

**EINFLUSS ELEKTRISCHER FELDER
AUF STRUKTUR UND FUNKTION VON TRYPSIN**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Physik
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von
Friederike Weimer
aus Staufenberg

Gießen, August 1999

D 26

Dekan:

Prof. Dr. K-H. Schartner

Erster Gutachter:

Prof. Dr. J. Kiefer

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. G. Gundlach

Dritter Prüfer:

Prof. Dr. W. Scheid

Tag der mündlichen Prüfung:

3.9.1999

INHALTSVERZEICHNIS

1 MOTIVATION	1
2 EINLEITUNG	3
2.1 ELEKTROMAGNETISCHE FELDER	3
2.1.1 Zeitliche Einordnung	3
2.1.2 Allgemeine physikalische Grundlagen	5
2.1.3 Einfluß elektrischer Felder auf biologische Strukturen	7
2.1.3.1 Einfluß starker elektrischer Felder	7
2.1.3.2 Einfluß hoher Frequenzen	8
2.1.3.3 Einfluß niedriger Frequenzen	10
2.1.3.4 Wechselwirkung mit der Zellmembran	11
2.2 TRYPSIN (E.C. 3.4.4.4)	13
3 MATERIAL UND METHODEN	16
3.1 ALLGEMEINE METHODEN	17
3.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	17
3.1.2 Bestimmung der Enzymaktivität	19
3.1.2.1 Bestimmung der tryptischen Enzymaktivität mit BAPA	20
3.1.2.2 Bestimmung der tryptischen Enzymaktivität mit BAEE	22
3.1.2.3 Bestimmung der tryptischen Enzymaktivität mit TAME	24
3.1.3 Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten für die Enzymaktivitätsmessungen	25
3.1.3.1 Molarer Extinktionskoeffizient für die Aktivitätsmessung mit BAPA als Substrat	26
3.1.3.2 Molarer Extinktionskoeffizient für die Aktivitätsmessung mit BAEE als Substrat	27
3.1.3.3 Molarer Extinktionskoeffizient für die Aktivitätsmessung mit TAME als Substrat	28
3.1.4 K_m-Wert von Trypsin für das Substrat BAPA	29

3.2 IMMOBILISIERUNG DES TRYPSINS	31
3.2.1 Allgemeine Voraussetzungen	31
3.2.1.1 Reaktionsschemata	33
3.2.2 Herstellung des immobilisierten Trypsins	34
3.2.3 Bestimmung des am Carrier gebundenen Trypsins	35
3.2.4. Enzymaktivität des immobilisierten Trypsins	36
3.3 KONTINUIERLICHE MESSUNG VON IMMOBILISIERTEM TRYPSIN	38
3.3.1 Allgemeine Voraussetzungen	38
3.3.2 Säule	39
3.3.3 Versuchsaufbau	40
3.3.4 Durchflußmessung und -konstanz	42
3.3.5 Temperaturmessung und -konstanz	43
3.3.6 Enzymaktivitätsmessung im Durchfluß	44
3.3.7 Wahl des Substrates	45
3.3.8 Stabilität des Substrates BAPA (Lösungsverhalten)	45
3.3.9 Bestimmung der pH-Abhängigkeit für das immobilisierte Trypsin	46
3.3.10 Bestimmung der Temperatur-Abhängigkeit für das immobilisierte Trypsin	47
3.4. UNTERSUCHUNGEN ZUR DENATURIERUNG VON IMMOBILISIERTEM TRYPSIN	49
3.4.1 Allgemeine Voraussetzungen	49
3.4.2 Denaturierung mit Harnstoff	49
3.4.2.1 Reversibilität der Denaturierung durch Harnstoff	50
3.4.3 Einfluß von Salzen auf die Denaturierung durch Harnstoff	51

3.5. APPLIKATION ELEKTRISCHER FELDER	53
3.5.1 Versuchsaufbau	53
3.5.1.1 Feldstärkeberechnung	55
3.5.2 Denaturierung bei den Durchflußmessungen mit Applikation eines elektrischen Feldes	57
3.5.2.1 Dichtebestimmung der Denaturierungspuffer	58
3.5.3 Auswertung des Effekts	59
4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	60
4.1 BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE	60
4.1.1 Enzymaktivität des bovinen Trypsins	60
4.1.2 Molare Extinktionskoeffizienten der Substrate für Trypsin	61
4.1.3 K_m-Wert für Trypsin gegenüber dem Substrat BAPA	62
4.2 IMMOBILISIERUNG VON TRYPSIN	63
4.2.1 Inkubationszeiten	63
4.2.2 Am Carrier gebundenes Trypsin	64
4.2.3 Aktivität des immobilisierten Trypsins	65
4.2.4 Abhängigkeit der Enzymaktivität des immobilisierten Trypsins vom pH-Wert	66
4.2.5 Abhängigkeit der Enzymaktivität des immobilisierten Trypsins von der Temperatur	68
4.3 DENATURIERUNG VON IMMOBILISIERTEM TRYPSIN	74
4.3.1 Denaturierung mit Harnstoff	74
4.3.1.1 Reversibilität der Denaturierung	75
4.3.2 Einfluß von Salzen auf die Denaturierung durch Harnstoff	76
4.3.3 Einfluß von DMSO auf die Enzymaktivität	78

4.4 APPLIKATION ELEKTRISCHER FELDER	79
4.4.1 Applikation eines elektrischen Feldes mit Netzfrequenz	79
4.4.1.1 Befeldung ohne Zusatz von denaturierenden Agentien	79
4.4.1.2 Befeldung unter Zusatz von Harnstoff	80
4.4.1.3 Befeldung unter Zusatz von Harnstoff und Salz	82
4.4.2 Applikation eines elektrischen Feldes mit variabler Frequenz	84
4.4.2.1 Befeldung ohne Zusatz von denaturierenden Agentien	84
4.4.2.2 Befeldung unter Zusatz von Harnstoff	84
4.4.2.3 Befeldung unter Zusatz von Harnstoff und Salz	86
4.4.3 Theoretische Betrachtungen	88
4.4.3.1 Der Einfluß von elektrischen Feldern auf einfache molekulare Dipole in wäßrigem Medium	88
4.4.3.2 Der Einfluß des elektrisches Feldes auf die Enzymmoleküle im Modell	91
4.4.3.3 Der Einfluß von elektrischen Feldern auf "aufgeweichte" Enzymmoleküle	96
4.4.3.4 Der Einfluß von elektrischen Feldern auf Substratmoleküle in wäßrigem Medium	97
4.4.1.5 Der Einfluß von elektrischen Feldern auf die Wechselwirkung zwischen Substrat und Enzym	105
4.4.4 Vergleich der theoretischen Überlegungen mit den praktischen Ergebnissen	106
5 ZUSAMMENFASSUNG	110
6 LITERATUR	112
ANHANG	127

1 MOTIVATION

Seit längerer Zeit wird der Einfluß nichtionisierender elektromagnetischer Strahlung auf den biologischen Organismus und die Mechanismen, die diesem Einfluß zugrunde liegen diskutiert. Für den hochfrequenten Bereich der UV-Strahlung und der Mikro- und Radiowellen sind die physikalischen Wechselwirkungsmechanismen und deren Effekte auf den biologischen Organismus schon größtenteils bekannt und gut untersucht. Für den niedrigen Frequenzbereich sind erklärende Mechanismen noch weitgehend unbekannt. Dennoch werden in der Öffentlichkeit immer wieder Effekte durch niederfrequente elektromagnetische Strahlung kontrovers diskutiert. Bei den bisher bekannten Studien werden zumeist *in vitro*-Systeme wie Zellkulturen oder sogar *in vivo*-Systeme an Tieren eingesetzt. Diese Systeme sind durch ihre Komplexität sehr schwierig zu untersuchen und die beobachteten Effekte nicht klar als Wechselwirkungen mit dem elektromagnetischen Feld zu deuten. Daher ist es sinnvoll, auf eine subzelluläre Ebene zu gehen und biologisch relevante Moleküle direkt zu untersuchen. In Frage kommen in diesem Zusammenhang die DNA als Träger der genetischen Substanz und Proteine, die über ihre Ladungen einer Wechselwirkung mit dem elektromagnetischen Feld ausgesetzt durch eine daraus folgende Dysfunktion einen indirekten Schaden auf den biologischen Organismus bewirken.

Die Zielsetzung für diese Arbeit war daher, den Einfluß eines elektrischen Feldes auf ein Proteinmolekül direkt zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollte

- Ein geeignetes Protein ausgewählt werden
- Eine Methode zur Stabilisierung des Moleküls im Feld entwickelt werden
- Eine Methode für die Meßbarkeit eines Effektes durch ein elektrisches Feld auf das Molekül entwickelt werden
- Mögliche Effekte durch das elektrische Feld frequenzabhängig und abhängig vom Zustand des Moleküls untersucht werden
- Diese Effekte ausgewertet und in Bezug zu den möglichen zugrundeliegenden physikalischen Mechanismen gesetzt werden

Voraussetzung für die Untersuchung eines Enzymproteins war die kontinuierliche Abtrennung der Reaktionsprodukte als Meßparameter für die biologische Aktivität des Enzyms. Nur unter einer solchen Bedingung konnte das Enzym in einer definierten Zeitspanne der Wirkung eines elektrischen Feldes ausgesetzt werden. Die Bindung des aktiven Enzyms an eine unlösliche Matrix mit der Möglichkeit der kontinuierlichen Messung des Substratumsatzes als Parameter für die biologische Aktivität sollte die Untersuchung des Einflusses eines elektrischen Feldes ermöglichen. Bei der Bindung an einen unlöslichen Carrier sollte darauf geachtet werden, daß das Molekül durch seine Bindung für das Substrat und das elektrische Feld gleichermaßen zugänglich bleibt.

Als Proteinmolekül wurde das Enzym Trypsin ausgewählt, da dieses sich über seine vielen Lysin-Reste an eine Matrix koppeln läßt. Auch kann seine Aktivität als biologisch relevanter Parameter photometrisch verfolgt werden. Ein weiterer Aspekt war, daß Trypsin in der Substratbindungstasche einen negativ geladenen sauren Rest besitzt, dessen mögliche Beeinflussung durch ein elektrisches Feld aufschlußreich wäre.

Technisch sollte eine Durchflußmethode eingesetzt werden, um den Einfluß eines elektrischen Feldes messen zu können.

2 EINLEITUNG

2.1 ELEKTROMAGNETISCHE FELDER

2.1.1 Zeitliche Einordnung

Schon seit Leben auf der Erde existiert, entwickelt sich dieses unter dem Einfluß der natürlichen elektromagnetischen Felder der Sonne und der Atmosphäre. Diese durch globale Wetterbedingungen hervorgerufenen atmosphärischen elektrischen Gleichfelder können zeitweilig eine Stärke von bis zu 100-150 V/m erreichen. Ein statisches Erd-Magnetfeld von etwa 50 μ T, elektromagnetische Wellen aus der Troposphäre im Bereich von mV/m- V/m und atmosphärischen Ionen sollen nicht unerwähnt bleiben (REITER, 1993).

Mit diesem Jahrhundert hat sich diese Situation durch die Einführung technischer Quellen für elektromagnetische Felder in Bereichen der Kommunikation, Navigation, Industrie und Haushalt stark verändert, so daß Lebewesen auf der Erde zum Teil um Größenordnungen höheren Belastungen durch artifizielle elektromagnetische Felder ausgesetzt sind als durch die natürlichen (SZMIGIELSKI, 1993).

Aus diesem Grund begannen auch mit diesem Jahrhundert die ersten Untersuchungen zu biologischen Effekten der elektromagnetischen Felder. Man wollte generell etwas über die ‚elektrischen‘ Eigenschaften von biologischem Gewebe erfahren und z. B. die Risiken abschätzen, die bei der Verwendung elektromagnetischer Felder für Therapiemaßnahmen durch die Entwicklung der ersten UKW-Diathermie-Geräte auftreten können (SCHWAN, 1993).

Die meisten Untersuchungen mit den zuverlässigsten Ergebnissen beziehen sich auf den Bereich der hochfrequenten elektromagnetischen Radiofrequenzfelder. Debye entwickelte die dielektrische Theorie und in den späten 30iger Jahren wird deren Anwendung auf polare und biologische Moleküle getestet. Von Oncley und Mitarbeitern gibt es Studien zu den Eigenschaften von Proteinen im Radiofrequenz-Bereich. Schon 1910 gibt es die

ersten Untersuchungen über den Einfluß von elektromagnetischen Feldern auf die Zellmembran und deren Frequenzabhängigkeit (SCHWAN, 1993).

Seit den 40iger bis 50iger Jahren werden technische Quellen elektromagnetischer Felder mit Frequenzen bis in den GHz-Bereich gebaut. Die Untersuchungen zu dielektrischen Eigenschaften und entsprechenden Relaxationsprozessen im Gewebe wurden bis in diesen Frequenzbereich ausgeweitet. Auch nichtthermale Effekte wurden dabei untersucht. Allerdings gibt es bis heute noch keine fundierten Erkenntnisse über einen möglichen Wechselwirkungsmechanismus zwischen den elektromagnetischen Feldern und dem Gewebe, durch den Effekte verursacht werden könnten (SCHWAN, 1993).

Bis vor 20 Jahren gab es nur vereinzelt Studien zu Effekten von elektromagnetischen Feldern mit niedrigen Frequenzen wie ELF (extremely low frequencies) und VLF (very low frequencies). Diesen wird von vielen Wissenschaftlern ihrer geringen Leistung wegen kein Einfluß auf das Gewebe und damit die Vernachlässigbarkeit gegenüber der thermischen Energie im Gewebe zugesprochen (SCHNEIDER, 1995).

Erst in jüngster Zeit werden auch Effekte durch Felder niedriger Frequenzen Effekte auf das biologische Gewebe mit Aufmerksamkeit untersucht. Als Beispiele seien Therapieansätze mit ELF-Feldern z. B. zur Knochenheilung und erste epidemiologische Studien zum Zusammenhang zwischen ELF-Feldern hervorgerufen durch Hochspannungsleitungen und einer vermuteten erhöhten Inzidenz der Krebsentstehung erwähnt (MARINO, 1995). Allerdings werden diese Studien durch zu ungenaue Messungen, zu geringe Datenmengen, die Schwierigkeit der retrospektiven Messung und wegen dem gleichzeitigen Einfluß anderer kanzerogener Reagentien kontrovers diskutiert (SCHREIBER et al., 1993). Auch gibt es nur sehr bedingt positive Laborstudien, welche epidemiologische Zusammenhänge unter dem Einfluß elektromagnetischer Felder auf die Gentranskription oder Effekte auf die Tumorpromotion in Tierstudien belegen könnten (PHILLIPS, 1993; HOLMBERG, 1995).

Andererseits glaubt man Veränderungen in der Zelle nach Belastung durch schwache niederfrequente elektromagnetische Felder, wie sie z. B. durch Hochspannungsleitungen entstehen, erkennen zu können. Dazu gehören z. B. Effekte auf die Zell-Zell-Erkennung, die Calcium-Homöostase, das Immunsystem, die Proteinexpression und die DNA-Synthese. Bei Tierstudien sind Effekte auf den biologischen Rhythmus über den Einfluß auf Melatonin, auf die Immunfunktion und auf ihre Verhaltensweise festgestellt worden (FLORIG, 1992). Leider lassen sich diese Effekte bis jetzt noch durch keinen geeigneten Mechanismus erklären. Damit verbunden gibt es bisher keinen Beweis für die Existenz eines molekularen, zellulären oder systemischen Schadens durch schwache elektromagnetische Felder (MACKLIS, 1993).

Die Analyse gemessener physiologischer Antworten auf die elektromagnetischen Felder führt bisher zu kontroversen Erkenntnissen (STONE, 1992). Die Reproduzierbarkeit der Effekte ist bislang nicht gewährleistet (SZMIGIELSKI, 1993). Dies könnte darauf hindeuten, daß für biologische Systeme bei einer Störung durch elektromagnetische Felder keine direkte Dosis-Wirkungs-Beziehung existiert. Außerdem könnte es auf Schwierigkeiten hinweisen, die initialen Bedingungen für eine Antwort des biologischen Systems auf eine Störung reproduzierbar einhalten zu können (MARINO, 1995).

2.1.2 Allgemeine physikalische Grundlagen

Elektromagnetische Felder lassen sich nach ihrer Energie in ionisierende Strahlung wie Gamma- und Röntgenstrahlen und in nichtionisierende Strahlung unterteilen (Abb. 2-1). Zu letzterer gehören sowohl die ultraviolette Strahlung (UV) und das sichtbare Spektrum als auch Infrarot (IR) und die Mikrowellen (MW), die Radiowellen und schließlich die Felder mit niedrigen Frequenzen wie sie z. B. durch Hochspannungsleitungen entstehen.

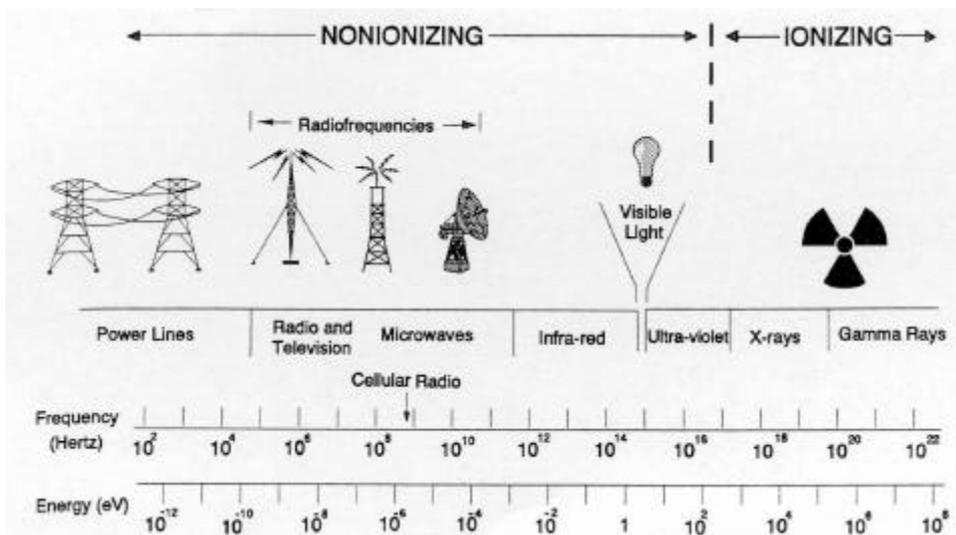


Abb. 2-1: Spektrum der elektromagnetischen Strahlung (aus CLEVELAND, 1994)

Elektromagnetische Felder setzen sich zusammen aus elektrischen und magnetischen Komponenten, die für Frequenzen über 100 kHz als gekoppelte sich ausdehnende Felder mit Strahlungsanteil beschrieben werden müssen (DENO und CARPENTER, 1994). Für niedrige Frequenzen können elektrische und magnetische Felder als quasistationär getrennt behandelt werden (Abb. 2-2), insbesondere, wenn die Wellenlänge der Felder weitaus größer als die Dimension des befeldeten Objekts ist (POLK, 1991). Die Wirkung des elektrischen Feldes auf biologisches Gewebe erfolgt dabei direkt, die des magnetischen Feldes über die Verknüpfung mit einem elektrischen Feld über die zeitliche Änderung (BERNHARDT, 1983). Das elektrische Feld wird beim Eindringen in biologisches Gewebe, das ein Dielektrikum darstellt, durch die mehr oder weniger hohe Leitfähigkeit im Gewebe abgeschwächt (BOIKAT, 1993). Magnetische Felder werden im Gewebe praktisch nicht verändert, da durch die leicht diamagnetische Beschaffenheit des biologischen Gewebes dort nahezu die gleiche magnetische Permeabilität wie außerhalb herrscht (POLK, 1991).

Wavelength (m)	Frequency Hz	Frequency-band designations					
3×10^7	3	ELF, extra low frequency	Quasi-static field theory E and B do not propagate and are not coupled fields				
	10						
3×10^6	30	VF, voice frequency		↓			
	100						
3×10^5	300	VLF, Very low frequency			↓		
	1 kHz = 10^3 Hz						
3×10^4	3	LF, low frequency				↓	
	10						
3×10^3	30	MF, medium frequency					E and B propagate as coupled fields
	100						
3×10^2	300	HF, high frequency	↓				
	1 MHz = 10^6 Hz						
3×10^1	3	VHF, very high frequency		↓			
	10						
3×10^0	30	UHF, ultrahigh frequency			↓		
	100						
3×10^{-1}	300	SHF, superhigh frequency				↓	
	1 GHz = 10^9 Hz						
3×10^{-2}	3	EHF, extremely high frequency					↓
	10						
3×10^{-3}	30		↓				
	100						
3×10^{-4}	300			↓			

Abb. 2-2: Einteilung der elektromagnetischen Strahlung (aus DENO und CARPENTER, 1994)

Die Mechanismen für Schäden auf biologisches Gewebe durch ionisierende Strahlung und auch durch UV sind gut untersucht und großen Teils bekannt. Für die nichtionisierende Strahlung mit Frequenzen unterhalb von 10^5 GHz sind diese Einflüsse auf biologische Strukturen bisher nicht genügend geklärt. Bei ELF-Feldern sind die Zusammenhänge bislang noch völlig offen.

2.1.3 Einfluß elektrischer Felder auf biologische Strukturen

Durch elektrische Felder hervorgerufene Effekte auf biologische Strukturen sind einmal abhängig von der Stärke und zum anderen von der Frequenz des Feldes.

2.1.3.1 Einfluß starker elektrischer Felder

Bei der Wechselwirkung von starken elektrischen Feldern mit biologischem Gewebe kommt es zur Induktion hoher Ströme (> 1 A/m²) und damit zur Erwärmung des Gewebes. Niedrigere Stromdichten (ca. 0.2 A/m²) können zur Stimulierung von Nerven und Muskeln

führen, noch niedrigere Stromdichten ($<10^{-2}$ A/m²) können das Wachstum von Zellen und innerzelluläre Prozesse beeinflussen (BARNES, 1992). In Zellen kann es bei hohen Feldstärken außerdem zu Veränderungen in der äußeren Form und auch zu Zellaggregationen kommen (BERG, 1987). Diese Prozesse hängen stark vom Radius des Objektes ab. Für Proteine werden erst oberhalb einer Schwellenfeldstärke von 100 kV/cm Effekte erwartet (BERNHARDT, 1983).

2.1.3.2 Einfluß hoher Frequenzen

Bei der Wechselwirkung von elektromagnetischen Feldern hoher Frequenzen mit biologischem Gewebe kann es auf molekularer Ebene zu drei Prozessen kommen (BERNHARDT, 1983):

- a) Wärmewirkung durch:
 - i) Wirkung auf freie Ladungsträger, wobei Ströme erzeugt werden und Joule'sche Wärme entsteht
 - ii) Orientierung molekularer Dipole
 - iii) Anregung von Molekülen zu Schwingung und Rotation, wobei die Relaxationsfrequenzen bei 10^6 - 10^{12} Hz liegen (β -, δ -, γ -Dispersion)
- b) Erzeugung von Potentialdifferenzen durch Ladungsverschiebungen, die durch Überlagerung des Membranpotentials dann zu Nerven- oder Muskelregung führen können
- c) Felderzeugte Kraftwirkungen durch die Wirkung eines induzierten Dipols auf andere Dipole in seiner Umgebung und damit der Übergang in einen Zustand größeren elektrischen Moments

Bei diesen hohen Frequenzen spielt auch die Wechselwirkung eines elektrischen Feldes mit Makromolekülen und dem Wasser im Gewebe eine große Rolle. Proteine zeigen hier die nach Debye typische dielektrische Relaxation durch die Orientierungspolarisation mit einer β -, δ - und γ -Dispersion bei Frequenzen von etwa

10 kHz bis in den GHz-Bereich (Abb. 2-3). Damit zusammen hängt der dielektrische Verlust (ϵ'') durch die Entstehung Joule'scher Wärme und entsprechend die Abnahme der Dielektrizitätskonstante (ϵ'). Die β -Dispersion entsteht durch die Ausrichtung des gesamten als Dipol wirkenden Proteinmoleküls im Feld, die δ -Dispersion kommt durch die Ausrichtung einzelner polarer Seitenketten im Molekül oder des am Molekül gebundenem Wasser zustande und die γ -Dispersion stammt von der Relaxation der das Protein umgebenden freien Wassermolekülen (BONE und ZABA, 1992).

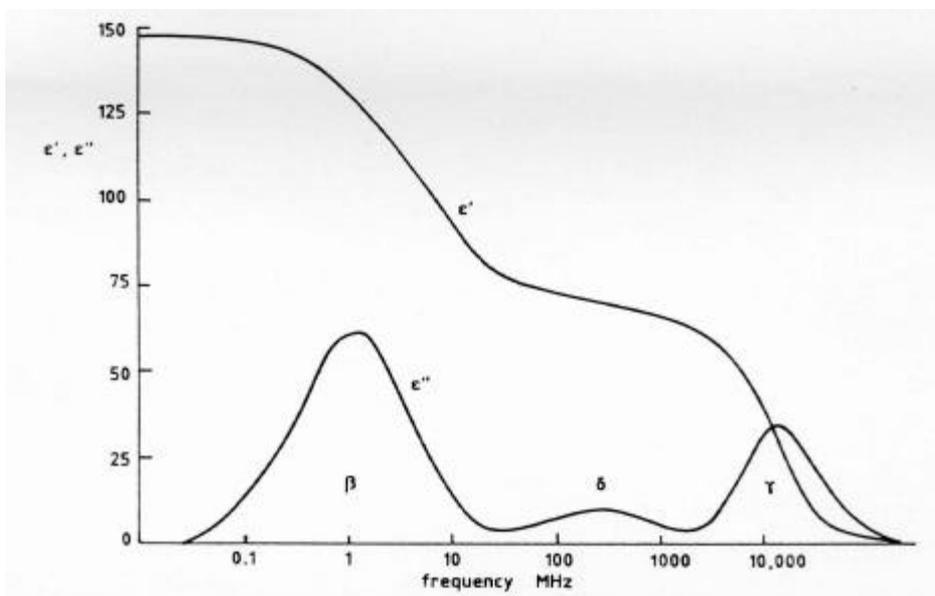


Abb. 2-3: Dispersionsspektrum eines Proteins in Lösung (aus BONE und ZABA, 1992)

Eine Denaturierung des Proteins ist dabei durch die direkte Wechselwirkung des Feldes mit den Proteinen über Rotations-Relaxationen im MHz-Bereich und durch die indirekte Wechselwirkung über die Absorption von Mikrowellen durch das Lösungsmittel und dessen Erwärmung möglich (YEARGERS et al., 1975).

Eine Vergrößerung des elektrischen Moments eines Proteins kann außer durch die Ausrichtung von molekularen Dipolen und die Induktion von Dipolen durch die Polarisierbarkeit des Moleküls erreicht werden durch Dissoziation ionisierbarer Gruppen, die Bewegung geladener Seitenketten sowie durch Konformationsänderungen mit Vergrößerung des Dipolmoments. Hierbei ändern sich Lage und Packung von α -

Helices, der Gehalt an α -Helices oder "ß-sheets" oder die Gestalt des gesamten Moleküls (TSONG, 1990).

2.1.3.3 Einfluß niedriger Frequenzen

Bei der Wechselwirkung eines elektrischen Feldes mit niedrigen Frequenzen (ELF und VLF) entstehen die erkennbaren Effekte durch hoch kooperative Prozesse (SZMIGIELSKI, 1993), d.h. es zeigt sich kein linearer Zusammenhang zwischen der Größe des Effekts und der Frequenz. Es existieren lediglich Frequenz- oder auch Intensitätsfenster (BOIKAT, 1993). Bis jetzt ist noch keine geeignete Erklärung für Bioeffekte durch ELF mit einer direkter Wechselwirkung verfügbar. Man beobachtet verschiedenste Effekte mit Auswirkung in den unterschiedlichsten Bereichen des Stoffwechsels.

Auf zellulärer Ebene ergaben sich unter dem Einfluß elektrischer niederfrequenter Felder Effekte auf den Calcium-Stoffwechsel. Ein veränderter Calcium-Stoffwechsel wiederum kann einmal als „second messenger“ die Proteinsynthese, zum anderen über die Calcium-Regulation in Lymphozyten die RNA-Transkription verändern (WALLECZEK, 1992). Damit ergibt sich indirekt ein Effekt auf die DNA (PINHOLSTER, 1993). Mit einem veränderten Calcium-Spiegel in Neuronen wird z. B. die Entstehung der Alzheimer'schen Krankheit durch den Zelltod dieser Neuronen in Verbindung gebracht (SOBEL et al., 1995).

Veränderungen des Hormonspiegels von Melatonin werden bei der Entstehung von Brustkrebs und anderer Krebsarten diskutiert. Außerdem kann es zu einer Schwächung des Immunsystems kommen (PINHOLSTER, 1993).

In Studien an Tieren konnten unter Einwirkung elektromagnetischer Felder niedriger Frequenzen eine gesteigerte neuronale Erregbarkeit, chemische und hormonelle Störungen, ein verändertes Verhalten und veränderte biologische Rhythmen bei den Versuchstieren festgestellt werden (BOIKAT, 1993).

Zumindest auf zellulärer Ebene scheint vielfach die Zellmembran das entscheidende erste Target für die Detektion des elektromagnetischen Feldes zu sein. Neuere Tumorgenese-Untersuchungen in Zusammenhang mit der Einwirkung von elektromagnetischen Feldern beziehen sich dementsprechend eher auf epigenetische Mechanismen wie die Dysfunktion der Membran als auf direkte DNA-Schädigung (ADEY, 1993). Die für die Wechselwirkung des elektrischen Feldes mit der Membran beschriebenen Modelle können unter Umständen auf nicht membranbezogene Effekte übertragen werden (GOODMAN et al., 1995).

2.1.3.4 Wechselwirkung mit der Zellmembran

Die Erregung einer zellulären Antwort auf ein elektrisches Feld verläuft nach einem kaskadenartigen Muster über die Zellmembran. Zuerst werden über elektrochemische Ereignisse an der Zelloberfläche Transmembran-Wechselwirkungen ausgelöst, die zu einer Signalverstärkung im Inneren der Zelle führen. Dort bewirkt die cytoplasmatische Antwort über Calcium und cAMP eine veränderte Makromolekül-Synthese, die wiederum einen Einfluß auf Transkription, Zellwachstum, Differenzierung und funktionelle Eigenschaften, wie z. B. eine Immunantwort haben kann (TENFORDE, 1991).

Die Transmembran-Wechselwirkung kann dabei über verschiedene Mechanismen vonstatten gehen. Das elektrische Feld kann die Membranstruktur verändern, so daß sich die Verfügbarkeit des Substrates für ein Enzym im Inneren der Zelle durch Modifikation der Permeabilität ändert. Außerdem kann das elektrische Feld über Ionenkanäle in der Membran detektiert und dessen Antwort getriggert werden, so daß die Ionenkonzentration an der Doppelschicht geändert wird. Daneben kann das elektrische Feld die Wirkung eines Hormons durch Änderung der Bindungsparameter an die Membran oder über das konformationelle Gleichgewicht von Membran-Proteinen verändert werden (KUBOTA et al., 1995).

Ein Beispiel für den letztgenannten Mechanismus ist die elektrokonformationelle Kopplung (ECC). Hier wird ein externes Feld als Energiequelle benutzt, um das

Gleichgewicht einer Reaktion zu stören oder bei Membrantransportproteinen die Substrate gegen einen Konzentrationsgradienten zu transportieren (ROBERTSON und ASTUMIAN, 1990a und 1991).

Der Prozeß der ECC ist frequenzspezifisch. Für Enzyme liegen die optimalen Kopplungsfrequenzen zwischen 100 Hz und 1 MHz, für diffusionskontrollierte Reaktionen im GHz-Bereich. Bei schnellen Veränderungen im Enzym und gleichzeitiger Dipolmomentänderung kann es auch bei höheren Frequenzen zu Wechselwirkungen kommen (WEAVER und ASTUMIAN, 1990).

Bedingung für eine ECC ist eine Kopplung zwischen Feld und Zustand des Proteins. Daher muß das Protein während der Umsetzungsreaktion in zwei unterschiedlichen Konformationen mit unterschiedlicher Ladungsverteilung vorliegen, d.h. während der Reaktion ist die Bewegung von Ladungen notwendig (ROBERTSON und ASTUMIAN, 1990b). Eine weitere Möglichkeit der Kopplung ist dann gegeben, wenn zwei Konformationen eines Enzyms unterschiedliche Dipolmomente besitzen (BERG, 1993).

Der Effekt durch die ECC ist für Membranproteine größer, da hier das Feld um einen Faktor von 10^3 - 10^5 amplifiziert wird und keine Rotation der Protein-Moleküle möglich ist (ROBERTSON und ASTUMIAN, 1991). Außerdem entstehen hier oft große Verschiebungsladungen bei einer Konformationsänderung (ROBERTSON und ASTUMIAN, 1992). Aber auch bei freien cytoplasmatischen Makromolekülen besteht die Möglichkeit zur ECC. Die beste Kopplung erreicht man dann für linear im Feld ausgerichtete Moleküle. Allerdings sind hier die minimal benötigten Feldstärken frequenzabhängig höher als bei Membranproteinen (WEAVER und ASTUMIAN, 1990).

Ein Beispiel für eine elektrokonformationelle Kopplung ist der Ca^{2+} -Influx in die Zellen, der nach elektrischer Behandlung eine Steigerung erfährt, die sich nach dem Abschalten des äußeren Feldes noch etwas fortsetzt und dann normalisiert. Dabei ist eine Abhängigkeit von Frequenz und Amplitude festzustellen. Die Steigerung der Influxrate beruht also nicht auf einer Joule'schen Erwärmung im Protein (ROBERTSON und ASTUMIAN, 1992).

2.2 TRYPSIN (E.C. 3.4.4.4)

Das Enzym Trypsin mit einem Molekulargewicht von ca. 24000 D gehört zu den Serinproteasen und spaltet als Endopeptidase bei einem pH-Optimum von ca. 8 spezifisch Amid-, Ester- und Peptidbindungen, die auf die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin folgen. Das katalytische Zentrum des Trypsins besteht aus dem aktiven Ser195, His57 und Asp102 (Abb. 2-4), wobei die Numerierung der Aminosäuren der Chymotrypsin-Nomenklatur folgt. Die Substratbindungstasche wird aus den Aminosäureresten 189-192 und 214-220 gebildet (STROUD et al., 1975). Am Boden dieser Tasche befindet sich das negativ geladene Asp189, an das die basischen Aminosäurereste des Substrats über Ionenbindungen gekoppelt werden können. Die Oxyanionhöhle wird über Wasserstoff-Brücken zwischen den Hauptkettenamiden des Ser195 und des benachbarten Gly193 und dem Carbonyl-Sauerstoff des Substrates gebildet und dient der Stabilisierung des tetraedrischen Zwischenprodukts bei der Katalyse (SOMAN et al., 1989).

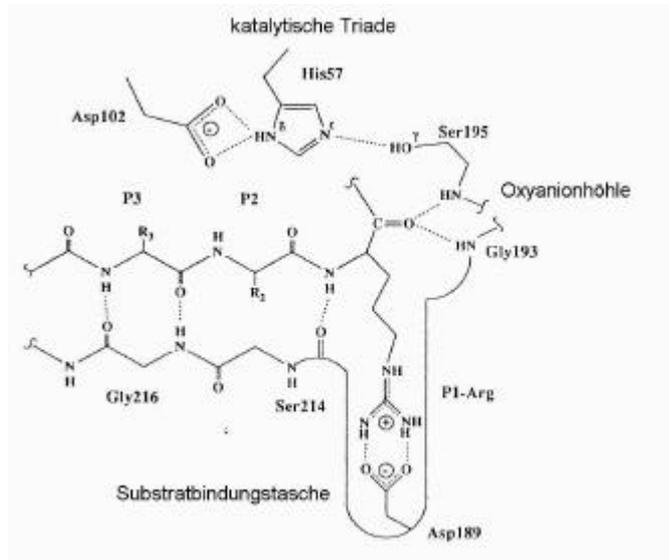
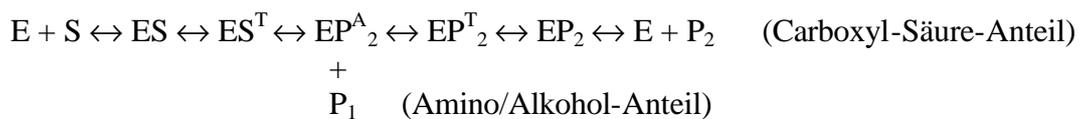


Abb. 2-4: Darstellung des katalytischen Zentrums, der Substratbindungstasche und der Oxyanionhöhle des Trypsins (aus PERONA und CRAIK, 1995)

Die Tertiärstruktur des Trypsins ist gekennzeichnet durch das Vorhandensein von zwei Domänen aus je sechssträngigen "β-barrels", d.h. einer jeweils faßartigen Struktur, zwischen denen die katalytische Triade angeordnet ist. Dabei gehören das His57 und

das Asp102 zur N-terminalen Domäne, die C-terminale Domäne enthält das Ser195, die Oxyaniontasche und die Substratbindungstasche (LESK und FORDHAM, 1996).

