

KfK 4196
Januar 1987

**Untersuchungen zur
Metallbindung im
Eisentransportprotein Transferrin
mit der Methode der
zeitdifferenziellen Beobachtung
von gestörten
Winkelkorrelationen**

G. M. Then
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

Kernforschungszentrum Karlsruhe

KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE

Institut für Genetik und für Toxikologie
von Spaltstoffen

KfK 4196

UNTERSUCHUNGEN ZUR METALLBINDUNG IM EISENTRANSPORTPROTEIN TRANSFERRIN
MIT DER METHODE DER ZEITDIFFERENTIELLEN BEOBACHTUNG VON GESTÖRTEN
WINKELKORRELATIONEN^{*}

G.M. Then

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

*
von der Fakultät für Physik der
Universität Karlsruhe genehmigte Dissertation

Als Manuskript vervielfältigt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 7500 Karlsruhe 1

ISSN 0303-4003

Untersuchungen zur Metallbindung im Eisentransportprotein Transferrin mit der Methode der zeitdifferentiellen Beobachtung von gestörten Winkelkorrelationen

Zusammenfassung

Die Bindung des Übergangsmetalls Hafnium an Transferrin wurde mit der Methode der zeitdifferentiellen Messung von gestörten $\gamma\gamma$ - Winkelkorrelationen (TDPAC) unter verschiedenen chemischen Bedingungen untersucht. Die Beobachtung der elektrischen Quadrupolwechselwirkung des Sondenkerns ^{181}Hf erlaubt die Bestimmung des elektrischen Feldgradienten der von den Liganden des Metallions erzeugt wird und seiner Symmetrieeigenschaften. Die Meßergebnisse lassen auch schließen, wie einheitlich die Bindung definiert ist und inwieweit Relaxationseffekte involviert sind. Mithilfe der ausgezeichneten Zeitauflösung, die mit neuentwickelten BaF_2 -Detektoren erreicht wurde, konnten die Quadrupolkopplungsparameter von ^{181}Hf -Transferrin mit großer Genauigkeit ermittelt werden. Unter annähernd physiologischen Bedingungen wurden einzelne Bindungskonfigurationen mit hoher Spezifität unterschieden und spektroskopisch charakterisiert.

Mit flüssigen Proben wurden zwischen pH 7 und pH 9,5 zwei sehr einheitliche Konfigurationen gefunden, deren Feldgradienten in Betrag und Symmetrie stark voneinander abweichen. Die relative Verteilung der Sondenkerne auf diese Plätze wird im wesentlichen vom pH-Wert der Probe bestimmt. Durch biochemische Untersuchungen ist gesichert, daß Hafnium an den beiden Eisenbindungsplätzen von Transferrin gebunden wird, die in der C- bzw. N-Terminalhälfte des Moleküls lokalisiert sind. Die mit TDPAC beobachteten spezifischen ^{181}Hf -Transferrin Konfigurationen entsprechen folglich den Metallbindungsplätzen des Proteins. In Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen wird geschlossen, daß die C- und N-Terminalplätze chemisch und strukturell nicht äquivalent sind. Bei niedrigen pH-Werten wird die C-, bei höheren pH-Werten die N-Konfiguration bevorzugt.

Ein Vergleich der Quadrupolkopplungsparameter von Serumtransferrinen verschiedener Spezies ergab eindeutige Unterschiede zwischen Rattenserum-Transferrin und Human- und Hamsterserum-Transferrin. Aus dem beobachteten Relaxationsverhalten bei verschiedenen Temperaturen, zum Teil unterhalb des Gefrierpunktes der Transferrinproben, konnte geschlossen werden, daß die Proteinmoleküle eine innere Dynamik aufweisen. Bei ausreichender thermischer Energie gehen verschiedene Konformationsunterzustände von Transferrin ständig ineinander über.

Studies of Metal Binding by the Iron Transport Protein Transferrin using Time Differential Perturbed Angular Correlation Spectroscopy

Abstract

The binding of the transition metal hafnium to transferrin was studied under various chemical conditions using time differential perturbed $\gamma\gamma$ angular correlation spectroscopy (TDPAC). Observing the electric quadrupole interaction of the ^{181}Hf probe nuclei size and symmetry of the electric field gradient induced by the ligands of the metal ions can be determined. The experimental data also suggest how homogeneous the binding conditions are and to which extend relaxation phenomena are involved. Due to the excellent time resolution obtained with new BaF_2 detectors the quadrupole coupling parameters of ^{181}Hf -transferrin could be determined very accurately. Under nearly physiological conditions different binding configurations were quantitatively characterized by spectroscopic means and distinguished with high specificity.

In liquid samples two very homogeneous configurations were found between pH 7 and pH 9.5. The corresponding field gradients are very different in both size and symmetry. The distribution of the probe atoms between the two sites is determined merely by the pH-value of the sample. Biochemical studies showed that hafnium is bound at the two iron binding sites of transferrin located in the N- and C-terminal region of the molecule, respectively. Therefore the specific ^{181}Hf -transferrin configurations observed with TDPAC correspond to the two metal binding sites of the protein. In accord with former studies it has been concluded that the C- and N-terminal sites are nonequivalent both chemically and structurally. At comparatively low pH-values the C-configuration is preferred whereas at higher pH the N-configuration becomes more favoured.

Comparing the quadrupole coupling parameters in serumtransferrins of different species a significant deviation of rat serumtransferrin from human and hamster serumtransferrin was found. Intramolecular dynamics had to be assumed to explain the observed relaxation times at different temperatures even below the freezing point of the transferrin samples. At sufficient thermal energies fast transitions among a large number of conformational substates may occur.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Das Eisentransportprotein Transferrin	3
2.1.	Struktur und Funktion	3
2.2.	Biochemie der Metallbindung	6
2.3.	Motivation für TDPAC-Untersuchungen	9
3.	Grundlagen der zeitdifferentiellen Messung von gestörten $\gamma\gamma$ - Winkelkorrelationen (TDPAC) mit $^{181}\text{Hafnium}$	12
3.1.	Allgemeiner Formalismus	12
3.2.	Statische elektrische Quadrupolwechselwirkung in polykristallinen Proben	13
3.3.	Zeitabhängige elektrische Quadrupolwechselwirkung (Relaxation)	16
3.4.	Überlagerung von statischen und zeitabhängigen elektrischen Feldgradienten	17
3.5.	Winkelkorrelation mit $^{181}\text{Hafnium}$	18
4.	Aufbau und Funktion der TDPAC-Apparatur	22
4.1.	Nachweiszähler	22
4.2.	Prinzip der Datenaufnahme	23
5.	Reduktion und Auswertung der Daten	26
5.1.	Bestimmung des R(t)-Verhältnisses	26
5.2.	Auswertung der R(t)-Spektren	27
6.	TDPAC-Messungen an Hafnium-Transferrin	31
6.1.	In vivo beladenes Rattenserum	33
6.2.	In vitro beladenes Rattenserum	38
6.2.1.	Konzentrationsabhängigkeit	39
6.2.2.	pH-Abhängigkeit	43

6.3.	In vitro beladenes Humanserum	48
6.4.	In vitro beladenes Hamsterserum	55
6.5.	In vitro beladenes menschliches Apotransferrin	57
6.6.	Getrocknete und gefrorene Proben	62
7.	Diskussion der Ergebnisse	66
7.1.	Charakterisierung der Hafnium-Transferrin Bindung	66
7.1.1.	Spezifische Bindung	66
7.1.2.	Unspezifische Bindung	70
7.1.3.	Relaxationsverhalten	72
7.2.	Interpretation der Besetzungsverhältnisse	76
7.2.1.	pH-Abhängigkeit	76
7.2.2.	Konzentrationsabhängigkeit	78
7.3.	Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies	80
8.	Zusammenfassung und Ausblick	82
Anhang A	Aufbau der BaF ₂ -Detektoren	85
Anhang B	Beschreibung der Nachweiselektronik	89
Anhang C	Testmessungen	92
C1	Hafniumfluorid-Lösung	92
C2	Polykristallines HfF ₄ *HF*2H ₂ O	94
C3	Hafniumnitriolotriacetat-Lösung	95
C4	Polykristallines Hf-NTA	95
C5	Hafniumchlorid-Stammlösung	97
C6	Polykristallines Hafniumoxychlorid	97
Literaturverzeichnis		100

1. Einleitung

Die zeitdifferentielle Messung von gestörten $\gamma\gamma$ - Winkelkorrelationen zählt zu den kernspektroskopischen Verfahren auf der Grundlage der Hyperfeinwechselwirkung. In der Literatur wird die Methode allgemein als TDPAC-Spektroskopie (Time Differential Perturbed Angular Correlation spectroscopy) bezeichnet. Wie durch Kernquadrupolresonanz (NQR)- und Mößbauer-Untersuchungen ist es mit ihrer Hilfe möglich, elektrische Feldgradienten in unterschiedlichen Probenmaterialien zu bestimmen. Als Sondenkerne für TDPAC-Messungen kommen Isotope in Frage, die eine $\gamma\gamma$ - Kaskade aufweisen, deren Zwischenniveau eine mittlere Lebensdauer im Bereich von 10^{-6} bis 10^{-9} Sekunden und ein endliches Kernquadrupolmoment besitzt. Die Methode wird bei der Untersuchung von festkörperphysikalischen und chemischen Fragestellungen seit langem erfolgreich eingesetzt.

In biologische und biochemische Untersuchungen hat die TDPAC-Spektroskopie dagegen nur zögernd Eingang gefunden. Dabei bietet gerade dieses Verfahren die Möglichkeit, mit äußerst geringen Probenmengen (wenige Nanomol) Messungen unter physiologischen Bedingungen, d.h. in Lösung und bei Normaltemperatur, durchzuführen. Bindungsverhältnisse in Biomolekülen können mit hoher Spezifität bestimmt werden. Die vorliegende Arbeit wird versuchen, die Leistungsfähigkeit von TDPAC-Untersuchungen anhand einer speziellen Problemstellung in der Biologie aufzuzeigen. Verwendung findet dabei das Hafniumisotop ^{181}Hf , das aufgrund seiner Eigenschaften für solche Messungen sehr gut geeignet ist.

Eine physikalischen Methoden besonders zugängliche Klasse von biologischen Substanzen stellen die Metalloproteine dar. Diese Eiweißmoleküle binden ein oder mehrere Metallionen, die für ihre physiologische Funktion wesentlich sind, oder von ihnen im Rahmen der Stoffwechselfvorgänge gespeichert und transportiert werden. Zu den letzteren zählt das Transportprotein Transferrin. Es findet sich im Blutserum vieler Wirbeltiere, insbesondere auch des Menschen, und besitzt nur zwei Metallbindungsplätze pro Molekül. Die entscheidende Bedeutung kommt diesem Protein im Eisenmetabolismus zu. Mit biochemischen und physikalischen Methoden wurde aber auch gezeigt, daß an den Eisenbindungsplätzen von Transferrin viele andere Metallionen spezifisch gebunden werden.

Frühere Arbeiten im Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen (IGT) des Kernforschungszentrum Karlsruhe zeigten, daß dies auch für das Übergangsmetall Hafnium gilt. Damit war es möglich, mit ^{181}Hf Winkelkorrelationsmessungen an Transferrin durchzuführen und die Bindungsverhältnisse von Metallionen in diesem Protein zu untersuchen.

Wesentliche Beweggründe, derartige Experimente vorzunehmen, waren einige Aspekte der Metall-Transferrin Bindung, die mit anderen Methoden bisher nicht eindeutig geklärt werden konnten. Im Vordergrund standen dabei Fragen bezüglich möglicherweise vorhandenen Unterschieden in der chemischen Natur und im biochemischen Verhalten der beiden Metallbindungsplätze und deren Abhängigkeit von verschiedenen Parametern. Durch vergleichende Untersuchungen an in vivo und in vitro präparierten Proben sowie an den Serumtransferrinen verschiedener Spezies sollte geklärt werden, ob die Umgebung des Metalls in unterschiedlichen Systemen einheitlich definiert ist. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der TDPAC-Methode war es möglich, durch diese Messungen neue Ansätze bei der Untersuchung von Transferrinen aufzuzeigen.

Im Kapitel 2 werden zunächst Struktur und Funktion von Transferrin dargestellt und die für die Arbeit wichtigen Fragestellungen zur Metallbindung erläutert. Anschließend wird im dritten Kapitel die Theorie und das Prinzip von TDPAC-Untersuchungen kurz umrissen und der Sondenkern ^{181}Hf speziell vorgestellt. Kapitel 4 beschreibt den Aufbau und die Funktion der verwendeten Winkelkorrelationsapparaturen. Besondere Behandlung erfährt dabei die Verbesserung der Zeitauflösung, die durch den Einsatz von neu entwickelten BaF_2 -Kristallen erzielt wurde und die Voraussetzung für hochpräzise Messungen mit ^{181}Hf war. Im Anschluß daran wird in Kapitel 5 die Durchführung der Messungen und die Auswertung der gewonnenen Spektren erläutert. In Kapitel 6 werden die Präparationen der ^{181}Hf -Transferrin Proben beschrieben, die Durchführung der einzelnen Meßreihen geschildert und die Ergebnisse der Auswertung vorgestellt und kurz analysiert. Die Resultate der verschiedenen Meßreihen werden in Kapitel 7 auf ihre Aussagekraft untersucht und vergleichend bewertet. Es wird versucht, eine systematische Interpretation in Bezug auf die eingangs angesprochenen Fragestellungen zu geben.

2. Das Eisentransportprotein Transferrin

2.1. Struktur und Funktion

Die Transferrine sind β -globuläre Glykoproteine in den Körperflüssigkeiten von Wirbeltieren. Neben den Serumtransferrinen des Blutes, die hier als Untersuchungsgut dienten, gehören dazu auch die Ovotransferrine und Lactoferrine, die in Vogeleiern bzw. in der Milch und in anderen Körpersekreten von Säugetieren enthalten sind (siehe z.B. /Chas83/). Alle Transferrine bestehen aus einer einsträngigen Polypeptidkette und einem Kohlehydratanteil, der von Spezies zu Spezies stark variieren kann /Broc85/. Die Eiweißkette enthält rund 700 Aminosäuren, deren Sequenz für einige Transferrine bestimmt werden konnte (siehe /Bezk80/). So besteht z.B. Humanserum-Transferrin aus 679 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 79550 Dalton /McMe83/. Da die Sequenzen der ersten und der zweiten Hälfte des Proteinstranges zu 40 % homolog sind /MaMe82/, vermutet man, daß dieses Molekül bei der Evolution durch Verdopplung aus einem Vorgänger der halben Größe entstanden ist /Will85, PaSc85/.

Die Tertiärstruktur des gefalteten Proteins setzt sich entsprechend aus zwei räumlich getrennten, lappenförmigen Bereichen zusammen, die nur durch einen kurzen Aminosäurestrang verbunden sind /GoHo79/. Je nachdem, ob sie das Amino- oder das Carboxylende der Peptidkette enthalten, bezeichnet man die Untereinheiten als N- bzw. C-Terminale. Jeder dieser beiden Bereiche besitzt genau einen spezifischen Bindungsplatz für Eisenionen /WiEl82/. Der Abstand der Plätze beträgt ca. 35 Å /OHYe81/, sie liegen maximal 17 Å unter der Oberfläche des Proteins /YeMe80/. Das eisenfreie oder Apotransferrin hat nach /RoSo71/ angenähert die Form eines langgestreckten Ellipsoids mit der Dimension 25 Å x 25 Å x 62 Å. Kristallographische Untersuchungen liefern durchweg etwas größere Abmessungen (siehe z.B. /GoHo79/). Wenn die Metallbindungskapazität abgesättigt ist, d.h. zwei Eisenionen pro Molekül gebunden sind, wird die Struktur etwas kompakter und das effektive Volumen kleiner. Das Protein erfährt also eine deutliche Konformationsänderung /Chas77/.

Die Liganden der beiden Metallionen im Transferrin sind bisher nicht eindeutig bekannt. Vieles spricht jedoch dafür, daß jeweils zwei Tyrosine, ein oder zwei Histidine und ein Wassermolekül oder Hydroxidion an der Bindung be-

teiligt sind. Zum Teil gibt es auch schon konkrete Vorstellungen, welche Positionen die metallbindenden Aminosäuren in der Peptidsequenz einnehmen und wie ihre räumliche Anordnung aussehen könnte /Chas83, MoMa85/.

Neben der starken spezifischen Bindung in den N- und C-Terminal Sites können Metallionen in geringem Maße auch eine schwache Bindung an der Oberfläche des Proteins eingehen, die üblicherweise als 'unspezifisch' bezeichnet wird /BaSc73/.

Eine einzigartige Besonderheit der spezifischen Metall-Transferrin Bindung stellt die Tatsache dar, daß sie nur zusammen mit der 'synergistischen' Bindung bestimmter Anionen erfolgen kann (siehe z.B. /GeHa80/). Es ist erwiesen, daß in vivo Carbonat oder Bicarbonat als synergistische Anionen dienen /ZwWo81/. In deren Abwesenheit können aber auch eine Vielzahl anderer organischer Anionen diese Rolle übernehmen /ScBa75/. Die Voraussetzungen für synergistische Anionen sind klar umrissen. Sie müssen sowohl eine Carboxylgruppe als auch eine weitere funktionelle Gruppe, die als Metallligand geeignet ist, in einem Abstand kleiner $6,3 \text{ \AA}$ enthalten und dürfen nicht größer als $ca. 3 \text{ \AA} \times 6 \text{ \AA} \times 6 \text{ \AA}$ sein /ScBa75/. Das favorisierte Modell der synergistischen Metall-Anion Bindung des Transferrins geht davon aus, daß das Anion über die funktionelle Gruppe mit dem Metallion koordiniert ist, während die Carboxylgruppe wahrscheinlich an Arginin- und/oder Lysin-Residuen der Peptidkette des Proteins bindet (siehe z.B. /Broc85/). Neben den bereits genannten Bindungen stellt das synergistische Anion damit eine weitere bindende Brücke zwischen Metall und Transferrin dar. Zu den in Frage kommenden Anionen zählen Nitrilotriacetat(NTA), Malonat, Oxalat und Maleat /CaCh77/. Nicht geeignet sind z.B. Succinat, Chloroacetat und Citrat /ScBa75/.

Eisen wird von Transferrin als dreiwertiges Ion (Fe^{3+}) im high-spin Zustand gebunden. Die Bindung ist vergleichsweise stark, unter physiologischen Bedingungen beträgt die Bindungskonstante etwa 10^{24} Mol^{-1} , nimmt in ihrer Stabilität mit sinkendem pH-Wert jedoch schnell ab /AiLe68/.

Neben Eisen bindet Transferrin, wenngleich stets schwächer, eine Vielzahl anderer Metallionen mit unterschiedlichen Wertigkeiten spezifisch /Broc85/. Genannt seien hier als Beispiele die Übergangsmetall-Ionen Cr^{3+} , Cd^{2+} und Ni^{2+} /TaWo69/, die Lanthaniden Ho^{3+} , Nd^{3+} und Pr^{3+} /LukC71/, die Aktiniden Th^{4+} , Np^{5+} und Pu^{4+} /HaCa81, WiTa85, DuTa86/ und das in dieser Arbeit im

Vordergrund stehende Hf^{4+} /TaLe83/. Bindungskonstanten sind absolut bisher kaum bestimmt worden. Es gibt jedoch konkrete Aussagen über die relativen Affinitäten der einzelnen Metallionen zu Transferrin /TaWo69/. Insbesondere wurde gezeigt, daß bei größeren Ionenradien ($\geq 1 \text{ \AA}$) eine der beiden Bindungsstellen nicht mehr besetzt werden kann, und daß die Koordination zumindest an einem der beiden Plätze von Metall zu Metall verschieden sein kann /HaCa81/.

Die Struktur von Transferrin sowie seine Eigenschaften bezüglich der Bindung von Metallen sind in einigen zusammenfassenden Artikeln ausführlich dargestellt (z.B. /AiLi80, Aise80, Chas83, Broc85/). Dort finden sich auch zahlreiche Verweise auf die Originalliteratur. Gleiches gilt für die folgenden Ausführungen zur Funktion und zum physiologischen Verhalten der Serumtransferrine (siehe z.B. /Morg74, Brow76, AiBr77, Gori82, Chun84/).

Hauptaufgabe des Transferrins ist der Eisentransport von Stellen der Aufnahme und Speicherung sowie des Erythrozyten-Abbaus zum blutbildenden Gewebe (siehe z.B. /Chun84/). Man geht davon aus, daß der wesentliche Aufnahmemechanismus der Zellen dabei die rezeptorvermittelte Endozytose ist /Daut86/. Bei diesem Prozess wird das eisenbeladene Transferrin an spezifischen Rezeptorproteinen der Zellmembran /Test85/ gebunden und zusammen mit diesen internalisiert. Nachdem das Eisen gelöst worden ist, wird das Apotransferrin von der Zelle wieder freigesetzt. Da die Eisen-Transferrin Bindung so stark ist, erfordert die Ablösung des Metalls einen speziellen Mechanismus, der noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte (siehe /Broc85/). Es wird vermutet, daß zunächst durch einen erniedrigten pH-Wert, wie er z.B. in den Lysosomen vorhanden ist, einer oder mehrere Liganden des Eisens (evtl. das Carbonat-Ion) protoniert werden /PaAr84/. Dadurch geht das Protein aus einer geschlossenen, stabilen Konformation in eine offene, reaktionsfähige über. Vorhandene Chelatbildner können dann mit Fe^{3+} , Transferrin und Hydrogencarbonat einen Zwischenkomplex bilden, der zerfällt und den Fe^{3+} - Chelatkomplex und das synergistische Anion freisetzt /DaCi83/. Eventuell findet dabei auch eine Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} statt /KoBa79/. In jedem Fall wird das Transferrin in der Zelle nicht abgebaut, sondern steht nach der Exozytose für weitere Transportzyklen zur Verfügung.

Die Konzentration von Transferrin im Serum variiert für verschiedene Spezies etwa zwischen 20 und 50 $\mu\text{Mol/Liter}$ /Morg80/. Je nach Spezies ist ein Anteil von 15 bis 60 % der damit verbundenen Bindungskapazität mit Eisen gesättigt.

Beim Menschen beträgt die Transferrinkonzentration zum Beispiel durchschnittlich $36 \pm 5 \mu\text{Mol}$ oder ca. 2,9 Gramm pro Liter /StDe84/, die Eisenbindungskapazität ist bei Frauen zu 34 %, bei Männern zu 39 % abgesättigt.

Neben seiner Funktion im Eisenstoffwechsel spielt Transferrin auch in der Immunabwehr und bei der Bekämpfung von Infektionen eine wichtige Rolle. Mikroorganismen benötigen für Wachstum und Vermehrung in der Regel größere Mengen Eisen. Dessen Zugänglichkeit wird jedoch durch die hohe Affinität an Transferrin erschwert. Durch eine verstärkte Transferrinproduktion kann der Organismus die Ausbreitung von Fremdkörpern in verstärktem Maße eindämmen. Transferrin kann so als Teil der unspezifischen Immunabwehr verstanden werden. Es wirkt darüber hinaus vermutlich auch als Regelmechanismus im Immunsystem indem es die Produktion von Antikörpern stimuliert. Die jeweilige Transferrinkonzentration bestimmt die bakterienwachstumshemmenden Eigenschaften des Serums wesentlich mit (siehe z.B. /Broc85, GaIs85/).

2.2. Biochemie der Metallbindung

Die Existenz von zwei spezifischen Metallbindungsplätzen pro Transferrinmolekül führt zwangsläufig zu Fragen nach strukturellen, funktionellen und bindungsschemischen Unterschieden und eventuell vorhandenen Wechselwirkungen zwischen diesen Plätzen (siehe z.B. /Chas83/). In der Tat wurde in vielen Untersuchungen aufgezeigt, daß sich die N- bzw. C-Terminale des Proteins bei der Metallbindung unterschiedlich verhalten (vgl. /Chas77, AiLi80, Bez80/). Es wurde aber auch klar, daß die auftretenden Unterschiede stark von den chemischen und physikalischen Bedingungen abhängen /BaSo81, DeMo82, EiNo78, Harr77, LeAi79/. Die Konzentrationsverhältnisse zwischen den Metallionen, den synergistischen Anionen und Transferrin, der pH-Wert und die Temperatur der Lösung sowie die Salzkonzentration gehen entscheidend in die resultierende Verteilung der Metallionen auf die beiden Plätze ein /HuJo84, MoHu78, PrZa76, WiMo80, ZaAi85/.

Unter physiologischen Bedingungen (atmosphärisches CO_2 , $\text{pH} = 7,4$) unterscheiden sich die Bindungskonstanten für Fe_N - und Fe_C -Transferrin schon deutlich ($2,4 \cdot 10^{19}$ bzw. $4,7 \cdot 10^{20} \text{ M}^{-1}$) /AiLe78/. Bei niedrigeren pH-Werten wird diese Diskrepanz größer, bis bei $\text{pH} = 5,5$ Eisen nur noch am C-Terminal gebunden wird /PrZa75, Lest76/. Man bezeichnet deshalb das C-Terminal auch

als 'acid stable'(A-), das N-Terminal als 'acid labile'(B-) 'site' /EvWi78/. Umgekehrt wird bei höheren pH-Werten ($> 8,2$) die Bindung am N-Terminal bevorzugt /ChWi81, AiLe78/. Der Grad der Bevorzugung hängt entscheidend von der Salzkonzentration ab /WiCh82/. Sowohl in stark sauren ($\text{pH} < 5$) /PrZa75/, als auch in stark alkalischen Medien ($\text{pH} > 9,5$) /ZaPr80/ geht die Eisenbindungskapazität völlig verloren.

Mit der Bindung des ersten Metallions ist offensichtlich eine Konformationsänderung des Proteins verbunden /KiSi85/. Ob dadurch die Bindung des zweiten Metallions erleichtert oder erschwert wird, ob also positive oder negative Kooperativität vorliegt, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Nach /AiLe78/ tritt bei niedrigen pH-Werten negative, bei höheren pH-Werten positive Beeinflussung auf. Im physiologischen Bereich ist keine Wechselwirkung zwischen beiden Plätzen erkennbar /ChWi81/. Änderungen in der Salzkonzentration, der Temperatur und anderen Bedingungen bewirken auch hier deutliche Verschiebungen.

Spektroskopische Studien, vor allem ESR (Elektronen - Spin - Resonanz) - Messungen, zeigen ebenfalls Unterschiede zwischen den N- und C-Terminal Bindungsplätzen auf /Aasa72, AiLe78, ZaLe78/. Konkrete Vorstellungen über die strukturellen Unterschiede, die zu den verschiedenen Ladungsverteilungen um die Metallionen führen, gibt es jedoch nicht (siehe /Chas83/). Dabei ist auch zu berücksichtigen, daß die ESR-Messungen überwiegend bei tiefen Temperaturen durchgeführt werden. Das Protein befindet sich folglich nicht im physiologischen Zustand. Die spektroskopisch beobachteten Abweichungen zwischen den Bindungsstellen sind stets sehr klein und daher nur schwer zu parametrisieren. Es gibt auch Hinweise darauf, daß jeder der beiden Plätze in verschiedenen Konfigurationen existieren kann, die einander sehr ähnlich sind /BaSo82/. Als mögliche Ursache für diese Beobachtung werden kleine Änderungen in der Tertiärstruktur des Proteins genannt /CaCh80, ChWi81, PeHa81/. Im Extremfall führen die Konformationsänderungen nach /HaCa81/ sogar dazu, daß sich bei hohen pH-Werten der C-Terminal Platz in seinen spektroskopischen Eigenschaften dem N-Terminal Platz völlig angleicht.

Es überrascht nicht, daß sich die Gegenwart verschiedener synergistischer Anionen in spektroskopischen Untersuchungen am Metallion bemerkbar macht /AiLe74/ wenn Anion und Metall im Transferrin-Komplex direkt aneinander gebunden sind /ZwAi79/. Die Natur der verwendeten Anionen bzw. der angebotenen

Metall-Anion Komplexe beeinflusst aber auch die Reaktionskinetik und die Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts der Metall-Transferrin Bindung ganz entscheidend /AiLe78/. Während z.B. mit Fe-NTA oder ähnlichen Chelaten die Bindung ans C-Terminal bevorzugt wird, geben Citrat- und Oxalat-Komplexe das Metall vornehmlich ans N-Terminal ab /EvWi78, ZaPr80/. Andere Anionen (z.B. Ascorbat) zeigen keine Präferenz /ZaPr77/. Offensichtlich findet nach erfolgter teilweiser Beladung des Transferrins nach reaktionskinetischen Gesichtspunkten in größeren Zeiträumen (Stunden bis Tage) eine Umbesetzung auf Grund der thermodynamischen Stabilitätskonstanten statt /EiNo78/. Wenn Bicarbonat zugegen ist, verdrängt dieses dabei das ursprünglich eingesetzte Anion vom synergistischen Bindungsplatz am Transferrin /KoBa79/.

Die geschilderte Komplexität der Metall-Transferrin Bindung, wie sie hauptsächlich in vitro beobachtet wurde, läßt nur schwer Schlüsse auf das tatsächliche physiologische Verhalten im lebenden Organismus zu /Broc85/. Außerdem liegen im Blut viele Komponenten vor, deren Einfluß auf die Bindung von Metallionen an Transferrin in der Gesamtheit kaum beurteilt werden kann.

Ovotransferrin und Lactoferrin unterscheiden sich in Bezug auf die Metallbindung von den Serumtransferrinen. So ist z.B. die Bindungskonstante für Eisen bei Lactoferrin wesentlich höher als bei Serumtransferrin, so daß die Fe-Lactoferrin Bindung bis herunter zu pH = 2 stabil bleibt /AiLe72/. Auch zwischen den Serumtransferrinen verschiedener Spezies treten kleine Unterschiede im Bindungsverhalten auf /Brow76/. Ob dies die Konsequenz struktureller Eigenschaften der Bindungsplätze selbst ist, konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Darüber hinaus gibt es in einzelnen Spezies verschiedene Transferrin-Varianten. So sind in der Ratte zwei 'Iso'-Transferrine nachgewiesen /OkJa79/, im menschlichen Serum gibt es eine Vielzahl genetischer Varianten, die in unterschiedlichen Häufigkeiten auftreten /Budo85/. Es scheint gesichert, daß diese Heterogenität hauptsächlich auf Unterschieden im Gehalt an Sialinsäuren, der Struktur und Anordnung der Polysaccharid-Ketten und auf der Substitution oder Auslassung einiger weniger, funktionell unbedeutender Aminosäuren der Sequenz beruht. Konsequenzen für die Metallbindung und die Funktion des Transferrins werden allgemein verneint (siehe /Broc85/).

2.3. Motivation für TDPAC Untersuchungen

Spektroskopische Methoden sind speziell geeignet, die Metallbindungsplätze in Makromolekülen zu charakterisieren, wenn kristallographische Experimente keine Aufschlüsse geben. Vor allem ESR-Messungen, aber auch optische und UV-Differenzspektroskopie wurden bisher zur Untersuchung der Metall-Transferrin-Bindung herangezogen. Dabei gelang es, spezifische Signale zu detektieren, die typisch für einzelne Metall-Transferrin-Anion Komplexe sind. Es wurden kleine Unterschiede zwischen den beiden Bindungsplätzen gefunden, die aber nur schwer quantifizierbar sind (siehe z.B. /Chas83/). Kernspektroskopische Untersuchungen an ^{57}Fe -Transferrin mit Hilfe des Mößbauer-Effekts ließen keine Rückschlüsse auf eine spektroskopische Unterscheidbarkeit der Plätze zu /SpOo73, TsBo73, TsBo76/. Ursache dafür könnte sein, daß solche Messungen, wie auch ESR-Experimente, nur bei Proben im festen Zustand wohldefinierte Signale liefern /GrG174/. Da es bisher nicht möglich ist, Transferrine zuverlässig auszukristallisieren, ist man gezwungen, das Probenmaterial einzufrieren und bei tiefen Temperaturen zu messen. Dabei können sich aber die Bindungsverhältnisse, bei denen ja auch Wassermoleküle eine wesentliche Rolle spielen, entscheidend verändern. Unterschiede zwischen verschiedenen Konfigurationen verschwinden unter diesen Umständen ganz oder teilweise. Auch wird jegliche innere Dynamik, die bei vielen Proteinen eine wichtige Rolle spielt /Frau84, Para85/, erheblich beeinflußt wenn die Temperatur so drastisch erniedrigt wird /FrPe79/. Das Protein wird dann in einer Reihe von geringfügig unterschiedlichen Zuständen ('conformational substates') eingefroren, die bei Normaltemperatur ständig ineinander übergehen /HaPa82, SiSc84/. Ist es nicht möglich, diese Zustände spektroskopisch aufzulösen, so werden nur unspezifische Signale beobachtet.

Die TDPAC Methode unterliegt keinen Einschränkungen bezüglich Temperatur und Aggregatzustand. Für Sondenkerne, die an Makromoleküle gebunden sind, erhält man auch in flüssigen Proben sehr spezifische Aussagen über die Wechselwirkung mit der Ladungsverteilung ihrer unmittelbaren Umgebung /Baue85/. Wie sowohl theoretische Überlegungen als auch eine Vielzahl chemischer und festkörperphysikalischer Untersuchungen mittels TDPAC zeigen, machen sich bei diesem Verfahren auch kleine Unterschiede in den Bindungsverhältnissen stark bemerkbar (siehe z.B. /Adlo78, Rinn79, BoBa84/. Die Methode ist auch dynamischen Prozessen gegenüber empfindlich. Aus dem beobachteten Relaxationsverhalten können die typischen Umorientierungszeiten bestimmt werden /GrG174, SaHa78/.

Von den genannten Voraussetzungen her erscheint die TDPAC Methode für die Untersuchung einer ganzen Reihe von Aspekten der Metall-Transferrin Bindung geradezu prädestiniert:

- Die chemische Umgebung des Metallions im Transferrin kann über die Wechselwirkung mit dem Quadrupolmoment des Sondenkerns eindeutig parametrisiert werden. Der Einfluß verschiedener Anionen kann aufgezeigt werden.
- Die Frage, ob die beiden Bindungsplätze gleich oder verschieden sind, sollte eindeutig beantwortet, vorhandene Unterschiede klar erfaßt werden können.
- Unter der Voraussetzung, daß sich die Plätze mit TDPAC unterscheiden lassen, kann die Verteilung der Metallionen auf N- und C-Terminal unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden. Einflüsse von Konzentrationsverhältnissen, Sättigungsgrad, verschiedenen Anionen, Salzgehalt, pH-Wert und Temperatur auf das Besetzungsverhältnis könnten sichtbar gemacht werden.
- Vergleichende Untersuchungen an den Serumtransferrinen verschiedener Spezies oder an den Varianten der gleichen Art können Aufschluß geben, ob beobachtete Unterschiede im biochemischen Verhalten auch an den Metallbindungsplätzen erkennbar sind.
- Experimente können sowohl in vivo, d.h. nach Injektion der Metallionen in den lebenden Organismus, als auch in vitro mit Serum oder kommerziell erhältlichem Apotransferrin durchgeführt werden.
- Messungen an flüssigen, eingefrorenen und getrockneten Proben versprechen Aufschlüsse über Veränderungen beim Übergang zur festen Phase. Eine Bewertung der Ergebnisse, wie sie mit anderen Methoden unter solchen Bedingungen gewonnen werden, würde dadurch erleichtert.

Für alle dazu notwendigen TDPAC Experimente, mit Ausnahme der in vivo Injektionen, werden nur äußerst geringe Mengen radioaktiver Sondenkerne und damit auch nur geringe Transferrinkonzentrationen benötigt. Physiologische Mengen, d.h. 10 bis 100 nMol/ml, sind vollkommen ausreichend.

Für die Entscheidung, ^{181}Hf als Sondenkern einzusetzen, waren mehrere Gründe maßgeblich. Voraussetzung war, daß gezeigt werden konnte, daß auch Hafnium spezifisch an Transferrin bindet. Eine Reihe von Untersuchungen, die im Institut mit biochemischen Methoden durchgeführt wurden, bestätigten diese

Tatsache /TaLe83, TaDu86/. Eine wesentliche Rolle spielte die besondere Eignung des Isotops ^{181}Hf für Winkelkorrelationsmessungen, die später noch eingehend erläutert wird. Für biologische Untersuchungen äußerst angenehm ist die mit 42,4 Tagen relativ lange Halbwertszeit des Mutterisotops. Erste TDPAC-Untersuchungen an Transferrin mit ^{181}Hf /ThZe83/ zeigten bereits, daß mit diesem Isotop im Gegensatz zu ^{111}In /MaSk78, SmLu84/ sehr spezifische 'Fingerabdrücke' der Metall-Transferrin Bindung gewonnen werden können. Wie bei allen PAC-Nukliden, die über Elektroneneinfangprozesse erzeugt werden, zu erwarten ist, führt die Reorganisation der Elektronenstruktur in ^{111}In -Transferrin offensichtlich zu einer starken Störung der Sondenkernelngebung (sog. 'Aftereffekte'). Dies ist nach dem β^- - Zerfall bei ^{181}Hf nicht zu befürchten (siehe /BoBa84/).

Aus der Sicht der Toxikologie ist von Interesse, daß sich Hafnium metabolisch ähnlich verhält wie das hochgiftige Plutonium, dessen Wirkung und Dekorporation Gegenstand vieler Untersuchungen ist /TaLe83/. Beide Metalle treten bevorzugt vierwertig auf, haben ähnliche Ionenradien und äußere Elektronenkonfigurationen und die gleiche Tendenz zur Hydrolyse in wässrigen Medien (vgl. /Zell84/).

3. Grundlagen der zeitdifferentiellen Messung von gestörten $\gamma\gamma$ - Winkelkorrelationen (TDPAC) mit ^{181}Hf

3.1. Allgemeiner Formalismus

Die Theorie gestörter Winkelkorrelationen ist für die meisten Anwendungen wohlverstanden und wird in einer Reihe von Arbeiten ausführlich dargestellt (siehe z.B. /FrSt65, ShHa72, StAl75/). An dieser Stelle sollen im folgenden nur die Grundlagen der $\gamma\gamma$ - Winkelkorrelationen für die Spezialfälle der statischen elektrischen Quadrupolwechselwirkung in polykristallinen Proben und der Wechselwirkung mit zeitlich veränderlichen elektrischen Feldgradienten kurz beschrieben werden.

Geht ein angeregter Kern durch die sukzessive Emission zweier γ - Quanten ($\gamma\gamma$ - Kaskade) in einen tieferliegenden Zustand über, so erfolgt die Abstrahlung des zweiten Quants bezüglich der Richtung des ersten in der Regel nicht mehr isotrop. Die Wahrscheinlichkeit W , daß die beiden γ - Quanten unter einem Winkel θ emittiert werden, ergibt sich zu

$$W(\theta) = \sum_{k=0}^{k_{\max}} A_{kk} P_k(\cos\theta) \quad (3/1)$$

P_k sind die Legendre-Polynome, die Koeffizienten A_{kk} hängen von den Multipolaritäten L_1 und L_2 der beiden Übergänge, sowie von den Kernspins I_a , I_i und I_g der beteiligten Niveaus ab (siehe Abb. 1).

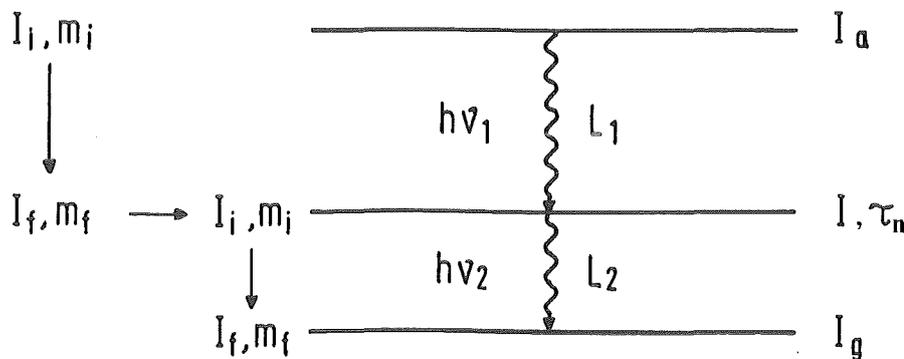


Abb. 1: Niveauschema einer $\gamma\gamma$ - Kaskade

Meist genügt es, sich auf die kleinstmöglichen Multipolaritäten zu beschränken, so daß gilt:

$$L_1 = |I_a - I|, L_2 = |I - I_g| \text{ und}$$

$$A_{kk} = F_k(L_1, L_1, I_a, I) * F_k(L_2, L_2, I, I_g)$$

Die Korrelationskoeffizienten F_k können explizit berechnet werden, sie liegen für verschiedene Spins tabelliert vor (siehe z.B. /Appe68/). Für reine Richtungskorrelationen, d.h. ohne Berücksichtigung der Polarisation, treten nur gerade Werte für k bis $k_{\max} = \text{Min}(2I, 2L_1, 2L_2)$ auf.

Wechselwirkt nun der Kern während der Lebensdauer τ_n des Zwischenzustands der Kaskade mit der Ladungsverteilung seiner Umgebung, so wird die Korrelationsfunktion $W(\theta)$ auch zeitabhängig ($W = W(\theta, t)$). Für Sondenkerne in polykristallinen Proben kann diese Zeitabhängigkeit durch Einführung einer Störfunktion $G_{kk}(t)$ parametrisiert werden:

$$W(\theta, t) = \sum_{k=0}^{k_{\max}} G_{kk}(t) A_{kk} P_k(\cos\theta) \quad (3/2)$$

Die Störfunktion $G_{kk}(t)$ wird von der Art der vorliegenden Wechselwirkung zwischen dem Kern und seiner Umgebung bestimmt.

