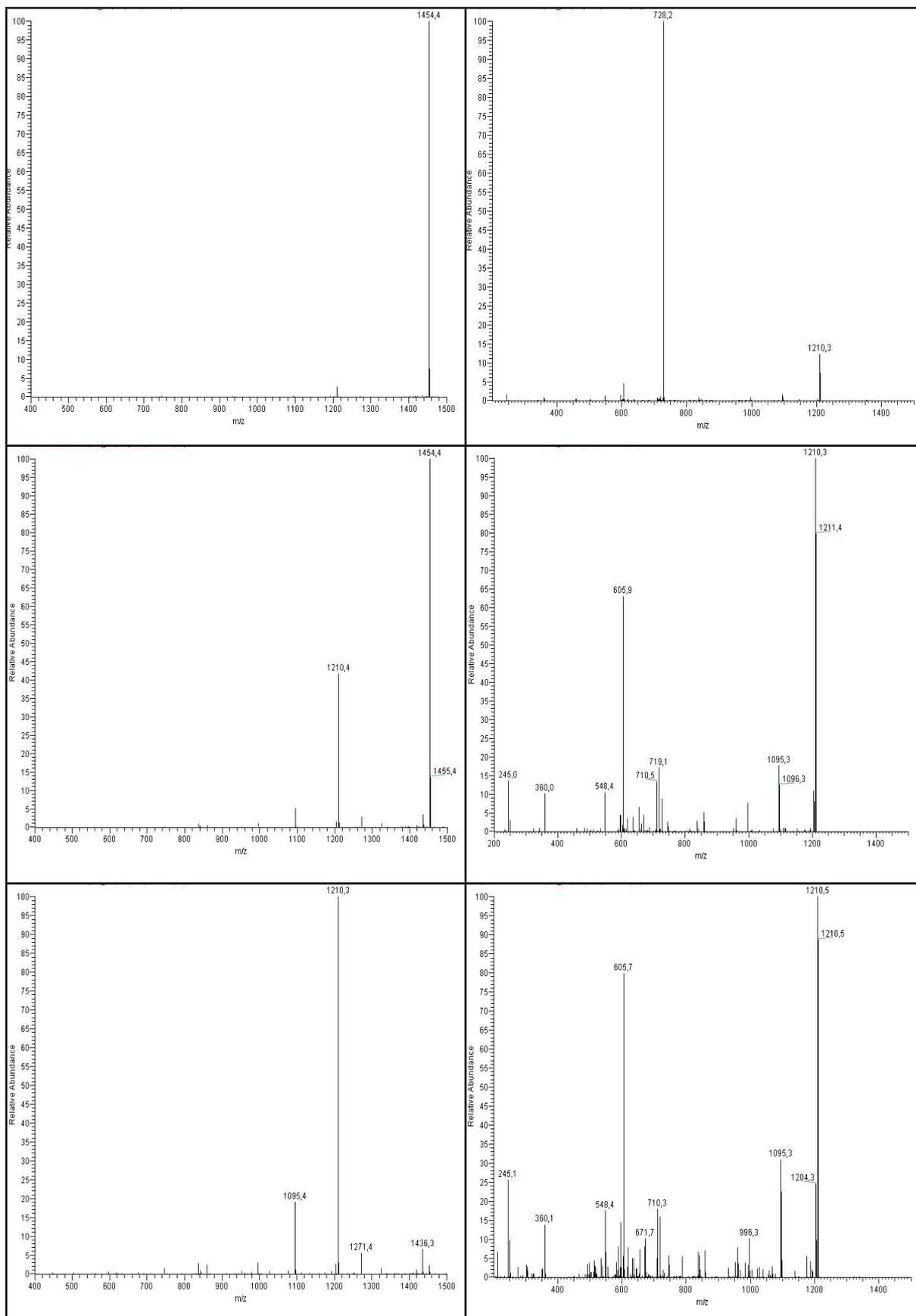


Abb.47: Tochterionenspektren der Precursorionen m/z 727,9 (rechte Spalte) sowie m/z 1454,7 (linke Spalte) bei 20% (erste Zeile), 25% (zweite Zeile) sowie 30% (dritte Zeile) relativer Kollisionsenergie.

4.4.3 Quantifizierung

Zur Quantifizierung wurde eine Kalibration der Methode durchgeführt. Dabei wurde das Peptid LHCDKLHVDPE als interner Standard (I.S.) verwendet. Korreliert wurde deshalb der Flächenquotient des Targetions $m/z=1210$ des LH(C+NAPQI)DKLHVDPE-Peptides und dem analogen b9-Ion ($m/z=1061$) des LHCDKLHVDPE-Peptides mit der Menge an zugesetztem NAPQI. Die Kalibration ergab mit Hilfe von fünf Kalibrationspunkten über einen Bereich von 10 bis 200 pmol NAPQI /mg Hämoglobin einen linearen Trend (Tab.16, Abb.49). Die Regressionsgerade wurde zur weiteren Untersuchung als lineare Kalibrationsfunktion verwendet.

Um die Nachweisgrenze der Methode abzuschätzen wurde der niedrigste Kalibrator vor der Proteolyse mit nativem Hämoglobin zusätzlich verdünnt. Hierbei konnten bis 1pmol NAPQI/ mg Hämoglobin Signale für das Target sowie die beiden Qualifier erhalten werden, bei 0,1 pmol/mg Hb war das Targetion, nicht mehr jedoch die Qualifierionen detektierbar.

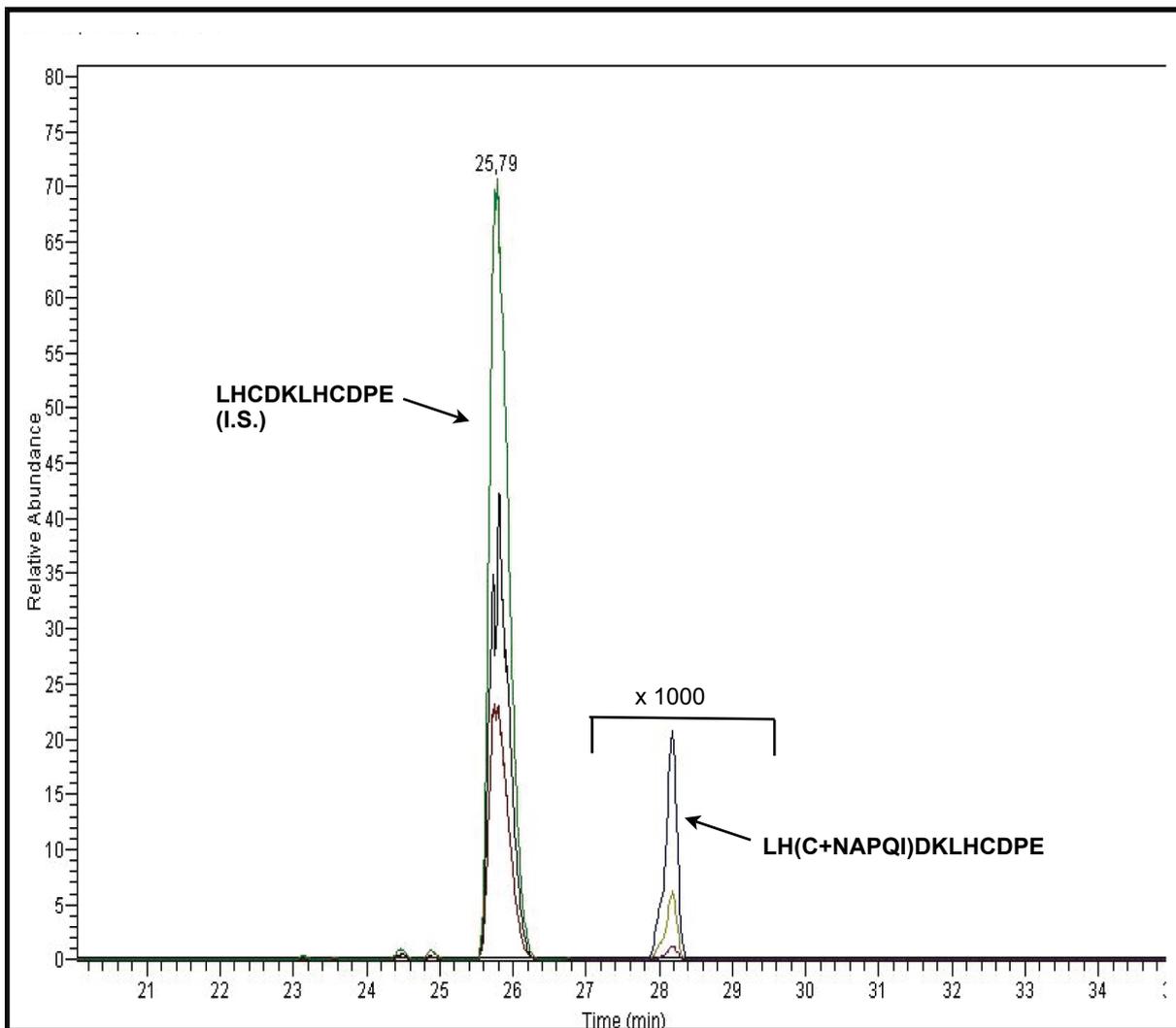


Abb.48: LC/MS/MS-Chromatogramm eines Kalibrators (50 pmol/mg) mit Darstellung der Ionenspuren für das Targetions sowie der beiden Qualifierionen der Peptide

Tab.16: Gemessene Signalflächen der Targetionen des modifizierten LHC(NAPQI)-DKLHVDPE-Peptides sowie des als internen Standard verwendeten nativen LHCDKLHVDPE-Peptides bei Inkubation von Hämoglobin mit unterschiedlichen Mengen NAPQI.

NAPQI/mg Hb	Area LHC-(NAPQI)-DKLHVDPE	LHCDKLHVDPE	Area-Quotient
10	75408	475899856	0,000158454
20	101464	419926021	0,000241624
50	145297	297071632	0,000489098
100	511665	384514313	0,001330679
200	265690	134856381	0,00197017
1000	2451986	136479197	0,017966005

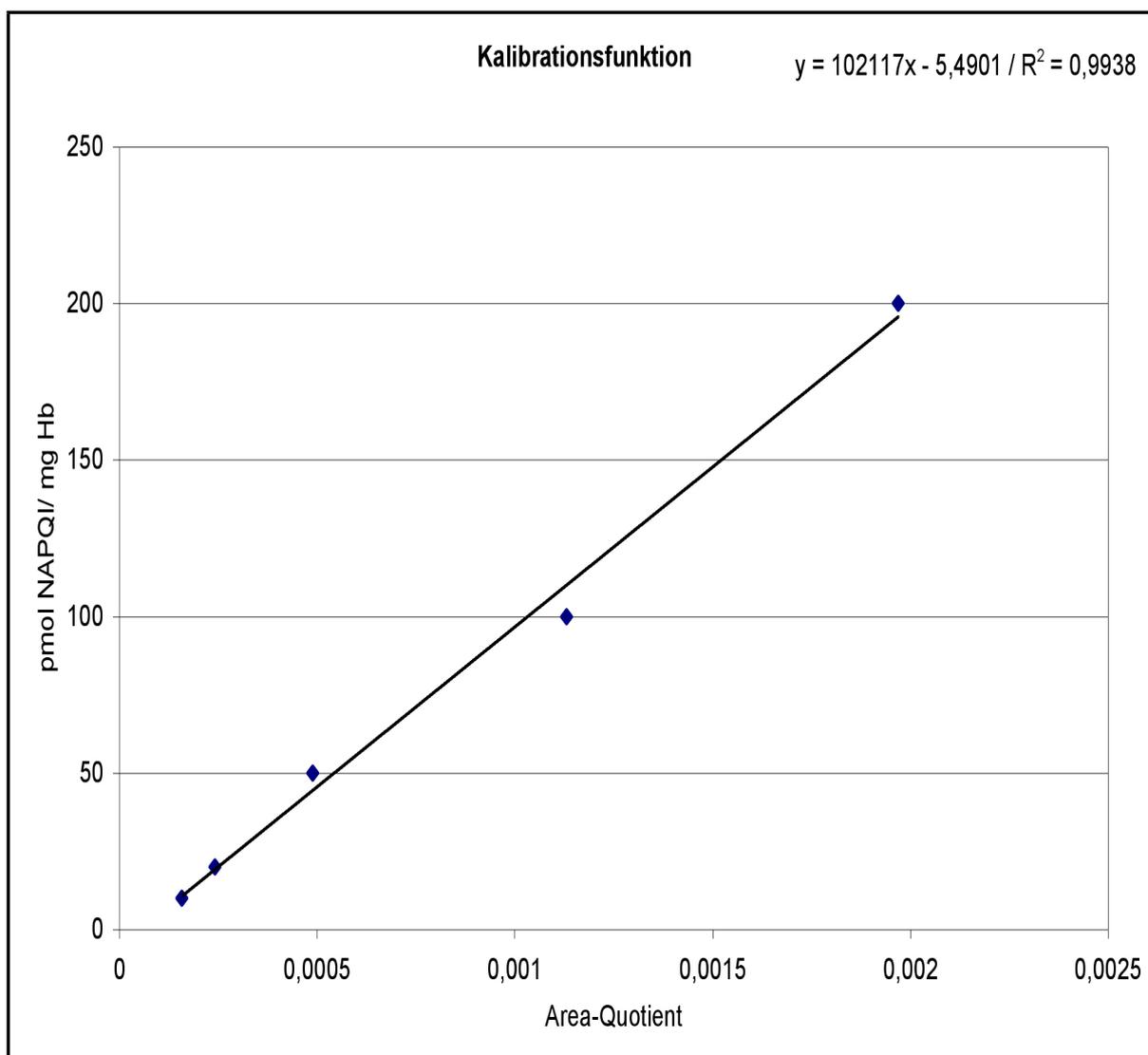


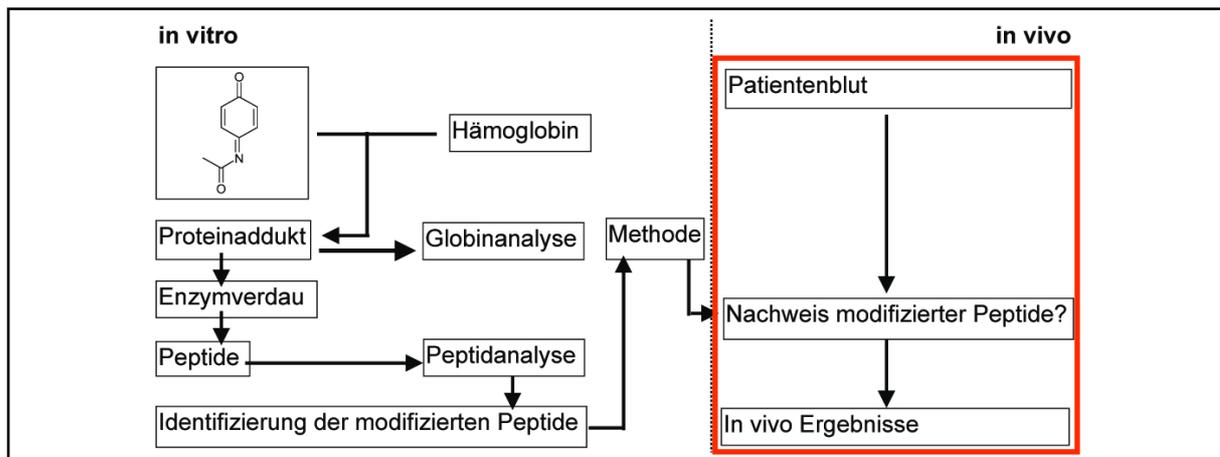
Abb.49: Die zur Quantifizierung des NAPQI im Hämoglobin verwendete Kalibrationsfunktion. Diese wurde ermittelt durch lineare Regression aus den gemessenen Flächenverhältnisse der Kalibratoren und deren NAPQI-Gehalt gemäß Tab.14.

4.4.4 Zusammenfassung der Untersuchungsmethode

Tab.17: Zusammenfassung der analytischen Kenndaten der Untersuchungsmethode

<p>Probenvorbereitung:</p> <ul style="list-style-type: none">-1mg Hämoglobin + 50µg Endoproteinase GluC in 100µL NH₄Ac 0,1M, pH4,0-5h Inkubation bei 37°C-Ultrafiltration (Cut-off 3000 Da)/ 90 Minuten
<p>LC/MS/MS:</p> <p>HPLC:</p> <ul style="list-style-type: none">-Trennsäule: Varian Polaris C18, 250 x 2 mm, 5µm-Eluent A: 0,1% Ameisensäure/ 95% Wasser/ 5% Acetonitril-Eluent B: 0,1% Ameisensäure/ 5% Wasser/ 95% Acetonitril-Flussrate: 0,2 ml/min-Injektion: 50 µL-Gradient: 0-5 min: 100% A, 55 min: 60%B , 60 min: 90%B <p>Interface:</p> <ul style="list-style-type: none">-Gasflüsse: Sheath-Gas 80 Arb, Aux-Gas 20 Arb-Heated Capillary: 220°C / 10 V-Tube Lens: 2V-Multipole: MP 1:-3 V / MP 2:-7 V-Interpol Lens: -16 V <p>Massenanalysator:</p> <ul style="list-style-type: none">-Trap Offset: -10V-Segment 1: Fullscan-MS/MS: m/z 1305, Isolationsbreite 3,0 Da/ CID: 30%-Segment 2: Fullscan-MS/MS: m/z 727,9 Isolationsbreite 2,0 Da/ CID: 25%-Maximum Injection Time: 500ms/ 1Microscan <p>Detektor:</p> <ul style="list-style-type: none">Dynode: -15kVMultipliiert: -800 V
<p>Auswertung:</p> <p>Kalibrationsfunktion der Flächenverhältnisse Interner Standard: LHCDKLHVDPE Target-Ion: b9/ Qualifier-Ionen: b8/y3</p>

4.5 Untersuchung der Patientenblutproben



4.5.1 Ergebnisse aller untersuchten Blutproben

Tab.18 zeigt in der Übersicht alle Ergebnisse der untersuchten Patientenblutproben. Aufgeführt sind die gemessenen Konzentrationen an freiem PCM im Serum (Spalte 3) sowie an kovalent gebundenem NAPQI im Hämoglobin (Spalte 4). Darüber hinaus ist ersichtlich, ob es sich bei der jeweiligen Probe um Hämoglobin aus isolierten Erythrocyten (e) oder aus hämolysierten Vollblutproben (s) handelte (Spalte 2).

Es fand sich kovalent gebundenes NAPQI in 50 der untersuchten 85 Blutproben. Überraschend hoch waren die hierbei gemessenen Konzentrationen von 32 bis 633 pmol NAPQI/ mg Hb, wobei sich mit 54 % der positiven Proben der größte Teil der Proben im Konzentrationsbereich zwischen 32 und 100 pmol NAPQI/ mg Hb befand (Abb.50).

Freies PCM konnte in 68 (80%) Proben nachgewiesen werden, die Verteilung der gemessenen PCM-Konzentrationen ist in Abb.51 dargestellt.