Der Katalysemechanismus des Trypsins geht über die Bildung eines tetraedrischen Zwischenprodukts, eines Acylenzymkomplexes und der anschließenden Deacylierung des Enzyms nach folgendem Schema vonstatten:



Die einzelnen Schritte des Katalysemechanismus sind in Abb. 2-5 noch einmal dargestellt. Bei der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes erfolgt ein nukleophiler Angriff des Ser195 auf den Carbonyl-Kohlenstoff des Substrates (I, entspricht ES). His57 und Asp102 dienen dabei jeweils als Basenkatalysatoren, indem sie ein Proton des benachbarten Aminosäurerestes zu sich ziehen. Das erste tetraedrische Zwischenprodukt wird ausgebildet. Es kommt zu einer kovalenten Bindung zwischen dem reaktiven Sauerstoff des Ser195 und dem Carbonyl-Kohlenstoff des Substrates (II, entspricht ES^T). Das erste Produkt aus der Katalyse (Amin bzw. Alkohol) nimmt ein Proton vom His57 des Enzyms mit (III, entspricht P_1). Bei der Auflösung des Acylenzymkomplexes übernimmt ein Wassermolekül die Aufgabe des nukleophilen Angriffs auf den Carbonylkohlenstoff der Acylgruppe im Komplex (IV, entspricht EP^A_2). Es wird erneut ein tetraedrisches Zwischenprodukt gebildet (V, entspricht EP^T_2). Bei der Entstehung des zweiten Produkts verliert dieses ein Proton an das Lösungsmittel, so daß jetzt zwei negative Ladungen im Komplex vorhanden sind, die zu einer Abstoßung führen und die Trennung von Enzym und Substrat erleichtern (VI, entspricht EP_2 bzw. $E+P_2$).

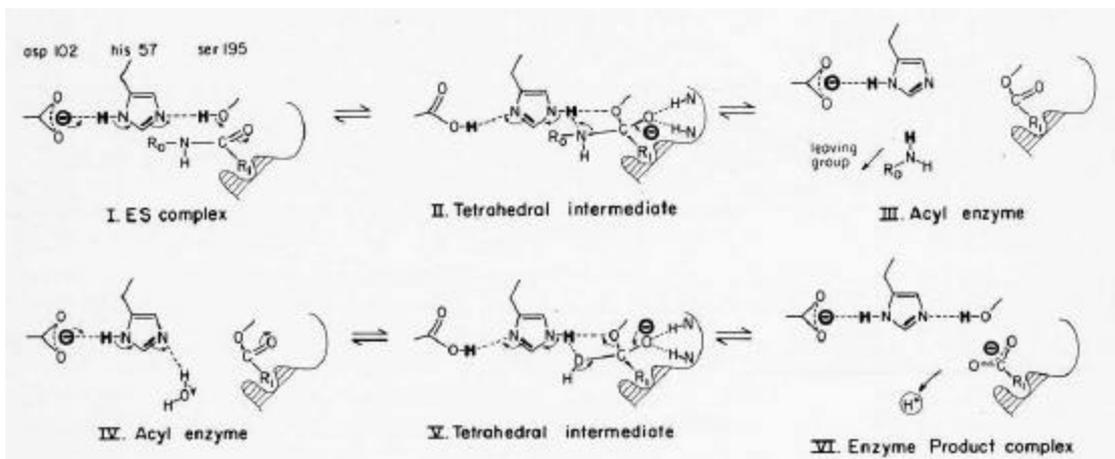


Abb. 2-5: Katalysemechanismus von Trypsin (aus STROUD et al., 1975)

In der neueren Literatur wird eher einer elektrostatischen Stabilisierung des Imidazol-Kations des His57 durch das negativ geladene Asp102 als dem bisher beschriebenen Charge-Relay-System, bei dem Protonen zwischen den beteiligten Aminosäuregruppen der katalytischen Triade direkt transferiert werden, der Vorzug gegeben. (WARSHEL et al., 1989; LIAO et al., 1992).

Bei der Bindung der Substrat-Seitenketten in der Tasche des Trypsins kommt es zu einer kleinen Konformationsänderung, welche die Katalyse-Aktivität steigert. Die Amidase-Aktivität reagiert im Vergleich zur Esterspaltung sensibler auf solche Konformationsänderungen, da der geschwindigkeitsbestimmende Schritt während der Katalyse die Bildung des Acylenzymkomplexes ist und für eine erfolgreiche Katalysereaktion die dabei beteiligten Aminosäuregruppen gut aufeinander ausgerichtet sein müssen (SEARS und CLARK, 1993). Im Gegensatz dazu ist bei der Spaltung von Estern durch Trypsin der Schritt der Deacylierung geschwindigkeitsbestimmend. Eine Konformationsänderung im Enzym während der Substratbindung ist dementsprechend weniger ausschlaggebend für die Katalyse.

3 MATERIAL UND METHODEN

Chemikalienliste:

Aceton, p.A.	Merck 14
3-Aminopropyltriethoxysilan, APTS	Roth 2328.2
Benzamidin-Hydrochlorid	Fluka 12073
N _α -Benzoyl-DL-Arginin-4-Nitroanilid • HCl (BAPA)	Serva 14634
N _α -Benzoyl-L-Arginin (BA)	Fluka 12870
N _α -Benzoyl-L-Arginin-Ethylester (BAEE)	Fluka 12880
Calciumchlorid, CaCl ₂ , reinst	Merck 2387
Dimethylsulfoxid (DMSO), p.A.	Merck 2931
Di-Natrium-hydrogenphosphat-2-hydrat, Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O, p.A.	Merck 6580
Folin-Ciocalteu-Reagenz	Merck 9001
Glutardialdehyd 25%	Merck 820603.1000
Harnstoff krist., reinst	Merck 8486.1000
Kaliumchlorid, KCl	Fluka 60130
Kieselgel HF 254 nach Stahl, mittlere Korngröße 10-40 μ	Merck 7739
Kupfersulfat-5-Hydrat, CuSO ₄ • 5 H ₂ O	Riedel de Haen 31292
Natriumcarbonat, Na ₂ CO ₃ , p.A.	Merck 6392
Natriumchlorid, NaCl, p.A.	Merck 6404
Natrium-di-hydrogenphosphat, NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O, p.A.	Merck 6346
Natriumhydroxid, NaOH, p.A.	Merck 6498
para-Nitroanilin (pNA)	Serva 30421
Rinder Serum Albumin (BSA), reinst	Serva 11930
N _α -Tosyl-L-Arginin (TA)	Sigma T-9644
N _α -Tosyl-L-Arginin-Methylesterhydrochlorid (TAME)	Merck 8334
tri-Natriumcitrat, p.A.	Merck 6448
Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan, Tris, p.A.	Merck 8382
Trypsin Rinderpankreas, f. analytische Zwecke	Boehringer 109819

3.1 ALLGEMEINE METHODEN

3.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die quantitative Proteinbestimmung von Proteinlösungen erfolgte nach LOWRY (1951) verändert nach EGGSTEIN und KREUTZ (1955). Bei diesem modifizierten Lowry-Ansatz bildet sich zunächst ein Kupfer-Protein-Komplex, der das anschließend zugesetzte Folin-Ciocalteu-Reagenz reduziert. Dadurch tritt eine Blaufärbung der Lösung ein. Die Intensität dieser Färbung wird durch die Messung der Extinktion bei 750 nm bestimmt und ist der Proteinkonzentration proportional.

Lösungen:

- Lösung A:
2 % Na_2CO_3 in 0.1 mol/l NaOH
- Lösung B:
0.5 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ in 1 % tri-Natriumcitratlösung
- Lösung C:
49 ml Lösung A + 1 ml Lösung B
- Lösung D:
Folin-Ciocalteu-Reagenz (Merck)
(1:1 verd. mit H_2O bidest.)

Zu 0.2 ml Probenlösung werden 2 ml einer frisch angesetzten Lösung C gegeben. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur werden 0.2 ml Lösung D zugesetzt, sofort gemischt und weitere 45 min inkubiert. Anschließend erfolgt die Messung der Absorption bei 750 nm.

Die Abb. 3-1 und 3-2 zeigen Standardkalibrationskurven, die sich für verschiedene Bovine Serum Albumin (BSA)-, Trypsinogen- und Trypsin-Konzentrationen bei 750 nm ergaben.

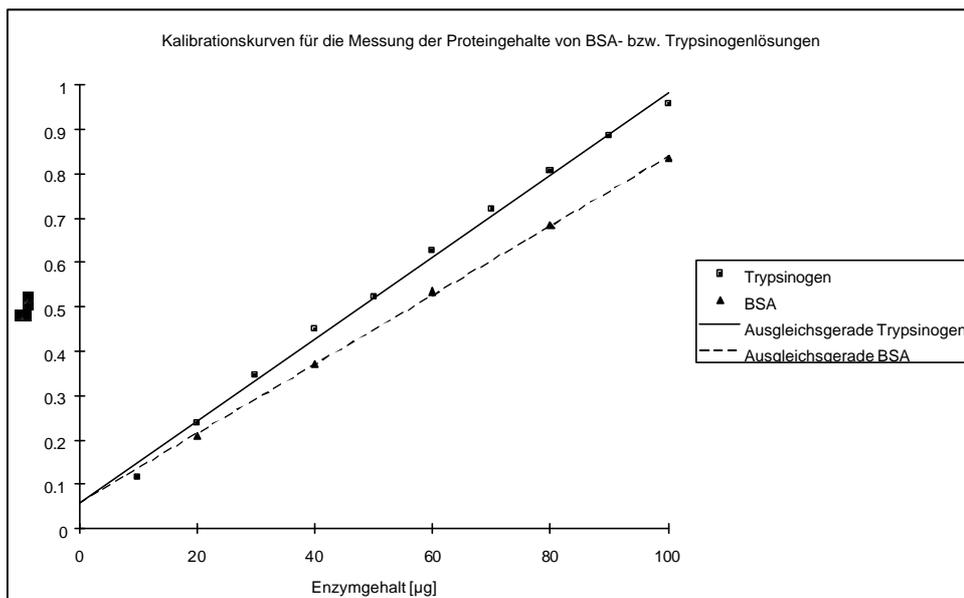


Abb. 3-1: Kalibrationskurven für die Proteinkonzentrationsbestimmung:
 Proteingehalte für BSA bzw. Rindertrypsinogen in $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ Probe
 Lineare Regression: BSA: $y = 0.0078 x + 0.0577$, $r = 0.9998$
 Trypsinogen: $y = 0.0093 x + 0.0571$, $r = 0.9979$

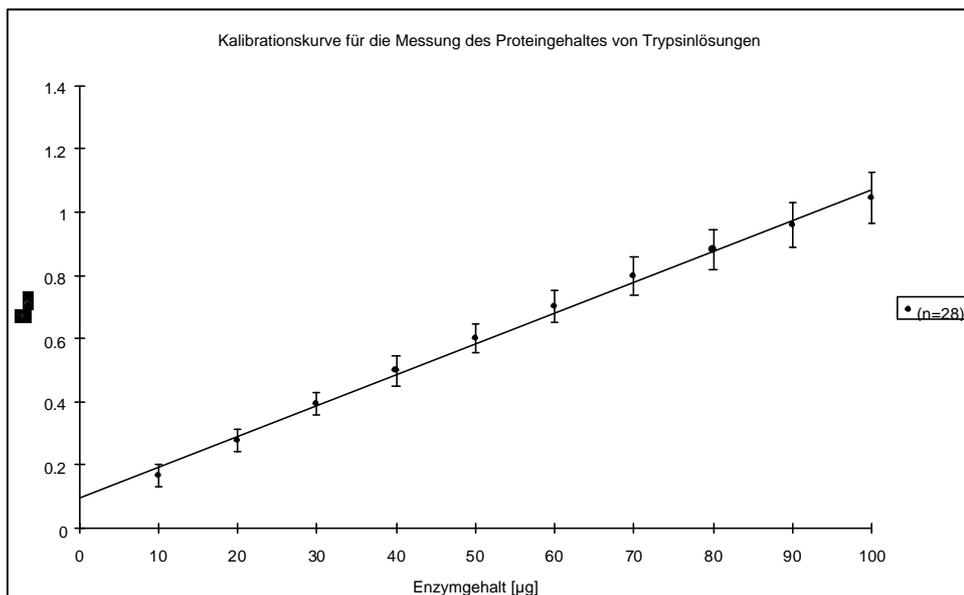


Abb. 3-2: Kalibrationskurve für die Proteinkonzentrationsbestimmung:
 Proteingehalt für Rindertrypsin in $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ Probe
 Lineare Regression: $y = 0.0098 x + 0.0958$, $r = 0.9980$

Der schnellen Identifikation und Quantifizierung von Proteingehalten in Lösungen dient eine Extinktionsmessung bei 280 nm. In Abbildung 3-3 ist eine Kalibrationskurve für Trypsin erstellt.

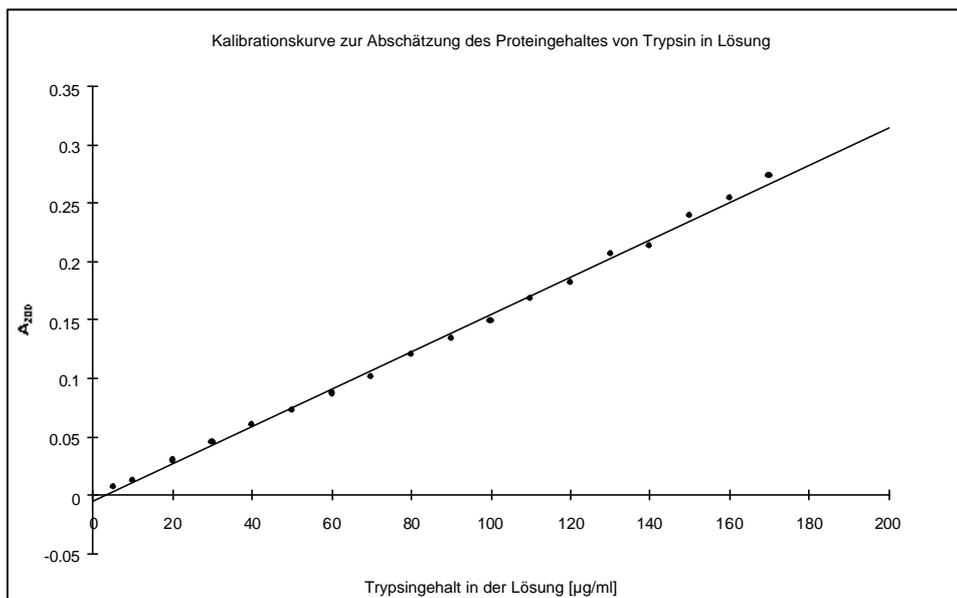


Abb. 3-3: Abhängigkeit der Absorption bei 280 nm von der Proteinkonzentration von Rindertrypsin in µg/ml

$$\text{Lineare Regression: } y = 0.0016 x - 0.0059, \quad r = 0.9987$$

3.1.2 Bestimmung der Enzymaktivität

Die tryptische Enzymaktivität wurde spektralphotometrisch für verschiedene Substrate bestimmt. Bei allen Methoden wird mit Hilfe eines Spektralphotometers die Hydrolyse des Substrates verfolgt. Gemessen wird der Substratumsatz anhand der Produktzunahme bei der Wellenlänge, welche die größte Absorptionsdifferenz zwischen Substrat und dem jeweils entstehenden Produkt aufweist. Die sich ergebende Extinktionsänderung pro Minute ist proportional zur Hydrolyserate des Substrates.

Die Enzymaktivität in Unit (U) ist dann definiert als Umsatz von 1 µMol Substrat pro Minute unter Standardbedingungen (WALSH und WILCOX, 1970). Die spezifische Aktivität entspricht der Anzahl von Units bezogen auf 1 mg Protein (U/mg).

Formel für die Berechnung der spezifischen Aktivität:

$$\frac{U}{\text{mg}} = \frac{A_{410}/\text{min} \cdot \text{GV} \cdot \text{VF}}{\epsilon \cdot d \cdot \text{PV} \cdot \text{mg/ml}} \quad (1)$$

mit

A_{410}/min	Extinktionsänderung pro Minute
GV	Gesamtvolumen
VF	Verdünnungsfaktor
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient (s. Kapitel 3.1.3)
d	Schichtdicke der Küvette in cm (hier immer 1 cm)
PV	Probenvolumen
mg/ml	Proteingehalt der Probe

3.1.2.1 Bestimmung der tryptischen Enzymaktivität mit BAPA

Bei dieser Methode nach ERLANGER, KOKOWSKY und COHEN (1961), modifiziert auf die Hälfte des Ansatzes (GV = 3 ml), wird die Zunahme des durch Trypsin vom Substrat Benzoyl-Arginin-para-Nitroanilid (BAPA) abgespaltenen Produkts p-Nitroanilin (pNA) spektralphotometrisch verfolgt. Die Absorptionsmessung erfolgt dabei im Wellenlängenbereich des sichtbaren Lichtes bei 410 nm.

Lösungen:

- Substratlösung:
 - 100.0 mmol/l BAPA-Stammlösung
(43.5 mg BAPA in 1 ml Dimethylsulfoxid gelöst)
- Pufferlösung:
 - 0.05 mol/l Tris/HCl, pH 8.2
 - 0.02 mol/l CaCl_2

Die BAPA-Stammlösung wird kurz vor dem Einsatz mit Puffer auf eine Lösung mit einer Konzentration von 1 mmol/l BAPA (Substratlösung) verdünnt.

Für die Messung werden 2.5 ml Substratlösung mit 450 μl H_2O aufgefüllt und 5 min lang bei 30 °C vortemperiert. Nach Zugabe von 50 μl Enzymlösung wurde die Extinktionsänderung gegenüber der Referenzküvette ohne Enzymzugabe 5 min lang

registriert (Spektralphotometer PU 8800, Philips; Spektralphotometer U2000, Hitachi). Das Substrat liegt dabei im Versuchsansatz in einer Konzentration von 0.83 mmol/l vor.

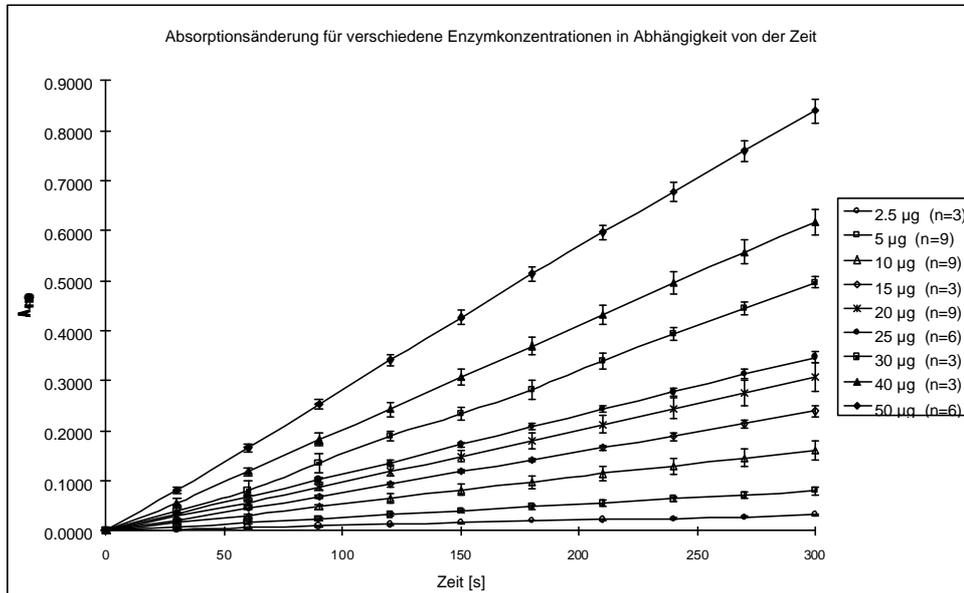


Abb. 3-4: Änderung der Absorption bei 410 nm in Abhängigkeit von der Zeit für verschiedene Rindertrypsinkonzentrationen

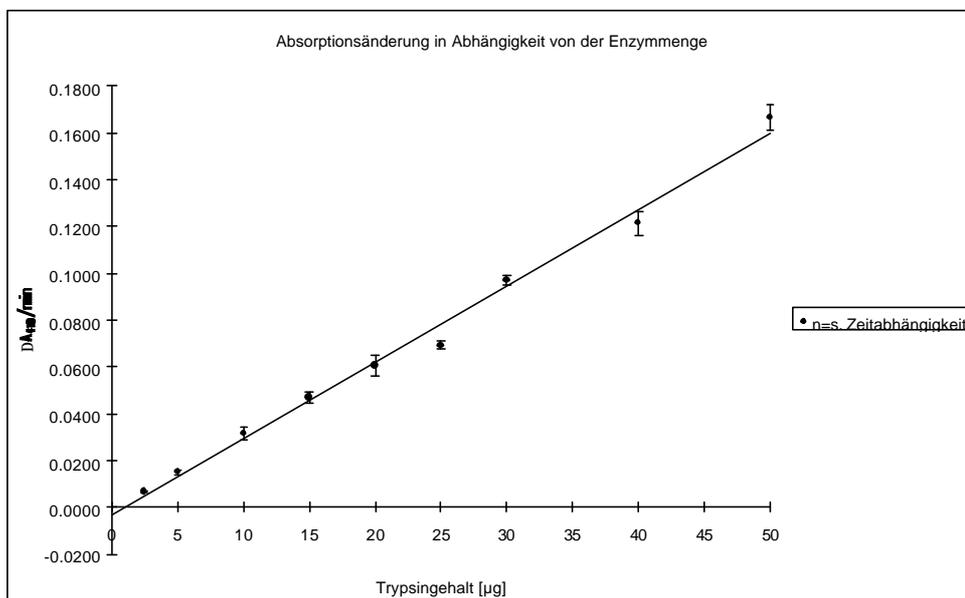


Abb. 3-5: Änderung der Absorption bei 410 nm pro Minute in Abhängigkeit vom Trypsingehalt der Probe
Lineare Regression: $y = 0.0033 x - 0.0029$, $r = 0.9956$

Aus der ermittelten Extinktionsänderung pro Minute bei 410 nm wurde mit Hilfe der Formel (1) ($GV = 3 \text{ ml}$, $PV = 50 \mu\text{l}$, $\epsilon = 9.2 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$) die spezifische Aktivität des Enzyms berechnet. Sie betrug für das Rindertrypsin unter diesen Bedingungen $1.0 \pm 0.1 \text{ U/mg}$.

3.1.2.2 Bestimmung der tryptischen Enzymaktivität mit BAEE

Hierbei wird nach BERGMAYER (1970) die Zunahme des durch Trypsin vom Substrat N-Benzoyl-L-Arginin-Ethylester (BAEE) abgespaltenen Produkts N-Benzoyl-L-Arginin (BA) spektralphotometrisch verfolgt. Die Absorptionsmessung erfolgt hier im UV-Bereich bei 253 nm.

Lösungen:

- Substratlösung:
0.9 mmol/l BAEE in Puffer gelöst
- Pufferlösung:
46.7 mmol/l Tris/HCl, pH 8.0
0.19 mol/l CaCl_2

Für die Messung werden 2.8 ml Substratlösung 5 min lang bei 30 °C vortemperiert, 0.2 ml Enzymlösung zugesetzt und die Extinktionsänderungen gegenüber der Referenzküvette ohne Enzymzugabe über einen Zeitraum von fünf Minuten registriert (Spektralphotometer PU 8800, Philips).

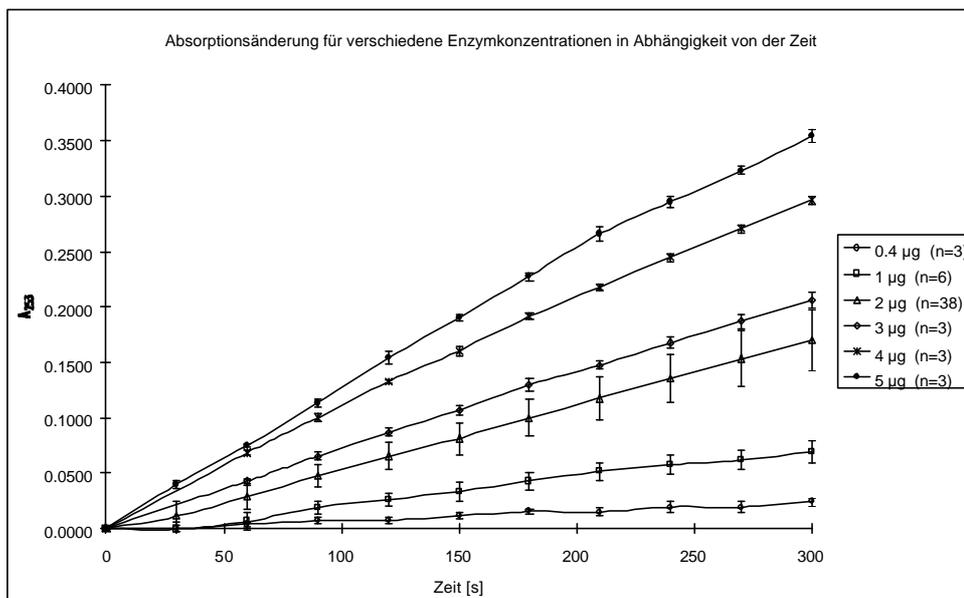


Abb. 3-6: Änderung der Absorption bei 253 nm in Abhängigkeit von der Zeit für verschiedene Rindertrypsinkonzentrationen

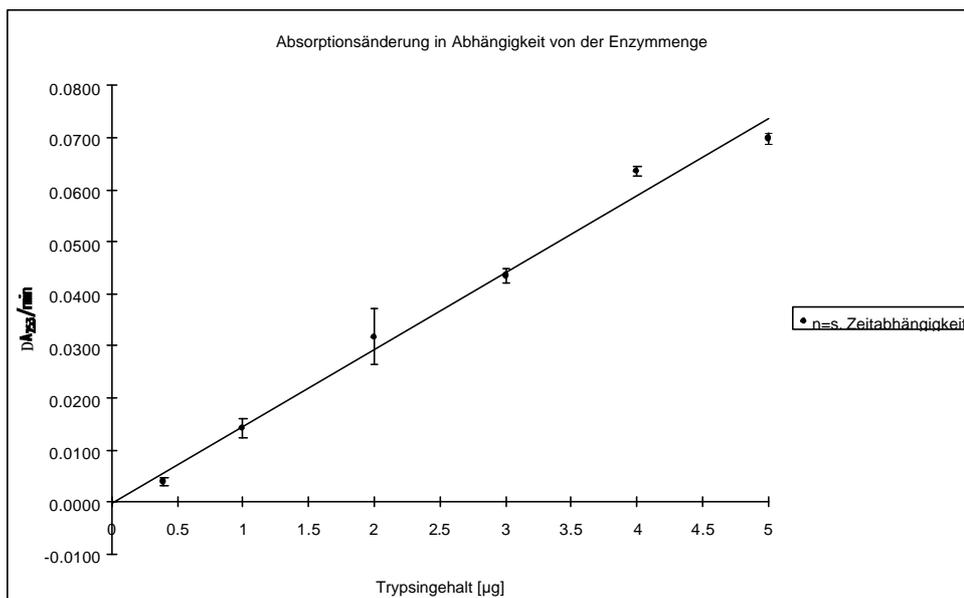


Abb. 3-7: Änderung der Absorption bei 253 nm pro Minute in Abhängigkeit vom Trypsingehalt der Probe

$$\text{Lineare Regression: } y = 0.0148 x - 0.0002, \quad r=0.9935$$

Aus der ermittelten Extinktionsänderung pro Minute bei 253 nm wurde mit Hilfe der Formel (1) ($GV = 3 \text{ ml}$, $PV = 0.2 \text{ ml}$, $\epsilon = 0.811 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$) die spezifische Aktivität des Enzyms berechnet. Sie betrug für das Rindertrypsin unter diesen Bedingungen $56 \pm 10 \text{ U/mg}$.

3.1.2.3 Bestimmung der tryptischen Enzymaktivität mit TAME

Bei dieser Methode nach HUMMEL (1959) wird die Zunahme des durch Trypsin vom Substrat N- α -Tosyl-L-Arginin-Methylester-Hydrochlorid (TAME) abgespaltenen Produkts N- α -Tosyl-L-Arginin (TA) spektralphotometrisch verfolgt. Die Absorptionsmessung erfolgt bei 247 nm.

Lösungen:

- Substratlösung:
1.04 mmol/l TAME in Puffer gelöst
- Pufferlösung:
0.04 mol/l Tris/HCl, pH 8.1
0.01 mol/l CaCl₂

3 ml Substratlösung werden 5 Minuten lang bei 30 °C vortemperiert, dann 0.1 ml Enzymlösung zugesetzt und die Extinktionsänderungen gegenüber der Referenzküvette ohne Enzymzugabe über einen Zeitraum von fünf Minuten registriert (Spektralphotometer PU 8800, Philips).

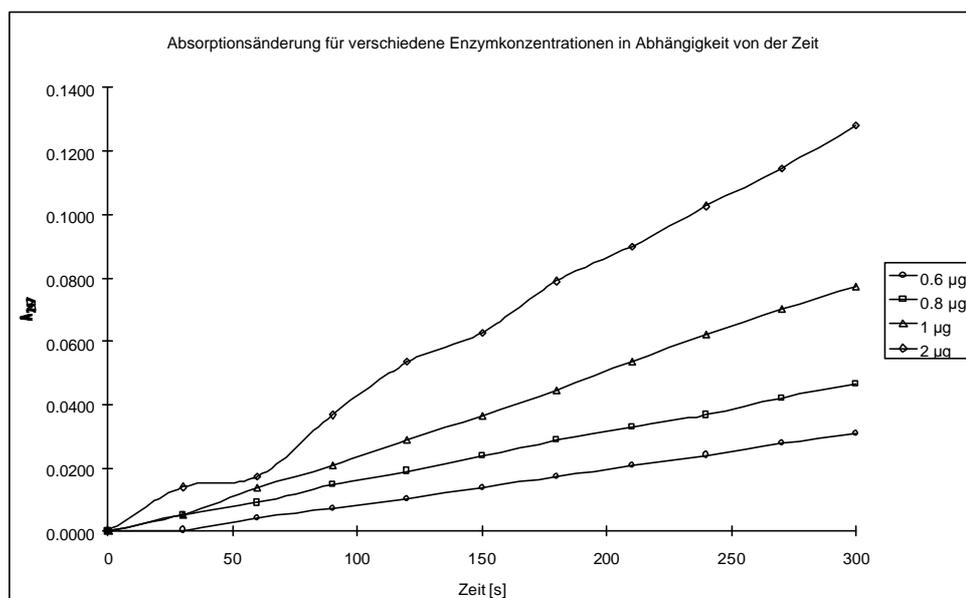


Abb. 3-8: Änderung der Absorption bei 247 nm in Abhängigkeit von der Zeit für verschiedenen Rindertypsinkonzentrationen

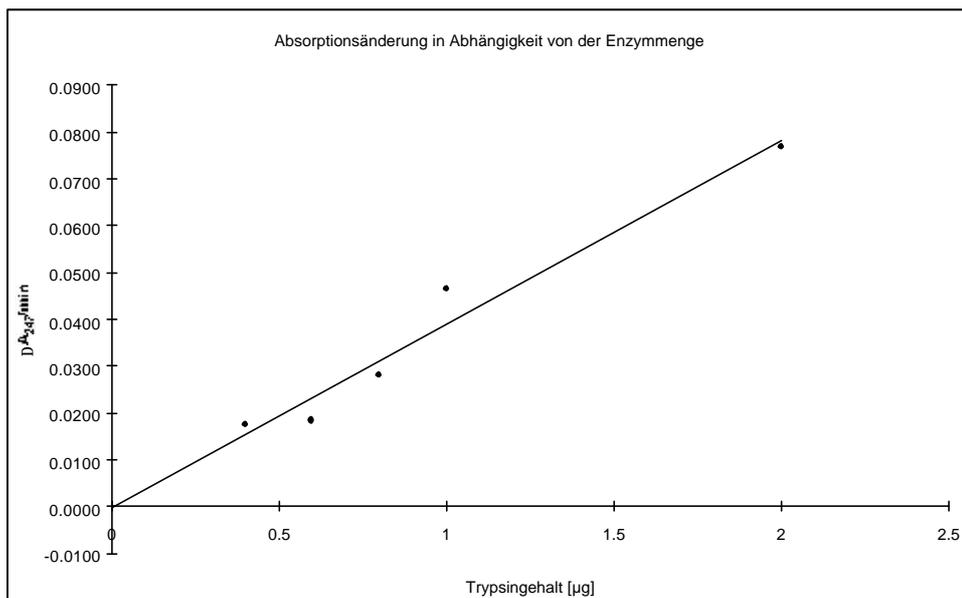


Abb. 3-9: Änderung der Absorption bei 247 nm pro Minute in Abhängigkeit vom Trypsingehalt der Probe
Lineare Regression: $y = 0.0392x - 0.0003$, $r = 0.9808$

Aus der ermittelten Extinktionsänderung pro Minute bei 247 nm wurde mit Hilfe der vorher genannten Formel ($GV = 3.1$ ml, $PV = 0.1$ ml, $\epsilon = 0.561$ cm²/µmol) die spezifische Aktivität des Enzyms berechnet. Sie betrug unter diesen Bedingungen 214 ± 35 U/mg.

3.1.3 Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten für die Enzymaktivitätsmessungen

Um die molaren Extinktionskoeffizienten für die verschiedenen Substrate zu ermitteln, wurden jeweils von in den Enzymaktivitäts-Tests verwendetem Substrat und gemessenem Produkt Lösungen mit einer Konzentration von 1 mmol/l hergestellt. Mittels eines Spektralphotometers (U2000, Hitachi) wurden über die relevanten Wellenlängenbereiche Spektren von den einzelnen Lösungen gegenüber einer Referenz mit Puffer hergestellt. Aus der Differenz der Spektren von Substrat und Produkt konnte dann der molare Extinktionskoeffizient anhand der Formel (2) berechnet werden.

Formel für die Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten:

$$e_l = \frac{A_{\text{Produkt}} - A_{\text{Substrat}}}{c \cdot d} \quad (2)$$

mit

ϵ_λ	molarer Extinktionskoeffizient für die Wellenlänge λ
A_{Produkt}	Absorption des Produkts bei der Wellenlänge λ
A_{Substrat}	Absorption des Substrats bei der Wellenlänge λ
c	Konzentration der eingesetzten Lösungen
d	Schichtdicke der Küvette (1 cm)

Zum Vergleich dazu wurden direkt Differenzspektren aufgenommen, indem das Spektrum des Substrates gegen das Produkt als Referenz aufgenommen wurde.

3.1.3.1 Molarer Extinktionskoeffizient für die Aktivitätsmessung mit BAPA als Substrat

Lösungen:

- Substratlösung:
0.1 mmol/l BAPA in Puffer gelöst
- Produktlösung:
0.1 mmol/l pNA in Puffer gelöst
- Pufferlösung:
0.05 mol/l Tris/HCl, pH 8.2

Meßbedingungen:

- Wellenlängenbereich: 340-500 nm
- Küvettendicke: 1 cm
- Temperatur: 25 °C

Aus den so erhaltenen Spektren wurde die Differenz der Absorptionswerte von Substrat und Produkt bei den Wellenlängen 405 nm und 410 nm ermittelt. Daraus ergab

sich ein molarer Extinktionskoeffizient von $10.6 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ für 405 nm und von $9.2 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ für 410 nm.