3.2. Statische elektrische Quadrupolwechselwirkung in polykristallinen Proben

Erzeugt die Ladungsverteilung der Sondenkernelngebung ein inhomogenes elektrisches Feld \vec{E} , d.h. einen elektrischen Feldgradienten (EFG) am Kernort, so wechselwirkt dieser mit dem Quadrupolmoment Q des Kerns. Allgemein ergibt sich der Störfaktor für die statische elektrische Quadrupolwechselwirkung zu:

$$G_{kk}(t) = \sum_{n=0}^{n_{\max}} s_{kn}(\eta) \cos(c_n(\eta)\omega_0 t) \quad (3/3)$$

Diese Beziehung sowie die in ihr enthaltenen Größen sollen im folgenden erläutert werden.

Der elektrische Feldgradient ist ein Tensor zweiter Stufe, der sich aus dem elektrischen Potential $V = -\Phi$ ableitet:

$$V_{ij} = \text{grad } \vec{E} = \frac{\partial}{\partial x_i} \frac{\partial}{\partial x_j} V$$

Im Hauptachsensystem x, y, z sind nur die Diagonalelemente V_{ii} von Null verschieden. Ihre Summe, d.h. die Spur des Tensors, liefert keinen Beitrag zur Quadrupolaufspaltung und wird deshalb Null gesetzt: $V_{xx} + V_{yy} + V_{zz} = 0$.

Üblicherweise ordnet man die Beträge der einzelnen Komponenten gemäß $|V_{zz}| \geq |V_{yy}| \geq |V_{xx}|$ und beschreibt den EFG durch die größte Komponente $|V_{zz}|$ und einen Asymmetrieparameter $\eta = (V_{xx} - V_{yy})/V_{zz}$, der dann stets zwischen Null und Eins liegt.

Durch die Wechselwirkung des EFG mit dem Quadrupolmoment Q des Kerns im Zwischenzustand wird die Entartung der m -Unterzustände zum Kernspin I teilweise aufgehoben. Im axialsymmetrischen Fall $V_{xx} = V_{yy}$, d.h. $\eta = 0$, lassen sich die zugehörigen Aufspaltungsenergien $\Delta E_{mm'} = E_m - E_{m'}$ leicht berechnen:

$$\Delta E_{mm'} = (m^2 - m'^2) \frac{3eQV_{zz}}{4I(2I-1)}$$

Als praktische Größen definiert man die Quadrupolfrequenz ω_Q , oder auch die spinunabhängige Quadrupolkopplungskonstante ν_Q :

$$\omega_Q = \frac{eQV_{zz}}{4I(2I-1)\hbar}, \quad \nu_Q = \frac{eQV_{zz}}{\hbar} \quad (3/4)$$

Die Frequenz ω_0 in Gleichung (3/3) entspricht der kleinsten auftretenden Energiedifferenz $\Delta E_{mm'}$ ($= \hbar\omega_0$). Für ganzzahlige I gilt $\omega_0 = 3\omega_Q$, für halbzahlige I $\omega_0 = 6\omega_Q$. Alle möglichen Energiedifferenzen $\hbar\omega_n$ ergeben sich für $\eta = 0$ aus ganzzahligen Vielfachen der Grundfrequenz ω_0 :

$$\omega_n = n\omega_0, \text{ wobei } \begin{cases} n = |m^2 - m'^2| & \text{und } n_{\max} = I^2 & \text{für ganzzahlige } I \\ n = |m^2 - m'^2|/2 & \text{und } n_{\max} = (4I^2 - 1)/8 & \text{für halbzahlige } I \end{cases}$$

Im allgemeinen Fall eines nichtaxialsymmetrischen Feldgradienten ($\eta \neq 0$) verschieben sich die Energieniveaus der magnetischen Unterzustände gegeneinander, die verschiedenen Energiedifferenzen stehen nicht mehr in ganzzahligen Verhältnissen zueinander. Üblicherweise beschreibt man die Auf-

spaltung weiter mit der oben definierten Grundfrequenz ω_0 , obwohl diese nun nicht mehr der kleinsten Energiedifferenz entspricht, und schreibt:

$$\omega_n = c_n(\eta)\omega_0$$

Die Faktoren $c_n(\eta)$ können durch Diagonalisieren der Wechselwirkungsmatrix $\langle \text{Im} | H_Q | \text{Im}' \rangle$, wobei H_Q der Hamiltonoperator der statischen elektrischen Quadrupolwechselwirkung ist, für beliebige η berechnet werden (siehe z.B. /Heid81/). Sie sind für $I = 5/2$ in Abb. 2a dargestellt. Es gilt stets $c_n(\eta = 0) = n$ (axialsymmetrischer Grenzfall) und $c_0(\eta) = 0$.

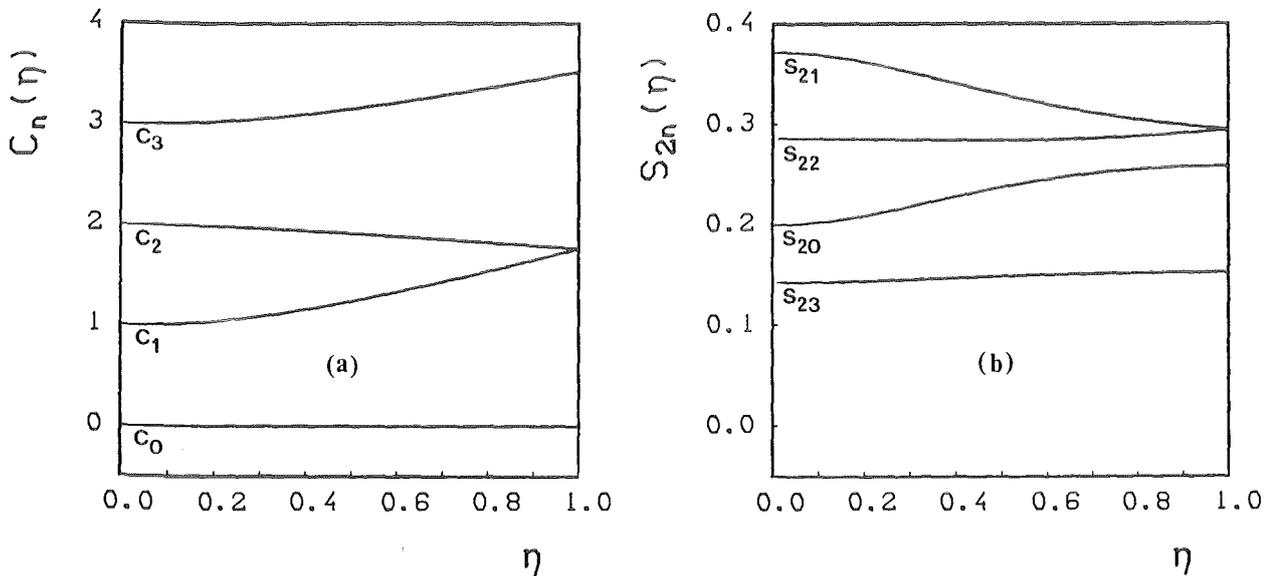


Abb. 2: Koeffizienten $c_n(\eta)$ (a) und $s_{2n}(\eta)$ (b) als Funktion des Asymmetrieparameters η für $I = 5/2$

Die Besetzung der m -Unterzustände ist nicht statisch. Durch die Quadrupolwechselwirkung werden während der Lebensdauer τ_n des Zwischenniveaus periodische Umbesetzungen bewirkt. Im halbklassischen Sinn präzediert die Polarisationsachse mit den Frequenzen ω_n um die Hauptachsen des elektrischen Feldgradienten. Die Beiträge der einzelnen Übergänge $m \rightarrow m'$ werden durch die Koeffizienten s_{kn} beschrieben. Für $\eta = 0$ ergeben sich die s_{kn} in polykristallinen Proben aus den 3j-Symbolen:

$$s_{kn} = \sum_{m, m'} \left(\begin{matrix} I & I & k \\ m' & -m & m-m' \end{matrix} \right)^2$$

Für $\eta \neq 0$ werden auch die s_{kn} eine Funktion des Asymmetrieparameters und müssen aus der Diagonalisierung der Wechselwirkungsmatrix bestimmt werden (vgl. /Heid81/). Abb. 2b zeigt die Ergebnisse für $k = 2$ und $I = 5/2$.

Die Störfunktion $G_{kk}(t)$ (Gleichung 3/3) beschreibt folglich die Gesamtheit der periodischen Umbesetzungen zwischen den Unterzuständen des Zwischen-niveaus, ist jedoch für $\eta \neq 0$ im allgemeinen selbst keine periodische Funktion mehr.

3.3. Zeitabhängige elektrische Quadrupolwechselwirkung (Relaxation)

Durch isotrope Reorientierung, wie sie z.B. aufgrund der Brown'schen Bewegung in Flüssigkeiten auftritt, ändert sich der EFG am Ort des Sondenkerns statistisch mit der Zeit. Diese Zeitabhängigkeit äußert sich in der Störfunktion für die Quadrupolwechselwirkung allgemein als exponentielle Dämpfung mit der Relaxationskonstanten λ_k :

$$G_{kk}(t) \sim e^{-\lambda_k t} \quad (3/5)$$

Die Schnelligkeit der Relaxationsprozesse wird durch eine mittlere Reorientierungsrate W bzw. durch die zugehörige Korrelationszeit $\tau_c = 1/W$ beschrieben. Je nach der Größe von τ_c im Vergleich zur charakteristischen Wechselwirkungszeit $1/\omega_Q$ können drei Fälle unterschieden werden:

a) Schnelle Relaxation

Für $\omega_Q \tau_c \ll 0,1$ erhält man ein rein exponentielles Abklingen der Anisotropie mit der Störfunktion /AbPo53/:

$$G_{kk}(t) = e^{-\lambda_k t} \quad (3/6)$$

mit
$$\lambda_k = \frac{3k(k+1)[4I(I+1)-k(k+1)-1]}{5} \langle \omega_Q^2 \rangle \tau_c$$

Aufgrund der Schnelligkeit der zeitlichen Änderung mittelt sich die statische Störung heraus, ist also nicht mehr beobachtbar. Im Extremfall $\tau_c \rightarrow 0$ geht auch λ_k gegen Null, die Zeitabhängigkeit verschwindet ganz und man beobachtet die ungestörte Winkelkorrelation $W(\theta)$.

b) Mittlere Relaxationszeiten

Für $\omega_0 \tau_c \approx 1$ läßt sich die Störfunktion allgemein nicht analytisch angeben /BoBa84/. Der Zusammenhang zwischen λ_k und τ_c kann nur durch spezielle Relaxationsmodelle beschrieben werden (siehe z.B. /Blum71, Zell84/).

c) Langsame Relaxation

Für $\omega_0 \tau_c \gg 10$ ergibt sich eine 'quasistatische' Störung, d.h. der statischen Störfunktion $G_{kk}^{stat}(t)$ ist eine exponentielle Dämpfung aufgrund der Relaxation überlagert (siehe z.B. /MaMe72/):

$$G_{kk}(t) = e^{-\lambda_k t} G_{kk}^{stat}(t) \quad (3/7)$$

mit
$$\lambda_k = \frac{k(k+1)}{6\tau_c}$$

Die Relaxationskonstante ist in diesem Bereich umgekehrt proportional zur Korrelationszeit, geht also auch für sehr langsame Reorientierung ($\tau_c \rightarrow \infty$) gegen Null. Man beobachtet dann die reine statische Störung $G_{kk}^{stat}(t)$.

3.4. Überlagerung von statischen und zeitabhängigen Feldgradienten

Es besteht auch die Möglichkeit, daß nur ein Teil der Sondenkerneln umgebung statisch ist, also einen in Betrag und Richtung zeitlich konstanten EFG erzeugt, zum Teil aber auch Fluktuationen auftreten, die einen reorientierenden Feldgradienten bewirken. Für eine solche Überlagerung lassen sich in den Grenzfällen langer und kurzer Korrelationszeiten die resultierenden Störfunktionen analytisch angeben /BoBa84/.

a) Schnelle Relaxation $\omega_0 \tau_c \ll 0,1$

Man erhält:

$$G_{kk}(t) = e^{-\lambda_k t} G_{kk}^{stat}(t) \quad (3/8)$$

mit
$$\lambda_k = \frac{3k(k+1)[4I(I+1) - k(k+1) - 1]}{5} \langle \omega_Q^2 \rangle \tau_c$$

Im Grenzfall $\tau_c \rightarrow 0$ ist nur der statische Anteil der Störung beobachtbar:

$$G_{kk}(t) = G_{kk}^{stat}(t)$$

b) Langsame Relaxation $\omega_0 \tau_c \gg 10$

Formal ergibt sich wieder eine 'quasistatische' Störung:

$$G_{kk}(t) = e^{-\lambda_k t} \overline{G_{kk}^{\text{stat}}(t)} \quad (3/9)$$

mit
$$\lambda_k = \frac{k(k+1)}{6\tau_c}$$

$\overline{G_{kk}^{\text{stat}}(t)}$ ist jetzt durch die statische Überlagerung des zeitunabhängigen und des fluktuierenden Feldgradienten gegeben. Für $\tau_c \rightarrow \infty$ verschwindet der Dämpfungsfaktor und man erhält die rein statische Störung aufgrund des resultierenden Feldgradienten:

$$G_{kk}(t) = \overline{G_{kk}^{\text{stat}}(t)}$$

3.5. Winkelkorrelation mit ^{181}Hf

Das Zerfallsschema von ^{181}Hf ist in Abb. 3 gezeigt. Hervorgehoben ist die $\gamma\gamma$ - Kaskade des Tochterkerns ^{181}Ta , an der die TDPAC - Messungen durchgeführt werden:

$$I_a = 1/2 \xrightarrow[L=2]{E=133 \text{ keV}} I = 5/2 \xrightarrow[L=1,2]{E=482 \text{ keV}} I_g = 7/2$$

Für diese Kaskade lautet die ungestörte Korrelationsfunktion:

$$W(\theta) = 1 + A_{22}P_2(\cos\theta) + A_{44}P_4(\cos\theta) \quad (3/10)$$

mit $A_{22} = -0,295$ und $A_{44} = -0,069$ /AvTr71/

Wegen des vergleichsweise kleinen Wertes für A_{44} ist der Term mit $k = 4$ für die meisten TDPAC-Messungen mit ^{181}Hf vernachlässigbar (siehe z.B. /Heid85/, so daß gilt:

$$W(\theta) = 1 - 0,295 P_2(\cos\theta)$$

Im Experiment muß noch der endliche Raumwinkel der Detektoren berücksichtigt werden. Dies führt zu einer Reduzierung des Anisotropiekoeffizienten auf einen Wert A_{22}^{eff} , der aus der Zählgeometrie berechnet werden kann (siehe Kap. 5.2).

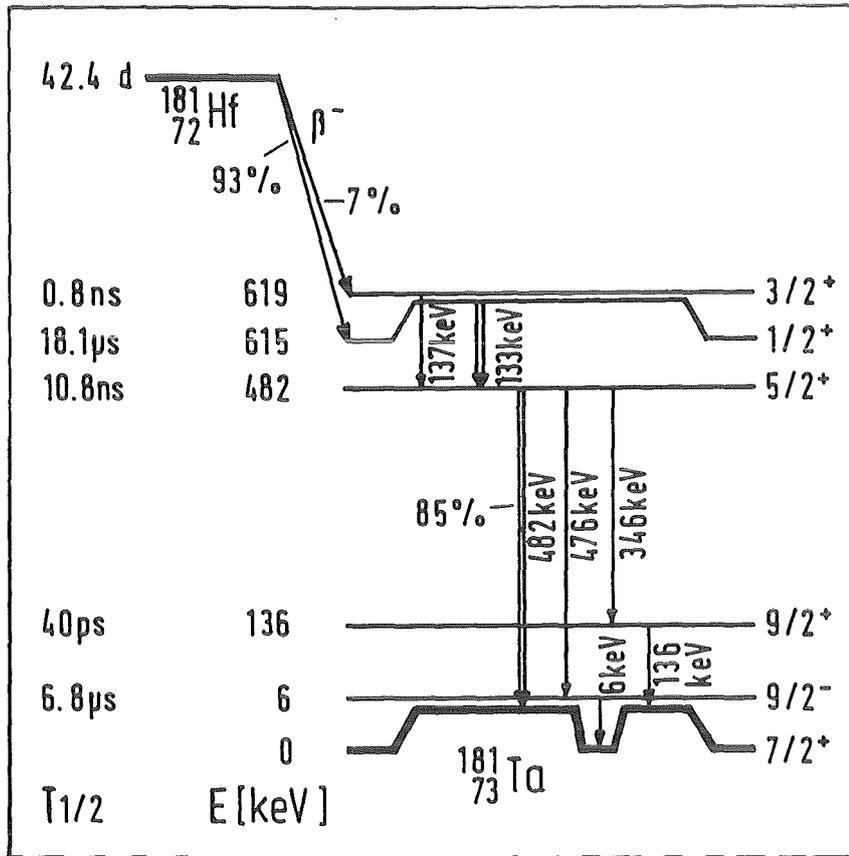


Abb. 3: Vereinfachtes Zerfallschema von ^{181}Hf (nach /LeSh78/)

Die zeitabhängige Korrelationsfunktion (Gleichung 3/2) vereinfacht sich für ^{181}Hf damit zu:

$$W(\theta, t) = 1 + A_{22}^{\text{eff}} G_{22}(t) P_2(\cos\theta) \quad (3/11)$$

Die Störfunktion $G_{22}(t)$ für statische elektrische Quadrupolwechselwirkung in polykristallinen Proben lautet:

$$G_{22}(t) = \sum_{n=0}^3 s_{2n}(\eta) \cos(c_n(\eta)\omega_0 t) \quad (3/12)$$

mit $\omega_0 = 6 \omega_Q = (3\pi/10) \nu_Q$

Bei zeitlich veränderlichen Feldgradienten tritt ein Relaxationsterm $e^{-\lambda_2 t}$ auf. Je nach Relaxationsbereich gelten folgende Beziehungen zwischen der Relaxationskonstanten λ_2 und der Korrelationszeit τ_c :

a) Für schnelle Relaxation:

$$\lambda_2 = 100,8(1 + \eta^2/3) \omega_Q^2 \tau_c \quad (3/13)$$

b) Für langsame Relaxation:

$$\lambda_2 = 1/\tau_c \quad (3/14)$$

In Flüssigkeiten wird das Relaxationsverhalten durch die Brown'sche Molekularbewegung bestimmt. Bei gegebener Temperatur hängt die Reorientierungsrate von der Viskosität $\tilde{\eta}$ der Lösung und dem Volumen und der Form der Partikel ab, in denen die Sondenkerne gebunden sind. Im Fall kugelförmiger Teilchen kann die Rotationskorrelationszeit τ_R näherungsweise nach dem Debye-Modell berechnet werden (siehe z.B. /Wall67/):

$$\tau_R = \frac{V\tilde{\eta}}{kT} \quad (3/15)$$

mit $V = (4\pi/3) \cdot r^3$, $r =$ Radius der Teilchen

Läßt sich aus der mittels TDPAC gemessenen Relaxationskonstanten λ_2 die Korrelationszeit τ_R nach Gleichung (3/13) oder (3/14) bestimmen, so kann mit Gleichung (3/15) daraus die Größe der ^{181}Hf -Komplexe abgeschätzt werden (vgl. /Zell84/).

Eine Reihe von Gegebenheiten läßt ^{181}Hf für TDPAC-Untersuchungen im biologischen Bereich als besonders geeignet erscheinen:

- Der Mutterkern ^{181}Hf wird durch eine (n,γ) -Reaktion aus dem stabilen Isotop ^{180}Hf (natürlicher Anteil 35 %) erzeugt. Der sehr hohe Einfangquerschnitt für thermische Neutronen (102 barn) erlaubt die Anreicherung hoher spezifischer Aktivitäten, so daß selbst beim Einsatz geringer Hafniummengen nur kurze Meßzeiten erforderlich sind.
- Die Lebensdauer des Mutterkerns ist mit 42,4 Tagen ausreichend groß, um längere Präparationen und Meßreihen durchzuführen. Die Aktivität kann kommerziell beschafft werden (Amersham & Buchler) und steht dann viele Wochen zur Verfügung.
- Das Ausgangsniveau der $\gamma\gamma$ -Kaskade weist eine relativ lange mittlere Lebensdauer von 26 μsec auf und wird durch einen β^- -Zerfall bevölkert.

Damit sind sog. Aftereffekte durch die Reorganisation der Elektronenhülle nach dem Zerfall weitestgehend ausgeschlossen /BoBa84/. Das unterscheidet ^{181}Hf z.B. von ^{111}In , für das gezeigt wurde, daß nach einem Elektroneneinfangprozess, Aftereffekte in Isolatoren eine vollständige Auslöschung der Quadrupolkorrelation bewirken können /BaBö82/.

Neben diesen Vorteilen speziell in biologischen und chemischen Anwendungen, vereint ^{181}Hf als Winkelkorrelationsisotop allgemein viele Vorzüge, die es zu einem Standardkern der TDPAC-Methode werden ließen:

- Hohes Verzweigungsverhältnis des β^- - Zerfalls in das Ausgangsniveau der Kaskade (93 %).
- Starke Anisotropie der Winkelverteilung aufgrund der Spinfolge der γ -Übergänge (ca. 30 %).
- Einfache Korrelationsfunktion ($k = 2$, $n_{\text{max}} = 3$), d.h. leicht interpretierbare Spektren.
- Sehr gut zu trennende γ -Energien mit günstigen Verzweigungsverhältnissen für die Kaskade (100 % für 133 keV, 85 % für 482 keV).
- Ausreichend lange Halbwertszeit des Zwischenniveaus (10,8 ns) für zeit-differentielle Messungen.
- Hohes Quadrupolmoment des Zwischenniveaus ($2,36 \pm 0,05$ barn /BuLe83/), d.h. starke Kopplung an elektrische Feldgradienten.

Der letzte Punkt führt aber auch oft zum Auftreten sehr hoher Quadrupolfrequenzen im Bereich mehrerer Gigahertz. Um die resultierenden Oszillationen mit Perioden von wenigen Nanosekunden aufzulösen, ist eine extrem gute Zeitauflösung der Meßapparatur (siehe Kap. 4 und 5) erforderlich /BeBe69/.

4. Aufbau und Funktion der TDPAC-Apparatur

4.1. Nachweiszähler

Bisher wurden für TDPAC-Experimente vorwiegend NaI(Tl)-Kristalle zum Nachweis der γ -Quanten verwendet. Die gute Energieauflösung dieser Szintillatoren (ca. 7 % für die 661 keV γ -Strahlung von ^{137}Cs) bietet zusammen mit der hohen Nachweiswahrscheinlichkeit optimale Voraussetzungen für TDPAC-Messungen mit vielen Winkelkorrelationsisotopen. Wenn allerdings das Zwischenniveau der Kaskade eine kurze Halbwertszeit ($T_{1/2} \lesssim 40$ ns) und ein vergleichsweise großes Quadrupolmoment ($Q \gtrsim 1$ b) besitzt, erweist sich die Zeitauflösung von NaI(Tl)-Detektoren oft als unzureichend. Gerade bei TDPAC-Untersuchungen mit ^{181}Hf ($T_{1/2} = 10,8$ ns, $Q = 2,36$ b) ist es nicht möglich, hohe Feldgradienten und insbesondere die zugehörigen Asymmetrieparameter mit NaI(Tl)-Zählern zuverlässig zu bestimmen, da für die relevante Kaskade (133 keV - 482 keV) eine Zeitauflösung σ (FWHM) von etwa 2 ns kaum unterschritten werden kann. Auf der anderen Seite sind für solche Messungen auch Plastiksintillatoren, deren zeitliches Auflösungsvermögen bei 10^{-10} s liegt, wenig geeignet, da ihr geringer Wirkungsquerschnitt für Photoeffekt und die daraus resultierende schlechte Energieauflösung keine Diskriminierung der Energien der $\gamma\gamma$ -Kaskade ermöglichen /BaBo83/.

Eine neue Perspektive bieten hier Bariumfluorid-Kristalle. Im UV-Bereich des Szintillationsspektrums von BaF_2 entdeckten Laval et al. vor wenigen Jahren /LaMo83/ bei 220 nm eine schnelle Komponente, die eine Zeitauflösung von etwa 500 ps gestattet. Die gleichermaßen gute Energieauflösung von ca. 10 % für 661 keV, die hohe Nachweiswahrscheinlichkeit aufgrund ihrer hohen Dichte und die leichte Handhabbarkeit der nicht hygroskopischen Kristalle lassen diese Szintillatoren für TDPAC mit ^{181}Hf als konkurrenzlos erscheinen. Die wesentlichen Eigenschaften von BaF_2 und NaI(Tl) werden in Tabelle 1 verglichen.

Die Ergebnisse von ersten TDPAC-Untersuchungen an Hafniumverbindungen mit BaF_2 -Detektoren, die 1983 von Baudry et al. veröffentlicht wurden /BaBo83/, machten bereits deutlich, daß diese Szintillatoren für die TDPAC-Methode einen außerordentlichen apparativen Fortschritt bedeuten. Zur gleichen Zeit zeigten Messungen, die in unserem Labor an anorganischen Hafniumverbindungen /BaBö82, Then82, ThAp83/ und an Hafnium-Transferrin /ThZe83/ unter Verwendung

von NaI(Tl)-Kristallen durchgeführt wurden, daß die unzureichende Zeitauf-
lösung die wesentliche Begrenzung bei der Analyse der gewonnenen Spektren
darstellte. Der Aufbau einer neuen Apparatur mit BaF₂-Szintillatoren erschien
somit unerläßlich.

Tabelle 1: Einige physikalische Eigenschaften von BaF₂ und NaI(Tl) /FaSw71, LaMo83/

	Feuchtigkeits- empfindlichkeit	Lin. Dichte	Lin. Abschwächungs- koeffizient	Wellenlänge max. Emission	Brechungs- index	Abkling- konstante	Licht- ausbeute
		[g/cm ³]	[cm ⁻¹ bei 511 keV]	[nm]		[ns]	[Photonen pro MeV]
BaF ₂	nicht	4,88	0,47	310	1,55	620	6500
	hygroskopisch			220	1,57	0,6	2000
NaI(Tl)	hygroskopisch	3,67	0,34	420	1,85	250	40000

Die Entwicklung der neuen BaF₂-Detektoren wird in Anhang A beschrieben. Mit
einer Energieauflösung von 11 % bei 661 keV konnten die γ -Energien von ¹⁸¹Hf
sehr gut getrennt werden. Die Nachweiswahrscheinlichkeit lag bei gleicher
Kristallgröße sogar etwas über der von NaI(Tl). Für die 133 keV - 482 keV
Kaskade von ¹⁸¹Hf wurde eine Zeitauflösung von ca. 550 ps erzielt. Damit
konnten die Voraussetzungen für TDPAC-Untersuchungen an Transferrin mit ¹⁸¹Hf
wesentlich verbessert werden (siehe /HeTh86/).

4.2. Prinzip der Datenaufnahme

Die TDPAC-Messungen wurden mit einer Vierzählerapparatur durchgeführt,
deren prinzipieller Aufbau in Abb. 4 gezeigt ist (vgl. /ArHo80/). Um die
Meßprobe sind in einer Ebene vier BaF₂-Detektoren rechtwinklig zueinander
angeordnet. Die Zähler sind radial verschiebbar, so daß ihr Abstand zur
Probe variiert werden kann. Mit der nachfolgenden 'slow-fast' Elektronik
werden acht Zeitspektren aufgenommen, je vier entsprechen Koinzidenzen unter
180° bzw. 90°. Die verwendeten Detektorkombinationen sind 1-2 und 3-4 (180°)
bzw. 1-4 und 3-2 (90°), wobei in jeder Kombination beide Zähler wechselweise
als Start- und Stop-Detektoren für zwei verschiedene Zeit-Impulshöhen-Wandler
(TPC) dienen. Bei der zeitdifferentiellen Messung mit ¹⁸¹Hf liefert der Nach-

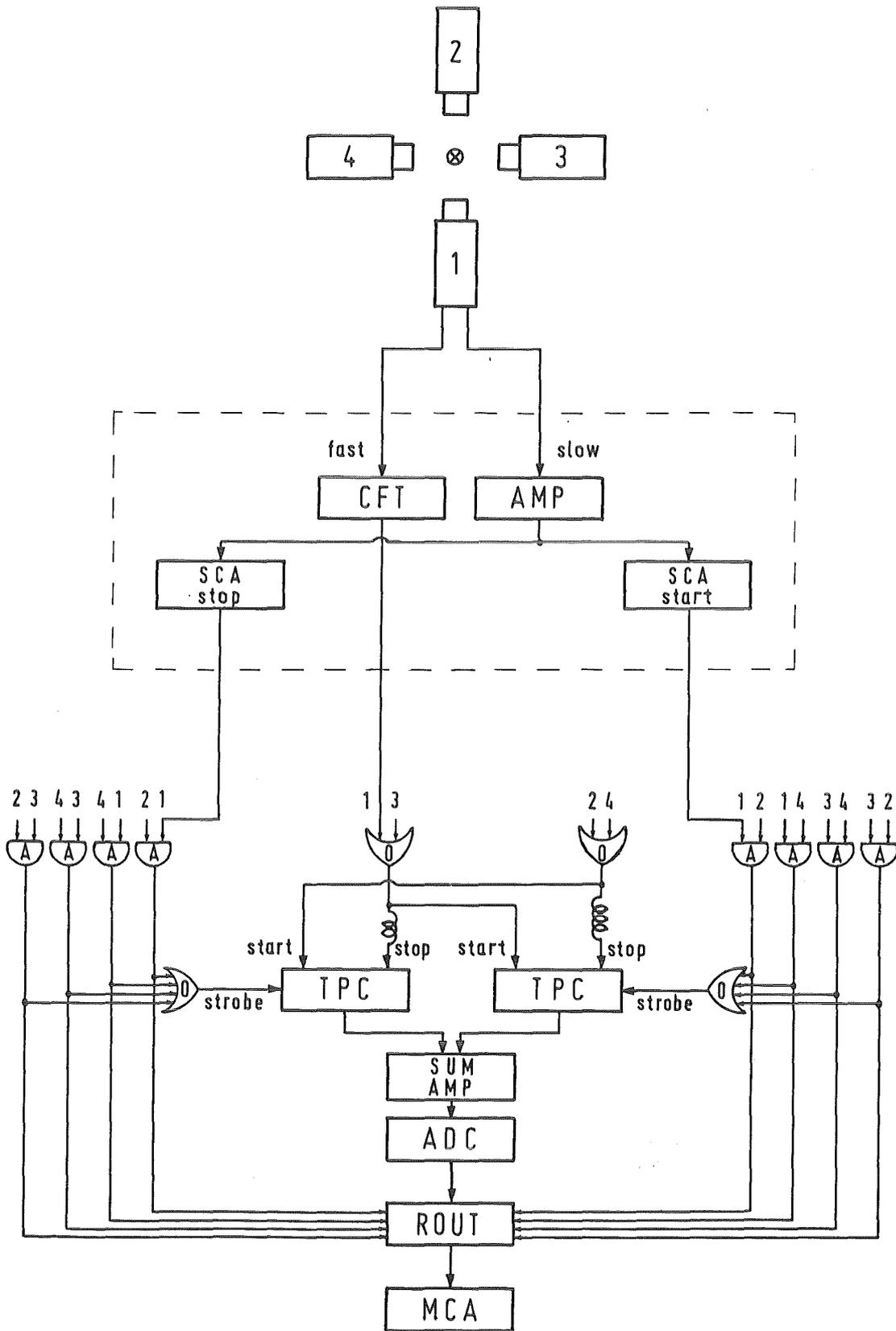


Abb. 4: Schematischer Aufbau der Vierzählerapparatur zur Aufnahme von acht Koinzidenzspektren

weis eines 133 keV γ -Quants, das den Zwischenzustand der Kaskade bevölkert, einen Start-Impuls, der des 482 keV γ -Quants, mit dem der Kern in den Grundzustand übergeht, den Stop-Impuls (vgl. Abb. 3). Die Verwendung zweier TPCs mit den zugehörigen Koinzidenzsystemen für je vier Zählerkombinationen gestattet die simultane Aufnahme von acht Zeitspektren und reduziert die Meßzeit gegenüber herkömmlichen Vierzählerapparaturen auf die Hälfte. Dies ist besonders für die Beobachtung der zeitlichen Entwicklung von biologischen Proben von Bedeutung.

Die Zeitspektren werden in acht separaten Bereichen eines Vielkanalanalysators (MCA) mit jeweils 1024 Kanälen akkumuliert. Die Zeiteichung beträgt 100 ps pro Kanal. Während der Messung sind die Daten ständig auf einem Videodisplay sichtbar. Nach Beendigung der Datenaufnahme oder auch zu Zwischenauswertungen werden die Speicherinhalte des MCA auf den Laborrechner (PDP 11/34) übertragen.

Eine ausführliche Beschreibung der Nachweiselektronik wird in Anhang B gegeben.

5. Reduktion und Auswertung der Daten

5.1. Bestimmung des $R(t)$ -Verhältnisses

Die acht gemessenen Zeitspektren stellen die Rohdaten für die TDPAC-Auswertung dar. Zunächst werden die MCA-Daten geeicht, d.h. eine Kanal-Zeit-Zuordnung vorgenommen, und die Zeitnullpunkte t_0 der Einzelspektren bestimmt. Für $t > t_0$ spiegeln die Daten dann im wesentlichen den exponentiellen Zerfall des Zwischenniveaus der $\gamma\gamma$ -Kaskade mit der Halbwertszeit $T_{1/2} = 10,8$ ns wieder. Überlagert ist diesen Zerfallskurven die zeitabhängige Korrelationsfunktion $W(\theta, t)$, so daß sich folgende Parametrisierung ($t_0 = 0$ per def.) der Koinzidenzzählraten anbietet:

$$N_{ij}(t) = \epsilon_{ij} e^{-t/\tau_n} W(\theta_{ij}, t) + U_{ij} \quad (5/1)$$

mit $\theta_{ij} = 180^\circ$ für $ij = 12, 21, 34, 43$
 $\theta_{ij} = 90^\circ$ für $ij = 14, 41, 32, 23$

Dabei berücksichtigen ϵ_{ij} die apparativen Ansprechwahrscheinlichkeiten der Zählerkombinationen ij , U_{ij} den jeweiligen konstanten Untergrund und $W(\theta_{ij}, t)$ die zeitabhängige Störung aufgrund der Quadrupolwechselwirkung (siehe Kap. 3).

Um die Störfunktion $G_{22}(t)$ zu extrahieren (vgl. /ArHo80/), wird zunächst in allen Spektren der Untergrund aufgrund von zufälligen Koinzidenzen bestimmt und abgezogen:

$$N_{ij}(t) \longrightarrow N_{ij}(t) - U_{ij}$$

Anschließend bildet man die Mittelwerte der Koinzidenzzählraten der 180° - bzw. 90° -Spektren:

$$N(180^\circ, t) = \sqrt[4]{N_{12}(t)N_{34}(t)N_{21}(t)N_{43}(t)} \quad (5/2)$$

$$N(90^\circ, t) = \sqrt[4]{N_{14}(t)N_{32}(t)N_{41}(t)N_{23}(t)}$$

Aus diesen Zählraten wird dann die zentrale Größe für die eigentliche Auswertung, das sog. $R(t)$ -Verhältnis berechnet:

$$R(t) = 2 \frac{N(180^\circ, t) - N(90^\circ, t)}{N(180^\circ, t) + 2N(90^\circ, t)} \quad (5/3)$$

Dabei fallen sowohl die apparativen Faktoren ϵ_{ij} , als auch die exponentielle Zerfallsfunktion e^{-t/τ_n} heraus, so daß gilt:

$$R(t) = 2 \frac{W(180^\circ, t) - W(90^\circ, t)}{W(180^\circ, t) + 2W(90^\circ, t)} \quad (5/4)$$

Mit Gleichung (3/11) und den Werten des Legendre-Polynoms

$P_2 = (1/2)(3\cos^2\theta - 1)$ für $\theta = 180^\circ$ bzw. 90° folgt:

$$R(t) = A_{22}^{\text{eff}} G_{22}(t) \quad (5/5)$$

Das $R(t)$ -Verhältnis liefert also direkt die gesuchte Störfunktion $G_{22}(t)$ /ArHo80/. Im Idealfall unendlich guter Zeitauflösung entspricht der konstante Faktor A_{22}^{eff} dem Wert $R(t=0)$, da dann $G_{22}(t=0) = 1$ gilt.

5.2. Auswertung der $R(t)$ -Spektren

Die Ergebnisse von TDPAC-Messungen werden in der Regel als $R(t)$ -Spektren, d.h. als Funktion der Zeit t zwischen der Emission des ersten und des zweiten γ - Quants der Kaskade, graphisch dargestellt und mit einem theoretischen Modell verglichen. Aus der Anpassung der geeigneten Modellfunktion an das gemessene $R(t)$ -Spektrum werden die Parameter der zugrundeliegenden Wechselwirkung bestimmt. Ausgangspunkt für die hier erforderliche Beschreibung von Quadrupolwechselwirkungen mit ^{181}Hf ist die allgemeine Störfunktion für kombinierte statische und zeitabhängige elektrische Feldgradienten nach Gleichung (3/8) und (3/9):

$$G_{22}(t) = e^{-\lambda_2 t} \sum_{n=0}^3 s_{2n}(\eta) \cos(c_n(\eta) \omega_0 t) \quad (5/6)$$

Berücksichtigt man zusätzlich die apparativen Gegebenheiten, und läßt zu, daß mehrere Anteile f_i von Sondenkernen auftreten können, die aufgrund

ihrer Umgebung unterschiedlichen Wechselwirkungen ausgesetzt sind, ergibt sich eine adäquate Parametrisierung der $R(t)$ -Spektren mit der Modellfunktion:

$$R(t) = R_0 + A_{22}^{\text{eff}} \sum_i f_i e^{-\lambda_2^{(i)} t} \sum_{n=0}^3 s_{2n}(\eta_i) e^{-c_n(\eta_i) \omega_0^{(i)} \delta_i t} e^{-(c_n(\eta_i) \omega_0^{(i)} \sigma)^2 / 16 \ln 2} * \cos(c_n(\eta_i) \omega_0^{(i)} t) \quad (5/7)$$

Neben den bereits eingeführten Parametern ω_0 , η und λ_2 , aus denen die Komponenten des EFG und die Korrelationszeit der Hafniumumgebung bestimmt werden können, enthält dieser Ansatz zwei exponentielle Dämpfungsglieder:

a) Dämpfung aufgrund der endlichen Zeitauflösung:

Die apparative Zeitauflösung σ führt zu einer frequenzabhängigen, zeitlich konstanten Reduzierung der Oszillationsamplituden. In Abb. 5 ist der Dämpfungsfaktor $D_\sigma = e^{-(c_n(\eta) \omega_0 \sigma)^2 / 16 \ln 2}$ /BeBe69/ als Funktion der Frequenz $\omega_n = c_n(\eta) \omega_0$ für $\sigma = 2,5$ ns und $\sigma = 0,6$ ns dargestellt. Man erkennt deutlich, daß die Nachweisgrenze ($D \lesssim 0,1$) bei der Zeitauflösung, die typisch für NaI(Tl)-Detektoren ist, schon bei etwa 2000 MHz liegt, während mit der Auflösung, die mit BaF₂ erreicht wird, noch wesentlich höhere Frequenzen gemessen werden können.

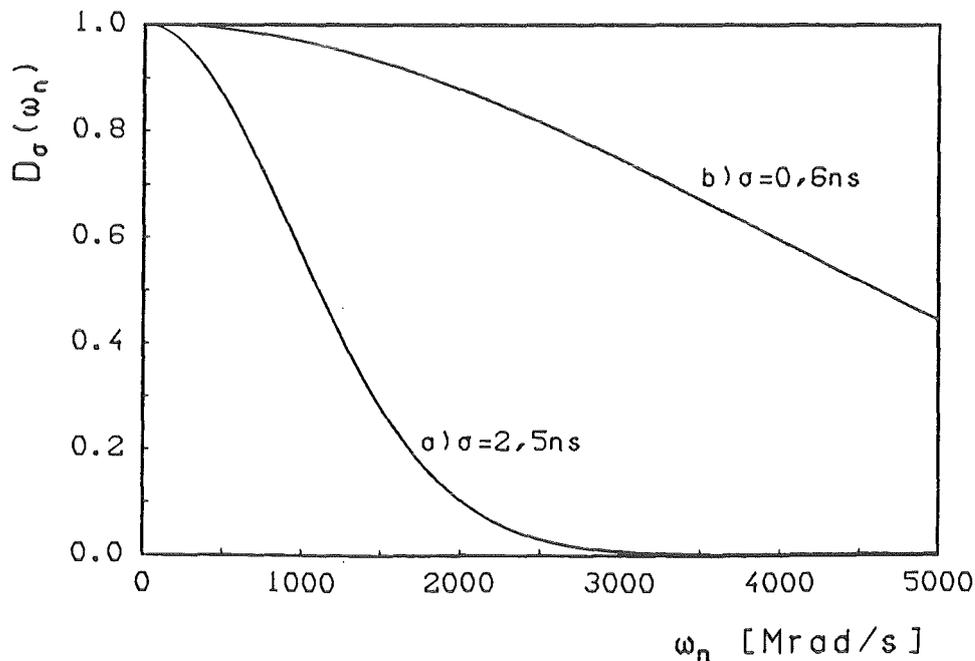


Abb. 5: Dämpfungsfaktor $D_\sigma(\omega_n)$ aufgrund der endlichen Zeitauflösung σ als Funktion der Frequenz ω_n
 a) für NaI(Tl)-Detektoren ($\sigma = 2,5$ ns)
 b) für BaF₂-Detektoren ($\sigma = 0,6$ ns)

b) Dämpfung aufgrund der endlichen Verbreiterung des Feldgradienten:

Ist der EFG nicht scharf definiert, so resultiert daraus eine Frequenzverteilung mit der relativen Breite $\delta = \Delta\omega/\omega$. Dies führt zu einer exponentiell zeitabhängigen Dämpfung der Quadrupoloszillationen, die für lorentzförmig angenommene Verbreiterungen durch $D_\delta = e^{-c_n(\eta)\omega_0\delta t}$ /BaBo83/ beschrieben wird. Bei starken Verbreiterungen ($\delta \gtrsim 20\%$) ist es oft notwendig, statt der Lorentz- eine Gauß-Verteilung vorzugeben, für die der Dämpfungsfaktor dann durch $D_\delta = e^{-(c_n(\eta)\omega_0\delta t)^2/2}$ gegeben ist /BeBe69/.