Es zeigte sich, dass kovalent gebundenes NAPQI ausschliesslich in hämolysierten Vollblutproben (s) nachweisbar war. Am Hämoglobin aus gewaschenen und lysierten Erythrocyten konnte kovalent gebundenes NAPQI in keiner Probe nachgewiesen werden, obgleich in deren zugehörigen Plasma teilweise sehr hohe Konzentrationen an freiem PCM festgestellt wurden (z.B. A1598/07b, Tab.18). Dieser Widerspruch erweckte rasch Zweifel an der Bedeutung der positiven Befunde, welche in der Folge noch verstärkt wurden:

- weil keine Korrelation zum klinischen Bild auszumachen war
- weil unterschiedliche Adduktbildungen in gleichzeitig abgenommenen Blutproben desselben Patienten beobachtet wurden: im hämolysierten Vollblut wurden hohe Konzentrationen, im EDTA-Blut jedoch kein NAPQI-Hb-Addukt (s. Proben A0999/07a und b, A1598/07a und b, wobei a hämolysierte und b EDTA-Blute waren)
- weil alle hämolytischen Vollblutproben, die kein freies PCM enthielten (n=15), auch kein kovalent gebundenes NAPQI am Hämoglobin aufwiesen.

Daraus ergaben sich Hinweise, dass möglicherweise freies PCM in vitro (nicht metabolisch) oxidiert worden war, eine kovalente Bindung an Hämoglobin einging und somit für die entstandenen NAPQI-Hb-Addukte in den (PCM-haltigen) hämolysierten Blutproben verantwortlich sein könnte.

Zur Abklärung wurden entsprechende Inkubationsversuche in vitro mit Hämoglobin und freiem PCM durchgeführt (vgl. 4.5.2).

Tab.18: Ergebnisse aller untersuchter Patientenproben mit Lab-Nr., Probenart (s= hämolytisches Vollblut, e= Erythrocyten-Hämolysat), freier PCM-Serumkonzentration [mg/L] (gemessen nach Probeneingang) sowie kovalent gebundenem NAPQI [pmol NAPQI/mg Hb].

Lab.Nr.	Probenart	Serum-PCM	pmol NAPQI/mg Hb
A0044/06	s	0	0
A0060/07	s	94,7	149
A0127/07	s	0	0
A0128/07	s	0	0
A0243/07	s	23	116,9
A0327/06	s	43,7	199,2
A0368/07	s	0	0
A0682/06	s	197,5	533
A0691/06	s	6,9	67,6
A0696/07	s	0	0
A0696/07b	e	0	0
A0751/07	s	30	107,6
A0771/07	s	44,2	179,2
A0772/07	s	66,5	145,2
A0896/07	s	52	100,8
A0897/07	s	27,1	81,7
A0916/06	s	120	272,4
A0918/06	s	15,6	86,8
A0998/05	s	90	160,5
A0999/07a	s	200	196,9
A0999/07b	e	200	0
A1172/07	s	0	0
A1256/06	s	9,8	48,1
A1261/07	s	0	0
A1368/07	e	0	0
A1371/06	s	0	0
A1375/07	s	2,8	39,7

Lab.Nr.	Probenart	Serum-PCM	pmol NAPQI/mg Hb
A1505/06	s	0	0
A1579/06	s	40	216,6
A1598/07a	s	343	41
A1598/07b	e	343	0
A1598/07c	e	343	0
A1605/07	s	121	44,4
A1723/06	s	94,3	270
A1724/07	e	136	0
A1724/07b	e	136	0
A2014/06	s	33	73
A2027/06	s	34,4	107,7
A2419/07	e	2,9	0
A2419/07b	e	2,9	0
A2420/07a	e	30	0
A2420/07b	e	30	0
A2433/06	s	85,8	220,7
A2598/07	e	3,9	0
A2696/07c	e	3,8	0
A2696/07b	e	55,7	0
A2696/07a	e	57,3	0
A2726/07b	e	171,3	0
A2726/07	e	177,3	0
A2727/07	e	122,3	0
A2739/07b	e	2,1	0
A2739/07	e	2,8	0
A2784/06	s	31,5	113,6
A2899/07	s	0	0
A2965/06	s	5,5	51,7
A3199/06	s	90,4	165,5
A3267/06	s	7,4	50,8
A3268/06	s	18,5	95,7
A3390/07	s	0	0
A3410/07	s	9,3	45,6
A3691/07	s	0	0
A4524/05	s	117	358,2
A4526/05	s	36,3	195,7

Lab.Nr.	Probenart	Serum-PCM	pmol NAPQI/mg Hb
A4528/05	s	7	89,7
A4549/05	s	29,2	134,8
A4866/05	s	67,5	310,4
A4867/05	s	87,5	383,8
A4868/05	s	240	404,9
A5121/05	s	90	632,9
A5211/05	s	1	35,9
A5301/05	s	0	0
A5339/05	s	11,8	88,5
A5413/05	s	21,7	172,1
A6694/05	s	8,8	71
A6784/05	s	104,7	317,2
A6785/05	s	46	35,2
A7125/05b	s	3	47,1
A7127/05	s	35,7	175,2
C0101/06b	s	8,1	31,5
C0102/06	s	26,2	67,3
C0904/05	s	99,5	361,6
C1458/07	s	0	0
C1696/06	s	112,9	223,4
C1697/06	s	17,9	59,3
C1701/06	s	o	0

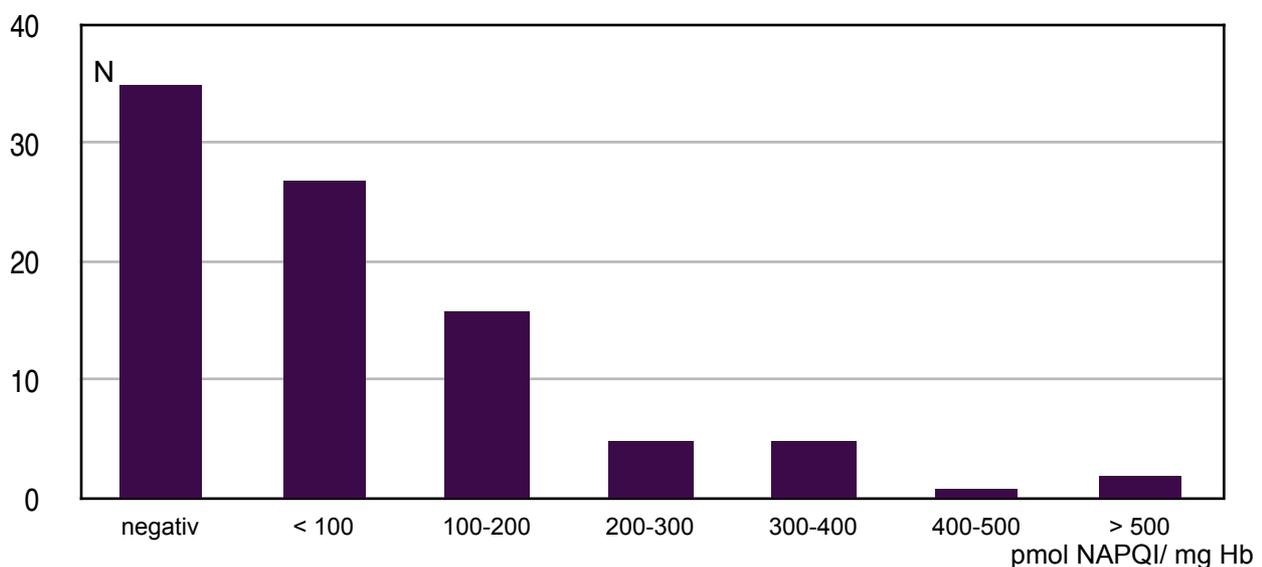


Abb.50: Häufigkeiten der gemessenen Konzentrationen an NAPQI- Hb-Addukten aller untersuchter Patientenblutproben

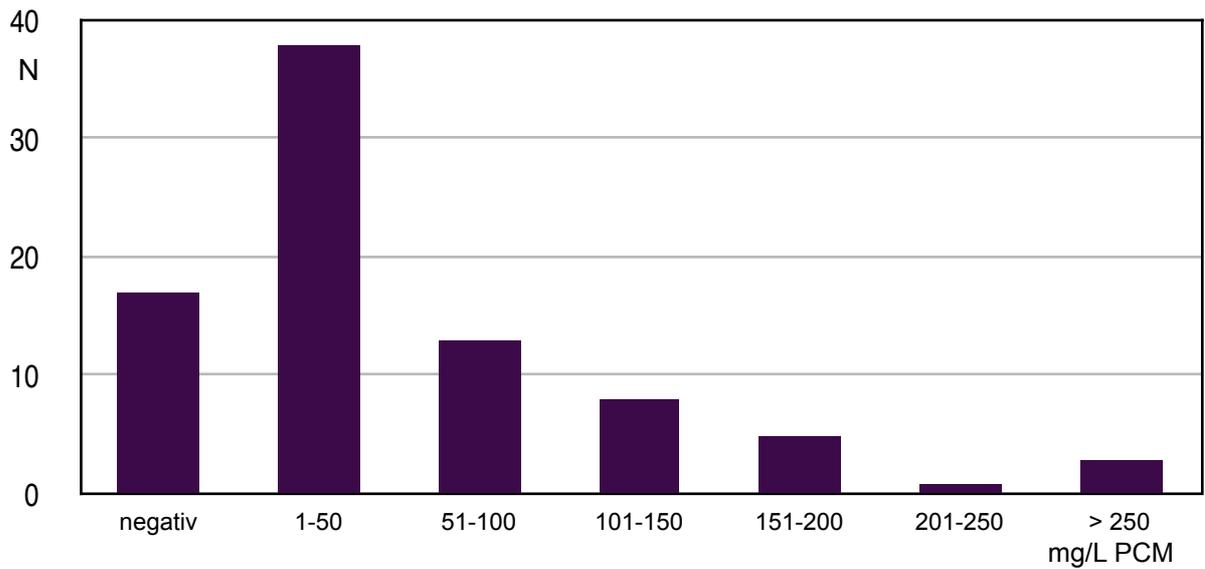
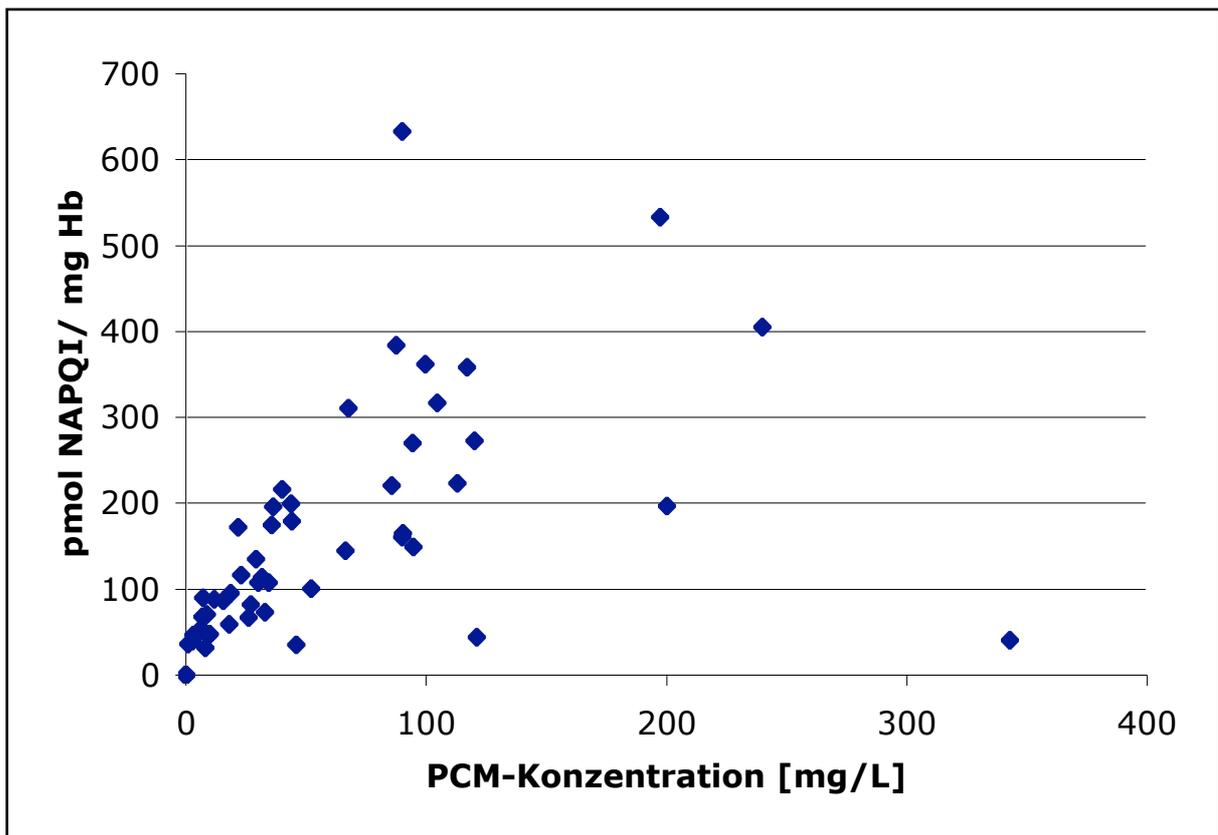


Abb.51: Häufigkeiten der gemessenen Konzentrationen an freiem PCM aller untersuchter Patientenblutproben



4.5.2 Ergebnisse der Blutproben von Patienten mit wiederholten Blutentnahmen

Von 4 Patienten (BSO, DS, TA, DY) standen mehrere, zeitlich versetzt abgenommene Blutproben (hämolytische Vollblutproben) zur Verfügung. Dabei zeigte sich neben dem erwarteten Rückgang der freien PCM-Serumkonzentration innerhalb einer Probenreihe auch eine starke Abnahme der Konzentration an kovalent gebundenem NAPQI am Hämoglobin. Bei Patient BSO konnte bei der dritten abgenommenen Probe, in der kein freies PCM mehr nachweisbar war, auch kein NAPQI-Hb-Addukt mehr nachgewiesen werden (Tab.19).

Tab.19: Ergebnisse der Blutproben von Patienten mit wiederholten Blutentnahmen

Lab.Nr.	Probenart	Serum-PCM	pmol NAPQI/mg Hb
Patient BSO			
C1696/06	s	112,9	223,4
C1697/06	s	17,9	59,3
C1701/06	s	0	0
Patient DS			
A0682/06	s	197,5	532,9
A0691/06	s	6,9	67,6
Patient TA			
A0896/07	s	52,1	100,7
A0897/07	s	27,1	81,7
Patient DY			
A6784/05	s	104,7	317,2
A6785/05	s	46	35,2

4.5.3 Ergebnisse der Blutuntersuchungen nach Proteinpräzipitation

Um den Einfluss von freiem PCM auf die NAPQI-Hb-Adduktbildung zu untersuchen, wurde bei neun der hämolytischen Vollblutproben, bei denen unterschiedliche Konzentrationen an freiem PCM sowie NAPQI-Hb-Addukt festgestellt wurden, eine Proteinpräzipitation mit der Aceton/HCl-Methode durchgeführt. Hierbei kam es neben der Präzipitation des Proteins gleichzeitig auch zur Entfernung der prosthetischen Gruppe (Häm). Das Globin fällt als weißer Niederschlag aus, während das rot gefärbte Häm in Lösung verbleibt. Nach dreimaligem Waschen war keine rötliche Färbung mehr im Globin-Präzipitat zu erkennen, da das Häm vollständig abgetrennt war. Durch das mehrmalige Waschen wurde auch freies PCM, welches in Aceton/HCl sehr gut löslich ist, vom Protein abgetrennt. In keiner der

Proben war nach der Präzipitation noch freies PCM nachweisbar. In sechs der untersuchten hämolytischen Vollblutproben, die NAPQI-Hb-Addukte von 35,9-107,8 pmol/mg aufwiesen, konnten diese nach Präzipitation nicht mehr nachgewiesen werden. Die übrigen drei Proben (272,4-317,2 pmol/mg) zeigten nach der Präzipitation wesentlich geringere Konzentrationen an NAPQI-Hb-Addukt (66,8-141,2 pmol/mg).

Tab.20: Ergebnisse der Untersuchung hämolytischer Vollblutproben sowie daraus durch Präzipitation gewonnener Globinproben.

Lab.Nr.	Probenart	freies PCM	pmol NAPQI/mg Hb
A1256/06	s	9,8	48,1
	Aceton/HCl-Präzipitat	0	0
A6785/05	s	46	35,9
	Aceton/HCl-Präzipitat	0	0
C1697/06	s	17,9	59,4
	Aceton/HCl-Präzipitat	0	0
A0918/06	s	15,6	86,8
	Aceton/HCl-Präzipitat	0	0
A0916/06	s	120	272,39
	Aceton/HCl-Präzipitat	0	66,79
A0691/06	s	6,9	67,6
	Aceton/HCl-Präzipitat	0	0
A6784/05	s	104	317,15
	Aceton/HCl-Präzipitat	0	121,32
A2027/06	s	34,4	107,7
	Aceton/HCl-Präzipitat	0	0
A4866/05	s	67,5	310,41
	Aceton/HCl-Präzipitat	0	141,15

4.6 Untersuchung von in vitro Paracetamol-Inkubationen

4.6.1 In vitro Paracetamol/Hämoglobin-Inkubationen

Zur Überprüfung einer möglichen in vitro-Reaktion zwischen Hämoglobin und PCM wurde frisch isoliertes Hämoglobin (je 1 mg in 0,1 mL) mit PCM in einer Konzentration von 100 mg/L sowie ohne PCM-Zusatz bei pH 7,4/37°C inkubiert. Dabei war bei der Probe ohne PCM-Zusatz nach 24 Stunden Inkubation kein kovalent gebundenes NAPQI am Hämoglobin nachweisbar, in der PCM-haltigen Probe fand sich hingegen kovalent gebundenes NAPQI in einer Konzentration von 85 pmol/mg Hb (Abb.53).