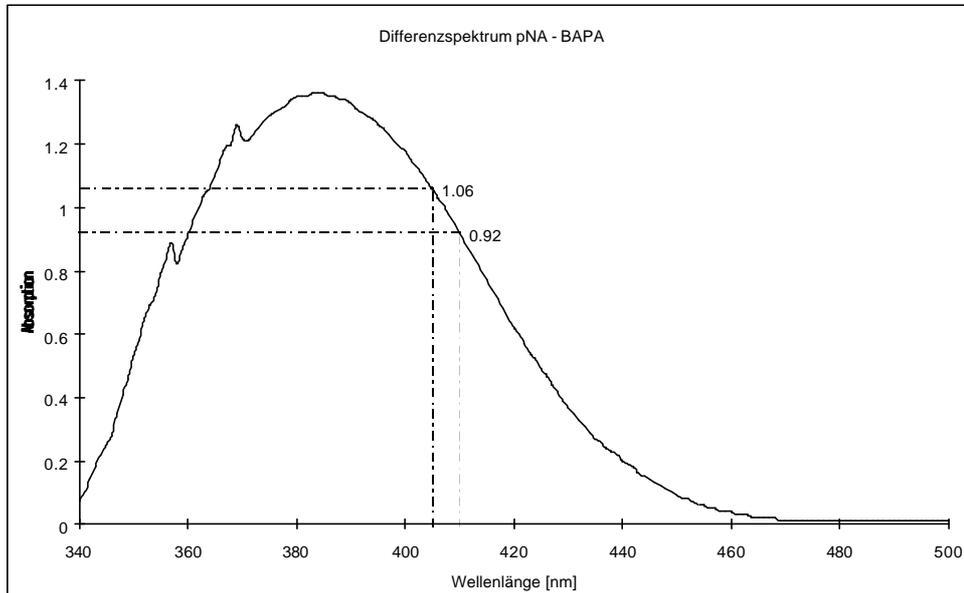


Abb. 3-10: Differenzspektrum von p-Nitroanilin (pNA) gegen N_{α} -Benzoyl-DL-Arginin-4-Nitroanilid (BAPA)

3.1.3.2 Molarer Extinktionskoeffizient für die Aktivitätsmessung mit BAEE als Substrat

Lösungen:

- Substratlösung:
1.0 mmol/l BAEE in Puffer gelöst
- Produktlösung:
1.0 mmol/l BA in Puffer gelöst
- Pufferlösung:
46.7 mmol/l Tris/HCl, pH 8.0

Meßbedingungen:

- Wellenlängenbereich: 230-300 nm
- Küvettendicke: 1 cm
- Temperatur: 25 °C

Aus den so erhaltenen Spektren wurde die Differenz der Absorptionswerte von Substrat und Produkt bei den Wellenlängen 253 nm ermittelt. Daraus ergab sich ein molarer Extinktionskoeffizient von $0.811 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$.

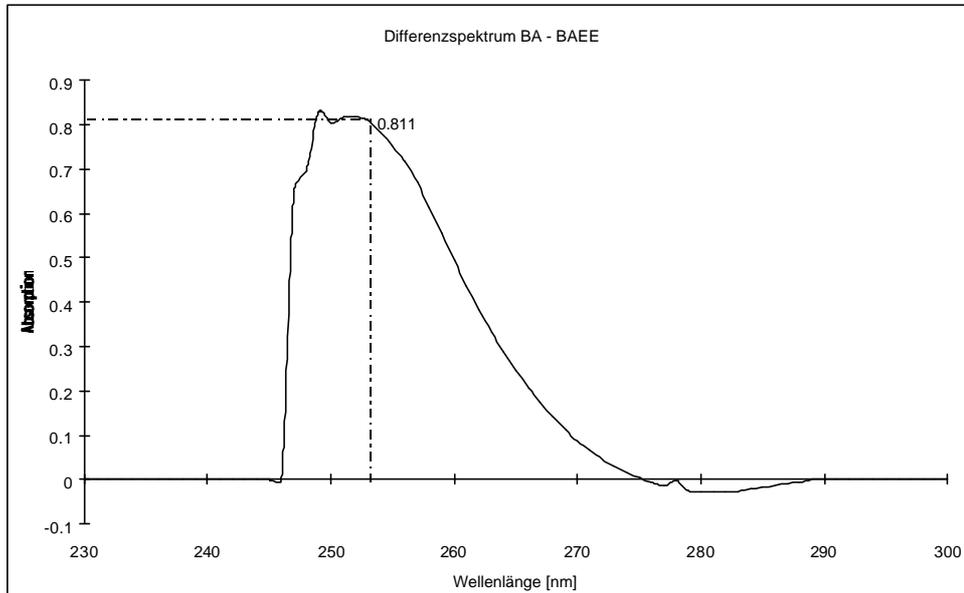


Abb. 3-11: Differenzspektrum von Benzoylarginin (BA) gegen Benzoylarginin-ethylester (BAEE)

3.1.3.3 Molarer Extinktionskoeffizient für die Aktivitätsmessung mit TAME als Substrat

Lösungen:

- Substratlösung:
1.0 mmol/l TAME in Puffer gelöst
- Produktlösung:
1.0 mmol/l TA in Puffer gelöst
- Pufferlösung:
0.04 mol/l Tris/HCl, pH 8.1

Meßbedingungen:

- Wellenlängenbereich: 240-300 nm
- Küvettendicke: 1 cm
- Temperatur: 25 °C

Aus den so erhaltenen Spektren wurde die Differenz der Absorptionswerte von Substrat und Produkt bei der Wellenlängen 247 nm ermittelt. Daraus ergab sich ein molarer Extinktionskoeffizient von $0.561 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$.

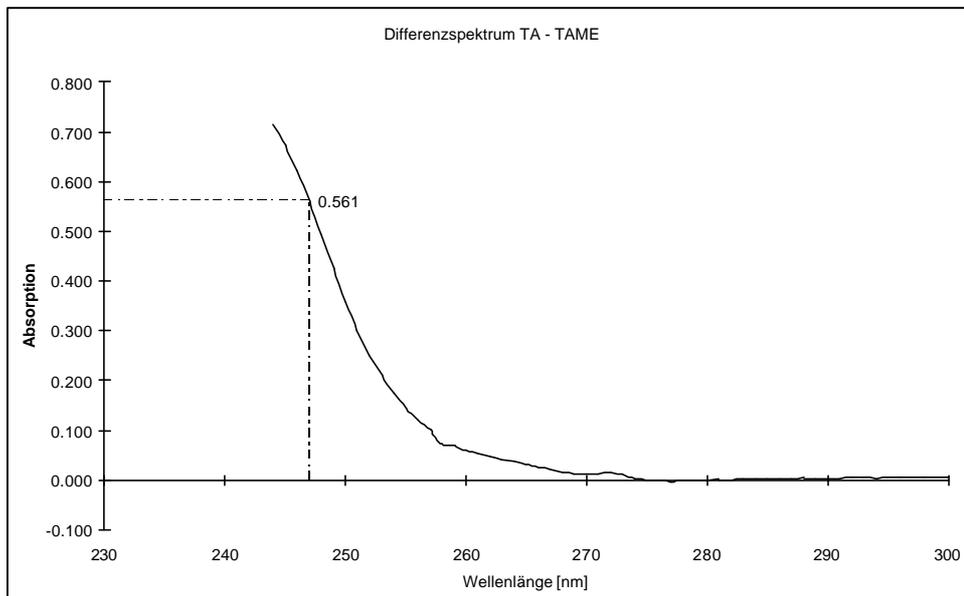


Abb. 3-12: Differenzspektrum von N_{α} -Tosyl-L-Arginin (TA) gegen N_{α} -Tosyl-L-Arginin-Methylesterhydrochlorid (TAME)

3.1.4 K_m -Wert von Trypsin für das Substrat BAPA

Um den K_m -Wert für Trypsin in bezug auf das Substrat BAPA zu bestimmen, wurden verschiedene Verdünnungen des Substrates hergestellt und mit diesen der in Kapitel 3.1.2.1 vorgestellte Enzym-Aktivitätstest durchgeführt.

Lösungen:

- Trypsinlösung:
200 $\mu\text{g/ml}$ in Puffer gelöst
- Substratstammlösung:
2.0 mmol/l BAPA in Puffer gelöst
- Pufferlösung:
0.05 mol/l Tris/HCl, pH 8.2

Der Substratumsatz wurde in Form von der Reaktionsgeschwindigkeit ($v_0 \equiv U/ml$) gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Die Abb. 3-13 zeigt die Darstellung nach Lineweaver-Burk, bei der der K_m -Wert als Schnittpunkt der ermittelten Geraden mit der x-Achse abgelesen werden kann. Es ergab sich für Trypsin in bezug auf BAPA ein K_m -Wert von 1.77 mmol/l.

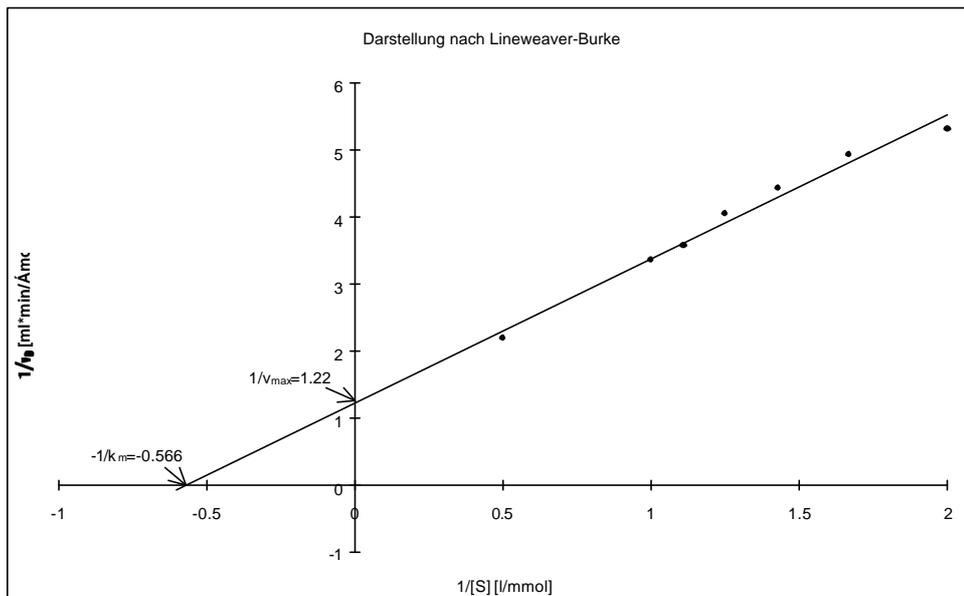


Abb. 3-12: Reaktionsgeschwindigkeit nach Lineweaver-Burke für Trypsin in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (BAPA)

3.2 IMMOBILISIERUNG DES TRYPSINS

3.2.1 Allgemeine Voraussetzungen

Für eine erfolgreiche Immobilisierung von Proteinen sind drei Faktoren zu berücksichtigen (CABRAL und KENNEDY, 1991):

- i) ein geeigneter unlöslicher Träger mit potentiellen Bindungsstellen
- ii) geeignete funktionelle Gruppen am Protein
- iii) geeignete Kopplungsreaktionen für das gewählte System

Als Träger stehen sowohl organische wie anorganische Materialien zur Verfügung. Man unterscheidet nach natürlichen und synthetischen Materialien. Je nach Einsatzbereich wird der am besten geeignete Träger ausgesucht.

Eine der wichtigsten Eigenschaften des Trägermaterials für diese Arbeit ist eine chemisch und physikalisch Reaktionsträgheit des Stoffes. Darüber hinaus ist es wesentlich, daß der Träger aus einem nicht porösen Material besteht, um Diffusionsprobleme zu vermeiden und das Enzym für die Anwendung eines elektrischen Feldes zugänglich zu erhalten. Daher wird hier das anorganische Kieselgel als Trägermaterial verwendet.

Funktionelle Gruppen des Proteins können generell nur diejenigen Reste sein, die sich an der Oberfläche des Moleküls befinden. Geeignet sind nukleophile Gruppen wie $-NH_2$, $-SH$ oder $-OH$, wobei die SH -Gruppe zwar am reaktivsten ist, die NH_2 -Gruppe jedoch die größte Stabilität aufweist. Ein geeignetes Protein sollte mehrere dieser funktionellen Gruppen besitzen.

Das für diese Arbeit gewählte Protein Trypsin kann über seine Lysin-Reste an der Oberfläche gut an einen Träger gekoppelt werden. Durch diese Kopplung wird weder das aktive Zentrum noch die Substratbindungstasche beeinflusst, da dort keine Lysin-Reste beteiligt sind.

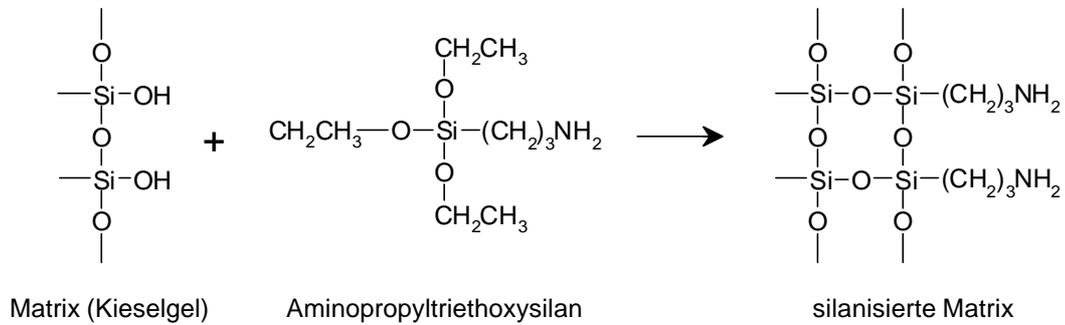
Bei der Art des Kopplungsmechanismus zwischen Träger und Protein hat man generell die Wahl zwischen einer kovalenten Kopplung und einer nicht-kovalenten Adsorption. Da hier eine feste Bindung des Proteins an seinen Träger wichtig ist, wird ein kovalenter Kopplungsmechanismus bevorzugt.

Die kovalente Kopplung des Proteins an den Träger kann entweder direkt oder indirekt über eine Aktivierung des Trägers erfolgen. Die direkte Kopplung ist nur selten erfolgreich, so daß im allgemeinen zuerst eine Aktivierung des Trägers durchgeführt wird. Bei der Verwendung anorganischer Trägermaterialien auf Silikatbasis ist zusätzlich eine vorherige Silanisierung, d.h. eine organische Ummantelung des Trägers notwendig.

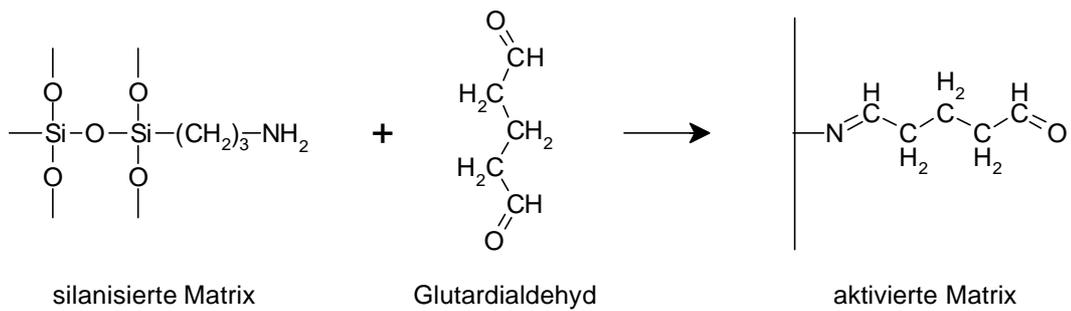
Zur Aktivierung gibt es unterschiedliche Reaktionsmechanismen. Für das hier verwendete System aus Kieselgel als Träger und Trypsin als zu koppelndes Protein ist die Methode der Aktivierung mittels Glutardialdehyd unter Bildung einer Schiff'schen Base die geeignetste. In diesem Fall besteht die reaktive Gruppe sowohl am Träger als auch am Protein aus einer Aminogruppe, zwischen die das Glutardialdehyd als Bindeglied gekoppelt wird. Im allgemeinen ist die Bildung einer Schiff'schen Base besonders im sauren Milieu reversibel, so daß die Iminbindungen durch eine Hydrierung noch stabilisiert werden sollten. Nach WEETALL (1976) reicht die Stabilität der Iminbindung bereits für eine erfolgreiche Immobilisierung.

3.2.1.1 Reaktionsschemata

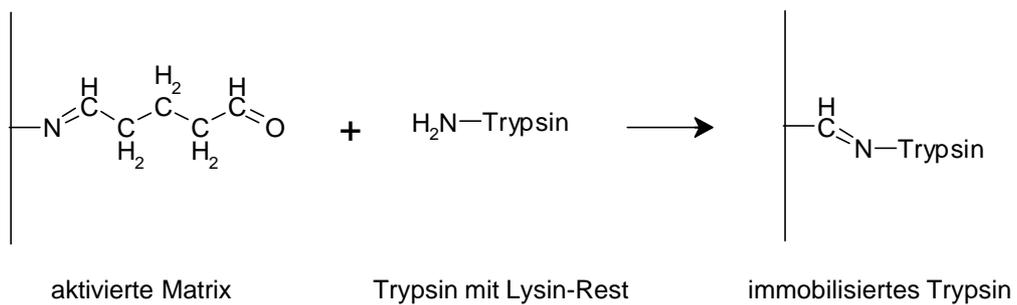
• Silanisierung:



• Aktivierung:



• Kopplung des Trypsins:



3.2.2 Herstellung des immobilisierten Trypsins

Das Trypsin wird an einer Matrix aus Kieselgel (Korngröße 10-40 μ) nach der Methode von WEETALL (1976) wie im folgenden beschrieben immobilisiert.

Lösungen:

- Komponenten zur Immobilisierung:

1 %	3-Aminopropyltriethoxysilan, APTS in Aceton (v/v)
2.5 %	Glutardialdehyd in Puffer (v/v)

- Enzymlösung:

20 mg/g Kieselgel	Trypsin in Puffer
-------------------	-------------------

- Pufferlösung:

50 mmol/l	Phosphatpuffer pH 7.0 (aus Di-Natrium-hydrogenphosphat-2-hydrat und Natrium-di-hydrogenphosphat hergestellt)
-----------	--

Zu 10 g Kieselgel werden 250 ml der 1 %igen APTS-Lösung zugegeben und unter dem Abzug so lange stehengelassen, bis das Aceton vollständig verdampft ist. Anschließend wird das APTS behandelte Kieselgel über Nacht bei 115°C getrocknet. In dieser Form als Alkylamin-Carrier läßt es sich längere Zeit aufbewahren.

An diesen Alkylamin-Carrier wird das Glutardialdehyd gekoppelt, indem zu 1 g des Carriers 25 ml der Glutardialdehyd-Lösung gegeben werden und mindestens eine Stunde lang einwirken lassen. Es entsteht ein Carbonyl-Derivat des Carriers. Dieses wird durch die Kopplungsreaktion rostbraun verfärbt. Nach der Inkubationszeit wird die Glutardialdehyd-Lösung über einen Filter abgesaugt. Das Carbonyl-Derivat, das auf dem Filter zurückgeblieben ist, wird gut mit aqua dest. gewaschen.

Für die Kopplung des Trypsins an das Carbonyl-Derivat werden zu 1 g dieses Derivates 20 mg Trypsin in 25 ml Phosphatpuffer gegeben. Dieses Gemisch läßt man mindestens vier Stunden ruhend reagieren. Um den Verlauf der Kopplung überprüfen zu können, werden während der Inkubation in Zeitabständen von einer Stunde Proben von 500 μ l aus dem Überstand entnommen und die Abnahme des Proteingehaltes im Überstand über die Extinktion bei 280 nm verfolgt. In einer nachträglichen Kontrolle

wird der Proteingehalt der Proben mit Hilfe der Proteinbestimmung nach Lowry überprüft.

BLANCO und GUIÓSÁN beschrieben 1988, daß die Zugabe von Benzamidin, eines kompetitiven Inhibitors für Trypsin, während des Immobilisierungsvorgangs die Aktivität des immobilisierten Enzyms erhöht. Daher wird zu den 20 mg Trypsin (ca. 0.83 µmol) gleichzeitig die 10-fache Gewichtsmenge an Benzamidin (ca. 1.08 mmol) in den Phosphatpuffer zugegeben. Eine größere Menge an Benzamidin erhöht weder die am Carrier gebundene Menge an Trypsin noch dessen Aktivität.

Die Zusammensetzung der Pufferlösung verändert sich damit zu:

- Pufferlösung:

50 mmol/l	Phosphatpuffer pH 7.0 (aus Di-Natrium-hydrogenphosphat-2-hydrat und Natrium-di-hydrogenphosphat hergestellt)
200 mg/g Kieselgel	Benzamidin im Puffer gelöst

Das fertige immobilisierte Trypsin wird in einer 1 mmol/l HCl enthaltenden Lösung im Kühlschrank aufbewahrt.

3.2.3 Bestimmung des am Carrier gebundenen Trypsins

Die Menge des am Carrier gebundenen Trypsins wird über die Differenz der Menge an zur Immobilisierung eingesetztem Trypsin und der nach der Inkubationszeit noch im Überstand befindlichen Menge an Trypsin bestimmt. Es werden jeweils zu Beginn der Immobilisierung und nach Beendigung der Immobilisierung Proben aus der eingesetzten Enzymlösung entnommen und durch eine Proteinbestimmung nach LOWRY unter Verwendung der Kalibrationskurve für Trypsin (s. Kapitel 3.1.1) der Proteingehalt bestimmt. Daraus ergibt sich dann die Menge an gebundenem Trypsin zu:

$$\frac{\text{mg gebundenes Trypsin}}{\text{g Kieselgel}} = \text{mg eingesetztes Trypsin} - \text{mg Trypsin im Überstand}$$

3.2.4. Enzymaktivität des immobilisierten Trypsins

Die Enzymaktivität des immobilisierten Trypsins wird photometrisch mit Hilfe des Substrates BAPA bei einer Wellenlänge von 410 nm (s. Kapitel 3.1.2.1) bestimmt.

Lösungen:

- Substratlösung:
100.0 mmol/l BAPA-Stammlösung
(43.5 mg BAPA in 1 ml Dimethylsulfoxid gelöst)
- Pufferlösung:
0.05 mol/l Tris/HCl, pH 8.2

Kurz vor Einsetzen des Substrates in den Test wird die Substrat-Stammlösung mit Puffer auf eine Lösung mit einer Konzentration 1 mmol/l herunterverdünnt. Etwa 30-50 mg des immobilisierten Trypsins werden in 500 µl Puffer suspendiert.

In ein Reagenzglas werden 2.5 ml der Substratlösung und 0.5 ml aqua dest. gegeben. Dazu werden 100 µl des in Puffer suspendierten immobilisierten Trypsins pipettiert und 10 min lang unter Schütteln inkubiert. Danach wird der Überstand in einer Küvette gegen die Referenzküvette ohne Enzymzugabe gemessen.

Zur Bestimmung der eingesetzten Menge an Enzym wird eine weitere Probe von 100 µl des in Puffer suspendierten immobilisierten Trypsins entnommen, getrocknet und gewogen. Aus der vorher bestimmten Menge an gebundenem Trypsin pro Gramm Kieselgel kann dann die Menge des eingesetzten Trypsins bestimmt werden.

Die spezifische Aktivität des immobilisierten Trypsins berechnet sich dann zu:

$$U/mg \text{ Trypsin} = \frac{\Delta A/min \cdot GV}{e \cdot d \cdot mg \text{ Kieselgel} / 100 \mu l} \cdot mg \text{ Kieselgel} / mg \text{ Trypsin} \quad (3)$$

mit

GV Gesamtvolumen (3 ml)

ϵ molarer Extinktionskoeffizient ($9.2 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$)

d Schichtdicke der Küvette (1 cm)

Die pH- und die Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität des immobilisierten Enzyms wird im Durchfluß bestimmt und daher in Kapitel 3.3 beschrieben.

3.3 KONTINUIERLICHE MESSUNG VON IMMOBILISIERTEM TRYPSIN

3.3.1 Allgemeine Voraussetzungen

Um die Enzymaktivität als Parameter der biologischen Funktion eines immobilisierten Enzyms zu messen, kann man prinzipiell die gleichen Methoden wie für ein lösliches Enzym verwenden. Die photometrische Messung der Enzymaktivität stellt diesbezüglich eine sensible und gleichzeitig gut durchführbare Methode dar (GLOGER und TISCHER, 1970).

Bei der photometrischen Messung immobilisierter Enzyme unterscheidet man generell zwei Varianten (MATTIASSON und MOSBACH, 1976):

- i) die Enzym-Matrix befindet sich direkt im Lichtweg
- ii) die Enzym-Matrix befindet sich nicht selbst im Lichtweg

Die erste Variante kann man nur verwenden, wenn die Matrix optisch durchlässig für die Wellenlänge des Meßstrahls ist und die einzelnen Partikel relativ klein sind, so daß die Störung des Absorptionssignals durch die Lichtstreuung der Matrixpartikel im Lichtweg vernachlässigbar ist.

Bei der zweiten Variante kann man zwischen Systemen unterscheiden, bei denen entweder eine Rezirkulation des Substrates benutzt wird oder das Substrat kontinuierlich an der Matrix vorbei fließt.

Da die Auswertung des Absorptionssignals bei den Rezirkulationssystemen durch die Abnahme des Substrats eine saubere Messung der Enzymkinetik nicht zuläßt, wird hier mit dem kontinuierlichen System gearbeitet.

Das kontinuierliche System benötigt eine mit dem immobilisierten Enzym gefüllte Säule, eine Pumpe, eine Durchflußküvette und ein Photometer zur Messung. Die einzelnen Komponenten dieses Systems werden im folgenden näher beschrieben.

3.3.2 Säule

Als Säule wird eine 100/200 μl -Einmal-Mikropipette (Hirschmann Laborgeräte) mit einem Außendurchmesser von 2,3 mm (Innendurchmesser 1,6 mm) verwendet, die auf eine Länge von etwa 5 cm gekürzt wird und dessen unteres Ende zu einem schmalen Auslauf ausgezogen wird. Als Filter wird in die Pipette zu Beginn dieser Verschmälerung eine Teflon-Fritte von etwa 1 mm Höhe eingelegt, die vorher in der passenden Größe ausgestanzt wurde.

Das in HCl-Lösung suspendierte immobilisierte Enzym wird unter Schütteln mit einer Eppendorfpipette (100-200 μl) aufgenommen und in die Säule überführt. Unter Umständen wird dieser Vorgang mehrfach wiederholt, bis das abgesetzte Matrixmaterial in der Säule eine Höhe von etwa 0.5 cm hat (Abb. 3-13). Man erhält dann eine Säule mit einem Matrixvolumen von ca. 10 μl . Die Menge an eingefüllter Matrix beträgt bei diesem Volumen etwa 10 mg Kieselgel.



Abb. 3-13: Säule für die Durchflußmessungen

Das Säulenmaterial wird dann mit 50 mmol/l Trispuffer pH 8.2 durchspült und ist so in abgeklemmtem Zustand gekühlt über längere Zeit lagerbar.

3.3.3 Versuchsaufbau

Das Experiment findet in einem Brutschrank statt, um die Umgebungstemperatur für das immobilisierte Enzym konstant halten zu können (Abb. 3-14).

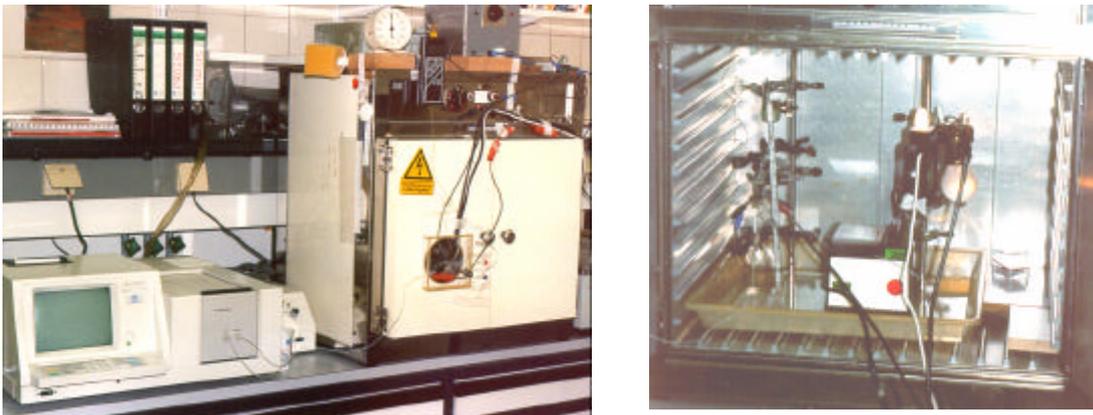


Abb. 3-14: Versuchsaufbau der Durchflußmessung

Die Säule wird dabei an einem Stativ frei im Raum befestigt. Über eine Schlauchpumpe wird aus einem Vorratsgefäß die Substratlösung durch die Säule gepumpt. Als Verbindungsschläuche werden Teflon-Schläuche verwendet. Etwa 2-3 cm hinter der Säule wird über ein U-Stück der Meßfühler eines Ni-Cr/Ni-Thermoelements in die Flüssigkeit eingebracht (Abb. 3-16). Dabei ist darauf zu achten, daß die Öffnung für den Meßfühler gut abgedichtet ist. Über Teflon-Schläuche wird die Produktlösung direkt zum Photometer geleitet und dort die Absorption mit einer 8 μ l-Durchflußküvette gemessen. Nach der Messung wird die Produktlösung außerhalb des Photometers gesammelt. Ein Schema des Versuchsaufbaus ist in Abbildung 3-15 dargestellt.

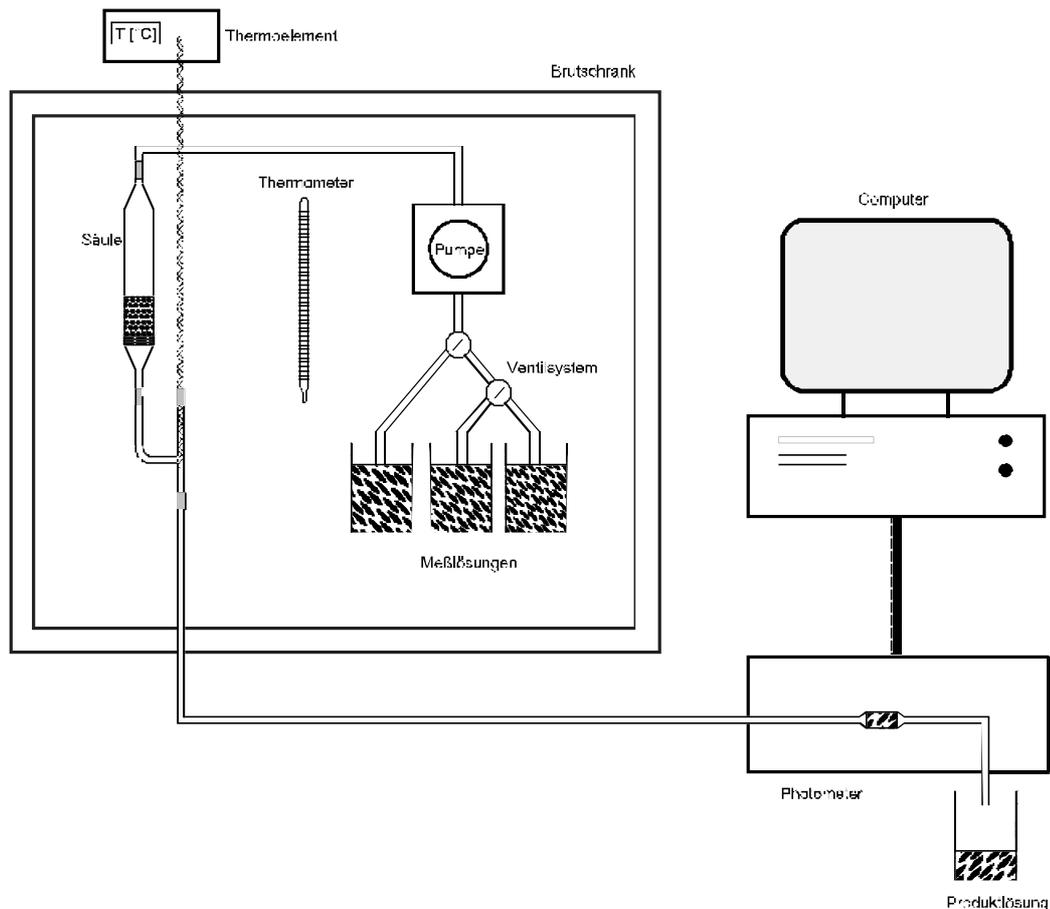


Abb. 3-15: Schema des Versuchsaufbaus für die Durchflußmessung

Der Brutschrank besitzt eine in die Tür hineingeschnittene abdeckbare Öffnung zur Durchleitung der benötigten Kabel und des Schlauchsystems (Abb. 3-17). Um auch Substratlösungen aus verschiedenen Vorratsgefäßen ohne Öffnen des Brutschrankes während des Experiments verwenden zu können, wird ein außen am Brutschrank angebrachtes Ventilsystem benutzt, daß immer nur eine Zuleitung zur Säule öffnet (Abb. 3-17). Wichtig ist dabei aber, daß die jeweiligen Substratlösungen bis zum entsprechenden Ventil bereits vor Versuchsbeginn vorgespült werden, um das Entstehen von Luft im System zu vermeiden.



Abb. 3-16: U-Stück für die Messung der Temperatur in der Flüssigkeit

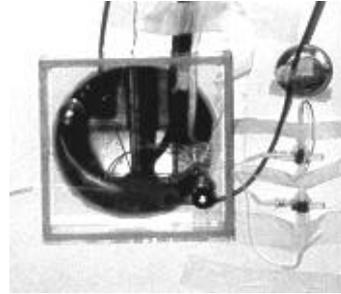


Abb. 3-17: Öffnung und Ventilsystem am Brutschrank

3.3.4 Durchflußmessung und -konstanz

Die Pumpgeschwindigkeit der Pumpe (P1-Peristaltikpumpe, Pharmacia) wird so eingestellt, daß der Fluß wegen der sonst auftretenden Diffusionsprobleme nicht zu langsam wird, gleichzeitig aber kein zu hoher Druck entsteht, der das Material in der Säule verdichten würde. Bei den hier verwendeten Säulen war ein Fluß von etwa 12 ml/h optimal.

Gemessen wird der jeweilige Fluß, indem hinter dem Photometer die Produktlösung gesammelt wird und in Zeitabständen von 20-30 min über das Gewicht das Volumen der Lösung bestimmt wird.

Die Konstanz der Fließgeschwindigkeit wird durch Volumenbestimmung von Fraktionen, die alle zwei Minuten gesammelt wurden, bestimmt. Die Abweichung vom Mittelwert betrug dabei maximal 2 %.

3.3.5 Temperaturmessung und -konstanz

Die Umgebungstemperatur für das jeweilige Experiment wird über den Brutschrank eingestellt, in dem das Experiment stattfindet. Dieser wird auf eine Temperatur von ca. 33 °C aufgeheizt und dann die Regelung abgeschaltet. Während der Versuchsdauer wird die Lufttemperatur im Brutschrank über eine Dimmerschaltung einer im Brutschrank (Volumen ca. 0.11 m³) befindlichen Glühlampe (40 W) und eines Ventilators zur gleichmäßigen Verteilung der Luft konstant gehalten (Abb. 3-18).