Kleine Werte für δ zeigen an, daß die Sondenkerne in der Probe in sehr einheitlichen Konfigurationen gebunden sind. Große Verbreiterungen bedeuten dagegen, daß die Umgebung von Kern zu Kern relativ stark variiert.

Der Parameter R_0 in Gleichung (5/7) berücksichtigt eine zeitlich konstante Verschiebung der $R(t)$ -Spektren. Endliche Werte für R_0 können sowohl physikalische als auch apparative Ursachen haben. Einerseits werden mit R_0 Anteile von Sondenkernen erfaßt, deren Umgebung keinen EFG erzeugt ('ungestörte' Kerne) oder die einer starken, uneinheitlichen Wechselwirkung ausgesetzt sind ('stark gestörte' Kerne). Andererseits gehen in R_0 auch Ungenauigkeiten bei der Bildung des $R(t)$ -Verhältnisses ein. Aufgrund der maximal erreichbaren Genauigkeit bei der Untergrunds- und Zeitnullpunktsbestimmung in den Einzelspektren können die $R(t)$ -Werte geringfügig verschoben sein. Die Interpretation eines endlichen Wertes für R_0 muß stets berücksichtigen, daß die resultierende Gesamtanisotropie dem theoretischen Wert A_{22}^{eff} entsprechen sollte. Mit diesem Kriterium können die angesprochenen Möglichkeiten in der Regel unterschieden werden.

Der Zeitnullpunkt des $R(t)$ -Spektrums kann nur mit einer Genauigkeit, die in der Größenordnung einer Kanalbreite (0,1 ns) liegt, bestimmt werden. Es empfiehlt sich, insbesondere bei hohen Quadrupolfrequenzen, auch kleine Zeitnullverschiebungen zu berücksichtigen. Man führt dazu einen weiteren Parameter t_0 in die Anpassungsfunktion ein, indem man die Zeit t durch $t - t_0$ ersetzt.

Die Anpassung der Modellfunktion an die gemessenen $R(t)$ -Spektren erfolgt nach der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate (Least Squares Fit), wobei die analytischen Ableitungen nach den einzelnen Parametern benutzt werden. Die Startwerte werden aufgrund einer Fourieranalyse des $R(t)$ -Spektrums abge-

schätzt ($f_i, \omega_0^{(i)}, \eta_i, \delta_i$). Die Werte der Asymmetrieparameter η_i werden aus den Koeffizienten $s_{2n}(\eta)$ und $c_n(\eta)$, die als Potenzreihen in η dargestellt sind (siehe /Heid81/), abgeleitet. Die Frequenzverbreiterungen δ_i können in beliebigen Kombinationen wahlweise als gauß- oder lorentzförmig angenommen werden.

Die apparativen Parameter Zeitauflösung σ und effektive Anisotropie A_{22}^{eff} wurden experimentell bestimmt (siehe Anhang A und C). Es ergaben sich die Werte $A_{22}^{\text{eff}} = -23\%$ und $\sigma = 0,5$ ns, die bei allen weiteren Auswertungen zugrundegelegt wurden. In Anhang C sind neben den Messungen, aus denen A_{22}^{eff} und σ bestimmt wurden, auch eine Reihe von Testmessungen an Systemen wiedergegeben, die als Zwischenprodukte bei der Transferrin-Präparation entstehen. Die Ergebnisse dieser Messungen zeigen die Leistungsfähigkeit und Langzeitstabilität der verwendeten TDPAC-Apparaturen und bilden eine unverzichtbare Grundlage für die Transferrin-Untersuchungen. Es war damit stets möglich, die Transferrin-Spektren auf eventuell vorhandene Beiträge von Zwischenprodukten unvollständig ablaufender Reaktionen zu überprüfen.

6. TDPAC-Messungen an Hafnium-Transferrin

Die Hafnium-Transferrin Bindung wurde in einer Reihe von Systemen studiert. Vom Untersuchungsgut und der Vorgehensweise bei der Präparation her lassen sich die durchgeführten Experimente wie folgt klassifizieren:

a) In vivo Untersuchungen

Für diese Meßreihe wurde ^{181}Hf an Rattenserum-Transferrin gebunden, indem die Aktivität in geeigneter Form lebenden Tieren injiziert wurde. Untersucht wurde dann das nach bestimmten Zeiten entnommene Serum.

b) In vitro Untersuchungen mit Serum

Frisch gewonnene Serumproben wurden im Reagenzglas mit ^{181}Hf versetzt. Neben Rattenserum wurde auch Human- und Hamsterserum verwendet.

c) In vitro Untersuchungen mit Apotransferrin

Kommerziell erhältliches menschliches Apotransferrin (Sigma, München) wurde mit ^{181}Hf beladen und mit TDPAC untersucht.

Wesentliche Voraussetzung für die TDPAC-Experimente waren biochemische Untersuchungen, mit deren Hilfe aufgezeigt werden konnte, daß Hafnium bei den verwendeten Präparationsverfahren stets quantitativ an Transferrin gebunden wurde. Es soll hier nicht auf die Einzelheiten der verwendeten Methoden eingegangen werden, diese lassen sich in der zitierten Literatur nachlesen. Im folgenden werden nur die Ergebnisse der durchgeführten Versuche erläutert.

Durch Gelfiltrationen mit einer Sephacryl S-200-Säule und anschließende Analyse der Transferrin-Fraktion auf DEAE-Zellulose konnte gezeigt werden, daß Hafnium bei den Präparationen, sowohl mit Ratten- und Hamsterserum /TaLe83/, als auch mit menschlichem Serum und Apo-Transferrin /TaDu86/ stets zu über 90 % an Transferrin bindet. Für den Nachweis, daß irgendein Metall spezifisch an den beiden Eisenplätzen gebunden wird, gelten sog. 'Competitive Binding'- Experimente als unerlässlich /Aise80/. Diese Methode wird anhand von Untersuchungen zur Plutonium-Transferrin Bindung in /DuTa86/ eingehend beschrieben. In analoger Weise wurden hier Transferrin-Proben mit ^{181}Hf und natürlichem Eisen beladen, um die Verdrängung von Hafnium aus den spezifischen Bindungsplätzen bzw. deren Blockierung durch Eisen aufzuzeigen. Die Ergebnisse der Analyse von solchen Serumproben mittels Gelchromatographie über Sephadex-50 sind in Tabelle 2 wiedergegeben (siehe auch /ThAp86/).

Tabelle 2: Einfluß von Eisen auf die Proteinbindung von Hafnium in Rattenserum[#]

Probe		Eisen- sättigung (%)	Anteil von ^{181}Hf in der Proteinfraction aus der Sephadex G-50 Säule (%)
Zugabe von ^{181}Hf zu	A	32	91 ± 3
vorher mit Eisen	B	84	17 ± 4
beladenem Rattenserum	C	150	< 2
Zugabe von Eisen zu	D	86	54 ± 12
vorher mit ^{181}Hf	E	> 200	< 2
beladenem Rattenserum			

[#]Mittelwerte aus jeweils drei Messungen. Hafniumkonzentration: 3 nmol/ml.

Die Resultate können wie folgt zusammengefaßt werden:

- Mit zunehmender Vorsättigung der Proben durch Eisen nimmt der Anteil von ^{181}Hf , der an Transferrin gebunden wird, deutlich ab. Bei Eisenüberschuß (im Vergleich zur Bindungskapazität des Transferrins) wird kein ^{181}Hf mehr in der Proteinfraction gefunden.
- Umgekehrt wird bei Zugabe von Eisen zu Serum, das vorher mit ^{181}Hf beladen wurde, die Hafniumaktivität fast vollständig vom Transferrin verdrängt.

Ähnliche Untersuchungen wurden mit Apotransferrin durchgeführt. Vorsättigung mit Eisen reduzierte dabei den Anteil Transferrin-gebundenen Hafniums auf weniger als 1 %, wogegen ohne Eisen (92 ± 10 %) der eingesetzten Hafniumaktivität auf die Transferrinfraction entfielen. Umgekehrt bewirkte auch hier die Zugabe von Eisen zu ^{181}Hf -Transferrin die schnelle Freisetzung der Hafniumionen.

Durch UV-Differenzspektroskopie (siehe z.B. /HaCa81/) an Hafnium-Transferrin konnte gezeigt werden, daß pro Mol Transferrin nur 2 Mol Hafnium spezifisch gebunden werden können /TaDu86/. Auch daraus muß auf eine definierte Bindung an den beiden Metallbindungsplätzen geschlossen werden.

Aufgrund der geschilderten Resultate kann kein Zweifel daran bestehen, daß Hafnium in vivo wie in vitro spezifisch an Transferrin bindet. Im folgenden wird gezeigt werden, daß die TDPAC-Untersuchungen diesen Befund bestätigen. Zur Kontrolle der Präparation wurden die Hafnium-Transferrin Proben parallel zu den TDPAC-Messungen im allgemeinen auch gelchromatographisch analysiert.

6.1. In vivo beladenes Rattenserum

Sprague Dawley Ratten wurde intravenös sowohl die in Anhang C3 beschriebene Hafnium-NTA Lösung ($|\text{Hf}| : |\text{NTA}| = 1 : 4$), als auch Hafniumoxalat- und Hafniumcitrat-Lösungen injiziert. Hafniumoxalat wurde dazu ebenfalls im Verhältnis 1 : 4 angesetzt, bei Hafniumcitrat war dagegen ein hoher Citratüberschuß erforderlich, um eine Komplexbildung der Metallionen zu gewährleisten. Der pH-Wert der Injektionslösungen wurde mit Bicarbonat auf 7,4 eingestellt. Im Serum, das bei ^{181}Hf -NTA und ^{181}Hf -Oxalat Injektionen nach 15 Minuten entnommen wurde, fanden sich ca. 16 % der eingesetzten Aktivität von 200 bzw. 300 μCi . Bei ^{181}Hf -Citrat Injektion war dagegen nach 12 Minuten noch 80 %, nach 60 Minuten noch 33 % der ursprünglichen Aktivität (300 μCi) im Serum vorhanden.

Für die TDPAC-Messungen wurden Proben mit einer Aktivität von ca. 20 μCi , maximal jedoch 1 ml, in Plexiglashalter abgefüllt und luftdicht verschlossen. Der pH-Wert zu Beginn der Messungen entsprach dem physiologischen Wert 7,4, die hohe Pufferkapazität des Serums ließ auch über längere Zeiten keine Änderungen erwarten. Für die Serumprobe, die nach Hafniumoxalat-Injektion entnommen wurde, ergab eine Kontrolle nach Beendigung der TDPAC-Messungen einen pH-Wert von 7,48. Diese Verschiebung ist in der Tat vernachlässigbar.

Die Eisenbindungskapazität TIBC (Total Iron Binding Capacity) des Sprague Dawley-Serums wurde im Rahmen der Routineuntersuchungen an dieser Tierkolonie bestimmt. Mit kommerziellen Testsätzen (Böhringer, Mannheim) konnten auch die Konzentration von Eisen im Serum und die freie Eisenbindungskapazität UIBC (Unsaturated Iron Binding Capacity) ermittelt werden /TaPl85/:

$$|\text{Fe}| = (38 \pm 4) \text{ nMol/ml}$$

$$|\text{UIBC}| = (36 \pm 5) \text{ nMol/ml}$$

Daraus läßt sich auf eine Transferrinkonzentration von 37 nMol bzw. 3 mg pro ml Serum schließen. Die Eisensättigung des Proteins beträgt $(51 \pm 4) \%$. Aus diesen Zahlen und den gefundenen Retentionen der Hafniumaktivität im Serum ergeben sich für die einzelnen Proben Verhältnisse von Hafniumionen zur Zahl der freien Bindungsplätze ($K = |\text{Hf}| : |\text{UIBC}|$) zwischen $K = 1 : 60$ und $K = 1 : 7$ (siehe Tabelle 3). In allen Fällen steht also am Transferrin genügend freie Kapazität für die Bindung des gesamten vorhandenen Hafnioms zur Verfügung.

Tabelle 3: TDPAC-Messungen an in vivo mit ^{181}Hf beladenem Rattenserum-Transferrin

Probe Nr.	Injizierter Komplex	t_{ink} (min)	$ \text{Hf} $ (nMol)	$ \text{Hf} : \text{UIBC} $ (#)	Alter der Probe (d)	f_1 (%)	f_2 (%)	Messung Nr.
I	Hf-NTA	15	0,6	1:60	5	57 ± 2	12 ± 2	1
					14	63 ± 5	6 ± 4	2
II	Hf-NTA	15	0,8	1:45	7	51 ± 2	21 ± 4	3
					13	57 ± 2	9 ± 3	4
					25	61 ± 2	6 ± 2	5
					60	57 ± 2	4 ± 2	6
III	Hf-oxalat	15	1,3	1:28	4	43 ± 1	20 ± 2	7
					23	60 ± 1	9 ± 3	8
IV	Hf-citrat	60	3,0	1:12	3	39 ± 1	28 ± 2	9
					10	46 ± 1	5 ± 2	10
V	Hf-citrat	12	5,1	1:7,0	4	30 ± 3	34 ± 3	11

(#) Der Fehler dieser Werte beträgt etwa 15 %

Insgesamt wurden an fünf verschiedenen Proben Messungen in Zeitabständen bis zu 60 Tagen nach Injektion der ^{181}Hf -Lösung und Entnahme des Serums durchgeführt (siehe Tabelle 3). Unabhängig vom Anion des injizierten Hafniumkomplexes (NTA, Oxalat oder Citrat), der Inkubationszeit t_{ink} (12 bis 60 min) und der Zeit zwischen Injektion und Messung wurden $R(t)$ -Spektren beobachtet, die sich aus drei charakteristischen Komponenten zusammensetzen. Das bedeutet, daß die Hafniumionen im Serum auf mindestens drei verschiedene Bindungskonfigurationen verteilt sind. Die aus den $R(t)$ -Spektren gewonnenen Parameter der einzelnen Sondenkerneumgebungen, d.h. die Quadrupolkopplungskonstanten ν_Q , die Asymmetrieparameter η und die Frequenzverbreiterungen δ , sind in Tabelle 4 wiedergegeben. Die Ergebnisse wurden kürzlich auch veröffentlicht /ThAp86/.

Tabelle 4: Quadrupolkopplungsparameter für in vivo mit ^{181}Hf beladenes Rattenserum-Transferrin

Bindungskonfiguration	ν_Q (MHz)	η	δ (%)	λ_2 (MHz)
1	903 ± 4	$0,922 \pm 0,010$	$1,8 \pm 0,4$	} 59 ± 4
2	1463 ± 6	$0,531 \pm 0,005$	$1,3 \pm 0,4$	
3	950 ± 6	0	$8,7 \pm 1,5$	

$$R_0 = - (1,12 \pm 0,10) \%$$

Aufgrund der kleinen Werte für δ müssen die Komponenten 1 und 2 als sehr spezifische, einheitliche Bindungskonfigurationen von Hafnium-Transferrin interpretiert werden. Es liegt nahe, diese Anteile mit den beiden Metallbindungsplätzen zu identifizieren. Die relativ große Verbreiterung des Feldgradienten der dritten Konfiguration entspricht einer Reihe von geringfügig unterschiedlichen Sondenkernumgebungen, spricht also für nicht-spezifische Hafniumbindung. Wegen der starken Dämpfung der Oszillationen der dritten Komponente in den $R(t)$ -Spektren ist es nicht möglich, den zugehörigen Asymmetrieparameter zuverlässig und eindeutig zu bestimmen. Die Analyse der Daten wurde deshalb durchgehend mit $\eta_3 = 0$ durchgeführt.

Es ist nicht ausreichend, die Spektren mit rein statischen Quadrupolwechselwirkungen zu beschreiben. Die Anpassung erfordert vielmehr für alle drei Konfigurationen einen quasistatischen Ansatz mit Relaxationskonstanten $\lambda_2^{(1)}$, $\lambda_2^{(2)}$ und $\lambda_2^{(3)}$. Offen bleiben muß jedoch, ob für diese Parameter drei verschiedene Werte zugrundeliegen, oder ob alle Anteile der gleichen Dynamik ausgesetzt sind. Beide Modelle ergeben die gleiche Anpassungsgüte. Im ersten Fall erhält man:

$$\lambda_2^{(1)} = (44 \pm 5) \text{ MHz}$$

$$\lambda_2^{(2)} = (78 \pm 6) \text{ MHz}$$

$$\lambda_2^{(3)} = (90 \pm 10) \text{ MHz}$$

Die einheitliche Beschreibung ($\lambda_2^{(1)} = \lambda_2^{(2)} = \lambda_2^{(3)}$) liefert:

$$\lambda_2 = (59 \pm 4) \text{ MHz}$$

Es zeigt sich, daß sich die anderen Wechselwirkungsparameter unabhängig von der gewählten Beschreibung der Relaxation extrahieren lassen. Lediglich mit den Anteilen f_i der einzelnen Fraktionen und den Dämpfungsparametern δ ist eine gewisse Korrelation festzustellen, signifikante Änderungen der Werte treten jedoch nicht auf. Die in Tabelle 3 und 4 angegebenen Werte entsprechen der Beschreibung mit einer gemeinsamen Relaxationskonstanten.

Während der Anteil der dritten Fraktion bei allen Messungen konstant bleibt und etwa 20 % beträgt, ergeben sich für die spezifischen Anteile f_1 und f_2 zum Teil unterschiedliche Werte. Diese sind in Tabelle 3 gezeigt. Man erkennt, daß bei den Proben aus Hafnium-NTA- und Hafniumoxalat-Injektionen

(Nr. I, II und III) die erste Konfiguration deutlich dominiert. Der Anteil nimmt mit dem Alter der Proben noch zu, scheint sich aber nach einiger Zeit zu stabilisieren. Abb. 6a zeigt das $R(t)$ -Spektrum einer Probe bei ^{181}Hf -NTA-Injektion nach 25 Tagen (Messung Nr. 5 in Tab. 3), in Abb. 6b ist das Ergebnis einer Messung 23 Tage nach der Entnahme des Serums bei ^{181}Hf -Oxalat-Injektion (Messung Nr. 8 in Tab. 3) wiedergegeben.

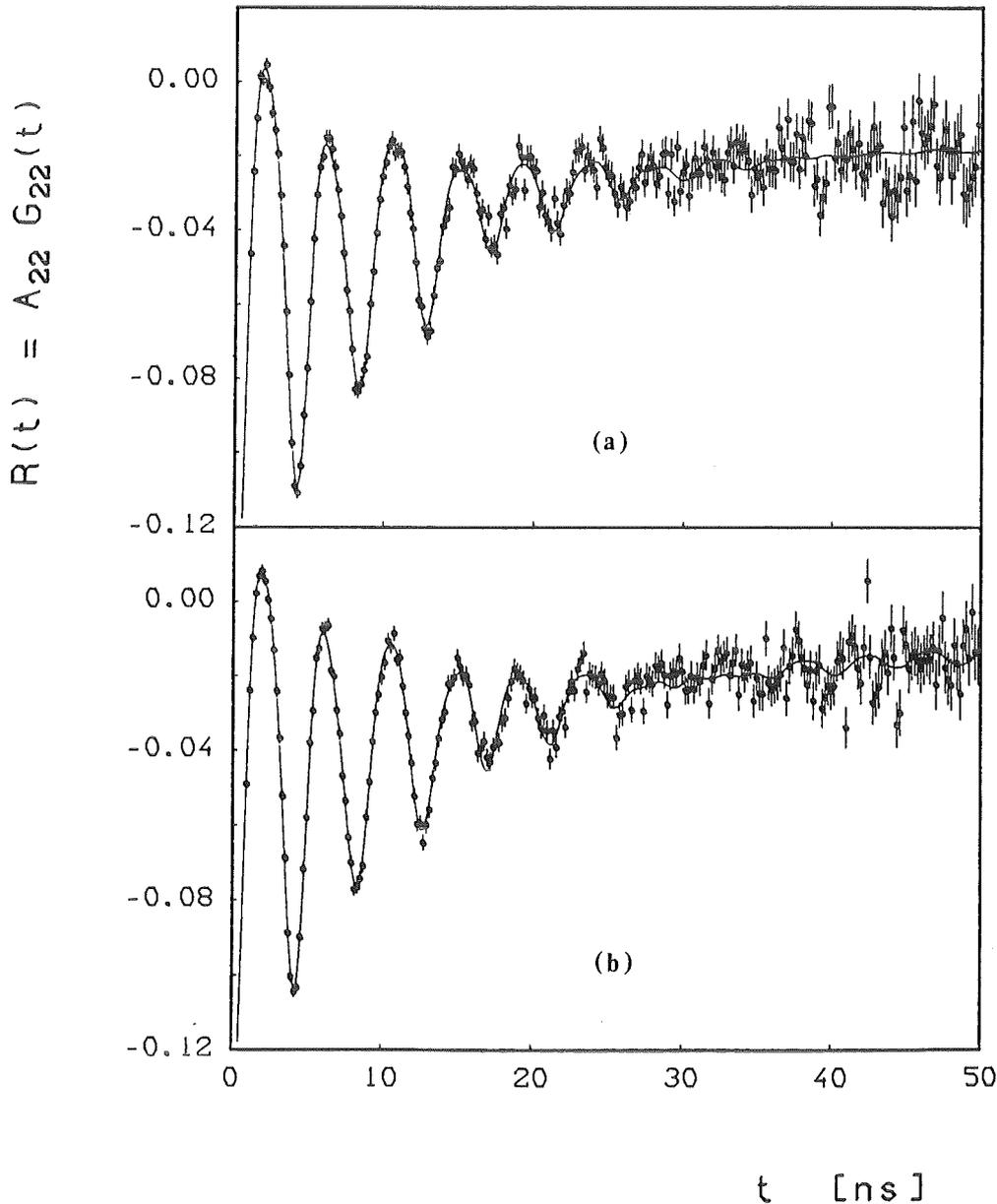


Abb. 6: $R(t)$ -Spektren von in vivo beladenem Rattenserum-Transferrin
a) nach Hf-NTA Injektion (Messung Nr. 5 in Tab. 3)
b) nach Hf-Oxalat Injektion (Messung Nr. 8 in Tab. 3)

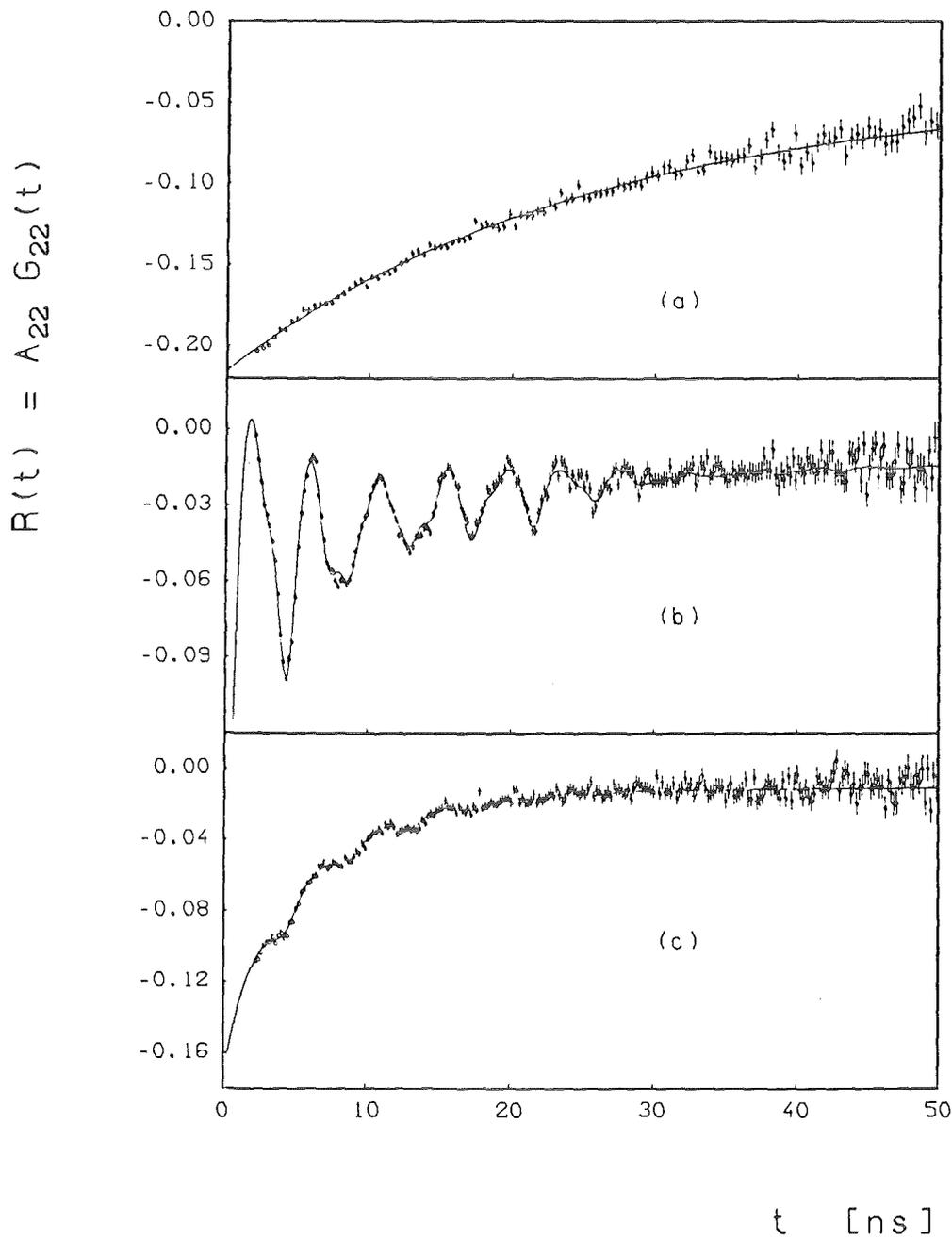


Abb. 7: a) $R(t)$ -Spektrum der injizierten Hf-Citrat Lösung
b) $R(t)$ -Spektrum von Rattenserum-Transferrin 3 Tage nach Hf-Citrat Injektion und Entnahme des Serums (Messung Nr. 9 in Tab. 3)
c) $R(t)$ -Spektrum der gleichen Probe 14 Tage später (nicht in Tab. 3 aufgeführt)

Bei den Proben mit Citrat liegen die beiden spezifischen Konfigurationen zu Beginn in etwa gleichen Anteilen vor (siehe Tab. 3). Es muß jedoch erwähnt werden, daß diese Proben nicht stabil waren und sich innerhalb von ein bis zwei Wochen deutlich veränderten (vgl. Abb. 7b und c). Nach dieser Zeit zeigten die TDPAC-Messungen eine starke Dämpfung durch Relaxationseffekte, wie sie für niedermolekulare Hafniumkomplexe in Lösung typisch ist (Abb. 7c). Eine gelchromatographische Analyse ergab in der Tat, daß nur noch ein kleiner Teil der Hafniumionen an Transferrin gebunden war. Zum Vergleich ist in Abb. 7a das $R(t)$ -Spektrum der injizierten Hafniumcitrat-Lösung gezeigt.

In Tabelle 3 sind für die einzelnen Proben auch die Hafniumkonzentrationen, bzw. die Verhältnisse $K = |\text{Hf}| : |\text{UIBC}|$ angegeben. Es fällt auf, daß die Anteile f_1 und f_2 mit der Hafniumsättigung korreliert sind. Je mehr Hafnium vorhanden ist, desto kleiner ist im allgemeinen der erste und entsprechend größer der zweite Anteil zu vergleichbaren Zeiten nach Serumentnahme. Da Inkubationszeiten kleiner 10 Minuten aus reaktionskinetischen Gesichtspunkten nicht sinnvoll erschienen, konnte das Konzentrationsverhältnis K in vivo nicht beliebig variiert werden. Es war deshalb erforderlich, zu den im folgenden beschriebenen in vitro Präparationen überzugehen, um die Konzentrationsabhängigkeit von f_1 und f_2 weiter zu untersuchen.

6.2. In vitro beladenes Rattenserum

Durch Zugabe unterschiedlicher Mengen der Standardlösung von ^{181}Hf -NTA ($|\text{Hf}| : |\text{NTA}| = 1 : 4$, $\text{pH} = 7,4$) zu jeweils 1 ml frisch gewonnenem Rattenserum im Reagenzglas konnte das Konzentrationsverhältnis $K = |\text{Hf}| : |\text{UIBC}|$ in einem größeren Bereich variiert werden. Um die Dauer einer Einzelmessung auf maximal 3 bis 4 Tage zu beschränken, war allerdings eine Probenaktivität von mindestens 5 μCi erforderlich. Bei der gegebenen spezifischen Aktivität der Stammlösung zum Zeitpunkt der Präparation (12 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) betrug die entsprechende Hafniummenge 2,3 nMol, so daß mit 1 ml Serum K nicht kleiner als 1 : 15,6 gewählt werden konnte. Es zeigte sich auch, daß eine Transferrinbindung bei Sättigungsgraden größer 1 : 4 nicht mehr vollständig gewährleistet war, weil dann offensichtlich ein Teil des eingesetzten Hafniums niedermolekular gebunden in Lösung blieb. Als größter Wert für K wurde daher 1 : 3,1 eingestellt.

6.2.1. Konzentrationsabhängigkeit

In Zeitabständen bis zu 4 Monaten nach der Präparation wurden Messungen an einer Reihe von Rattenserum-Proben mit unterschiedlicher Hafniumbeladung ($1 : 15,6 \leq K \leq 1 : 3,1$) durchgeführt (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: TDPAC-Messungen zur Konzentrationsabhängigkeit an in vitro mit ^{181}Hf beladenem Rattenserum-Transferrin

Probe Nr.	$ \text{Hf} $ (nMol)	$ \text{Hf} : \text{UIBC} $ (#)	End-pH-Wert	Alter der Probe (d)	f_1 (%)	f_2 (%)	Messung Nr.
I	2,3	1:16	7,5	2	46 ± 2	19 ± 3	1
				16	57 ± 2	11 ± 3	2
II	4,6	1:7,8	7,8	5	47 ± 2	19 ± 3	3
				19	54 ± 2	11 ± 2	4
				42	56 ± 2	10 ± 2	5
III	6,9	1:5,2	9,2	7	43 ± 2	17 ± 3	6
				21	22 ± 1	40 ± 2	7
				38	7 ± 1	57 ± 2	8
IV	9,6	1:3,7	9,5	1	11 ± 1	27 ± 3	9
				6	4 ± 1	49 ± 3	10
				129	5 ± 1	45 ± 4	11
V	11,5	1:3,1	9,5	1	22 ± 1	19 ± 3	12
				2	11 ± 1	19 ± 4	13
				10	4 ± 1	32 ± 4	14
				128	8 ± 1	19 ± 3	15

(#) Der Fehler dieser Werte beträgt etwa 15 %

Die gewonnenen $R(t)$ -Spektren können mit den drei charakteristischen Anteilen beschrieben werden. Die Quadrupolkopplungsparameter sind in Tabelle 6 gezeigt.

Tabelle 6: Quadrupolkopplungsparameter für in vitro mit ^{181}Hf beladenes Rattenserum-Transferrin (Messungen zur Konzentrationsabhängigkeit)

Bindungs-konfiguration	ν_Q (MHz)	η	δ (%)	λ_2 (MHz)
1	895 ± 4	$0,934 \pm 0,013$	$2,7 \pm 0,4$	} 60 ± 2
2	1472 ± 5	$0,526 \pm 0,002$	$0,4 \pm 0,1$	
3	935 ± 5	0	$7,9 \pm 1,7$	

$$R_0 = - (1,34 \pm 0,08) \%$$

Ein Vergleich mit Tabelle 4 belegt, daß die Werte innerhalb der Meßgenauigkeit denjenigen entsprechen, die mit in vivo beladenem Rattenserum gewonnen wurden. Damit ist bewiesen, daß sich die Bindungsverhältnisse von Hafnium-Transferrin für in vivo und in vitro präparierte Proben nicht unterscheiden.

Bei den höchsten Hafniumkonzentrationen ($K = 1 : 3,7$ und $K = 1 : 3,1$) tritt ein kleiner zusätzlicher Anteil (ca. 10 %) von niedermolekular gebundenen ^{181}Hf -Kernen auf. Die Beschreibung der Daten erfordert für diese 4. Fraktion einen Ansatz für schnelle Relaxation (Gleichung 3/6) mit einer Relaxationskonstanten $\lambda_2 \approx 100$ MHz. Das beobachtete Relaxationsverhalten läßt es als ausgeschlossen erscheinen, daß diese Kerne an Transferrin gebunden sind. Die Natur der niedermolekularen Komplexe kann aus den TDPAC-Messungen jedoch nicht bestimmt werden. Selbst wenn man die größere Viskosität von Serum im Vergleich zu einer wässrigen Hafnium-NTA Lösung berücksichtigt, liegt die gemessene Relaxationskonstante für $[\text{HfNTA}_2]^{2-}$ - Ionen deutlich zu hoch (vgl. Anhang C3).

Der dritte Anteil ist auch bei den in vitro präparierten Proben ziemlich unspezifisch (große Frequenzverbreiterung δ), so daß kein Asymmetrieparameter bestimmt werden kann. Gegenüber den in vivo gewonnenen Proben beträgt der Anteil im Mittel 28 statt 21 %. Diese Erhöhung muß nicht unbedingt signifikant sein, wäre jedoch durchaus verständlich, da bei der in vitro Präparation nicht die Möglichkeit besteht, daß unspezifisch gebundenes Hafnium durch den Stoffwechsel aus dem Serum entfernt wird.

Das Hauptaugenmerk bei der Auswertung gilt natürlich den Anteilen f_1 und f_2 der beiden spezifischen Konfigurationen. Die ermittelten Werte für alle Einzelmessungen sind in Tabelle 5 mit aufgenommen. Für die beiden niedrigsten Hafniumkonzentrationen $K = 1 : 16$ und $K = 1 : 7,8$ (Proben I und II) dominiert von Beginn an der 1. Anteil deutlich und nimmt mit der Zeit noch zu. Die Summe der beiden Anteile bleibt dabei konstant, sie beträgt etwa 65 %. Nach einem Monat scheint ein stabiler Zustand erreicht. Das Verhältnis f_1 zu f_2 beträgt dann etwa 5,6 : 1.

Völlig anders verhalten sich die Proben mit höherer Hafniumkonzentration. Für $K = 1 : 5,2$ (Probe III) dominiert zwar anfangs (Messung Nr. 6) der erste Anteil etwa in gleichem Maße wie bei Probe I und II, nimmt mit der Zeit jedoch stark ab, bis nach 38 Tagen nur noch 7 % der Kerne in dieser

Konfiguration vorliegen (Messung Nr. 8). Gleichzeitig nimmt der zweite Anteil zu, so daß schließlich eine Verteilung $f_1 : f_2 = 1 : 8,1$ erreicht wird. Die Erhöhung der Hafniumkonzentration von 4,6 auf 6,9 nMol/ml führt also zu einer vollständigen Umkehrung im Besetzungsverhältnis der beiden spezifischen Konfigurationen.

Auch bei den höchsten Hafniumkonzentrationen $|\text{Hf}| = 9,6$ und $11,5$ nMol/ml (Proben IV und V) dominiert der zweite Anteil. Wenngleich die Summe der spezifischen Anteile kleiner ist, da etwa 10 % der Kerne auf die Konfiguration 4 entfallen, stellt sich schnell eine 8 bis 10-fache Bevorzugung der zweiten Konfiguration ein.

In Abb. 8 sind drei charakteristische $R(t)$ -Spektren und die zugehörigen Fouriertransformationen gezeigt, aus denen die Verteilung auf die Konfigurationen 1 und 2 qualitativ ersichtlich ist. In Abb. 8a (Messung Nr. 5) erkennt man fast nur die erste Konfiguration, Abb. 8b (Messung Nr. 7) zeigt ein Spektrum, in dem beide Anteile deutlich vorhanden sind, während Abb. 8c (Messung Nr. 8), das Spektrum der gleichen Probe 17 Tage später gemessen, völlig vom zweiten Anteil dominiert wird.

Wie schon erwähnt, wurde der pH-Wert aller Proben bei der Präparation auf 7,4 eingestellt. Eine erneute Kontrolle der pH-Werte nach Abschluß der TDPAC-Messungen ergab zum Teil deutlich erhöhte Werte, die aus Tabelle 5 ersichtlich sind. Während bei den niedrigen Hafniumkonzentrationen (kleiner 4,6 nMol/ml) nur ein leichter Anstieg auf 7,5 bzw. 7,8 zu verzeichnen war, wurden für $|\text{Hf}| \geq 6,9$ nMol/ml pH-Werte von über 9 gefunden. Es besteht also ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Hafniumkonzentration und dem sich einstellenden pH-Wert. Je mehr Hafnium angeboten wird, desto alkalischer werden die Serumproben. Es ist auch offensichtlich, daß eine Korrelation zwischen der Verteilung der Hafniumionen auf die spezifischen Bindungskonfigurationen und dem pH-Wert der Proben besteht. Bleibt der pH-Wert kleiner als 8, dominiert die erste Fraktion, steigt er jedoch auf über 9 an, wird bevorzugt die zweite Konfiguration angenommen.

Um diese pH-Abhängigkeit genauer zu untersuchen und insbesondere auch die Besetzungsverhältnisse $f_1 : f_2$ im Übergangsbereich zwischen pH 8 und 9 zu bestimmen, wurde eine zusätzliche Meßreihe durchgeführt. Die Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt dargestellt.

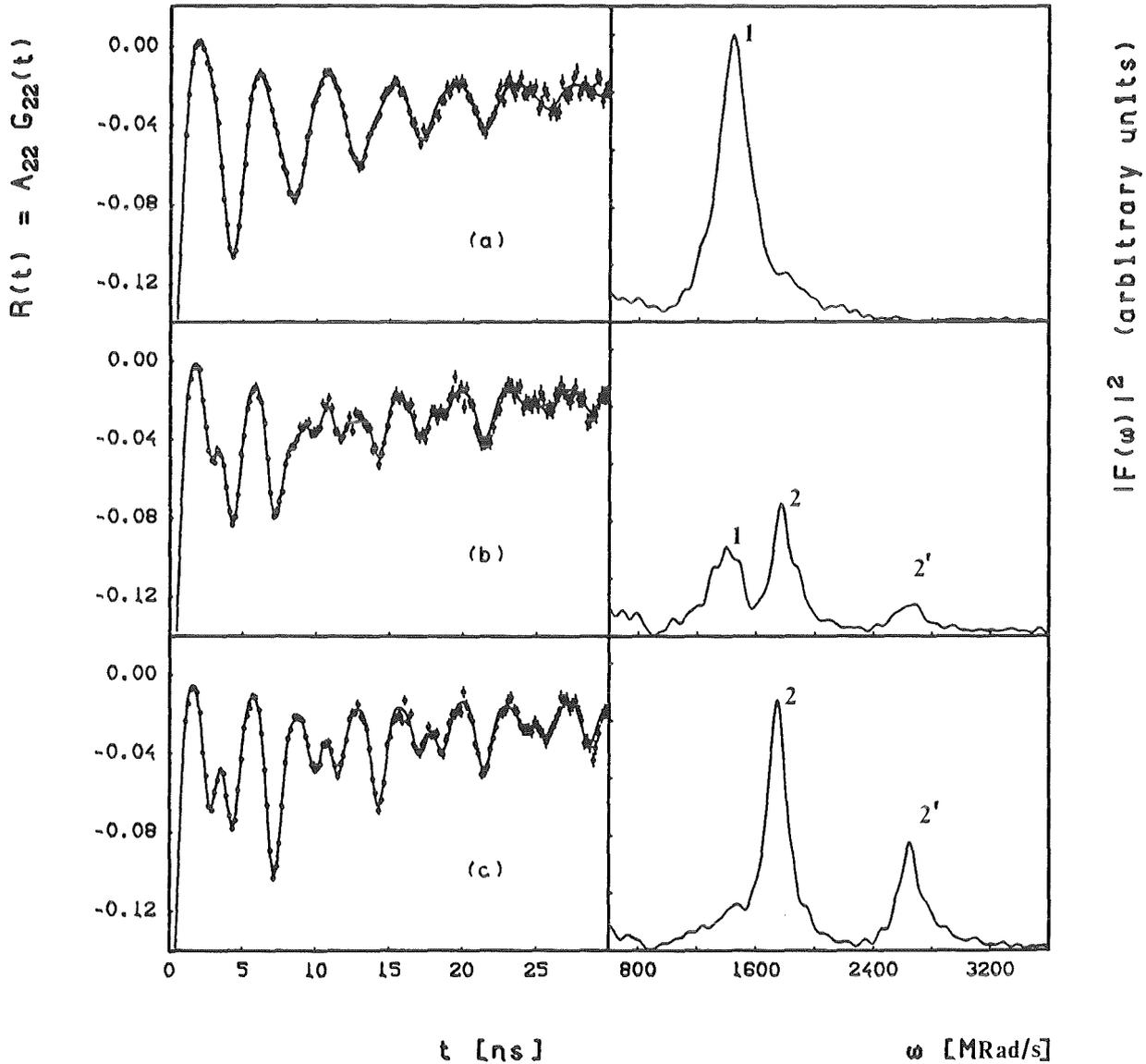


Abb. 8: $R(t)$ -Spektren und zugehörige Fouriertransformationen von in vitro beladenem Rattenserum-Transferrin mit verschiedenen Anteilsverhältnissen der spezifischen Bindungskonfigurationen 1 und 2

- a) $K = 1:7,8$, $\text{pH} = 7,8$ (Messung Nr. 5 in Tab. 5): $f_1:f_2 = 5,6:1$
- b) $K = 1:5,2$, $\text{pH} = ?$ (Messung Nr. 7 in Tab. 5): $f_1:f_2 = 1:1,8$
- c) $K = 1:5,2$, $\text{pH} = 9,2$ (Messung Nr. 8 in Tab. 5): $f_1:f_2 = 1:8,1$
(gleiche Probe wie b), 17 Tage später gemessen)

Aus den Fouriertransformationen sind die Verhältnisse der Anteile f_1 und f_2 qualitativ ersichtlich. $2'$ entspricht der Frequenz $c_2(\eta)\lambda_b$ der 2. Bindungskonfiguration. Bei der 1. Konfiguration fallen die Frequenzen $c_1(\eta)\lambda_b$ und $c_2(\eta)\lambda_b$ wegen des hohen Wertes von η zusammen.