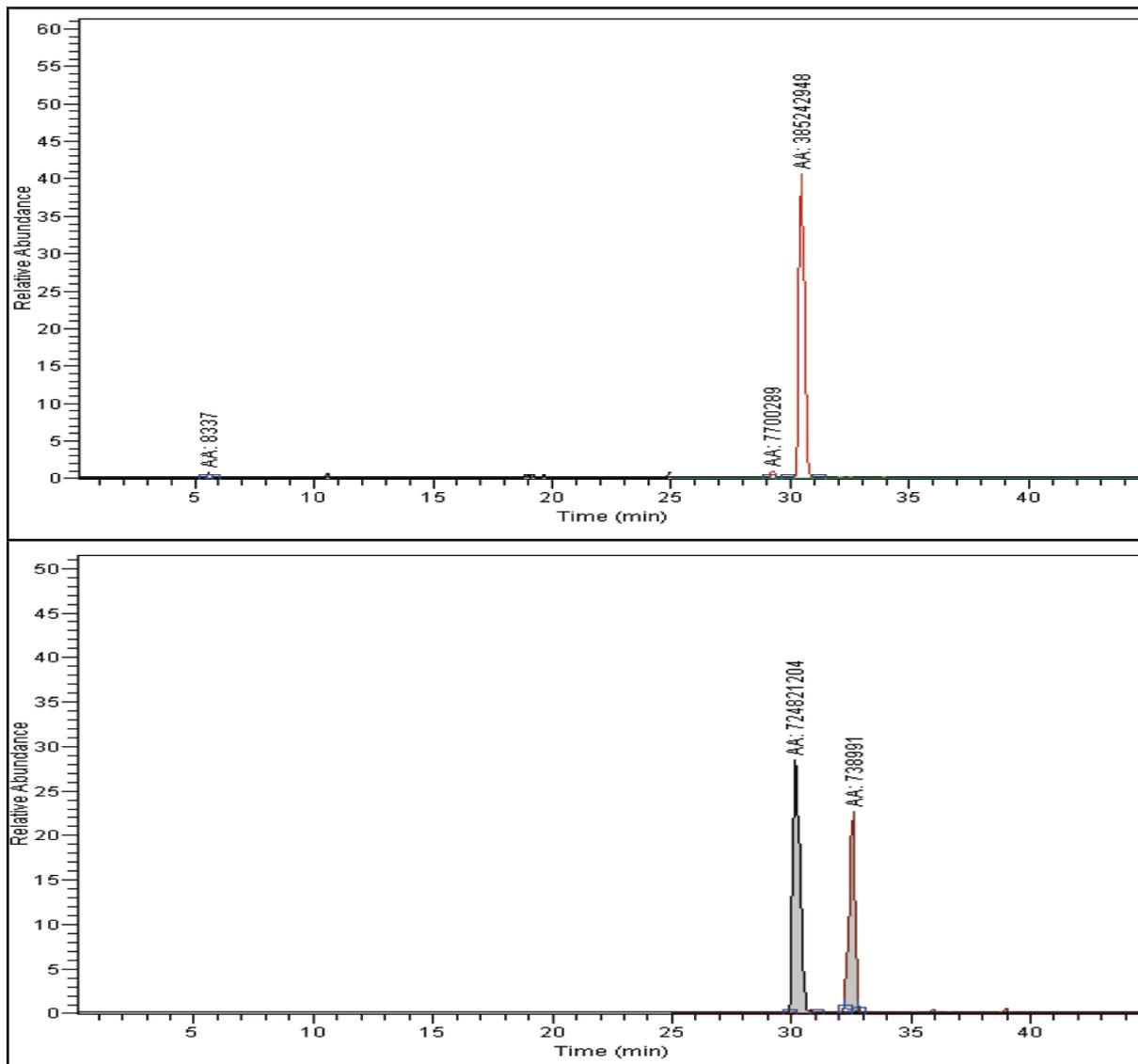


Abb.53: LC/MS/MS-Chromatogramm von Hämoglobin nach Inkubation ohne (oben), sowie mit (unten) Zusatz von PCM (100 mg/L).

4.6.2 Glutathion/NAPQI- Inkubation

Zur Prüfung, ob PCM in vitro auch mit anderen Cysteinderivaten eine kovalente Bindung einging, wurde zunächst das Addukt aus Glutathion (GSH, Abb.54) und NAPQI analog zum Hämoglobinaddukt hergestellt. Abb.55 zeigt das LC/MS-(TIC)-Chromatogramm des GSH-Reaktionsproduktes mit NAPQI. Es waren hierbei vier Produkte (Signale a-d) zu beobachten, wobei es sich bei a um dimerisiertes, disulfidisches Glutathion ($m/z=613$) und bei b um PCM ($m/z=152$) handelte. Signale c und d zeigten jeweils $m/z=457$ sowie ein jeweils identisches Tochterionenspektrum (Abb.56). Neben einer Addition des NAPQI erfolgte somit auch in signifikantem Umfang eine Redox-Reaktion, bei der es zur Oxidation des GSH zu disulfidischem GSSG und einer Reduktion des NAPQI zu PCM gekommen war. Bei der Addition waren zwei unterschiedliche Produkte entstanden, die sich chromatographisch auftrennten ($R_t=20,57/22,58$ Minuten). Da diese jeweils $[M+H]^+$ -Ionen mit $m/z=457$ zeigten,

was einer Massenzunahme von 149 Da gegenüber dem $[M+H]^+$ des GSH ($m/z=308$) entsprach, mußte es sich bei diesen Produkten um einfache Addukte zwischen GSH und NAPQI handeln.

Das Tochterionenspektrum des GSH wies die Ionen $[M-H_2O+H]^+$ ($m/z=290$), $[M-Gly+H]^+$ ($m/z=233$), $[M-H_2O-Gly+H]^+$ ($m/z=215$), $[M-Glu+H]^+$ ($m/z=179$) sowie $[M-NH_3-Glu+H]^+$ ($m/z=162$) auf.

Die Tochterionenspektren der beiden Additionsprodukte besaßen mit den zwei intensivsten Ionen $m/z=328$ sowie $m/z=382$ die analogen $[M-Glu+H]^+$ - und $[M-Gly+H]^+$ -Ionen. Hieraus war abzuleiten, dass die Massenzunahme von +149 Da am Cystein stattgefunden hatte und es sich somit -wie zu erwarten- um Cystein-Addukte des Glutathions handelte (Abb.56).

Da zwei chromatographisch trennbare, also physikochemisch unterschiedliche Verbindungen entstanden waren, die dasselbe Fragmentionenspektrum besaßen, handelte es sich um zwei isomere Additionsprodukte. Diese entstanden vermutlich durch nucleophilen Angriff des Cystein-Schwefels an ortho- und meta-Position des NAPQI.

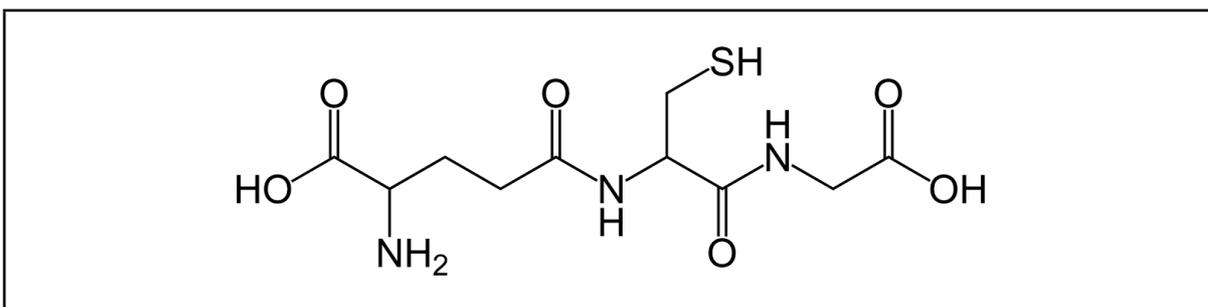


Abb.54: Strukturformel des Glutathions (MW = 307,2)

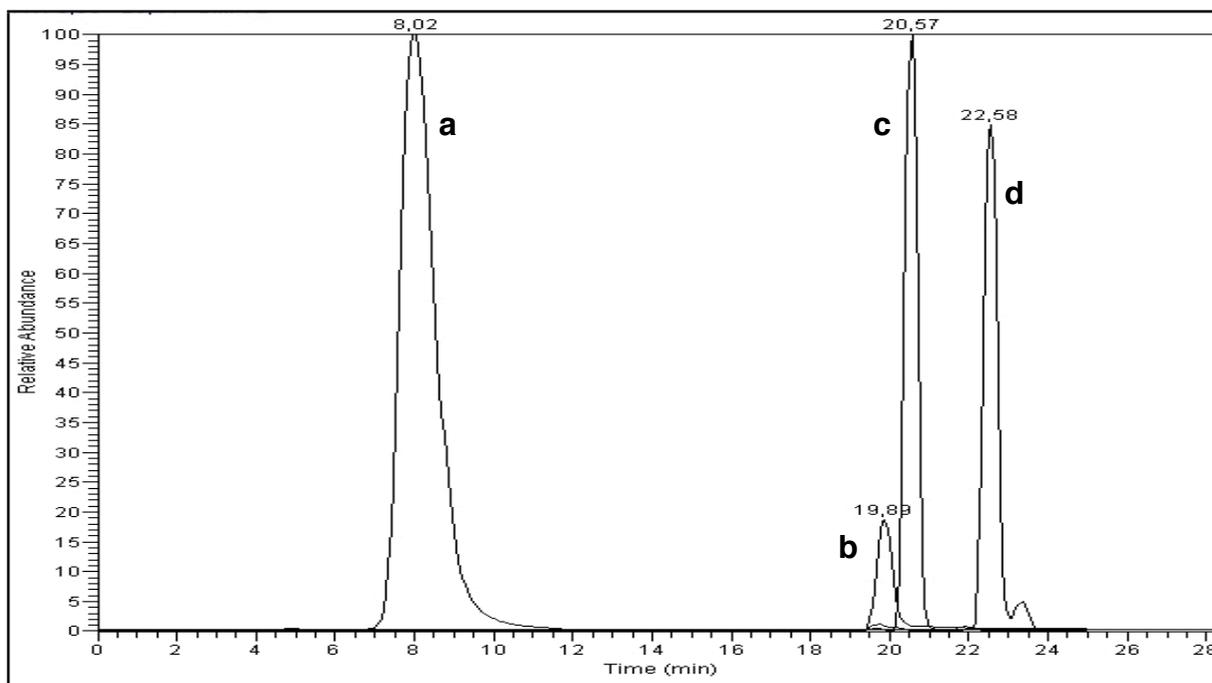


Abb.55: LC/MS Chromatogramm des Reaktionsproduktes von Glutathion und NAPQI

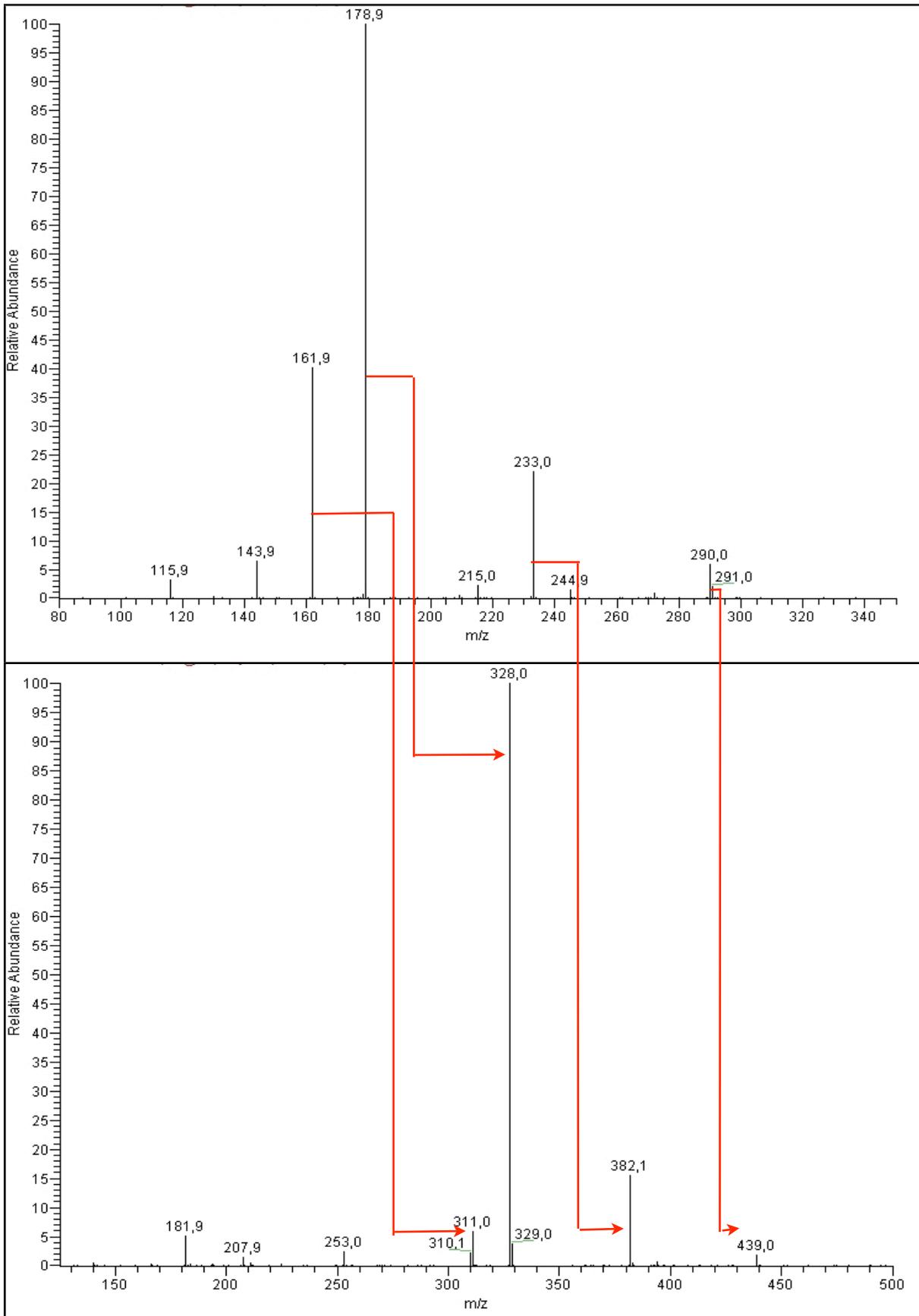


Abb.56: Tochterionenspektrum von GSH (oben) sowie der beiden Reaktionsprodukte RT= 20,6/22,6 min (unten). Die roten Pfeile zeigen die um +149 Da versetzten Tochterionen

4.6.3 Glutathion/PCM- Inkubation

Die analog zu 4.6.1 durchgeführte Inkubation mit Glutathion und PCM führte nicht zur messbaren Bildung von (GSH+NAPQI)-Addukten. Somit wurde nachgewiesen, dass PCM nicht durch Umgebungseinflüsse (wie z.B. Luftsauerstoff) oxidiert wurde.

4.6.4 Hämoglobin/Glutathion/PCM- Inkubation

Es wurden verschiedene, mit PCM in vitro inkubierte Proben auf die Anwesenheit von NAPQI-Hb- oder NAPQI-GSH-Addukten untersucht.

Abb.57 zeigt ein typisches LC/MS/MS-Chromatogramm einer untersuchten Probe, die sowohl NAPQI-GSH-Addukt (Signale b und c) sowie NAPQI-Hb-Addukt (LH(C+NAPQI)DKLHVDPE, Signal e) enthielt.

Signale a und d sind unverändertes GSH bzw LHCDKLHVDPE.

In Tab.21 sind die Ergebnisse der Inkubationsversuche mit Hämoglobin, Glutathion, Deoxyhämoglobin und Globin zusammengefasst. Dabei ist in Spalte 1 die Zusammensetzung der inkubierten Probe, welche bei pH 7,4/37°C für 24 Stunden inkubiert wurden, beschrieben, wobei die aufgeführten Bestandteile in 0,1 mL Puffer gelöst waren.

Nach Inkubation von Glutathion und Hämoglobin mit PCM (200 mg/L) und V8-Proteasenverdau konnten sowohl GSH-NAPQI-Addukte wie auch Hb-NAPQI-Addukte nachgewiesen werden. Da für GSH-NAPQI-Addukte keine Kalibration erstellt wurde, konnte die Menge des gebildeten NAPQI-GSH-Addukts nur anhand der Flächenverhältnisse der analogen Tochterionenpaare abgeschätzt werden. Für kovalentes NAPQI am GSH wurden hierzu die Flächen der [M-Glu+H]⁺-Ionen (m/z=179, m/z= 328), für kovalentes NAPQI am Hämoglobin die Flächen der b9-Ionen (m/z=1061, m/z=1210) des LHCDKLHVDPE- bzw. LH(C+NAQPI)DKLHVDPE-Peptids verwendet.

Dabei zeigte sich, dass das quantitative Ausmaß der Adduktbildung am Glutathion höher war (ca. 400%) als am Hämoglobin (Tab.21, Zeile 2). Dabei spielte es keine entscheidende Rolle, ob Hämoglobin in oxygenierter Form oder als Deoxy-Hämoglobin (Zeile 5) vorlag.

Zur Klärung, ob V8-Protease möglicherweise an der Adduktbildung beteiligt war, wurde Glutathion und PCM mit V8-Protease inkubiert (Zeile 6), wobei kein kovalentes NAPQI-GSH-Addukt nachgewiesen wurde. Auch in Abwesenheit von V8-Protease kam es bei Inkubationen von Hämoglobin als auch Globin (Häm-frei) mit PCM zur Ausbildung von NAPQI-GSH-Addukten (Zeilen 3,4), wobei die Adduktkonzentration bei (oxygeniertem) Hämoglobin höher war als bei der Inkubation mit dem Globin.

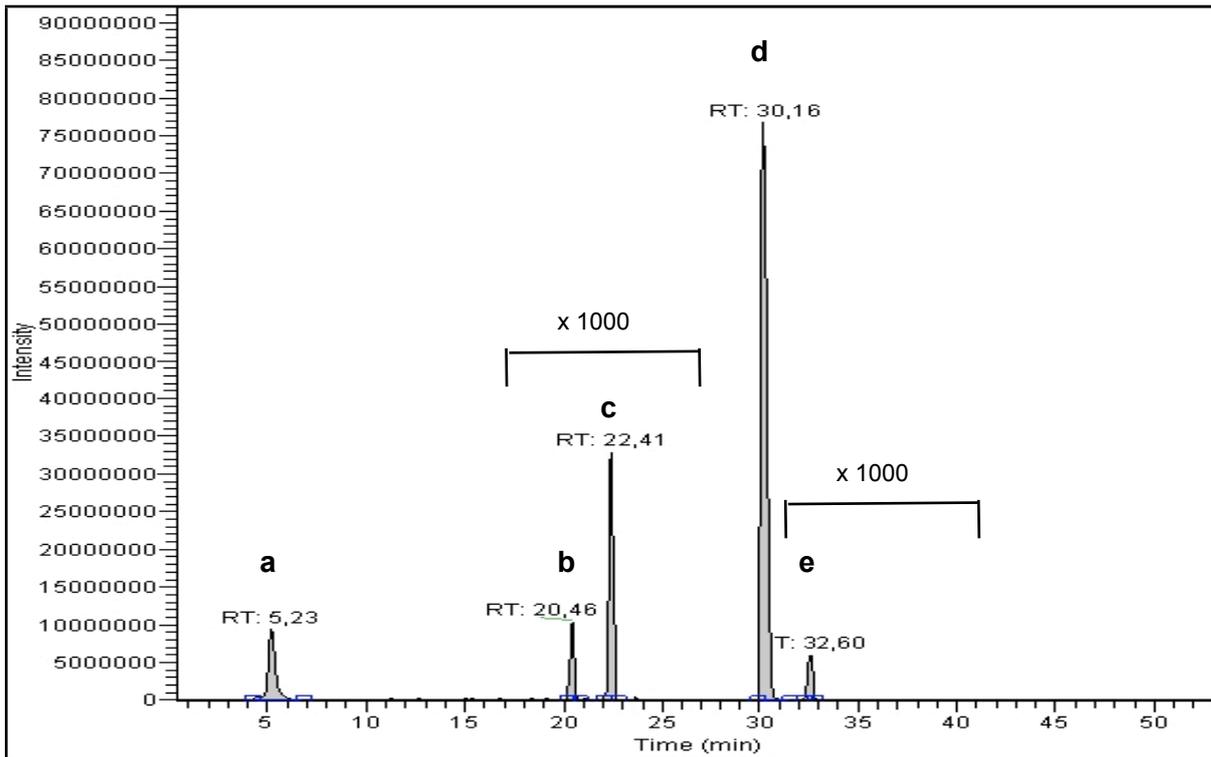


Abb.57.: LC/MS/MS-Chromatogramm einer Inkubation von Hämoglobin, PCM und Glutathion

Tab.21: Ergebnisse der Inkubationsexperimente mit Hämoglobin, Glutathion und PCM.