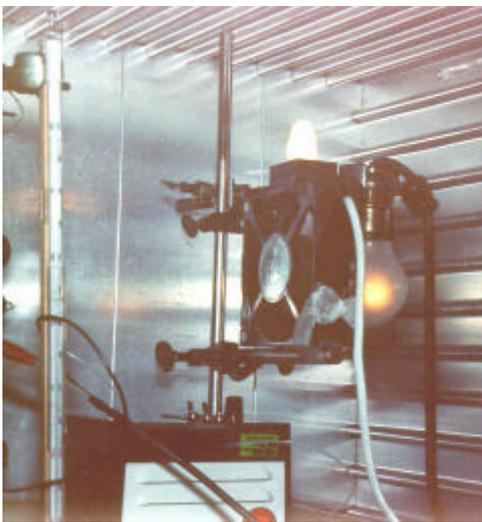


Abb. 3-18: Konstanthaltung der Temperatur

Gemessen wird die Lufttemperatur im Brutschrank über ein Quecksilber-Thermometer, das frei im Raum in der Nähe der Versuchs-Säule angebracht war. Sie beträgt während der Experimente üblicherweise 32 ± 1 °C. Die Flüssigkeitstemperatur der Produktlösung wurde über einen etwa 2-3 cm hinter der Säule in den Flüssigkeitsstrom eingebrachten Meßfühler eines Ni-Cr/Ni-Thermoelements mit einer Genauigkeit von ± 0.1 °C bestimmt. Diese lag in der Regel 1.5 °C niedriger als die Raumtemperatur. Die Abweichung von diesen mittleren Temperaturen betrug über die gesamte Versuchsdauer maximal 3 %.

3.3.6 Enzymaktivitätsmessung im Durchfluß

Für die Enzymaktivitätsmessungen im Durchfluß wird der in Kapitel 3.3.3 beschriebene Versuchsaufbau verwendet.

Lösungen:

- Substrat-Stammlösung:
20.0 mmol/l BAPA (43.5 mg BAPA in 5 ml Dimethylsulfoxid gelöst)
- im Experiment eingesetzte Substratlösung:
1.0 mmol/l BAPA-Stammlösung mit Puffer verdünnt
- Pufferlösung:
50 mmol/l Tris/HCl, pH 8.2

Meßbedingungen:

- Wellenlänge: 410 nm
- Küvette: 8 µl-Durchfluß, Schichtdicke 1 cm
- Pumpgeschwindigkeit s. Kapitel 3.3.4
- Temperatur s. Kapitel 3.3.5
- Meßintervall 6 s

Vor Beginn des Experiments wird das gesamte Schlauchsystem von den Vorratslösungen bis zur Meßzelle mit reiner Substratlösung (Stammlösung mit Puffer auf eine Konzentration von 1 mmol/l verdünnt) vorgespült. Das Photometer wird hiermit auf Null abgeglichen. Nach dem Abgleich wird die Säule verbunden mit dem U-Stück für den Meßfühler in das Schlauchsystem integriert. Jetzt wird gleichzeitig die Pumpe, eine Uhr zur Überwachung und Registrierung der Veränderungen während des Experiments und die Aufzeichnung am Photometer gestartet.

Die zeitliche Verzögerung zwischen dem tatsächlich in der Säule vorliegenden Substratumsatz und der Aufzeichnung der Absorption am Photometer wird durch Länge und Querschnitt des Schlauchsystems hinter der Säule bestimmt.

An das Photometer ist über eine serielle Schnittstelle ein Computer angeschlossen, der über die entsprechende Programmierung (Programme s. Anhang) die gemessenen Absorptionsdaten aufzeichnet. Diese Daten können dann mittels eines Plot-Programmes (Brend'amour, Strahlencentrum Gießen) ausgewertet werden.

3.3.7 Wahl des Substrates

Mit den drei Trypsin-Substraten TAME, BAEE und BAPA wurden im Durchflußverfahren Aktivitäts-Tests durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß der Null-Abgleich bei Verwendung der Substrate TAME und BAEE durch die hohe Absorption des Substrates bei der Wellenlänge des Meßstrahls schwierig war. Außerdem liegt die spezifische Aktivität des Trypsins gegenüber den Substraten TAME und BAEE um Größenordnungen höher als für das Substrat BAPA, so daß hier bei einer für die Versuchsdurchführung sinnvollen Menge an eingesetztem Trypsin die Messung der Absorption für die Produktentstehung weit außerhalb des Meßbereichs des Photometers liegt.

Daher wurde im folgenden für alle Durchflußmessungen mit immobilisiertem Trypsin das Substrat BAPA verwendet.

3.3.8 Stabilität des Substrates BAPA (Lösungsverhalten)

Für die Enzymaktivitätstests mit löslichem Trypsin wurden Substratlösungen aus einer BAPA-Stammlösung mit 1% DMSO als Lösungsmittel in Tris-Puffer und Zugabe von CaCl_2 hergestellt. Es stellte sich allerdings heraus, daß die Zugabe von CaCl_2 auf die Löslichkeit des BAPA im Puffer einen negativen Einfluß hatte, so daß für die Durchfluß-Läufe mit immobilisiertem Trypsin auf die Zugabe von CaCl_2 im Puffer verzichtet wurde. Der stabilisierende Effekt des CaCl_2 auf das lösliche Trypsin wird hier

schon durch die Bindung des Trypsins an die Matrix erreicht (GLASSMEYER und OGLE, 1971).

Außerdem zeigte sich, daß ein höherer Anteil an DMSO in der Stammlösung die Löslichkeit des Substrates BAPA gerade bei Zugabe von Salzen stark verbesserte und eine höhere Stabilität in den Durchfluß-Läufen mit immobilisiertem Trypsin erbrachte. Daher wurde für die Enzymaktivitätsmessungen im Durchfluß eine BAPA-Stammlösung in einer Konzentration von 50 mmol/l bzw. 20 mmol/l angesetzt. Da die für den Test verwendete Substratlösung wiederum auf eine Konzentration von 1 mmol/l verdünnt wurde, entspricht dies einem DMSO-Gehalt in der Meßlösung von 2 bzw. 5 %.

3.3.9 Bestimmung der pH-Abhängigkeit für das immobilisierte Trypsin

PUVANAKRISHNAN und BOSE beschrieben 1980 für Trypsin und WENGENMAYER et al. 1977 für 1,4- α -Glukan-Phosphorylase einen Shift des pH-Optimums für die Aktivität des immobilisierten Enzyms gegenüber dem löslichen Enzym. Um die pH-Abhängigkeit des immobilisierten Trypsins zu bestimmen, wird die in Kapitel 3.3.3 beschriebene Durchflußmethode angewendet.

Lösungen:

- Substratlösung:
 - 100.0 mmol/l BAPA-Stammlösung
(43.5 mg BAPA in 1 ml Dimethylsulfoxid gelöst)

- Pufferlösungen:
 - a) 50 mmol/l Tris-Maleat, pH 8.5
 - 50 mmol/l Tris-Maleat, pH 5.5

 - b) 50 mmol/l Tris/HCl, pH 9.0
 - 50 mmol/l Tris/HCl, pH 7.2

Meßbedingungen:

- Wellenlänge: 410 nm
- Küvette: 1 cm-Durchfluß (Spektralphotometer PE 124, Perkin-Elmer)
- Temperatur: 25 °C

Vor dem Einsatz in den Test wird die Substrat-Stammlösung mit den jeweiligen Puffern auf eine Konzentration von 1 mmol/l verdünnt. Über einen Gradientenmischer wurde der pH-Wert der Substratlösungen in Stufen von $\Delta\text{pH} = 0.15$ (Stufendauer 12 min) mit dem Tris-Maleat-Puffer von pH 8.5 auf pH 5.5 bzw. in Stufen von $\Delta\text{pH} = 0.09$ (Stufendauer 6 min) mit dem Tris-Puffer von pH 9.0 auf pH 7.2 verändert.

Der Substratumsatz wird photometrisch im Durchfluß gemessen und die jeweilige Absorption mit Hilfe eines Schreibers aufgezeichnet.

3.3.10 Bestimmung der Temperatur-Abhängigkeit für das immobilisierte Trypsin

Auch zur Bestimmung der Temperaturabhängigkeit wird die in Kapitel 3.3.3 beschriebene Durchflußmethode angewendet. Für die verschiedenen Messungen wurden Säulen verwendet, die mit unterschiedlichen Ansätzen von immobilisiertem Material gefüllt waren.

Lösungen:

- Substratlösung:
100.0 mmol/l BAPA-Stammlösung
(43.5 mg BAPA in 1 ml Dimethylsulfoxid gelöst)
- Pufferlösungen:
50 mmol/l Tris/HCl, pH 8.2

Meßbedingungen:

- Wellenlänge: 410 nm
- Küvette: 8 µl-Durchfluß
- Temperaturbereich: 25-35 °C bzw. 10-54 °C

Die Temperaturregelung wird mit Hilfe eines Wasserbades vorgenommen, dessen Temperatur an einer Digitalanzeige auf 0.1 °C genau eingestellt werden kann. Mit dem Wasserbad ist über ein Schlauchsystem ein Temperiermantel verbunden, in den die Säule mit dem immobilisierten Trypsin eingebracht wird. Um die Temperaturen unterhalb Zimmertemperatur (27 °C) zu erreichen, wird zusätzlich eine Gegenkühlung eingeschaltet. Über einen Temperaturfühler, der direkt neben der Säule in den Temperiermantel eingesetzt ist, wird die dort herrschende Temperatur abgelesen.

Der Substratumsatz wird photometrisch im Durchfluß gemessen und die jeweilige Absorption über einen angeschlossenen Rechner aufgezeichnet und ausgewertet.

3.4. UNTERSUCHUNGEN ZUR DENATURIERUNG DES IMMOBILISIERTEN TRYPSINS

3.4.1 Allgemeine Voraussetzungen

Proteine werden über kovalente Bindungen, Ionenbindungen, Wasserstoffbrücken und nichtkovalente intramolekulare Wechselwirkungen in ihrer dreidimensionalen Konformation gehalten. Zu den kovalenten Bindungen gehören z. B. Schwefelbrücken, die sich zwischen zwei Cysteinen ausbilden können.

Durch geeigneten Einsatz von Denaturierungsmitteln kann man die dreidimensionale Struktur eines Proteins destabilisieren. So kann z. B. Harnstoff einen Teil der Wasserstoffbrücken im Protein lösen, die Zugabe eines Salzes kann in einer Proteinlösung die ionischen Wechselwirkungen im Protein stören.

3.4.2 Denaturierung mit Harnstoff

Um die Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Grad der Denaturierung durch Harnstoff zu überprüfen, wurden mit dem immobilisierten Enzym Durchflußmessungen mit Harnstoff-Gradienten durchgeführt.

Lösungen:

- Substrat-Stammlösung:
20.0 mmol/l BAPA (43.5 mg BAPA in 5 ml Dimethylsulfoxid gelöst)
- Pufferlösung:
50 mmol/l Tris/HCl, pH 8.2
- Gradientenlösungen:
A. 50 mmol/l Tris/HCl, pH 8.2
B1. 6 mol/l Harnstoff gelöst in Puffer bzw.
B2. 3 mol/l Harnstoff gelöst in Puffer

Meßbedingungen:

- Wellenlänge: 410 nm
- Küvette: 8 μ l-Durchfluß
- Temperatur: 25 °C

Die Substrat-Stammlösung wird mit den jeweiligen Gradientenlösungen A und B1 bzw. B2 auf eine Konzentration von 1 mmol/l verdünnt und so in den Test eingesetzt.

Über einen Stufengradienten wurde durch Mischen der eingesetzten Substratlösungen A und B1 der Harnstoffgehalt mit $\Delta c = 0.6$ mol/l pro Stufe (Stufendauer 23 min) von 0 mol/l (entsprechend 0 % Lösung B1) auf 6 mol/l (entsprechend 100 % Lösung B1) verändert. Die Substratkonzentration liegt während des gesamten Vorgangs in der gemischten Lösung in einer Konzentration von 1 mmol/l vor und wird bei der Variation des Harnstoffgehaltes nicht verändert.

Außerdem wurden Experimente durchgeführt, bei denen der Harnstoffgehalt der Meßlösung mit $\Delta c = 0.3$ mol/l pro Stufe (Stufendauer 23 min) von 0 mol/l (entspricht 0 % Lösung B2) auf 3 mol/l (entspricht 100 % Lösung B2) verändert wurde.

Der Substratumsatz wird photometrisch im Durchfluß gemessen und die jeweilige Absorption über einen angeschlossenen Rechner (s. auch Kapitel 3.3.6) aufgezeichnet und ausgewertet.

3.4.2.1 Reversibilität der Denaturierung durch Harnstoff

Um die Reversibilität der Denaturierung durch Harnstoff zu überprüfen, wird die Durchflußmessung mit zwei aufeinanderfolgenden Stufen-Gradienten, einmal von 0-6 mol/l Harnstoffkonzentration und anschließend ein entgegengesetzter Gradient von 6-0 mol/l in gleicher Weise wie vorher beschrieben durchgeführt.

Außerdem wird eine Durchflußmessung durchgeführt, bei der ein linearer Gradient (Dauer 4h) ansteigend von 0-6 mol/l Harnstoff in den Substratlösungen verwendet, die höchste Konzentration 5 min gehalten und anschließend ein linearer Gradient abfallend von 6-0 mol/l Harnstoff verwendet wird.

3.4.3 Einfluß von Salzen auf die Denaturierung durch Harnstoff

Die Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Salzgehalt in den Substratlösungen wird nicht mit reinen Salzlösungen durchgeführt, da mit diesen keine stabilen Durchflußmessungen erzielt werden konnten, weil das Substrat in den so angesetzten Meßlösungen ausfiel. Die Salzgradientenlösung wird daher nicht in Puffer, sondern in Verbindung mit einer Harnstofflösung angesetzt.

Lösungen:

- Substrat-Stammlösung:
20.0 mmol/l BAPA (43.5 mg BAPA in 5 ml Dimethylsulfoxid gelöst)
- Pufferlösung:
50 mmol/l Tris/HCl, pH 8.2
- Harnstofflösung:
2 mol/l Harnstoff in Puffer gelöst
- Gradientenlösungen:
A. 2 mol/l Harnstofflösung
B. 0.5 mol/l NaCl in Harnstofflösung gelöst

Meßbedingungen:

- Wellenlänge: 410 nm
- Küvette: 8 µl-Durchfluß, Schichtdicke 1 cm
- Temperatur: 25 °C

Die Substrat-Stammlösung wird mit den jeweiligen Gradientenlösungen A und B auf eine Konzentration von 1 mmol/l verdünnt und so in den Test eingesetzt.

Über einen Stufengradienten wurde durch Mischen der eingesetzten Substratlösungen A und B der Salzgehalt der Meßlösung mit $\Delta c = 0.05 \text{ mol/l}$ pro Stufe (Stufendauer 23 min) von 0 mol/l (entspricht 0 % Lösung B) auf 0.5 mol/l (entspricht 100 % Lösung B) verändert. Auch hier liegt die Substratkonzentration während des gesamten Vorgangs in der gemischten Lösung in einer Konzentration von 1 mmol/l vor und wird bei der Variation des Salzgehaltes nicht verändert (vgl. Kapitel 3.4.2).

Der Substratumsatz wird photometrisch im Durchfluß gemessen und die jeweilige Absorption über einen angeschlossenen Rechner (s. auch Kapitel 3.3.6) aufgezeichnet und ausgewertet.

3.5. APPLIKATION ELEKTRISCHER FELDER

3.5.1 Versuchsaufbau

Für die Experimente mit Applikation eines elektrischen Feldes wurde im Prinzip der Versuchsaufbau für die Durchflußmessungen beibehalten. Das elektrische Feld wurde über einen Plattenkondensator, in den die Säule eingebracht war, appliziert. Dieser Plattenkondensator bestand aus zwei Kupferplatten mit einer Fläche von 1 cm x 1 cm und einer Dicke von 0.2 mm, die auf einer 5 x 5 cm großen und 3 mm dicken Acrylglasplatte aufgeklebt waren (Abb. 3-19). An die Kupferplatten waren Bananenstecker gelötet, über die der Kondensator mit einer Spannungsquelle verbunden werden konnte. Der Plattenabstand konnte mit Hilfe von Abstandshaltern konstant gehalten werden und betrug bei diesen Experimenten 0.35 cm.

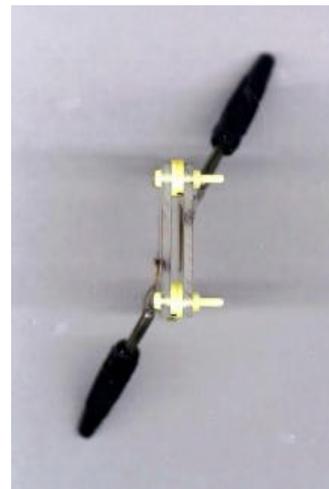
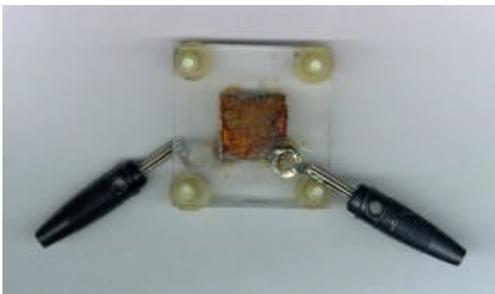


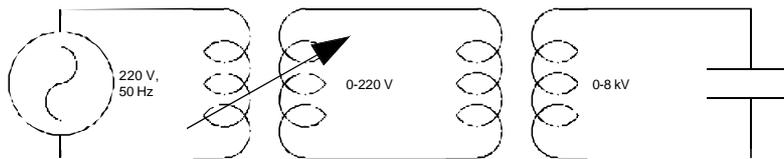
Abb. 3-19: Auf- und Seitenansicht des verwendeten Kondensators

Es wurden zwei verschiedene Spannungsquellen für die Applikation des Feldes benutzt. Die erste Spannungsquelle verwendete die Netzfrequenz von 50 Hz und die Netzwechselspannung von ~ 220 V, die über einen Regeltransformator (0-200 V) und einen zweiten nachgeschalteten Transformator auf eine regelbare Wechselspannung von 0-8 kV_{eff} hochtransformiert wurde. Bei einem Plattenabstand des Kondensators von 0.35 cm war allerdings die Spannung auf $V_{\max} = 9.6$ kV_{SS} (= 3.4 kV_{eff}) beschränkt, da es sonst zu Funkenüberschlägen kam.

Die maximale elektrische Feldstärke im Kondensator ist dann gegeben durch:

$$E_0 = \frac{\frac{9.6}{2} \text{ kV}_{SS}}{0.35 \text{ cm}} = 1.37 \cdot 10^4 \text{ V/cm}$$

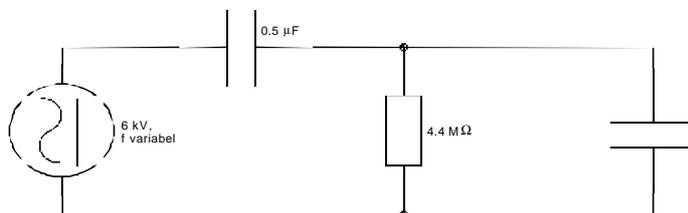
Ersatzschaltbild für das System:



Die zweite Spannungsquelle bestand aus einer 6kV-Gleichspannungsquelle (KepCo), die über einen Funktionsgenerator mit einer variablen Sinusfrequenz angesteuert wird, wobei die Höhe der maximal verfügbaren Spannung ($V_{\max} = 6 \text{ kV}_{SS} = 2.12 \text{ kV}_{\text{eff}}$) von der gewählten Frequenz abhängig ist. Der Gleichspannungsanteil wird über einen nachgeschalteten Kondensator weggefiltert. Hier ist die maximale elektrische Feldstärke im Kondensator gegeben durch:

$$E_0 = \frac{\frac{6}{2} \text{ kV}_{SS}}{0.35 \text{ cm}} = 8.57 \cdot 10^3 \text{ V/cm}$$

Ersatzschaltbild für das System:



Die an den Kondensator über die beiden Spannungsquellen angelegte Spannung wird über einen Hochspannungstastkopf, der direkt an die Kondensatorplatten angeschlossen ist bzw. über einen Spannungsteiler (Faktor 1:10000) an einem Oszillographen überprüft.

3.5.1.1 Feldstärkeberechnung

Gegenüber der elektrischen Feldstärke $E_0=U/d$ in einem Kondensator in Luft mit einer Dielektrizitätskonstante von $\epsilon = 1$ wird die Feldstärke im Inneren eines in den Kondensator eingebrachten Materials mit einer Dielektrizitätskonstante von $\epsilon > 1$ abgeschwächt. Für die Berechnung der Abschwächung im Innenraum müssen die Stetigkeitsbedingungen für Tangential- und Normalkomponenten des Potentials bzw. des Feldes an der Grenzfläche berücksichtigt werden. In diesem Fall gibt es zwei Grenzflächen, die betrachtet werden müssen, nämlich der Übergang von der Luft in das Zylindermaterial und der Übergang vom Zylindermaterial in den Innenraum. Im Innenraum kann man das elektrische Feld dann als homogen ansehen. Bei der Berechnung wird die Zylinderachse in z -Richtung, das elektrische Feld parallel zur x -Achse gewählt (Abb. 3-20).

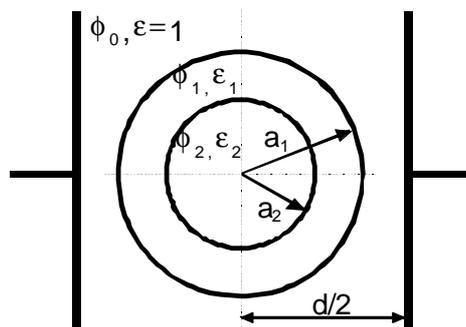


Abb. 3-20: Darstellung der verwendeten Bezeichnungen für die Feldstärkeberechnung

Folgende Stetigkeitsbedingungen müssen erfüllt werden:

a) für den Übergang von Luft in das Zylindermaterial:

$$\begin{aligned} \frac{\partial \Phi_0}{\partial j} \Big|_{a_1} &= \frac{\partial \Phi_1}{\partial j} \Big|_{a_1} \\ e_0 \cdot \frac{\partial \Phi_0}{\partial r} \Big|_{a_1} &= e_1 \cdot \frac{\partial \Phi_1}{\partial r} \Big|_{a_1} \end{aligned} \quad (4)$$

b) für den Übergang vom Zylindermaterial in den Innenraum:

$$\begin{aligned} \frac{\partial \Phi_1}{\partial \mathbf{j}} \Big|_{a_2} &= \frac{\partial \Phi_2}{\partial \mathbf{j}} \Big|_{a_2} \\ \mathbf{e}_1 \bullet \frac{\partial \Phi_1}{\partial r} \Big|_{a_2} &= \mathbf{e}_2 \bullet \frac{\partial \Phi_2}{\partial r} \Big|_{a_2} \end{aligned} \quad (5)$$

Der Ansatz für das Potential wird in Zylinderkoordinaten als Fourier-Reihe wie folgt geschrieben (FLÜGGE, 1986):

$$\Phi(r, \mathbf{j}) = \sum_{m=1}^{\infty} (a_m r^m + b_m r^{-m}) \cos(m\mathbf{j}) \quad (6)$$

Nach Einsetzen des Potentials in die Stetigkeitsbedingungen, Berücksichtigung aller weiterer Randbedingungen und anschließendem Koeffizientenvergleich ergibt sich für das elektrische Feld im Innenraum des Zylinders:

$$\mathbf{E}_i = 2 \bullet \left[\frac{\mathbf{e}_1 + \mathbf{e}_2 + (\mathbf{e}_1 - \mathbf{e}_2) \left(\frac{a_2}{a_1}\right)^2}{2\mathbf{e}_1} + \frac{\mathbf{e}_1 + \mathbf{e}_2 - (\mathbf{e}_1 - \mathbf{e}_2) \left(\frac{a_2}{a_1}\right)^2}{2\mathbf{e}_0} \right]^{-1} \bullet \mathbf{E}_0 \quad (7)$$

Der Außenradius a_1 des Zylinders beträgt 1.65 mm, der Innenradius a_2 beträgt 0.8 mm. Bei dem Zylindermaterial handelt es sich um Glas mit einer Dielektrizitätskonstante von $\epsilon = 5$ (PAUS, 1995). Das in den Zylinder eingebrachte Material besteht aus einer Mischung von Kieselgel (SiO_2) mit dem daran immobilisierten Trypsin und einer wässrigen Lösung. Für das Kieselgel kann man mit einem ϵ wie bei Glas rechnen (Glas enthält überwiegend SiO_2), die wässrige Lösung besitzt bei 25°C eine Dielektrizitätskonstante von 78.54 (PAUS, 1995). Bei den verwendeten Frequenzen bis 450 Hz sind diese Dielektrizitätskonstanten von der Frequenz unabhängig.

Durch Einsetzen der Parameter ergibt sich für das elektrische Feld im Innenraum des Zylinders:

$$\begin{aligned} (\mathbf{E}_i)_{\min} &= 0.035 \bullet \mathbf{E}_0 && \text{mit } \epsilon_2 \text{ für die wässrige Lösung} \\ (\mathbf{E}_i)_{\max} &= 0.333 \bullet \mathbf{E}_0 && \text{mit } \epsilon_2 \text{ für das Kieselgel} \end{aligned}$$

Bei den theoretischen Überlegungen in Kapitel 4.4.3 wird mit dem Wert $(E_i)_{\min}$ gerechnet, da dieser die minimale Feldstärke angibt und für eine Abschätzung im Inneren der Säule sinnvoller erscheint.

3.5.2 Denaturierung bei den Durchflußmessungen mit Applikation eines elektrischen Feldes

Für die Durchflußmessungen mit Applikation eines elektrischen Feldes wird eine feste Konzentration der Denaturierungsmittel gewählt und zwar diejenige Konzentration, bei der der Substratumsatz durch das immobilisierte Trypsin etwa auf die Hälfte zurückgeht. Dies ist für die Denaturierung durch reinen Harnstoff bei 2 mol/l und für die kombinierte Denaturierung von Harnstoff und Salz bei 2 mol/l Harnstoff + 0.2 mol/l Salz der Fall.

Lösungen:

- Substrat-Stammlösung:
20.0 mmol/l BAPA (43.5 mg BAPA in 5 ml Dimethylsulfoxid gelöst)
- Pufferlösung:
50 mmol/l Tris/HCl, pH 8.2
- Harnstofflösung:
2 mol/l Harnstoff in Puffer gelöst
- Salzlösung:
0.5 mol/l NaCl bzw. KCl in Harnstofflösung gelöst

Für die Messung wird die Substrat-Stammlösung mit den einzelnen Lösungen auf eine Konzentration von 1 mmol/l verdünnt und diese Substratlösungen wahlweise im Experiment eingesetzt.

Meßbedingungen:

- Wellenlänge: 410 nm
- Küvette: 8 µl-Durchfluß
- Temperatur: 25 °C

Der Verlauf der Messung erfolgt wie in Kapitel 3.3.6 beschrieben.

Da sich während der Durchfluß-Experimente mit immobilisiertem Trypsin herausstellte, daß die Konstanz der Absorption bei der Messung und die Stabilität der Substratlösung (kein Ausfallen während der Versuchsdauer) besser gewährleistet war bei der Zugabe von KCl als Salz als bei der Zugabe von NaCl, wurde im weiteren nur noch KCl als Salz verwendet. Bei der Verwendung der reinen Salze ohne Harnstoff im Puffer fiel das Substrat sofort aus.

3.5.2.1 Dichtebestimmung der Denaturierungspuffer

Da die Konstanz des Durchflusses über eine Gewichtsbestimmung der Produktlösung überprüft wird, kann es durch die unterschiedlichen Dichte der verschiedenen Substratlösungen zu Abweichungen kommen. Um diese möglichst gering zu halten, wird die Dichte der Substratlösungen mit einem Pyknometer bestimmt. Mit einem Korrekturfaktor, der sich aus dem Verhältnis der bestimmten Dichte der verschiedenen Substratlösungen zur Dichte der Pufferlösung ($\rho=1.003 \text{ g/cm}^3$) ergibt, wird dann das Volumen der Produktlösung je nach verwendeter Meßlösung korrigiert.

$$\text{Volumen der Produktlösung} = \text{Gewicht der Produktlösung} \left/ \frac{\text{Dichte der Substratlösung}}{\text{Dichte der Pufferlösung}} \right.$$

mit

Dichte der Harnstofflösung: 1.033 g/cm³ (Korrekturfaktor = 1.03)

Dichte der Salz-Harnstoff-Lösung: 1.042 g/cm³ (Korrekturfaktor = 1.04)

3.5.3 Auswertung des Effekts

Jeder Zeitraum einer Befeldung des immobilisierten Trypsins wird als ein Ereignis registriert. Als positiv wird dieses Ereignis gewertet, wenn während der Befeldung ein Effekt auftritt. Ein Effekt auf die Funktion des Trypsins durch das applizierte elektrische Feld wird über eine statistisch signifikante Änderung der Absorption - als Parameter für den Substratumsatz durch Trypsin - mit Applikation des Feldes gegenüber derjenigen ohne Feld definiert. Dabei ist es für den zu untersuchenden Effekt nicht relevant, die absolute Aktivität des eingesetzten Trypsins zu kennen.

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde, soweit möglich, eine einfache Varianzanalyse für die Mittelwerte der einzelnen Versuchsreihen durchgeführt (GEIGY, 1960). Dabei wurden die folgenden Formeln verwendet:

$$Q_{\text{zwischen}} = \sum_i \frac{(\sum_j x_{ij})^2}{n_i} - \frac{(\sum_i x_i)^2}{\sum_i n_i}$$

$$Q_{\text{innerhalb}} = \sum_{i,j} x_{i,j}^2 - \sum_i \frac{(\sum_j x_{ij})^2}{n_i}$$

$$\hat{F} = \frac{\frac{1}{k-1} \cdot Q_{\text{zwischen}}}{\frac{1}{n-k} \cdot Q_{\text{innerhalb}}} \quad \text{mit } k = \text{Anzahl der } i \text{ Gruppen}$$

Die Mittelwerte waren dann auf dem 5%-Niveau signifikant unterschiedlich, wenn $\hat{F} > F_0$ in den Signifikanzschranken der F-Verteilung war (Geigy, S.40).

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

4.1.1 Enzymaktivität des bovinen Trypsins

Für das lösliche bovine Trypsin wurden mit verschiedenen Substraten Enzymtests durchgeführt und die spezifische Aktivität des Trypsins gegenüber diesen Substraten bestimmt.

Die spezifische Aktivität von Rindertrypsin gegenüber dem Substrat BAPA betrug 1.0 ± 0.1 U/mg. Dieser Wert stimmt gut mit anderen Ergebnissen überein, die in dieser Arbeitsgruppe gemacht wurden (ZÜLKE, 1996). In der Literatur findet man einen Wert von 1.62 U/mg angegeben (KLEINE et al., 1976). Dieser ist in etwa eineinhalb mal so hoch wie der hier ermittelte, die Bestimmung des Wertes erfolgte aber mit einer anderen Methode und unter Verwendung nur der halben Substratkonzentration.

Die spezifische Aktivität des bovinen Trypsins für das Substrat BAEE ergab sich zu 56 ± 10 U/mg. Diesen Wert kann man im Rahmen der Abweichung noch gut mit der Literatur, wo ein Wert von maximal 70 U/mg Trypsin angegeben wird (WALSH und WILCOX, 1970) und den Herstellerangaben mit 40 U/mg, die damit eine obere und untere Grenze bilden, vergleichen.

Für das Substrat TAME lag die spezifische Aktivität des Rindertrypsins bei 214 ± 35 U/mg. Auch hier kann man den Wert mit anderen in der Arbeitsgruppe durchgeführten Tests gut vergleichen (SCHROETER, 1997), wenn man berücksichtigt, daß die Berechnung der spezifischen Aktivität in der vorliegenden Arbeit mit einem höheren molaren Extinktionskoeffizienten durchgeführt wurde.

4.1.2 Molare Extinktionskoeffizienten der Substrate für Trypsin

Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität des bovinen Trypsins gegenüber verschiedenen Substraten mußte deren molarer Extinktionskoeffizient bestimmt werden.

Der molare Extinktionskoeffizient für die Aktivitätsmessung mit dem Substrat BAPA konnte bei der Meßwellenlänge von 410 nm zu $9.2 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ bestimmt werden. In der Literatur wird dafür ein Wert von $8.8 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ angegeben (ERLANGER et al., 1961). Auch der häufig in der Literatur verwendete molare Extinktionskoeffizient bei 405 nm von $9.9 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ (NAGEL et al., 1965) konnte mit dieser Untersuchung mit $10.2 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ recht gut bestätigt werden. Das Maximum des Differenzspektrums von pNA gegen BAPA liegt bei 380 nm. Man mißt also bei einer Meßwellenlänge von 410 nm weit außerhalb dieses Maximums, die störende Absorption durch das Substrat selbst ist aber bei dieser Wellenlänge vollständig verschwunden. Die auch oft durchgeführte Messung bei einer Wellenlänge von 405 nm hat historische Gründe, da früher Spektrallinienphotometer mit Quecksilberlampen verwendet wurden.

Für die Aktivitätsmessung mit dem Substrat BAEE lag der molare Extinktionskoeffizient bei der Meßwellenlänge von 253 nm bei $0.811 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$. Dieser Wert stimmt mit der Literatur sehr gut überein, wo der molare Extinktionskoeffizient von BAEE bei 255 nm mit $0.808 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ angegeben wird (BERGMAYER, 1970). In diesem Fall liegt die Meßwellenlänge im Bereich des Maximums des Differenzspektrums von BA gegen BAEE.

Der molare Extinktionskoeffizient für die Aktivitätsmessung mit dem Substrat TAME wurde bei der Meßwellenlänge von 247 nm zu 0.561 bestimmt. Dieser Wert liegt etwas höher als in der Literatur mit $0.54 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ beschrieben. Es ergibt sich allerdings nur eine Abweichung von 4%. Auch hier liegt die Meßwellenlänge außerhalb des Maximums des Differenzspektrums von TA gegen TAME. Sie ergibt sich ebenso aus historischen Gründen, da früher Quarzprismenphotometer verwendet wurden.

4.1.3 K_m -Wert für Trypsin gegenüber dem Substrat BAPA

Enzymaktivitätsbestimmungen werden im allgemeinen unter Sättigungsbedingungen durchgeführt, d.h. bei einer mindestens zehnfach höheren Substratkonzentration als dem K_m -Wert des Enzyms gegenüber diesem Substrat entspricht, da dann die aktiven Zentren des Enzyms nahezu alle mit Substratmolekülen besetzt sind. Daher wurde hier der K_m -Wert von Trypsin gegenüber dem für die weiteren Untersuchungen verwendeten Substrat BAPA bestimmt.

Bei der Bestimmung des K_m -Wertes von bovinem Rindertrypsin für das Substrat BAPA ergab sich ein Wert von 1.77 mmol/l (pH = 8.2, 30°C). Dieser Wert ist zu vergleichen mit Werten aus der Literatur, wo der K_m -Wert bei 15 °C (BERGMEYER, 1970; ERLANGER et al., 1961) und einem pH-Wert von 8.15 zu 0.939 mmol/l und bei 30 °C und einem pH-Wert von 8 zu 0.65 mmol/l (TUPPY et al., 1962) bestimmt wurde. Die beiden Literaturwerte lassen sich gut vergleichen, da bei steigender Temperatur (im Bereich des pH-Optimums für Trypsin) das Enzym effizienter arbeiten sollte, d.h. daß die Umsatzgeschwindigkeit höher ist und sich der K_m -Wert dadurch verringert. Der in dieser Untersuchung gemessene K_m -Wert liegt bei ähnlichen Bedingungen um den Faktor 2.7 höher als der entsprechende Literaturwert. Dies spricht für eine schlechte Umsetzung des Substrates.

Die Aktivitätsmessungen wurden allerdings für das lösliche Trypsin mit einer Substratkonzentration von 0.83 mmol/l und für das immobilisierte Trypsin mit Substratkonzentrationen von bis zu 1 mmol/l durchgeführt, da bei höheren Konzentrationen die Löslichkeit des Substrates beschränkt ist (TUPPY et al., 1962). Dies liegt in beiden Fällen noch unter derjenigen Konzentration, die der des K_m -Wertes entspricht, d.h. die Umsatzgeschwindigkeit ist von der Substratkonzentration abhängig.

4.2 IMMOBILISIERUNG VON TRYPSIN

4.2.1 Inkubationszeiten

Die Immobilisierung von Trypsin an dem anorganischen Kieselgel als Träger wird in drei Schritten durchgeführt: als erstes die Silanisierung des Trägermaterials, danach die Aktivierung des Alkylamin-Carriers mit Glutardialdehyd und schließlich die Kopplung des Trypsins am aktivierten Carrier. Für jeden dieser Schritte, insbesondere für den letzten, ist es wichtig, die richtige Reaktionszeit zu wählen.