6.2.2. pH-Abhängigkeit

Für diese Untersuchungen wurden mehrere Rattenserum-Proben mit einer Hafniumkonzentration von 6,9 nMol/ml, d.h. einer Transferrin-Beladung $K = |\text{Hf}| : |\text{UIBC}| = 1 : 5,2$ bei pH = 7,4 präpariert. Es zeigte sich, daß es nicht möglich war, durch Zugabe von NaOH oder HCl diesen oder auch höhere bzw. niedrigere pH-Werte zu stabilisieren. Stets erhöhte sich der pH-Wert mit der Zeit, um schließlich, wie auch bei den vorangegangenen Untersuchungen mit der gleichen Hafniumkonzentration, etwa pH 9 zu erreichen (vgl. Tab. 5). Da andererseits das Hafnium-Transferrin System nicht durch massive Pufferzusätze verändert werden sollte, waren Messungen an Proben mit festen, stabilen pH-Werten nicht durchführbar. Als Alternative blieb somit nur, die natürliche Entwicklung der Proben auszunutzen, d.h. in kurzen Abständen TDPAC-Messungen vorzunehmen und den pH-Wert vorher und nachher zu kontrollieren. Da jeweils eine Meßzeit von ca. 2 Tagen benötigt wurde, änderte sich der pH-Wert auch während der Meßdauer zum Teil beträchtlich. Als pH-Wert der Messung wurde dann das Mittel der Werte vorher und nachher definiert (siehe Tabelle 7). Die Größe der Änderung wurde bei der Angabe des Fehlers berücksichtigt.

In einigen Fällen wurde der pH-Wert, nachdem er sich im Laufe der Zeit (ca. 1 Monat) bei etwa 9 stabilisiert hatte, durch Zugabe von HCl wieder herabgesetzt. Dabei konnten Werte zwischen 6,6 und 7,6 erreicht werden, die jedoch wieder nicht stabil blieben, sondern relativ schnell auf den ursprünglichen Wert bei 9 anstiegen.

Eine Auswahl der $R(t)$ -Spektren ist in Abb. 9 gezeigt. Sie können mit den bekannten charakteristischen Anteilen beschrieben werden. Die Bestimmung des Asymmetrieparameters η und der Frequenzverbreiterung δ der ersten Konfiguration ist bei kleinen Anteilen schwierig. Es wurde deshalb vorgezogen, für η_1 und δ_1 die Werte einzusetzen, die bei großen Anteilen ermittelt wurden, und bei der Anpassung festzuhalten. So konnte eine zuverlässige und konsequente Bestimmung der Verteilung $f_1 : f_2$ bei allen pH-Werten gewährleistet werden.

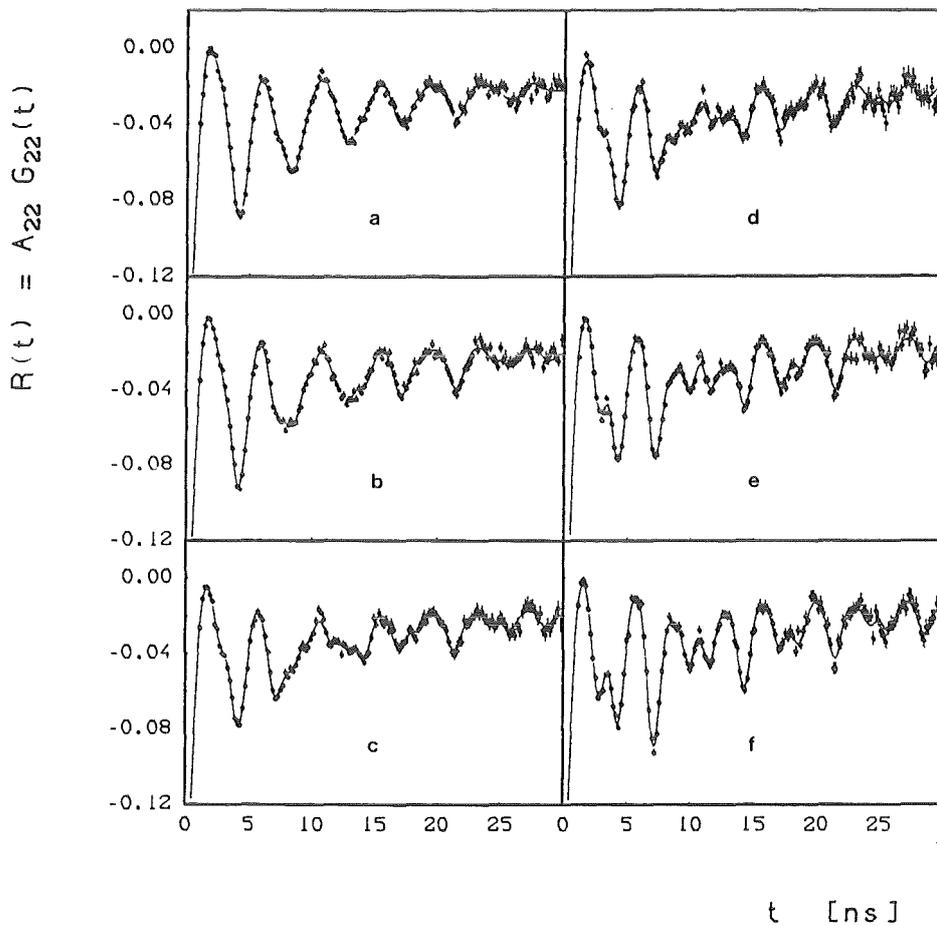


Abb. 9: $R(t)$ -Spektren von in vitro beladenem Rattenserum-Transferrin bei verschiedenen pH-Werten

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| a) pH = 7,86: $f_1' = 82\%$ | d) pH = 8,30: $f_1' = 46\%$ |
| b) pH = 7,92: $f_1' = 68\%$ | e) pH = 8,66: $f_1' = 30\%$ |
| c) pH = 8,15: $f_1' = 55\%$ | f) pH = 9,03: $f_1' = 16\%$ |

In Tabelle 7 sind die so ermittelten spezifischen Anteile f_1 und f_2 für alle Einzelmessungen zusammengefaßt. Da die Summe $f_1 + f_2$ nicht immer konstant ist, speziell von Probe zu Probe ergeben sich Unterschiede (siehe Tab. 7), werden die Werte normiert, d.h. in relative Anteile $f_1' = f_1 / (f_1 + f_2)$ und $f_2' = f_2 / (f_1 + f_2)$ umgerechnet ($f_1' + f_2' = 1$). Die sich dann ergebende pH-Abhängigkeit der Besetzungsverhältnisse ist in Abb. 10 dargestellt. Zwischen pH 7,9 und 9,3 nimmt f_1' kontinuierlich von ca. 85 % auf 10 % ab, f_2' entsprechend von 15 % auf 90 % zu. Die damit verbundene Änderung der $R(t)$ -Spektren wird anhand der Beispiele in Abb. 9 deutlich. Eine Gleichbesetzung der beiden Konfigurationen wird bei pH 8,2 erreicht (vgl. Abb. 10).

Tabelle 7: TDPAC-Messungen zur pH-Abhängigkeit an in vitro mit ^{181}Hf beladenem Rattenserum-Transferrin

Probe Nr.	pH-Wert	f_1 (%)	f_2 (%)	$f_1 + f_2$ (%)	$f_1' =$ $f_1/(f_1+f_2)$ (%)	$f_2' =$ $f_2/(f_1+f_2)$ (%)
I	$7,77 \pm 0,02$	44 ± 2	20 ± 3	64 ± 4	68 ± 3	32 ± 3
	$7,81 \pm 0,02$	46 ± 2	15 ± 3	61 ± 4	75 ± 4	25 ± 4
	$7,86 \pm 0,02$	48 ± 1	10 ± 1	58 ± 1	82 ± 1	18 ± 1
	$7,90 \pm 0,01$	42 ± 1	17 ± 1	59 ± 2	71 ± 2	29 ± 2
	$7,92 \pm 0,01$	42 ± 1	20 ± 1	62 ± 1	68 ± 1	32 ± 1
	$8,49 \pm 0,03$	23 ± 1	38 ± 1	61 ± 1	38 ± 1	62 ± 1
	$8,66 \pm 0,01$	19 ± 1	44 ± 1	63 ± 2	30 ± 2	70 ± 2
	$8,65 \pm 0,02$	18 ± 1	45 ± 1	63 ± 2	28 ± 1	72 ± 1
	$8,75 \pm 0,02$	13 ± 1	50 ± 1	63 ± 1	21 ± 1	79 ± 1
	$8,92 \pm 0,02$	12 ± 1	51 ± 1	63 ± 1	20 ± 1	80 ± 1
	$8,98 \pm 0,01$	12 ± 1	55 ± 1	67 ± 1	18 ± 1	82 ± 1
	$9,03 \pm 0,01$	11 ± 1	58 ± 1	69 ± 2	16 ± 1	84 ± 1
	$8,84 \pm 0,02$	15 ± 1	48 ± 1	63 ± 1	23 ± 1	77 ± 1
	+ HCl	$8,15 \pm 0,05$	30 ± 1	25 ± 1	55 ± 2	55 ± 1
$8,67 \pm 0,03$		18 ± 1	42 ± 2	60 ± 2	29 ± 1	71 ± 1
$8,80 \pm 0,01$		17 ± 1	43 ± 2	60 ± 2	28 ± 2	72 ± 2
II	$8,30 \pm 0,05$	27 ± 1	32 ± 2	59 ± 2	46 ± 2	54 ± 2
	$8,84 \pm 0,02$	13 ± 1	50 ± 1	63 ± 1	20 ± 1	80 ± 1
	$8,90 \pm 0,05$	15 ± 1	46 ± 1	61 ± 1	25 ± 1	75 ± 1
III	$8,45 \pm 0,05$	14 ± 1	29 ± 2	43 ± 2	32 ± 2	68 ± 2
	$9,20 \pm 0,05$	7 ± 1	55 ± 3	62 ± 3	11 ± 1	89 ± 1
IV	$8,40 \pm 0,10$	12 ± 1	18 ± 1	30 ± 2	40 ± 2	60 ± 2
	$9,30 \pm 0,05$	4 ± 1	34 ± 2	38 ± 2	11 ± 2	89 ± 2
V	$7,90 \pm 0,05$	40 ± 1	8 ± 1	48 ± 1	84 ± 2	16 ± 2
VI	$9,08 \pm 0,02$	13 ± 1	52 ± 1	65 ± 1	20 ± 1	80 ± 1

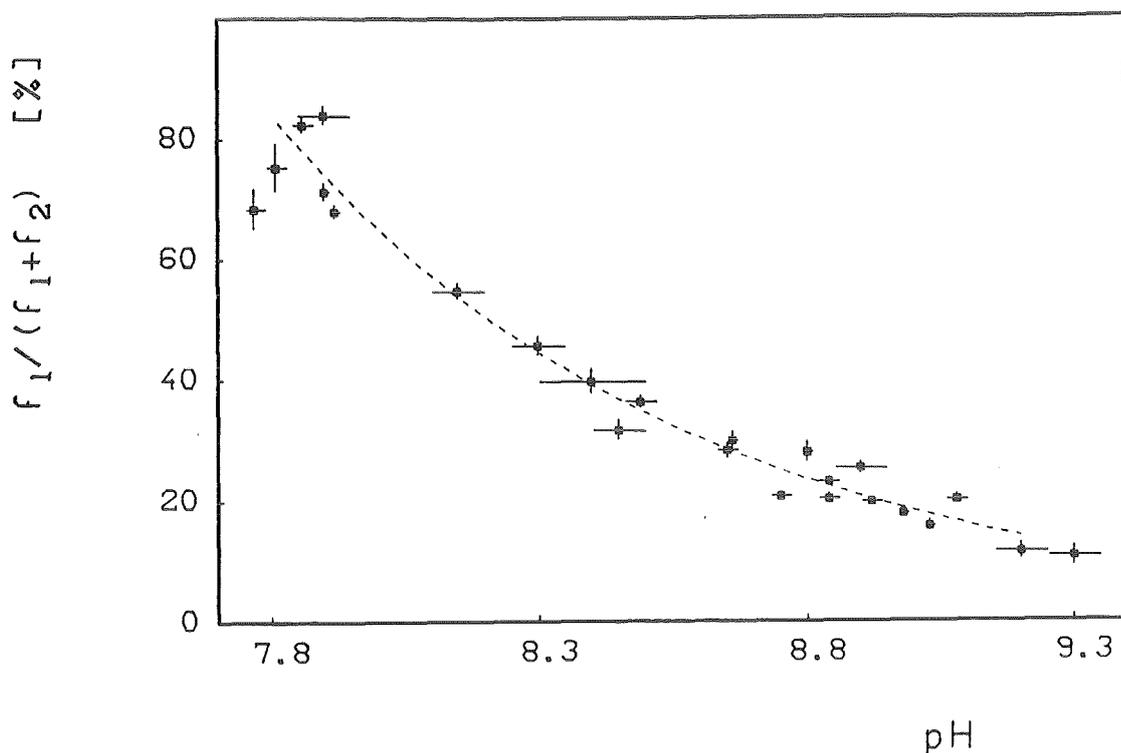


Abb. 10: Abhängigkeit des relativen Anteils f_1' der ersten Bindungskonfiguration in Rattenserum-Transferrin vom pH-Wert der Probe ($f_2' = 1 - f_1'$). Die gestrichelte Kurve soll lediglich den prinzipiellen Verlauf der Meßpunkte verdeutlichen.

Das Absinken des ersten Anteils unterhalb pH 7,9 (siehe Tab. 7 und Abb. 10) ist nicht unbedingt signifikant. Zum einen handelt es sich dabei um Messungen kurz nach der Präparation, bei denen die Auswertung der Daten schwierig war, zum anderen deuten die Ergebnisse der Proben mit niedrigeren Hafniumkonzentrationen im vorigen Abschnitt darauf hin, daß f_1' bei pH 7,5 und 7,8 auch etwa 85 % beträgt. Es sieht also so aus, als ob bei niedrigen und hohen pH-Werten eine Art Sättigung mit etwa umgekehrten Besetzungsverhältnissen $f_1' : f_2'$ erreicht wird. Der Anteil der dritten Konfiguration beträgt konstant etwa 27 %.

Bei Probe III und IV (siehe Tab. 7) wird wieder ein zusätzlicher Relaxationsanteil mit $\lambda_2 \approx 100$ MHz benötigt. Diese Proben nehmen auch die höchsten pH-Werte (9,2 bzw. 9,3) an. Der Anteil der vierten Konfiguration beträgt dann 2 bzw. 7 %. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen in Kap. 6.2.1, wo bei den Proben, die pH 9,5 erreichten (vgl. Tabelle 5), etwa 10 % reine Relaxation gefunden wurde.

In zwei Fällen wurde der pH-Wert von 8 bzw. 9 durch Zugabe von HCl auf unter 7 (6,8 bzw. 6,6) herabgesetzt. Resultat war stets das Verschwinden der charakteristischen Struktur in den $R(t)$ -Spektren. Obwohl sich der pH-Wert im Laufe der Zeit auf etwa 8 erhöhte, traten die spezifischen Anteile nicht wieder in den Spektren auf. Dies ist in Abb. 11 am Beispiel der Probe VI veranschaulicht.

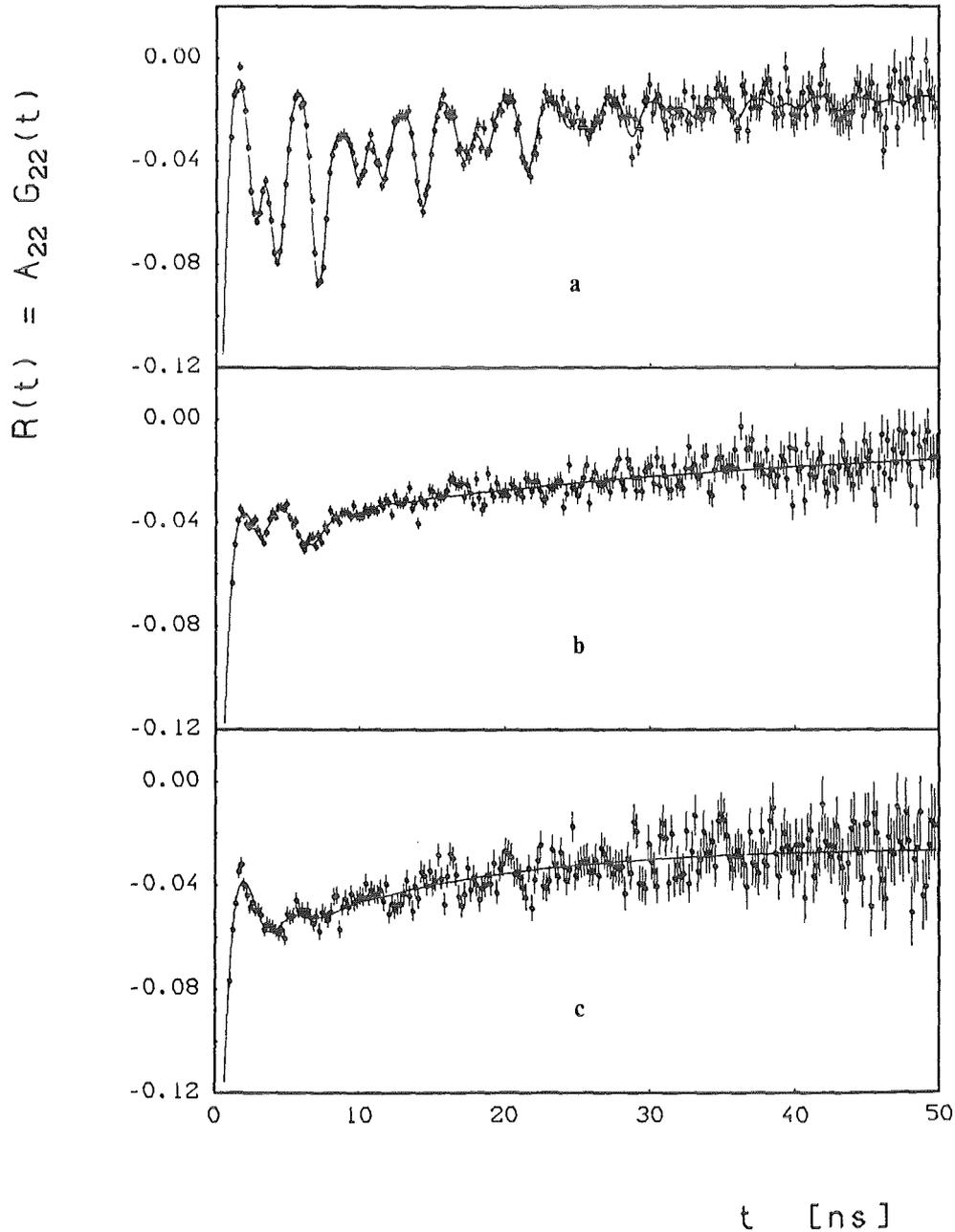


Abb. 11: $R(t)$ -Spektren einer Rattenserum-Probe vor und nach Erniedrigung des pH-Wertes durch Zugabe von HCl unter pH 7
a) vor Zugabe von HCl: pH = 9,08
b) nach Zugabe von HCl: pH = 6,6
c) nach Wiederanstieg des pH-Wertes auf 8,0

Dagegen blieb bei Erniedrigung des pH-Wertes auf 7,6 bis 7,8 das charakteristische Spektrum erhalten (siehe z.B. Abb. 9c), die Anteile f_1' und f_2' entsprechen diesen pH-Werten (vgl. Tabelle 7). Diese Ergebnisse zeigen auf, daß die Hafnium-Transferrin Bindung unterhalb pH 7 nicht stabil ist. Bei Unterschreiten dieses Werts werden die Hafniumionen freigesetzt. Da auch bei anschließender Wiedererhöhung des pH-Wertes keine Bindung an Transferrin mehr eingegangen wird, muß geschlossen werden, daß Hafnium unter pH 7 in nicht reaktionsfähiger Form komplexiert wird oder ausfällt.

Aus den in Tabelle 7 aufgeführten Messungen im pH-Bereich 7,8 bis 9,2 wurden erneut die Quadrupolkopplungsparameter der drei charakteristischen Bindungskonfigurationen von Rattenserum-Transferrin bestimmt. Der Asymmetrieparameter der ersten Konfiguration wurde aus den oben genannten Gründen fest vorgegeben. Für die anderen Parameter sind in Tabelle 8 die Mittelwerte aller Einzelmessungen aufgeführt. Sie stimmen mit denen der vorhergehenden Meßreihen gut überein (vgl. Tab. 4 und 6).

Tabelle 8: Quadrupolkopplungsparameter für in vitro mit ^{181}Hf beladenes Rattenserum-Transferrin (Messungen zur pH-Abhängigkeit)

Bindungs- konfiguration	ν_Q (MHz)	η	δ (%)	λ_2 (MHz)
1	897 ± 4	0,934	$1,5 \pm 0,2$	} 64 ± 1
2	1463 ± 5	$0,528 \pm 0,001$	$0,2 \pm 0,1$	
3	933 ± 6	0	$14,3 \pm 0,9$	

$$R_Q = - (1,35 \pm 0,05) \%$$

6.3. In vitro beladenes Humanserum

Analog zu den in vitro Experimenten mit Rattenserum wurden durch Zugabe verschiedener Mengen Hafnium zu Humanserum Proben mit unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen $K = |\text{Hf}| : |\text{UIBC}|$ präpariert (siehe Tabelle 9). Bei Zusatz gleicher Mengen Hafnium zu Ratten- bzw. Humanserum ergeben sich etwas andere Beladungswerte, da sowohl die Transferrinkonzentration als auch die Eisenvorsättigung für beide Spezies nicht identisch sind. Nach neueren

Untersuchungen /StDe84/ enthält 1 ml Humanserum 36 ± 5 nMol (= $2,9 \pm 0,4$ mg) Transferrin, die Bindungskapazität ist zu etwa 35 % mit Eisen gesättigt. Die freie Bindungskapazität beträgt damit ca. 47 nMol/ml (Ratte: 36 nMol/ml).

An den einzelnen Proben wurden in verschiedenen Zeitabständen nach der Präparation (bis zu 80 Tage) TDPAC-Messungen durchgeführt. Nach Abschluß der Untersuchungen wurde der pH-Wert erneut kontrolliert. Wieder wurden zum Teil beträchtliche Erhöhungen des ursprünglich eingestellten, physiologischen Wertes (pH = 7,4) festgestellt (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: TDPAC-Messungen an in vitro mit ^{181}Hf beladenem Humanserum-Transferrin

Probe Nr.	$ \text{Hf} $ (nMol)	$ \text{Hf} : \text{UTBC} $ (#)	End-pH-Wert	Alter der Probe (d)	f_1 (%)	f_2 (%)	Messung Nr.
I	2,3	1:20	7,9	2	36 ± 1	25 ± 2	1
				16	42 ± 1	24 ± 2	2
II	4,6	1:10	7,8	5	33 ± 1	31 ± 1	3
				19	41 ± 1	23 ± 2	4
				52	48 ± 1	16 ± 2	5
III	6,9	1:6,8	9,2	7	12 ± 2	58 ± 2	6
				21	11 ± 2	60 ± 2	7
IV	6,4	1:7,3	8,5	8	13 ± 1	59 ± 1	8
				38	24 ± 4	42 ± 1	9
				72	31 ± 3	33 ± 1	10
V	6,4	1:7,3	8,8	11	7 ± 1	66 ± 1	11
				41	15 ± 1	55 ± 2	12
				80	21 ± 1	47 ± 1	13

(#) Der Fehler dieser Werte beträgt etwa 15 %

Auch für Humanserum erfordert die Beschreibung der TDPAC-Spektren drei Komponenten, von denen eine aufgrund der großen Frequenzverbreiterung ($\delta \approx 15$ %) stark gedämpft ist und einen konstanten Anteil von ca. 27 % aufweist. Die Quadrupolfrequenzen der beiden anderen Fraktionen sind sehr scharf definiert ($\delta < 1$ %) und bestimmen somit die charakteristische Form der $R(t)$ -Spektren. Die im einzelnen ermittelten Kopplungskonstanten ν_Q , Asymmetrieparameter η und Frequenzverbreiterungen δ sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Quadrupolkopplungsparameter für in vitro mit ^{181}Hf beladenes Humanserum-Transferrin

Bindungs- konfiguration	ν_Q (MHz)	η	δ (%)	λ_2 (MHz)
1	872 ± 4	$0,949 \pm 0,008$	$0,7 \pm 0,3$	} 67 ± 2
2	1437 ± 5	$0,577 \pm 0,002$	$0,7 \pm 0,1$	
3	917 ± 7	0	$15,2 \pm 0,6$	

$$R_Q = - (1,31 \pm 0,03) \%$$

Obwohl die Werte denen für Rattenserum sehr ähnlich sind, können aufgrund der guten Zeitauflösung der Apparatur und der Vielzahl der durchgeführten Messungen statistisch signifikante Unterschiede zwischen beiden Spezies festgestellt werden (vgl. Tabelle 10 mit den Tabellen 4, 6 und 8):

- Für alle Anteile liegen die Quadrupolkopplungskonstanten ν_Q bei Humanserum-Transferrin um 2 bis 3 % niedriger als bei Rattenserum-Transferrin. Aus den Verteilungen der Einzelmeßwerte in Abb. 12a und 12b sind diese Unterschiede für die beiden spezifischen Konfigurationen klar ersichtlich.

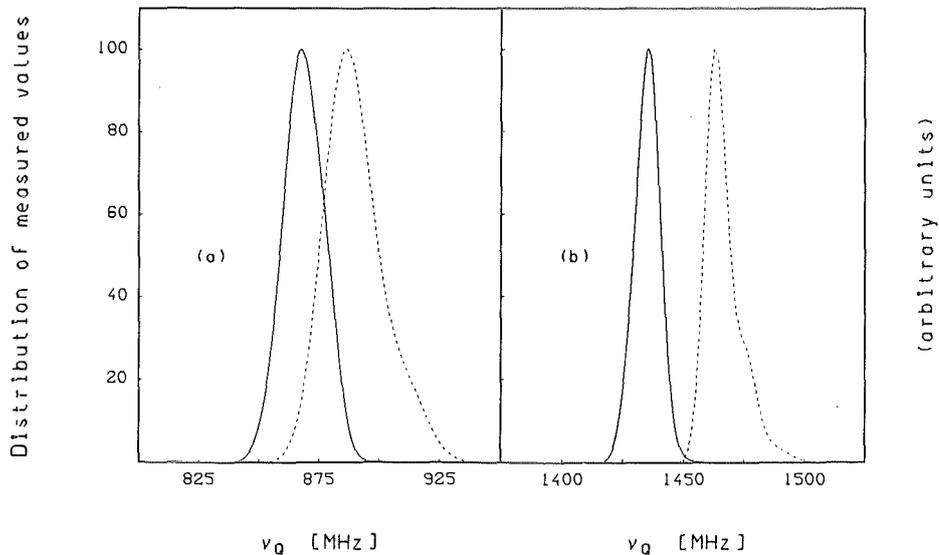


Abb. 12: Verteilungen aller Einzelmeßwerte der Quadrupolkopplungskonstanten ν_Q für Human- (—) und Rattenserum (- - -)-Transferrin
a) Bindungskonfiguration 1
b) Bindungskonfiguration 2

- Für den ersten Anteil kann kein signifikanter Unterschied im Asymmetrieparameter festgestellt werden, da die Bestimmung aufgrund der hohen Werte ($\eta_1 \approx 0,95$) nur mit relativ großer Unsicherheit (ca. 2 %) möglich ist (siehe Abb. 13a).
- Die Asymmetrieparameter der zweiten Konfiguration können dagegen extrem genau bestimmt werden ($\Delta\eta/\eta = 0,2\%$). Sie unterscheiden sich um etwa 10 % (siehe Abb. 13b).

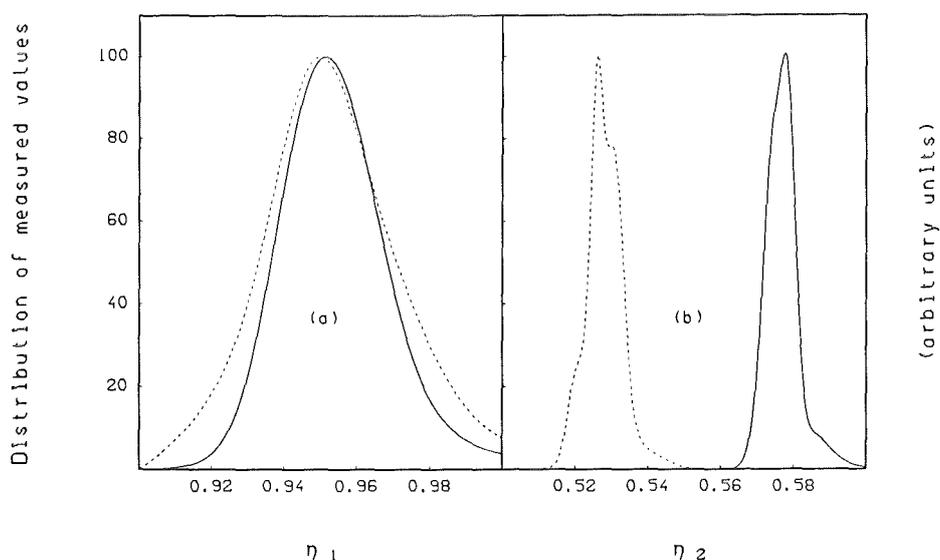


Abb. 13: Verteilungen aller Einzelmesswerte des Asymmetrieparameters η für Human- (—) und Rattenserum (- - -)-Transferrin
a) Bindungskonfiguration 1
b) Bindungskonfiguration 2

- Die Relaxationskonstante λ_2 (ein Wert für alle Anteile) ergibt sich bei Humanserum-Transferrin mit (67 ± 3) MHz etwas höher als bei Rattenserum-Transferrin (60 ± 2) MHz).

Die erreichbare Genauigkeit bei der Bestimmung von Asymmetrieparametern hängt davon ab, wie empfindlich kleine Änderungen in η in die Form der $R(t)$ -Spektren eingehen. Während im Bereich mittlerer Werte ($\eta \approx 0,5$) schon geringfügige Abweichungen die Struktur der Spektren stark beeinflussen, bewirken große Werte ($\eta \gtrsim 0,94$) innerhalb des Meßbereichs (ca. 60 ns) nur eine mehr oder weniger starke, zusätzliche Dämpfung der Oszillationen.

Da diese Dämpfung nur schwer von denjenigen aufgrund von Frequenzverbreiterung und Relaxation zu trennen ist, wird die Anpassungsgüte zwischen $\eta = 0,94$ und 1 durch den jeweils gewählten Wert von η nur wenig verändert (siehe Abb. 14).

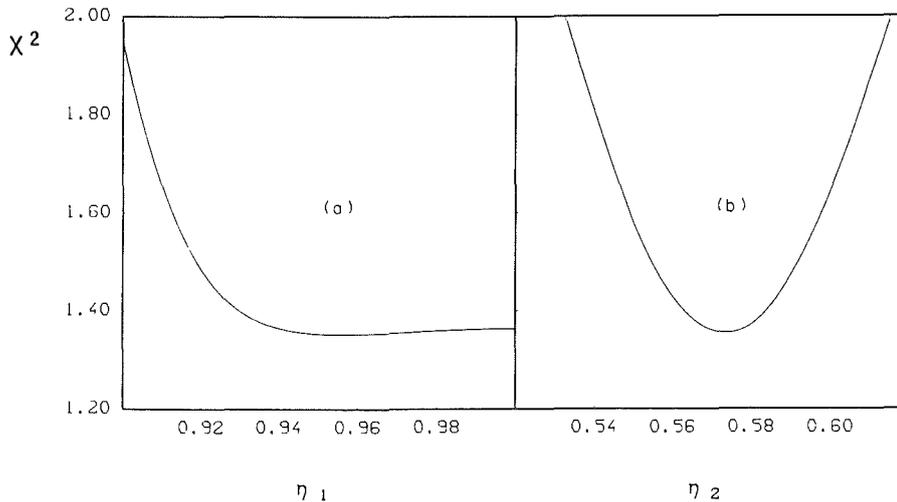


Abb. 14: Anpassungsgüte X^2 als Funktion des in der Anpassung eingesetzten Asymmetrieparameter-Wertes η für $R(t)$ -Spektren, simuliert mit Frequenzverbreiterung $\delta = 1\%$ und Relaxationskonstante $\lambda_2 = 60$ MHz
a) für hohe η (0,95) und b) für niedrige η (0,575)

Das hat zur Konsequenz, daß die $R(t)$ -Spektren von Ratten- und Humanserum klar unterscheidbar sind, wenn der zweite Anteil ($\eta \approx 0,5$) dominiert, wogegen bei Überwiegen des ersten Anteils ($\eta \approx 0,95$) kaum Unterschiede in der Spektrumsform festgestellt werden können. Ein Vergleich der entsprechenden $R(t)$ -Spektren in Abb. 15 läßt dies sofort erkennen.

In Tabelle 9 ist auch die Verteilung der Sondenkerne auf die beiden spezifischen Bindungskonfigurationen bei den einzelnen Messungen aufgeführt. Wieder dominiert bei niedrigen Hafniumkonzentrationen ($K = 1 : 20$ und $K = 1 : 10$) der erste Anteil mit zunehmendem Alter der Proben immer deutlicher. Allerdings ist die Präferenz ($2 : 1$ bis $3 : 1$) nicht so ausgeprägt wie bei den entsprechenden Rattenserum-Proben (vgl. Tab. 5). Für $K = 1 : 6,8$ wird erwartungsgemäß eine starke Bevorzugung der zweiten Fraktion beobachtet ($f_1 : f_2 = 1 : 7$), die sich mit der Zeit kaum ändert. Bei etwas niedrigerer Hafniumkonzentration ($K = 1 : 7,3$) dagegen wird der anfangs ebenfalls hohe Anteil f_2 innerhalb von 10 Wochen deutlich reduziert.

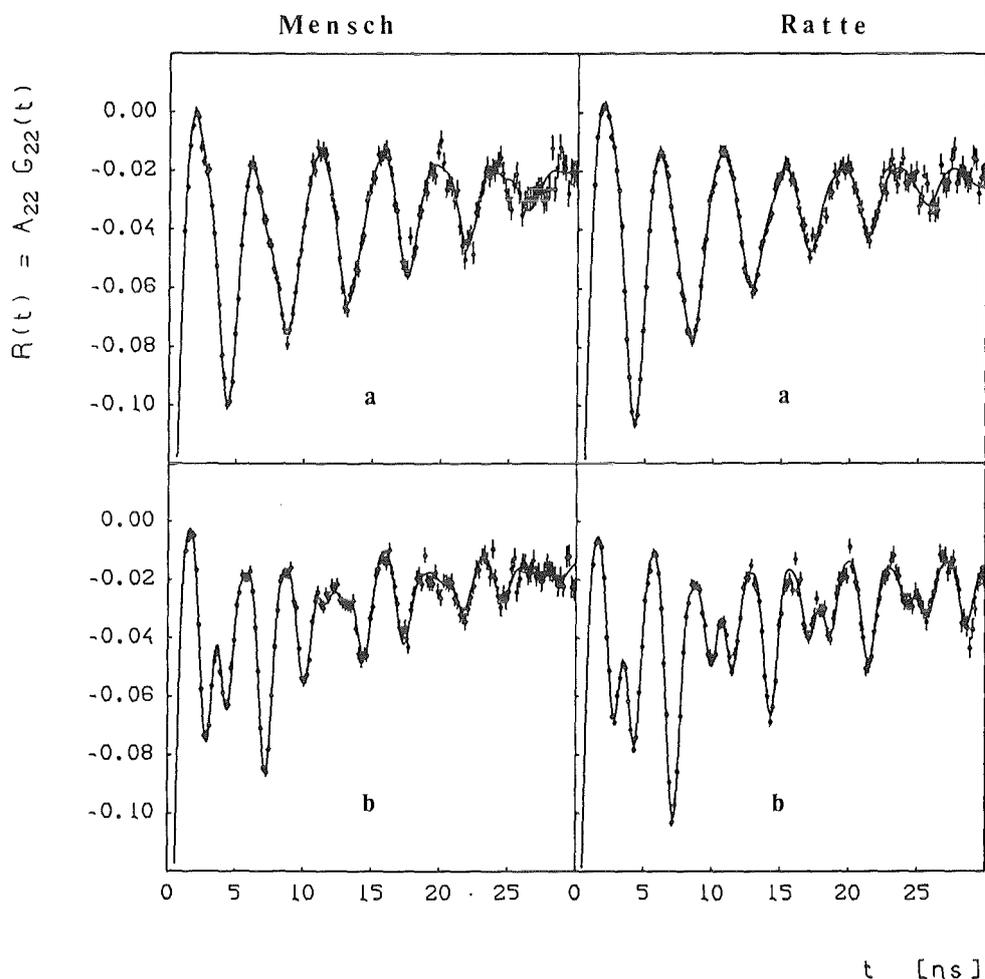


Abb. 15: Vergleich der $R(t)$ -Spektren für Human- und Rattenserum-Transferrin a) bei niedrigem und b) bei hohem pH-Wert, d.h. bei dominierender erster bzw zweiter Konfiguration

Vergleicht man die jeweils direkt nach den letzten TDPAC-Messungen bestimmten pH-Werte mit den zugehörigen Verhältnissen $f_1 : f_2$, so fällt auch bei Humanserum eine eindeutige Korrelation auf. Je höher der pH-Wert, desto größer ist f_2 . Unter pH 8 dominiert klar die erste, oberhalb pH 9 dagegen die zweite Fraktion. Bei pH = 8,6 sind beide Konfigurationen annähernd gleich stark vertreten. Dieser Zusammenhang wird in Abb. 16 anhand von drei charakteristischen $R(t)$ -Spektren (pH = 7,8(a), 8,5(b) und 9,2(c)) belegt.