Probenzusammensetzung	Area GSH	Area NAPQI-GSH	Area LHCDKLHVDPE	Area LH(+NAPQI)DKLHVDPE	pmol NAPQI/mg Hb	pmol NAPQI/mg GSH
1 mg Hb 10µg GSH 50µg GluC	30318801		108068659		0	0
1mg Hb/10µg GSH/20 µg PCM/ 50ug GluC	30955281	159154	251674297	256441	84,6	308,8
1mg Hb/10µg GSH/20 µg PCM	115637223	862885			-	435
1mg Globin/10 µg GSH/20 µg PCM	62864423	131559			-	143
1mg Deoxy-Hb/ 10 µg GSH/20 µg PCM/50 µg GluC	12866309	88347	102304955	130078	105,2	402,6
10µg GSH/ 20µg PCM/50µg GluC	190808164				-	0
1 mg Deoxy-Hb/ 50µg GluC	1513618		3238295		0	-
10µg GSH/20µg PCM	167381350				-	0

5 Diskussion

Mit der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob es unter den Bedingungen einer Intoxikation mit dem Analgetikum und Antipyretikum PCM in vivo zu einer Ausbildung kovalenter Hämoglobinaddukte des lebertoxischen Metaboliten NAPQI kommt.

Ziel war es hierbei, diese Hämoglobinaddukte in vitro darzustellen, zu charakterisieren und schliesslich in vivo, in Blutproben von Patienten nach PCM-Überdosierung, nachzuweisen. Die Ergebnisse sollten hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit zur klinisch-toxikologischen Bewertung von PCM-Intoxikationen geprüft werden.

Im Folgenden werden Aussagen aus dem Ergebnisteil noch einmal aufgegriffen, mit den bereits bekannten wissenschaftlichen Erkenntnissen verglichen und im Hinblick auf ihre Bedeutung für das Ziel dieser Arbeit, aber auch zukünftiger Untersuchungen bewertet.

5.1 Diskussion der Methode

5.1.1 In vitro Adduktbildung

Die vereinfachte Untersuchung eines in vivo Geschehens mittels eines Modelles in vitro ist gerechtfertigt, wenn die zugrundeliegenden biochemischen Prozesse in vivo ausreichend untersucht und verstanden sind.

Der Metabolismus des Paracetamols (1.2.2) sowie die biochemischen Mechanismen der Hepatotoxizität (1.2.3) sind ausgiebig untersucht und beschrieben worden. NAPQI ist dabei als Intermediat von überragender toxikologischer Bedeutung in vivo identifiziert worden, und seine kovalente Bindung an nieder- und makromolekulare Nucleophile ist bekannt [52]. So konnten in vitro hergestellte NAPQI-Addukte, wie beispielsweise das NAPQI-Glutathionaddukt [99], in vivo nachgewiesen werden.

Darüber hinaus wurde im Tiermodell (Maus) nach Verabreichung hepatotoxischer Dosen von radioaktiv markiertem PCM am Hämoglobin gebundene Radioaktivität beobachtet [53]. Der Nachweis von Cysteinyl-PCM legte nahe, dass intermediäres NAPQI, welches in Form einer Michaeladdition mit Cysteinylresten des Maushämoglobins reagiert hatte, an der kovalenten Bindung in vivo beteiligt war.

Somit erschien es als zulässig, die Adduktbildung zwischen NAPQI und humanem Hämoglobin, die in vivo nicht nachgewiesen wurde, durch direkte Reaktion zwischen NAPQI und humanem Hämoglobin in vitro zu simulieren.

Zur Darstellung von NAPQI kamen mehrere Verfahren in Frage, die alle auf einer Oxidation von PCM beruhten. Die elektrochemische Umsetzung von PCM erforderte eine ausreichend leistungsfähige coulometrische Flusszelle [100]. Zur biochemischen Oxidation wurden mikrosomale Zubereitungen benötigt [99]. Als am kostengünstigsten und einfachsten

durchzuführen erschien jedoch die naßchemische Oxidation von PCM, welche mittels Blei(IV)oxid in Benzol [101] sowie Silberoxid in CHCl_3 [98] beschrieben wurde. Letztere Autoren reinigten das NAPQI nach der Umsetzung mit chromatographischen Verfahren, isolierten es (nach Sublimation) als kristalline Festsubstanz und präsentierten analytische Daten.

Die Synthese des NAPQI im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde unter den in [98] beschriebenen Bedingungen durchgeführt, wobei sich Schwierigkeiten ergaben, das NAPQI aus der Syntheselösung anzureichern und zu isolieren. Der bei der Einengung der Syntheselösung sowie der Eluate nach der Säulenchromatographie unter Vakuum plötzlich auftretende braune Niederschlag, der mit einer Entfärbung der zuvor tiefgelben CHCl_3 -Lösung einherging, sprach für eine unerwünschte Polymerisation des NAPQI. Dies legte das Ausmaß der Umsetzung sowie die Unlöslichkeit des entstandenen Produktes nahe. Der Zusatz von BHT vor der Einengung zeigte keine Wirkung auf diesen Vorgang. Der Verzicht auf eine Isolation des NAPQI aus der Syntheselösung war jedoch nicht möglich, da sich dünnschichtchromatographisch zeigte, dass neben NAPQI ($R_f=0,38$) auch das Edukt PCM ($R_f=0,08$) sowie weitere Produkte ($R_f=0,46/ 0,23$) in der Lösung vorhanden waren. Zudem trat auch hier der braune Niederschlag bereits bei 24 stündigem Stehen (4°C) auf, was auf eine (konzentrationsabhängige) Instabilität des NAPQI in CHCl_3 hindeutete.

Der Austausch des Reaktionslösemittels durch Ethylacetat und Acetonitril erbrachte keine Veränderung, während bei der Verwendung von Toluol zwar eine deutlich schwächere Färbung nach der Reaktion, jedoch keine Niederschlagsbildung zu beobachten war. Die Reaktionsausbeute lag bei der Umsetzung in Toluol bei lediglich 13%, jedoch zeigte die Dünnschichtchromatographie der Reaktionslösung mit lediglich einer einzelnen Bande ($R_f=0,36$), dass keine detektierbaren Nebenprodukte entstanden waren und darüberhinaus auch kein Edukt (PCM) mehr enthalten war. Dies war auf die Unlöslichkeit von PCM in Toluol zurückzuführen.

Die HPLC-DAD-Analyse bestätigte dieses Ergebnis. Das einzige Signal, welches im RP-System eine deutlich höhere Retention als PCM besass, zeigte ein homogenes UV-Spektrum mit Absorptionsmaxima bei 260 und 370 nm. PCM konnte nicht nachgewiesen werden.

Die durchgeführten massenspektrometrischen Untersuchungen standen im Einklang mit den Ergebnissen von [95], NAPQI wurde anhand seines Massenspektrums hinreichend identifiziert. Das Auftreten eines $[\text{M}+2]^+$ -Ions (=PCM) bei der GC/MS-Analyse des NAPQI ist ein typisches Merkmal chinoider Substanzen und ist durch Spuren an Wasser in der Ionenquelle bedingt [102]. Dieses führt zur Protonierung von NAPQI und anschließenden Reduktion des chinoiden Systems bei der Ionisation. Bisher nicht beschrieben war diese Reduktion bei der Injektion in den Gaschromatographen sowie der Electrospray-Ionisation, vermutlich liegt hier jedoch derselbe Mechanismus zugrunde.

Die im Umkehrschluss zur Synthese durchgeführte Quantifizierung des NAPQI nach

Reduktion zu PCM mittels HPLC wurde ermöglicht durch die frühe Elution und somit gute Abtrennung der Ascorbinsäure sowie die Abwesenheit von PCM in der Syntheselösung.

Da der Gehalt an NAPQI so bestimmt werden konnte und keine Nebenprodukte nachweisbar waren, wurde auf eine Isolation und chromatographische Reinigung des NAPQI verzichtet.

Die NAPQI-Lösungen zeigten bei -20°C Lagerung nach 14 Tagen keine makroskopisch festzustellende Veränderung (Niederschlag, Trübung, Farbe), bei der GC/MS-Untersuchung konnte innerhalb von fünf Stunden bei Raumtemperatur keine signifikante Abnahme des NAPQI-Signales beobachtet werden.

Die Untersuchung auf Stabilität des NAPQI im verwendeten Inkubationspuffer ergab einen linearen Zusammenhang ($r^2=0,99$) zwischen der Quadratwurzel der Konzentration und der Zeit, was in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von [96] stand.

Die Geschwindigkeitskonstante des Abbaus von $3,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol}^{1/2} \cdot \text{L}^{-1/2} \cdot \text{s}^{-1}$ lag hierbei etwa dreifach höher, was die starke Abhängigkeit vom Solvens (Ionenstärke, Puffer) und vor allem vom pH-Wert verdeutlichte. Die Michaeladdition von Nucleophilen an NAPQI ist, wie am Beispiel der Reaktion mit GSH gezeigt wurde [103], eine um Größenordnungen schnellere Reaktion (Reaktionskinetik 2. Ordnung, $k=3,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ bei $\text{pH}=7/25^{\circ}\text{C}$). So konnte bei EC/MS-Experimenten die Ausbildung des Adduktes in weniger als 1 s beobachtet werden [100]. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Hydrolyse des NAPQI im Puffer bei vorgelegtem Reaktionspartner keine relevante Konkurrenzreaktion darstellte.

Bei der Reaktion von NAPQI und Hämoglobin in vivo war von einem deutlichen Überschuss an Hämoglobin auszugehen. Dies zeigten die im Tierexperiment beobachtete Konzentration von 0.2 nmol NAPQI/mg Globin, was einer durchschnittlichen Umsetzung von ca. 0,3% des Proteins entsprach [53]. Da jedoch zur analytischen Charakterisierung des Addduktes in vitro eine ausreichende Umsetzung erzielt werden sollte, wurden zur Inkubation dem Hämoglobin bis zu äquimolare Mengen NAPQI zugesetzt.

Die Verwendung von Erythrocyten bzw. Vollblut zur direkten Adduktbildung war nicht möglich, da die Zugabe von NAPQI mit einer starken Hämolyse einherging. Diese wurde bei direkter Applikation auch im Tierexperiment beobachtet [98]. Die Frage, wie NAPQI in vivo Membranen (z.B. Mitochondrienmembran, Erythrocytenmembran) überquert, ist nicht sicher geklärt, wobei postuliert wurde, dass NAPQI in Form von stabilisierten ipso-Konjugaten mit niedermolekularen Verbindungen transportfähig ist [104].

5.1.2 Analytik des NAPQI-Hämoglobin-Adduktes

Die LC/MS-Untersuchung von Proteinaddukten, sowie auch deren direkte massenspektrometrische Analyse (z.B. MALDI) auf Ebene der intakten Proteine (ohne enzymatischen Abbau), ist nur möglich, wenn das modifizierte Protein im Verhältnis zum nichtmodifizierten Protein in hohen Konzentrationen vorkommt. Eine der wenigen Anwendungen, in denen Proteinaddukte in solch hohen Konzentrationen vorliegen, dass sie

als intaktes Molekül chromatographisch oder massenspektrometrisch analysiert werden können, ist die Bestimmung des glykosilierten Hämoglobins HbA1c [105], [106]. Dieses stellt beim Gesunden ca. 5% des gesamten HbA1.

Die Analyse des Reaktionsproduktes zwischen NAPQI und Hämoglobin in der durchgeführten Arbeit wurde zunächst ebenfalls auf Proteinebene durchgeführt. Dies rechtfertigten die hohen Konzentrationen des NAPQI, die in vitro eingesetzt werden konnten und die einen hohen Anteil an modifiziertem Hämoglobin erwarten liessen. Zudem war die durch NAPQI am Hämoglobin hervorgerufene Massenzunahme groß (+149 Da), wodurch eine Unterscheidung der $[M+xH]^{*+}$ -Ionen von Hämoglobin und Hämoglobin-Addukt auch mit einem niedrig auflösenden Massenspektrometer ermöglicht wurde.

Bedingt durch die gute flüssigkeitschromatographische Auftrennung der Globinanteile des Hämoglobins sowie die massenspektrometrische Detektion konnte hierüber nachgewiesen werden, dass die Bindung des NAPQI (zumindest im überwiegenden Maße) auf die β -Globinkette beschränkt war, und dass nur ein Äquivalent NAPQI pro β -Globin gebunden wurde.

Aus der LC/MS-Analyse am intakten Protein nicht ableitbar war jedoch die Zahl und die Lokalisation der Bindungsstellen. Zudem konnte auch nicht sicher ausgeschlossen werden, dass in geringem Umfang weitere Äquivalente NAPQI am β -Globin gebunden wurde, was durch Koelution mit dem schlecht aufgetrennten β - sowie (β +NAPQI)-Globin nicht detektiert wurde.

Allgemein gilt, dass der Nachweis von Addukten am intakten Protein sich umso schwieriger gestaltet je grösser dieses ist. Denn je grösser ein Protein, desto geringer wird der Unterschied der chemisch-physikalischen Eigenschaften zu seinem entsprechenden, durch einen niedermolekularen Bindungspartner modifizierten Addukt. Mit zunehmender Molekülgrösse ist deshalb eine Erhöhung der Auflösung spektraler und chromatographischer Methoden nötig, tandemmassenspektrometrische Verfahren können nicht angewandt werden.

Deshalb werden Proteinaddukte, insbesondere wenn deren Konzentration sehr gering ist, nicht am intakten Protein nachgewiesen. Da kovalent gebundenes NAPQI am Hämoglobin in vivo nur in sehr geringen Konzentrationen zu erwarten war (im Tierexperiment 200 pmol/mg, [53]) konnten diese nicht wie die in vitro hergestellten Addukte analysiert werden, sondern es musste ein empfindlicheres Verfahren gefunden werden.

Die überwiegende Mehrzahl aller bisher beschriebenen analytischen Methoden zur Untersuchung von Addukten niedermolekularer Verbindungen an Proteine weisen prinzipiell ein ähnliches analytisches Vorgehen auf. Nach Isolation des Proteins werden die Addukte aus diesem freigesetzt. Die Freisetzung kann sowohl direkt, durch Abspaltung des niedermolekularen Bindungspartners vom Protein, als auch indirekt, durch Bildung modifizierter Aminosäuren oder modifizierter Peptide, erfolgen. Anschliessend werden die

freigesetzten Addukte (bzw. die modifizierten Aminosäuren oder Peptide) isoliert und mit einer geeigneten Analysenmethode nachgewiesen.

Dieses prinzipielle Vorgehen wurde auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewandt, die wichtigsten Aspekte werden im Folgenden erläutert.

5.1.2.a Isolation des Hämoglobins

Die Isolation des Hämoglobins gestaltete sich einfach aus Blut, welches durch Antikoagulantien (EDTA, Citrat, Heparin) ungerinnbar gemacht wurde. Durch Zentrifugation und mehrfaches isotones Waschen sowie die anschließende Lyse der isolierten Erythrozyten konnten Hämolysate mit ca. 1mM Hämoglobin gewonnen werden. Da andere Proteine in Erythrocyten nur in niedrigen Konzentrationen vorkommen, besaßen die Hämolysate einen Hämoglobinanteil von ca. 95% [107]. Hämoglobin aus hämolytischen Vollblutproben wurde nicht isoliert, da hier keine intakten Erythrocyten mehr abgetrennt werden konnten. Aufgrund des hohen Hämoglobingehalts im hämolytischen Vollblut, der Spezifität der Methode und insbesondere der Möglichkeit zur internen Standardisierung (s.u.) erschien es gerechtfertigt, hämolytisches Vollblut direkt zu untersuchen.

5.1.2.b Freisetzung und Nachweis des Adduktes aus dem Hämoglobin

Zur Freisetzung und dem Nachweis des Adduktes wurden folgende Methoden in Betracht gezogen:

Direkte Abspaltung des Adduktes und Nachweis:

Die Freisetzung von an Cystein gebundenen Resten kann durch Spaltung mit Raney-Nickel erfolgen [108]. Dabei wird die C-S-Bindung des Adduktes gespalten, Schwefel als Schwefelwasserstoff entfernt und eine neue C-H-Bindung gebildet. Am Cystein gebundenes NAPQI würde in diesem Fall als freies PCM abgespalten.

Dieses müsste abgetrennt und mit einem geeigneten und ausreichend empfindlichen Analysenverfahren letztlich nachgewiesen werden.

Freisetzung und Nachweis modifizierter Aminosäuren:

Die einfachste Methode zum Nachweis von Substanzen, die am Hämoglobin über dessen N-terminales Valin binden (z.B. Alkylantien) ist die „N-Alkyl-Edman-Methode“ [16].

Bei dieser wird durch Umsetzung des Hämoglobins mit Pentafluorphenylisothiocyanat (PFPICT) unter neutralen pH-Bedingungen eine selektive Abspaltung des substituierten N-terminalen Valin-Restes als Phenylthiohydantoin bewirkt. Neben der Freisetzung ist gleichzeitig eine Derivatisierung erfolgt, so dass das abgespaltene Valinaddukt nach Extraktion mittels GC/MS bei negativer chemischer Ionisation (NCI) sehr empfindlich

nachgewiesen werden kann.

Die Untersuchungen von *Axworthy et al* am Maushämoglobin zeigten jedoch, dass nach Applikation hepatotoxischer Dosen PCM eine kovalente Bindung von NAPQI ausschliesslich an der Aminosäure Cystein stattfand [53]. Eine Bindung am N-terminalen Valin, das murinem und humanem Hämoglobin gemeinsam ist, wurde hingegen nicht beobachtet.

Zur Freisetzung modifizierten Cysteins müsste letztlich eine Totalhydrolyse des Hämoglobins durchgeführt werden, bei der das Protein in 6M HCl bei 110°C zu Aminosäuren abgebaut wird und die modifizierten Aminosäuren dann nachgewiesen werden [109].

Freisetzung und Nachweis modifizierter Peptide:

Die Entwicklung der Electrospray-Ionisation [110] hat zu einer enormen Vereinfachung der Proteinsequenzierung mittels Massenspektrometrie geführt. Sie wird heute in einer Vielzahl von Anwendungen zur Proteincharakterisierung („Proteomics“) eingesetzt, wozu auch die Untersuchung kovalenter Proteinaddukte zählt.

Eine Reihe von in vitro hergestellten Hämoglobinaddukten (Methylbromid, Epichlorhydrin, Styrenoxid) wurden bereits mit dieser Analysetechnik untersucht, wobei es möglich war, auch die genauen Bindungsstellen im Protein zu lokalisieren.