Bei der Silanisierung ist die Reaktionszeit insofern vorgegeben, weil hierbei das Aceton völlig verdampfen mußte und danach eine vollständige Trocknung über Nacht erfolgte. Die Inkubationsdauer für die Aktivierung mit Glutardialdehyd wurde im Laufe der verschiedenen Immobilisierungsversuche von 60 Minuten auf 100 Minuten verlängert, womit qualitativ bessere Ergebnisse erzielt werden konnten.

Die Inkubationszeit für die Bindung des Trypsins an den aktivierten Carrier wurde über eine Messung des Überstandes mit Hilfe einer Abnahme der Extinktion bei 280 nm überprüft. Da die Zugabe von Benzamidin in den Puffer die Absorption durch Trypsin bei 280 nm vollständig überlagert (Abb. 4-1), wurde die Kopplung über eine Kontrolle des Überstandes mit der Proteinbestimmung nach LOWRY durchgeführt (Abb. 4-2). Bei dem Verlauf der Absorption bei 750 nm zeigt sich, daß eine Mindestinkubationsdauer von vier Stunden nicht unterschritten werden sollte, durch eine längere Inkubationsdauer bis 390 min wird nur noch eine mäßige Abnahme des Trypsins im Überstand erreicht.

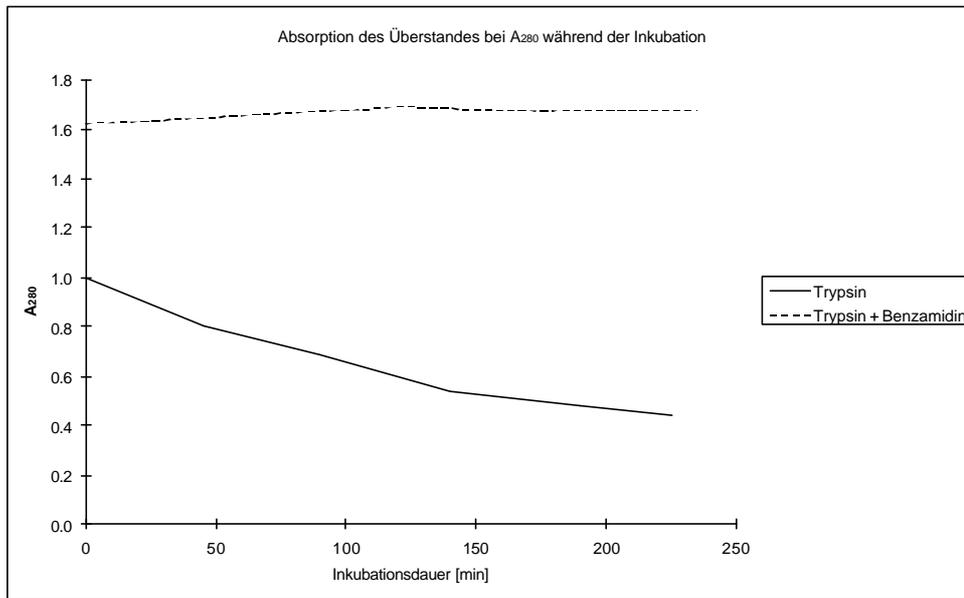


Abb. 4-1: Verlauf der Absorption des Überstandes bei 280 nm für die Immobilisierung von Trypsin mit und ohne Benzamidin im Puffer

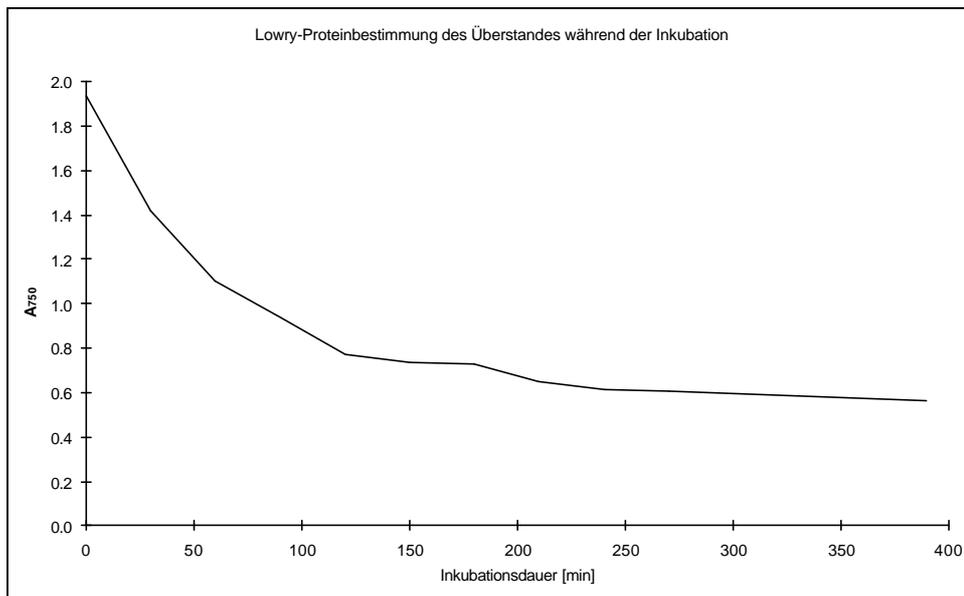


Abb. 4-2: Verlauf der Absorption des Überstandes bei 750 nm für die Immobilisierung von Trypsin mit Benzamidin im Puffer

4.2.2 Am Carrier gebundenes Trypsin

Die am Carrier gebundene Menge an Trypsin wurde bestimmt als Differenz der bei der Immobilisierung eingesetzten Menge an Trypsin und der nach Abschluß der Inkubation noch im Überstand befindlichen Menge an Trypsin. Der Trypsingehalt wurde jeweils mit einer Proteinbestimmung nach LOWRY ermittelt. Dabei ergab sich im Durchschnitt eine gebundene Menge an Trypsin von 12.6 ± 2.5 mg pro Gramm Kieselgel, das entspricht 63 ± 13 % des bei der Immobilisierung eingesetzten Trypsins. Dies ist eine gute Ausbeute, die sich auch in der Literatur bestätigt (MOSBACH et al., 1976), wobei man hier allerdings nur bedingt vergleichen kann, da das Trypsin dort an einen organischen Carrier gebunden wird und die Ausbeute an gebundenem Enzym deutlich von der Immobilisierungsmethode abhängt (GLASSMEYER und OGLE, 1971).

4.2.3 Aktivität des immobilisierten Trypsins

Die Aktivität des immobilisierten Trypsins wurde mit dem Substrat BAPA in der beschriebenen Weise bestimmt. Dabei ergab sich für das immobilisierte Trypsin eine spezifische Aktivität von etwa 30-40 % der Aktivität des löslichen Trypsins für das Substrat BAPA, wobei man jedoch berücksichtigen muß, daß die mit der beschriebenen Methode gemessenen Werte aufgrund des störenden Einflusses durch den Carrier nur eine qualitative Aussage bieten können. Auch in der Literatur liegen sehr unterschiedliche Werte für die spezifische Aktivität des immobilisierten Trypsins vor:

	Carrier	Substrat	spez. Aktivität in % des lösl. Trypsins
Glassmeyer und Ogle, 1971	organisch	BAPA	95 %
Knights und Light, 1974	organisch	BAPA	70 %
Kleine et al., 1976	organisch	BAPA	63-70 %
Mosbach et al., 1976	organisch	BAEE	14-69 %
Levin et al., 1964	organisch	BAEE	40-70 %
Gabel et al., 1970	organisch	TAME	20-70 %
Kumakura und Kaetsu, 1984	organisch	Casein	40-50 %

Man sieht bei dieser Auflistung wie schon bei der Ausbeute des immobilisierten Trypsins, daß es bei der Auswertung der Eigenschaften für das immobilisierte Trypsin

sehr auf die Wahl der Immobilisierungsmethode und -bedingungen ankommt. Ein Aspekt ist dabei auch die Ladung von Carrier und Substrat. Sind diese geladen, so verändert sich je nach Vorzeichen der Ladung von Carrier und Substrat die Umsatzgeschwindigkeit (MOSBACH et al., 1976). Ein anderer Aspekt ist auch die mögliche sterische Behinderung der enzymatischen Umsetzungsreaktion durch die Form des Trägermaterials und durch eine mögliche leichte Konformationsänderung des Enzyms durch die Kopplung an den Träger.

Die Aktivität des immobilisierten Trypsins hängt auch von den Lagerungsbedingungen ab. Der oben genannte Wert für die spezifische Aktivität des immobilisierten Trypsins wurde mit Trypsin erhalten, daß in einer 1 mmol/l HCl enthaltenden Lösung aufbewahrt wurde. Wird das immobilisierte Trypsin lyophilisiert und trocken gelagert, ergibt sich eine 20fach geringere spezifische Aktivität. Auch hier gibt es in der Literatur widersprüchliche Aussagen. Schon 1971 stellt KEIL fest, daß wasserunlösliche Derivate von Trypsin in lyophilisierter Form aufbewahrt werden können und auch PUVANAKRISHNAN und BOSE weisen 1980a darauf hin, daß die funktionale Stabilität des immobilisierten Trypsins gebunden an einen anorganischen Carrier durch eine trockene Lagerung bei 4 °C nicht verändert wird. Währenddessen gibt WEETALL 1976 an, daß das an anorganischen Trägermaterialien immobilisierte Trypsin nicht zu trocknen sondern als feuchte Probe bei 4 °C aufzubewahren sei, nachdem er 1970 noch beschrieben hatte, daß die Gefriertrocknung der Probe der feuchten oder nassen Lagerung vorzuziehen sei.

Ferner erhöht die gleichzeitige Zugabe eines Trypsin-Inhibitors während der Immobilisierung, wie in der Literatur beschrieben (BLANCO und GUIÁN, 1988) die spezifische Aktivität des immobilisierten Trypsins etwa um den Faktor 2.

4.2.4 Abhängigkeit der Enzymaktivität des immobilisierten Trypsins vom pH-Wert

Die Abhängigkeit der Enzymaktivität des immobilisierten Trypsins vom pH-Wert wurde im Durchflußverfahren bestimmt. Dabei wurde die Enzymaktivität des immobilisierten Trypsins über einen pH-Bereich von 5.5 bis 9.0 photometrisch über die Absorption des Produktes verfolgt. In der Auswertung wird die bei einem bestimmten pH-Wert gemessene Absorption auf die Absorption bei pH = 8.2 bezogen, da dieser pH-Wert im Bereich des pH-Optimums für das lösliche Trypsin liegt (bei pH = 8) und dieses derjenige pH-Wert ist, bei dem alle weiteren Messungen durchgeführt wurden. Es zeigte sich, daß die Absorption und damit auch die Aktivität eine über einen weiten Bereich vom vorherrschenden pH unabhängig ist. Erst ab einem pH-Wert niedriger als 7.15 fällt die Absorption leicht und erst ab pH = 6.25 zeigt sich ein deutlicher Rückgang in der Absorption (Abb. 4-3).

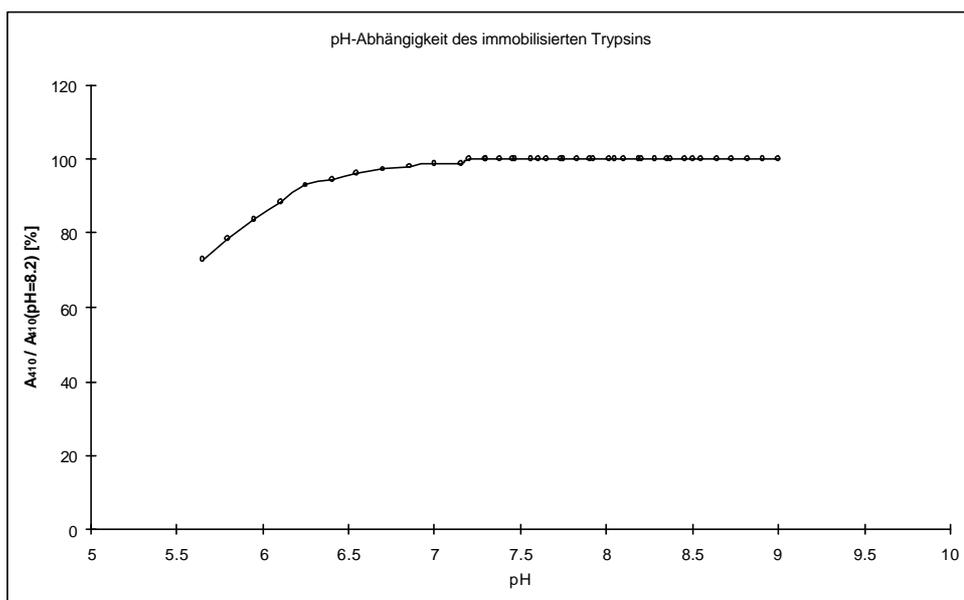


Abb. 4-3: Abhängigkeit der Enzymaktivität des immobilisierten Trypsins vom pH-Wert der Lösung bezogen auf die Aktivität bei pH = 8.2

Es ergibt sich also weder, wie zum Beispiel auch von LEVIN 1964 beschrieben ein pH-Shift in den alkalischeren Bereich für das immobilisierte gegenüber dem löslichen Enzym, noch sind die pH-Aktivitätsprofile für immobilisiertes und lösliches Trypsin fast übereinstimmend wie es KNIGHTS 1974 darstellt. Es ergibt sich vielmehr eine besonders im alkalischen Bereich deutlich höhere pH-Stabilität der Enzymaktivität, wenn man das pH-Profil mit dem des löslichen Enzyms vergleicht, das eine glockenförmige Form mit einem Maximum bei etwa pH = 8.0 zeigt und zu beiden Seiten relativ schnell abfällt mit

Wendepunkten bei $\text{pH} = 6.7$ und $\text{pH} = 10.1$ (STROUD et al., 1975). Das pH-Aktivitätsprofil für das immobilisierte Trypsin zeigt ein deutlich verbreitertes Maximum der pH-Kurve und ein flacheres Abfallen der Kurve zum sauren pH-Bereich hin. Im alkalischen Bereich konnte bis $\text{pH} = 9.0$ keine Verringerung der Aktivität festgestellt werden. In der Literatur wird die breitere Form des pH-Aktivitätsprofils (HABEEB, 1967) mit einem plateau-ähnlichen Verlauf im Bereich von $\text{pH} = 8-10$ (GLASSMEYER und OGLE, 1971) beschrieben.

Die höhere pH-Stabilität läßt sich zum einen damit erklären, daß durch die Bindung des Trypsins an einen Carrier keine Autolyse mehr stattfinden kann, die besonders im neutralen und alkalischen pH-Bereich eine Rolle spielt. Außerdem ist für das Abfallen des rechten Schenkels beim pH-Aktivitätsprofil des löslichen Trypsins laut STROUD (1975) die Zerstörung einer Salzbrücke im Trypsin und damit die Veränderung der dreidimensionalen Struktur des Trypsins verantwortlich. Durch die Bindung des Trypsins an einer Matrix könnte die dreidimensionale Struktur des Trypsins besser konserviert werden, so daß die enzymatische Funktionalität erhalten bleibt. Das Ausbleiben eines pH-Shifts gegenüber dem löslichen Trypsin könnte daran liegen, daß hier ein ungeladener Carrier verwendet wurde. Wie auch LEVIN 1964 beschreibt, ist der beobachtete pH-Shift wahrscheinlich auf eine veränderte H^+ -Ionen-Verteilung durch ein geladenes Trägermaterial zurückzuführen. KNIGHTS führt außerdem 1974 an, daß durch ein gepuffertes System für die Aktivitätsuntersuchungen, wie es hier verwendet wurde, diese Effekte unterdrückt werden.

4.2.5 Abhängigkeit der Enzymaktivität des immobilisierten Trypsins von der Temperatur

Die Abhängigkeit der Enzymaktivität des immobilisierten Trypsins von der Temperatur wurde ebenfalls im Durchflußverfahren bestimmt. Dabei wurde die Enzymaktivität des immobilisierten Trypsins über einen Temperaturbereich von 25 °C bis 35 °C bzw. von 10 °C bis 54 °C photometrisch über die Absorption des Produktes verfolgt (Abb. 4-4 und 4-5).

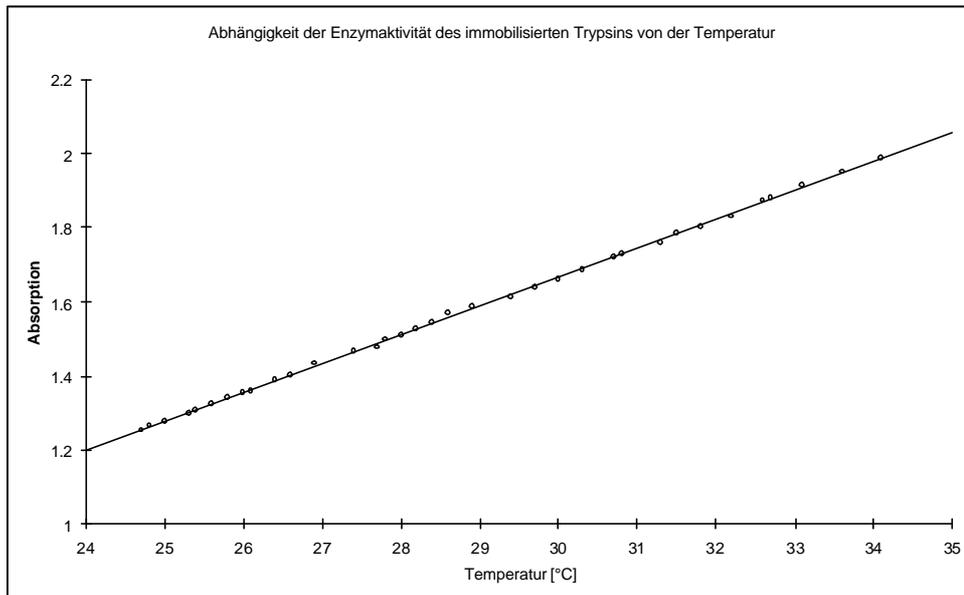


Abb. 4-4: Abhängigkeit der Enzymaktivität des immobilisierten Trypsins von der Temperatur im Bereich von 24.7 °C-34.1 °C
Lineare Regression: $y = 0.0778 x - 0.6683$, $r = 0.9998$

Im Temperaturbereich von 25 °C bis 35 °C zeigt sich dabei eine lineare Beziehung zwischen Temperatur und Absorption als Maß für die Enzymaktivität des immobilisierten Trypsins (Abb. 4-4). Der Temperaturkoeffizient Q_{10} für die Aktivitätszunahme, definiert nach der Regel von van't Hoff, liegt bei einer Temperatursteigerung von 25 °C auf 35 °C bei 1.6, was für Enzymreaktionen ein durchaus üblicher Wert ist.

Die Linearität in diesem Bereich wird auch durch die Messung über einen größeren Temperaturbereich bestätigt. Der Unterschied in der Steigung von 6 % zwischen beiden Messungen in diesem Bereich läßt sich durch die Verwendung zweier verschiedener Präparationen erklären.

Insgesamt zeigt sich über den gesamten untersuchten Temperaturbereich aber der von Arrhenius beschriebene exponentielle Anstieg der Umsatzkurve mit steigender Temperatur bis zu einer kritischen Temperatur. Oberhalb dieser Temperatur überwiegt die temperaturbedingte Inaktivierung des Trypsins, die zu einer schnellen Abnahme der Aktivität führt (Abb. 4-5).

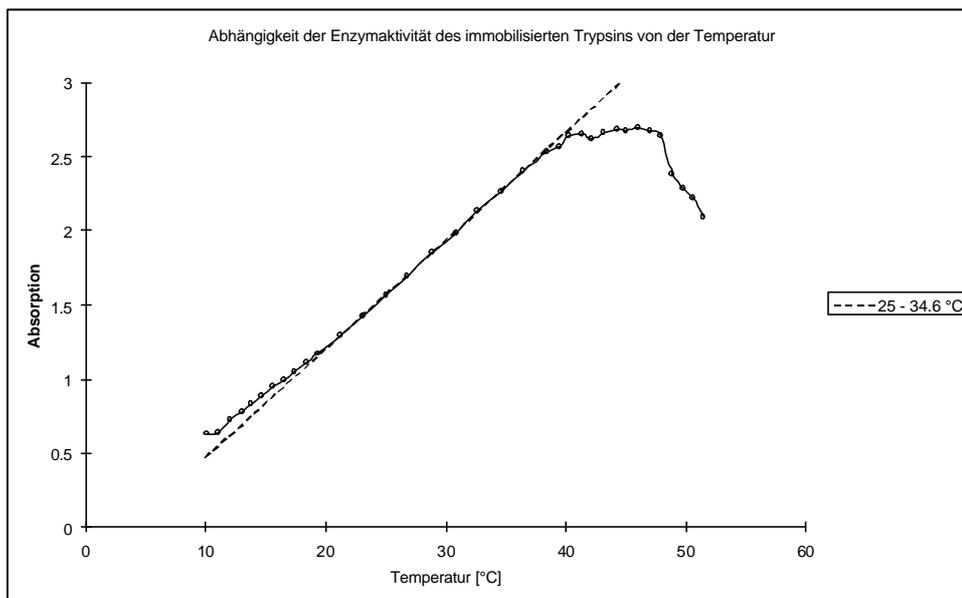


Abb. 4-5: Abhängigkeit der Enzymaktivität des immobilisierten Trypsins von der Temperatur im Bereich von 10 °C-54 °C

Lineare Regression für

25 °C - 34.6 °C: $y = 0.0733 x - 0.2654$, $r = 0.9997$

Die Enzymaktivität des immobilisierten Trypsins steigt bis zu einer Temperatur von 40 °C, bleibt dann bis 46 °C stabil und fällt bei höheren Temperaturen schnell ab. Diese Charakteristik ist vergleichbar mit Daten für das lösliche Trypsin (BUCK et al., 1962). KNIGHTS und LIGHT beschrieben 1974 eine erhöhte Stabilität. Durch die Bindung an einen Carrier sollte das immobilisierte Trypsin gegenüber dem löslichen Trypsin erst bei etwas höheren Temperaturen denaturieren. In dieser Arbeit ergibt sich dahingegen keine erhöhte Temperaturstabilität der Aktivität des immobilisierten Trypsins gegenüber der Aktivität des löslichen Trypsins für das gleiche Substrat (vgl. ZÜLKE, 1997) Dieser Befund wird auch durch die Arbeiten von PUVANAKRISHNAN und BOSE 1980 oder auch schon 1969 von WEETALL gestützt. Erstere beschreiben allerdings gleichzeitig eine erhöhte Stabilität der Enzymaktivität nach Renaturierung des immobilisierten Trypsins durch Abkühlung. In der vorliegenden Arbeit ergab sich durch Abkühlen auf 24 °C nur noch eine Enzymaktivität von ca. 70 % der zu Beginn des Experiments gemessenen Aktivität. Eventuell ist die Bindung des Trypsins an den Carrier mit der hier verwendeten Methode nicht so stark, um eine möglicherweise falsche Rückfaltung des Proteins beim Abkühlen zu vermeiden.

Trägt man die Abhängigkeit der Enzymaktivität über die Absorption gegenüber der Temperatur im Bereich von 25 °C bis 35 °C mit den Werten aus beiden Experimenten in einem Arrhenius-Diagramm auf, so erhält man folgendes Bild (Abb. 4-6).

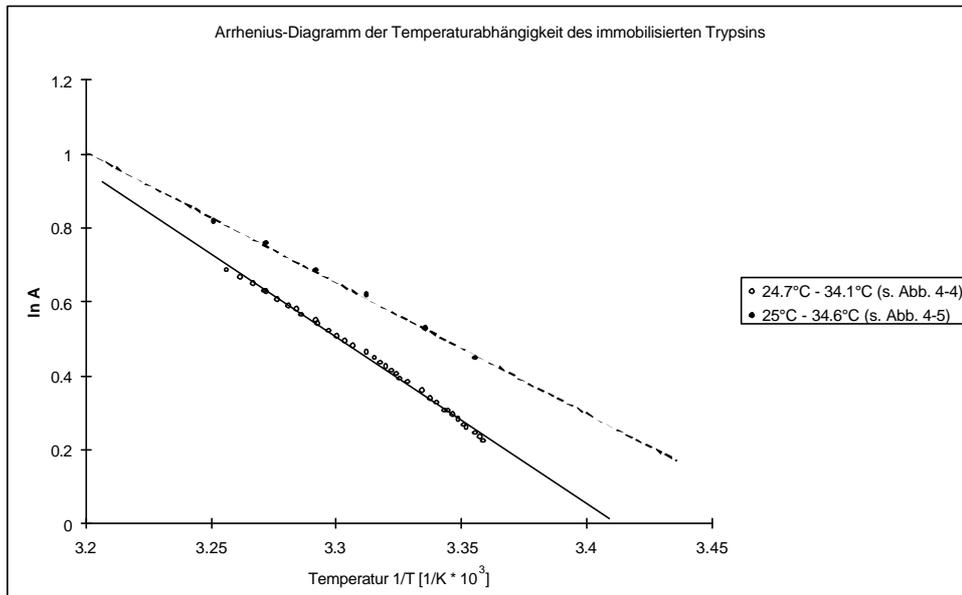


Abb. 4-6: Abhängigkeit der Enzymaktivität des immobilisierten Trypsins von der Temperatur im Bereich von 10 °C-54 °C

Lineare Regression für

24.7 °C - 34.1 °C: $y = -4.4946 \cdot 10^3 x + 15.338$, $r = 0.9985$

25 °C - 34.6 °C: $y = -3.5414 \cdot 10^3 x + 12.341$, $r = 0.9985$

Dieser Auftragung liegt die folgende Formel zugrunde:

$$\ln k = \ln H - \frac{E_A}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (8)$$

mit

k Geschwindigkeitskonstante

H Häufigkeitsfaktor, Aktionskonstante

E_A Aktivierungsenergie

R Gaskonstante = 8.314 J/(mol*K) = 1.987 cal/(mol*K)

T absolute Temperatur in Kelvin

Üblicherweise wird dabei in den Arrhenius-Diagrammen auf der Ordinate der natürliche Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten abgetragen. Diese stand hier nicht zur Verfügung. Allerdings bezeichnet die Geschwindigkeitskonstante einen Wert für die Umsetzung des Substrates pro Zeiteinheit, was der Definition für die Enzymaktivität

entspricht. Diese erhält man über die Multiplikation der Absorption mit einem Faktor, der aus den weiteren Versuchsbedingungen resultiert. Ein multiplikativer Faktor in einem natürlichen Logarithmus verschiebt die lineare Gleichung nur um einen konstanten Faktor parallel zur Ordinate. Die Steigung der Funktion ändert sich dabei nicht, so daß es für deren Ermittlung auch gerechtfertigt ist, für die Ordinate den natürlichen Logarithmus der gemessenen Absorption anzugeben. Über die Steigung erhält man nach Formel (6) die Aktivierungsenergie zu 36.56 kJ/mol (= 8.93 kcal/mol) für die Werte aus Abb. 4-4 bzw. zu 28.81 kJ/mol (= 7.04 kcal/mol). Mit diesen Werten läßt sich der zugehörige Temperaturkoeffizient bestimmen zu 1.6 bzw. 1.5 (RAUEN, 1956), was sehr gut mit dem zuvor aus der Steigung direkt bestimmten Wert für Q_{10} übereinstimmt.

In der Literatur existieren überwiegend Werte für die Aktivierungsenergie für Enzymreaktionen des Trypsins mit Estersubstraten. Mit dem Substrat TAME ergibt sich, ermittelt über einen Temperaturbereich von 27 °C bis 37 °C eine Aktivierungsenergie von 10.68 kcal/mol (de SOUZA OTERO et al., 1980) und mit dem Substrat BAEE eine Aktivierungsenergie von 11.1 kcal/mol über einen Temperaturbereich von 15 °C bis 35 °C (GUTFREUND, 1954). Sie wurden unter Verwendung der reaktionsgeschwindigkeitsbestimmenden Geschwindigkeitskonstante bzw. der Geschwindigkeitskonstante für die maximale Umsetzung des Substrates k_{cat} , die sich bei Esterreaktionen aus der Geschwindigkeitskonstanten für die Deacylierung ergibt, ermittelt. Für die Amidaseaktion des Trypsins wird k_{cat} über die Geschwindigkeitskonstante für den Acylierungsschritt bestimmt. Hier gibt BUTLER 1941 Aktivierungsenergien für Trypsin bei der Hydrolyse von Amidbindungen zwischen 11.2 bis 21.2 kcal/mol abhängig vom benutzten Substrat an. SIMPSON und HAARD finden 1984 für die Aktivierungsenergie für die Hydrolyse von BAPA durch Trypsin einen Wert von 12.7 kcal/mol. Die in dieser Arbeit ermittelten Werte für die Aktivierungsenergie der Amidaseaktion des Trypsins mit dem Substrat BAPA liegen etwa um die Hälfte niedriger. In diesem Zusammenhang wird 1976 von BUCHHOLZ und RÜTH ein diffusionsbedingter Effekt der Substratkonzentration bei der Verwendung von immobilisiertem Trypsin diskutiert. Die Aktivierungsenergie verringert sich dabei bis auf die Hälfte des ursprünglichen Wertes, wenn eine Substratkonzentration verwendet wird, die gleich oder kleiner dem K_m -Wert für dieses Substrat ist. Dies ist in dieser Arbeit der

Fall, da die Messung mit einer Substratkonzentration von 1 mmol/l durchgeführt wurde, welche unter dem hier ermittelten K_m -Wert für BAPA von 1.77 mmol/l liegt.

Die hier bestimmten Daten können später für eine weitergehende Analyse der Experimente mit Applikation eines elektrischen Feldes verwendet werden, da diese Experimente bei einer Temperatur durchgeführt wurden, die in dem hier betrachteten Temperaturbereich liegen. Zu beachten ist, daß die Werte für die Aktivierungsenergie von der verwendeten Säule abhängen, da die Aktivität des immobilisierten Trypsins durch eventuell unterschiedliche Vernetzung mit der Matrix während der Herstellung variieren kann. Es wurde jedoch darauf geachtet, daß die Säulen bei einer Flußrate des Substrates möglichst ähnliche Absorptionen zeigten, so daß die oben errechneten Werte für die Aktivierungsenergie durchaus als Anhaltswerte herangezogen werden können.

4.3 DENATURIERUNG VON IMMOBILISIERTEM TRYPSIN

4.3.1 Denaturierung mit Harnstoff

Die Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Grad der Denaturierung durch Harnstoff wurde mit dem immobilisierten Trypsin im Durchflußverfahren ermittelt. Dabei wurde ein Harnstoffgradient verwendet, bei dem die Konzentration des Harnstoffs in der Meßlösung von 0 mol/l auf 6 mol/l variiert wurde. Die Enzymaktivität wurde über die Absorption des Produktes spektrophotometrisch verfolgt und als Verhältnis der Absorption unter Harnstoffzugabe zur Absorption ohne Harnstoffzugabe aufgetragen.

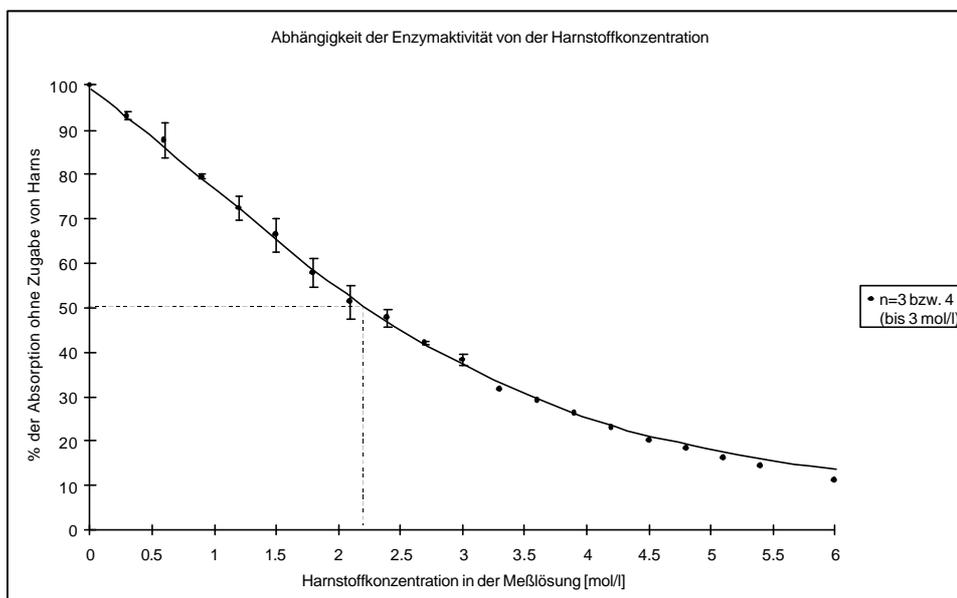


Abb. 4-6: Abhängigkeit der Enzymaktivität des immobilisierten Trypsins von der Harnstoffkonzentration in der Meßlösung bezogen auf die Aktivität ohne Harnstoffzugabe

Es zeigt sich, daß die Aktivität des immobilisierten Trypsins bei der Zugabe von etwa 2 mol/l Harnstoff zur Meßlösung auf die Hälfte reduziert ist. Bei einer Zugabe von 6 mol/l Harnstoff zur Meßlösung erreicht die Enzymaktivität nur noch einen Wert von 15 % derjenigen Aktivität ohne Zugabe von Harnstoff.

HARRIS zeigt 1956 bei der Untersuchung des Einflusses von Harnstoff auf die Enzymaktivität von freiem Trypsin, daß diese erst bei einer Harnstoffkonzentration von 4 mol/l auf die Hälfte reduziert ist. Man sollte annehmen, daß an einen Träger gebundenes

Trypsin gegenüber dem denaturierenden Einfluß von Harnstoff stabiler reagiert, wie dies auch von LEVIN et al. 1964 beschrieben wird. Auch KNIGHTS und LIGHT zeigen 1974, daß sowohl freies als auch immobilisiertes Trypsin erst bei höheren Harnstoffkonzentrationen ihre Aktivität verlieren, wobei sich das immobilisierte Trypsin gegenüber dem freien als stabiler erweist (50 %ige Aktivität für freies Trypsin bei 4 mol/l Harnstoff, für immobilisiertes Trypsin bei 5 mol/l).

GLASSMEYER und OGLE beschreiben 1971 keinen Unterschied bei der Denaturierung von freiem und immobilisiertem Trypsin durch Harnstoff, finden aber eine Abhängigkeit der Stabilität des Trypsins von der Enzymkonzentration. BANO et al. berichten 1980 von unterschiedlichem Verhalten von freiem Trypsin bei der Denaturierung durch Harnstoff in Abhängigkeit von der Reinheit des Enzyms. HARHEN und BARRY stellten 1990 immobilisiertes Trypsin nach unterschiedlichen Methoden an verschiedenen Trägersubstanzen gebunden her und fanden auch hier ein unterschiedliches Denaturierungsverhalten.

Aus diesen unterschiedlichen Ergebnissen wird ersichtlich, daß mehrere Faktoren den Einfluß von Harnstoff auf immobilisiertes Trypsin bestimmen und das in dieser Arbeit aufgezeigte Verhalten durchaus damit in Übereinstimmung gebracht werden kann.

4.3.1.1 Reversibilität der Denaturierung

Zur Untersuchung der Reversibilität der Denaturierung von immobilisiertem Trypsin wurde nach erfolgter Denaturierung die Konzentration des Harnstoffs in der Meßlösung von 6 mol/l über einen Gradienten wieder bis auf 0 mol/l reduziert. Die Absorption des Produktes wird wiederum spektrophotometrisch verfolgt. Da in diesem Fall die Absorption ohne Zugabe des Substrates durch Schwankungen während der Messung nicht auszuwerten war, wird direkt die Absorption des Produktes unter Harnstoffzugabe bei der Darstellung des Ergebnisses verwendet (Abb. 4-7).