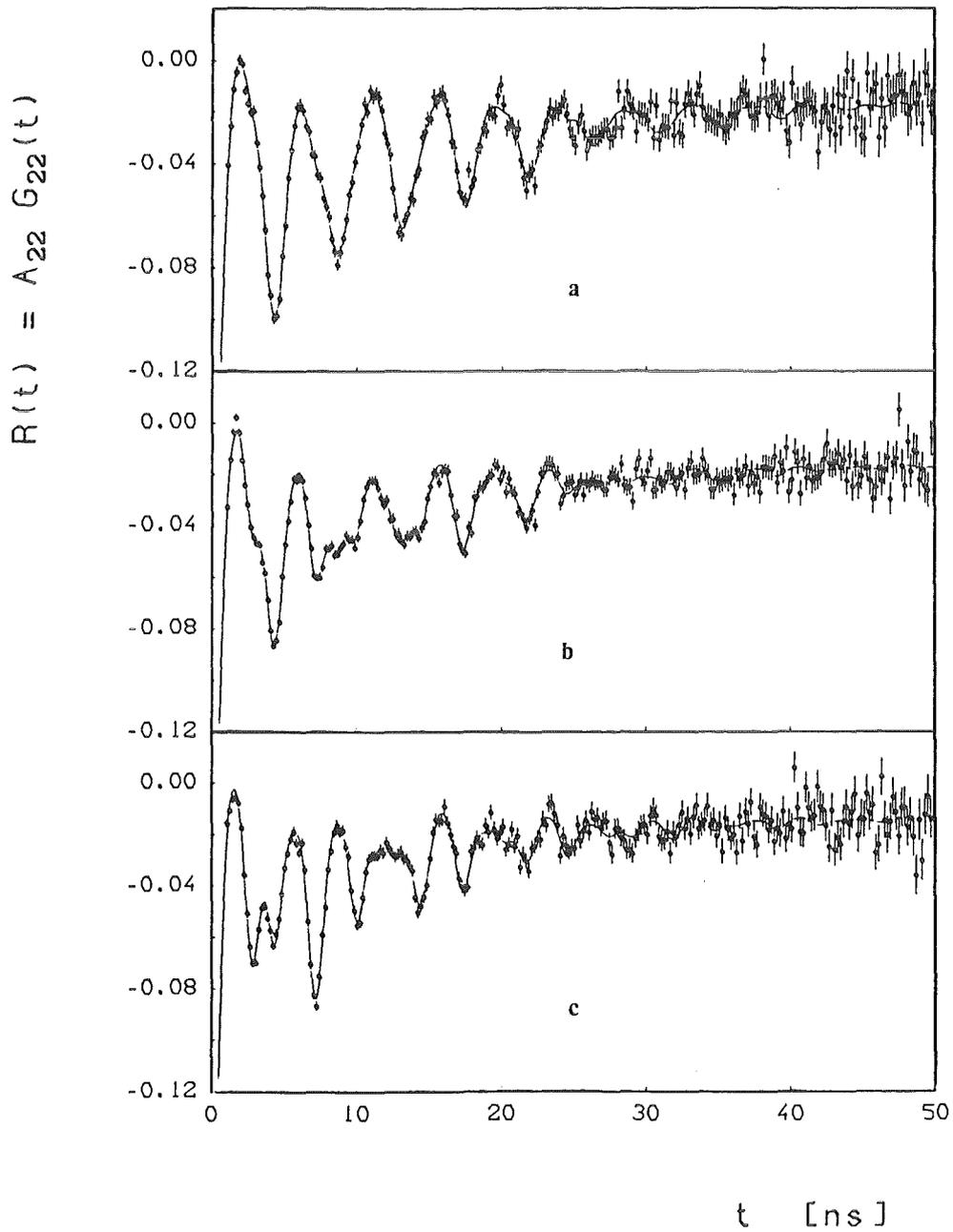


Abb. 16: $R(t)$ -Spektren für menschliches Serum-Transferrin bei verschiedenen pH-Werten

- a) pH = 7,8: $f_1' = 75$ % (Messung Nr. 5 in Tab. 9)
- b) pH = 8,5: $f_1' = 48$ % (Messung Nr.10 in Tab. 9)
- c) pH = 9,2: $f_1' = 15$ % (Messung Nr. 7 in Tab. 9)

6.4. In vitro beladenes Hamsterserum

Aufgrund der aufgezeigten Unterschiede in den Bindungskonfigurationen der Serumtransferrine von Ratte und Mensch stellt sich die Frage, ob grundsätzlich eine Speziesabhängigkeit beobachtet wird, oder ob die Abweichungen singulär für eines der untersuchten Proteine sind. Um diesen Punkt näher zu beleuchten und eine bessere Vorstellung von der möglichen Variationsbreite zu gewinnen, wurden zwei Hamsterserum-Proben nach dem üblichen Verfahren in vitro mit ^{181}Hf beladen. Dabei wurden 3,7 nMol (Probe I) bzw. 4,6 nMol (Probe II) Hafnium eingesetzt. Um genügend Substanz auch für die parallel durchgeführten biochemischen Versuche zur Verfügung zu haben, mußte für jede Probe das Serum von 10 chinesischen Hamstern gemischt werden. Nach den vorliegenden Untersuchungen an der verwendeten Tierkolonie beträgt die Transferrinkonzentration bei dieser Spezies 36,8 nMol oder 2,9 mg pro Milliliter Serum, die Eisensättigung ist mit 79 % sehr hoch /WiSe81/. Damit steht für Hafnium nur eine freie Bindungskapazität von etwa 16 nMol/ml zur Verfügung, so daß bei den beiden Proben Verhältnisse $K = |\text{Hf}| : |\text{UIBC}|$ von 1 : 4,3 bzw. 1 : 3,4 resultierten.

Erste Messungen kurz nach der Präparation ergaben $R(t)$ -Spektren mit den bereits diskutierten, charakteristischen Anteilen (siehe Abb. 17a). Die Quadrupolkopplungsparameter stimmen für beide Proben innerhalb der Fehler überein, die Mittelwerte sind in Tabelle 11 gezeigt. Ein Vergleich mit den Daten für Ratten- (Tabelle 4, 6 und 8) und Humanserum (Tabelle 10) zeigt, daß die Werte denen für Humanserum entsprechen, und sich wie diese klar von den Parametern für Rattenserum unterscheiden. Es muß deshalb geschlossen werden, daß das Serumtransferrin der Ratte innerhalb der hier getroffenen Auswahl eine Sonderstellung einnimmt.

Tabelle 11: Quadrupolkopplungsparameter für in vitro mit ^{181}Hf beladenes Hamsterserum-Transferrin

Bindungs- konfiguration	ν_Q (MHz)	η	δ (%)	λ_2 (MHz)
1	861 ± 6	$0,945 \pm 0,008$	$1,0 \pm 0,4$	} 68 ± 2
2	1440 ± 7	$0,565 \pm 0,008$	0	
3	914 ± 5	0	$13,0 \pm 1,0$	

$$R_0 = - (1,44 \pm 0,11) \%$$

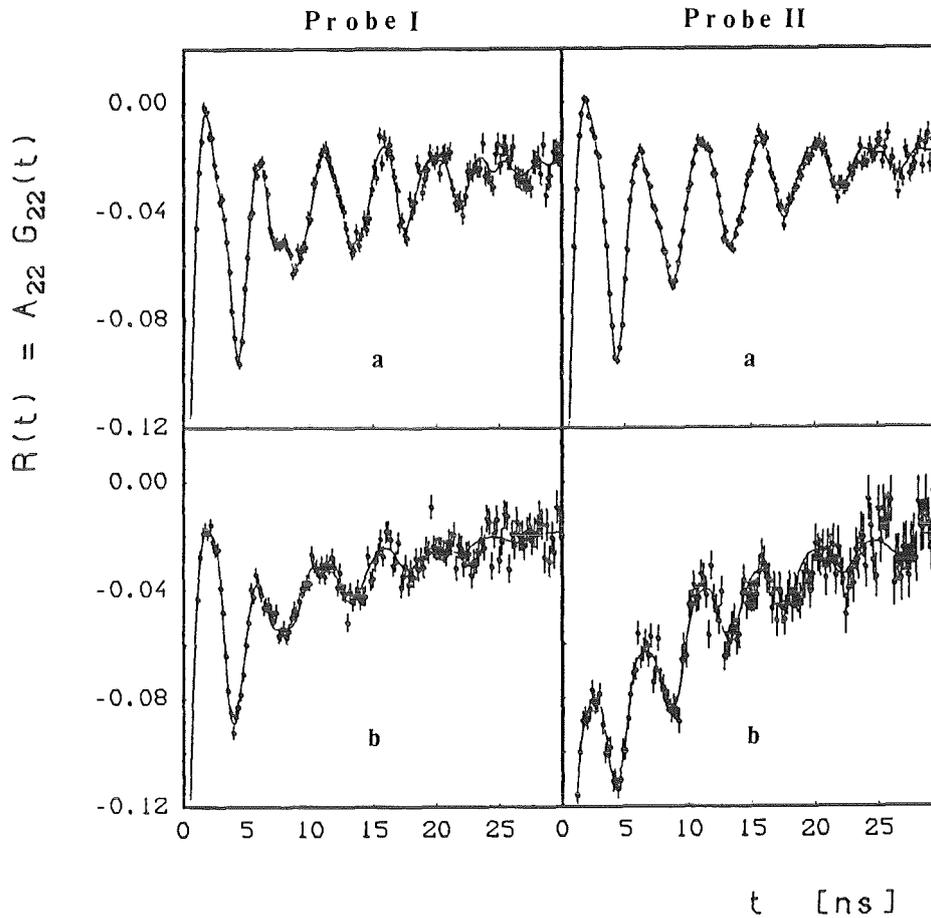


Abb. 17: $R(t)$ -Spektren von zwei Hamsterserum-Transferrin Proben
 a) kurz nach der Präparation
 b) nach 27 Tagen (I) bzw nach 15 Tagen (II)

Während der Anteil der unspezifischen dritten Konfiguration für beide Hamsterserum-Proben etwa gleich ist ($29 \pm 1\%$), ergeben sich für die spezifischen Konfigurationen unterschiedliche Anteile f_1 und f_2 :

$$\text{Probe I: } f_1 = (42 \pm 1)\% \quad f_2 = (23 \pm 1)\%$$

$$\text{Probe II: } f_1 = (50 \pm 1)\% \quad f_2 = (11 \pm 1)\%$$

Diese Unterschiede werden im Zusammenhang mit den jeweils direkt vor den Messungen bestimmten pH-Werten verständlich. Bei Probe I, d.h. bei der niedrigeren Hafniumkonzentration, lag der pH-Wert mit 8,0 höher als bei Probe II, für die pH 7,7 gemessen wurde. Die Anteile folgen also dem stets

beobachteten Trend, daß bei niedrigerem pH-Wert die erste Konfiguration stärker besetzt wird. Die sonst gefundenen Korrelation zwischen pH-Wert und Konzentrationsverhältnis K ist hier allerdings nicht gegeben.

Weitere Aufschlüsse wurden von Messungen längere Zeit nach der Präparation erwartet. Es zeigte sich jedoch, daß die $R(t)$ -Spektren von Probe I nach 27 Tagen und Probe II nach 15 Tagen (Abb. 17b) nicht mehr allein mit den drei charakteristischen Konfigurationen beschrieben werden können. Insbesondere erfordert der Ansatz einen zusätzlichen Relaxationsanteil f_4 . Die zweite Konfiguration ist nicht mehr nachweisbar (d.h. $f_2 < 3\%$), die erste deutlich reduziert ($f_1 = 29 \pm 9\%$ bzw. $24 \pm 2\%$). Auf die dritte Fraktion entfallen unverändert knapp 30 % der Kerne. Der Anteil reiner Relaxation ist in beiden Messungen stark unterschiedlich. Er beträgt für Probe I etwa 6 %, für Probe II dagegen 45 % (siehe Abb. 17b). Die zugehörige Relaxationskonstante $\lambda_2^{(4)}$ liegt in der Größenordnung 100 MHz.

Die abschließende Messung des pH-Werts bei einer Probe ergab den Wert 7,2. Von den vorausgegangenen Untersuchungen her scheint es plausibel, daß bei diesem pH-Wert der zweite Anteil nicht mehr auftritt. Die Tatsache, daß nur noch ein Viertel der Kerne spezifisch gebunden ist, stellt ebenfalls keine Überraschung dar, wurde doch bei Rattenserum unterhalb pH 7 keine spezifische Bindung mehr beobachtet (siehe Kap. 6.2.2). Man muß auch in Betracht ziehen, daß die Mischung des Serums verschiedener Tiere eventuell eine Zersetzung der Serumproteine hervorruft. Das ungewöhnliche Absinken des pH-Wertes ist ein Indiz für chemische Veränderungen in den Proben.

6.5. In vitro beladenes menschliches Apotransferrin

Im Hinblick auf weiterführende Untersuchungen der Metall-Transferrin Bindung unter optimal kontrollierbaren Versuchsbedingungen, das heißt zum Beispiel bei stabilen pH-Werten, wurde auch eine Reihe von Messungen mit kommerziell erhältlichem menschlichen Apotransferrin durchgeführt. Als Ausgangsmaterial diente gefriergetrocknetes Transferrin der Fa. Sigma (München). Die Substanz war vom Hersteller durch mehrere Lösungs- und Trocknungszyklen gereinigt (Reinheitsangabe: $> 90\%$) und eisenfrei gemacht worden war. Erste Beladungsversuche mit Lösungen von Apotransferrin in Wasser oder TRIS-Puffer ließen

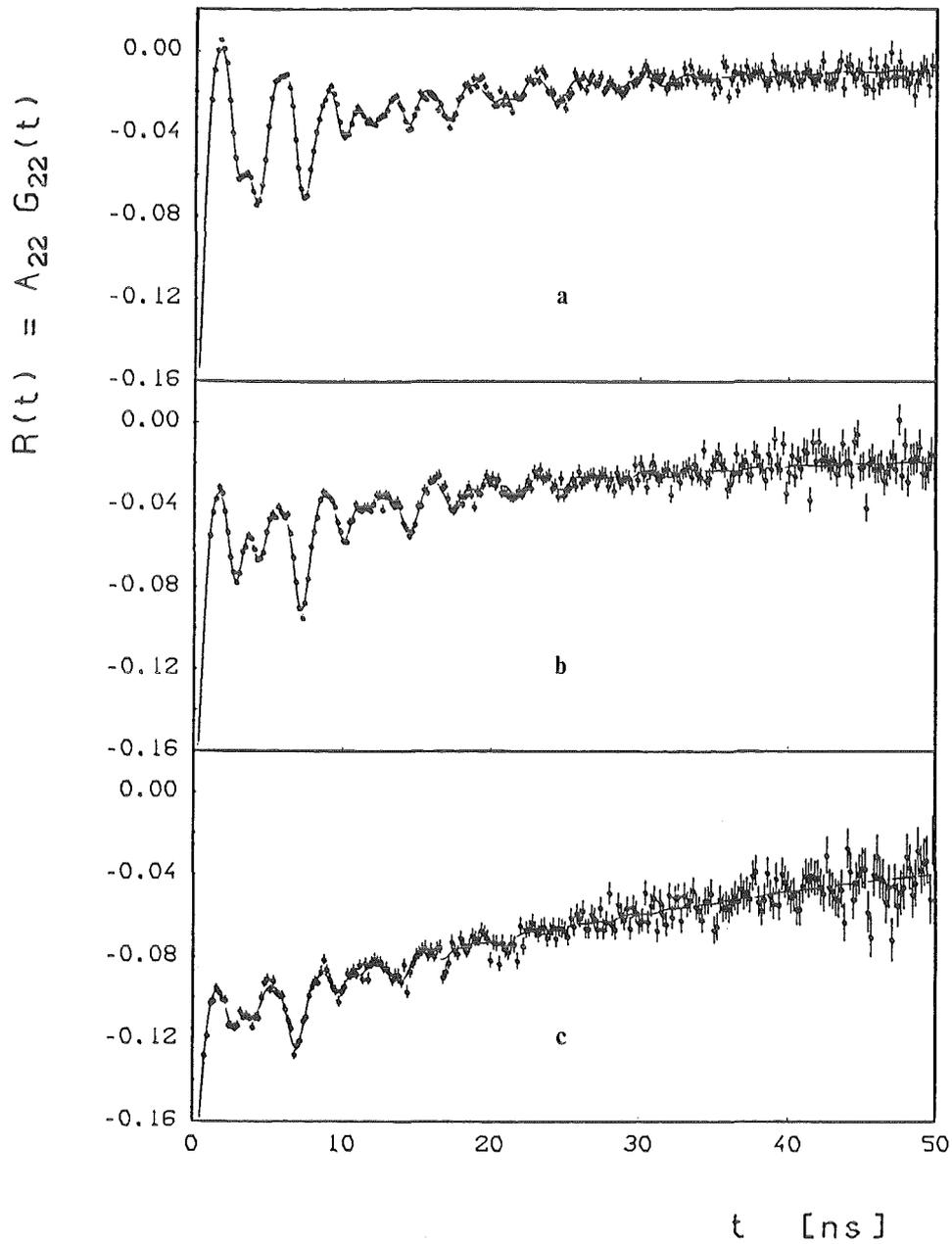


Abb. 18: $R(t)$ -Spektren von drei Apotransferrin-Proben (wässrige Lösungen) präpariert mit 6,9 nMol Hafnium bei pH = 9. Die Anteile der einzelnen Konfigurationen sind:

- | | | | | |
|----|---------------------|---------------------|---------------------|--|
| a) | $f_1 \approx 25 \%$ | $f_2 \approx 45 \%$ | $f_3 \approx 20 \%$ | $f_4 = 0$ |
| b) | $f_1 < 2 \%$ | $f_2 \approx 40 \%$ | $f_3 \approx 35 \%$ | $f_4 \approx 15 \%$, $\lambda_2 \approx 20$ MHz |
| c) | $f_1 < 5 \%$ | $f_2 \approx 15 \%$ | $f_3 \approx 25 \%$ | $f_4 \approx 45 \%$, $\lambda_2 \approx 20$ MHz |

erkennen, daß in diesen Inkubationsmedien eine spezifische Hafnium-Transferrin Bindung nur schwer kontrolliert und reproduzierbar erreicht werden konnte.

Die Ergebnisse von TDPAC-Messungen an Proben, die von den Präparationsbedingungen her identisch sein sollten, zeigten eine große Variationsbreite, insbesondere den Anteil niedermolekular, also nicht an Transferrin, gebundenen Hafniums betreffend. Als Beispiele sind in Abb. 18 drei $R(t)$ -Spektren gezeigt, die an Proben gemessen wurden, die alle mit einer Hafniumkonzentration von 6,9 nMol bei pH 9 präpariert worden waren. Die Auswertung ergibt für diese Messungen unterschiedliche Anteile der bekannten Konfigurationen 1 bis 4 (siehe Abb 18).

Zudem traten zum Teil (quasi-)statische Anteile auf, die auf Ausfällungen von anorganischen Hafniumverbindungen hindeuteten. Obwohl stets auch die spezifischen Konfigurationen der Hafnium-Transferrin Bindung beobachtet wurden (vgl. Abb. 18), schien es angebracht, auf geeignetere, die physiologischen Bedingungen in Serum besser widerspiegelnde Inkubationsmedien auszuweichen.

Als gut geeignet für die Hafnium-Transferrin Präparation erwies sich ein künstliches Serumprodukt der Fa. LKB (München) mit Handelsnamen ULTROSER G. Es besteht aus einer Mischung verschiedener Proteine in Anteilen, wie sie für natürliches Rinderserum typisch sind. Insgesamt enthält ein Gramm der getrockneten Substanz 750 mg Protein, davon etwa 3 mg Eisen-Transferrin. In 10 ml destilliertem Wasser gelöst, erhält man eine phosphat-gepufferte Salzlösung, die normalerweise für Zellkulturen verwendet wird. Für die TDPAC-Messungen wurde jeweils 1 ml dieses künstlichen Serums eingesetzt.

Um zu zeigen, daß Hafnium nicht von irgendwelchen Bestandteilen von ULTROSER gebunden wird, wurde die ^{181}Hf -NTA Lösung zunächst ohne Apotransferrin zur Proteinlösung gegeben ($|\text{Hf}| = 4,6 \text{ nMol/ml}$). Das Ergebnis der TDPAC-Messung ist in Abb. 19a gezeigt. Die Beschreibung ist mit einem reinen Relaxationsansatz möglich. Mit $\lambda_2 = (23 \pm 1) \text{ MHz}$ ergibt sich eine Relaxationskonstante, die in etwa der einer Hf-NTA Lösung entspricht (vgl. Anhang C3). Offensichtlich reicht die Bindungskapazität des vorhandenen Rindserum-Transferrins (0,3 mg/ml) nicht aus, meßbare Mengen von Hafnium zu binden.

Nach Zugabe einer physiologischen Menge Apotransferrin (ca. 3 mg) zu dieser Probe wurde dagegen das quasistatische $R(t)$ -Spektrum von Hafnium-Transferrin beobachtet (siehe Abb. 19b).

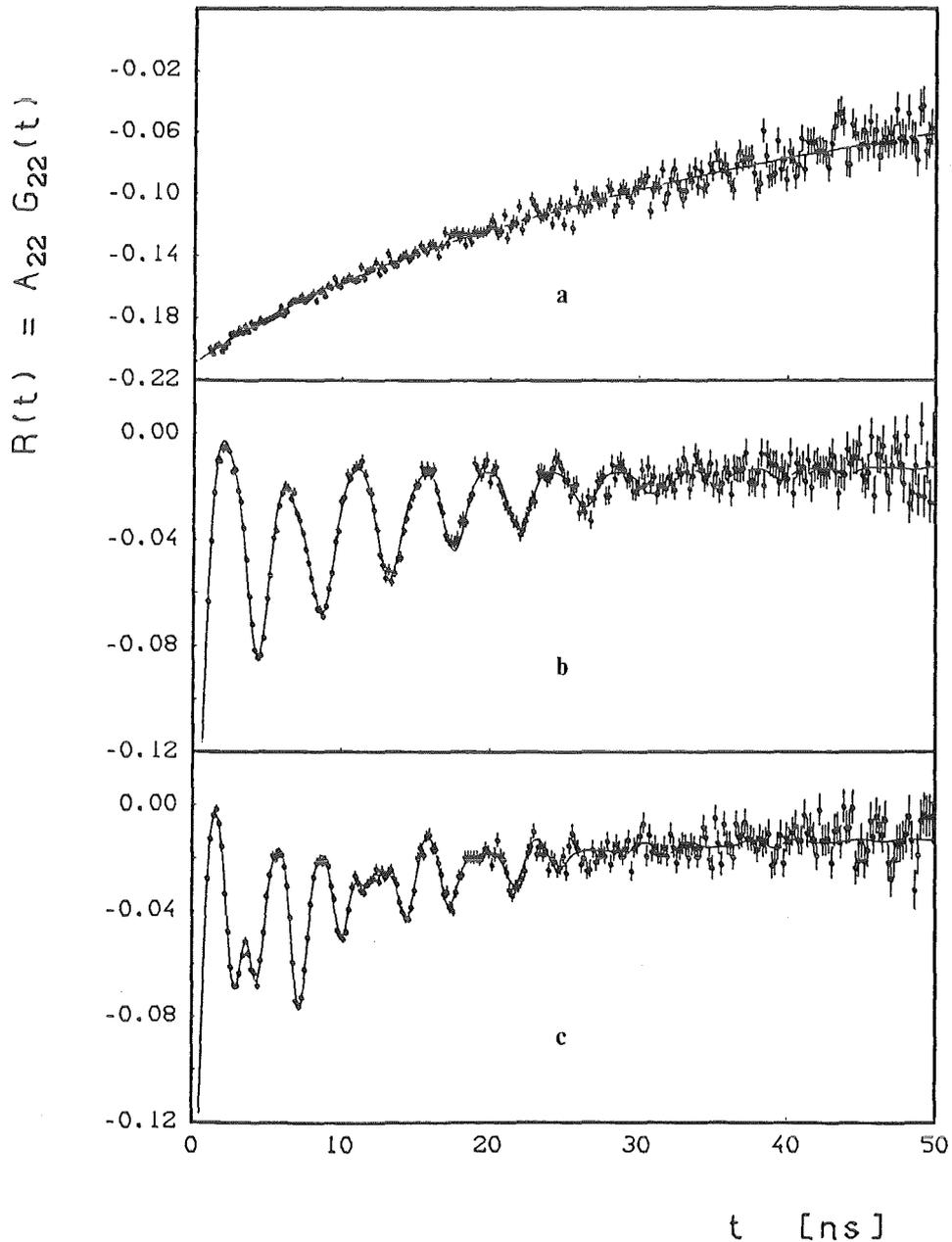


Abb. 19: $R(t)$ -Spektren in einer Lösung von künstlichem Serum (ULTOSER G)
a) 4,6 nmol Hf in Ultrosor ohne Apotransferrin: reine Relaxation
b) 4,6 nmol Hf in Ultrosor +3mg Apotransferrin: $f_1' = 84\%$
c) 6,9 nmol Hf in Ultrosor +3mg Apotransferrin: $f_1' = 12\%$

Die Anteile der spezifischen Bindungskonfigurationen können daraus zu $f_1 = (43 \pm 1) \%$ und $f_2 = (8 \pm 1) \%$ bestimmt werden. Einer unspezifischen Bindung unterliegen immerhin ca. 40 % der Kerne. Bei einer weiteren Probe, die mit höherer Hafniumkonzentration (6,9 nMol/ml) präpariert wurde, wurde ein R(t)-Spektrum gemessen, in dem die zweite Konfiguration deutlich dominiert (Abb. 19c). Die Werte der einzelnen Anteile ergeben sich zu $f_1 = (9 \pm 1) \%$, $f_2 = (65 \pm 1) \%$ und $f_3 = (19 \pm 2) \%$.

Aus diesen und einer Reihe weiterer Messungen, die stets mit dem Modell von drei charakteristischen Quadrupolwechselwirkungen beschrieben werden können, erhält man die Parameter der einzelnen Konfigurationen wieder mit großer Genauigkeit. Die Werte sind in Tabelle 12 zusammengefaßt, sie stimmen mit Ausnahme der Frequenzverbreiterung δ_3 sehr gut mit den Ergebnissen der Untersuchungen an Humanserum überein (vgl. Tab. 10).

Tabelle 12: Quadrupolkopplungsparameter für in vitro mit ^{181}Hf beladenes menschliches Apotransferrin in künstlichem Serum (Ultrosor G)

Bindungs- konfiguration	ν_Q (MHz)	η	δ (%)	λ_2 (MHz)
1	868 ± 4	$0,948 \pm 0,003$	$0,3 \pm 0,2$	} 66 ± 2
2	1434 ± 6	$0,574 \pm 0,005$	0	
3	922 ± 11	0	$21,8 \pm 1,6$	

$$R_0 = - (1,22 \pm 0,08) \%$$

Während jedoch mit Humanserum ein konstanter Wert für den Anteil der unspezifischen Konfiguration gefunden wurde, variiert diese Größe hier von Messung zu Messung stark ($20 \% \leq f_3 \leq 50 \%$). Bei der Präparation mit Apotransferrin ist die Gefahr einer unspezifischen Hafnium-Transferrin Bindung offensichtlich größer als in natürlichem Serum. In diesem Zusammenhang scheint auch die erhöhte Verbreiterung des Feldgradienten der dritten Konfiguration verständlich.

Die TDPAC-Untersuchungen an Apotransferrin beweisen eindeutig, daß sowohl in vivo als auch in vitro mit Serum stets die Bindung von Hafnium an Transferrin beobachtet wurde. Des weiteren erscheint es nun möglich, an Apotransferrin-Systemen spezifischere Untersuchungen zu Konzentrations- und pH-Abhängigkeiten vorzunehmen, als sie mit den relativ komplexen Serumproben möglich waren.

6.6 Getrocknete und gefrorene Proben

Alle bisher geschilderten TDPAC-Messungen wurden an flüssigen Proben, also unter nahezu physiologischen Bedingungen durchgeführt. Durch die Brown'sche Molekularbewegung führen die Transferrinmoleküle in der Flüssigkeit eine Rotationsbewegung durch, d.h. die Richtung der Komponenten des elektrischen Feldgradienten am Ort der Hafniumsondenkerne bezüglich der Detektoren ändert sich zeitlich mit der Rotationskorrelationszeit τ_c . Liegt τ_c in der Größenordnung der mittleren Lebensdauer τ_n der $\gamma\gamma$ -Kaskade, so äußert sich die Rotationsdiffusion als exponentielle Dämpfung in den $R(t)$ -Spektren (siehe Kap. 3.3). Die für Transferrin beobachtete Relaxationskonstante λ_2 liegt bei 60 bis 70 MHz (siehe Kap. 6.1 bis 6.5), entspricht also $\tau_c = 1/\lambda_2 = 15$ ns (langsame Relaxation), und führt dazu, daß die Struktur in den $R(t)$ -Spektren nach 30 ns fast völlig weggedämpft ist. Die Auswertung der Messungen würde erheblich erleichtert, wenn es gelänge, die Relaxation so zu verlangsamen, daß die Dämpfung im relevanten Zeitfenster (ca. 50 ns) verschwindet. Im Prinzip kann das durch Einfrieren oder Trocknen der Probe, indem man also vom flüssigen in den festen Zustand übergeht, erreicht werden ($\tau_c \rightarrow \infty$ und damit $\lambda_2 \rightarrow 0$).

Sowohl an getrockneten, als auch an bei 77 K gefrorenen Rattenserum-Proben, die in vitro bei Raumtemperatur mit ^{181}Hf (ca. 5 nMol/ml) beladen worden waren, wurden TDPAC-Messungen durchgeführt. Entgegen den Erwartungen ergaben sich dabei stets $R(t)$ -Spektren, die zwar frei von Relaxation waren, aber eine extreme Dämpfung aufgrund großer Frequenzverbreiterungen aufwiesen. Die Bindungskonfigurationen sind im festen Zustand offenbar sehr uneinheitlich. Typische $R(t)$ -Spektren sind in Abb. 20 gezeigt, die zugehörigen Fouriertransformationen veranschaulichen die breite Verteilung elektrischer Feldgradienten in den Proben.

Am größten ist die Frequenzverbreiterung δ bei der getrockneten Probe (Abb. 20a). Die Auswertung erfordert zwei Anteile mit gaußförmigen Verbreiterungen $\delta_{1,2} = 36$ %. Da die $R(t)$ -Werte zu größeren Zeiten hin deutlich ansteigen, wird mindestens ein relaxierender Term benötigt. Aufgrund der unspezifischen Struktur ist es jedoch nicht möglich, zu entscheiden, ob alle oder nur ein Teil der Kerne dieser Relaxation unterliegen, und ob es sich um einen Anteil reiner Relaxation oder um eine quasistatische

Störung handelt. Äußerlich erschien die Probe völlig trocken, so daß Brown'sche Bewegung als Ursache für die Relaxation ausgeschlossen werden kann. Statt dessen muß angenommen werden, daß Prozesse innerer Proteindynamik für die Zeitabhängigkeit der Quadrupolwechselwirkung verantwortlich sind.

Demgegenüber wurden im eingefrorenen Zustand bei 77 K $R(t)$ -Spektren ohne Relaxation beobachtet (Abb. 20b und 20c). Die beiden gezeigten Messungen wurden an zwei verschiedenen Proben durchgeführt, die aufgrund der vorausgegangenen TDPAC-Untersuchungen bei Raumtemperatur (RT) ausgewählt wurden.

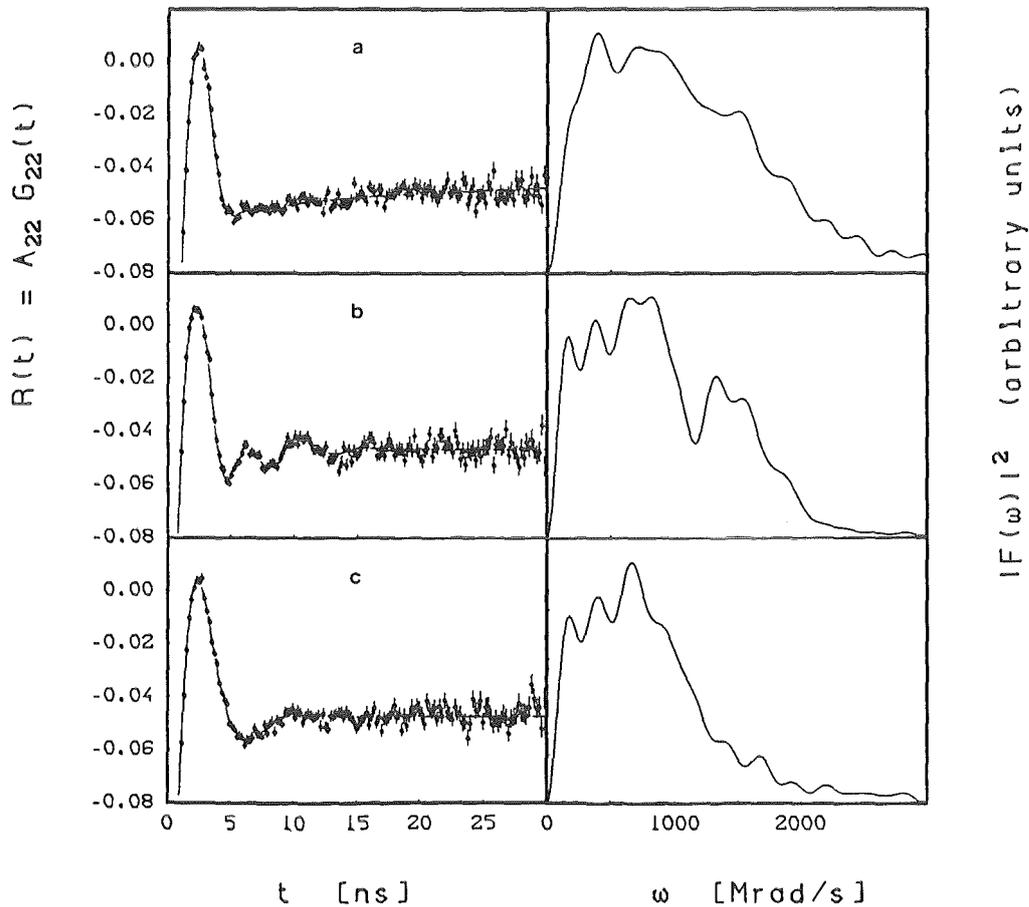


Abb. 20: $R(t)$ -Spektren und zugehörige Fouriertransformationen für getrocknete und gefrorene (77 K) Rattenserum-Transferrin Proben
 a) getrocknete Probe
 b) gefrorene Probe (77 K), f_1' bei Raumtemperatur: 83 %
 c) gefrorene Probe (77 K), f_1' bei Raumtemperatur: 10 %

Während in einem Fall (b) bei RT eine Verteilung auf die beiden spezifischen Konfigurationen (siehe Kap. 6.1 bis 6.5) von $f_1 : f_2 = 5 : 1$ vorlag, war dieses Verhältnis im anderen Fall (c) mit $f_1 : f_2 = 1 : 9$ etwa umgekehrt. Wie insbesondere aus den Fourieranalysen leicht zu erkennen ist, spiegelt sich dieser Unterschied auch bei 77 K wieder. Die Auswertung der $R(t)$ -Spektren liefert wegen der starken Dämpfung freilich weitaus weniger eindeutige Ergebnisse als bei RT. Es scheint, daß bei dominierendem ersten Anteil auch bei 77 K noch ein Teil der Kerne mit den Parametern ν_Q und η dieser Konfiguration beschrieben werden kann (siehe Abb. 20b). Lediglich die zugehörige Frequenzverbreiterung δ (lorentzförmig) ergibt sich mit 17 % erheblich größer als bei RT. Der Rest der Kerne erfährt eine sehr unspezifische Wechselwirkung ($\delta = 25$ %, gaußförmig) mit einer kleineren mittleren Quadrupolfrequenz. Dagegen wurde im Fall der Probe mit nahezu verschwindendem erstem Anteil bei 77 K ein völlig unspezifisches Spektrum beobachtet (Abb. 20c). Die Auswertung ergibt zwei Anteile mit ähnlichen Parametern wie für die getrocknete Probe (Abb. 20a). Die gaußförmigen Frequenzverbreiterungen sind mit ca. 30 % nur wenig kleiner als dort beobachtet.

Es ist zu vermuten, daß die gewählte Parametrisierung der Spektren mit zwei Anteilen großer Frequenzverbreiterung nur eine grobe Näherung darstellt. Schon eine relativ geringe Zahl (5 bis 10) wohldefinierter Konfigurationen mit nahe beieinander liegenden Frequenzen wäre in der Lage, ähnlich stark gedämpfte Spektren zu erzeugen. Ein entsprechender Modellansatz ist jedoch wegen der Vielzahl der unbekanntenen Parameter für die Auswertung der Spektren nicht geeignet.

Nach dem Wiederauftauen der gefrorenen Proben durchgeführte TDPAC-Messungen ergaben $R(t)$ -Spektren, die den ursprünglich bei Raumtemperatur beobachteten entsprachen. Durch den Einfriervorgang werden also keine irreversiblen Veränderungen der Hafnium-Transferrin Bindung induziert. Im gefrorenen Zustand beobachtet man jedoch eine drastisch geänderte Ladungsverteilung in der Umgebung der Sondenkerne. Im Fall der getrockneten Probe wäre noch zu zeigen, ob durch den Trocknungsvorgang nicht irreversible Schäden am Hafnium-Transferrin Komplex verursacht werden. Die Frage nach der Ursache der Unterschiede zwischen getrockneten und gefrorenen Proben muß deshalb vorläufig offen bleiben.

Um zu klären, wie sich der Übergang von den $R(t)$ -Spektren bei Raumtemperatur zu denen bei 77 K vollzieht wurden in der Arbeitsgruppe Messungen bei verschiedenen Temperaturen zwischen 77 und 330 K durchgeführt. Die Ergebnisse /ApDu86/ zeigen, daß einerseits beim Gefrierpunkt (ca. -5°C) selbst eine dramatische Änderung auftritt, daß andererseits aber auch im flüssigen ($-5^{\circ}\text{C} < T < 50^{\circ}\text{C}$) und festen ($T < -5^{\circ}\text{C}$) Zustand noch kontinuierliche Veränderungen ablaufen.

7. Diskussion der Ergebnisse

Nachdem biochemische Untersuchungen zweifelsfrei ergeben hatten, daß auch das Übergangsmetall Hafnium quantitativ an Transferrin bindet, konnte die Metall-Protein Bindung in Human-, Ratten- und Hamsterserum sowie in Apotransferrin-Lösungen unter verschiedenen chemischen Bedingungen spektroskopisch charakterisiert werden. Die Wechselwirkung des elektrischen Quadrupolmoments der ^{181}Hf -Sondenkerne mit der Ladungsverteilung der unmittelbaren Umgebung erzeugt wohldefinierte Signale, die mit den üblichen Größen ν_Q , η , δ und λ_2 parametrisiert werden. Die gewonnenen Daten werden im folgenden in Bezug auf die eingangs erläuterten Fragestellungen diskutiert.

7.1. Charakterisierung der Hafnium-Transferrin Bindung

Bei allen TDPAC-Messungen werden drei Anteile von Sondenkernen beobachtet, die sich mit dem Modell quasistatischer Wechselwirkung beschreiben lassen. Die einzelnen Bindungskonfigurationen unterscheiden sich deutlich in den Quadrupolkopplungskonstanten und Asymmetrieparametern. Dagegen erlaubt die Auswertung keine Entscheidung, ob die zugehörigen Relaxationskonstanten alle den gleichen oder drei verschiedene Werte haben. Aufgrund der jeweils gefundenen Frequenzverbreiterungen müssen die beiden ersten Anteile als sehr spezifisch, der dritte dagegen als vergleichsweise schlecht definiert bezeichnet werden.

7.1.1. Spezifische Bindung

Mit einer relativen Frequenzverbreiterung von ca. 1 % entsprechen der erste und zweite Anteil sehr einheitlichen Bindungskonfigurationen, wie sie normalerweise in hochreinen, kristallinen Hafniumverbindungen beobachtet werden. Daraus darf man folgern, daß sich die Anordnung der Liganden um die Hafniumionen in diesen Konfigurationen von Transferrinmolekül zu Transferrinmolekül nur geringfügig unterscheidet. Dies entspricht der Erwartung für spezifisch an den beiden Metallbindungsplätzen von Transferrin gebundene Hafniumionen. Eine solche Interpretation wird durch die Tatsache unterstützt, daß beide Bindungskonfigurationen sowohl bei den in vivo und in vitro Präparationen mit

Serum als auch mit Apotransferrin beobachtet werden. Da zudem in vivo verschiedene Hafniumchelatkomplexe (NTA, Oxalat und Citrat) eingesetzt wurden, stets jedoch die gleichen Aufspaltungsparameter gemessen wurden, muß geschlossen werden, daß in allen Fällen das gleiche Anion den synergistischen Bindungsplatz zwischen Metallion und Transferrin einnimmt. Dabei kann es sich nur um Carbonat bzw. Bicarbonat handeln, das in allen Proben in ausreichender Konzentration vorhanden war.

Der Asymmetrieparameter der ersten Konfiguration liegt nahe bei Eins. Das bedeutet, daß die Komponenten V_{zz} (siehe Gleichung 3/4) und $V_{yy} = -(1+\eta)/2 V_{zz}$ des elektrischen Feldgradienten betragsmäßig annähernd gleich sind, während die Komponente $V_{xx} = -(1-\eta)/2 V_{zz}$ fast verschwindet (vgl. Tabelle 13). Die Ladungsverteilung der Hafniumumgebung erzeugt also ein elektrisches Feld, das in der yz-Ebene sehr inhomogen, senkrecht dazu aber nahezu homogen ist. Eine solche Verteilung elektrischer Feldgradienten tritt in ähnlicher Form z.B. auch in $\text{HfF}_4 \cdot \text{HF} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und $\text{HfOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ auf (siehe Anhang C2 und C6). Es wird vermutet, daß $\eta = 1$ typisch für achtfache Koordination von Hafnium in einer D_2 - quadratisch-antiprismatischen Struktur ist /Adlo78, BoBa84/.

Die zweite Konfiguration weist eine fast doppelt so große Quadrupolkopplungskonstante und eine deutlich geringere Asymmetrie ($\eta \approx 0,55$) auf. Asymmetrieparameter dieser Größenordnung werden in einer Reihe von Hafniumverbindungen beobachtet. Im einzelnen handelt es sich dabei z.B. um Hafniumsulfat /KoMa80/, Hafniumtropolonat /BaBo78/, verschiedene Alkalimetall-Oxalatohafniate /VuBa78/ und Hafniumoxychlorid mit 4 Wassermolekülen /ZmLo72/ (vgl. auch Anhang C6). In diesen Verbindungen ist das Hafniumion dodecaedrisch von acht Sauerstoffatomen umgeben. Daß eine ähnliche Anordnung auch der Bindung von Hafnium an Transferrin in der zweiten Bindungskonfiguration entspricht, wäre durchaus denkbar.