Dabei ist es von entscheidender Bedeutung, die zu untersuchenden Proteine mittels spezifischer Proteasen in kleinere Peptide zu zerlegen, deren Aminosäuresequenz (und die entsprechenden Modifikationen) dann durch Tandemmassenspektrometrie ermittelt werden kann. Da zum Nachweis des Adduktes neben der Retentionszeit auch das jeweilige Fragmentenmuster herangezogen werden kann, besitzt die Methode eine sehr hohe Spezifität. Gleichzeitig kommt es, bedingt durch die zweistufige Massenanalyse, bei der Tandemmassenspektrometrie zu einer Reduktion des Untergrundrauschens („Background noise“), was mit einer Erhöhung des Signal/Rausch-Verhältnisses und damit günstigen Nachweisgrenzen einhergeht [111]. Nachweisgrenzen, die vergleichbar der GC/NCI/MS-Analytik sind, werden durch Miniaturisierung des flüssigkeitschromatographischen Systems („nano-flow“, Säulendurchmesser 75-300µm) erreicht. Durch die äußerst geringen Flussraten (nL-µL/min) kommt es zu einer ausgeprägten Steigerung der Effizienz des Electrosprays und einem starken Empfindlichkeitsanstieg [112], [113].

Angewandte Methode zur Freisetzung und Nachweis des Adduktes:

Der Nachweis kovalenter Addukte von NAPQI am Hämoglobin im Rahmen dieser Arbeit wurde über den Nachweis modifizierter Peptide nach enzymatischer Freisetzung mittels LC-(ESI)-MS(/MS) durchgeführt. Die Methode wurde ausgewählt, weil sie sich unter den beschriebenen Methoden als vergleichsweise selektiver darstellte und darüberhinaus als einzige gestattete, neben dem Nachweis einer kovalenten Bindung von NAPQI auch dessen genaue Bindungsstellen zu lokalisieren. Darüber hinaus wurde das Messprinzip als leichter übertragbar auf andere Fragestellungen und damit universeller angesehen als die Methoden,

die auf einem direkten Nachweis des Adduktes oder modifizierter Aminosäuren beruhen. Die selektive Bindung des NAPQI an nur einer Stelle im Hämoglobin, dem Cys93 der β -Globinkette vereinfachte die Untersuchungsmethode, da die Detektion auf zwei Peptide (LH(C+NAPQI)DKLHVDPE / LHCDKLHVDPE) beschränkt werden konnte. Dabei bot sich das native Peptid LHCDKLHVDPE als interner Standard an, da es bei der Proteolyse in gleichem Umfang wie LH(C+NAPQI)DKLHVDPE entstehen sollte. Somit konnten Variationen im Proteolysegrad sowie im Hämoglobingehalt der Probe ausgeglichen werden. Dies erschien für die Arbeit als besonders geeignet, da als Untersuchungsmaterial teilweise hämolytische Vollblutproben eingesetzt wurden, die neben Hämoglobin auch Serumbestandteile enthielten.

5.1.2.c Freisetzung des modifizierten Peptides durch Proteolyse

Trypsinhydrolyse

Trypsin ist die in der Proteinanalytik am häufigsten eingesetzte Protease. Dies ist begründet durch die hohe Spezifität, die Häufigkeit der Schnittstellen und die Grösse der entstehenden Peptide. Arginin und Lysin, an deren C-Terminus die Hydrolyse durch Trypsin stattfindet (von einigen Ausnahmen abgesehen, siehe 3.3.6) stellen 5,6% bzw. 5,7% aller Aminosäuren des „Human genome protein file“ [95]. Dies bedeutet, dass in humanen Proteinen durchschnittlich mehr als jede zehnte Aminosäure durch Trypsin gespalten werden kann. Bei der Hydrolyse entstehen Peptide mit einer für die Sequenzierung mittels Tandemmassenspektrometrie geeigneten Grösse (<3000 Da), die dazu am C-terminalen Ende immer eine basische Aminosäure tragen, welche sich im positiven Electrospray gut ionisieren lässt.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Proteolyse des Hämoglobins zunächst mit dieser Protease durchgeführt. Es zeigte sich jedoch, dass sich grössere Teile der Aminosäuresequenz wie α (100-127) und β (83-120) nicht in entsprechenden Peptiden wiederfanden. Die fehlenden Peptide stellten den hydrophoben inneren Teil des Hämoglobinmoleküls („Hydrophobic Core“) dar und enthielten allesamt Cystein.

Unter den alkalischen Bedingungen eines Trypsinverdaus kam es vermutlich zur Ausbildung von homo- und heterodimeren Disulfiden, die massenspektrometrisch schwer zu detektieren sind, was bereits an anderer Stelle beschrieben wurde [114]. Im Rahmen der Untersuchung von Hämoglobinopathien, die durch Substitution von Aminosäuren im „Hydrophobic Core“ des Hämoglobins ausgelöst werden, wurde ein Verfahren entwickelt mit welchem die tryptischen Peptide des „Hydrophobic Core“ (β T10- β T12) detektiert werden konnten [115]. Dazu wurde eine Derivatisierung der Cysteinygruppen in Form einer Oxidation zu Cysteinsäure durchgeführt.

Da zum Nachweis von Addukten am Cystein eine solche Derivatisierung als ungünstig erschien (hinsichtlich einer möglichen Veränderung der Addukte und der Quantifizierung), wurden alternativ die Spaltung mit HCOOH und die Hydrolyse mit V8-Protease untersucht.

Spaltung mit Ameisensäure:

Spezifische chemische Hydrolyseverfahren für ausgewählte Peptidbindungen sind die Cyanbromidspaltung am Methionin [116] sowie die Spaltung an Aspartylresten durch Ameisensäure [95].

Da humanes Hämoglobin nur drei Methionin enthält, kann es mittels Cyanbromidspaltung nicht ausreichend hydrolysiert werden. Asparaginsäure ist hingegen eine deutlich häufiger vorkommende Aminosäure (4,9% des „Human Genom Protein Files“), so dass eine Hydrolyse hier als effektiv angesehen wurde. Nach Hydrolyse des Hämoglobins mit den beschriebenen Bedingungen von [95] konnten jedoch Teile der β -Globinsequenz nicht in den entsprechenden Peptiden wiedergefunden werden. Der Vergleich der experimentell bestimmten Peptidmassen mit den theoretisch berechneten zeigte in grösseren Teilen keine Übereinstimmung, was darauf hindeutete, dass neben der Hydrolyse von Aspartylresten störende Nebenreaktionen (wie z.B. Formylierungen (+28 Da), Bildung von Pyroglutamat, Cyclisierungen (-18 Da)) abgelaufen waren. Zudem konnten mehrere Peptide desselben Sequenzbereiches detektiert werden, die sich in den endständigen Aspartylresten (+/- 115 Da) unterschieden. Dies war als mechanistisch bedingt anzusehen, denn die Hydrolyse, die über ein cyclisches Intermediat vermittelt wird, kann sowohl N- als auch C-terminal zum Aspartylrest eintreten [95].

Obwohl die Methode kurze Hydrolysezeiten (2h) ermöglichte und ohne störende Puffer arbeitete, erschien die Hydrolyse für die vorgesehene Untersuchung nicht als sehr geeignet, da möglicherweise dasselbe Addukt in mehreren unterschiedlichen Peptiden auftauchen könnte, was die Nachweisgrenze negativ beeinflussen und die Quantifizierung erschweren würde.

Spaltung mit V8-Protease:

Endoproteinase GluC, gewonnen aus *Staphylococcus aureus* (V8-Protease), wird bereits als hydrolytisches Enzym in der Hämoglobinanalytik (Bestimmung des HbA1c) eingesetzt [117]. Das Enzym besitzt eine Spezifität für Glutamatreste in Ammoniumacetat bei pH 4,0 [118], [96]. Dies erschien günstig, da Cysteinyreste in schwach saurem Milieu eine höhere Oxidationsstabilität besitzen. Die Untersuchung der Peptide nach Proteolyse ergab eine vollständige Wiederfindung der Aminosäuresequenz von α - und β -Globin, was eine Identifikation möglicher Bindungsstellen im gesamten Hämoglobinmolekül gewährleistet. Weshalb chargenabhängige Unterschiede im Hydrolysemuster, bei der auch Spaltungen an anderen Aminosäuren beobachtet wurden, auftraten, bleibt unklar, jedoch wurde hieraus kein nachteiliger Effekt erkennbar. Bei der Identifizierung der NAPQI-Bindungsstellen war dies sogar vorteilhaft, da zusätzliche Hydrolysestellen einen stärkeren Abbau des (an Glutamat armen) α -Globins verursachten. Eine Beeinträchtigung der späteren Quantifizierung durch diese zusätzlichen Hydrolysestellen konnte durch die Verwendung des nativen Peptides als internen Standard ausgeschlossen werden.

5.1.2.d Nachweisgrenze

Die erzielte Nachweisgrenze von 1pmol/mg ist hoch im Vergleich zu den Nachweisgrenzen, die zum Teil bei den Bestimmungen von N-Alkyl-Valin-Addukten mittels GC/NCI/MS (z.B. [119], [120], 1-10 fmol) erreicht wurden. Sie zeigte sich aber vergleichbar mit ähnlichen HPLC-MS/MS-Untersuchungsmethoden, wie z.B. dem Nachweis von Methylbromid-Hämoglobinaddukten ([121], 0,75 pmol/mg).

Die Untersuchungsmethode von *Muldrew et al* [54] zum Nachweis von NAPQI-Cysteinaddukten, erlaubte den Nachweis von ca. 3 pmol/mg Protein. Darüber hinaus lagen die im Tierexperiment [53] beobachteten Konzentrationen von kovalent gebundenem NAPQI am Maushämoglobin bei 200pmol/mg und damit zwei Größenordnungen oberhalb der ermittelten Nachweisgrenze.

Deshalb wurde die erreichte Nachweisgrenze als ausreichend angesehen, eine niedrigere Nachweisgrenze hätte eine zusätzliche Anreicherung des LH(C+NAPQI)DKLHVDPE-Peptides sowie eine weitere Miniaturisierung der HPLC mit einer Verbesserung der massenspektro-metrischen Detektion erfordert.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 In vitro Adduktbildung

Die Ausbildung kovalenter Hämoglobinaddukte ist prinzipiell eine Reaktion einer elektrophilen Spezies mit Nucleophilen innerhalb des Proteins, wobei unterschiedliche Reaktionsmechanismen (z.B. SN1, SN2, 1,4-Addition) zugrunde liegen können.

Für die Reaktion eines einfachen Alkylanz (Methylbromid) mit einem nucleophilen Bindungspartner (SN2) fanden *Swain und Scott* [122] die Beziehung $\log(k_y/k_{H_2O})=S^*N$, wobei k_y die Reaktivität des Alkylanz gegenüber dem nucleophilen Partner und k_{H_2O} die Reaktivität gegenüber Wasser beschreibt. „S“ ist die Substratkonstante und „N“ die Stärke des Nucleophils. Schwefel in Thiolen besitzt dabei eine Nucleophilie von $N \approx 5$, Stickstoff (primäre Amine und Heterocyden) $N \approx 3-5$ und Sauerstoff (Carboxylgruppen und Hydroxylgruppen) $N \approx 1-4$. Bezogen auf Biomoleküle ergibt sich daraus eine prinzipiell abnehmende Nucleophilie der Reihenfolge Protein-SH > Protein-NH₂ > DNA-N > DNA-O [12].

Wie aus der *Swain-Scott*-Beziehung ersichtlich ist, beeinflusst auch die Art des elektrophilen Bindungspartners die Reaktion. So können unterschiedliche Alkylanzien am gleichen Protein an deutlich verschiedenen Aminosäureresten reagieren und entsprechend unterschiedliche Adduktmuster hervorrufen. Dies wurde in vitro am Hämoglobin mit Ethylenoxid und N-(2-Hydroxyethyl)-N-nitrosoharnstoff gezeigt [123]. In Anlehnung an die Terminologie von [124] werden harte und weiche Elektrophile unterschieden. Elektrophile, die über ein großes, wenig polarisierbares Akzeptoratom mit leicht anregbarem Elektronensystem verfügen,

werden als „weiche“ Elektrophile, während Elektrophile mit starker positiver Ladung und von kleiner Größe als „hart“ bezeichnet werden.

In Analogie zu [124] reagieren „harte“ Elektrophile (z.B. Alkylcarbeniumionen) bevorzugt mit „harten“ Nucleophilen (z.B. Purin/Pyrimidin-Sauerstoff), während „weiche“ Elektrophile (z.B. α - β -ungesättigte Carbonylverbindungen) mit „weichen“ Nucleophilen (z.B. Cystein-SH) reagieren [12].

Vor diesem Hintergrund war bei der untersuchten Reaktion zwischen NAPQI und dem Hämoglobin prinzipiell eine bevorzugte Bindung des NAPQI („weiches Elektrophil“) an Cysteinylreste („weiches Nucleophil“) des Hämoglobins anzunehmen. Allerdings spielen bei der Reaktion mit Biopolymeren stets auch sterische Effekte, mechanistische Einflüsse sowie die Reaktionsumgebung (pH, Ionenstärke) eine große Rolle, so dass sich die Vorhersage des Bindungsverhaltens schwierig gestaltet.

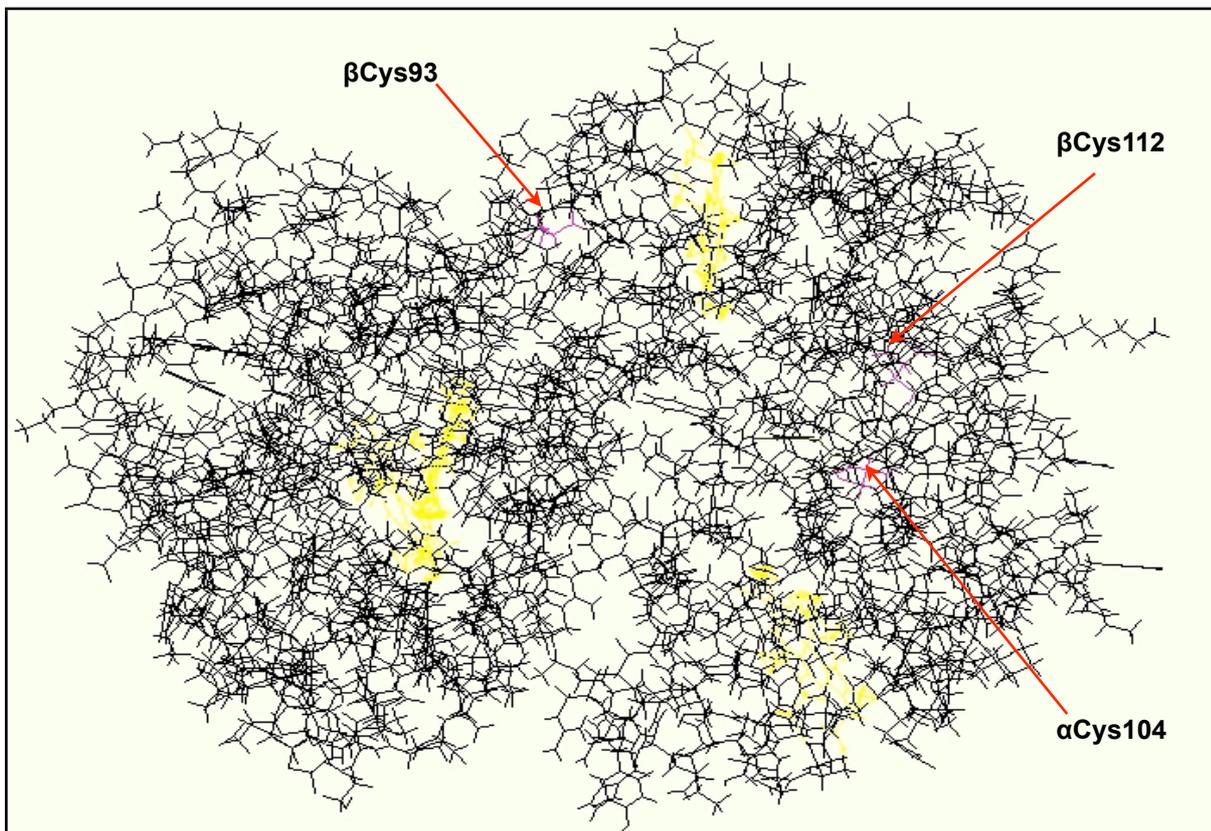


Abb.58: Molekülmodell des Hämoglobins nach [125] (Hämgruppen sind gelb (hell) gezeichnet, Cysteinreste jeweils nur einmal dargestellt)

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde kovalent gebundenes NAPQI am humanen Hämoglobin nur an einer einzelnen Aminosäure, dem β Cys93, gefunden. Dies steht im Einklang mit den obigen Überlegungen und bestätigt die Ergebnisse von Axworthy [53]. Sie zeigten, dass Cystein die einzige Aminosäure ist, welche nach Verabreichung hepatotoxischer Dosen PCM im murinen Hämoglobin durch NAPQI modifiziert wird.

Dabei konnte mit der vorliegenden Arbeit darüber hinaus gezeigt werden, dass die Bindung am humanen Hämoglobin selektiv an nur einem von drei möglichen Cysteinyresten (β Cys93, β Cys112, α Cys104) erfolgt. Abb.58 zeigt ein Modell des Hämoglobins (NMR, [125]) mit den Lokalisationen der Cysteinreste, wobei diese im Tetramer ($\alpha_2\beta_2$) jeweils zweimal vorhanden sind.

Während die Thiofunktion des Cys93 der β -Globinkette an der Oberfläche des Moleküls exponiert ist, liegen die Thiofunktionen von β Cys112 und α Cys104 weiter innerhalb des Tetramers und sind schlechter zugänglich [126], [127]. Daraus resultiert eine erhöhte Reaktivität gegenüber Elektrophilen, die bereits an anderer Stelle experimentell nachgewiesen wurde [126],[127],[128]. So konnte beispielsweise eine selektive Bindung am β Cys93 für Stickstoffmonoxid (NO) gezeigt werden, nur bei einem sehr grossen Überschuss an NO (100:1) konnte auch eine Bindung an α Cys104 und β Cys112 beobachtet werden. Ob eine solche auch mit einem Überschuss des NAPQI am Hämoglobin auftritt, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht und kann somit nicht beantwortet werden. Jedoch ist von solch einem Überschuss des NAPQI gegenüber Hämoglobin in vivo nicht auszugehen, was die geringe Umsetzung des Hämoglobins im Tierexperiment [53] selbst bei sehr hohen PCM-Dosen gezeigt hat.

Die unterschiedliche Reaktivität der Cysteinyreste im Hämoglobin wurde auch bei der Reaktion von Methylbromid mit Hämoglobin in vitro [128] beobachtet. Bei einem Überschuss an Methylbromid (10x) traten Methylierungen an einer Vielzahl von unterschiedlichen Aminosäureresten (15 α , 11 β) auf, wobei alle Cysteinyreste vollständig methyliert waren. Bei Verwendung äquimolarer Mengen an Methylbromid und Hämoglobin zeigte sich eine unterschiedliche Methylierung von β Cys93: α Cys104: β Cys112 im Verhältnis 7:2:1.

Die besondere Reaktivität des β Cys93 zeigt sich desweiteren auch darin, dass dieses als einziger Cysteinrest des Hämoglobins in vivo ein kovalentes Glutathionaddukt bildet [129].