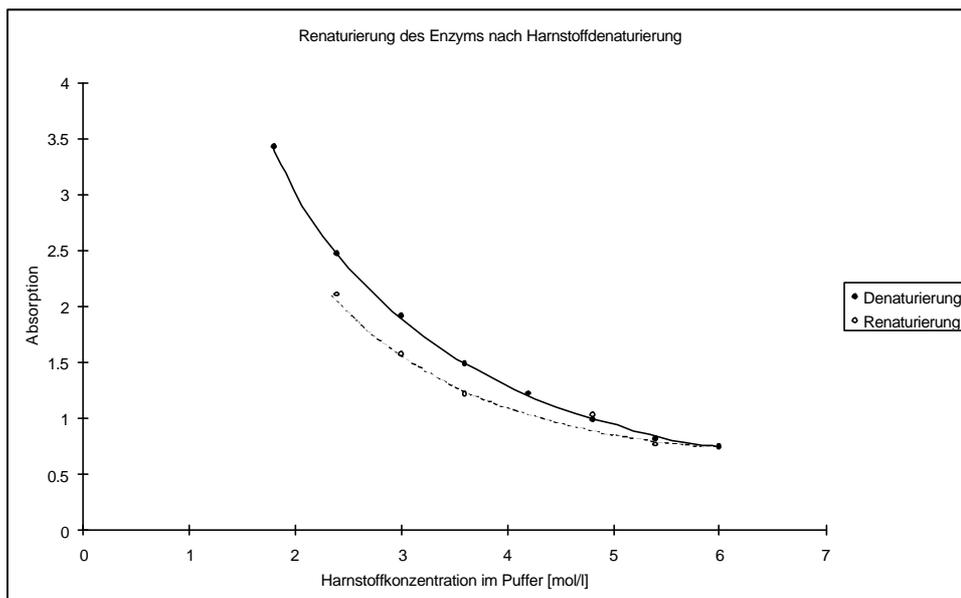


Abb. 4-7: Reversibilität der Denaturierung des immobilisierten Trypsins nach Denaturierung durch Harnstoff

Hier zeigt sich eine fast vollständige Wiederherstellung der ursprünglichen Enzymaktivität, wie dies auch KNIGHTS und LIGHT 1974 darstellen. Die Renaturierung ist hier im Gegensatz zu freiem Trypsin möglich, da die intermolekularen Kontakte durch Kopplung an den Träger stark vermindert werden und damit eine Autolyse der durch den Harnstoff in ihrer dreidimensionalen Struktur aufgelöste Moleküle durch noch aktive Moleküle verhindert wird.

4.3.2 Einfluß von Salzen auf die Denaturierung durch Harnstoff

Der Einfluß von Salzen auf die Enzymaktivität des durch 2 mol/l Harnstoff destabilisierten immobilisierten Trypsins wurde ebenfalls im Durchflußverfahren ermittelt. Dabei wurde ein Salzgradient verwendet, bei dem die Konzentration des Salzes KCl in der Meßlösung von 0 mol/l auf 0.5 mol/l variiert wurde. Der Umsatz des Substrates wurde über die Absorption des Produktes spektrophotometrisch verfolgt und als Verhältnis der Absorption unter Salzzugabe zur Absorption ohne Salzzugabe aufgetragen.

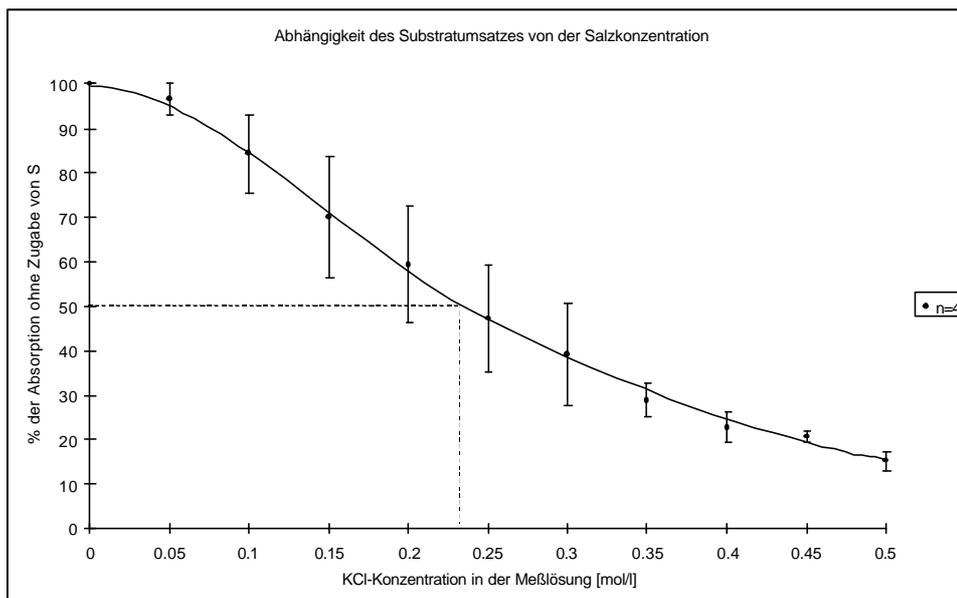


Abb. 4-8: Abhängigkeit des Substratumsatzes des immobilisierten Trypsins von der Salzkonzentration in Gegenwart von 2 mol/l Harnstoff in der Meßlösung bezogen auf die Aktivität ohne Salzzugabe

Hier zeigt sich ein zusätzlicher negativer Effekt des KCl auf den Substratumsatz, der sich in einer leicht sigmoiden Kurve darstellt. Bis zu einer Salzkonzentration von 0.05 mol/l ist dieser Effekt nur sehr gering. Bei einer Salzkonzentration von etwa 0.2 bis 0.25 hat sich der Substratumsatz auf die Hälfte verringert und ist bei einer Zugabe von 0.5 mol/l KCl auf einen Umsatz von 20 % des Ausgangswertes reduziert.

Eine Ursache für dieses Verhalten könnte die Wirkung des K^+ als kompetitiver Inhibitor zu dem positiv geladenen Substrat um den negativ geladenen Asp189-Rest in der Substratbindungstasche des immobilisierten Trypsins sein. Dies wird 1994 auch von TOUGU et al. beschrieben, die für K^+ eine Inhibitorkonstante K_I von 0.28 mol/l für die Hydrolyse von BAPA angeben. Dies wäre dann auch in guter Übereinstimmung mit dem in dieser Arbeit ermittelten Wert für die Salzkonzentration, bei der der Substratumsatz auf die Hälfte reduziert wird.

Eine andere Möglichkeit für die Einflußnahme des KCl auf die Aktivität des Enzyms wäre die Störung der ionischen Wechselwirkungen im Enzym selbst, was sich ebenfalls in einer Reduktion des Substratumsatzes bemerkbar machen würde.

4.3.3 Einfluß von DMSO auf die Enzymaktivität

Da das Substrat BAPA in wäßrigen Lösungen (Puffer) nur in sehr geringen Konzentrationen löslich ist, wurde DMSO als Lösungsvermittler für eine Substratstammlösung verwendet und diese Stammlösung erst direkt vor dem Einsatz in die Messung mit dem Puffer verdünnt. Bei der Zugabe von 1-5 % DMSO in der Meßlösung zeigte sich kein Einfluß auf die Enzymaktivität des Trypsins. Dies wird 1978 auch von SOMORIN et al. beschrieben, die zeigen, daß Dimethylformamid (DMF) als Lösungsmittel für das Substrat BAPA bis zu Konzentrationen von 3 % keinen Einfluß auf die Enzymaktivität von Trypsin hat. Für das Substrat N-Benzoyl-L-Phenylalanyl-L-Valyl-L-Arginin-*p*-Nitroanilid ergab sich auch bei niedrigen Konzentrationen des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) kein Effekt auf die Aktivität des Trypsins.

4.4 APPLIKATION ELEKTRISCHER FELDER

4.4.1 Applikation eines elektrischen Feldes mit Netzfrequenz

4.4.1.1 Befeldung ohne Zusatz von denaturierenden Agentien

Es wurde insgesamt 36 mal eine Befeldung ohne Zusatz von Denaturierungsmitteln durchgeführt. Dabei entfielen 9 Ereignisse auf eine Befeldung mit einer Feldstärke von $4.8 \cdot 10^4$ V/m am Ort der Wechselwirkung und 27 Ereignisse auf eine Befeldung mit einer Feldstärke von $3.36 \cdot 10^4$ V/m. Die Aufteilung der Ereignisse auf die verschiedenen verwendeten Feldstärken und der Effekt der Befeldung auf die Ereignisse ist in der folgenden Tabelle und in Abb. 4-9 dargestellt.

Feldstärke am Ort der Wechselwirkung [10^4 V _{max} /m]	Gesamtzahl der Ereignisse	Anzahl der Ereignisse mit positivem Effekt	Anzahl der Ereignisse ohne Effekt
4.8	9	6	3
3.36	27	6	21
3.2	-	-	-
1.6	-	-	-

Bei einer Feldstärke von $4.8 \cdot 10^4$ V/m waren von den durchgeführten 9 Ereignissen 67 % positive Ereignisse, d.h. Ereignisse, die einen Absorptionsanstieg unter Befeldung bewirkten. Bei einer Feldstärke von $3.36 \cdot 10^4$ V/m ergaben sich noch 22 % positive Ereignisse. Hier zeigt sich also eine Abhängigkeit der Häufigkeit eines positiven Effektes von der Feldstärke.

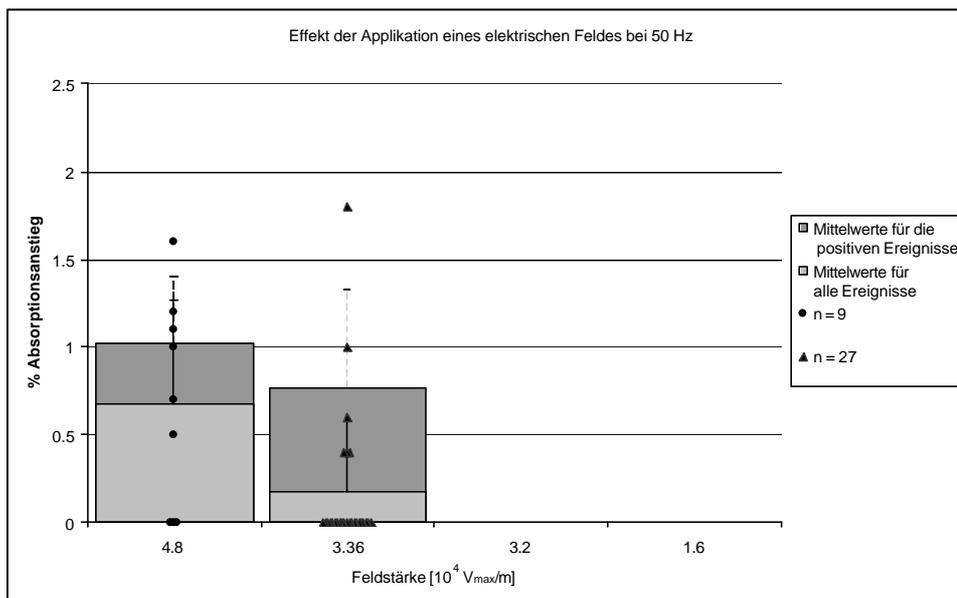


Abb. 4-9: Absorptionsanstieg unter Befeldung in Prozent der Absorption ohne Befeldung ohne Zusatz von Denaturierungsmitteln

Die Größe des Effektes lag unter Berücksichtigung aller Ereignisse bei $4.8 \cdot 10^4$ V/m bei einem Absorptionsanstieg gegenüber derjenigen ohne Befeldung um 0.68 ± 0.59 %, bei $3.36 \cdot 10^4$ V/m bei 0.17 ± 0.41 %. Bei der durchgeführten Varianzanalyse ergab sich, daß die Mittelwerte der Ereignisse bei $4.8 \cdot 10^4$ V/m und bei $3.36 \cdot 10^4$ V/m signifikant unterschiedlich auf dem 5%-Niveau waren. Werden nur die Ereignisse betrachtet, bei denen sich ein positiver Effekt zeigte, so ergibt sich bei $4.8 \cdot 10^4$ V/m ein Absorptionsanstieg gegenüber derjenigen ohne Befeldung um 1.02 ± 0.39 %, bei $3.36 \cdot 10^4$ V/m bei 0.77 ± 0.58 %. Hier zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten für $4.8 \cdot 10^4$ V/m und $3.36 \cdot 10^4$ V/m.

4.4.1.2 Befeldung unter Zusatz von Harnstoff

Insgesamt wurde 133 mal eine Befeldung unter Zusatz von Harnstoff in der Substratlösung durchgeführt. Von diesen entfielen 25 Ereignisse auf eine Befeldung mit einer Feldstärke von $4.8 \cdot 10^4$ V/m am Ort der Wechselwirkung und 100 Ereignisse auf eine Befeldung mit einer Feldstärke von $3.36 \cdot 10^4$ V/m, 4 Ereignisse auf eine Befeldung mit einer Feldstärke von $3.2 \cdot 10^4$ V/m und 4 Ereignisse auf eine Befeldung mit einer Feldstärke von $1.6 \cdot 10^4$ V/m. Die Aufteilung der Ereignisse auf die verschiedenen

verwendeten Feldstärken und der Effekt der Befeldung auf die Ereignisse ist in der folgenden Tabelle und in Abb. 4-10 dargestellt.

Feldstärke am Ort der Wechselwirkung [$10^4 V_{\max}/m$]	Gesamtzahl der Ereignisse	Anzahl der Ereignisse mit positivem Effekt	Anzahl der Ereignisse ohne Effekt
4.8	25	16	9
3.36	100	15	85
3.2	4	0	4
1.6	4	0	4

Bei einer Feldstärke von $4.8 \cdot 10^4 V/m$ waren von den durchgeführten 25 Ereignissen 64 % positive Ereignisse. Bei einer Feldstärke von $3.36 \cdot 10^4 V/m$ ergaben sich noch 15 % positive Ereignisse, bei $3.2 \cdot 10^4 V/m$ und $1.6 \cdot 10^4 V/m$ zeigten sich keine positiven Ereignisse mehr. Auch hier zeigt sich eine Abhängigkeit der Häufigkeit eines positiven Effektes von der Feldstärke. Mit den Ergebnissen für die Ereignisse unter Befeldung ohne Zusatz von Harnstoff ergibt sich eine gute Übereinstimmung.

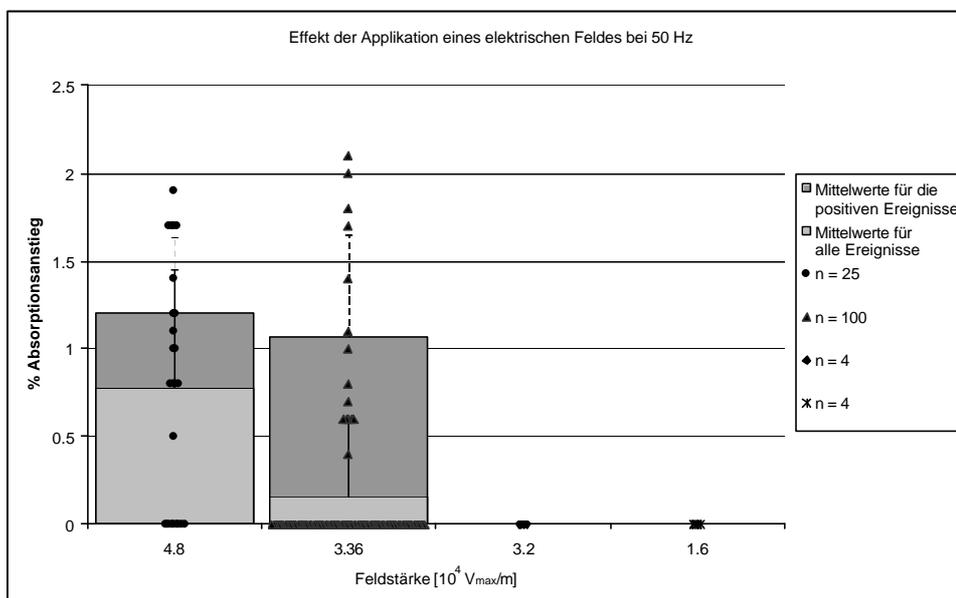


Abb. 4-10: Absorptionsanstieg unter Befeldung in Prozent der Absorption ohne Befeldung unter Zusatz von Harnstoff im Substratpuffer

Die Höhe des positiven Effektes ergibt sich unter Berücksichtigung aller Ereignisse bei einer Feldstärke von $4.8 \cdot 10^4 V/m$ zu $0.77 \pm 0.68 \%$ Absorptionsanstieg gegenüber der

Absorption ohne Befeldung. Bei $3.36 \cdot 10^4$ V/m ergibt sich ein Absorptionsanstieg von 0.16 ± 0.44 %. Die Varianzanalyse liefert auch hier signifikant unterschiedliche Mittelwerte für $4.8 \cdot 10^4$ V/m und $3.36 \cdot 10^4$ V/m. Betrachtet man nur die positiven Ereignisse, so ergibt sich bei $4.8 \cdot 10^4$ V/m ein Absorptionsanstieg gegenüber derjenigen ohne Befeldung um 1.21 ± 0.43 %, bei $3.36 \cdot 10^4$ V/m bei 1.07 ± 0.58 %. Diese Mittelwerte zeigen keinen signifikanten Unterschied.

4.4.1.3 Befeldung unter Zusatz von Harnstoff und Salz

Hier wurde insgesamt 78 mal eine Befeldung unter Zusatz von Harnstoff und Salz in der Substratlösung durchgeführt. Von diesen entfielen 18 Ereignisse auf eine Befeldung mit einer Feldstärke von $4.8 \cdot 10^4$ V/m am Ort der Wechselwirkung und 51 Ereignisse auf eine Befeldung mit einer Feldstärke von $3.36 \cdot 10^4$ V/m, 4 Ereignisse auf eine Befeldung mit einer Feldstärke von $3.2 \cdot 10^4$ V/m und 5 Ereignisse auf eine Befeldung mit einer Feldstärke von $1.6 \cdot 10^4$ V/m. Die Aufteilung der Ereignisse auf die verschiedenen verwendeten Feldstärken und der Effekt der Befeldung auf die Ereignisse ist in der folgenden Tabelle und in Abb. 4-11 dargestellt.

Feldstärke am Ort der Wechselwirkung [10^4 V _{max} /m]	Gesamtzahl der Ereignisse	Anzahl der Ereignisse mit positivem Effekt	Anzahl der Ereignisse ohne Effekt
4.8	18	12	6
3.36	51	7	44
3.2	5	0	5
1.6	4	0	4

Bei einer Feldstärke von $4.8 \cdot 10^4$ V/m waren von den durchgeführten 18 Ereignissen 67 % positive Ereignisse. Bei einer Feldstärke von $3.36 \cdot 10^4$ V/m ergaben sich noch 14 % positive Ereignisse, bei $3.2 \cdot 10^4$ V/m und $1.6 \cdot 10^4$ V/m zeigten sich keine positiven Ereignisse mehr. Wie schon bei der Befeldung unter Zusatz von Harnstoff zeigt sich hier eine Abhängigkeit der Häufigkeit eines positiven Effektes von der Feldstärke. Mit den Ergebnissen für die Ereignisse unter Befeldung ohne Zusatz von Harnstoff ergibt sich wiederum eine gute Übereinstimmung.

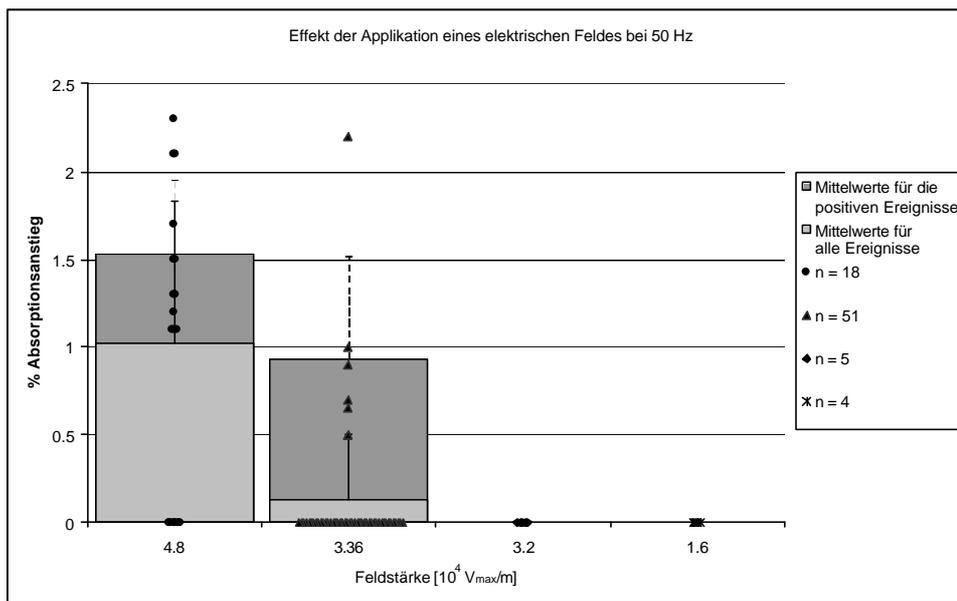


Abb. 4-11: Absorptionsanstieg unter Befeldung in Prozent der Absorption ohne Befeldung unter Zusatz von Harnstoff und Salz im Substratpuffer

Die Höhe des positiven Effektes ergibt sich unter Berücksichtigung aller Ereignisse bei einer Feldstärke von $4.8 \cdot 10^4$ V/m zu 1.02 ± 0.82 % Absorptionsanstieg gegenüber der Absorption ohne Befeldung. Bei $3.36 \cdot 10^4$ V/m ergibt sich ein Absorptionsanstieg von 0.13 ± 0.38 %. Auch hier ergeben sich für die Mittelwerte von $4.8 \cdot 10^4$ V/m und $3.36 \cdot 10^4$ V/m signifikante Unterschiede. Werden nur die Ereignisse betrachtet, bei denen sich ein positiver Effekt zeigte, so ergibt sich bei $4.8 \cdot 10^4$ V/m ein Absorptionsanstieg gegenüber derjenigen ohne Befeldung um 1.53 ± 0.43 %, bei $3.36 \cdot 10^4$ V/m bei 0.93 ± 0.59 %. Hier zeigt sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten von $4.8 \cdot 10^4$ V/m und $3.36 \cdot 10^4$ V/m.

Vergleicht man nun die Mittelwerte der einzelnen Befeldungsbedingungen, also nur Substrat, Substrat unter Zusatz von Harnstoff oder Substrat unter Zusatz von Harnstoff und Salz, bei einer Feldstärke, so ergibt sich ein signifikanter Unterschied der Mittelwerte nur bei einer Feldstärke von $4.8 \cdot 10^4$ V/m bei dem Vergleich von Substrat unter Zusatz von Harnstoff gegen Substrat unter Zusatz von Harnstoff und Salz, wenn man nur die positiven Ereignisse berücksichtigt. Dann erhält man allerdings auch einen signifikanten Unterschied, wenn man alle drei Bedingungen miteinander vergleicht.

4.4.2 Applikation eines elektrischen Feldes mit variabler Frequenz

4.4.2.1 Befeldung ohne Zusatz von denaturierenden Agentien

Es wurde insgesamt 32 mal eine Befeldung ohne Zusatz von Denaturierungsmitteln durchgeführt. Die Aufteilung der Ereignisse auf die verschiedenen verwendeten Frequenzen und der Effekt der Befeldung ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Frequenz [Hz]	Feldstärke am Ort der Wechselwirkung [$10^4 V_{\max}/m$]	Gesamtzahl der Ereignisse	Anzahl der Ereignisse mit positivem Effekt	Anzahl der Ereignisse ohne Effekt
16	3.0	5	0	5
50	3.0	5	0	5
100	3.0	5	0	5
150	2.5	5	0	5
200	2.5	3	0	3
300	2.0	5	0	5
450	1.5	4	0	4

Bei keinem der Ereignisse unabhängig von der Frequenz zeigte sich ein positiver Effekt. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß die maximale Feldstärke am Ort der Wechselwirkung, die durch äußere technische Beschränkungen gegeben war, unterhalb der Feldstärke lag, bei der sich bei der Befeldung mit Netzfrequenz noch positive Effekte zeigten. Zudem verringerte sich mit Erhöhung der Frequenz die technisch maximal mögliche Spannung und damit das maximal anliegende elektrische Feld weiter.

4.4.2.2 Befeldung unter Zusatz von Harnstoff

Insgesamt wurde 47 mal eine Befeldung unter Zusatz von Harnstoff in der Substratlösung durchgeführt. Die Aufteilung der Ereignisse auf die verschiedenen verwendeten Frequenzen und der Effekt der Befeldung ist in der folgenden Tabelle und in Abb. 4-12 dargestellt.

Frequenz [Hz]	Feldstärke am Ort der Wechselwirkung [$10^4 V_{\max}/m$]	Gesamtzahl der Ereignisse	Anzahl der Ereignisse mit positivem Effekt	Anzahl der Ereignisse ohne Effekt
16	3.0	8	0	8
50	3.0	9	1	8
100	3.0	5	1	4
150	2.5	8	3	5
200	2.5	4	0	4
300	2.0	7	0	7
450	1.5	6	0	6

Dabei ergaben sich nur bei einer Frequenz von 50 Hz positive Effekte bei 11 % der Ereignisse, bei einer Frequenz von 100 Hz bei 20 % und bei einer Frequenz von 150 Hz bei 38 %. Vergleicht man den prozentualen Anteil der positiven Ereignisse bei der Frequenz von 50 Hz mit demjenigen aus Abschnitt 4.4.1.1, so zeigt sich eine gute Übereinstimmung mit der Tendenz der abnehmenden Anzahl positiver Ereignisse bei geringerer Feldstärke. Bei höheren Frequenzen ergibt sich ein prozentual höherer Anteil an positiven Ereignissen.

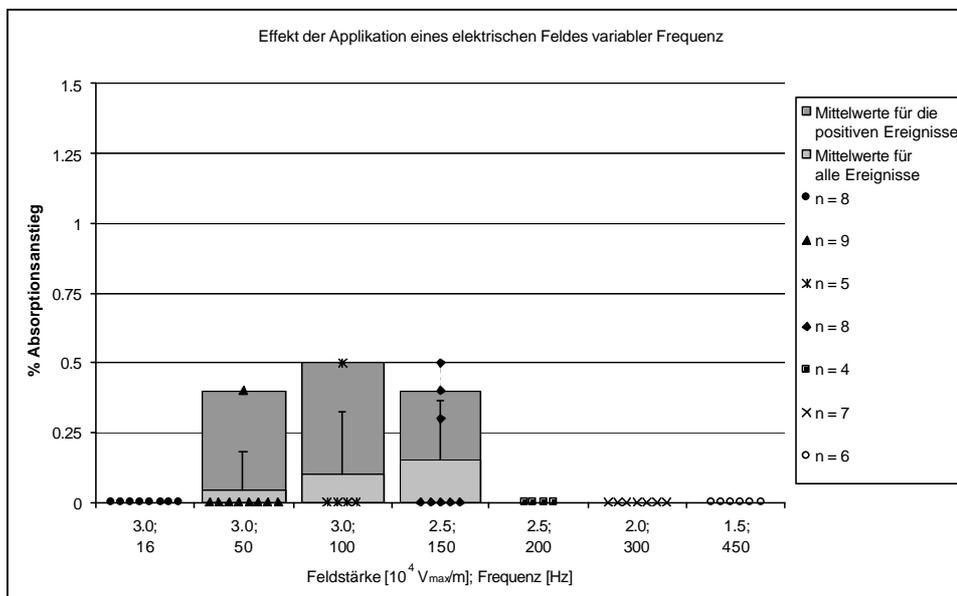


Abb. 4-12: Absorptionsanstieg unter Befeldung in Prozent der Absorption ohne Befeldung unter Zusatz von Harnstoff im Substratpuffer

Die Höhe des positiven Effektes liegt unter Berücksichtigung aller Ereignisse bei einer Frequenz von 50 Hz bei einem Absorptionsanstieg um 0.04 ± 0.13 % gegenüber derjenigen ohne Befeldung, bei 100 Hz bei einem Absorptionsanstieg um 0.1 ± 0.22 % und bei einer Frequenz von 150 Hz bei 0.15 ± 0.21 %. Betrachtet man nur die positiven Ereignisse, so ergibt sich bei einer Frequenz von 50 Hz ein Absorptionsanstieg um 0.4 % gegenüber derjenigen ohne Befeldung, bei 100 Hz bei einem Absorptionsanstieg um 0.5 % und bei einer Frequenz von 150 Hz bei 0.4 ± 0.1 %. Vergleicht man die Höhe des Effektes mit den Werten aus Abschnitt 4.4.1.1, so zeigt sich hier ein wesentlich geringerer Effekt, was durch die niedrigere verwendete Feldstärke begründet werden kann.

In keinem Fall zeigt sich hierbei, soweit vergleichbar, mit der Varianzanalyse ein signifikanter Unterschied der einzelnen Mittelwerte.

4.4.2.3 Befeldung unter Zusatz von Harnstoff und Salz

Hier wurde insgesamt 35 mal eine Befeldung unter Zusatz von Harnstoff und Salz in der Substratlösung durchgeführt. Die Aufteilung der Ereignisse auf die verschiedenen verwendeten Frequenzen und der Effekt der Befeldung ist in der folgenden Tabelle und in Abb. 4-13 dargestellt.

Frequenz [Hz]	Feldstärke am Ort der Wechselwirkung [$10^4 V_{\max}/m$]	Gesamtzahl der Ereignisse	Anzahl der Ereignisse mit positivem Effekt	Anzahl der Ereignisse ohne Effekt
16	3.0	5	0	5
50	3.0	7	1	6
100	3.0	4	0	4
150	2.5	7	1	6
200	2.5	3	0	3
300	2.0	6	0	6
450	1.5	3	0	3

Dabei ergaben sich nur bei einer Frequenz von 50 Hz positive Effekte bei 14 % der Ereignisse und bei einer Frequenz von 150 Hz ebenfalls bei 14 %. Auch hier ergibt sich bei 50 Hz wiederum eine gute Übereinstimmung mit den Werten aus Abschnitt 4.4.1.1.

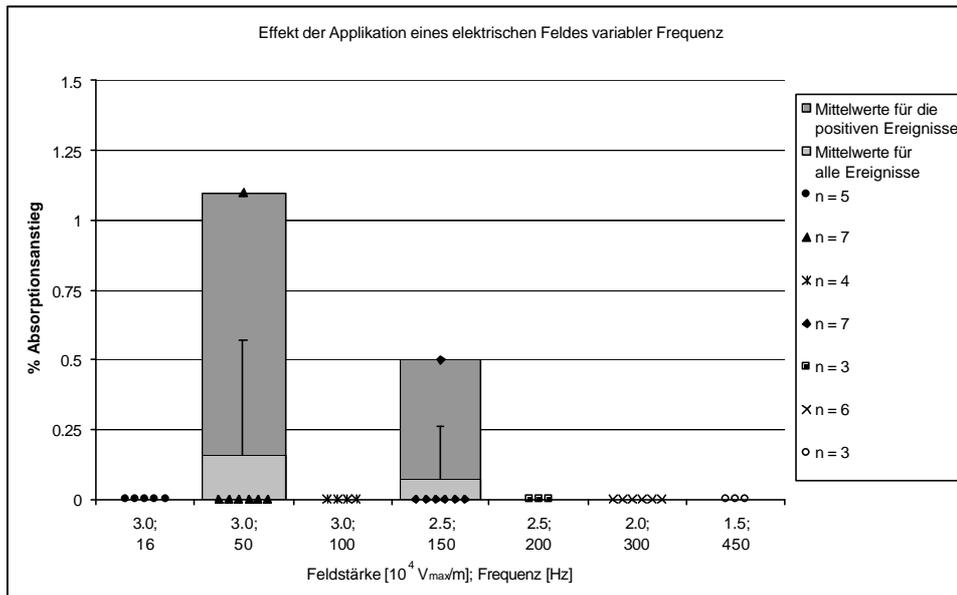


Abb. 4-13: Absorptionsanstieg unter Befeldung in Prozent der Absorption ohne Befeldung unter Zusatz von Harnstoff und Salz im Substratpuffer

Die Höhe des positiven Effektes liegt unter Berücksichtigung aller Ereignisse bei einer Frequenz von 50 Hz bei einem Absorptionsanstieg um 0.16 ± 0.42 % gegenüber derjenigen ohne Befeldung und bei einer Frequenz von 150 Hz bei 0.07 ± 0.19 %. Werden nur die Ereignisse betrachtet, bei denen sich ein positiver Effekt zeigte, so ergibt sich bei einer Frequenz von 50 Hz ein Absorptionsanstieg um 1.1 % gegenüber derjenigen ohne Befeldung und bei einer Frequenz von 150 Hz bei 0.5 %. Ein Vergleich mit den Werten aus Abschnitt 4.4.1.1 zeigt hier bei 50 Hz eine relativ gute Übereinstimmung mit den Werten für eine Feldstärke von $3.36 \cdot 10^4$ V/m. Allerdings müssen die Aussagen aus diesen Vergleichen sowohl in Abschnitt 4.4.1.2 wie auch hier mit Einschränkungen betrachtet werden, da sie nur auf Einzelereignissen beruhen.

Auch hier zeigt sich in keinem Fall, soweit vergleichbar, mit der Varianzanalyse ein signifikanter Unterschied der einzelnen Mittelwerte. Vergleicht man die Mittelwerte der einzelnen Befeldungsbedingungen, also Substrat unter Zusatz von Harnstoff mit Substrat unter Zusatz von Harnstoff und Salz, bei einer Frequenz, so ergibt sich ein signifikanter Unterschied der Mittelwerte nur bei einer Frequenz von 150 Hz, wenn man nur die positiven Ereignisse berücksichtigt.

4.4.3 Theoretische Betrachtungen

4.4.3.1 Der Einfluß von elektrischen Feldern auf einfache molekulare Dipole in wäßrigem Medium

Ein elektrischer Dipol besteht aus einem System zweier in einem Abstand l befindlicher gleich großer Ladungen q mit entgegengesetztem Vorzeichen. Das Dipolmoment p ist wie folgt charakterisiert:

$$p = \text{Ladung } q \cdot \text{Länge } l \quad (9)$$

Polare Moleküle, d.h. Moleküle, bei denen die Ladungsschwerpunkte innerhalb des Moleküls nicht zusammenfallen, besitzen ein permanentes Dipolmoment. Wird ein solcher Dipol einem homogenen elektrischen Feld ausgesetzt, dessen Richtung um einen Winkel α von der Dipolachse abweicht, so greift an den Ladungen ein Drehmoment an, um den Dipol in Richtung des Feldes auszurichten. Die Ausrichtung eines Dipols im elektrischen Feld wird dann Orientierungspolarisation genannt (Abb. 4-14).

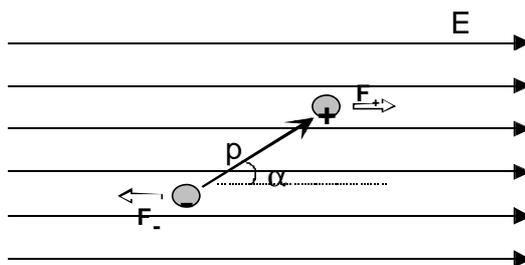


Abb. 4-14: Ausrichtung eines permanenten Dipols im elektrischen Feld

Das angreifende Drehmoment M ist gegeben über:

$$M = p \cdot E \cdot \sin\alpha \quad (10)$$

Das elektrische Feld verrichtet bei der Ausrichtung des Dipols Arbeit. Diese ist gegeben als:

$$dW = - M \cdot d\alpha = - p \cdot E \cdot \sin \alpha \cdot d\alpha \quad (11)$$

Die potentielle Energie des Dipols ist entgegengesetzt gleich groß wie die vom Feld verrichtete Arbeit und es ergibt sich damit:

$$dE_{\text{pot}} = - dW = p \cdot E \cdot \sin \alpha \cdot d\alpha$$

Durch Integration ergibt sich dann:

$$E_{\text{pot}} = - p \cdot E \cdot \cos \alpha \quad (12)$$

In nichtpolaren Molekülen kann durch ein äußeres elektrisches Feld ein Dipolmoment durch Trennung der Ladungsschwerpunkte induziert werden (Abb. 4-15).