Da das Hf^{4+} - Ion (Elektronenkonfiguration d^0) relativ groß, stark geladen und kugelförmig ist und keine teilgefüllten Schalen aufweist, zeigt es keine stereochemischen Präferenzen /CoWi80/ und tendiert zu hohen Koordinationszahlen. In wässrigen Medien und in Gegenwart von stark elektronegativen Donatoren, wie O^{2-} , OH^- und H_2O , oder mehrzähligen Gruppen wird fast ausschließlich eine achtfache Koordination verwirklicht /BrTh73/. Man muß deshalb davon ausgehen, und die mit TDPAC gefundenen Asymmetrieparameter bestätigen dies, daß Hafnium auch in den beiden spezifischen Bindungs-

konfigurationen von Transferrin achtfach koordiniert ist. Das unterscheidet dieses Metall von Eisen, für das aufgrund von EXAFS (Extended X-Ray Absorption Fine Structure)-Messungen (siehe z.B. /LiBa86/) eine sechs- oder siebenfache Koordination bei der Transferrinbindung postuliert wird /RoSc84/. Jüngste Untersuchungen mit dieser Methode /GaEv86/ favorisieren die sechsfache Koordination. Bei den Eisenliganden könnte es sich um vier Sauerstoff- und zwei Stickstoffatome handeln, die von Carbonat oder Bicarbonat, je zwei Tyrosin- und Histidinresiduen und einem Wassermolekül oder einer OH-Gruppe stammen. Es scheint auch denkbar, daß zumindest in einem der beiden Bindungsplätze nur ein oder gar kein Stickstoff koordiniert ist, also fünf bzw. sechs Sauerstoffatome direkt an das Metall binden.

Es liegt nahe anzunehmen, daß die beiden zusätzlichen Plätze in der Koordinationsschale des Metallions bei der Hafnium-Transferrin Bindung von weiteren Wassermolekülen und/oder OH-Gruppen eingenommen werden. Die beobachteten Unterschiede in den Quadrupolaufspaltungen der spezifischen Bindungskonfigurationen von Hafnium-Transferrin können damit verschiedene Ursachen haben:

- Bindung von Bicarbonat oder Carbonat
- Bindung von H_2O oder OH^- in einer oder auch mehreren Koordinationsstellen
- Bindung an unterschiedliche Zahl von Tyrosin- und Histidinresiduen

Alle genannten Ersetzungen stellen drastische Änderungen der Ladungsverteilung um das Metallion dar und würden die stark unterschiedlichen Kopplungsparameter erklären. Andererseits wurde bei Untersuchungen an anorganischen Hafniumverbindungen aufgezeigt, daß auch geringe Abstandsänderungen ausreichen, Symmetrie und Größe des elektrischen Feldgradienten stark zu beeinflussen /BaBo79/. Aufgrund der Komplexität der Stereochemie von achtfach koordinierten Hafniumionen lassen sich deshalb vorläufig keine konkreten Schlüsse auf die Natur und Anordnung der Liganden in Hafnium-Transferrin ziehen.

Die Präzision, mit der die beiden spezifischen Bindungskonfigurationen von Transferrin bei den vorliegenden TDPAC-Messungen mit ^{181}Hf charakterisiert werden können, wird deutlich, wenn man die Ergebnisse mit denen aus TDPAC-Untersuchungen an ^{111}In -Transferrin /MaSk78, SmLu84, LuSm85/ vergleicht.

Mit ^{111}In -Transferrin-Proben werden nur sehr unspezifische $R(t)$ -Spektren beobachtet, deren Auswertung und Parametrisierung wenig konkrete Resultate liefert. Es können offensichtlich gleichermaßen eine oder zwei Bindungskonfigurationen zugrundegelegt werden. Es ergeben sich dann Quadrupolkopplungskonstanten zwischen 20 und 90 MHz, die durchwegs mit großen Fehlern behaftet sind. Nur in einer Arbeit /SmLu84/ werden Asymmetrieparameter angegeben. Je nachdem, ob ein oder zwei Anteile angenommen werden, finden die Autoren $\eta \approx 0,55$ ($\nu_Q \approx 50$ MHz) bzw. $\eta_1 \approx 0,3$ ($\nu_Q \approx 90$ MHz) und $\eta_2 \approx 0,4$ ($\nu_Q \approx 25$ MHz). Außerdem wird stets darauf verzichtet eine endliche Frequenzverbreiterung δ einzubeziehen, so daß die zum Teil bestimmten Relaxationskonstanten die gesamte Dämpfung beschreiben und auf unzuverlässige Korrelationszeiten führen. Messungen im gefrorenen Zustand /SmLu84/ liefern im Gegensatz zu den hier berichteten Ergebnissen ausgeprägtere Spektren mit höheren Kopplungskonstanten als bei Raumtemperatur. Eine Bewertung der Untersuchungen mit ^{111}In muß eine Reihe von Gesichtspunkten berücksichtigen:

- Die TDPAC-Messungen wurden mit Apotransferrin in wässrigen Medien oder in einfachen Puffersystemen durchgeführt. Aufgrund der gewonnenen Erfahrungen ist bekannt, daß unter solchen Bedingungen eine kontrollierte und reproduzierbare Bindung des Metalls an Transferrin nur mit größerem präparativen Aufwand erreicht werden kann.
- Nimmt man an, daß der Feldgradient, der von der Umgebung der Metallionen erzeugt wird, in ^{111}In - und ^{181}Hf -Transferrin in der gleichen Größenordnung liegt, so ergibt sich für ^{111}In wegen des kleineren Quadrupolmoments (ca. 0,77 b /RaRa73/) und des reduzierten Sternheimer'schen Abschirmfaktors (-29 /FeJo69/ statt -61 bei ^{181}Hf /JaSa81/) theoretisch eine Kopplungskonstante, die etwa einen Faktor 7 kleiner ist als bei ^{181}Hf . Das Produkt $\omega_Q \tau_c$ liegt dann bei 1, man befindet sich also im Übergangsbereich zwischen langsamer und schneller Relaxation. Die $R(t)$ -Spektren sind in diesem Fall stark gedämpft und können nur schwer parametrisiert werden. In der Tat spiegeln die ermittelten Werte für ω_Q und τ_c in /MaSk78/ und /LuSm85/ genau diese Situation wieder ($0,5 \lesssim \omega_Q \tau_c \lesssim 6$).
- Ein generelles Problem bei TDPAC-Untersuchungen mit ^{111}In an nichtmetallischen Substanzen stellen die sogenannten Aftereffekte dar (siehe z.B. /Thun71/). Nach dem Elektroneneinfangprozess ($^{111}\text{In} \xrightarrow{\text{EC}} ^{111}\text{Cd}$) ist zunächst ein Loch in einer inneren Elektronenschale vorhanden, das je nach Verfügbarkeit von freien Elektronen mehr oder weniger schnell aufgefüllt wird. Da das Ausgangsniveau der $\gamma\gamma$ -Kaskade in ^{111}Cd eine Halbwertszeit

von nur 120 ps besitzt, können die Reorganisationsprozesse noch während der Lebensdauer des Zwischenzustands stattfinden und einen zeitabhängigen elektrischen Feldgradienten bewirken, der die ansonst statische Korrelation vollständig auslöscht. Dieser Effekt wird z.B. im Isolator CdCl_2 beobachtet /BaBö82/. Da auch in Transferrin freie Ladungsträger nicht beliebig zur Verfügung stehen, ist anzunehmen, daß die $R(t)$ -Spektren von ^{111}In -Transferrin von den elektronischen Reorganisationsprozessen stark beeinträchtigt werden.

Insbesondere die beiden letzten Punkte lassen ^{111}In als Sondenkern für Untersuchungen an Transferrin prinzipiell als schlecht geeignet erscheinen, und erklären die wenig spezifischen Ergebnisse solcher TDPAC-Messungen. Bei ^{181}Hf , das die $\gamma\gamma$ -Kaskade durch β^- -Zerfall bevölkert und eine etwa 7-mal stärkere Kopplung an elektrische Feldgradienten aufweist, liegen die Verhältnisse dagegen viel günstiger. Man befindet sich im Bereich langsamer Relaxation, Aftereffekte nach dem β^- -Zerfall sind nahezu ausgeschlossen, so daß die elektrischen Feldgradienten der spezifischen Metallbindungsplätze von Transferrin mit großer Genauigkeit bestimmt werden können.

7.1.2. Unspezifische Bindung

Mit Ausnahme der Apotransferrin-Proben und einigen Messungen bei sehr hohen oder niedrigen pH-Werten finden sich stets etwa zwei Drittel der Hafniumkerne in den oben beschriebenen spezifischen Bindungskonfigurationen. Weitere 20 % bis 30 % entfallen auf einen dritten Anteil, dessen Frequenzverbreiterung mit 8 % bis bis 15 % relativ groß ist und keine verlässliche Bestimmung des zugehörigen Asymmetrieparameters erlaubt. Darüber hinaus ergibt sich eine deutliche negative R_0 -Verschiebung von etwa 1,2 %. Zunächst soll der Ursprung dieses konstanten Beitrags zur Anisotropie diskutiert werden.

Ungenauigkeiten bei der Zeitnull- und Untergrundsbestimmung scheiden als alleinige Ursache aus. Nach pessimistischsten Abschätzungen unter Berücksichtigung der speziellen Gegebenheiten bei der Datenaufnahme (geringer Untergrund, Zeiteichung 0,1 ns pro Kanal) und -auswertung (nur sehr kleine Zeitnullverschiebungen in den Einzelspektren) dürfte R_0 keinesfalls größer als ca. 0,5 % werden. Da systematische Fehler nicht zu erwarten sind, müßten die Einzelwerte außerdem statistisch um Null verteilt sein. Nimmt man an,

daß eine starke, uneinheitliche Wechselwirkung für die Verschiebung verantwortlich ist, kann der Anteil der Kerne abgeschätzt werden. Eine Verschiebung von -1,2 % erfordert mindestens 38 % der gesamten Sondenkerne. Da die Summe aller Anteile $f_1+f_2+f_3+f(R_0)$ damit weit über 100 % liegt, kann auch diese Möglichkeit ausgeschlossen werden. Geht man dagegen davon aus, daß ein Teil der Kerne keinen elektrischen Feldgradienten sieht, so ist deren Anteil durch R_0/A_{22}^{eff} gegeben. Mit etwa 5 % ergibt sich dann ein durchaus plausibler Wert. Es ist auch vorstellbar, daß ein Teil der R_0 -Verschiebung auf Unzulänglichkeiten der gewählten Beschreibung der Relaxationseffekte zurückzuführen ist. Diese Problematik soll bei der Diskussion des Relaxationsverhaltens später noch erläutert werden.

Die Zuordnung der dritten, stark verbreiterten Konfiguration muß ebenfalls mehrere Möglichkeiten berücksichtigen. Zunächst scheint es naheliegend, damit Hafniumkerne zu identifizieren, die nicht oder zumindest nicht spezifisch an Transferrin gebunden sind. Der hohe Anteil dieser Fraktion (20 bis 30 %) steht aber dann im Widerspruch zu den biochemischen Untersuchungen, die zeigen, daß Hafnium zu mehr als 90 % spezifisch an Transferrin gebunden wird. Diese Diskrepanz ist nur verständlich, wenn man annimmt, daß ein relativ hoher Prozentsatz der spezifischen Plätze in der Lage ist, eine abweichende, uneinheitliche Konfiguration einzunehmen. Eine Erklärung für solche 'anormalen' Sondenkernumgebungen wurde von Boyer et al. /BoBa84/ zur Interpretation ähnlicher, unspezifischer Anteile in TDPAC-Messungen an einer Vielzahl von Hafniumchelatkomplexen vorgeschlagen. Sie basiert im wesentlichen auf möglichen physikalisch-chemischen Folgeprozessen des β^- -Zerfalls von ^{181}Hf zu ^{181}Ta . Obwohl die maximale Rückstoßenergie des Kerns mit 1,6 eV nicht ausreicht, chemische Bindungen aufzubrechen, könnten Moleküle dadurch in metastabile Zustände angehoben werden, indem z.B. spezifische Vibrationsmoden angeregt werden. Solche Konfigurationsänderungen sind insbesondere in hochkoordinierten Komplexen denkbar, bei denen die Bindungsenergien verschiedener Stereoisomere nahe beieinander liegen. Zum anderen könnten auch Elektronen Shake-off Prozesse, deren Wahrscheinlichkeit als Folge des β^- -Zerfalls in freien Atomen bei 20 bis 30 % liegt /CaNe68/, veränderte, uneinheitliche Sondenkernumgebungen erzeugen /BoBa84/. Im Fall der Hafnium-Transferrin Bindung würde das bedeuten, daß zwar fast alle Hafniumionen in sehr gut definierten Konfigurationen gebunden werden, die Umgebung aber zum Teil durch den β^- -Zerfall gestört wird.

Bei den Apotransferrin-Proben wurden stark unterschiedliche Anteile der dritten Konfiguration von bis zu 50 % beobachtet. Zumindest in diesen Messungen muß ein Beitrag nicht oder nicht-spezifisch an Transferrin gebundener Hafniumionen vermutet werden. Da die Frequenzverbreiterung δ_3 bei den Untersuchungen an Apotransferrin mit 22 % weitaus höher liegt als bei den Serumproben, deckt diese Konfiguration in der Tat eine größere Variationsbreite des elektrischen Feldgradienten ab.

7.1.3. Relaxationsverhalten

Die beobachteten Feldgradienten in Transferrin sind nicht statisch, sondern zeigen eine deutliche Zeitabhängigkeit, die durch einen quasistatischen Relaxationsansatz berücksichtigt werden kann. Nimmt man an, daß alle Konfigurationen der gleichen Dynamik unterliegen, ergeben sich bei den einzelnen Messreihen Relaxationskonstanten λ_2 zwischen 59 und 68 MHz. Die Werte für Rattenserum-Transferrin liegen signifikant niedriger als diejenigen für Human- und Hamsterserum-Transferrin. Da diese Unterschiede für eine prinzipielle Interpretation des Relaxationsverhaltens nicht relevant sind, wird im folgenden ein typischer Wert $\lambda_2 = 64$ MHz zugrundegelegt.

Nach dem Modell langsamer Relaxation ergibt sich daraus eine Korrelationszeit $\tau_c = 1/\lambda_2$ von etwa 16 ns. Das Produkt $\omega_0 \tau_c$ für die einzelnen Anteile liegt dann zwischen 13 und 22, so daß die Annahme langsamer Relaxation durchaus gerechtfertigt erscheint. Messungen zur Temperaturabhängigkeit ergaben eindeutig, daß λ_2 proportional zu T ist /ApDu86/. Da aber τ_c mit $1/kT$ geht, muß $\lambda_2 = 1/\tau_c$ gelten, d.h. man befindet sich tatsächlich im Grenzfall langsamer Relaxation. Allerdings ist nicht auszuschließen, daß bei Raumtemperatur bereits gewisse Abweichungen vom verwendeten Modell auftreten, da $\omega_0 \tau_c$ noch nicht allzu groß ist. Unter anderem erwartet man in der Nähe des Übergangsbereiches eine zunehmende konstante Verschiebung der R(t)-Spektren /BoSp74/. Die endlichen Werte von R_0 könnten zum Teil auch auf solche Effekte zurückzuführen sein.

Nach dem Debye-Modell kann die Rotationskorrelationszeit τ_R von Transferrin in Serum abgeschätzt werden (siehe Kap. 3.5). Mit den Literaturwerten für das Volumen eines Moleküles $V = 169 \cdot 10^{-27} \text{ m}^3$ /Aise80/ und für die Viskosität

von Serum $\tilde{\eta} = 1,7 \cdot 10^{-3}$ kg/ms /Oser65/ erhält man bei Raumtemperatur (295 K):

$$\tau_R = \frac{V\tilde{\eta}}{kT} = 71 \text{ ns}$$

Abweichungen von der Kugelgestalt führen bei gleichbleibendem Volumen zu größeren Rotationskorrelationszeiten. Berücksichtigt man, daß Transferrin in erster Näherung ein langgestrecktes Ellipsoid mit einem Achsenverhältnis von etwa 2 : 1 ist /Aise80/, so ergibt sich nach Perrin /Perr34/:

$$\tau_R = 1,08 \tau_R(\text{Kugel}) = 77 \text{ ns}$$

Vergleicht man diesen Wert mit der gemessenen Korrelationszeit $\tau_c = 16$ ns aus den TDPAC-Messungen, so stellt man eine große Diskrepanz fest. Es muß geschlossen werden, daß das beobachtete Relaxationsverhalten mit idealer Rotationsdiffusion des Gesamtmoleküls allein nicht erklärt werden kann. Einen Ausweg böte die Annahme, daß Untereinheiten des Transferrinmoleküls mit einem Fünftel des Gesamtvolumens, in denen die Sondenkerne gebunden sind, nur schwach an den Rest des Moleküls gekoppelt sind und sich praktisch frei in der Lösung bewegen können. Da die Tertiärstruktur von Transferrin aber nur aus zwei räumlich getrennten, etwa gleich großen Bereichen besteht, erscheint diese Möglichkeit nicht sehr plausibel.

In der Literatur wird auch versucht, bei der Berechnung von Rotationszeiten die speziellen Reibungsverhältnisse zwischen Partikeloberfläche und Lösungsmittel zu berücksichtigen. Rein formal modifiziert man dazu die Debye-Beziehung, indem man einen Korrekturfaktor K einführt, der es gestattet, berechnete und gemessene Korrelationszeiten aneinander anzupassen /BaBo81/:

$$\tau_c = \frac{V\tilde{\eta}}{kT} K \quad \text{mit } 0 \leq K \leq 1$$

Für Hafnium-Transferrin erhält man mit $K = 0,2$ einen sehr kleinen Wert. Im Grunde führt man dabei wieder ein effektives Volumen $V_{\text{eff}} = K \cdot V$ oder eine effektive Viskosität $\tilde{\eta}_{\text{eff}} = K \cdot \tilde{\eta}$ ein. Wenn eine solche Interpretation auch nicht ganz von der Hand zu weisen ist, scheint die Einführung eines zusätzlichen empirischen Parameters, dessen spezieller Wert nur schwer zu deuten ist (vgl. /BaBo81/), im vorliegenden Fall doch wenig hilfreich.

Eine plausiblere Erklärung der kleinen gemessenen Korrelationszeiten basiert auf der Annahme von zusätzlich zur Rotationsdiffusion vorhandenen Relaxationseffekten. Die Relaxationskonstante würde sich dann aus zwei Anteilen zusammensetzen:

$$\lambda_2 = \lambda_R + \lambda_X$$

Dabei ist λ_R auf die Brown'sche Bewegung zurückzuführen, λ_X beschreibt die unbekannte Relaxation. Mit $\lambda_2 = 64$ MHz und $\lambda_R = 1/\tau_R = 13$ MHz erhält man:

$$\lambda_X = 51 \text{ MHz}$$

Nimmt man an, daß auch diese zusätzliche Relaxation langsam ist, ergibt sich daraus eine Korrelationszeit $\tau_X = 20$ ns. Handelt es sich dagegen um schnelle Relaxation liefert eine grobe Abschätzung mit $\omega_Q = 200$ MHz eine charakteristische Zeit $\tau_X = \lambda_X / (100,8\omega_Q^2) = 10$ ps.

Nach McCammon und Karplus /McKa80/ laufen Prozesse innerer Proteindynamik in einer Zeitskala von ca. 10^{-7} bis 10^{-14} Sekunden ab. Ähnliches gilt für die Wechselwirkung mit Bestandteilen des Lösungsmittels durch Stöße, Anlagerung und Abspaltung polarer Moleküle. Beide Effekte sind so in der Lage, einen zeitlich veränderlichen elektrischen Feldgradienten am Ort der Hafniumkerne mit den oben postulierten Relaxationszeiten zu erzeugen. Die Messungen knapp unterhalb des Gefrierpunkts der Serumproben zeigen auf, daß auch im gefrorenen Zustand noch dynamische Prozesse ablaufen /ApDu86/. Da Brown'sche Bewegung dort ausgeschlossen ist und das beobachtete Relaxationsverhalten typisch für den Übergangsbereich zwischen langsamen und schnellen Fluktuationen ist, muß geschlossen werden, daß es sich dabei um innere Proteindynamik handelt. Die zusätzliche Relaxation bei Raumtemperatur rührt folglich von schnellen Prozessen mit einer Korrelationszeit von ca. 10 Picosekunden her. Als Ursache kommen Übergänge zwischen energetisch nahe beieinanderliegenden Konformationszuständen in Frage, die in typischen Zeiten von 10^{-9} bis 10^{-12} Sekunden ablaufen /McKa80/.

Diese Hypothese wird durch die TDPAC-Messungen bei 77 K weiter gestützt. Die dort beobachteten rein statischen Spektren sind durch breite Verteilungen elektrischer Feldgradienten gekennzeichnet. Da nach dem Auftauen sofort wieder die üblichen $R(t)$ -Spektren auftreten, kann dies kaum auf ein Aufbrechen der Hafnium-Transferrin Bindung zurückzuführen sein. Statt dessen liegt die

Vermutung nahe, daß die Hafniumionen in unterschiedlichen Konformationen eingefroren werden, da aufgrund der geringen thermischen Energie bei tiefen Temperaturen keine Übergänge zwischen den einzelnen Unterzuständen möglich sind. Bei Raumtemperatur dagegen gehen die 'conformational substates' /HaPa82/ so schnell ineinander über, daß ein mittlerer Feldgradient beobachtet wird, der sehr scharf definiert ist ('motional narrowing').

Proben, die bei Raumtemperatur aufgrund unterschiedlicher Anteile der spezifischen Konfigurationen völlig verschiedene Spektren zeigen, sind bei 77 K kaum noch zu unterscheiden. Es ergeben sich ganz andere Quadrupolkopplungsparameter. Lediglich der erste Anteil scheint in stark verbreiteter Form teilweise erhalten zu bleiben. Die Tieftemperaturmessungen allein wären kaum ausreichend, verschiedene Bindungskonfigurationen von Hafnium in Transferrin aufzuzeigen und quantitativ zu charakterisieren. Ähnlich ist die Situation bei ESR-Untersuchungen an Transferrin, die meist bei 77 K durchgeführt werden. Aus den Spektren kann zwar geschlossen werden, daß z.B. Eisen in zwei verschiedenen Konfigurationen gebunden sein muß /Aasa72/, die Anteile zu bestimmen, scheint aber kaum möglich. Ebenso wenig kann die jeweils zugrundeliegende Wechselwirkung physikalisch eindeutig parametrisiert werden. Durch gezielte Einzelbeladung der beiden Plätze wurden die ESR-Spektren der Bindungsstellen im N- bzw. im C-Terminal in Reinform gewonnen /AiLe78/. Sie unterscheiden sich nur ähnlich subtil, wie die bei 77 K gemessenen TDPAC-Spektren von Hafnium-Transferrinproben mit Bevorzugung der ersten bzw. zweiten spezifischen Bindungskonfiguration. ESR-Messungen mit anderen Metallionen (siehe z.B. /CaCh80/ und /ZwAi79/) liefern vergleichbare Resultate. Mößbauer-Untersuchungen mit ^{57}Fe bei tiefen Temperaturen finden keinerlei Hinweise auf verschiedene Bindungskonfigurationen /SpOo73, TsBo73, TsBo76/. Dabei muß auch berücksichtigt werden, daß aus Mößbauer-Messungen mit ^{57}Fe kein Asymmetrieparameter bestimmt werden kann, und Unterschiede zwischen stark verbreiterten Feldgradienten ähnlicher Größe kaum aufzulösen sind.

Als Konsequenz der geschilderten Beobachtungen ergibt sich, daß nur Methoden, die unter physiologischen Bedingungen einsetzbar sind, gute Chancen bieten, Unterschiede zwischen den verschiedenen Bindungskonfigurationen von Transferrin mit hoher Spezifität aufzuzeigen. Auch Aussagen über dynamische Prozesse, die offensichtlich eine wesentliche Rolle spielen, sind nur möglich, wenn der gesamte Temperaturbereich für die Meßmethode zugänglich ist.

7.2. Interpretation der Besetzungsverhältnisse

Ein wesentliches Resultat der vorliegenden Messungen stellen die jeweils ermittelten Besetzungsverhältnisse der beiden spezifischen Bindungskonfigurationen dar. Aus den einzelnen Messreihen ist klar ersichtlich, daß die Verteilung der Sondenkerne mit dem pH-Wert der Proben und der Konzentration der Hafniumionen im Vergleich zur Zahl der freien Bindungsplätze von Transferrin korreliert ist. Dabei wird der pH-Wert bzw. dessen Veränderung mit der Zeit offensichtlich vom gewählten Verhältniss $K = |\text{Hf}| : |\text{UIBC}|$ bestimmt. Diese Beobachtungen lassen Rückschlüsse auf die Natur und Stabilität der beiden Bindungskonfigurationen zu.

7.2.1. pH-Abhängigkeit

Bezüglich des Gesamtanteils spezifisch an Transferrin gebundener Hafniumionen lassen sich drei pH-Bereiche unterscheiden:

- Niedrige pH-Werte ($\text{pH} < 7,4$)

Mit sinkendem pH-Wert nimmt der Anteil spezifischer Bindung ab. Unterhalb $\text{pH} = 6,8$ sind die Konfigurationen 1 und 2 nicht mehr nachweisbar.

- Mittlere pH-Werte ($7,4 \leq \text{pH} \leq 9,2$)

Der Gesamtanteil $f_1 + f_2$ bleibt konstant (ca. 60 bis 70 %). Es findet lediglich eine Umbesetzung statt, so daß sich die Verhältnisse der Besetzungszahlen zwischen $\text{pH} = 7,4$ und $9,2$ umkehren ($f_1 : f_2 = 9 : 1$ bzw. $1 : 9$).

- Hohe pH-Werte ($\text{pH} > 9,2$)

Der Anteil spezifisch gebundenen Hafniums nimmt langsam wieder ab. Bei $\text{pH} = 9,5$ entfallen weniger als 40 % auf die Konfigurationen 1 und 2.

Bei Eisen ist bekannt, daß die spezifische Transferrinbindung nur im Bereich $\text{pH} = 5$ bis $9,5$ stabil ist. Der Stabilitätsbereich von Hafnium-Transferrin beginnt demgegenüber erst bei deutlich höheren Werten und scheint sich nach oben etwas weiter auszudehnen. Die Hafniumbindung ist also weit weniger stabil gegen Säure. Offensichtlich liegt die Bindungskonstante so niedrig, daß unterhalb des physiologischen Bereiches schnell eine Bevorzugung der Komplexbildung von Hafnium mit niedermolekularen Komponenten der Proben (Salzionen,

NTA etc.) eintritt. Bei sehr hohen pH-Werten dürfte, wie bei Eisen, die Bildung von Hydroxidkomplexen ausschlaggebend für die Abnahme des Metall-Transferrin Anteils sein.

Am interessantesten ist natürlich der Zwischenbereich, in dem Hafnium-Transferrin in zwei spezifischen Bindungskonfigurationen auftritt, deren Identifizierung mit den beiden Metallbindungsplätzen im N- und C-Terminal des Proteins auf der Hand liegt. In der Tat sprechen viele Argumente für eine solche Interpretation.

Zunächst muß berücksichtigt werden, daß in allen Serumproben eine Vorrättigung mit Eisen vorhanden ist. Da unter physiologischen Bedingungen Serumeisen annähernd gleichförmig auf die beiden Plätze verteilt sein sollte /HuBa81, ZaAi85/, darf man davon ausgehen, daß die verbleibende Bindungskapazität jedes Platzes stets ausreichte, die gesamte Menge eingesetzten Hafniums aufzunehmen. Die sich jeweils einstellende Verteilung der Hafniumionen auf N- und C-Terminal konnte also unabhängig von der Eisenvorbeladung erfolgen.

Wie für Eisen wird bei vielen Metallen, insbesondere z.B. bei Th^{4+} /HaCa81/, bei niedrigen pH-Werten eine Bevorzugung des C-Terminals gefunden, die bei höheren pH-Werten verschwindet und von einer überwiegenden Besetzung des N-Terminals abgelöst wird /ChWi81/. Durch erhöhte Salzkonzentrationen wird dieser Effekt noch beschleunigt /WiCh82/. Es ist auch bekannt, daß Eisen, das bei $\text{pH} = 7,4$ in Form von Fe-NTA angeboten wird, an das C-Terminal von Apotransferrin bindet, und nach Erhöhung des pH-Wertes längere Zeit (Stunden bis Tage) braucht, um an das N-Terminal überzugehen /EiNo78/.

Interpretiert man das Verhalten von Hafnium in Analogie zu diesen Befunden, muß die Konfiguration 1 dem C-Terminal-Bindungsplatz von Transferrin gleichgesetzt werden, die Konfiguration 2 entspräche einer Bindung am N-Terminal. Die beobachtete pH-Abhängigkeit ist dann in völliger Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Transferrin-Untersuchungen mit anderen Metallen. Der pH-Wert, bei dem eine Gleichbesetzung beider Plätze vorliegt, entspricht durchaus Werten, die üblicherweise berichtet werden (siehe z.B. /EiNo78, HaCa81/). Aus den vorliegenden Messungen müßte aufgrund der unterschiedlichen Feldgradienten der beiden Fraktionen außerdem auch geschlossen werden, daß die Bindungsplätze von Transferrin chemisch nicht äquivalent sind.

In der Literatur wird berichtet, daß bei Erhöhung des pH-Wertes Konformationsänderungen auftreten können, durch die sich der Charakter der Bindungsplätze verändert /CaCh77/. Für Thorium wurde ein plausibles Modell entwickelt, nach dem sich der C-Terminal Platz bei hohen pH-Werten dem N-Terminal Platz angleicht /HaCa81/. So ist nicht einmal eine Wanderung der Hafniumionen von einem Terminal zum anderen erforderlich, wie sie van Eijk im Fall von Eisen-Transferrin Untersuchungen postulierte /EiNo78/, um die pH-Abhängigkeit der spezifischen Hafnium-Transferrin Konfigurationen zu erklären. Das gesamte Hafnium bliebe stets am C-Terminal Platz gebunden, dieser würde aber bei hohen pH-Werten die Konfiguration des N-Terminal Platzes annehmen.

Natürlich ist allein aufgrund der vorliegenden TDPAC-Messungen nicht auszuschließen, daß es sich bei den spezifischen Bindungskonfigurationen von Hafnium lediglich um verschiedenen Zustände ein und desselben Platzes (z.B. desjenigen im C-Terminal) handelt, wogegen der andere gar nicht angenommen wird oder als unspezifisch erscheint. Es wäre auch denkbar, daß beide Plätze chemisch äquivalent sind, gleichmäßig besetzt werden, und ihre Konfiguration mit dem pH-Wert in gleicher Weise ändern. Bei Einbeziehung der Ergebnisse anderer Untersuchungen (vide supra) erscheinen solche Interpretationen allerdings wenig plausibel. Endgültige Klarheit können aber erst TDPAC-Messungen an gezielt im N- bzw. C-Terminal beladenen Transferrinproben, oder eine biochemische Bestimmung der Verteilung von Hafnium auf die beiden Transferrinhälften bringen.

7.2.2. Konzentrationsabhängigkeit

Es scheint, daß die Menge eingesetzten Hafniums bzw. das Konzentrationsverhältnis K die resultierende Verteilung auf die beiden Bindungsplätze im untersuchten Bereich nur mittelbar beeinflusst. Die eigentliche Bestimmungsgröße ist der pH-Wert, dessen Einstellung bzw. Veränderung wird aber von der Hafniumkonzentration gesteuert. Unterhalb einer bestimmten Konzentration (ca. 5 nMol/ml) ändert sich der pH-Wert der Proben nur wenig und bleibt stets unter 8, so daß die Bindung in der ersten Konfiguration überwiegt. Werden dagegen mehr als 6 nMol Hafnium einem Milliliter Serum zugesetzt, so steigt der pH-Wert mit der Zeit auf über 9 an, so daß sich schließlich eine deutliche Bevorzugung der Konfiguration 2 ausbildet.

Die Frage nach der Ursache dieser pH-Änderung ist nicht einfach zu beantworten. Man muß berücksichtigen, daß mit der Hf-NTA Lösung neben Hf^{4+} auch eine größere Menge anderer Ionen, wie z.B. Na^+ , Cl^- , HCO_3^- und NTA^{3-} in die Serumproben gelangen. Es ist denkbar, daß diese Zusätze Reaktionen auslösen, die irgendwann die Pufferkapazität des Serums übersteigen und eine pH-Erhöhung bewirken. Wenn auch nach den TDPAC-Messungen der Hafnium-Transferrin Komplex über sehr lange Zeiten stabil bleibt, ist nicht auszuschließen, daß sich andere Serumproteine zersetzen und Hydroxidionen oder andere alkalische Gruppen frei werden. Je nach Menge der mit der Hafniumlösung zugesetzten Ionen werden diese Reaktionen über längere Zeiträume mehr oder weniger abgepuffert. In dieses Bild passt auch die Tatsache, daß bei Konzentrationen knapp über 6 nMol/ml der pH-Wert zunächst nur langsam zunimmt, sich dann aber in kurzer Zeit stark erhöht und anschließend wieder annähernd konstant bleibt.

Bei hohen Hafniumkonzentrationen, die aber immer noch weit von der theoretischen Sättigungskonzentration von Transferrin entfernt sind, nimmt der Anteil spezifisch gebundener Hafniumionen bereits deutlich ab. Ein Teil des eingesetzten Hafniums wird also nicht an Transferrin gebunden. Ursache könnte sein, daß die Bindungskonstante von Hafnium-Transferrin so niedrig ist, daß bei höheren Hafniumkonzentrationen aufgrund des chemischen Gleichgewichts ein Teil des Metalls niedermolekular gebunden in Lösung bleibt. Dieser Effekt wird eventuell dadurch verstärkt, daß sich auch das vorhandene Eisen auf das bei den vorliegenden hohen pH-Werten bevorzugte N-Terminal konzentriert, und so die Bindungskapazität für Hafnium weiter einschränkt. Aufgrund des hohen Wertes der Relaxationskonstante des niedermolekularen Anteils, kann es sich dabei kaum um Hf-NTA handeln. Wahrscheinlich bilden sich ähnliche Hydroxidkomplexe wie sie in der Hafniumchloridlösung beobachtet wurden (Anhang C5). Der exakte Verlauf des Sättigungsverhaltens von Transferrin bei Zugabe von Hafnium muß mit eisenfreien Proben noch genauer untersucht werden.

7.3. Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies

Die TDPAC-Untersuchungen zur Bindung von Hafnium an den Serumtransferrinen verschiedener Spezies sind besonders geeignet, die Empfindlichkeit der Methode aufzuzeigen. In Tabelle 13 sind die Werte der Quadrupolkopplungskonstanten ν_Q und der Asymmetrieparameter η der drei Bindungskonfigurationen für menschliches, Ratten- und Hamster-Serumtransferrin gegenübergestellt. Mit dem Quadrupolmoment $Q = 2,36$ b wurden daraus die Beträge der Komponenten des elektrischen Feldgradiententensors berechnet. Für Human- und Hamsterserumtransferrin stimmen die Werte innerhalb der Fehler überein, so daß man davon ausgehen darf, daß die Ladungsverteilungen um die Hafniumkerne in den einzelnen Bindungskonfigurationen für beide Spezies identisch sind. Dagegen werden für Rattenserumtransferrin signifikante Abweichungen festgestellt. Insbesondere die Erniedrigung des Asymmetrieparameters der zweiten Konfiguration um ca. 10 % läßt auf eine veränderte Anordnung der Liganden dieses Bindungsplatzes schließen.

Tabelle 13: Vergleich der Quadrupolkopplungsparameter und der daraus resultierenden Komponenten $|V_{zz}|$, $|V_{yy}|$ und $|V_{xx}|$ des elektrischen Feldgradiententensors für die verschiedenen Bindungskonfigurationen von Hafnium in den Serumtransferrinen von Ratte, Mensch und Hamster.

		ν_Q (MHz)	η	$ V_{zz} $ ($10^{17}V/cm^2$)	$ V_{yy} $ ($10^{17}V/cm^2$)	$ V_{xx} $ ($10^{17}V/cm^2$)
Konfiguration 1	Ratte	893 ± 3	$0,926 \pm 0,006$	$15,65 \pm 0,05$	$15,07 \pm 0,07$	$0,58 \pm 0,05$
	Mensch	870 ± 2	$0,948 \pm 0,005$	$15,25 \pm 0,04$	$14,85 \pm 0,05$	$0,40 \pm 0,04$
	Hamster	861 ± 6	$0,945 \pm 0,008$	$15,09 \pm 0,11$	$14,68 \pm 0,12$	$0,41 \pm 0,06$
Konfiguration 2	Ratte	1466 ± 3	$0,528 \pm 0,002$	$25,69 \pm 0,05$	$19,63 \pm 0,05$	$6,06 \pm 0,03$
	Mensch	1436 ± 3	$0,576 \pm 0,002$	$25,17 \pm 0,05$	$19,83 \pm 0,05$	$5,34 \pm 0,03$
	Hamster	1440 ± 7	$0,565 \pm 0,008$	$25,24 \pm 0,12$	$19,75 \pm 0,14$	$5,49 \pm 0,10$
Konfiguration 3 (unspezifisch)	Ratte	939 ± 5	0	$16,46 \pm 0,08$	$8,23 \pm 0,04$	$8,23 \pm 0,04$
	Mensch	919 ± 7	0	$16,11 \pm 0,12$	$8,05 \pm 0,06$	$8,05 \pm 0,06$
	Hamster	914 ± 5	0	$16,02 \pm 0,08$	$8,01 \pm 0,04$	$8,01 \pm 0,04$

Die angegebenen Unsicherheiten sind rein statistische Fehler aufgrund der Bildung von gewichteten Mittelwerten aus den Einzelmessungen. Bei der Berechnung der Komponenten des Feldgradiententensors wurde der Fehler des Quadrupolmoments ($Q = 2,36 \pm 0,05$ b) nicht berücksichtigt, da nur Messungen mit dem gleichen Kernniveau verglichen werden. Unter Einbeziehung von ΔQ erhöhen sich die Fehler der Feldgradientenwerte durchgehend auf ca. 2 %.

Änderungen der beobachteten Größenordnung können nach theoretischen Überlegungen bereits durch geringfügige Versetzung der Liganden oder kleine Ladungsverschiebungen zwischen Metallion und Liganden bewirkt werden (siehe z.B. /VuBa78/). Eine geringfügig unterschiedliche Proteinkonfiguration in der Nähe der Metallbindungsplätze reicht aus, die gefundenen Abweichungen zu erklären. Zahl und Natur der Hafniumliganden dagegen dürften für alle Spezies identisch sein.

Die TDPAC-Messungen zeigen auf, daß sich Unterschiede, die im biochemischen Verhalten verschiedener Serumtransferrine beobachtet werden, auch an den Metallbindungsplätzen direkt nachweisen lassen. Man nimmt an, daß das veränderte Verhalten der Transferrinrezeptoren von Zellen einer Spezies gegenüber den Serumtransferrinen anderer Spezies auf einem spezifischen Erkennungsmechanismus der jeweiligen Molekülkonformation beruht /Broc85/. Es wäre deshalb interessant zu untersuchen, inwieweit sich aus den TDPAC-Parametern der Bindungskonfigurationen Rückschlüsse auf die Bildung heterogener Transferrin-Rezeptor Komplexe ziehen lassen. Neben Messungen an den Serumtransferrinen verschiedener Spezies oder auch an Varianten der gleichen Art erscheinen insbesondere auch Untersuchungen an den Lacto- und Ovotransferrinen aufschlussreich, da bekannt ist, daß sich diese strukturell stark von den anderen Transferrinen unterscheiden /Will85/. Es gibt in diesen Proteinen zum Beispiel eine unterschiedliche Zahl von Disulphid-Brücken, so daß die Tertiärstruktur völlig anders sein könnte. Auch die Stabilität der Metallbindung scheint bei Lacto- und Ovotransferrinen verschieden, wodurch auch der pH-Bereich, in dem Metalle gebunden werden, verschoben und/oder ausgedehnt sein kann /AiLe72/. Auch solche Effekte wären nach den bisherigen Erfahrungen mit TDPAC leicht zu beobachten und quantitativ zu erfassen.

8. Zusammenfassung und Ausblick

Die mit Hilfe der zeitdifferentiellen Beobachtung gestörter Winkelkorrelationen gewonnenen Aussagen über die Metallbindung an Serumtransferrinen stellen die Leistungsfähigkeit der Methode in biologischen Untersuchungen eindeutig unter Beweis. Es war möglich, die einzelnen Bindungskonfigurationen der Metallionen sehr spezifisch zu erfassen, und die verschiedenen Anteile in Abhängigkeit der Konzentrationsverhältnisse und des pH-Wertes quantitativ zu bestimmen. Darüber hinaus wurde aufgezeigt, daß sich biochemisch gefundene Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies auch in den Ladungsverteilungen um die TDPAC-Sondenkerne nachweisen lassen. Ein erster Einblick in Prozesse der inneren Dynamik des Proteins konnte gewonnen werden. Vergleiche von Messungen an Proben bei Raumtemperatur und unterhalb des Gefrierpunktes liefern Hinweise auf 'conformational substates', die bei ausreichend hoher thermischer Energie ständig ineinander übergehen.

Aufgrund der Komplexität der untersuchten Systeme konnten einige Aspekte nicht vollständig geklärt werden. Dabei sind aber keine Beschränkungen von der Untersuchungsmethode selbst her erkennbar. Es bedarf, wie z.B. bei der Frage nach der Identifizierung der spezifischen Bindungskonfigurationen mit den Metallbindungsplätzen im N- und C-Terminal, hauptsächlich weiterer präparativer Anstrengungen, um endgültige Schlußfolgerungen zu ziehen. Die vorliegenden Ergebnisse bilden eine solide Grundlage für die Untersuchung von weiteren Aspekten der Metall-Transferrin Bindung. Genannt seien hier nur Themen wie Einfluß verschiedener synergistischer Anionen auf die Metallbindung, Konzentrationsabhängigkeit und Sättigungsverhalten in verschiedenen Metall-Apotransferrin Systemen oder Unterschiede zwischen Lacto-, Ovo- und Serumtransferrinen. Es scheint durchaus möglich, mittels TDPAC Bindungskonstanten für die einzelnen Konfigurationen zu bestimmen, wenn es gelingt, exakt definierte Präparationsbedingungen zu schaffen.