5.2.2 Diskussion der Ergebnisse am Hämoglobin aus isolierten Erythrocyten

In keiner der Blutproben von Patienten nach PCM-Exposition, aus denen Hämoglobin nach Isolation und Waschen der Erythrocyten gewonnen wurde, konnte kovalent gebundenes NAPQI nachgewiesen werden, obwohl bei mehreren Patienten (PS, SS1, CS, BW) nachweislich massive Intoxikationen bestanden hatten und zudem im Tierexperiment eine solche Bindung nachgewiesen wurde [53].

Allein durch die hohen Konzentrationen an PCM im Serum der Patienten (bis 340 mg/L) bestand nach allgemein gültiger Auffassung ein hohes Risiko bezüglich einer Hepatotoxizität (Rumack-Matthew), wenngleich auch keine laborchemischen Daten (AST/ALT, PT, Bilirubin) der Patienten zur Verfügung standen, anhand derer eine Leberschädigung ersichtlich gewesen wäre.

Tierexperimentelle Untersuchungen [54] haben gezeigt, dass kovalent gebundenes NAPQI

sowohl in der Leber, als auch im Serum bereits 15 Minuten nach i.p.-Applikation und damit weit vor Eintritt der Leberschädigung nachweisbar ist. Auch bei der Untersuchung von humanen Serumproben nach PCM-Intoxikation konnten kovalente NAPQI-Cystein-Addukte im Serumprotein bereits 2h nach Ingestion ohne Nachweis einer Leberschädigung (AST=16/ALT=35) beobachtet werden.

Eine Verhinderung der NAPQI-Bindung an Hämoglobin durch eine Behandlung mit NAC, die bei den Patienten mit hohem Risiko für eine Leberschädigung vorgenommen wurde, ist nicht zu erwarten, denn die kovalente NAPQI-Bindung im Tiermodell wurde auch beobachtet, wenn durch eine Verabreichung von NAC (bis zu 2h nach i.p.-Applikation des PCM) die Leberschädigung verhindert wurde [130]. Darüberhinaus wurden auch die Patienten von [70], bei denen NAPQI-Cys im Serumprotein nachgewiesen werden konnten, allesamt mit NAC behandelt.

Die NAPQI-Hb-Addukte, die bei der Untersuchung am Mausmodell mit Dosierungen von 400mg/kg beobachtet wurden, lagen in einem Bereich von 0,2 nmol/mg Hb. Mit der beschriebenen Methode (Nachweisgrenze ca. 1pmol/mg) sollten NAPQI-Hb-Addukte am humanen Hämoglobin auch in einem deutlich niedrigeren Konzentrationsbereich nachweisbar sein. Trotzdem konnten diese in keiner der untersuchten Probe nachgewiesen werden.

Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz gegenüber den Experimenten im Tierexperiment [53] könnten unterschiedlich reaktive Cysteinreste in humanem Hämoglobin und Hämoglobin von Nagetieren sein [131]. β Cys93, an welchem die NAPQI-Bindung in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurde, liegt in einem hoch konservierten Bereich des Moleküls. Dieser weist bei vielen Spezies eine identische Aminosäuresequenz auf, so dass auch Mäuse- und Rattenhämoglobin β Cys93 enthält. Darüberhinaus wurden bei Nagetieren weitere Cysteinylreste nachgewiesen. Rattenhämoglobin besitzt an Position β 125 ein Cystein, welches gegenüber Elektrophilen eine außerordentlich hohe Reaktivität aufweist [121]. So zeigte sich, dass die Umsetzung mit DTNB (5,5-Dithio-bis-(2-Nitro-Benzoessäure)) am β Cys125 mit einer 4000fach höheren Geschwindigkeit ablief als am β Cys93 und darüber hinaus um einen Faktor 100 schneller war als die Reaktion mit Glutathion. Mit einem auf der Umsetzung von Benzochinon beruhenden Assay zum Nachweis von „fast-reacting Cysteins“ [132], konnten solche hochreaktiven Cysteine auch im Hämoglobin des Meerschweinchens (ebenfalls β Cys125), im Hämoglobin von Mäusen, nicht jedoch in humanem Hämoglobin nachgewiesen werden. Bei Mäusen wird die β -Globinkette entweder in einer einzigen Form (z.B. C57-Mäuse) oder aber in diffuser Form (z.B. DBA-Mäuse) exprimiert [29 aus 144], weshalb bei diesen vom Stamm abhängige Unterschiede sichtbar wurden. C57 Mäuse zeigten keine hochreaktiven Cysteinreste, während DBA-Mäuse ein schnell reagierendes Cystein besitzen, welches als β 13Cys identifiziert wurde.

BALBc-Mäuse, bei denen im Tierversuch die kovalente NAPQI-Bindung am Hämoglobin nachgewiesen wurde, besitzen ebenfalls dieses reaktive β 13Cys [133].

Hieraus kann geschlossen werden, dass die Reaktion von NAPQI mit BALBc-Mäusehämoglobin und humanem Hämoglobin nicht direkt vergleichbar ist, denn das BALBc-Mäusehämoglobin weist eine bedeutend höhere Reaktivität gegenüber Elektrophilen auf als humanes Hämoglobin. Insbesondere ist zu bedenken, dass die BALBc-Hämoglobinreaktivität um ein Vielfaches höher ist als die des Glutathions, was bei humanem Hämoglobin nicht der Fall ist. In Erythrocyten besitzt GSH eine Konzentration ca. $10\mu\text{mol/g Hb}$ [134], was bedeutet, dass GSH in Erythrocyten in einer mit Hämoglobin vergleichbaren Stoffmenge enthalten ist. Aufgrund des hohen Reaktivitätsunterschiedes ist es vorstellbar, dass NAPQI in humanen Erythrocyten durch GSH gebunden wird, während es in Mäuseerythrocyten bevorzugt mit dem βCys13 reagiert.

5.2.3 Diskussion der Ergebnisse in hämolysierten Vollblutproben

Kovalent gebundenes NAPQI konnte in 50 der 65 Proben, bei denen Hämoglobin aus hämolysierten Vollblutproben untersucht wurde, nachgewiesen werden. Dabei fiel auf, dass NAPQI hier in teilweise sehr grosser Menge ($>600\text{pmol/mg Hb}$) am Hämoglobin gebunden wurde. Die im Tierexperiment festgestellten Konzentrationen (200pmol/mg) wurden deutlich überschritten und auch die Konzentrationen an kovalentem NAPQI im Serum, die bei Patienten nach PCM-Intoxikation nachgewiesen wurden, lagen niedriger (pmol/mg [58]). Darüber hinaus zeigte sich, dass kovalent gebundenes NAPQI nur in den Proben nachgewiesen wurde, in denen auch freies PCM enthalten war. Zudem war eine Korrelation zwischen freier PCM und NAPQI-Hb-Konzentration erkennbar.

In vivo gebildete Hämoglobinaddukte werden im Allgemeinen sehr langsam abgebaut, die Stabilität ist bedingt durch die Lebensdauer der Erythrocyten, die zwischen verschiedenen Species variiert [19]. Bei einer akuten Exposition von humanem Hämoglobin mit NAPQI, wie es im Rahmen einer akuten PCM-Intoxikation zu erwarten wäre, würden in Erythrocyten jeden Alters NAPQI-Hb-Addukte gebildet werden. Da die Lebensdauer von Erythrocyten im Menschen etwa 126 Tage beträgt, wäre davon auszugehen, dass täglich $1/126$ der NAPQI-Addukte abgebaut würden, was einer Eliminationskinetik 0. Ordnung entspricht. Einen Abfall der NAPQI-Hb-Konzentration auf die Hälfte („Halbwertszeit“) würde man nach 63 Tagen erwarten.

Dem widersprechen die Ergebnisse der Untersuchungen der Patienten, von denen mehrere Blutproben zur Verfügung standen, die in zeitlicher Abfolge entnommen worden waren.

Auch wenn die genauen zeitlichen Abstände der Blutentnahmen nicht bekannt waren, zeigt der Abfall der PCM-Serumkonzentrationen ($\text{HWZ}<4\text{h}$), dass die Abstände nicht mehr als 24 Stunden betragen. Bereits in dieser kurzen Zeit war ein nicht erklärbarer Abfall der NAPQI-Hb-Konzentration festzustellen, der gegen eine in vivo-Entstehung der nachgewiesenen Addukte spricht.

Die starke Abnahme der NAPQI-Hb-Addukte nach Proteinpräzipitation (bei 6 von 9 Proben

konnte nach Aceton/HCl-Präzipitation überhaupt kein NAPQI-Hb mehr nachgewiesen werden) zeigte, dass an der Bildung der nachgewiesenen Addukte Species beteiligt sein mussten, die durch Behandlung mit Aceton/HCl entfernt wurden. Als solche erschienen am ehesten freies PCM (löslich in Aceton/HCl) sowie Häm in Frage zu kommen, welche beide bei der Präzipitation abgetrennt wurden.

Der Verbleib an gebundenem NAPQI bei 3 der 9 Proben auch nach der Präzipitation könnte daneben auf eine Entstehung bei der Lagerung der Proben hindeuten. Durch die in vitro-Inkubationsexperimente konnte gezeigt werden, dass es letztlich unter den Bedingungen der Probenaufarbeitung (V8-Proteasenverdau, Ultrafiltration) zu einer ausgeprägten kovalenten Bindung von PCM an Hämoglobin in Anwesenheit von freiem PCM (100 mg/L) kommt.

Dabei scheint Häm hierfür unerheblich zu sein, denn auch die Inkubation von (hämfreiem) präzipitiertem Globin mit PCM führte zur dessen kovalenter Bindung am β Cys93.

Zur Klärung der Ursache dieser Reaktion zwischen freiem PCM und β Cys93 schien es sinnvoll ein zweites, einfacher nachweisbares Cysteinderivat mit zu untersuchen. Die Reaktion zwischen NAPQI und GSH ergab zwei NAPQI-GSH-Additionsprodukte, was auch an anderer Stelle bereits beschrieben wurde [104].

Die Inkubation von GSH und PCM führte nicht zur Bildung eines NAPQI-GSH-Adduktes, woraus geschlossen werden kann, dass PCM unter den verwendeten Bedingungen nicht spontan (z.B. Luftsauerstoff) oxidiert wurde.

Die Inkubation aus PCM, GSH und V8-Protease, bei der ebenfalls kein NAPQI-GSH-Addukt gebildet wurde, zeigte, dass auch das verwendete Enzym nicht ursächlich für die Reaktion sein konnte.

Jedoch ergab die Inkubation von Hämoglobin, Deoxyhämoglobin sowie präzipitiertem Globin in Anwesenheit von PCM und GSH jeweils NAPQI-GSH-Addukt. Daraus konnte geschlossen werden, dass eine Reaktion des Proteinanteils des Hämoglobins mit dem PCM erfolgt sein musste, welches dann (vermutlich über intermediäres NAPQI) am β Cys93 kovalent gebunden wurde.

Die Ergebnisse der Inkubation von Hämoglobin, GSH und PCM mit V8-Proteasenverdau deuten darauf hin, dass die Addition von NAPQI am GSH stärker ausgeprägt war als am β Cys93, was aufgrund der unterschiedlichen Reaktivität der Cysteinreste (s.o.) zu erwarten wäre.

Als Reaktionspartner im Protein, der möglicherweise in der Lage wäre, PCM zu oxidieren, kommen disulfidische Cystinreste in Betracht. Humanes Hämoglobin besitzt diese in Form des Glutathionyl-Hämoglobins, bei welchem vom Cystein eines Glutathions und dem β Cys93 ein heterodimeres Disulfid gebildet wird.

Zur Beantwortung der Frage, ob dieses in der Lage ist, PCM zu oxidieren, sind weitere Experimente erforderlich, die nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden.

5.3 Fazit

Kovalente Hämoglobinaddukte des lebertoxischen PCM-Metaboliten NAPQI konnten, nach Isolation des Hämoglobins aus Blutproben von Patienten mit PCM-Intoxikation, nicht nachgewiesen werden.

Sie sind somit keine geeigneten Biomarker einer Intoxikation und können nicht zur Beurteilung einer Intoxikation herangezogen werden. Offen bleibt die Frage, ob NAPQI-Addukte am humanen Hämoglobin bei PCM-Intoxikationen überhaupt nicht gebildet werden, oder ob sie in solch geringer Konzentration auftreten, dass die Nachweisgrenze der verwendeten Analysenmethode (ca. 1 pmol NAPQI/mg Hb) einen Nachweis nicht gestattet.

Die Diskrepanz zu den Ergebnissen im Tierversuch, bei denen nach Verabreichung hepatotoxischer Dosen an PCM hohe Konzentrationen an NAPQI-Hb-Addukten (200 pmol NAPQI/mg Hb) beobachtet wurden, kann mit den beschriebenen Unterschieden zwischen humanem und murinem Hämoglobin erklärt werden. Hierbei könnte ausschlaggebend sein, dass humanes Hämoglobin eine deutlich geringere Reaktivität als Glutathion gegenüber Elektrophilen zeigt und NAPQI in humanen Erythrocyten deshalb bevorzugt mit Glutathion reagiert.

Der Nachweis hoher Konzentrationen an NAPQI-Hb (>600 pmol NAPQI/mg Hb) in hämolysierten Vollblutproben verdeutlicht, dass bei der Verwendung von Proteinaddukten als Biomarker sichergestellt werden muss, dass die nachgewiesenen Addukte auf eine Entstehung in vivo zurückzuführen sind. Es ist möglich, dass überlagernde Nebenreaktionen in vitro zu einer Verfälschung der Ergebnisse und damit zu einer fehlerhaften Beurteilung führen. Das Auftreten solcher störender Nebenreaktionen, die letztlich zu einer Adduktbildung in vitro geführt haben, wurde z.B. auch bei der Untersuchung von Ethylenoxid-Addukten des Hämoglobins beobachtet [135]. Dabei war bei Lagerung der Proben eine signifikante Zunahme der Adduktkonzentrationen zu beobachten, was vermutlich durch die Bildung von Ethen verursacht worden war, letztlich jedoch nicht nachgewiesen wurde. Die solchen unerwünschten Nebenreaktionen zugrundeliegenden Mechanismen können unterschiedlichster Natur sein, entsprechend aufwendig gestaltet sich ihre Aufklärung.

So konnte auch die Entstehung der NAPQI-Hb-Addukte in vitro, die bei den hier durchgeführten Untersuchungen beobachtet wurden, nicht abschliessend geklärt werden.

Es erscheint deshalb unerlässlich, die Stabilität von Proteinaddukten sowie die Plausibilität der Messwerte zu überprüfen, um eine mögliche Verfälschung durch diagnostisch unerwünschte Nebenreaktionen erkennen zu können.

Der Einfluss störender Nebenreaktionen bei der Untersuchung der Patientenblutproben in dieser Arbeit offenbarte sich bei Ergebnissen, die einer in vivo Bildung der nachgewiesenen NAPQI-Hb-Addukte widersprachen:

-Der Nachweis von NAPQI-Hb-Addukten in hämolysiertem Vollblut, nicht aber in Lysaten aus gewaschenen Erythrocyten von gleichzeitig abgenommenen Blutproben derselben Patienten.

-Die im Verhältnis zum Tierexperiment [53] deutlich höheren Konzentrationen an NAPQI-Hb-Addukten.

-Der rasche Konzentrations-Abfall des NAPQI-Addukts in hämolysierten Vollblutproben, die am gleichen Patienten in kurzen zeitlichen Abständen (im Bereich von einigen Stunden) hintereinander abgenommen worden waren.

-Die starke Abnahme der NAPQI-Hb-Adduktkonzentration (bis zum Verschwinden) bei Präzipitation des Globins.

-Die Korrelation der NAPQI-Hb-Adduktkonzentrationen in den hämolysierten Vollblutproben mit den dort gemessenen Konzentrationen an freiem PCM.

Die Ergebnisse zeigen auch, dass eine Isolation und eine ausreichende Reinigung des Proteins, die hier durch das Abtrennen und Waschen der Erythrocyten erfolgte, ein wichtiger Schritt bei der Probenvorbereitung darstellt und nicht durch eine Analysenmethode mit hoher Spezifität ersetzt werden sollte.

5.4 Ausblick

Der Nachweis von an Proteinen gebundenen Fremdstoffen oder deren Metaboliten hat sich als wichtiges Hilfsmittel bei der Untersuchung verschiedenster (z.B. umwelttoxikologischer oder arbeitsmedizinischer) Fragestellungen etabliert.

Anwendungen in der klinischen oder auch forensischen Toxikologie haben sich hieraus bisher jedoch nicht entwickelt, obwohl auch hier makromolekular gebundene Fremdstoff-metabolite besonders aufgrund ihrer langen Nachweisbarkeit von Interesse sein könnten.

Im konkreten Fall, bei der Beurteilung von PCM-Intoxikationen, hat (unspezifisch) makromolekular gebundenes NAPQI-Cys bereits seine Möglichkeiten aufgezeigt [67],[69], [70], jedoch fehlt bisher ein spezifischer Nachweis des Adduktes an definierten Proteinen.

Kovalente Hämoglobinaddukte sind als solche nicht geeignet, was die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen belegt haben.

Erfolgversprechender könnte bei der Untersuchung von PCM-Intoxikationen in Zukunft die gezielte Untersuchung von Addukten an Proteinen mit direktem hepatischem Ursprung sein, für welche eine höhere Exposition gegenüber NAPQI zu erwarten ist.

Die Methode, die im Rahmen dieser Arbeit Untersuchung von NAPQI-Hb-Addukten entwickelt und verwendet wurde, ist hierfür von ihrem Ansatz her prinzipiell geeignet, so dass weiterführende Anwendungen denkbar sind.

6 Zusammenfassung

6.1. Zusammenfassung

Der Nachweis einer Paracetamol-(PCM)-Intoxikation im Rahmen der klinisch-toxikologischen Analytik basiert heute auf der Bestimmung und Interpretation der PCM-Konzentration im Blut. Aufgrund der kurzen PCM-Halbwertszeit und der mehrtägigen Latenz bis zur Entwicklung einer möglicherweise tödlichen Leberschädigung ist die Bewertung niedriger PCM-Konzentrationen hinsichtlich der Prognose oder Ätiologie pathologischer Leberwerte problematisch, wenn Angaben über den Zeitpunkt der PCM-Aufnahme fehlen. Wünschenswert wären deshalb Messungen längerlebiger Metabolite, die auf der Entstehung des toxischen Metaboliten N-Acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI) beruhen. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Hämoglobin-(Hb)-Addukte des NAPQI in Blutproben von Patienten mit PCM-Intoxikation nachweisbar sind.

Zur Darstellung des Adduktes wurde NAPQI, welches durch Oxidation aus PCM gewonnen wurde, mit Hb in vitro inkubiert und anschliessend analysiert. Nach chromatographischer Trennung und massenspektrometrischer Detektion der Globine zeigte sich, dass bei der Reaktion ausschliesslich ein Äquivalent NAPQI an der β -Globinkette des Hämoglobins gebunden wurde.

Zur weiteren Untersuchung wurde eine Proteolyse („Peptide Mapping“) des Hämoglobins durchgeführt. Hierbei wurden zwei enzymatische Methoden mit Trypsin und V8-Protease sowie eine chemische Hydrolyse mit Ameisensäure verwendet. Es zeigte sich, dass die mittels V8-Protease gebildeten Peptide eine vollständige Wiederfindung der Aminosäuresequenz des Hb erlaubten und somit geeignet waren, die Bindungsstelle(n) des NAPQI zu lokalisieren.