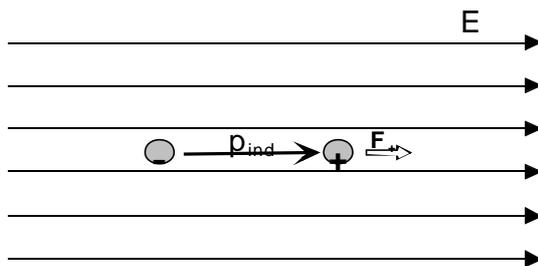


Abb. 4-15: Induzierung eines Dipols durch Verschiebungspolarisation im elektrischen Feld

Dabei wirkt das elektrische Feld auf die Ladung mit einer Kraft F ein, welche die Ladung q um eine Strecke x auslenkt:

$$F = q \cdot E = k_f \cdot x \quad (13)$$

Durch diese Verschiebungspolarisation wirkt auch dieses Molekül wie ein elektrischer Dipol und es entsteht ein Dipolmoment:

$$p = q \cdot x = \frac{q^2 \cdot E}{k_f} \quad (14)$$

Die Rückstellkraft zwischen zwei Ladungen wird über das Coulomb-Gesetz bestimmt, so daß sich die Federkonstante k wie folgt ergibt:

$$k_f = \frac{dF}{dr} = \frac{q^2}{2p \cdot e_0 \cdot r^3} \quad (15)$$

Hier ist die potentielle Energie der Auslenkung gegeben durch:

$$\begin{aligned} E_{\text{pot}} &= \frac{1}{2} \cdot F \cdot x \\ &= \frac{1}{2} \cdot k_f \cdot x^2 \\ &= \frac{1}{2} \cdot p \cdot E \end{aligned} \quad (16)$$

Sie ist halb so groß wie die potentielle Energie eines permanenten Dipols, da der Dipol erst im Feld erzeugt werden muß.

Die Verschiebungspolarisation ist unabhängig von der Temperatur. Der Orientierungspolarisation steht allerdings die ungeordnete Wärmebewegung entgegen. Wenn sie überwiegt, kommt es zu einer statistischen Verteilung der Dipole. Für kleine Moleküle wird erst bei Feldern mit Feldstärken größer 10^6 V/cm $pE \geq kT$ (FLÜGGE, 1986). Für Makromoleküle wie z.B. das Chymotrypsin mit einem permanenten Dipolmoment von $1.6 \cdot 10^{-27} \text{ C m}$ (= 480 Debye) überwiegt die Orientierungspolarisation schon bei Feldern in der Größenordnung von 10^4 V/cm (ANTOSIEWICZ und PORSCHKE, 1989).

Das temperaturabhängige mittlere Dipolmoment ist gegeben durch:

$$p = \frac{p_0^2}{kT} \cdot E \quad (17)$$

mit

p_0	Dipolmoment ohne elektrisches Feld
k	Boltzmannkonstante = $1.38 \cdot 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$
T	absolute Temperatur

4.4.3.2 Der Einfluß von elektrischen Feldern auf Enzymmoleküle im Modell

Die Enzymmoleküle sind über einen Anker an unlösliche Matrixmoleküle gebunden. Sie können sich daher in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer Ladung nicht fortbewegen sondern werden an ihrem Anker um einen Winkel α ausgelenkt (Abb. 4-16).

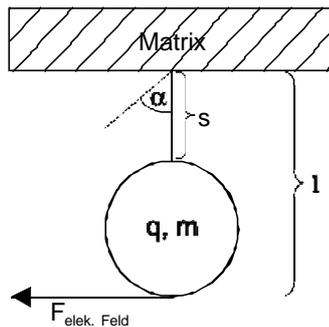


Abb. 4-16: Modell für die Auslenkung des Enzymmoleküls im elektrischen Feldes

Das Matrixmolekül ist mit einem Durchmesser von ca. $25 \mu\text{m}$ etwa um einen Faktor 1000 größer als das Enzymmolekül. Es bildet daher für die maximale Auslenkung des Enzyms im elektrischen Feld eine Barriere. Dies ist im folgenden dargestellt (Abb. 4-17):

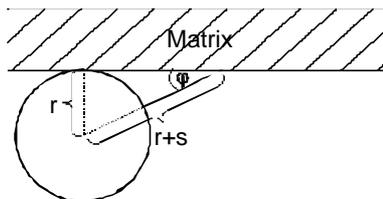


Abb. 4-17: Modell für den maximalen Winkel der Auslenkung des Enzymmoleküls

Der Winkel, unter dem das Enzymmolekül an das Matrixmolekül anstößt, ist gegeben durch:

$$\sin \mathbf{j} = \frac{r}{r+s}$$

$$\Downarrow$$

$$\mathbf{j} = \arcsin \frac{r}{r+s} \quad (18)$$

mit

r Radius des Enzymmoleküls = $2.25 \cdot 10^{-9}$ m
s Länge des Ankers = $1 \cdot 10^{-9}$ m

Damit ergibt sich für den maximalen Auslenkungswinkel des Enzyms im elektrischen Feld:

$$\begin{aligned} a_{\max} &= p/2 - \mathbf{j} \\ &= p/2 - \arcsin \frac{r}{r+s} \\ &= p/2 - \arcsin \frac{2.25 \cdot 10^{-9} \text{ m}}{2.25 \cdot 10^{-9} \text{ m} + 1 \cdot 10^{-9} \text{ m}} \\ &= 0.81 \\ &= 46.41^\circ \end{aligned} \quad (19)$$

Die Bewegungsgleichung für den Schwingungsvorgang des Enzymmoleküls lautet:

$$m_T \cdot l \cdot \ddot{a} + f \cdot l \cdot \dot{a} = q \cdot E \cdot \sin \omega t \cdot \cos a$$

$$\Downarrow$$

$$\ddot{a} + \frac{f}{m_T} \cdot \dot{a} = \frac{q \cdot E}{m_T \cdot l} \cdot \sin \omega t \cdot \cos a \quad (20)$$

wobei

q Elementarladung = $1.6 \cdot 10^{-19}$ As
E Amplitude des Feldes
 m_T Masse des Trypsinmoleküls = $4 \cdot 10^{-23}$ kg
l Länge bis zum Angriffspunkt des Feldes ($l_{\max} = 5.5$ nm)
 ω Kreisfrequenz = $2 \cdot \pi \cdot \nu$
f Reibungskoeffizient = $6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r = 4.24 \cdot 10^{-11}$ kg/s

$$\eta_{\text{Wasser, } 20^\circ\text{C}} = 0.001 \text{ Ns/m}^2$$

$$r = 2.25 \cdot 10^{-9} \text{ m für Trypsin}$$

Das Enzymmolekül "spürt" dabei nur den Anteil des Feldes senkrecht zu der Achse des Ankers. Über den durch die Matrix begrenzten maximalen Ausschlagswinkel ergibt

sich der minimale Anteil des Feldes, den das Enzymmolekül spürt, zu $\cos(0.81) = 0.69$. Maximal kann dieser Anteil für den Winkel $\alpha = 0$ gleich eins sein.

Die Bewegungsgleichung (20) wurde mit Hilfe einer numerischen Differentiation gelöst mit folgendem Ansatz für die Ableitungen des Winkels α :

$$\begin{aligned}\ddot{a}_0 &= \frac{1}{(\Delta t)^2} \cdot (a_{-1} - 2 \cdot a_0 + a_1) \\ \dot{a}_0 &= \frac{1}{2 \cdot \Delta t} \cdot (-a_{-1} + a_1)\end{aligned}\quad (21)$$

Eingesetzt ergibt sich damit für die Bewegungsgleichung:

$$a_0 = a_1 = -a_{\max}$$

als Startwerte und

$$a_{t+\Delta t} = \frac{2}{a \cdot (\Delta t)^2} \cdot a_t - \frac{b}{a} \cdot a_{t-\Delta t} + \frac{q \cdot E}{m_T \cdot l \cdot a} \cdot \sin^2 t \cdot \cos \alpha \quad (22)$$

mit den Faktoren:

$$\begin{aligned}a &= \frac{1}{(\Delta t)^2} + \frac{f}{2 \cdot m_T \cdot \Delta t} \\ b &= \frac{1}{(\Delta t)^2} - \frac{f}{2 \cdot m_T \cdot \Delta t}\end{aligned}$$

wobei wiederum

q	Elementarladung = $1.6 \cdot 10^{-19}$ As
E	Amplitude des Feldes
m_T	Masse des Trypsinmoleküls = $4 \cdot 10^{-23}$ kg
l	Länge bis zum Angriffspunkt des Feldes ($l_{\max} = 5.5$ nm)
ω	Kreisfrequenz = $2 \cdot \pi \cdot \nu$
f	Reibungskoeffizient = $6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r = 4.24 \cdot 10^{-11}$ kg/s

$$\eta_{\text{Wasser, } 20^\circ\text{C}} = 0.001 \text{ Ns/m}^2$$

$$r = 2.25 \cdot 10^{-9} \text{ m für Trypsin}$$

Mit Zeitschritten von $\Delta t = 1 \cdot 10^{-6}$ s ergibt sich dann für eine Frequenz von 50 Hz und einer Feldamplitude von $4.8 \cdot 10^4$ V/m ein in der Abbildung 4-18 dargestellter Verlauf für

die Schwingung des Enzymmoleküls vom Anschlag an der einen Seite der Matrix bis zum Anschlag auf der anderen Seite.

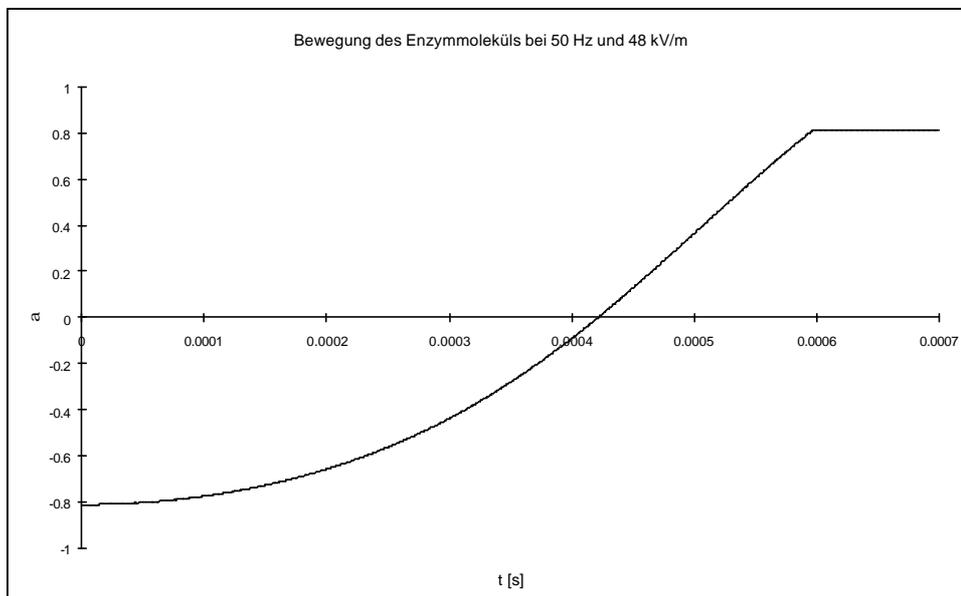


Abb. 4-18: Bewegung des Enzymmoleküls bei 50 Hz und $4.8 \cdot 10^4$ V/m vom Anschlag des Moleküls auf der einen Seite der Matrix bis zum Anschlag auf der anderen Seite

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse für die Laufzeit des Enzymmoleküls von einem Anschlag auf der einen Seite der Matrix bis zur anderen Seite, die Ruhezeit des Enzyms an der Matrix und das Verhältnis von Ruhezeit zu Gesamtzeit der Schwingung für die verschiedenen Frequenzen und Feldstärken noch einmal aufgelistet.

Spannungsquelle	Frequenz [Hz]	Feldstärke [V/m]	Gesamtzeit = halbe Schwingungsdauer	Laufzeit [s]	Ruhezeit [s]	Anteil Ruhezeit an Gesamtzeit [%]

			$\frac{1}{2} \cdot T = 1/(2 \cdot ?)$ [s]			
mit fester Frequenz	50	$4.8 \cdot 10^4$	$1.0 \cdot 10^{-2}$	$5.96 \cdot 10^{-4}$	$9.40 \cdot 10^{-3}$	94.0
	50	$3.36 \cdot 10^4$	$1.0 \cdot 10^{-2}$	$7.12 \cdot 10^{-4}$	$9.29 \cdot 10^{-3}$	92.9
	50	$3.2 \cdot 10^4$	$1.0 \cdot 10^{-2}$	$7.3 \cdot 10^{-4}$	$9.27 \cdot 10^{-3}$	92.7
	50	$1.6 \cdot 10^4$	$1.0 \cdot 10^{-2}$	$1.03 \cdot 10^{-3}$	$8.97 \cdot 10^{-3}$	89.7
mit variabler Frequenz	16	$3.0 \cdot 10^4$	$3.12 \cdot 10^{-2}$	$1.34 \cdot 10^{-3}$	$3.0 \cdot 10^{-2}$	96.0
	50	$3.0 \cdot 10^4$	$1.0 \cdot 10^{-2}$	$7.54 \cdot 10^{-4}$	$9.25 \cdot 10^{-3}$	92.5
	100	$3.0 \cdot 10^4$	$5.0 \cdot 10^{-3}$	$5.34 \cdot 10^{-4}$	$4.47 \cdot 10^{-3}$	89.4
	150	$2.5 \cdot 10^4$	$3.33 \cdot 10^{-3}$	$4.8 \cdot 10^{-4}$	$2.85 \cdot 10^{-3}$	85.5
	200	$2.5 \cdot 10^4$	$2.5 \cdot 10^{-3}$	$4.17 \cdot 10^{-4}$	$2.08 \cdot 10^{-3}$	83.2
	300	$2.0 \cdot 10^4$	$1.67 \cdot 10^{-3}$	$3.84 \cdot 10^{-4}$	$1.28 \cdot 10^{-3}$	76.8
	450	$1.5 \cdot 10^4$	$1.11 \cdot 10^{-3}$	$3.71 \cdot 10^{-4}$	$7.4 \cdot 10^{-4}$	66.6

In einer sehr kurzen Zeit im Verhältnis zur Schwingungsdauer bewegt sich das Enzymmolekül vom Anschlag auf der einen Seite zum Anschlag auf der anderen Seite. Die überwiegende Zeit befindet sich das Trypsinmolekül in Ruhe im Anschlag an die Matrix. Auch bei den bei Frequenzen über 100 Hz verringerten Amplituden des elektrischen Feldes ist diese Situation noch gegeben.

Dabei wird in Gleichung (22) für die Ladung q eine Ladungseinheit gesetzt. Dies ist legitim, da alle Versuche bei einem pH-Wert von 8.2 durchgeführt wurden, was in der Nähe des isoelektrischen Punktes für Trypsin liegt und man daher davon ausgehen kann, das nur in geringem Maße Oberflächenladungen existieren. Außerdem würde sich bei Annahme von mehr Ladungen auf der Oberfläche des Moleküls die Kraft $q \cdot E$, die auf das Molekül wirkt, nur vergrößern und zu einem noch schnelleren Anschlag auf der anderen Seite der Matrix führen. Damit vergrößern sich aber die Ruhezeiten für das Enzymmolekül, so daß man mit der Annahme von einer Ladungseinheit eine Abschätzung der Ruhezeit nach unten erhält. Der Angriffspunkt des Feldes wird konstant auf I_{\max} gesetzt, da eine kürzere „Pendellänge“ nur zu noch größeren Ruhezeiten führen würde und hiermit also auch eine Abschätzung nach unten erfolgt.

Aus den oben gemachten Berechnungen geht hervor, daß sich das Enzymmolekül überwiegend an einer Matrixseite festgehalten in Ruhe befindet. Die Wirkung des

elektrischen Feldes auf das Enzymmolekül ist dabei um so größer, je größer die Feldstärke bzw. je kleiner die Frequenz des Wechselfeldes ist.

Ähnliche Überlegungen zur Bewegung des Moleküls in Richtung des Ankers können hier unterbleiben, da die inneren Kräfte in Richtung des Ankers zu groß sind, so daß Effekte in dieser Form durch das elektrische Feld ausgeschlossen werden können.

4.4.3.3 Der Einfluß von elektrischen Feldern auf „aufgeweichte“ Enzymmoleküle

Durch den Einfluß des Harnstoffs auf das Enzymmolekül werden im Molekül Wasserstoffbrücken gelöst. Dies führt zu einer teilweisen Auflösung der dreidimensionalen Struktur des Enzymmoleküls. Dadurch wird das Volumen und damit auch der Durchmesser des Moleküls vergrößert. Für das Verhältnis von Ruhezeit zu Gesamtzeit ergibt sich bei einer 20 %igen Vergrößerung des Durchmessers des Enzymmoleküls eine Verringerung von -0.63% für 16 Hz und -2.85% für 450 Hz bei der Spannungsquelle mit variabler Frequenz, für die Spannungsquelle mit Netzfrequenz ergibt sich sogar nur eine Verringerung von -0.48% für die höchste und von -1% für die niedrigste Feldstärke. Der negative Einfluß, den die Vergrößerung des Moleküls durch die Wirkung des Harnstoffs erfährt, ist demnach also relativ gering.

Durch den Einfluß des Salzes auf des Enzymmolekül wird dessen Durchmesser durch eine Vergrößerung der umgebenden Hydrathülle ebenfalls vergrößert. Man kann also die für den Harnstoff gemachten Überlegungen hier übernehmen.

4.4.3.4 Der Einfluß von elektrischen Feldern auf Substratmoleküle in wäßrigem Medium

Nach einer Einschwingzeit wird sich das Substratmolekül mit der Frequenz des Feldes bewegen, so daß man für die Wanderungstrecke den folgenden Ansatz machen kann:

$$x = C_1 \cdot \sin \omega t$$

Damit ergibt sich für die Bewegungsgleichung:

$$f \cdot \dot{x} = -q \cdot E \cdot \cos \omega t$$

↓

$$f \cdot (? \cdot C_1 \cdot \cos \omega t) = -q \cdot E \cdot \cos \omega t$$

(25)

Durch Koeffizientenvergleich ergibt sich für die Konstante C_1 :

$$C_1 = -\frac{q \cdot E}{f \cdot ?}$$

und damit für die Bewegungsgleichung:

$$x = -\frac{q \cdot E}{f \cdot ?} \cdot \sin \omega t$$

(26)

Die maximale Geschwindigkeit des Substratmoleküls ergibt sich durch zweimaliges Differenzieren und Null setzen zu:

$$\begin{aligned} v_{\max} &= \frac{q \cdot E}{f} \\ &= \frac{1.6 \cdot 10^{-19} \text{ As} \cdot E [\text{V/m}]}{6 \cdot p \cdot 0.001 \text{ Ns/m}^2 \cdot \frac{1 \cdot 10^{-9} \text{ m}}{2}} \\ &= 1.698 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{Vs} \cdot E [\text{V/m}] \end{aligned}$$

(27)

mit

f Reibungskoeffizient = $6\pi \cdot \eta \cdot r$ für ein kugelförmiges Molekül mit Radius r

$\eta_{\text{Wasser, 20}^\circ\text{C}}$ Viskositätskoeffizient = 0.001 Ns/m^2

Nimmt man für das Substrat BAPA einen Moleküldurchmesser von $1 \cdot 10^{-9} \text{ m}$ und eine annähernd kugelförmige Gestalt an, so ergeben sich für dessen maximale

Wanderungsgeschwindigkeit abhängig von der anliegenden Feldstärke die in der folgenden Tabelle aufgeführten Werte:

Spannungsquelle	Frequenz [Hz]	Feldstärke [V/m]	maximale Geschwindigkeit [m/s]
mit fester Frequenz	50	$4.8 \cdot 10^4$	$8.15 \cdot 10^{-4}$
	50	$3.36 \cdot 10^4$	$5.71 \cdot 10^{-4}$
	50	$3.2 \cdot 10^4$	$5.43 \cdot 10^{-4}$
	50	$1.6 \cdot 10^4$	$2.72 \cdot 10^{-4}$
mit variabler Frequenz	16	$3.0 \cdot 10^4$	$5.09 \cdot 10^{-4}$
	50	$3.0 \cdot 10^4$	$5.09 \cdot 10^{-4}$
	100	$3.0 \cdot 10^4$	$5.09 \cdot 10^{-4}$
	150	$2.5 \cdot 10^4$	$4.25 \cdot 10^{-4}$
	200	$2.5 \cdot 10^4$	$4.25 \cdot 10^{-4}$
	300	$2.0 \cdot 10^4$	$3.40 \cdot 10^{-4}$
	450	$1.5 \cdot 10^4$	$2.55 \cdot 10^{-4}$

Dabei hängt die maximale Wanderungsgeschwindigkeit des Substratmoleküls nicht von der Frequenz des Feldes sondern nur von seiner Amplitude ab.

Rechnet man die ermittelten Geschwindigkeiten durch Division des elektrischen Feldes in die entsprechenden Beweglichkeiten für das Molekül BAPA um, so erhält man Werte von etwa $1.7 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{Vs}$, was sich mit Werten in der Literatur für Ionen mit ähnlichem Molekulargewicht gut vergleichen lässt (MOORE und HUMMEL, 1983).

Die maximale Bewegung des Substratmoleküls in eine Richtung ergibt sich dann, wenn der $\sin(\omega t)$ in der Gleichung (29) zu eins wird:

$$\begin{aligned}
 x_{\max} &= \frac{q \cdot E}{f \cdot ?} \\
 &= \frac{1.6 \cdot 10^{-19} \text{ As} \cdot E [\text{V/m}]}{6 \cdot p \cdot 0.001 \text{ Ns/m}^2 \cdot \frac{1 \cdot 10^{-9} \text{ m}}{2} \cdot ? [1/\text{s}]} \\
 &= 1.698 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{Vs} \cdot E [\text{V/m}] \cdot \frac{1}{?} [\text{s}]
 \end{aligned} \tag{28}$$

mit

f Reibungskoeffizient = $6\pi \cdot \eta \cdot r$ für ein kugelförmiges Molekül mit Radius r

$\eta_{\text{Wasser, 20}^\circ\text{C}}$ 0.001 Ns/m²

ω Kreisfrequenz = $2\pi \cdot \nu$

Mit einem Moleküldurchmesser von $1 \cdot 10^{-9}$ m für das Substrat BAPA unter der Annahme einer annähernd kugelförmige Gestalt, ergeben sich für dessen maximale Bewegung in eine Richtung abhängig von der anliegenden Feldstärke und Frequenz die in der folgenden Tabelle aufgeführten Werte:

Spannungsquelle	Frequenz [Hz]	Kreisfrequenz [1/s]	Feldstärke [V/m]	maximale Bewegung in eine Richtung [m]
mit fester Frequenz	50	314.2	$4.8 \cdot 10^4$	$2.58 \cdot 10^{-6}$
	50	314.2	$3.36 \cdot 10^4$	$1.81 \cdot 10^{-6}$
	50	314.2	$3.2 \cdot 10^4$	$1.72 \cdot 10^{-6}$
	50	314.2	$1.6 \cdot 10^4$	$8.60 \cdot 10^{-7}$
mit variabler Frequenz	16	100.5	$3.0 \cdot 10^4$	$5.04 \cdot 10^{-6}$
	50	314.2	$3.0 \cdot 10^4$	$1.61 \cdot 10^{-6}$
	100	628.3	$3.0 \cdot 10^4$	$8.06 \cdot 10^{-7}$
	150	942.5	$2.5 \cdot 10^4$	$4.48 \cdot 10^{-7}$
	200	1256.6	$2.5 \cdot 10^4$	$3.36 \cdot 10^{-7}$
	300	1885.0	$2.0 \cdot 10^4$	$1.79 \cdot 10^{-7}$
	450	2827.4	$1.5 \cdot 10^4$	$8.96 \cdot 10^{-8}$

Betrachtet man nun die Stoßhäufigkeit der Substratmoleküle (A) mit einem der matrixgebundenen Enzymmoleküle (B), so kann man darüber die mittlere Entfernung der Substratmoleküle von einem Enzymmolekül wie folgt bestimmen:

$$? = \frac{c_{AB}}{z_{AB}} \quad (29)$$

mit

c_{AB} Relativgeschwindigkeit der Moleküle A und B

z_{AB} Stoßhäufigkeit der Substratmoleküle mit einem Enzymmolekül B

Die Anzahl der Kollisionen der Substratmoleküle (A) mit einem der unbeweglichen Enzymmoleküle (B) pro Zeiteinheit nennt man die Stoßhäufigkeit. Sie wird bestimmt über:

$$z_{AB} = p \cdot d_{AB}^2 \cdot N_A / V \cdot c_{AB} \quad (30)$$

mit

c_{AB} Relativgeschwindigkeit der Moleküle A und B

N_A/V Anzahl der Substratmoleküle (A) im betrachteten Säulenvolumen

$d_{AB} = (d_A + d_B) / 2$, d.h. halber Abstand zwischen Mittelpunkten der beiden Moleküle A (BAPA) und B (Trypsin)

Damit ergibt sich für den mittleren Abstand der Substratmoleküle zu einem Enzymmolekül:

$$\begin{aligned} ? &= \frac{V}{p \cdot d_{AB}^2 \cdot N_A} \\ &= \frac{V}{p \cdot \left(\frac{d_A + d_B}{2} \right)^2 \cdot N_A} \\ &= \frac{1 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3}{\left(\frac{1.0 \cdot 10^{-9} \text{ m} + 4.5 \cdot 10^{-9} \text{ m}}{2} \right)^2 \cdot 6.02 \cdot 10^{20}} \\ &= 2.20 \cdot 10^{-7} \text{ m} \end{aligned} \quad (31)$$

mit

N_A/V Konzentration der Substratlösung = 1 mmol/l = $6.02 \cdot 10^{20}$ Teilchen/l

Das Substratmolekül legt also während seiner Wanderung in eine Richtung im elektrischen Feld bei den Versuchen mit einer fester Frequenz von 50 Hz bei allen verwendeten Feldstärken eine maximale Strecke zurück, die bei der höchsten Feldstärke um den Faktor 12 größer, bei der kleinsten verwendeten Feldstärke nur noch um den Faktor 4 größer ist als der in Formel (31) berechnete Abstand zum nächsten Enzymmolekül. Für die Versuche mit variabler Frequenz ergibt sich, daß die Reichweite des Substratmoleküls im elektrischen Feld nur für Frequenzen bis 200 Hz den Abstand

von Substrat- und Enzymmolekül übertrifft, und zwar um mehr als das zwanzigfache bei 16 Hz und nur noch um das eineinhalbfache bei 200 Hz.

Um zu ermitteln, wie dicht die Substratmoleküle im betrachteten Volumen liegen, kann man die mittlere freie Weglänge unter alleiniger Betrachtung der Substratmoleküle berechnen. Die außerdem im Volumen vorhandenen übrigen Moleküle kann man dabei außer acht lassen, da sich dadurch eine obere Grenze für den Abstand zwischen den Substratmolekülen ergibt. Der Abstand der einzelnen Substratmoleküle voneinander läßt sich dann mit Formel (32) bestimmen.

$$\begin{aligned} \lambda &= \frac{1}{\sqrt{2} \cdot p \cdot N/V \cdot d^2} \\ &= \frac{1}{\sqrt{2} \cdot p \cdot 6 \cdot 10^{23} \text{ Teilchen/m}^3 \cdot (1.0 \cdot 10^{-9} \text{ m})^2} \\ &= 3.75 \cdot 10^{-7} \text{ m} \end{aligned} \quad (32)$$

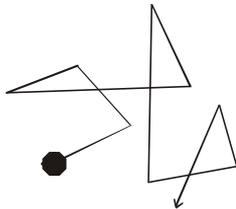
mit

N/V Konzentration des Substrates BAPA im betrachteten Volumen
 (= 1 mmol/l = $6 \cdot 10^{20}$ Teilchen/l = $6 \cdot 10^{23}$ Teilchen/m³)

Da die Substratmoleküle im betrachteten Volumen im Mittel $3.75 \cdot 10^{-7}$ m voneinander entfernt sind, wird statistisch eines der Substratmoleküle das nächste Enzymmolekül erreichen.

Ein Faktor für einen Effekt auf die Enzymaktivität durch ein elektrisches Feld ist die Möglichkeit für das Substrat, in die Nähe des Enzymmoleküls zu gelangen. Eine Auswirkung durch das elektrische Feld wird aber nur dann sichtbar, wenn die durch das angelegte Feld hervorgerufene Geschwindigkeit des Substratmoleküls die ohne Feld vorhandene Diffusionsgeschwindigkeit übertrifft (Abb. 4-20).

Bewegung ohne Feldeinfluß



Bewegung unter Feldeinfluß

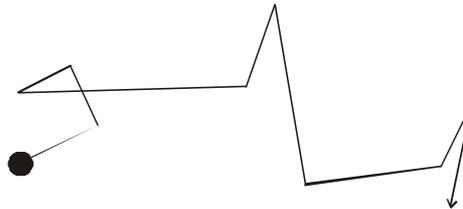


Abb. 4-20: Bewegung des Substratmoleküls unter alleinigem Einfluß der Diffusion (links) und unter zusätzlichem Einfluß eines elektrischen Feldes (rechts)

Die Diffusionsgeschwindigkeit eines Moleküls in Lösung ist gegeben über:

$$D = \frac{k \cdot T}{f} \quad (33)$$

mit

k Boltzmannkonstante = $1.38 \cdot 10^{-23}$ J/K

T Temperatur in K (hier 32 C = 305 K)

f Reibungskoeffizient = $6\pi \cdot \eta \cdot r$ für ein kugelförmiges Molekül mit Radius r

Für das Molekül BAPA ergibt sich demnach in der Pufferlösung ein Diffusionskoeffizient von $4.47 \cdot 10^{-10}$ m²/s oder in der in der Literatur üblichen Einheit von $4.47 \cdot 10^{-6}$ cm²/s. Dieser Wert läßt sich gut vergleichen mit einem Wert von $4.2 \cdot 10^{-6}$ cm²/s für das Molekül Maltose mit einem dem BAPA entsprechenden Molekulargewicht von 342 g (BELL, 1956).

Da die Diffusion eine ungerichtete Bewegung des Moleküls ist, kann man hier nur die mittlere quadratische Verschiebung für das Molekül angeben. Diese ergibt sich durch:

$$\overline{x^2} = 2Dt \quad (34)$$

Die vom Molekül in einer Zeiteinheit zurückgelegte Wegstrecke läßt sich dann annähernd durch die Wurzel der mittleren quadratischen Verschiebung beschreiben:

$$\overline{x} = \sqrt{\overline{x^2}} = \sqrt{2Dt} = \sqrt{2 \cdot 4.47 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}} \cdot \sqrt{t} = 0.00299 \text{ cm}/\sqrt{\text{s}} \cdot \sqrt{t} \quad (35)$$

Vergleicht man die vom Molekül in einer Zeiteinheit durch Diffusion zurückgelegte Wegstrecke mit derjenigen Wegstrecke, die das Molekül in dieser Zeit durch den Einfluß des elektrischen Feldes zurücklegt (siehe (28)), so ergibt sich folgendes Bild (Abb. 4-21):

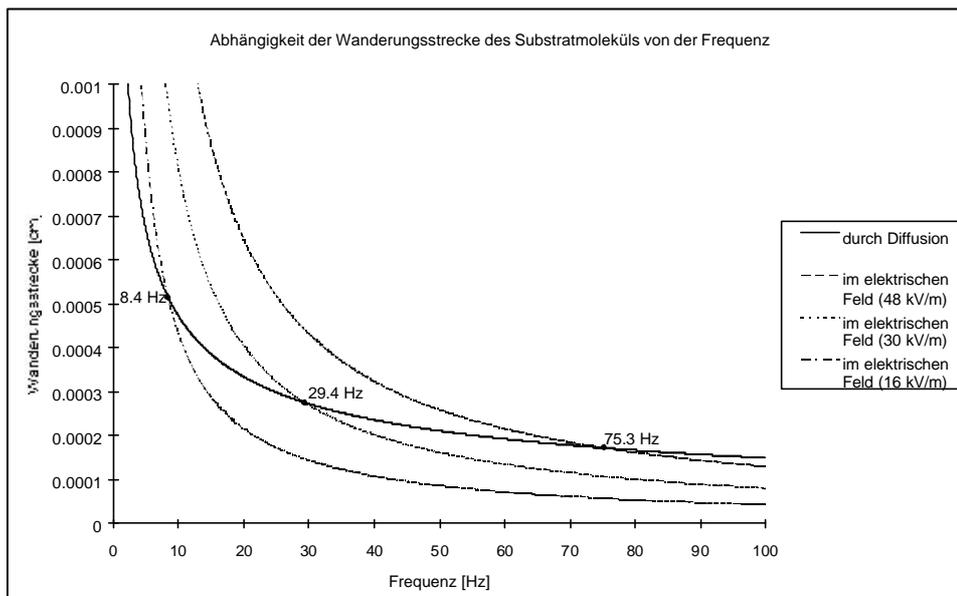


Abb. 4-21: Vergleich der maximalen Wanderungstrecke des Moleküls in eine Richtung unter Einfluß des elektrischen Feldes bzw. durch Diffusion in Abhängigkeit von der anliegenden Frequenz

Dabei zeigt sich, daß die Frequenz des Feldes, bei der die maximale Reichweite des Moleküls durch den Einfluß des elektrischen Feldes die Reichweite durch die Diffusion überwiegt (vgl. Abb. 4-20), von der Amplitude des Feldes abhängt und zwar über folgenden Zusammenhang:

$$x_{\max} = \frac{q \cdot E}{f \cdot 2 \cdot p \cdot ?} = \sqrt{2 \cdot D \cdot \frac{1}{4 \cdot ?}}$$

$$\Downarrow$$

$$? = \left(\frac{E}{5531.98} \right)^2 \text{ m}^2 / \text{V}^2 \text{ s} \quad (36)$$

Bei der in den Versuchen verwendeten Spannungsquelle mit Netzfrequenz ergibt sich damit eine minimale Feldstärke, bei welcher der Effekt durch das elektrische Feld die Diffusion noch überwiegt, und zwar zu $3.91 \cdot 10^4 \text{ V/m}$. Bei den Versuchen mit der

Spannungsquelle mit variabler Frequenz hing die maximal nutzbare Feldstärke von der verwendeten Frequenz ab (s. Kapitel 4.4.2). Hier ergibt sich daher nur für eine Frequenz von 16 Hz bei einer Feldstärke von $3 \cdot 10^4$ V/m ein die Diffusion überwiegender Effekt des elektrischen Feldes.

4.4.3.5 Der Einfluß von elektrischen Feldern auf die Wechselwirkung zwischen Substrat und Enzym

In Kapitel 4.4.3.2 zeigte sich, daß durch den Einfluß des elektrischen Feldes das Enzymmolekül für die überwiegende Zeit der Schwingung in Ruhe an der Matrix anliegend gehalten wird. Für die Wechselwirkung des Enzymmoleküls mit dem Substratmolekül heißt dies, daß die Anlagerung des Substrats an das Enzym durch den erzwungenen Ruhezustand erleichtert wird. Dabei kann allerdings nicht berücksichtigt werden, an welcher Stelle auf der Oberfläche das Enzymmolekül an die Matrix gebunden hat, d.h. ob die Substratbindungsstelle durch die Anlagerung an der Matrix blockiert wird. Da sich aber auf der Oberfläche des Molekül viele Bindungsstellen – Trypsin besitzt 14 Lysinreste – für die Bindung an die Matrix befinden, kann man davon ausgehen, daß hier eine Gleichverteilung herrscht.

Entscheidend für eine Wechselwirkung des Enzymmoleküls mit einem Substratmolekül ist allerdings die Entfernung der beiden Moleküle voneinander. Die Reichweite des Substratmoleküls, die es aufgrund des elektrischen Feldes erhält, übertrifft den Abstand von Enzym- und Substratmolekül am deutlichsten bei hohen Feldstärken bzw. niedrigen Frequenzen.

Ebenfalls nur unter diesen Bedingungen ergibt sich für das Substratmolekül ein gerichteter Effekt des elektrischen Feldes, der die ungerichtete Bewegung durch Diffusion übertrifft (s. Kapitel 4.4.3.4). Da die Matrixmoleküle mit dem daran gebundenen Enzymmolekül allerdings nicht in eine Richtung ausgerichtet vorliegen, kann dieser beschleunigende Effekt des elektrischen Feldes auf das Enzymmolekül zu allerdings nur in einem Drittel der Fälle für eine verbesserte Bindung des Substrats an das Enzym genutzt werden.