Natürlich kann die TDPAC-Methode auch eingesetzt werden, um den Weg der Metallionen im Metabolismus weiter zu verfolgen, und die Bindung des Metalltransferrins an die Zellrezeptoren sowie die Aufnahme in die Zelle selbst zu studieren. Dabei ist man nicht auf den Sondenkern ^{181}Hf beschränkt. Mit der nunmehr vorhandenen TDPAC-Apparatur sind aufgrund der vorzüglichen Zeitauflösung auch Kerne mit noch kürzeren Lebensdauern des Zwischen-

niveaus (wenige Nanosekunden) für zeitdifferentielle Messungen zugänglich. Geeignet sind unter anderem die Isotope ^{199}Hg und ^{99}Mo (vgl. /Baue85/), bei denen die $\gamma\gamma$ -Kaskade ebenfalls durch β -Zerfall gespeist wird.

Auch scheint die Untersuchung anderer Biomoleküle mit der TDPAC-Methode sehr erfolgversprechend. So konnten Bauer et al. /Baue85/ unter Verwendung von ^{111m}Cd trotz der kurzen Lebensdauer des Mutterisotops (48 min) in umfangreichen Experimenten an Zinkenzymen wesentliche Erkenntnisse über das biochemische Verhalten und die Struktur dieser Proteine gewinnen. Mit Hilfe sogenannter AOM (Angular Overlap Model)-Rechnungen war es in diesem Fall möglich, aus den jeweils gemessenen Quadrupolkopplungsparametern direkte Rückschlüsse auf die Art und Anordnung der Metalliganden zu ziehen. Dieser letzte Schritt bei der Auswertung von TDPAC-Messungen muß auch bei Hafnium-Transferrin angestrebt werden. Voraussetzung für AOM-Rechnungen ist allerdings, daß ein breites Basiswissen über elektrische Feldgradienten in organischen Hafniumverbindungen erarbeitet wird, aus dem dann die Beiträge einzelner Bindungsgruppen bestimmt werden können.

Prinzipiell steht der Anwendung der TDPAC-Methode in der Biologie ein weites Feld offen. Mit deutlicher Verzögerung gegenüber anderen spektroskopischen Verfahren wie ESR, NMR und Mößbauer-Effekt, bei denen eine apparative Standardisierung früher erreicht wurde, finden Winkelkorrelationsmessungen erst allmählich Eingang in Bereiche außerhalb der physikalischen Grundlagenforschung. Durch apparative Verbesserungen, wie zum Beispiel die Einführung von BaF_2 -Detektoren, kann eine Beschleunigung dieser Entwicklung erwartet werden.

Durch den gezielten Einsatz kernphysikalischer Messmethoden wird das Verständnis biologischer Vorgänge bedeutend vorangebracht werden. Die Faszination biologischer Systeme und die Zukunftsaussichten der physikalischen Forschung an Biomolekülen werden am besten durch die Einschätzung von zwei Mitbegründern der modernen Physik wiedergegeben. So vergleicht E. Schrödinger 'normale' periodische Kristalle wie folgt mit Biomolekülen, die er als aperiodische Kristalle bezeichnet /Schr44/:

" Yet, compared with the aperiodic crystals, they are rather plain and dull. The difference in structure is of the same kind as that between an ordinary wallpaper in which the same pattern is repeated

again and again in regular periodicity and a masterpiece of embroidery, say a Rafael tapestry, which shows no dull repetition, but an elaborate, coherent, meaningful design traced by the great master. "

Und H. Frauenfelder schreibt /Frau84/:

" The physics of biomolecules is a rich field. It stands now where nuclear, particle, and condensed matter physics where around 1930. We can expect exciting progress in the next few decades. "

Anhang A Aufbau der BaF_2 -Detektoren

Zunächst wurden zylindrische 2" x 2" BaF_2 -Kristalle (Fa. Harshaw) in Standard-Line Montagen getestet und für TDPAC eingesetzt. Es zeigte sich jedoch, daß sowohl die Energieauflösung (15 bis 20 % bei 661 keV), als auch die Lichtausbeute und damit die Nachweisempfindlichkeit dieser Detektoren deutlich zu wünschen übrig ließen. Auch die Zeitauflösung lag mit 800 ps bis 1 ns deutlich über anderswo erzielten Werten /BaBo83/. Eine bräunliche Trübung und erkennbare Reflexionsebenen in den Kristallen sprachen für Verunreinigungen und Versetzungen im idealerweise völlig klaren BaF_2 -Material, und dürften für die schlechten Nachweiseigenschaften verantwortlich gewesen sein. Vor allem die Energieauflösung reichte nicht aus, die relevanten γ - Energien vollständig von anderen Übergängen zu trennen, so daß die TDPAC-Messungen von einer hohen Rate an falschen Koinzidenzen beeinträchtigt wurden.

Besseres Material konnte direkt vom Hersteller (Fa. Korth, Kiel) bezogen werden. Es wurden ungekapselte, zylindrische BaF_2 -Kristalle der Dimension 40 mm x 40 mm beschafft, und zunächst nach der von Wisshak et al. /WiKä84/ beschriebenen Prozedur behandelt und gereinigt. Die Montage erfolgte in Aluminium-Töpfchen mit einem Innendurchmesser von 45 mm, einer Tiefe von 41 mm und einer Wandstärke von 0,3 mm. Zwischen Boden und Kristall wurde eine ca. 2 mm dicke Schicht aus α - Al_2O_3 (α - Aluminiumoxid mit 90 % Al_2O_3 , 9 % H_2O , 40 Micron der Fa. Alpha-Ventron) gepresst. Ebenso wurde der ca. 2,5 mm breite Randspalt zwischen Kristall und Behälterwand mit diesem Reflektormaterial ausgefüllt und anschließend mit einem Kunstharz-Klebstoff (Araldit) verschlossen (siehe Abb. A1).

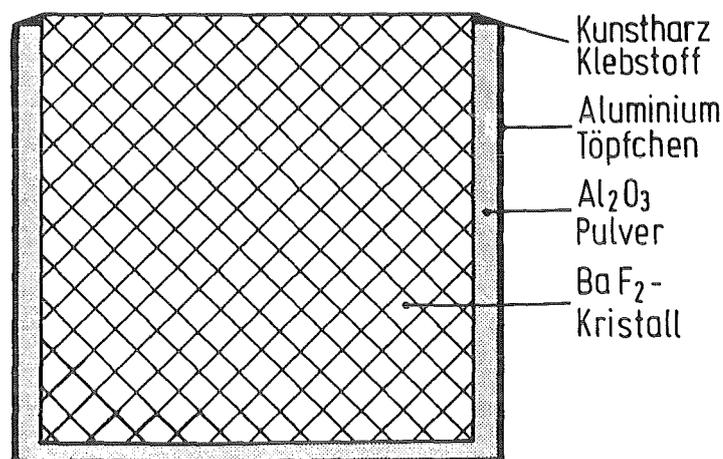


Abb. A1: Kapselung der BaF_2 -Kristalle

Mit diesen Szintillatoren, deren Reinheit aufgrund ihrer Transparenz recht hoch schien, wurden sehr gute Testergebnisse erzielt. Die Energieauflösung für 661 keV liegt bei 11 % (siehe Abb. A2), die Zeitauflösung für die 133 keV - 482 keV Kaskade bei 550 ps. Die Zählraten sind unter gleichen Bedingungen fast einen Faktor 2 höher als bei den Harshaw-Kristallen. In Abb. A3 ist das mit den BaF₂-Detektoren gemessene Energiespektrum von ¹⁸¹Hf gezeigt. Abb. A4 gibt die Zeitauflösungskurve mit ²²Na wieder, die mit den für Winkelkorrelationsmessungen mit ¹⁸¹Hf benötigten Energiefenstern aufgenommen wurde.

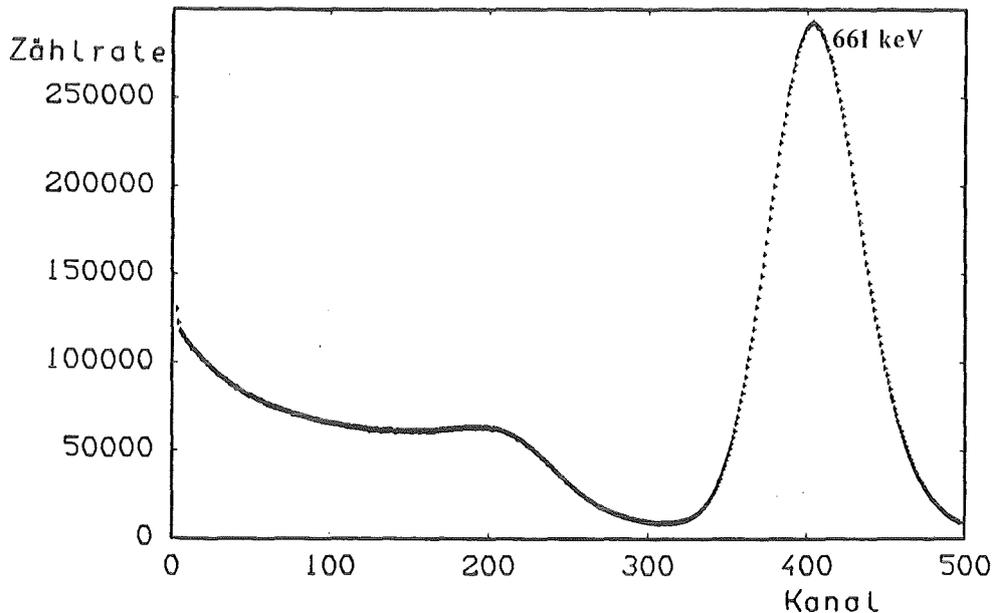


Abb. A2: Ausschnitt aus dem Energiespektrum von ¹³⁷Cs aufgenommen mit einem BaF₂-Detektor (Kanal 0 = 228 keV, 1 Kanal = 1,07 keV) Energieauflösung $\Delta E(\text{FWHM})/E$ für 661 keV: 11 %

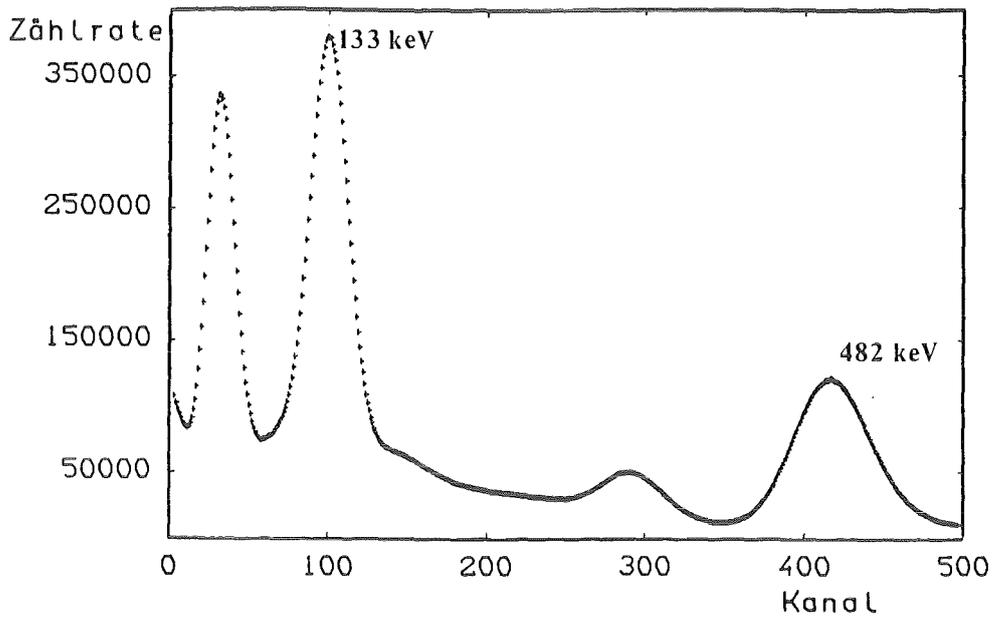


Abb. A3: Energiespektrum von ^{181}Hf aufgenommen mit einem BaF_2 -Detektor (Kanal 0 = 15 keV, 1 Kanal = 1,125 keV)
Energieauflösung $\Delta E(\text{FWHM})/E$ für 133 keV: 25 %
Energieauflösung $\Delta E(\text{FWHM})/E$ für 482 keV: 13 %

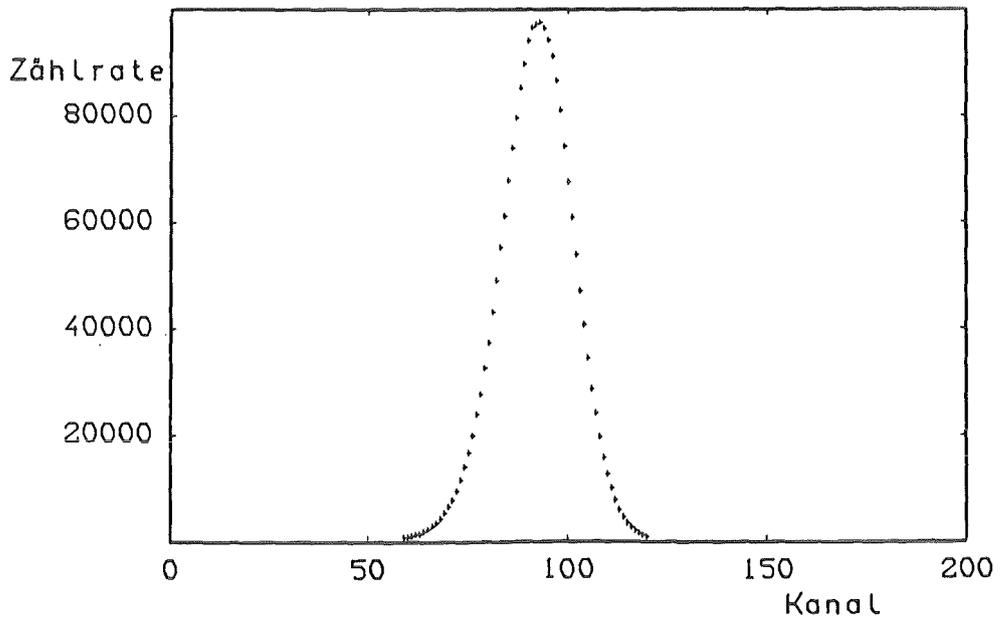


Abb. A4: Zeitspektrum von ^{22}Na für 133 keV - 482 keV Koinzidenz aufgenommen mit zwei BaF_2 -Detektoren unter 180° (1 Kanal = 26 ps)
Zeitauflösung $\sigma(\text{FWHM}) = 550$ ps

Die Verarbeitung der schnellen Komponente im Szintillationslicht von BaF_2 stellt wegen der kurzen Wellenlänge (220 nm) besondere Anforderungen an die zu verwendenden Photomultiplier. Das Eintrittsfenster muß bei dieser Wellenlänge noch gut durchlässig sein, die spektrale Empfindlichkeit der Photokathode darf im UV-Bereich nicht allzu stark absinken. Zum anderen muß das Vervielfachersystem kurze Impulsanstiegs- und -abfallzeiten, sowie geringe Laufzeitschwankungen gewährleisten. Verwendet wurde deshalb der Typ XP2020Q der Fa. Valvo (Hamburg), ein schneller, 12-stufiger Fotovervielfacher mit Quarzfenster und einer halbdurchlässigen Bialkali (Sb-K-Cs, DU-Typ)-Photokathode, die bis herunter zu ca. 150 nm empfindlich ist. Die optische Kopplung zwischen BaF_2 -Kristall und Röhrenfenster wurde mit Silikonöl der Viskosität 100 000 Centistokes (Rhodorsil V100, Fa. OKS, München) hergestellt, dessen gute Transmission im UV-Bereich bekannt ist /Wikä84/. Der Spannungsteiler wurde gemäß der von Valvo für schnelles Timing mit der XP2020Q empfohlenen Schaltung B' /Valv83/ ausgelegt, und mit negativer Hochspannung (Anode auf Masse) von 2000 bis 2500 Volt (je nach Röhre) betrieben. Es zeigte sich, daß nur Multiplier mit einem sehr kleinen Dunkelstrom von weniger als 5 nA und geringem Nulleffekt < 500 Impulse/s (bei der Normverstärkung $V = 3 \cdot 10^7$) gute Ergebnisse für Energie- und Zeitauflösung ermöglichen.

Für die Zeitbestimmung wird dabei das schnelle, negative Anodensignal verwendet. Zur Energiediskriminierung wird an der 6. Dynode ein Signal ausgekoppelt und mittels eines eingebauten Vorverstärkers in Amplitude und Impulsform an die verwendeten Hauptverstärker angepaßt.

Anhang B Beschreibung der Nachweiselektronik

In Abb. B1 ist das vollständige Blockschaltbild der verwendeten, kommerziellen NIM-Elektronik wiedergegeben. Aus den schnellen Anodenimpulsen (Zeitsignal t) werden in Constant-Fraction-Triggern (CFT) die Nachweiszeitpunkte unabhängig von den Impulshöhen bestimmt und zeitlich exakt korrelierte, schnelle negative Normsignale ($V_{\max} = -0,8$ Volt) erzeugt. Für optimale Zeitauflösung sind Nachweisschwellen knapp über dem niederenergetischen Untergrund erforderlich, die bei allen Zählern etwa bei der gleichen Impulshöhe liegen sollten. Die Ausgangssignale werden dann in zwei 'OR'-Gliedern paarweise zusammengefasst, und wechselseitig auf die Start- und Stop-Eingänge der beiden TPCs gegeben. Durch Nanosekunden-Delays (~~von~~) am Ausgang der CFTs und an den Stop-Eingängen der TPCs können die Zeitnullpunkte der einzelnen Detektoren exakt abgeglichen, und die notwendige minimale Zeitdifferenz zwischen Start- und Stopsignalen (ca. 13 ns bei den verwendeten TPCs) eingestellt werden. Für jedes Paar von Start-Stop-Impulsen mit einem zeitlichen Abstand kleiner als der gewählte Meßbereich wird im TPC zunächst ein internes Signal erzeugt, dessen Höhe proportional der Zeitdifferenz beider Eingangssignale ist. Im 'Strobe'-Mode wird dieses interne Signal zurückgehalten, bis es ein Koinzidenzsignal am 'Strobe'-Eingang freigibt. Ist dies nach $5 \mu\text{s}$ nicht der Fall, wird es verworfen. Damit können echte Signale, d.h. solche die zu einer 'richtigen' $\gamma\gamma$ - Kaskade gehören, ausgewählt werden.

Dazu werden die positiven Dynodenimpulse (Energiesignal E) zunächst in einem Hauptverstärker aufbereitet und parallel auf zwei Einkanalanalysatoren (TSCA) gegeben. Hier werden die Signale, die Start (133 keV)- bzw. Stop (482 keV)-Quanten entsprechen, herausgefiltert. Für solche Impulse werden positive Normsignale erzeugt. Damit kann in den Koinzidenzeinheiten (COINC) überprüft werden, ob in einer der acht vorgesehenen Start-Stop Kombinationen eine 133 keV - 482 keV Kaskade nachgewiesen wurde. Die resultierenden Koinzidenzsignale werden dann in zwei Oder-Einheiten (OR) so zusammengefasst und auf die 'Strobe'-Eingänge der TPCs gegeben, daß sie den möglichen Start-Stop Kombinationen entsprechen (siehe Abb. B1).

Mit den so gewonnenen Ausgangssignalen der TPCs sollen nun in einem Vielkanalanalysator (MCA) die acht verschiedenen Zeitspektren in unterschiedlichen

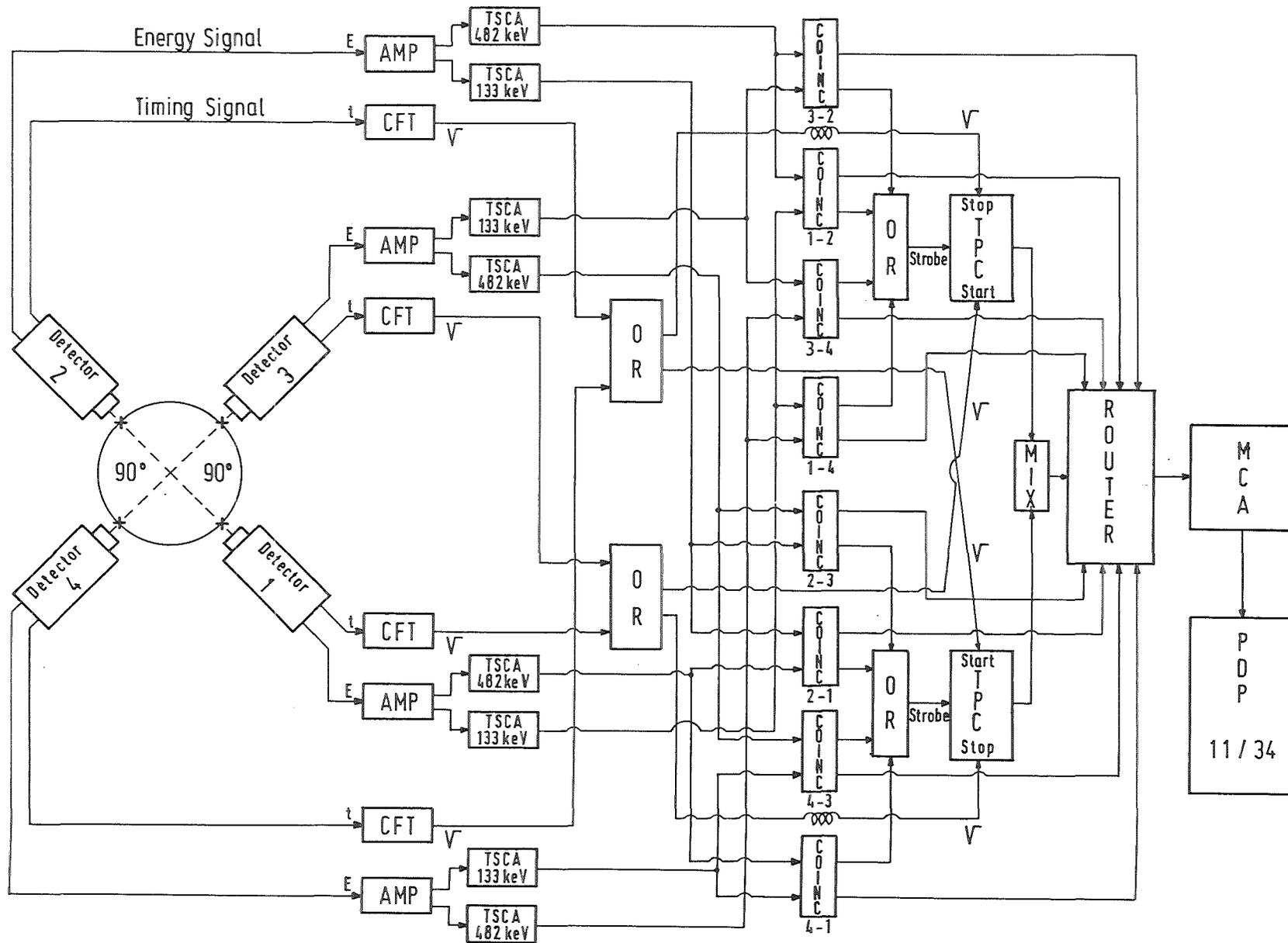


Abb. B1: Blockschaltbild der Nachweiselektronik

Bereichen des Speichers akkumuliert werden. Um die spätere Datenreduktion zu erleichtern, werden die beiden TPC-Signale zunächst aufeinander abgeglichen, so daß gleichen Zeitdifferenzen gleichen Impulshöhe entsprechen. Damit wird eine einheitliche Zeiteichung gewährleistet. Anschließend werden die Signale zusammengefaßt (MIX) und mit einem Analog-Digital-Converter (ADC) in den MCA einsortiert. Mit einer Routing-Einheit (ROUTER), auf die alle Koinzidenzsignale gegeben werden, wird die Zugehörigkeit der TPC-Signale zur jeweiligen Detektorkombination ermittelt und die Abspeicherung in den dafür vorgesehenen Bereich des MCA gesteuert. Von dort werden die Daten an den Rechner (PDP 11/34) übertragen.

Anhang C Testmessungen

Ausgangspunkt der Probenpräparation war, wie auch bei den Untersuchungen an Transferrin, stets eine kommerziell erhältliche Lösung von ^{181}Hf -Chlorid in 2-molarer HCl (Amersham & Buchler), mit bekannter Hafniumkonzentration und hoher spezifischer Aktivität an ^{181}Hf (20 bis 60 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$). Eine Probenaktivität von 5 bis 30 μCi erwies sich auch für länger dauernde TDPAC-Meßreihen als ausreichend. Mit den dazu benötigten Substanzmengen konnte auch das Volumen flüssiger Proben kleiner als 1 cm^3 gehalten werden.

Als Abstand der Zähler von der Probe wurden 40 mm gewählt. Unter Berücksichtigung der Größe der BaF_2 -Kristalle und der linearen Abschwächungskoeffizienten κ von BaF_2 /FaSw71/ lassen sich daraus der Geometriefaktor Q_{22} und die effektive Anisotropie $A_{22}^{\text{eff}} = Q_{22} A_{22}$ der Anordnung bestimmen. Für ^{181}Hf erhält man mit $A_{22} = -28,6 \%$, $\kappa(133 \text{ keV}) = 3,0 \text{ cm}^{-1}$, und $\kappa(482 \text{ keV}) = 0,09 \text{ cm}^{-1}$:

$$\begin{aligned} A_{22}^{\text{eff}} &= Q_2(133 \text{ keV}) \cdot Q_2(482 \text{ keV}) A_{22} = 0,873 \cdot 0,909 A_{22} \\ &= -22,7 \% \end{aligned}$$

Dieser berechnete Wert wurde zunächst durch die zeitdifferentielle Messung der Winkelkorrelation einer ^{181}Hf -Fluorid-Lösung experimentell überprüft.

C1 Hafniumfluorid-Lösung

Einige μl der oben beschriebenen Stammlösung wurden getrocknet und anschließend in wenigen Tropfen konzentrierter Flußsäure (HF, 38 %) gelöst. In einer solchen Lösung liegt Hafnium in Form von $[\text{HfF}_6]^{2-}$ - Ionen vor (vgl. /Wils76/). Das gemessene $R(t)$ -Spektrum ist in Abb. C1a gezeigt. In Übereinstimmung mit der Literatur /McGo54, ScWa71, Wils76/ beobachtet man eine nahezu ungestörte Korrelation. Eine Beschreibung ist mit dem Ansatz für einen schnell relaxierenden EFG (Gleichung 3/6) möglich. Man erhält einen sehr kleinen Wert für die Relaxationskonstante $\lambda_2 = (0,6 \pm 0,2) \text{ MHz}$ und eine effektive Anisotropie $A_{22}^{\text{eff}} = -(23,0 \pm 0,1) \%$. Dieser Wert ist in ausgezeichneter Übereinstimmung mit dem oben berechneten (-22,7 %) und wurde deshalb bei allen weiteren Messungen zugrundegelegt.

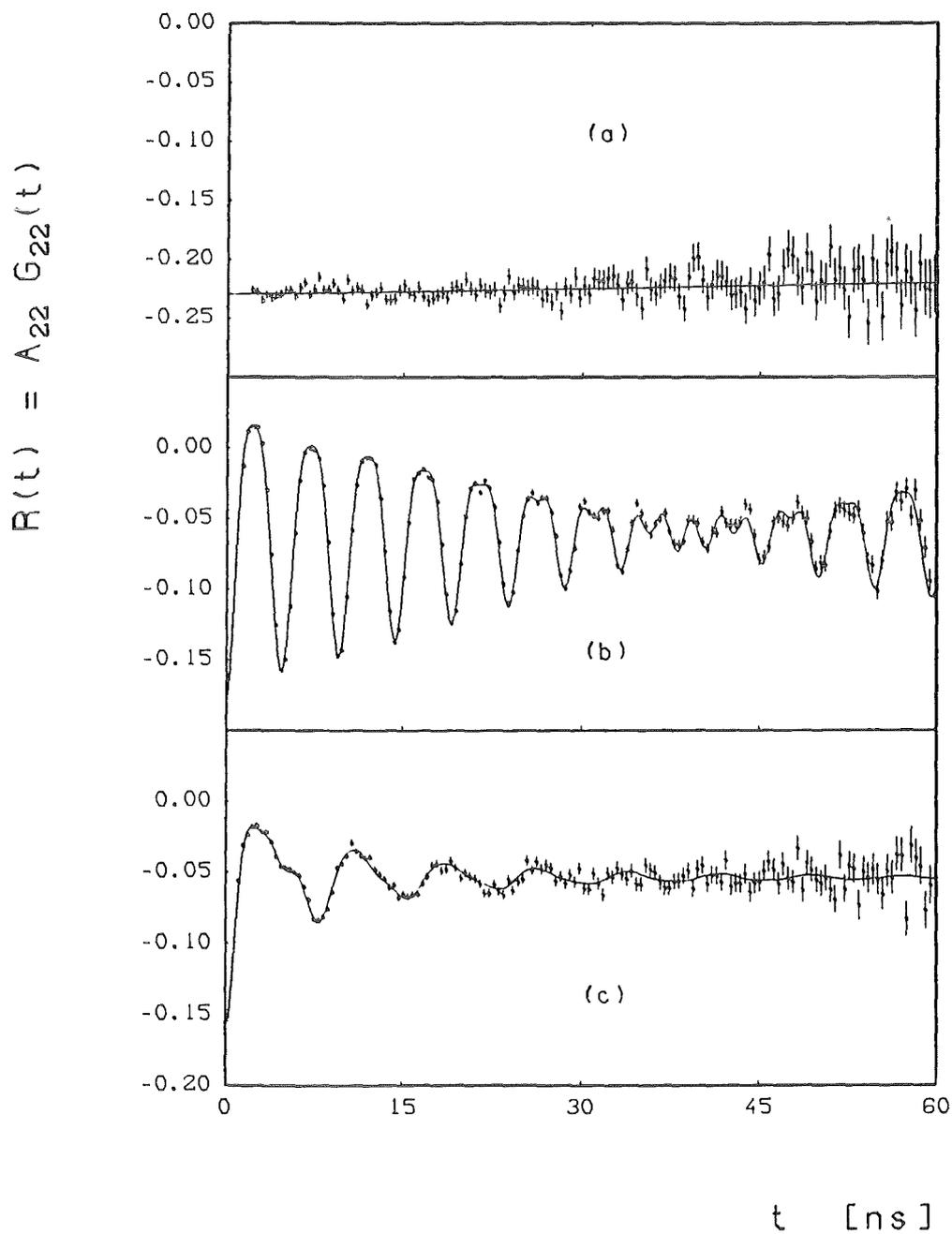


Abb. C1: $R(t)$ -Spektren der Hafniumfluorid-Proben
a) flüssige Probe: $[\text{HfF}_6]^{2-} \cdot 2\text{H}^+$
b) getrocknete Probe bei Raumtemperatur: $\text{HfF}_4 \cdot \text{HF} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
c) getrocknete Probe bei 400°C : HfF_4

C2 Polykristallines $\text{HfF}_4 \cdot \text{HF} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Trocknet man die beschriebene Hafniumfluorid-Lösung im Exsikkator mit Kieselsäuregel, erhält man getrübbte, nadelförmige Kristalle, die mit Röntgenbeugungsmessungen als $\text{HfF}_4 \cdot \text{HF} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ identifiziert werden können /Gaud66/. Um ausreichend Substanz für die Kristallisation zur Verfügung zu stellen, war es jedoch notwendig, die Hafniumkonzentration der Stammlösung durch Zugabe von inaktivem HfCl_4 zu erhöhen. Dies gilt auch für die im folgenden diskutierten getrockneten Proben.

Abb. C1b zeigt das $R(t)$ -Spektrum einer so präparierten $\text{HfF}_4 \cdot \text{HF} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -Probe bei Raumtemperatur. Im Gegensatz zu früheren Messungen mit NaI(Tl) -Detektoren /Then82/ können daraus die Parameter der rein statischen Quadrupolwechselwirkung (d.h. $\lambda_2 = 0$) mit großer Genauigkeit bestimmt werden. Insbesondere kann nun auch der Wert des Asymmetrieparameters extrahiert werden. Aus einer Reihe von Messungen ergeben sich folgende Mittelwerte:

$$\begin{aligned} \nu_Q &= (808 \pm 2) \text{ MHz} \\ \eta &= 0,927 \pm 0,001 \\ \delta &= (0,6 \pm 0,1) \% \end{aligned}$$

Neben diesem dominierenden Anteil mit nahezu verschwindender Verbreiterung findet man in den Spektren auch einen Anteil aufgrund von Kernen in einer relativ schlecht definierten Umgebung ($\delta \approx 10\%$) und eine deutliche R_O -Verschiebung.

Eine Erhöhung der Meßtemperatur auf ca. 400 K verursachte eine irreversible Strukturänderung der Probe. Das $R(t)$ -Spektrum bei dieser Temperatur (siehe Abb. C1c) und bei anschließenden Raumtemperatur-Messungen läßt sich im wesentlichen mit den aus der Literatur bekannten Parametern für HfF_4 /MaCa83/ beschreiben:

$$\begin{aligned} \nu_Q &= (722 \pm 9) \text{ MHz} \\ \eta &= 0,39 \pm 0,02 \\ \delta &= (13 \pm 1) \% \end{aligned}$$

Eine ausführliche Diskussion der vollständigen Ergebnisse, insbesondere auch der gemessenen Temperaturabhängigkeit des EFG's wurde bereits veröffentlicht /ThiA86/.

Es sei noch erwähnt, daß die Auswertung der ausgeprägt oszillierenden, nur wenig gedämpften Spektren eine Bestimmung der Zeitauflösung ermöglichte. Aus einer Vielzahl von Messungen ergab sich ein Mittelwert $\sigma = (0,49 \pm 0,04)$ ns, der sich in guter Übereinstimmung mit dem Wert befindet, der in Kap. 4.1 mit ^{22}Na bestimmt wurde ($\sigma(\text{FWHM}) = 0,55$ ns). Das in der Anpassungsfunktion verwendete Modell einer gaußförmigen Zeitauflösungsfunktion stellt also eine geeignete Beschreibung dar.

C3 Hafniumnitriolotriacetat-Lösung

Für die Hafnium-Transferrin Präparationen wurde in der Regel von einer Hafniumnitriolotriacetat(Hf-NTA)-Lösung ausgegangen. In früheren Arbeiten /Then82, ThZe83, Zell84/ wurde gefunden, daß sich bei Zugabe einer Lösung von Natrium-NTA in NaOH zur Hafniumchlorid-Stammlösung lösliche $[\text{HfNTA}_2]^{2-}$ - Ionen bilden (vgl. /InMa60/), deren Radius etwa $3,5 \text{ \AA}$ beträgt /Mukh70/. Das molare Verhältnis $|\text{Hf}| : |\text{NTA}|$ bei der Präparation sollte im Bereich $1 : 2$ bis $1 : 4$ liegen.

Abb. C2a zeigt das $R(t)$ -Spektrum der $[\text{HfNTA}_2]^{2-}$ - Lösung. Im Hinblick auf die Transferrin-Präparationen war der pH-Wert mit Natriumbicarbonat (NaHCO_3) auf den physiologischen Wert von Blut $\text{pH} = 7,4$ eingestellt worden. Die Anpassung liefert eine Relaxationskonstante

$$\lambda_2 = (28 \pm 1) \text{ MHz.}$$

C4 Polykristallines Hf-NTA

Wie ebenfalls früher bereits gezeigt wurde /Then82, ThZe83/, erhält man bei der Trocknung einer Hf-NTA-Lösung von $\text{pH} = 5$ eine kristalline Substanz, deren stöchiometrische Zusammensetzung vermutlich $\text{Na}_2\text{HfNTA}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ entspricht (vgl. /HoSi68/).

Mit den BaF_2 -Detektoren konnten die Parameter der Quadrupolaufspaltung mit deutlich verbesserter Genauigkeit bestimmt werden. Das $R(t)$ -Spektrum (siehe Abb. C2b) läßt sich im wesentlichen mit einem nahezu axialsymmetrischen EFG mit sehr geringer Verbreiterung δ beschreiben.

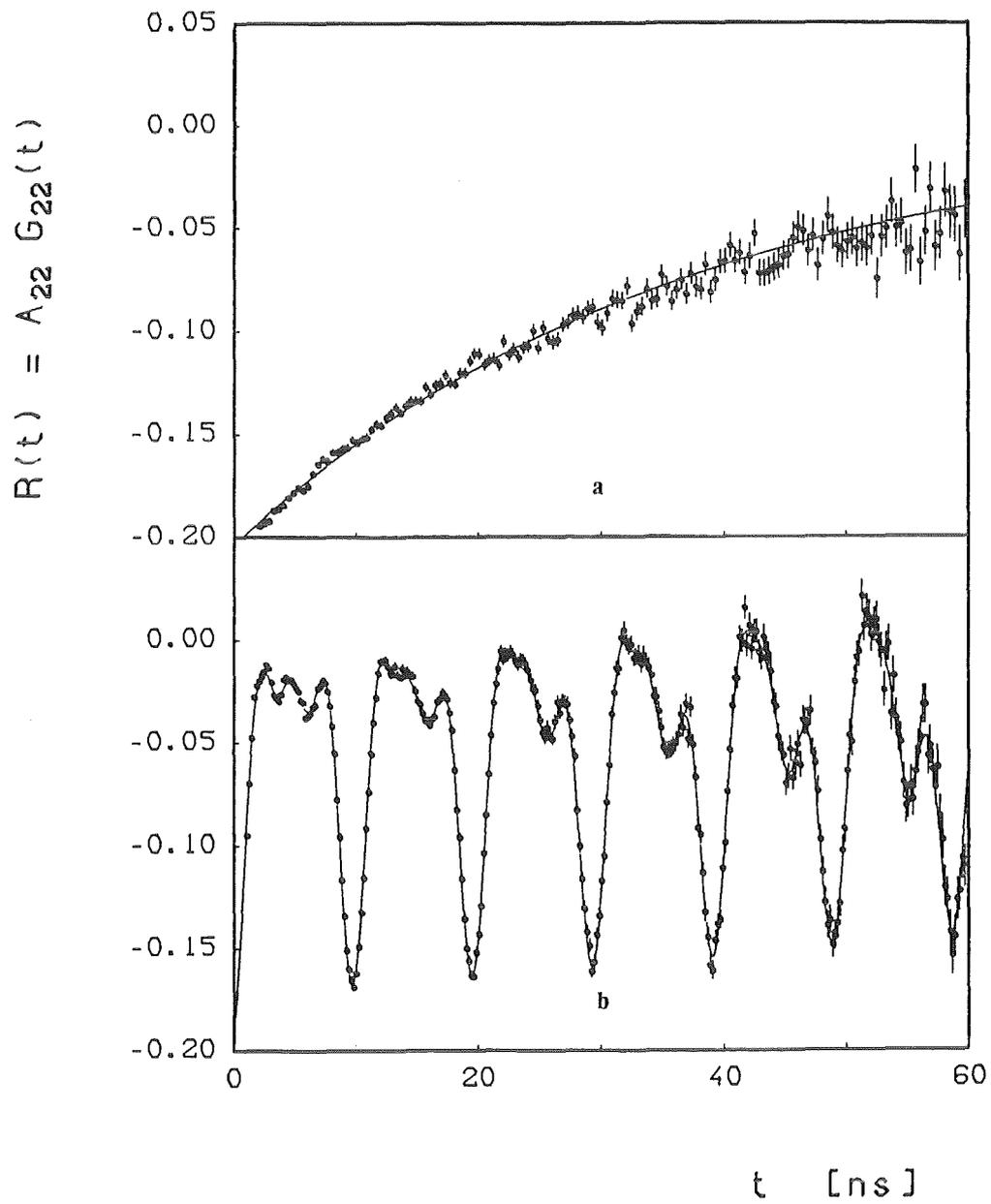


Abb. C2: $R(t)$ -Spektren der Hafniumnitriлотriacetat-Proben
a) flüssige Probe: $[\text{HfNTA}_2]^{2-} 2\text{Na}^+$
b) getrocknete Probe: $\text{Na}_2\text{HfNTA}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Bei Raumtemperatur findet man:

$$\begin{aligned}\nu_Q &= (680 \pm 1) \text{ MHz} \\ \eta &= 0,134 \pm 0,001 \\ \delta &= (0,2 \pm 0,1) \%\end{aligned}$$

Wieder tritt daneben ein kleiner Anteil ($f_2 \approx 20 \%$) eines stark verbreiterten Feldgradienten ($\delta \approx 15 \%$) auf. Die Herkunft und Signifikanz solcher unspezifischen Beiträge in den $R(t)$ -Spektren wird im Zusammenhang mit den Messungen an Hafnium-Transferrin noch ausführlich diskutiert.

C5 Hafniumchlorid-Stammlösung

Auch bei TDPAC-Messungen an der kommerziell erhaltenen ^{181}Hf -Chlorid-Lösung erhält man ein reines Relaxationsspektrum (Abb. C3a). Die Auswertung liefert:

$$\lambda_2 = (65 \pm 1) \text{ MHz}$$

Die Größe der Relaxationskonstanten zeigt an, daß die Hafniumatome in relativ großen Komplexen gebunden sind. Nach der Literatur handelt es sich vermutlich um tetramere $[\text{Hf}_4(\text{OH})_8 \cdot 16\text{H}_2\text{O}]^{8+}$ - Ionen /MuVa60/, deren Radius etwa 5 Å beträgt /PhSm81/.