Die LC/MS-Analyse der V8-Peptide des NAPQI-Hb-Adduktes zeigte, dass die Bindung des NAPQI nur an einem einzigen Peptid erfolgt. Dieses wurde tandemmassenspektrometrisch als LH(C+NAPQI)DKLHVDPE (β 91-101) identifiziert und somit nachgewiesen, dass die Bindung am Cys93 des β -Globins erfolgte.

Hieraus abgeleitet wurde eine LC/MS/MS-Methode entwickelt und optimiert, die es gestattete, das modifizierte V8-Peptid LH(C+NAPQI)DKLHVDPE in Blutproben nachzuweisen, wobei das nichtmodifizierte Peptid LHCDKLHVDPE als interner Standard zur Quantifizierung verwendet werden konnte.

Zur Untersuchung standen 85 Blutproben von Patienten nach PCM-Exposition zur Verfügung. Von 20 Proben, die durch Zusatz von EDTA ungerinnbar gemacht worden waren, konnte Hb aus isolierten Erythrocyten gewonnen werden, während es sich bei 65 Proben um hämolysierte Vollblutproben handelte.

Das NAPQI-Hb-Addukt wurde in insgesamt 50 der hämolysierten Vollblutproben, die auch signifikante Konzentrationen an freiem PCM enthielten, nachgewiesen. Dabei lagen die

festgestellten Konzentrationen (32-633 pmol NAPQI/mg Hb) teilweise deutlich höher, als in vorangegangenen tierexperimentellen Untersuchungen beobachtet. Die Untersuchung mehrerer, mit zeitlichem Abstand am gleichen Patienten entnommener Blutproben zeigte eine unerwartet rasche Abnahme der Konzentration an NAPQI-Hb bis hin zum vollständigen Verschwinden innerhalb kurzer Zeit. In keiner der 20 Proben mit gewaschenen Erythrocyten, aus denen das Hb isoliert worden war, fand sich NAPQI-Hb-Addukt, selbst in Proben massiv intoxikierter Patienten (Nachweisgrenze ca. 1 pmol NAPQI/mg Hb).

Ebenso fand sich kein NAPQI-Hb-Addukt in 15 hämolysierten Vollblutproben, die kein freies PCM enthielten.

Diese Befunde widersprachen einer *in vivo* Adduktbildung. *In vitro* durchgeführte Inkubationen zeigten, dass freies PCM *in vitro* in Anwesenheit von Hämoglobin oxidiert und kovalent an diesem gebunden wurde. Somit waren die NAPQI-Hb-Addukte, die in den hämolysierten Blutproben nachgewiesen wurden, nicht *in vivo* entstanden, sondern wurden vielmehr durch freies PCM, das in diesen Proben vorhanden war, gebildet.

Die Untersuchungen *in vitro* zeigten, dass neben Hämoglobin auch isoliertes Globin in der Lage war, PCM *in vitro* zu oxidieren. Zur Beantwortung der Frage, ob hierfür möglicherweise das (disulfidische) Gluathionyl- β -Globin verantwortlich ist, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass NAPQI-Addukte in humanem Hb bei PCM-Intoxikation nicht oder in nur äußerst geringem Maße (<1pmol NAPQI/mg Hb) gebildet werden. Dies widerspricht den Ergebnissen tierexperimenteller Untersuchungen, bei welchen nach Verabreichung hepatotoxischer Dosen an PCM NAPQI-Hb-Addukte (200 pmol NAPQI/mg Hb) bei der Maus beobachtet wurden. Möglicherweise ist diese Diskrepanz auf molekulare Unterschiede und daraus folgend unterschiedlicher Reaktivität der Cysteiny-SH-Gruppen von humanem und murinem Hämoglobin zurückzuführen. Es zeigte sich, dass β Cys13 des murinen Hämoglobins eine um Grössenordnungen höhere Reaktivität gegenüber Elektrophilen besitzt als das humane β Cys93. In Mäuseerythrocyten ist eine bevorzugte Reaktion von Elektrophilen mit dem β Cys13 des Hb zu erwarten, denn dieses besitzt eine höhere Reaktivität als Glutathion. In humanen Erythrocyten reagieren Elektrophile hingegen möglicherweise bevorzugt mit Glutathion, welches eine höhere Reaktivität als β Cys93 besitzt und in hoher Konzentration vorhanden ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass NAPQI-Hb-Addukte nicht zur klinisch-toxikologischen Beurteilung von humanen PCM-Intoxikationen verwendet werden können, da sie *in vivo* nicht oder nur unzureichend gebildet werden. Für zukünftige Experimente erscheint es als günstiger, zum Nachweis von NAPQI-Addukten nach PCM-Intoxikation im Menschen Proteine mit direktem hepatischem Ursprung zu untersuchen, welche vermutlich eine deutlich höhere Exposition gegenüber NAPQI aufweisen als Hämoglobin.

Die Methode, die im Rahmen dieser Arbeit zur Untersuchung von NAPQI-Hb-Addukten entwickelt und verwendet wurde, ist hierfür von ihrem Ansatz her prinzipiell geeignet.

6.2. Summary

The measurement and interpretation of Paracetamol-(PCM)-blood-concentrations in clinical toxicology today is very common and provides objective evidence for PCM-overdosage.

Due to short half-life and longlasting latency of hepatotoxicity, the interpretation of low blood-PCM-concentrations with regard to etiology and prognosis is difficult, when the time of PCM-ingestion is not known.

A better evaluation might be possible by measurements of more persistent metabolites of the toxic N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI).

In the present work, Hemoglobin-(Hb)-adducts of NAPQI were investigated.

Synthesis of the adduct was accomplished by incubation of hemoglobin and NAPQI, obtained by oxidation of PCM. Chromatographic separation and mass spectrometry of the globin chains indicated the covalent binding of a unique NAPQI to the β -Globin.

For the further exploration, hemoglobin was decomposed by enzymatic digestion (Trypsin/V8-Protease) and chemical cleavage (Formic acid) and the peptides were mapped. V8-Proteolysis facilitated recovery of the whole amino acid sequence of Hb. Therefore this enzyme was used to localize the binding sites of NAPQI.

By LC/MS- Analysis of the V8-Peptides derived from synthesized NAPQI-Hb-adduct, a single modified peptide was detected and identified as LH(C+NAPQI)DKLHVDPE (β 91-101) by tandem mass spectrometry.

Consequently, the binding of NAPQI was unique to the β Cys93.

A LC/MS/MS-method was developed for the detection of the LH(C+NAPQI)DKLHVDPE-Peptide in human blood samples, using the native LHCDKLHVDPE as internal standard for quantification.

85 blood samples from patients after PCM-overdosage were tested for the presence of the NAPQI-Hb-Adduct. There were 20 anticoagulant-stabilized blood samples whose hemoglobin was isolated by separation of red blood cells. 65 samples were from stored hemolytic whole blood.

NAPQI-Hb-adducts were present in 50 hemolytic whole-blood-samples, in which also significant concentrations of PCM could be detected. The NAPQI-Hb-adducts of 32-633 pmol NAPQI/mg Hb exceeded the concentrations, which were observed in animal experiments.

There was a rapid decline of NAPQI-Hb-adducts until their disappearance in samples which were taken at different time points from the same patient.

As well as in the 15 whole blood samples without detectable PCM-concentrations, in none of the 20 anticoagulant-stabilized and separated RBC samples NAPQI-Hb-adducts could be found, even in cases of severe PCM-intoxication (limit of detection appr. 1pmol NAPQI/ mg Hb).

The results were inconsistent with in-vivo-origination of the detected NAPQI-Hb-adducts, incubation experiments showed that PCM can be oxidized in-vitro by hemoglobin and binds

covalently to the protein.

The detected adducts consequently derived from the in vitro oxidation of PCM in the hemolytic whole blood samples and not from hepatic metabolism.

In addition to hemoglobin, the precipitated globin was able to oxidise PCM in vitro too, so it was proposed that the disulfide Glutathionyl- β -Globin could be responsible for the in vitro binding. The experimental confirmation would require additional studies.

The results of the present work revealed that there are either no or very low levels (<1pmol NAPQI/ mg Hb) of NAPQI-adducts in human Hb after PCM overdose. This is in disagreement with previous results of animal experiments, in which high levels of NAPQI-Hb (200 pmol NAPQI/mg Hb) could be detected. This is probably caused by molecular differences in human and murine Hb. There is a highly reactive β Cys13 in murine Hb, reacting much faster with electrophiles than the human β Cys93. So, in the murine red blood cells, NAPQI could preferentially bind to β Cys13, exhibiting a higher reactivity than glutathione.

In human red blood cells, electrophiles probably react preferentially with glutathione due to higher reactivity with respect to the human β Cys93. Glutathione is present in red blood cells at concentrations similar to the Hb.

The present work indicated, that NAPQI-Hb-adducts are not suitable for the detection of PCM overdose, since there are either no or very low levels generated in vivo.

For future experiments, the investigation of NAPQI adducts in proteins, which derive directly from the liver and exhibit higher exposure to NAPQI than Hb, could have more promise.

The present method can in principle be adapted for those investigations.

7 Literaturverzeichnis

1	Yamagiwa K, Ichikawa K, Experimental study of the pathogenesis of carcinoma. CA Cancer J Clin. 1977; 27(3):174-81.
2	Marquardt H, Chemische Kanzerogenese, in: H. Marquardt, S.G. Schäfer (Hrsg.) Lehrbuch der Toxikologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1994: 124 -146.
3	Miller EC, Miller JA, The presence and significance of bound aminoazo dyes in the livers of rats fed p- dimethylaminoazobenzene. Cancer Research 1947: 468-480
4	Magee PN, Schoental R, Carcinogenesis by Nitroso Compounds. Br Med Bull. 1964; 20: 102-6.
5	Miller EC, Miller JA, Mechanisms of chemical carcinogenesis: nature of proximate carcinogens and interactions with macromolecules. Pharmacol Rev. 1966; 18(1): 805-38.
6	Brodie BB, Reid DR, Cho AK, Sipes G, Krishna G, Gillette JR, Possible mechanism of liver necrosis caused by aromatic organic compounds,, Proceedings of the National Academy of Sciences, 1971; 68(1): 160-164.
7	Nelson SD, Pearson PG, Covalent and noncovalent interactions in acute lethal cell injury caused by chemicals. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1990; 30: 169-95.
8	Pumford NR, Halmes NC, Protein targets of xenobiotic reactive intermediates. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1997; 37: 91-117.
9	Couri D, Milks M, Toxicity and metabolism of the neurotoxic hexacarbons n-hexane, 2-Hexanone and 2,5-hexanedione. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1982; 22: 145-66
10	Graham D, Szakal-Quin G, Priest JW, Anthony DC, In vitro evidence that covalent crosslinking of neurofilaments occurs in γ -diketone neuropathy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1984; 81: 4979-82

11	Kenna JG, Satoh H, Christ DD, Pohl LR, Metabolic basis for a drug hypersensitivity: antibodies in sera from patients with halothane hepatitis recognize liver neoantigens that contain the trifluoroacetyl group derived from halothane. J Pharmacol Exp Ther. 1988; 245(3): 1103-9.
12	Hinson JA, Roberts DW, Role of covalent and noncovalent interactions in cell toxicity: effects on proteins Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1992; 32: 471-510.
13	Ehrenberg L, Hiesche KD, Osterman-Golkar S, Wenneberg I, Evaluation of genetic risks of alkylating agents: tissue doses in the mouse from air contaminated with ethylene oxide. Mutat Res. 1974; 24(2): 83-103.
14	Osterman-Golkar S, Ehrenberg L, Segerbäck D, Hällström I, Evaluation of genetic risks of alkylating agents.II. Haemoglobin as a dose monitor. Mutation Research 1976; 34: 1--10
15	Calleman CJ, Ehrenberg L, Jansson B, Osterman-Golkar S, Segerbäck D, Svensson K, Wachtmeister CA, Monitoring and risk assessment by means of alkyl groups in hemoglobin in persons occupationally exposed to ethylene oxide. J Environ Pathol Toxicol. 1978; 2(2): 427-42.
16	Törnqvist M, Mowrer J, Jensen S, Ehrenberg L, Monitoring of environmental cancer initiators through hemoglobin adducts by a modified Edman degradation method. Anal Biochem. 1986; 154(1): 255-66.
17	Neumann HG, Ewers U, Die Stellung des biochemischen Effektmonitorings im Konzept des Human-Biomonitorings. Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz 2003; 46: 891-895
18	Törnqvist M, Fred C, Haglund J, Helleberg H, Paulsson B, Rydberg P, Protein adducts: quantitative and qualitative aspects of their formation, analysis and applications. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2002; 5;778(1-2): 279-308.
19	Allison AC, Turnovers of erythrocytes and plasma proteins in mammals. Nature. 1960; 188: 37-40.
20	Stellungnahme der Kommission „Humanbiomonitoring“ des Umweltbundesamtes Verwendung von Hämoglobinaddukten als Biomarker für das Monitoring von Belastungen und Beanspruchungen durch genotoxische Stoffe. Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz 2003; 46: 918-922

21	Tan GH, Rabbino MD, Hopper J Jr, Is Phenacetin a Nephrotoxin? A report on twenty-three users of the drug. Calif Med. 1964; 101: 73-7.
22	Brodie BB, Axelrod J, The fate of antipyrine in man. J Pharmacol Exp Ther. 1950; 98(1): 97-104.
23	Flower RJ, Vane JR, Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). Nature. 1972; 240(5381): 410-1.
24	Hanel AM, Lands WE, Modification of anti-inflammatory drug effectiveness by ambient lipid peroxides. Biochem Pharmacol. 1982; 31(20): 3307-11.
25	Schwab JM, Schluesener HJ, Laufer S, COX-3: just another COX or the solitary elusive target of paracetamol? Lancet. 2003; 361(9362): 981-2.
26	Pickering G, Lorient MA, Libert F, Eschalier A, Beaune P, Dubray C, Analgesic effect of acetaminophen in humans: first evidence of a central serotonergic mechanism. Clin Pharmacol Ther. 2006; 79(4): 371-8.
27	Ottani A, Leone S, Sandrini M, Ferrari A, Bertolini A, The analgesic activity of paracetamol is prevented by the blockade of cannabinoid CB1 receptors. Eur J Pharmacol. 2006; 531(1-3): 280-1.
28	Bertolini A, Ferrari A, Ottani A, Guerzoni S, Tacchi R, Leone S, Paracetamol: new vistas of an old drug. CNS Drug Rev. 2006; 12(3-4): 250-75
29	Prescott LF, Kinetics and metabolism of paracetamol and phenacetin. Br J Clin Pharmacol. 1980;10(2): 291-298.
30	Levy G, Garrettson LK, Soda DM, Evidence of placental transfer of acetaminophen. Pediatrics. 1975; 55(6): 895.
31	Larson AM, Acetaminophen hepatotoxicity. Clin Liver Dis. 2007; 11(3): 525-48,
32	Manyike PT, Kharasch ED, Kalhorn TF, Slattery JT, Contribution of CYP2E1 and CYP3A to acetaminophen reactive metabolite formation. Clin Pharmacol Ther. 2000; 67(3): 275-82.

33	Davidson DG, Eastham WN, Acute liver necrosis following overdose of paracetamol. Br Med J. 1966; 2(5512): 497-9.
34	Thomson JS, Prescott LF, Liver damage and impaired glucose tolerance after paracetamol overdosage. Br Med J. 1966; 2(5512): 506-7.
35	Sheen CL, Dillon JF, Bateman DN, Simpson KJ, Macdonald TM, Paracetamol toxicity: epidemiology, prevention and costs to the health-care system. QJM. 2002; 95(9): 609-19.
36	Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiødt FV, Larson A, Davern TJ, Han SH, McCashland TM, Shakil AO, Hay JE, Hynan L, Crippin JS, Blei AT, Samuel G, Reisch J, Lee WM; U.S. Acute Liver Failure Study Group. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States Ann Intern Med. 2002; 137(12): 947-54.
38	Gyاملani GG, Parikh CR, Acetaminophen toxicity: suicidal vs. accidental. Crit Care. 2002; 6(2): 155-9.
39	Eriksson LS, Broomé U, Kalin M, Lindholm M, Hepatotoxicity due to repeated intake of low doses of paracetamol. J Intern Med. 1992; 231(5): 567-70.
40	Singer AJ, Carracio TR, Mofenson HC, The temporal profile of increased transaminase levels in patients with acetaminophen-induced liver dysfunction. Ann Emerg Med. 1995; 26(1): 49-53.
41	Harrison PM, O'Grady JG, Keays RT, Alexander GJ, Williams R, Serial prothrombin time as prognostic indicator in paracetamol induced fulminant hepatic failure BMJ. 1990; 301(6758): 964-6.
42	Dargan PI, Jones AL, Acetaminophen poisoning: an update for the intensivist. Crit Care. 2002; 6(2): 108-10.
43	Prescott LF, Roscoe P, Wright N, Brown SS, Plasma-paracetamol half-life and hepatic necrosis in patients with paracetamol overdosage Lancet. 1971; 1(7698): 519-22.
44	Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Gillette JR, Brodie BB, Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. J Pharmacol Exp Ther. 1973; 187(1): 211-7.

45	Davis M, Simmons CJ, Harrison NG, Williams R, Paracetamol overdose in man: relationship between pattern of urinary metabolites and severity of liver damage. Q J Med. 1976; 45(178): 181-91.
46	Streeter AJ, Dahlin DC, Nelson SD, Baillie TA, The covalent binding of acetaminophen to protein. Evidence for cysteine residues as major sites of arylation in vitro. Chem Biol Interact. 1984; 48(3): 349-66.
47	Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR, Brodie BB, Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism. J Pharmacol Exp Ther. 1973; 187(1): 185-94.
48	Potter WZ, Davis DC, Mitchell JR, Jollow DJ, Gillette JR, Brodie BB, Acetaminophen-induced hepatic necrosis. 3. Cytochrome P-450-mediated covalent binding in vitro. J Pharmacol Exp Ther. 1973; 187(1): 203-10.
49	Pumford NR, Hinson JA, Potter DW, Rowland KL, Benson RW, Roberts DW Immunochemical quantitation of 3-(cystein-S-yl)acetaminophen adducts in serum and liver proteins of acetaminophen-treated mice. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1989; 248: 190–196.
50	Bartolone JB, Sparks K, Cohen SD, Khairallah EA, Immunochemical detection of acetaminophen-bound liver proteins. Biochem. Pharmacol. 1987; 36: 1193–1196.
51	Cohen SD, Khairallah EA, Selective protein arylation and acetaminophen-induced hepatotoxicity. Drug Metab Rev. 1997; 29(1-2): 59-77
52	Qiu Y, Benet LZ, Burlingame AL, Identification of the hepatic protein targets of reactive metabolites of acetaminophen in vivo in mice using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. J Biol Chem. 1998; 273(28): 17940-53.
53	Axworthy DB, Hoffmann KJ, Streeter AJ, Calleman CJ, Pascoe GA, Baillie TA, Covalent binding of acetaminophen to mouse hemoglobin. Identification of major and minor adducts formed in vivo and implications for the nature of the arylating metabolites. Chem Biol Interact. 1988;68 (1-2): 99-116.
54	Halmes NC, Hinson JA, Martin BM, Pumford NR, Glutamate dehydrogenase covalently binds to a reactive metabolite of acetaminophen. Chem Res Toxicol. 1996; 9(2): 541-6.