Zusammengefaßt ergibt sich theoretisch eine mögliche Steigerung des Substratumsatzes durch das Trypsinmolekül in den Versuchen mit einer fester Frequenz von 50 Hz vorwiegend bei der höchsten Feldstärke bzw. bei den Versuchen mit variabler Frequenz bei einer Frequenz von 16 Hz, einmal bedingt durch die zu geringe Reichweite des Moleküls bei Frequenzen über 200 Hz und zusätzlich durch die bei höheren Frequenzen erforderlichen höheren als hier technisch möglichen Feldstärken, damit der Effekt durch das elektrische Feld denjenigen der Diffusion überwiegt.

4.4.4 Vergleich der theoretischen Überlegungen mit den praktischen Ergebnissen

Bei der Auswertung der Meßergebnisse zeigte sich, daß sich die Anzahl der positiven Effekte mit abnehmender Feldstärke verkleinerte, und zwar unabhängig von der verwendeten Spannungsquelle. Die Zahlen waren für eine konstante Feldstärke gut vergleichbar. Unter der Zugabe von Harnstoff zum Substrat zeigte sich eine Tendenz zu mehr positiven Ereignissen bei steigender Frequenz. Dies konnte für die Zugabe von Harnstoff und Salz zum Substrat allerdings nicht bestätigt werden.

Eine signifikante Abhängigkeit der Höhe des Effektes von der Feldstärke ergab sich, wenn man alle Ereignisse betrachtete unabhängig von der Substratzusammensetzung. Dabei war der Effekt bei Zusatz von Harnstoff zur Substratlösung größer als bei Verwendung einer reinen Substratlösung und vergrößerte sich noch einmal unter dem Zusatz von Harnstoff und Salz zur Substratlösung, allerdings nur für die höchste Feldstärke und in signifikant unterschiedlichem Maß nur unter alleiniger Berücksichtigung der positiven Ereignisse.

Eine signifikante Abhängigkeit der Höhe des Effekts von der Frequenz konnte nicht festgestellt werden. Auch hier war der Effekt größer, wenn sich in der Substratlösung Harnstoff befand und noch größer, wenn zusätzlich Salz zugegeben war, allerdings in signifikant unterschiedlichem Maß nur bei einer Frequenz von 150 Hz unter Berücksichtigung nur der positiven Ereignisse. Hier standen jedoch nur sehr wenige Versuchsergebnisse für die Auswertung zur Verfügung.

Vergleicht man diese Resultate aus den Versuchen mit den theoretischen Überlegungen, so zeigt sich eine Übereinstimmung in der Abhängigkeit sowohl der Anzahl der positiven Ereignisse als auch der Höhe des Effekts von der Feldstärke. Für die Abhängigkeit von der Frequenz kann kein Vergleich gezogen werden. Auffallend ist aber, daß sich bei Verwendung der niedrigsten Frequenz (16 Hz) bei der höchsten Feldstärke keine positiven Ereignisse zeigen, wie dies nach den theoretischen Überlegungen eigentlich hätte der Fall sein müssen. Hier wären weitere Untersuchungen nötig, um diese Diskrepanz aufzuklären.

Der bei den theoretischen Überlegungen als Möglichkeit erwartete negativ wirkende Effekt durch Zusatz von Harnstoff bzw. Harnstoff und Salz zur Substratlösung spiegelt sich in den praktischen Ergebnissen nicht wieder. Hier zeigt sich hingegen, daß die Höhe des Effektes unter Zusatz von Harnstoff zur Substratlösung eher zunimmt und sich der Effekt unter Zugabe von Harnstoff und Salz zur Substratlösung noch einmal erhöht, unabhängig von der verwendeten Spannungsquelle. Eventuell werden durch die teilweise Auflösung der dreidimensionalen Struktur des Enzyms weitere Ladungen an die Oberfläche gebracht, was dann bei der Applikation eines elektrischen Feldes eine längere Lagerungszeit des Enzyms an der Matrix und damit ein längeres Festhalten in einer Position zur Folge hätte und so die Anlagerung und den Umsatz des Substrates erleichtern würde.

In der Literatur zu Untersuchungen bei ELF-Feldern zeigt sich, wie in Kapitel 2.1.1 und 2.1.3.3 schon erwähnt, häufig das Phänomen der nicht gewährleisteten Reproduzierbarkeit von Effekten durch ein ELF-Feld auf biologische Strukturen und die Schwierigkeit, solche Effekte über geeignete Mechanismen erklären zu können. Dort findet sich außerdem oft keine direkte Dosis-Wirkungsbeziehung, so daß man bei diesen Untersuchungen von Intensitäts- bzw. Frequenzfenstern für den Einfluß des Feldes auf die biologischen Strukturen spricht. In den in dieser Untersuchung gefundenen Ergebnissen zur Frequenz- und Feldstärkeabhängigkeit der Effekte durch das Feld zeigt sich ein ähnlich unstimmmiges Bild. Das könnte Befunde aus der Literatur bestätigen. Wahrscheinlicher ist aber, daß bei Verfeinerung und Optimierung der

Versuchsbedingungen unter dem Einfluß höherer Feldstärken die Ergebnisse eindeutiger werden könnten.

Abgesehen von den hier gemachten theoretischen Erörterungen wäre es vielleicht auch möglich, an einen Mechanismus im Sinne der elektrokonformationellen Kopplung (ECC) des Feldes zu denken. Diese Überlegung ist allerdings nur dann sinnvoll, wenn die Voraussetzungen für eine solche Kopplung (siehe Kapitel 2.1.3.4) für das hier vorliegende Versuchssystem gegeben sind. Wichtig dafür war eine Konformationsänderung während des Substratumsatzes, mit der eine Dipolmomentänderung oder eine Ladungsverschiebung einher geht. Dies könnte bei Trypsin, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, zutreffen, da während des Katalysemechanismus eine Konformationsänderung des Enzymmoleküls auftritt. Auch wird beim Umsatz von N_{α} -Benzoyl-DL-Arginin-4-Nitroanilid (BAPA) als Substrat die Amidaseaktivität des Trypsins genutzt, die ein sensiblerer Parameter für Konformationsänderungen im Enzym als die Esteraseaktivität ist. Des weiteren ändert sich während der Katalyse die Ladungsverteilung um das katalytische Zentrum herum, so daß auch hierüber eine Kopplung des elektrischen Feldes möglich scheint. Für die an Membranproteinen gemachten Untersuchungen zur ECC wurden häufig bei einer äußeren Feldstärke von 20 V/cm (d.h. 2 kV/m) gemacht, so daß sich eine Potentialdifferenz von etwa 10 mV über die befeldete Zelle (\varnothing ca. 5 μ m) und damit ein Feld von etwa 20 kV/cm (d.h. $2 \cdot 10^6$ V/m) über die Zellmembran (Dicke ca. 5 nm) ergibt (LIU et al., 1990; ROBERTSON und ASTUMIAN, 1991; TSONG et al., 1989). Hier in diesen Untersuchungen wurden äußere elektrische Felder von maximal $1.37 \cdot 10^6$ V/m und minimal $4.29 \cdot 10^5$ V/m verwendet. Damit liegen sie im Bereich derjenigen bei den Untersuchungen von Membranproteinen eingesetzten. Da die Bindung des Enzyms an eine Matrix eine ähnliche Stabilisierung und Bewegungseinschränkung wie eine Membran für ein Membranprotein gibt, könnte diese Feldstärke möglicherweise ausreichen, um im Trypsin eine elektrokonformationelle Kopplung mit dem Feld zu ermöglichen, auch wenn die am Ort der enzymatischen Katalyse auftretende Feldstärke geringer ist als diejenige bei den Untersuchungen der Membranproteine direkt an der Zellmembran. ROBERTSON und ASTUMIAN fanden 1992 bei Untersuchungen zur ATPase-Aktivität unter dem Einfluß elektrischer Felder einen ansteigenden Effekt mit steigender Feldstärke bei 100 Hz. Auch bei den hier gemachten

Untersuchungen zeigt sich eine Abhängigkeit der Höhe des Effektes von der Höhe der verwendeten Feldstärke. BLANK zeigte 1992, daß bei nichtoptimaler Enzymaktivität, also z.B. durch Inhibierung oder durch Entfernung vom Temperaturoptimum ein Effekt durch das elektrische Feld verstärkt wird. TSONG und ASTUMIAN beschrieben 1988, daß sich ein aktivitätssteigernder Effekt des elektrischen Feldes nur unter Temperaturbedingungen zeigte, bei denen die normale Funktion des Enzyms stark eingeschränkt war. Auch in den hier durchgeführten Versuchen wird ein Zustand des Enzyms mit nichtoptimaler Aktivität, nämlich unter denaturierenden Bedingungen, dem Einfluß eines elektrischen Feldes ausgesetzt, wobei sich auch hier größere Effekte als bei optimalen Bedingungen ergeben. Insofern scheint sich die aus den vorgegebenen Bedingungen für das hier verwendete Versuchssystem für möglich gehaltene ECC für Trypsin in den erhaltenen Ergebnissen zu bestätigen und mit der Literatur in Einklang bringen zu lassen.

Abschließend muß man sagen, daß man sich mit den hier vorhandenen technischen Möglichkeiten im Grenzbereich dessen aufhält, wo ein Einfluß des elektrischen Feldes auf die Enzyme spürbar zu sein scheint. Allerdings sind diese Effekte nicht konstant reproduzierbar und damit auch nicht eindeutig theoretisch einzuordnen. Hier wären auf jeden Fall weitere Versuchsreihen mit eventuell weitergehenden technischen Möglichkeiten in bezug auf die Feldstärke bzw. eine konstant gleich hohe Feldstärke für alle Frequenzen wichtig, um genauere Aussagen über Effekte durch das elektrische Feld und einen möglichen Mechanismus machen zu können.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In unserer heutigen Gesellschaft kommt es vermehrt zur Einwirkung artifizierender elektromagnetischer Felder auf Lebewesen. Inzwischen werden diesen auch vermehrt negative Einflüsse auf den Organismus zugeschrieben. Besonders diskutiert werden in diesem Zusammenhang hochfrequente elektromagnetische Felder. Über die Wirkung von Feldern auf Biomoleküle (z.B. Proteine) im Niederfrequenzbereich gibt es nicht sehr viele Studien, insbesondere nicht an *in vitro*-Systemen.

Ziel dieser Arbeit sollte es daher sein, mögliche Einflüsse eines elektrischen Feldes mit niedrigen Frequenzen auf ein geeignetes *in vitro*-System zu untersuchen, wobei hier der Einfluß auf Proteine und ihre Funktion im Vordergrund stand.

Ein geeignetes Enzym für die Untersuchung fand sich in der Protease Trypsin. Als Marker für den Einfluß des elektrischen Feldes auf das Enzym sollte die Enzymaktivität gegenüber einem geeigneten Substrat dienen. Dazu wurden mehrere Substrate in bezug auf den Substratumsatz durch Trypsin getestet. Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität wurden außerdem ihre molaren Extinktionskoeffizienten bestimmt. Das Substrat BAPA erschien dabei als das geeignetste Substrat für Trypsin, so daß hier noch zusätzlich der K_m -Wert von Trypsin für dieses Substrat ermittelt wurde, um einen Hinweis für die zu verwendende Substratkonzentration zu erhalten.

Das Trypsin konnte durch die Bindung an eine Matrix im elektrischen Feld stabilisiert werden. Als Matrix wurde silanisierter Kieselgel verwendet, an welches das Trypsin über einen Anker aus Glutaraldehyd an die Matrix gebunden werden konnte. Dabei wurden die für eine Immobilisierung des Enzyms geeigneten Inkubationszeiten und die anschließend gebundene Menge an Enzym bestimmt. Außerdem wurden die Aktivität dieses immobilisierten Trypsins und die Abhängigkeit seiner Aktivität von pH-Wert und Temperatur untersucht. Es zeigte sich, daß die Aktivität des immobilisierten Trypsins nur noch ca. 30-40 % derjenigen des löslichen Trypsins besaß. Im alkalischen pH-Bereich ergab sich für das immobilisierte Trypsin eine erhöhte Stabilität gegenüber dem löslichen. Für den Temperaturbereich zwischen 25 °C und 30 °C ergibt sich ein linearer

Zusammenhang zwischen Temperatur und Enzymaktivität, allerdings keine erhöhte Stabilität des immobilisierten gegenüber dem löslichen Trypsin.

Als der für die Funktion des Trypsins relevante Parameter wurde seine Enzymaktivität bestimmt. Da die Matrix optisch nicht durchlässig war, wurde ein Durchflußsystem entwickelt, bei dem die Substratlösung kontinuierlich am Enzym vorbeigeleitet und der Substratumsatz danach photometrisch gemessen werden konnte.

Um verschiedene strukturelle Zustände des Trypsins im elektrischen Feld untersuchen zu können, wurden der Substratlösung denaturierende bzw. strukturbeeinflussende Reagentien zugefügt. Für die teilweise Lösung von Wasserstoffbrücken wurde Harnstoff verwendet. Dabei zeigte sich, daß das immobilisierte Enzym nicht stabiler gegenüber Harnstoff war als das lösliche. Allerdings war eine fast vollständige Renaturierung möglich. Eine ergänzende Störung der ionischen Wechselwirkungen im Enzym wurde durch die zusätzliche Zugabe von Salz in die Lösung erreicht.

Für die Untersuchung des Einflusses von elektrischen Feldern auf das immobilisierte Trypsin wurden zwei Spannungsquellen verwendet, wobei es mit der einen möglich war, bei fester Netzfrequenz die Feldstärke zu verändern, mit der anderen die Frequenz mit einer davon abhängigen konstanten Feldstärke. Die Änderung der Absorption bei der photometrischen Enzymaktivitätsmessung wurde als Parameter für einen Einfluß des Feldes verwendet. Dabei ergaben sich die meisten positiven Effekte bei den höchsten eingesetzten Feldstärken. Auch zeigte sich ein Einfluß des strukturellen Zustandes des Enzyms auf die Höhe des Effektes. Über eine mögliche Abhängigkeit des Effektes von der Frequenz ließen sich bei den Untersuchungen keine Aussagen treffen. Für die Erklärung des Einflusses durch ein elektrisches Feld auf das Enzymmolekül wurden theoretische Überlegungen durchgeführt und mit den praktischen Ergebnissen verglichen.

6 LITERATUR

ADEY W. R.

Biological effects of electromagnetic fields

J. Cell. Biochem. 51, 410-416 (1993)

ANTOSIEWICZ J., PORSCHKE D.

The nature of protein dipole moments: experimental and calculated permanent dipole of α -chymotrypsin

Biochemistry 28, 10072-10078 (1989)

BANO B. SALEEMUDDIN M., SIDDIQI M.

Studies on chemically aggregated trypsin using glutaraldehyde

Indian J. Biochem. 17, 12-17 (1980)

BARNES F. S.

Some engineering models for interactions of electric and magnetic fields with biological systems

Bioelectromagnetics Supp. 1, 67-85 (1992)

BELL L. G. E.

Freeze-drying

in: Oster G., Pollister A. W. (Eds.)

Physical techniques in biological research

Vol. III: Cells and tissues

Academic Press, New York (1956); 1-25

BERG H.

Electrotransfection and electrofusion of cells and electrostimulation of their metabolism

Stud. Biophys. 119, 17-29 (1987)

BERG H.

Electrostimulation of cell metabolism by low frequency electric and electromagnetic fields

Bioelectrochem. Bioenerg. 31, 1-25 (1993)

BERGMEYER H. U. (Ed.)

Methoden der enzymatischen Analyse, Bd. I

2. Auflage

Verlag Chemie, Weinheim (1970); 476

BERNHARDT J. H.

Biologisch-technische Grundlagen der Schutzbestimmungen für hochfrequente elektromagnetische Felder

in: Newi G., Bernhardt J. H., Hauf R., Rieter R., Silny J., Wever R. (Eds.)

Biologische Wirkungen elektrischer, magnetischer und elektromagnetischer Felder

Kontakt & Studium, Technische Akademie Esslingen, Band 106

expert verlag (1983); 66-84

BLANCO R. M., GUISÁN J. M.

Protecting effect of competitive inhibitors during very intense insolubilized enzyme-activated support multipoint attachments:

trypsin (amine)-agarose (aldehyde) system

Enzyme Microb. Technol. 10, 227-232 (1988)

BLANK M.

Na, K-ATPase function in alternating electric fields

FASEB J. 6, 2434-2438 (1992)

BOIKAT U.

Biologische Wirkungen elektromagnetischer niederfrequenter Strahlung

in: Morgan K. Z.

Veränderungen wünschenswert: Über die Art und Weise wie internationale
Strahlenschutzempfehlungen verfaßt werden

Berichte des Otto-Hug-Strahleninstitutes Bonn, Bericht Nr. 6

MMV-Medizin-Verlag, München (1993); 13-29

BONE S., ZABA B.

Bioelectronics

Chapter 4: Dielectric and conduction properties of biomolecules

John Wiley & Sons Ltd. (1992)

BUCHHOLZ K., RÜTH W.

Temperature dependence of a diffusion-limited immobilized enzyme reaction

Biotechnol. Bioeng. 18, 95-104 (1976)

BUCK F. F., VITHAYATHIL A. J., BIER M., NORD F. F.

On the mechanism of enzyme action

LXXIII. Studies on trypsins from beef, sheep and pig pancreas

Arch. Biochem. Biophys. 97, 417-424 (1962)

BUTLER J. A. V.

The molecular kinetics of trypsin action

J. Am. Chem. Soc. 63, 2971-2974 (1941)

CABRAL J. M. S., KENNEDY J. F.

Covalent and coordination immobilization of proteins

in: Taylor R. F. (Ed.)

Protein Immobilization

Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hongkong (1991); 73-160

CLEVELAND JR. R. F.

Radiofrequency radiation in the environment: Sources, exposure standards and related issues

in: Carpenter D. O., Ayrapetyan S. (Eds.)

Biological effects of electric and magnetic fields

Sources and mechanisms

Academic Press, New York and London (1994); 53-81

DENO D. W., CARPENTER D. O.

Sources and characteristics of electric and magnetic fields in the environment

in: Carpenter D. O., Ayrapetyan S. (Eds.)

Biological effects of electric and magnetic fields

Sources and mechanisms

Academic Press, New York and London (1994); 3-51

EGGSTEN M., KREUTZ F. H.

Vergleichende Untersuchungen zur quantitativen Eiweissbestimmung im Liquor und eiweissarmen Lösungen

Klinische Wochenschrift 37/38, 879-884 (1955)

ERLANGER B. F., KOKOWSKY N., COHEN W.

The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin

Arch. Biochem. Biophys. 95, 271-278 (1961)

FLORIG H. K.

Containing the costs of the EMF problem

Science 257, 468-492 (1992)

FLÜGGE S.

Rechenmethoden der Elektrodynamik

Springer-Verlag (1986); 61f; 256

GABEL D., VRETBLAD P., AXEN R., PORATH J.

Insolubilized trypsin with activity in 8 M urea
Biochim. Biophys. Acta 214, 561-563 (1970)

GEIGY J. R. (Ed.)

Documenta Geigy
Wissenschaftliche Tabellen, 6. Auflage
J.R. Geigy A.G., Basel (1960)

GLASSMEYER C. K., OGLE J. D.

Properties of an insoluble form of trypsin
Biochemistry 10, 786-792 (1971)

GLOGER M., TISCHER W.

Determination of the catalytic activity of immobilized enzymes
in: Bergmeyer H. U. (Ed.)
Methoden der enzymatischen Analyse, Bd. I
2. Auflage
Verlag Chemie, Weinheim (1970); 142-163

GOODMAN E. M., GREENEBAUM B., MARRON M. T.

Effects of electromagnetic fields on molecules and cells
Int. Rev. Cytol. 158, 279-338 (1995)

GUTFREUND H.

The characterization on the catalytic site of trypsin
Trans. Faraday Soc. 51, 441-446 (1955)

HABEEB A. F. S. A.

Preparation of enzymically active, water-insoluble derivatives of trypsin
Arch. Biochem. Biophys. 119, 264-268 (1967)

HARHEN B., BARRY F.

Immobilization of proteolytic enzymes
Biochem. Soc. Trans. 18, 314-315 (1990)

HARRIS J. I.

Effect of urea on trypsin and chymotrypsin
Nature 177, 471-473 (1956)

HOLMBERG B.

Magnetic fields and cancer: Animal and cellular evidence – an overview
Environm. Health Perspect. 103, 63-67 (1995)

HUMMEL B. C.

A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and
thrombin
Can. J. Biochem. Physiol. 37, 1393-1399 (1959)

KEIL B.

Trypsin
in: Boyer P. D. (Ed.)
The Enzymes
Volume III: Hydrolysis: Peptide Bonds
3. Auflage
Academic Press, New York and London (1971); 249-275

KLEINE R., SPANGENBERG P., FLEMMING C.

Herstellung und einige Eigenschaften von immobilisiertem Trypsin des
Flußkrebsses *Cambarus affinis* Say
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 629-639 (1976)

KNIGHTS R. J., LIGHT A.

Sepharose-bound trypsin and activated sepharose-bound trypsinogen

Studies with small and large substrates

Arch. Biochem. Biophys. 160, 377-386 (1974)

KUBOTA K., YOSHIMURA N., YOKOTA M., FITZSIMMONS R. J., WIKESJÖ U. M. E.

Overview of effects of electrical stimulation on osteogenesis and alveolar bone

J. Periodontol. 66, 2-6 (1995)

KUMAKURA M., KAETSU I.

Behaviour of enzyme activity in immobilized proteases

Int. J. Biochem. 16, 1159-1161 (1984)

LESK A. M., FORDHAM W. D.

Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the
chymotrypsin family

J. Mol. Biol. 258, 501-537 (1996)

LEVIN Y., PECHT M., GOLDSTEIN L., KATCHALSKI E.

A water-insoluble polyanionic derivative of trypsin

I. Preparation and properties

Biochemistry 3, 1905-1913 (1964)

LIAO D.-I., BREDDAM K., SWEET R. M., BULLOCK T., REMINGTON S. J.

Refined atomic model of wheat serine carboxypeptidase II at 2.2-Å resolution

Biochemistry 31, 9796-9812 (1992)

LIU D.-S., ASTUMIAN R. D., TSONG T. Y.

Activation of Na⁺ and K⁺ pumping modes of (Na, K)-ATPase by an oscillating
electric field

J. Biol. Chem. 265, 7260-7267 (1990)

LOWRY O. H., ROSEBROUGH A. L., FARR A. L., RANDALL J. R.

Protein measurement with the folin phenol reagent

J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

MACKLIS R. M.

Magnetic healing, quackery and the debate about the health effects of
electromagnetic fields

Ann. Int. Med. 118, 376-383 (1993)

MARINO A. A.

Different outcomes in biological experiments involving weak EMFs: is chaos a
possible explanation?

Am. J. Physiol.-Regul. Integr. C. 37, R1013-R1018 (1995)

MATTIASSON B., MOSBACH K.

Assay procedures for immobilized enzymes

Methods in Enzymology 44, 335-353 (1976)

MOORE W. J., HUMMEL D. O.

Physikalische Chemie

3. Auflage

Walter de Gruyter, Berlin und New York (1983); 529

MOSBACH R., KOCH-SCHMIDT A.-C., MOSBACH K.

Immobilization of enzymes to various acrylic copolymers

Methods in Enzymology 44, 53-65 (1976)

NAGEL W., WILLIG F., PESCHKE W., SCHMIDT F. H.

Über die Bestimmung von Trypsin und Chymotrypsin mit Aminosäure-*p*-
nitroaniliden

Hoppe-Seylers Zeitsch. f. physiol. Chemie 340, 1-10 (1965)

PAUS H. J.

Physik in Experimenten und Beispielen

Carl Hanser Verlag, München Wien (1995); 316

PERONA J. J., CRAIK C. S.

Structural basis of substrate specificity in the serine proteases

Protein Science 4, 337-360 (1995)

PHILLIPS J. L.

Effects of electromagnetic field exposure on gene transcription

J. Cell. Biochem. 51, 381-386 (1993)

PINHOLSTER G.

The ceshire cat phenomenon: Effects of nonionizing electromagnetic radiation

Environm. Health Perspect. 101, 292-295 (1993)

POLK C.

Biological effects of low-level low-frequency electric and magnetic fields

IEEE Transactions on Education 34, 243-249 (1991)

PUVANAKRISHNAN R., BOSE S. M.

Studies on the immobilization of trypsin on sand

Biotechnol. Bioeng. 22, 919-928 (1980)

PUVANAKRISHNAN R., BOSE S. M.

Properties of trypsin immobilized on sand

Biotechnol. Bioeng. 22, 2449-2453 (1980a)

RAUEN H. M. (Ed.)

Biochemisches Taschenbuch

Springer Verlag (1956); 690-693

REITER R.

Possible biological effects of electric and magnetic parameters in the environment
Experientia 49, 769-774 (1993)

ROBERTSON B., ASTUMIAN R. D.

Michaelis-Menten equation for an enzyme in an oscillating electric field
Biophys. J. 58, 969-974 (1990a)

ROBERTSON B., ASTUMIAN R. D.

Kinetics of a multistate enzyme in a large oscillating field
Biophys. J. 57, 689-696 (1990b)

ROBERTSON B., ASTUMIAN R. D.

Frequency dependence of catalyzed reactions in a weak oscillating field
J. Chem. Phys. 94, 7414-7419 (1991)

ROBERTSON B., ASTUMIAN R. D.

Interpretation of the effect of an oscillating electric field on membrane enzymes
Biochemistry 31, 138-141 (1992)

SCHNEIDER D.

High tension
Researchers debate EMF experiments on cells
Sci. Am. 273, 15-16 (1995)

SCHREIBER G. H., SWAEN G. M. H., MEIJERS J. M. M., SLANGEN J. J. M., STURMANS F.

Cancer mortality and residence near electricity transmission equipment: A
retrospective cohort study
Int. J. Epidemiol. 22, 9-15 (1993)

SCHROETER, M.

Isolierung, Charakterisierung und Sequenzierung der Chymotrypsinogene A und B vom Damwild

Inaugural-Dissertation JLU Gießen (1997)

SCHWAN H. P.

History of the genesis and development of the study of effects of low energy electromagnetic fields

in: Grandolfo M., Michaelson S. M., Rindi A. (Eds.)

Biological effects and dosimetry of nonionizing radiation

Radiofrequency and microwave energies

Plenum Press, New York and London (1993); 1-17

SEARS P. S., CLARK D. S.

Comparison of soluble and immobilized trypsin kinetics:

Implications for peptide synthesis

Biotechnol. Bioeng. 42, 118-124 (1993)

SIMPSON B. K., HAARD N. F.

Purification and characterization of trypsin from the Greenland cod (*Gadus ogac.*)

1. Kinetic and thermodynamic characteristics

Can. J. Biochem. Cell Biol. 62, 894-900 (1984)

SOBEL E., DAVANIPOUR Z., SULKAVA R., ERKINJUNTTI T., WIKSTROM J.,

HENDERSON V. W., BUCKWALTER G., BOWMAN J. D.

Occupational exposure to electromagnetic fields: A possible risk factor for Alzheimer's disease

in: Iqbal K., Mortimer J. A., Winblad B., Wisniewski H. M. (Eds.)

Research Advances in Alzheimer's disease and related disorders

John Wiley & Sons Ltd. (1995); 43-52

SOMAN K., YANG A.-S., HONIG B., FLETTERICK R.

Electrical potentials in trypsin isozymes
Biochemistry 28, 9918-9926 (1989)

SOMORIN O., TOKURA S., NISHI N., NOGUCHI J.

The action of trypsin on synthetic chromogenic arginine substrates
J. Biochem. 85, 157-162 (1978)

SOUZA OTERO A. DE, ROGANA E., MARES-GUIA M.

Thermal behavior of bovine β -trypsin at physiological temperature range
Arch. Biochem. 204, 109-116 (1980)

STONE R.

Polarized debate: EMFs and cancer
Science 258, 1724-1725 (1992)

STROUD R. M., KRIEGER M., KOEPPE II R. E., KOSSIAKOFF A. A., CHAMBERS J. L.

Structure-function relationships in serine proteases
in: Reich E., Rifkin D. B., Shaw E. (Eds.)
Proteases and biological control
Colds Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, Vol. 2
CSH (1975); 13-32

SZMIGIELSKI S.

Electromagnetic fields and neoplasms with special reference to extremely low frequencies
Bioelectrochem. Bioenerg. 30, 253-264 (1993)

TENFORDE T. S.

Biological interactions of extremely-low-frequency electric and magnetic fields
Bioelectrochem. Bioenerg. 25, 1-17 (1991)

TOUGU V., TIIVEL T., TALTS P., ŠIKŠNIS V., POYARKOVA S., KESVATERA T., AAVIKSAAR A.

Electrostatic effects in trypsin reactions

Influence of salts

Eur. J. Biochem. 222, 475-481 (1994)

TSONG T. Y.

Electrical modulation of membrane proteins:

Enforced conformational oscillations and biological energy signal transductions

Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 19, 83-106 (1990)

TSONG T. Y., ASTUMIAN R. D.

Electroconformational coupling: How membrane-bound ATPase transduces energy from dynamic electric fields

Ann. Rev. Physiol. 50, 273-290 (1988)

TSONG T. Y., LIU D.-S., CHAUVIN F., GAIGALAS A., ASTUMIAN R. D.

Electroconformational coupling (ECC): an electric field induced enzyme oscillation for cellular energy and signal transductions

Bioelectrochem. Bioenerg. 21, 319-331 (1989)

TUPPY H., WIESBAUER U., WINTERSBERGER E.

Aminosäure-p-nitroanilide als Substrate für Aminopeptidasen und andere proteolytische Fermente

Hoppe-Seylers Zeitsch. f. physiol. Chemie 329, 278-288 (1962)

WALLECZEK J.

Electromagnetic field effects on cells of the immune system: the role of calcium signaling

FASEB J. 6, 3177-3185 (1992)

WALSH K. A., WILCOX P. E.

Serine Proteases

in: Perlmann G. E., Lanzo L. (Eds.)

Proteolytic Enzymes

Academic Press, New York and London (1970); 31-41

WARSHEL A., NARAY-SZABO G., SUSSMAN F., HWANG J.-K.

How do serine proteases really work?

Biochemistry 28, 3629-3637 (1989)

WEAVER J. C., ASTUMIAN R. D.

The response of living cells to very weak electric fields: The thermal noise limit

Science 247, 459-462 (1990)

WEETALL H. H.

Trypsin and papain covalently coupled to porous glass: preparation and characterization

Science 166, 615-617 (1969)

WEETALL H. H.

Storage stability of water-insoluble enzymes covalently coupled to organic and inorganic carriers

Biochim. Biophys. Acta 212, 1-7 (1970)

WEETALL H. H.

Covalent coupling methods for inorganic support materials

Methods in Enzymology 44, 134-148 (1976)

WENGENMAYER F., LINDER D., WALLENFELS K.

1,4- α -Glucan phosphorylase from *Klebsiella pneumoniae* covalently coupled on porous glass

Biotechnol. Bioeng. 19, 1387-1403 (1977)

YEARGERS E. K., LANGLEY J. B., SHEPPARD A. P., HUDDLESTON G. K.

Effects of microwave radiation on enzymes

Ann. N. Y. Acad. Sci. 247, 301-304 (1975)

ZÜLKE M.

Vergleichende Untersuchungen zu Eigenschaften und Struktur von Verdauungs-
enzymen der Bauchspeicheldrüse des Pferdes

Inaugural-Dissertation JLU Gießen (1996)

Programm zur Aufzeichnung der Absorptionsdaten (qbasic unter DOS)

```
CLS
```

```
zaehler = 0  
warte = 0
```

```
LINE INPUT "Name der Speicherdatei:"; name$  
LINE INPUT "Steuerfolge:"; steuer$
```

```
text$ = name$ + ".txt"  
datei$ = name$ + ".dat"
```

```
OPEN text$ FOR OUTPUT AS #1  
OPEN datei$ FOR OUTPUT AS #2  
OPEN "com2:1200, n, 8, 1, ds0" FOR RANDOM AS #3  
ON COM(2) GOSUB holedaten  
COM(2) ON  
PRINT #3, steuer$;
```

```
warteschleife:  
DO  
  warte = warte + 1  
  IF INKEY$ = CHR$(115) THEN PRINT #3, "R"  
LOOP UNTIL INKEY$ = CHR$(27)
```

```
ende:  
CLOSE #1  
CLOSE #2  
PRINT #3, "I"  
COM(2) OFF  
CLOSE #3  
END
```

```
holedaten:  
  zaehler = zaehler + 1  
  COM(2) OFF  
  LINE INPUT #3, daten$  
  PRINT #1, daten$  
  IF MID$(steuer$, 2, 1) = "V" THEN  
    IF zaehler > 4 THEN  
      eins$ = MID$(daten$, 2, 4)  
      zwei$ = MID$(daten$, 7, 6)
```

```
    PRINT #2, eins$, " "; zwei$
  END IF
END IF
IF MID$(steuer$, 2, 1) = "W" OR MID$(steuer$, 2, 1) = "X" THEN
  IF zaehler > 5 THEN
    eins$ = MID$(daten$, 2, 6)
    zwei$ = MID$(daten$, 12, 6)
    PRINT #2, eins$, " "; zwei$
  END IF
END IF
IF MID$(steuer$, 2, 1) = "M" THEN
  IF zaehler > 4 THEN
    eins$ = MID$(daten$, 1, 4)
    PRINT #2, eins$, " ";
    FOR wlnr = 1 TO wlanz
      zwei$ = MID$(daten$, wlnr * 6 - 1, 6)
      PRINT #2, zwei$, " ";
    NEXT wlnr
    PRINT #2,
  END IF
END IF
COM(2) ON
RETURN
```

Danksagung

Allen, die zum Gelingen meiner Promotionsarbeit beigetragen haben, möchte ich, sofern ich es nicht schon persönlich getan habe, hiermit von Herzen danken.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Kiefer und Herrn Prof. Dr. Gerd Gundlach gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes. Auch möchte ich mich für die stete Bereitschaft zur Diskussion bedanken.

Herzlichst bedanken möchte ich mich bei Herrn Peter Dotzauer für seine technische Hilfestellung bei der Durchführung der Versuche.

Auch allen Mitgliedern des Biochemischen Instituts, die zu einem sehr angenehmen Arbeitsklima beigetragen haben, sei recht herzlich gedankt.

Bei Herrn Dipl. Phys. Werner Arnold möchte ich mich für die Bereitstellung einiger technischer Geräte und für die Beratung in dieser Hinsicht bedanken.

Großer Dank gilt auch Herrn Dr. rer. nat. Hans-Christoph Dönges, der mir in vielen Diskussionen bei den theoretischen Überlegungen zur Seite stand.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei allen Freunden und Bekannten für das stets vorhandene Verständnis und die treue Begleitung während der vielen Jahre der Arbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne deren Unterstützung mein Studium und damit auch die Möglichkeit zu dieser Promotion nicht denkbar gewesen wäre.

Vor allen Dingen möchte ich aber auch meinem Lebenspartner herzlich danken, der mir immer beigestanden und mich in meiner Arbeit bestärkt hat.

Lebenslauf

Persönliches

Name	Friederike Weimer
Geburtstag und -ort	01. August 1965 in Gießen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Eltern	Werner Weimer Helga Weimer, geb. Weimert

Schulbildung

1971-1975	Grundschule in Staufenberg
1975-1981	Gymnasialzweig der Clemens-Brentano-Schule in Lollar bis zur 10. Klasse
1981-1984	Gymnasialzweig der Herderschule in Gießen
Juni 1984	Abitur

Studium

1984-1991	Physikstudium an der JLU Gießen
Juli 1991	Diplom im Fach Strahlenbiophysik des Fachbereichs Physik zum Thema „Strahleninduzierte Genkonversionen in der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> “ unter der Betreuung von Prof. Dr. J. Kiefer
seit Dezember 1991	Promotion am Biochemischen Institut des Fachbereichs Medizin der JLU Gießen zum Thema „Auswirkung elektrischer Felder auf Struktur und Funktion von Proteinen“
seit WS 97/98	Studium der klassischen Archäologie an der JLU Gießen

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.