C6 Polykristallines Hafniumoxychlorid

Trocknet man die Hafniumchloridlösung, so entstehen hydratisierte Hafniumoxychloridverbindungen /Blum58/. Es handelt sich dabei im wesentlichen um die Spezies $\text{HfOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ und $\text{HfOCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Aus TDPAC-Untersuchungen ist bekannt, daß die elektrischen Feldgradienten am Ort der Hafniumkerne in beiden Verbindungen stark verschieden sind /ZmLo72, BoAb76, BaBo83/. Dies äußert sich besonders in den zugehörigen Asymmetrieparametern.

In den hier durchgeführten Experimenten zeigte sich, daß ausgehend von der gleichen Lösung je nach Trocknungsgrad und Abschluß gegen Luftfeuchtigkeit $\text{HfOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ und $\text{HfOCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen entstehen. Abb. C3b und c zeigen die gefundenen Extremfälle. Die Auswertung

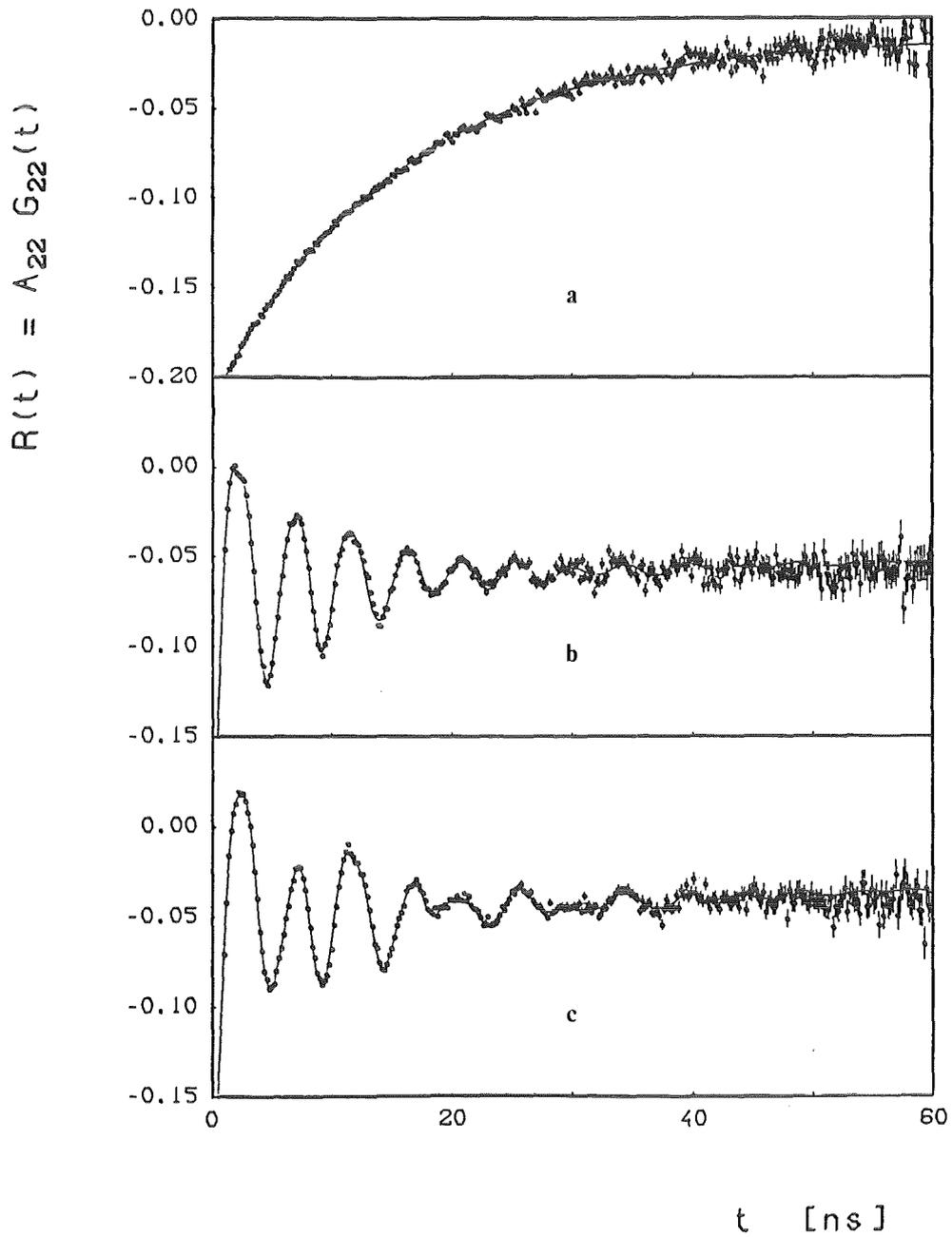


Abb. C3: $R(t)$ -Spektren der Hafniumoxychlorid-Proben
a) flüssige Probe: $[\text{Hf}_4(\text{OH})_8 \cdot 16\text{H}_2\text{O}]^{8+} 8\text{Cl}^-$
b) getrocknete Probe: $\text{HfOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O} : \text{HfOCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} = 7 : 1$
c) getrocknete Probe: $\text{HfOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O} : \text{HfOCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} = 1 : 1$

des $R(t)$ -Spektrums in Abb. C3b ergibt Anteile von $\text{HfOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ und $\text{HfOCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ im Verhältnis 7 : 1, während aus der Messung in Abb. C3c auf eine 1 : 1 - Verteilung geschlossen werden kann.

Die Werte der Parameter ν_Q , η und δ konnten mit verbesserter Genauigkeit bestimmt werden (vgl. z.B. /ZmLo72, BaBo83/):

$$\begin{aligned} \text{HfOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}: \quad \nu_Q &= (813 \pm 3) \text{ MHz} \\ \eta &= 1 \\ \delta &= (7,2 \pm 0,2) \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{HfOCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}: \quad \nu_Q &= (686 \pm 4) \text{ MHz} \\ \eta &= 0,561 \pm 0,004 \\ \delta &= (7,6 \pm 0,2) \% \end{aligned}$$

Es fällt auf, daß die Spektren nicht vollkommen statisch sind (vgl. auch /BoAb77/). Bei der Anpassung muß mindestens ein Anteil als quasistatisch angenommen werden, d.h. die Parametrisierung erfordert einen Ansatz

$$G_{22}(t) = e^{-\lambda_2 t} G_{22}^{\text{stat}}(t).$$

Die Relaxationskonstante λ_2 liegt dann in der Größenordnung 10 MHz. Es kann nicht eindeutig festgestellt werden, welche der beiden, oder ob sogar beide gefundenen Spezies dieser Dynamik unterliegen. In jedem Fall bedeutet das Auftreten von Relaxation, daß ein Teil der Hafniumumgebung (eventuell das Kristallwasser) in der festen Phase noch beweglich ist, und einen zeitlich veränderlichen Beitrag zum EFG liefert. Auch bei diesen Proben tritt zusätzlich ein stark verbreiteter Feldgradient auf ($\delta \approx 15\%$).

Literaturverzeichnis

- /Aasa72/ R. Aasa
Re-Interpretation of the Electron Paramagnetic Resonance Spectra of Transferrin
Biochemical and Biophysical Research Communications, 49(1972), 806-812
- /AbPo53/ A. Abragam and R.V. Pound
Influence of Electric and Magnetic Fields on Angular Correlations
Physical Review, 92(1953), 943-962
- /Adlo78/ J.P. Adloff
Application to Chemistry of Electric Quadrupole Perturbation of γ - γ Angular Correlations
Radiochimica Acta, 25(1978), 57-74
- /AiBr77/ P. Aisen and E.B. Brown
The Iron-Binding Function of Transferrin in Iron Metabolism
Seminars in Hematology, 14(1977), 31-53
- /AiLi80/ P. Aisen and I. Litowsky
Iron Transport and Storage Proteins
Annual Review of Biochemistry, 49(1980), 357-393
- /AiLe68/ P. Aisen and A. Leibman
Citrate Mediated Exchange of Fe^{3+} among Transferrin Molecules
Biochemical and Biophysical Research Communications, 32(1968), 220-226
- /AiLe72/ P. Aisen and A. Leibman
Lactoferrin and Transferrin: A Comparative Study
Biochimica et Biophysica Acta, 157(1972), 314-323
- /AiLe74/ P. Aisen, A. Leibman, and R.A. Pinkowitz
The Anion Binding Functions of Transferrin
in: Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 48: Protein Metal Interactions, Friedman and Mendal, Eds.
Plenum Press, New York(1974), 125-140
- /AiLe78/ P. Aisen, A. Leibman, and J. Zweier
Stoichiometric and Site Characteristics of the Binding of Iron to Human Transferrin
Journal of Biological Chemistry, 253(1978), 1930-1937
- /Aise80/ P. Aisen
The Transferrins
in: Iron in Biochemistry and Medicine, II
A. Jacobs and M. Worwood, Eds.
Academic Press, London(1980), 87-129
- /ApDu86/ H. Appel, J. Duffield, D.M. Taylor, G. Then, and W.-G. Thies
 ^{181}Hf -Labelled Transferrin: Influence of Temperature on the Metal-Binding Configurations
VIIth International Conference on Hyperfine Interactions, Bangalore wird veröffentlicht in Hyperfine Interactions(1987)

- /Appe68/ H. Appel
Numerische Tabellen für die Berechnung von Winkelkorrelationen
in: Landoldt-Börnstein: Zahlenwerte und Funktionen aus Natur-
wissenschaft und Technik, Neue Serie, Gruppe I, Band 3
H. Schopper, Ed.
Springer Verlag, Berlin(1968)
- /ArHo80/ A.R. Arends, C. Hohenemser, F. Pleiter, H. de Waard, L. Chow, and
R.M. Suter
Data Reduction Methodology for Perturbed Angular Correlation
Experiments
Hyperfine Interactions, 8(1980), 191-213
- /AvTr71/ F.T. Avignone III, J.H. Trueblood, and Z.W. Grabowski
Directional Correlation and Intensity Studies of Electromagnetic
Transitions in ^{181}Ta
Nuclear Physics, A167(1971), 129-142
- /BaBo78/ A. Baudry, P. Boyer, and A. Tissier
Etude par Correlation Angulaire γ - γ Perturbee des Interactions
Moleculaires du Chelates $\text{Hf}(\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_2)_4$ avec le Chloroform et la
N,N-dimethylformamide a l'Etat Solide
Molecular Physics, 36(1978), 1037-1052
- /BaBo79/ A. Baudry, P. Boyer, A. Tissier, and P. Vulliet
Hyperfine Quadrupole Coupling and π Bonding in Dodecahedral Chelates
of Hafnium(IV)
Inorganic Chemistry, 18(1979), 3427-3432
- /BaBo81/ A. Baudry, P. Boyer, J.D. Fabris, and P. Vulliet
PAC Study of Molecular Rotational Motions in Dilute Solutions
Hyperfine Interactions, 10(1981), 1057-1062
- /BaBo83/ A. Baudry, P. Boyer, and P. Vulliet
High Resolution TDPAC Experiments with Fast BaF_2 Scintillators
Hyperfine Interactions, 13(1983), 263-269
- /BaBö82/ H. Barfuß, G. Böhnlein, H. Hohenstein, W. Kreisliche, H. Niedrig,
H. Appel, R. Heidinger, J. Raudies, G. Then, and W.-G. Thies
Temperature Dependence of the Electric Field Gradient in CdSe
and HfO_2
Zeitschrift für Physik, B47(1982), 99-102
- /BaSc73/ G.W. Bates and M.R. Schlabach
The Reaction of Ferric Salts with Transferrin
Journal of Biological Chemistry, 248(1973), 3228-3232
- /BaSo81/ D.A. Baldwin and D.M.R. de Sousa
The Effect of Salts on the Kinetics of Iron Release from N-Terminal
and C-Terminal Monoferric Transferrins
Biochemical and Biophysical Research Communications, 99(1981),
1101-1107

- /BaSo82/ D.A. Baldwin, D.M.R. de Sousa, and G. Ford
The Effect of Salts and Detergents on the Relative Lability and
Structure of N-Terminal and C-Terminal Monoferric Transferrin
in: The Biochemistry and Physiology of Iron
P. Saltman and J. Hegenauer, Eds.
Elsevier Biomedical, New York(1982), 57-65
- /Baue85/ R. Bauer
Perturbed Angular Perturbation Spectroscopy and its Application
to Metal Sites in Proteins: Possibilities and Limitations
Quarterly Review of Biophysics, 18(1985), 1-64
- /BeBe69/ R. Beraud, I. Berkes, J. Daniere, G. Marest, and R. Rougny
Effect of Finite Time Resolution on Perturbed Angular Correlation
Measurements
Nuclear Instruments and Methods, 69(1969), 41-44
- /BezK80/ A. Bezkorovainy
Biochemistry of Nonheme Iron
Plenum Press, New York(1980)
- /Blum58/ W.B. Blumenthal
The Chemical Behavior of Zirconium
van Nostrand, Princeton(1958)
- /Blum71/ M. Blume
Perturbed Angular Correlations: Perturbation Factor for Arbitrary
Correlation Times
Nuclear Physics, A167(1971), 81-86
- /BoAb77/ A. Boussaha, J.Ch. Abbe, and A. Haessler
Influence of the Acidity on the Polymerisation of Hf(IV) in Aqueous
Solutions of HfOCl₂ Observed by the Time Differential Perturbed
Angular Correlation Technique
Journal of Inorganic Nuclear Chemistry, 39(1977), 853-855
- /BoBa84/ P. Boyer and A. Baudry
Perturbed Angular Correlation of Gamma Rays
in: Studies in Physical and Theoretical Chemistry
T. Matsuura, Ed.
Elsevier, Amsterdam, 31(1984), 315-347
- /BoSp74/ F. Bosch and H. Spehl
Perturbation of Gamma-Ray Angular Correlations Following Continual
Random Reorientation of the Axis of Interaction
Zeitschrift für Physik, 268(1974), 145-156
- /Broc85/ J.H. Brock
Transferrins
in: Topics in Molecular and Structural Biology
P.M. Harrison, Ed.
Weinheim, Vol. 7(1985), 183-262
- /Brow76/ E.B. Brown
Transferrin: Physiology and Function in Iron Transport
Ciba Foundation Symposium, 51(1976), 125-143

- /BrTh73/ D.C. Bradley and P. Thornton
Zirconium and Hafnium
in: Comprehensive Inorganic Chemistry, Vol. 3
J.C. Bailar, H.J. Emelens, R. Nyholm, and A.F. Trotman-Dickenson, Eds.
Pergamon Press, Oxford(1973), 419-490
- /Budo85/ B. Budowle
Transferrin Subtypes Determined by Ultrathin-Layer Polyacrylamide
Gel Isoelectric Focusing
Electrophoresis, 6(1985), 97-99
- /BuLe83/ T. Butz and A. Lerf
Comment on "Mössbauer Studies of the 6.2 keV γ -Rays of ^{181}Ta in
Ta-Dichalcogenides"
Physics Letters, 97A(1983), 217-218
- /CaCh77/ R.F. Campbell and N.D. Chasteen
An Anion Binding Study of Vanadyl(IV) Human Serotransferrin
Journal of Biological Chemistry, 252(1977), 5996-6001
- /CaCh80/ J.D. Casey and N.D. Chasteen
Vanadyl(IV) Conalbumin. I. Metal Binding Site Configurations
II. Mixed Metal and Anion Binding Studies
Journal of Inorganic Biochemistry, 13(1980), 111-136
- /CaNe68/ T.A. Carlson, C.W. Nestor, T.C. Tucker, and F.B. Malik
Calculation of Electron Shake-Off for Elements from $Z = 2$ to 92
with the Use of Self-Consistent-Field Wave Functions
Physical Review, 169(1968), 27-36
- /Chas77/ N.D. Chasteen
Human Serotransferrin: Structure and Function
Coordination Chemistry Review, 22(1977), 1-36
- /Chas83/ N.D. Chasteen
Transferrin: A Perspective
Advances in Inorganic Biochemistry, 5(1983), 201-233
- /ChWi81/ N.D. Chasteen and J. Williams
The Influence of pH on the Equilibrium Distribution of Iron between
the Metal-Binding Sites of Human Transferrin
Biochemical Journal, 193(1981), 717-727
- /CoWi80/ F.A. Cotton and G. Wilkinson
The Elements of the Second and Third Transition Series
in: Advanced Inorganic Chemistry
Wiley & Sons, New York(1980), 822-831
- /DaCi83/ A. Dautry-Varsat, A. Ciechanover, and H.F. Lodish
pH and the Recycling of Transferrin during Receptor-Mediated
Endocytosis
Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 80(1983),
2258-2262

- /Daut86/ A. Dautry-Varsat
Receptor-Mediated Endocytosis: The Intracellular Journey of
Transferrin and its Receptor
Biochimie, 68(1986), 375-381
- /DeMo82/ T.A. Delaney, W.H. Morgan, and E.H. Morgan
Chemical, but not Functional, Differences between the Iron-Binding
Sites of Rabbit Transferrin
Biochimica et Biophysica Acta, 701(1982), 295-304
- /DuTa86/ J.R. Duffield, D.M. Taylor, and S.A. Proctor
The Binding of Plutonium by Transferrin in the Presence of
Tri-n-Butyl Phosphate or Nitrate and its Release by Diethylene-
triaminepenta-Acetate and the Tetrameric Catechoylamide Ligand
LICAMC(C)
International Journal of Medicine and Biology, 12(1986), 483-487
- /EiNo78/ H.G. van Eijk, W.L. van Noort, M.J. Kroos, and C. van der Heul
Analysis of the Iron Binding Sites of Transferrin by Isoelectric
Focussing
Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry, 16(1978),
557-560
- /EvWi78/ R.W. Evans and J. Williams
Studies of the Binding of Different Iron Donors to Human Serum
Transferrin and Isolation of Iron-Binding Fragments from the
N- and C-Terminal Regions of the Protein
Biochemical Journal, 173(1978), 543-552
- /FaSw71/ M.R. Farukhi and C.F. Swinehart
Barium Fluoride as a Gamma Ray and Charged Particle Detector
IEEE Transactions of Nuclear Science, NS-18(1971), 200-204
- /FeJo69/ F.D. Feiock and W.R. Johnson
Atomic Susceptibilities and Shielding Factors
Physical Review, 187(1969), 39-50
- /Frau84/ H. Frauenfelder
From Atoms to Biomolecules
Helvetica Physica Acta, 57(1984), 165-187
- /FrPe79/ H. Frauenfelder, G.A. Petsko, and D. Tsernoglou
Temperature-Dependent X-Ray Diffraction as a Probe of Protein
Structural Dynamics
Nature, 280(1979), 558-563
- /FrSt65/ H. Frauenfelder and R.M. Steffen
Angular Correlations
in: Alpha-, Beta-, and Gamma-Ray Spectroscopy, Vol. 2
K. Siegbahn, Ed.
North Holland Publishing Company, Amsterdam(1975), 997-1198
- /GaEv86/ R.C. Garrat, R.W. Evans, S.S. Hasnain, and P.F. Lindley
An Extended-X-Ray-Absorption-Fine-Structure Investigation of Diferric
Transferrins and their Iron-Binding Fragments
Biochemical Journal, 233(1986), 479-484

- /GaIs85/ Y. Gauthier and P. Isoard
Proprietes Antimicrobiennes des Transferrines
Bulletin de l'Institut Pasteur, 83(1985), 71-89
- /Gaud66/ M.B. Gaudreau
Comparaison des Composes Fluores du Hafnium et du Zirconium
Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences,
Paris, C263(1966), 67-70
- /GeHa80/ M.H. Gelb and D.C. Harris
Correlation of Proton Release and Ultraviolet Difference Spectra
Associated with Metal-Binding by Transferrin
Archives of Biochemistry and Biophysics, 200(1980), 93-98
- /GoHo79/ B. Gorinsky, C. Horseburgh, P.F. Lindley, D.S. Moss, M. Parkar, and
J.L. Watson
Evidence for the Bilobal Structure of Diferric Rabbit Plasma
Transferrin
Nature, 281(1979), 157-158
- /GrG174/ G. Graf, J.C. Glass, and L.L. Richer
The Application of Perturbed Directional Correlation of Gamma Rays
to the Study of Protein-Metal Interactions
in: Advances in Experimental Medicine and Biology
New York(1974), 639-679
- /HaCa81/ W.R. Harris, C.J. Carrano, V.L. Pecoraro, and K.N. Raymond
Siderophilin Metal Coordination. 1. Complexation of Thorium by
Transferrin: Structure-Function Implications
Journal of the American Chemical Society, 103(1981), 2231-2237
- /HaPa82/ H. Hartmann, F. Parak, W. Steigemann, G.A. Petsko, D. Ringe Ponzi,
and H. Frauenfelder
Conformational Substates in a Protein: Structure and Dynamics of
Metmyoglobin at 80 K
Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 79(1982),
4967-4971
- /Harr77/ D.C. Harris
Different Metal-Binding Properties of the Two Sites of Human
Transferrin
Biochemistry, 16(1977), 560-564
- /Heid81/ R. Heidinger
Die Messung der elektrischen Quadrupolwechselwirkung von ^{181}Ta
in Hf und HfO_2
Diplomarbeit, Kernforschungszentrum und Universität Karlsruhe(1981)
- /Heid85/ R. Heidinger
Die Beobachtung struktureller Phasenübergänge in HfV_2H_x und
 $\text{Zr}_{0.99}\text{Hf}_{0.01}\text{V}_2\text{H}_x$ mit der Methode der gestörten Winkelkorrelationen
Dissertation, Kernforschungszentrum und Universität Karlsruhe(1985)
- /HeTh86/ R. Heidinger, W.-G. Thies, H. Appel, and G. Then
High Resolution ^{181}Hf TDPAC Spectroscopy using Fast BaF_2 -Detectors
VIIth International Conference on Hyperfine Interactions, Bangalore
wird veröffentlicht in Hyperfine Interactions(1987)

- /HoSi68/ J.L. Hoard, E.W. Silverton, and J.V. Silverton
Stereochemistry of Discrete Eight-Coordination. IV. The Structure
of the Bis(nitrilotriacetato)zirconate (IV) Ion in Crystals of
Potassium Salt
Journal of the American Chemical Society, 90(1968), 2300-2308
- /HuBa81/ H.A. Huebers, W. Bauer, E. Huebers, E. Csiba, and C.A. Finch
The Behavior of Transferrin Iron in the Rat
Blood, 57(1981), 218-228
- /HuJo84/ H.A. Huebers, B. Josephson, E. Huebers, E. Csiba, and C.A. Finch
Occupancy of the Iron Binding Sites of Human Transferrin
Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 81(1984),
4326-4330
- /InMa60/ B.I. Intorre and A.E. Martell
Zirconium Complexes in Aqueous Solution. I. Reaction with
Multidentate Ligands
Journal of the American Chemical Society, 82(1960), 358-364
- /JaSa81/ H.C. Jain, M.A.A. Saad, and S.K. Malik
Electric Field Gradient at the Hf Site and the Phase Transition
in HfV₂
Hyperfine Interactions, 11(1981), 177-183
- /KiSi85/ F. Kilar and I. Simon
The Effect of Iron Binding on the Conformation of Transferrin
Biophysical Journal, 48(1985), 799-802
- /KoBa79/ N. Kojima and G.W. Bates
The Reduction and Release of Iron from Fe³⁺.Transferrin.CO₃²⁻
Journal of Biological Chemistry, 254(1979), 8847-8854
- /KoMa80/ S. Koicki, M. Manasijevic, A. Koicki, and B. Cekic
Electric Quadrupole Interactions in Hafnium Sulphates
Hyperfine Interactions, 8(1980), 71-75
- /LaMo83/ M. Laval, M. Moszynski, R. Allemant, E. Cormoreche, P. Guinet,
R. Odru, and J. Vacher
Barium Fluoride - Inorganic Scintillator for Subnanosecond Timing
Nuclear Instruments and Methods, 206(1983), 169-176
- /LeAi79/ A. Leibman and P. Aisen
Distribution of Iron between the Binding Sites of Transferrin in
Serum: Methods and Results in Normal Human Subjects
Blood, 53(1979), 1058-1065
- /LeSh78/ C.M. Lederer and V.S. Shirley, Eds.
Table of Isotopes, Seventh Edition
Wiley & Sons, New York(1978), 1135
- /Lest76/ A.N. Lestas
The Effect of pH upon Human Transferrin: Selective Labelling of
the Two Iron-Binding Sites
British Journal of Hematology, 32(1976), 341-350

- /LiBa86/ P.F. Lindley, S. Bailey, R.W. Evans, R.C. Garrat, B. Gorinsky, S.S. Hasnain, and R. Sarra
Transferrin: A Study of the Iron Binding Sites using Extended X-Ray Absorption Fine Structure and Anomalous Dispersion Techniques
Biochemical Society Transactions, 14(1986), 542-545
- /LukC71/ C.K. Luk
Study of the Nature of the Metal-Binding Sites and Estimate of the Distance between the Metal-Binding Sites in Transferrin using Trivalent Lanthanide Ions as Fluorescence Probes
Biochemistry, 10(1971), 2838-2843
- /LuSm85/ D.J. Lurie, F.A. Smith, and A. Shukri
The Dissociation of Some ^{111}In Chelates in the Presence of Transferrin and Haemoglobin Studied by PAC
International Journal of Applied Radiation and Isotopes, 36(1985), 57-62
- /MaCa83/ J.A. Martinez, M.C. Caracoche, A.M. Rodriguez, P.C. Rivas, and A.R. Lopez Garcia
On the Kinetics of Chemical Reactions in Hafnium Tetrafluorides Using Time Differential Perturbed Angular Correlations
Chemical Physics Letters, 102(1983), 277-280
- /MaMe72/ A.G. Marshall and C.F. Meares
Effect of Slow Rotational Diffusion on Angular Correlations
Journal of Chemical Physics, 56(1972), 1226-1229
- /MaMe82/ R.T.A. MacGillivray, E. Mendez, S.K. Sinha, M.R. Sutton, J. Lineback-Zins, and K. Brew
The Complete Amino Acid Sequence of Human Serum Transferrin
Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 79(1982), 2504-2508
- /MaSk78/ P.W. Martin and K. Skov
In-111 Transferrin Labeling Studied by Perturbed Angular Correlations
Journal of Nuclear Medicine, 19(1978), 1171-1174
- /McGo54/ F.K. McGowan
Angular Correlations of Gamma Rays in ^{181}Ta
Physical Review, 93(1954), 471-477
- /McKa80/ J.A. McCammon and M. Karplus
Simulation of Protein Dynamics
Annual Review of Physical Chemistry, 31(1980), 29-45
- /McMe83/ R.T.A. McGillivray, E. Mendez, J.G. Shewale, S.K. Sinha, J. Lineback-Zins, and K. Brew
The Primary Structure of Human Serum Transferrin
Journal of Biological Chemistry, 258(1983), 3543-3553
- /MoHu78/ E.H. Morgan, H. Huebers, and C.A. Finch
Differences between the Binding Sites for Iron Binding and Release in Human and Rat Transferrin
Blood, 52(1978), 1219-1228

- /MoMa85/ J. Montreuil, J. Mazurier, D. Legrand, and G. Spik
Human Lactoferrin: Structure and Function
in: Proteins of Iron Storage and Transport
G. Spik, J. Montreuil, R.R. Crichton, and J. Mazurier, Eds.
Elsevier, Amsterdam(1985), 25-38
- /Morg74/ E.H. Morgan
Transferrin and Transferrin Iron
in: Iron in Biochemistry and Medicine
A. Jacobs and M. Worwood, Eds.
Academic Press, London(1974), 30-71
- /Morg80/ E.H. Morgan
Comparative Iron Metabolism
in: Iron in Biochemistry and Medicine, II
A. Jacobs and M. Worwood, Eds.
Academic Press, London(1980), 641-687
- /Mukh70/ A.K. Mukherji
Analytical Chemistry of Zirconium and Hafnium
Pergamon Press, Oxford(1970)
- /MuVa60/ G.M. Muha and P.A. Vaughan
Structure of the Complex Ion in Aqueous Solutions of Zirconyl and
Hafnyl Oxyhalides
Journal of Chemical Physics, 33(1960), 194-199
- /OHYe81/ P. O'Hara, S.M. Yeh, C.F. Meares, and R. Bersohn
Distance between Metal-Binding Sites in Transferrin: Energy Transfer
from Bound Terbium (III) to Iron (III) or Manganese (III)
Biochemistry, 20(1981), 4704-4708
- /OkJa79/ S. Okada, B. Jarvis, and E.B. Brown
In Vivo Evidence for the Functional Heterogeneity of Transferrin-
Bound Iron. V. Isotransferrins: An Explanation of the Fletcher-
Huehns Phenomenon in the Rat
Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 93(1979), 189-198
- /Oser65/ B.L. Oser
in: Hawk's Physiological Chemistry, 14th Edition
Blakiston Division McGraw-Hill, New York(1965)
- /PaAr84/ S. Paterson, N.J. Armstrong, B.J. Iacopetta, H.J. McArdle, and
E.H. Morgan
Intravesicular pH and Iron Uptake by Immature Erythroid Cells
Journal of Cellular Physiology, 120(1984), 225-232
- /Para85/ F. Parak
Strukturfluktuationen in Proteinen
Physikalische Blätter, 41(1985), 396-400
- /PaSc85/ I. Park, E. Schaeffer, A. Sidoli, F.E. Baralle, G.N. Cohen, and
M.M. Zakin
Organisation of the Human Transferrin Gene: Direct Evidence that
it Originated by Gene Duplication
Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 82(1985),
3149-3153

- /PeHa81/ V.L. Pecoraro, W.R. Harris, C.J. Carrano, and K.N. Raymond
Siderophilin Metal Coordination. Difference Ultraviolet Spectroscopy
of Di-, Tri-, and Tetravalent Metal Ions with Ethylenebis[(ortho-
hydroxyphenyl)glycine]
Biochemistry, 20(1981), 7033-7039
- /Perr34/ F. Perrin
Mouvement Brownien d'un Ellipsoïde. (I). Dispersion Dielectrique
pour des Molecules Ellipsoidales
Journal de Physique et le Radium, 5(1934), 497-511
- /PhSm81/ M.E. Philips and F.A. Smith
Formation of Hafnium(IV) Compounds in a Range of Acidities
Hyperfine Interactions, 10(1981), 1063-1068
- /PrZa75/ J.V. Princiotto and E.J. Zapolski
Difference between the Two Iron-Binding Sites of Transferrin
Nature, 255(1975), 87-88
- /PrZa76/ J.V. Princiotto and E.J. Zapolski
Functional Heterogeneity and pH-Dependent Dissociation Properties
of Human Transferrin
Biochimica et Biophysica Acta, 428(1976), 766-771
- /RaRa73/ R.S. Raghavan, P. Raghavan, and J.M. Friedt
Nuclear Quadrupole Interactions of the Excited States of ^{117}In
and ^{111}Cd in Cd Compounds
Physical Review Letters, 30(1973), 10-13
- /Rinn79/ H.H. Rinneberg
Applications of Perturbed Angular Correlations to Chemistry and
Related Areas of Solid State Physics
Atomic Energy Review, 17(1979), 477-595
- /RoSc84/ A.L. Roe, D.J. Schneider, R.J. Mayer, J.W. Pyrz, J. Widom, and L. Que
X-Ray Absorption Spectroscopy of Iron-Tyrosinate Proteins
Journal of the American Chemical Society, 106(1984), 1676-1681
- /RoSo71/ M.Y. Rosseneu-Motreff, F. Soetewey, and R. Lamote
Size and Shape Determination of Apotransferrin and Transferrin
Monomers
Biopolymers, 10(1971), 1039-1048
- /SaHa78/ K.S.R. Sastry, G.J. Hallee, M.E. Ottlinger, and E.W. Westhead
Some Biophysical Applications of Perturbed Gamma-Ray Angular
Correlations
Hyperfine Interactions, 4(1978), 891-905
- /Schr44/ E. Schrödinger
What is Life?
Cambridge University Press(1944)
- /ScWa71/ G. Schmidt and H.F. Wagner
Investigations of Statistically Perturbed Angular Correlations of
 ^{181}Ta at Different Temperatures
Zeitschrift für Physik, 242(1971), 102-106

- /SeBa75/ M.R. Schlabach and G.W. Bates
The Synergistic Binding of Anions and Fe³⁺ by Transferrin
Journal of Biological Chemistry, 250(1975), 2182-2188
- /ShHa72/ D.A. Shirley and H. Haas
Perturbed Angular Correlation of Gamma Rays
Annual Review of Physical Chemistry, 23(1972), 385-414
- /SiSc84/ G.P. Singh, H.J. Schink, H. von Löhneysen, F. Parak, and
S. Hunklinger
Excitations in Metmyoglobin Crystals at Low Temperatures
Zeitschrift für Physik, B55(1984), 23-26
- /SmLu84/ F.A. Smith, D.J. Lurie, F. Brady, H.J. Danpure, M.J. Kensett,
S. Osman, D.J. Silvester, and S.L. Waters
PAC Studies of ¹¹¹In Binding to Transferrin, Tropolone, and
Acetylacetonone in Aqueous Solutions
International Journal of Applied Radiation and Isotopes, 35(1984),
501-506
- /SpOo73/ K. Spartalian and W.T. Oosterhuis
Mössbauer Effect Studies of Transferrin
Journal of Chemical Physics, 59(1973), 617-622
- /StAl75/ R.M. Steffen and K. Alder
Extranuclear Perturbations of Angular Correlations
in: The Electromagnetic Interaction in Nuclear Spectroscopy
W.D. Hamilton, Ed.
North Holland Publishing Company, Amsterdam(1975), 583-643
- /StDe84/ L. Stoddard, W. Dennis, R.M. Parvin, and O.W. van Assendelft
Freeze/Thaw Stability of Transferrin and Reference Values Obtained
with Kinetic Nephelometry
Clinical Chemistry, 30(1984), 114-115
- /TaDu86/ D.M. Taylor and J.R. Duffield
The Binding of Hafnium to Human Transferrin
noch unveröffentlichte Daten
- /TaLe83/ D.M. Taylor, M. Lehmann, F. Planas-Bohne, and A. Seidel
The Metabolism of Radiohafnium in Rats and Hamsters: A Possible
Analog of Plutonium for Metabolic Studies
Radiation Research, 95(1983), 339-358
- /TaPl85/ D.M. Taylor and F. Planas-Bohne
The Retention of Metallic Radionuclides in Experimental Abscesses
in Rats
British Journal of Radiology, 58(1985), 655-659
- /TaWo69/ A.T. Tan and R.C. Woodworth
Ultraviolet Difference Spectral Studies of Conalbumin Complexes
with Transition Metals
Biochemistry, 8(1969), 3711-3716
- /Test85/ U. Testa
Transferrin Receptors: Structure and Function
Current Topics in Hematology, 5(1985), 127-161

- /ThAp83/ G. Then, H. Appel, J.H. Raudies, W.-G. Thies, J. Duffield, and D.M. Taylor
The Binding of Hafnium to Nitriilotriacetate
Hyperfine Interactions, 15/16(1983), 889-892
- /ThAp86/ G. Then, H. Appel, J. Duffield, D.M. Taylor, and W.-G. Thies
In Vivo and In Vitro Studies of Hafnium-Binding to Rat Serum Transferrin
Journal of Inorganic Biochemistry, 27(1986), 255-270
- /Then82/ G. Then
Untersuchung der Bindungsverhältnisse in Hafniumkomplexen mit Hilfe der zeitdifferenziellen Beobachtung von gestörten Winkelkorrelationen
Diplomarbeit, Kernforschungszentrum und Universität Karlsruhe(1982)
- /ThiA86/ W.-G. Thies, H. Appel, R. Heidinger, and G. Then
Temperature Dependence of the Electric Field Gradient in $\text{HfF}_4 \cdot \text{HF} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Hyperfine Interactions, 30(1986), 153-165
- /Thun71/ J.E. Thun
The Influence of After Effects on Angular Correlation Measurements in: Angular Correlation in Nuclear Disintegration
H. van Krugten and B. van Noijen, Eds.
Rotterdam University Press, Wolters-Nordhoff Publishing, Groningen(1971), 78-97
- /ThZe83/ G. Then, I. Zell, H. Appel, W.-G. Thies, J. Duffield, and D.M. Taylor
Hafnium Binding to Rat Serum Transferrin
Hyperfine Interactions, 15/16(1983), 893-896
- /TsBo73/ C.P. Tsang, A.J.F. Boyle, and E.H. Morgan
Mössbauer Spectroscopy of Iron in Human and Rabbit Transferrin
Biochimica et Biophysica Acta, 328(1973), 84-94
- /TsBo76/ C.P. Tsang, L. Bogner, and A.J.F. Boyle
Further Mössbauer Study of Iron in Human Transferrin
Journal of Chemical Physics, 65(1976), 4584-4589
- /Valv83/ Valvo Datenbuch
Fotovervielfacher 1983
Hamburg(1983), 169
- /VuBa78/ P. Vulliet, A. Baudry, P. Boyer, and A. Tissier
Perturbed Angular Correlation Measurements of Electric Field Gradient at the Metal Site in $\text{M}_4(\text{C}_2\text{O}_4)_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (M=Na, K, Rb, Cs, NH_4) Compounds
Chemical Physics Letters, 55(1978), 297-302
- /Wall67/ D. Wallach
Effect of Internal Rotation on Angular Correlation Functions
Journal of Chemical Physics, 47(1967), 5258-5268
- /WiCh82/ J. Williams, N.D. Chasteen, and K. Moreton
The Effect of Salt Concentration on the Iron-Binding Properties of Human Transferrin
Biochemical Journal, 201(1982), 527-532

- /WiEl82/ J. Williams, T.C. Elleman, I.B. Kingston, A.G. Wilkins, and K.A. Kuhn
The Primary Structure of Hen Ovotransferrin
European Journal of Biochemistry, 122(1982), 297-303
- /WiKä84/ K. Wisshak and F. Käppeler
Large Barium Fluoride Detectors
Nuclear Instruments and Methods, 227(1984), 91-96
- /Will85/ J. Williams
The Structure of Transferrins
in: Proteins of Iron Storage and Transport
G. Spik, J. Montreuil, R.R. Crichton, and J. Mazurier, Eds.
Elsevier, Amsterdam(1985), 13-23
- /Wils76/ E.J. Wilson
Perturbed Angular Correlation Studies of Chemically Generated
Electric Quadrupole Interactions
Ph.D. Thesis, Carnegie-Mellon University, Pittsburgh(1976)
- /WiMo80/ J. Williams and K. Moreton
The Distribution of Iron between the Metal-Binding Sites of
Transferrin in Human Serum
Biochemical Journal, 185(1980), 483-488
- /WiSe81/ R. Winter and A. Seidel
The Influence of an Iron-Sorbitol-Citrate Complex on the Deposition
of Monomeric ^{239}Pu in Four Rodent Species
Health Physics, 40(1981), 100-104
- /WiTa85/ R. Wirth, D.M. Taylor, and J. Duffield
Identification of Transferrin as the Principal Neptunium-Binding
Protein in the Blood Serum of Rats
International Journal of Nuclear Medicine and Biology, 12(1985),
327-330
- /YeMe80/ S.M. Yeh and C.F. Meares
Characterization of Transferrin Metal-Binding Sites by Diffusion-
Enhanced Energy Transfer
Biochemistry, 19(1980), 5057-5062
- /ZaAi85/ O. Zak and P. Aisen
Iron is not Randomly Distributed between the Binding-Sites of
Circulating Human Transferrin
in: Proteins of Iron Storage and Transport
G. Spik, J. Montreuil, R.R. Crichton and J. Mazurier, Eds.
Elsevier, Amsterdam(1985), 61-64
- /ZaLe83/ O. Zak, A. Leibman, and P. Aisen
Metal-Binding Properties of a Single-Sited Transferrin Fragment
Biochimica et Biophysica Acta, 742(1983), 490-495
- /ZaPr77/ E.J. Zapolski and J.V. Princiotto
Transferrin Iron-Binding: Observation on Nonrandom (Heterogeneous)
Binding
in: Proteins of Iron Metabolism
E.B. Brown, P. Aisen, J. Fielding, and R.R. Crichton, Eds.
Grune & Stratton, New York(1977), 205-210

- /ZaPr80/ E.J. Zapolski and J.V. Princiotta
Binding of Iron from Nitrilotriacetate Analogues by Human Transferrin
Biochemistry, 19(1980), 3599-3603
- /Zell84/ I. Zell
Beobachtung der zeitabhängigen elektrischen Quadrupolwechselwirkung
in Hf-NTA-Lösungen
Diplomarbeit, Kernforschungszentrum und Universität Karlsruhe(1984)
- /ZmLo72/ H. Zmora, L.M. Lowe, and W.V. Prestwich
Quadrupole Interaction of ^{181}Ta in Hafnium Oxychloride
Canadian Journal of Physics, 50(1972), 2054-2057
- /ZwAi79/ J. Zweier, P. Aisen, J. Preisach, and W.B. Mims
Pulsed Electron Paramagnetic Resonance Studies of the Copper
Complexes of Transferrin
Journal of Biological Chemistry, 254(1979), 3512-3515
- /ZwWo81/ J.L. Zweier, J.B. Wooten, and J.S. Cohen
Studies of Anion Binding by Transferrin Using Carbon-13 Nuclear
Magnetic Resonance Spectroscopy
Biochemistry, 20(1981), 3505-3510