55	Pumford NR, Halmes NC, Martin BM, Cook RJ, Wagner C, Hinson JA, Covalent binding of acetaminophen to N-10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase in mice J Pharmacol Exp Ther. 1997; 280(1): 501-5.
56	Tirmenstein MA, Nelson SD, Subcellular binding and effects on calcium homeostasis produced by acetaminophen and a nonhepatotoxic regioisomer, 3'-hydroxyacetanilide, in mouse liver. J Biol Chem. 1989; 264(17): 9814-9.
57	Jaeschke H, Bajt ML, Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. Toxicol Sci. 2006; 89(1): 31-41.
58	Knight TR, Fariss MW, Farhood A, Jaeschke H, Role of lipid peroxidation as a mechanism of liver injury after acetaminophen overdose in mice. Toxicol Sci. 2003; 76(1): 229-36
59	Hinson JA, Pike SL, Pumford NR, Mayeux PR, Nitrotyrosine-protein adducts in hepatic centrilobular areas following toxic doses of acetaminophen in mice. Chem Res Toxicol. 1998; 11(6): 604-7.
60	Ray SD, Sorge CL, Raucy JL, Corcoran GB, Early loss of large genomic DNA in vivo with accumulation of Ca ²⁺ in the nucleus during acetaminophen-induced liver injury. Toxicol Appl Pharmacol. 1990; 106(2): 346-51.
61	Gujral JS, Knight TR, Farhood A, Bajt ML, Jaeschke H, Mode of cell death after acetaminophen overdose in mice: apoptosis or oncotic necrosis? Toxicol Sci. 2002; 67(2): 322-8.
62	Ambre J, Alexander M, Liver toxicity after acetaminophen ingestion. Inadequacy of the dose estimate as an index of risk. JAMA. 1977; 238(6): 500-1.
62	Frings CS, Saloom JM, Colorimetric method for the quantitative determination of acetaminophen in serum. Clin Toxicol. 1979; 15(1): 67-73.
64	Coxon RE, Gallacher G, Landon J, Rae C, Development of a specific polarisation fluoroimmunoassay for paracetamol in serum. Ann Clin Biochem. 1988; 25(Pt 1): 49-52.

65	Fletcherick CG, Grove TH, Hohnadel DC, Liquid-chromatographic determination of acetaminophen in serum. Clin Chem. 1979; 25(3): 409-12.
66	Rumack BH, Matthew H, Acetaminophen poisoning and toxicity. Pediatrics. 1975; 55(6): 871-6.
67	Davern TJ, James LP, Hinson JA, Polson J, Larson AM, Fontana RJ, Lalani E, Munoz S, Shakil AO, Lee WM, Measurement of serum acetaminophen-protein adducts in patients with acute liver failure. Gastroenterology. 2006; 130(3): 687-94.
68	James LP, Farrar HC, Sullivan JE, Givens TG, Kearns GL, Wasserman GS, Walson PD, Hinson JA, Pumford NR, Measurement of acetaminophen-protein adducts in children and adolescents with acetaminophen overdoses. J Clin Pharmacol. 2001; 41(8): 846-51.
69	James LP, Alonso EM, Hynan LS, Hinson JA, Davern TJ, Lee WM, Squires RH, Detection of acetaminophen protein adducts in children with acute liver failure of indeterminate cause. Pediatrics. 2006; 118(3): 676-81.
70	Muldrew KL, James LP, Coop L, McCullough SS, Hendrickson HP, Hinson JA, Mayeux PR, Determination of acetaminophen-protein adducts in mouse liver and serum and human serum after hepatotoxic doses of acetaminophen using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Drug Metab Dispos. 2002; 30(4): 446-51.
71	Underhill TJ, Greene MK, Dove AF, A comparison of the efficacy of gastric lavage, ipecacuanha and activated charcoal in the emergency management of paracetamol overdose. Arch Emerg Med. 1990; 7(3): 148-54
72	Prescott LF, Paracetamol overdosage. Pharmacological considerations and clinical management. Drugs. 1983; 25(3): 290-314
73	Amitai Y, Mitchell AA, McGuigan MA, Lovejoy FH Jr, Ipecac-induced emesis and reduction of plasma concentrations of drugs following accidental overdose in children. Pediatrics. 1987; 80(3): 364-7.
74	Dordoni B, Willson RA, Thompson RP, Williams R, Reduction of absorption of paracetamol by activated charcoal and cholestyramine: a possible therapeutic measure. Br Med J. 1973; 3(5871): 86-7.

75	Benedetti MS, Louis A, Malnoe A, Prevention of paracetamol-induced liver damage in mice with glutathione. J Pharm Pharmacol. 1975; 27(8): 629-32.
76	Gazzard BG, Hughes RD, Portmann B, Dordoni B, Williams R, Protection of rats against the hepatotoxic effect of paracetamol. Br J Exp Pathol. 1974; 55(6): 601-5.
77	Prescott LF, Newton RW, Swainson CP, Wright N, Forrest AR, Matthew H, Successful treatment of severe paracetamol overdosage with cysteamine. Lancet. 1974; 1(7858): 588-92.
78	Hughes RD, Gazzard BG, Hanid MA, Trewby PN, Murray-Lyon IM, Davis M, Williams R, Bennet JR, Controlled trial of cysteamine and dimercaprol after paracetamol overdose. Br Med J. 1977; 2(6099): 1395
79	Prescott LF, Sutherland GR, Park J, Smith IJ, Proudfoot AT Cysteamine, methionine, and penicillamine in the treatment of paracetamol poisoning Lancet. 1976; 2(7977): 109-13.
80	Prescott LF, Park J, Ballantyne A, Adriaenssens P, Proudfoot AT, Treatment of paracetamol (acetaminophen) poisoning with N-acetylcysteine. Lancet. 1977; 2(8035): 432-4.
81	Rumack BH, Peterson RC, Koch GG, Amara IA., Acetaminophen overdose. 662 cases with evaluation of oral acetylcysteine treatment Arch Intern Med. 1981; 141(3): 380-5.
82	Smilkstein MJ, Knapp GL, Kulig KW, Rumack BH, Efficacy of oral N-acetylcysteine in the treatment of acetaminophen overdose. Analysis of the national multicenter study (1976 to 1985) N Engl J Med. 1988; 319(24): 1557-62.
83	Kanter MZ, Comparison of oral and i.v. acetylcysteine in the treatment of acetaminophen poisoning Am J Health Syst Pharm. 2006; 63(19): 1821-7.
84	Mant TG, Tempowski JH, Volans GN, Talbot JC, Adverse reactions to acetylcysteine and effects of overdose. Br Med J (Clin Res Ed). 1984; 289(6439): 217-9.
85	Carr D, Handbook of analysis and purification of peptides and proteins by RP-HPLC. Grace Vydac third edition 2002:3
86	James P, Proteome research: Mass spectrometry Springer Berlin 2001:13

87	Thermo Electron Corporation, San Jose, California Technical publications 2003
88	Hunt DF, Yates JR 3rd, Shabanowitz J, Winston S, Hauer CR, Protein sequencing by tandem mass spectrometry. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986; 83(17): 6233-7.
89	Roepstorff P, Fohlman J, Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. Biomed Mass Spectrom. 1984; 11(11): 601.
90	Griffin L, MacAdoo DJ, The effect of ion size on the rate of dissoziation: RRKM calculations of model large polypeptide ions. J Am Soc Mass Spec 1993; 4: 11-15
91	Zwart A, Buursma A, van Kampen EJ, Oeseburg B, van der Ploeg PH, Zijlstra WG, A multi-wavelength spectrophotometric method for the simultaneous determination of five haemoglobin derivatives. J Clin Chem Clin Biochem. 198; 19(7): 457-63
92	Rossi-Fanelli, A.; Antonini, E.; Caputo, A, Pure native globin from human hemoglobin: preparation and some physico-chemical properties. Biochim. Biophys. Acta. 1958; 28: 221.
93	Zhang Z, Marshall AG, A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra. J Am Soc Mass Spectrom. 1998; 9(3): 225-33.
94	Schultz J, Cleavage at aspartic acid. Methods in Enzymology, 1967; 11: 255-263
95	Li A, Sowder RC, Henderson LE, Moore SP, Garfinkel DJ, Fisher RJ. Chemical cleavage at aspartyl residues for protein identification. Anal Chem. 2001; 73(22): 5395-402.
96	Mil'itina EI, Voyushina TL, Chestukhina GG, Glutamyl Endopeptidases: Structure, function and practical application, Russ J Bioorg Chem 2003; 29(6): 563-576
97	Eshragi J, Chowdhury SK, Factors affecting electrospray ionization of effluents containing trifluoroacetic acid for high-performance liquid chromatograohy/ mass spectrometry. Anal Chem 1993; 65(23): 3528-3533

98	Dahlin DC, Nelson SD, Synthesis, decomposition kinetics, and preliminary toxicological studies of pure N-acetyl-p-benzoquinone imine, a proposed toxic metabolite of acetaminophen. J Med Chem. 1982; 25(8): 885-6.
99	Miner DJ, Kissinger PT, Evidence for the involvement of N-acetyl-p- quinoneimine in acetaminophen metabolism. Biochem Pharmacol. 1979; 28(22): 3285-90.
100	Getek TA, Korfmacher WA, McRae TA, Hinson JA, Utility of solution electrochemistry mass spectrometry for investigating the formation and detection of biologically important conjugates of acetaminophen. J Chromatogr. 1989; 474(1): 245-56.
101	Blair IA, Boobis AR, Davies DS, Paracetamol oxidation: Synthesis and reactivity of N-Acetyl-p-benzoquinoneimine, Tetrahedron Letters, 1980; 21: 4947-4950
102	Zeller KP, "The Chemistry of the Quinoid Compounds", Part 1, S.Patai, Ed., Wiley, New York, 1974: p 231
103	Coles B, Wilson I, Wardman P, Hinson JA, Nelson SD, Ketterer B, The spontaneous and enzymatic reaction of N-acetyl-p-benzoquinonimine with glutathione: a stopped-flow kinetic study. Arch Biochem Biophys. 1988; 264(1): 253-60.
104	Chen W, Shockcor JP, Tonge R, Hunter A, Gartner C, Nelson SD. Protein and nonprotein cysteinyl thiol modification by N-acetyl-p-benzoquinone imine via a novel ipso adduct. Biochemistry. 1999; 38(25): 8159-66.
105	Nakanishi T, Miyazaki A, Kishikawa M, Yasua M, Tokuchi Y, Kanada Y, Shimizu A, Quantification of glycated hemoglobin by electrospray ionization mass spectrometry. J Mass Spectrom. 1997; 32(7): 773-8.
106	Roberts NB, Green BN, Morris M, Potential of electrospray mass spectrometry for quantifying glycohemoglobin. Clin Chem. 1997; 43(5): 771-8.
107	Ris A, Preparation of blood hemoglobins from vertebrates. Methods in Enzymology, 1981; 76: 5-28
108	Ting D, Smith MT, Doane-Setzer P, Rappaport SM, Analysis of styrene oxide-globin adducts based upon reaction with Raney nickel. Carcinogenesis. 1990; 11(5): 755-60.

109	Osterman-Golkar S, Ehrenberg L, Segerbäck D, Hällström I, Evaluation of genetic risks of alkylating agents. II. Haemoglobin as a dose monitor. Mutat Res. 1976; 34(1): 1-10.
110	Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science 1989; 246(4926): 64-71.
111	Törnqvist M in Caprioli RM, Malorni A, Sindona G (Eds.), Mass spectrometry in biomolecular sciences, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1996: p.381
112	Oosterkamp AJ, Gelpí E, Abian J, Quantitative peptide bioanalysis using column-switching nano liquid chromatography/mass spectrometry. J Mass Spectrom. 1998; 33(10): 976-83.
113	Hoes I, Van Dongen W, Lemière F, Esmans EL, Van Bockstaele D, Berneman ZN. Comparison between capillary and nano liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for the analysis of minor DNA-melphalan adducts. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 2000; 748(1): 197-212.
114	Nakanishi T, Kishikawa M, Shimizu A, Hayashi A, Assignment of the ions in the electrospray ionization mass spectra of the tryptic digest of the non-derivatized globin, covering the whole sequence of a- and b-chains: A rapid diagnosis for haemoglobinopathy, J Mass Spectrom 1995; 30: 1663-1670
115	Nakanishi T, Miyazaki A, Kishikawa M, Shimizu A, Electrospray ionization-tandem mass spectrometry analysis of peptides derived by enzymatic digestion of oxidized globin subunits: An improved method to determine amino acid substitution in the hemoglobin "Core", J Am Soc Mass Spectrom 1996; 7: 1040-1049
116	Inglis AS, Edman P, Mechanism of cyanogen bromide reaction with methionine in peptides and proteins. I. Formation of imidate and methyl thiocyanate. Anal Biochem. 1970; 37(1): 73-80
117	Kobold U, Jeppsson JO, Dülffer T, Finke A, Hoelzel W, Miedema K, Candidate reference methods for hemoglobin A1c based on peptide mapping. Clin Chem. 1997; 43(10): 1944-51.
118	Drapeau GR, Boily Y, Houmard J, Purification and properties of an extracellular protease of Staphylococcus aureus. J Biol Chem. 1972; 247(20): 6720-6.

119	Törnqvist M, Epoxide adducts to N-terminal valine of hemoglobin. Methods Enzymol 1994;231: 650-657
120	Fennell TR, Sumner SC, Walker VE. A model for the formation and removal of hemoglobin adducts. Cancer Epidemiol Biomarkers 1992;1(3): 213-219.
121	Sannolo N, Mamone G, Ferranti P, Basile A, Malorni A, Biomonitoring of human exposure to methyl bromide by isotope dilution mass spectrometry of peptide adducts. J Mass Spectrom. 1999; 34(10):1028-32.
122	Swain CG, Scott CB, Quantitative correlation of relative rates. Comparison of hydroxide ion with other nucleophilic reagents toward alkyl halides, esters, epoxides and acyl halides. J Amer Chem Soc 1953; 75: 141-147.
123	Segerbäck D, Reaction products in hemoglobin and DNA after in vitro treatment with ethylene oxide and N-(2-hydroxyethyl)-N-nitrosourea. Carcinogenesis. 1990; 11(2): 307-12.
124	Pearson RG, Songstad J, Application of the principle of hard and soft acids and bases to organic Chemistry. Organic and Biological Chemistry, 1967; 89: 1827-36
125	Xu Y, Zheng Y, Fan JS, Yang D. A new strategy for structure determination of large proteins in solution without deuteration. Nat Methods. 2006 Nov;3(11):931-7.
126	Ferranti P, Mamone G, Malorni A, Preparation and mass spectrometric analysis of S-Nitrosohemoglobin. Methods in Molecular Biology. 2000; 146: 147-165
127	Guidotti G, The rates of reaction of the sulfhydryl groups of human hemoglobin. J Biol Chem. 1965; 240(10): 3924-7.
128	Mamone G, Malorni A, Scaloni A, Sannolo N, Basile A, Pòcsfalvi G, Ferranti P, Structural analysis and quantitative evaluation of the modifications produced in human hemoglobin by methyl bromide using mass spectrometry and Edman degradation. Rapid Commun Mass Spectrom. 1998; 12(22): 1783-92.
129	Craescu CT, Poyart C, Schaeffer C, Garel MC, Kister J, Beuzard Y, Covalent binding of glutathione to hemoglobin. II. Functional consequences and structural changes reflected in NMR spectra. J Biol Chem. 1986; 261(31): 14710-6.

130	James LP, McCullough SS, Lamps LW, Hinson JA, Effect of N-acetylcysteine on acetaminophen toxicity in mice: relationship to reactive nitrogen and cytokine formation. Toxicol Sci. 2003; 75(2): 458-67.
131	Miranda JJ, Highly reactive cysteine residues in rodent hemoglobins. Biochem Biophys Res Commun. 2000; 275(2): 517-23.
132	Rossi R, Barra D, Bellelli A, Boumis G, Canofeni S, Di Simplicio P, Lusini L, Pascarella S, Amiconi G, Fast-reacting thiols in rat hemoglobins can intercept damaging species in erythrocytes more efficiently than glutathione. J Biol Chem 1998; 273(30): 19198-19206
133	Popp RA, Bailiff EG, Sequence of amino acids in the major and minor chains of the diffuse hemoglobin from BALB-c mice. Biochim Biophys Acta. 1973; 303(1): 61-7.
134	Unt E, Kairane C, Vaheer I, Zilmer M, Red blood cell and whole blood glutathione redox status in endurance-trained men following a ski marathon. J Sport Science and Medicine 2008; 7: 344-349
135	Törnqvist M, Formation of reactive species that lead to hemoglobin adducts during storage of blood samples. Carcinogenesis. 1990; 11(1): 51-4.

Gefahrstoffe

Folgende verwendete Reagenzien und Lösungsmittel waren mit Gefahrenhinweisen und Sicherheitsratschlägen nach § 6 der Gefahrstoffverordnung versehen:

Substanz	Gefahrensymbole	Gefahrenhinweise	Sicherheitsratschläge
Aceton	F, Xi	11-36-66-67	9-16-26
Acetonitril	F, Xn	11-20/21/22-36	16-36/37
Ameisensäure	C	35	23.2-26-45
Citronensäure Monohydrat	Xi	36	26
Coffein	Xn	22	1/2
Diethylether	F+, Xn	12-19-22-66-67	9-16-29-33
Endoproteinase Glu C	Xn	36/37/38-42/43	22-26-26/37-45
Kaliumhydroxid	C	22-35	26-36/37/39-45
Methanol	T, F	11-23/24/25	7-16-36/37-45
Natriumhydroxid	C	35	26-37/39-45
Paracetamol	Xn	22-52/53	22-61
Salzsäure 1 M	Xi	36/37/38	26
Silbernitrat	C, N	34-50/53	26-45-60-61
Tert- Butylmethylether	F	11-66	16-23.2-29-33
Trifluoressigsäure	C	20-35-52/53	9-26
Tris- (hydroxymethyl)- aminomethan	Xi	36/37/38	26-36
Trypsin	Xn	36/37/38-42	22-24-26-36/37

Lebenslauf

04.04.1978	Geboren als Sohn von Beate Müller, geb. Berlinghof und Walter Müller in Rottweil
1984-1988	Maximilian-Kolbe-Schule Rottweil
1988-1997	Leibniz-Gymnasium Rottweil
20.06.1997	Abitur
7/1997-8/1998	Zivildienst beim Rettungsdienst Deutsches Rotes Kreuz KV Rottweil
10/1998	Beginn des Pharmaziestudiums in Freiburg i.Br.
22.03.2001	Erstes pharmazeutisches Staatsexamen
15.04.2003	Zweites pharmazeutisches Staatsexamen
5/2003-11/2003	Pharmaziepraktikum I: Eli Lilly Research GmbH, Hamburg
11/2003-4/2004	Pharmaziepraktikum II: Mönckeberg-Apotheke, Hamburg
25.06.2004	Drittes pharmazeutisches Staatsexamen und Approbation als Apotheker
seit 8/2004	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Rechtsmedizin der Universität Hamburg

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Dissertation noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen.

Ich habe mich auch früher um keine Promotion bemüht.

Ferner versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den genutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.