

Abteilung für Physikalische Biochemie des Physiologisch-Chemischen Instituts¹ und Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie² der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen

Proteinanalytische Untersuchungen an Enzymtabletten

B. SCHULZ¹, S. STOEVA¹, W. VOELTER¹ und P. C. SCHMIDT²

Enzymtabletten mit Butyrylcholinesterase (CHE) und Peroxidase (POD) weisen nach Einwirkung eines Tablettierdruckes von 495 MPa verminderte Enzymaktivitäten auf. Im Vergleich zur Lösung des unverpressten Materials ergeben sich hinsichtlich der UV-Absorption und der Fluoreszenzintensität keine Unterschiede. Geringe Differenzen treten lediglich bei den CD-Spektren auf. Mit der Polyacrylamidgel-Elektrophorese werden keine fehlenden oder zusätzlichen Banden festgestellt. Paralleluntersuchungen werden an thermisch belastetem Ausgangsmaterial durchgeführt. Nach dem Erhitzen auf 150 °C zeigen die CHE und POD noch Restaktivitäten, die UV-Absorptionen steigen mit der Dauer der Belastung an, bis es zu Präzipitationen kommt. Die CD-Spektren der erhitzten Proben sind deutlich verändert.

Analytical behavior of enzyme tablets

Enzyme tablets with butyrylcholine esterase (CHE) and peroxidase (POD) partly lose enzymatic activity during compaction at a pressure of 495 MPa. Compared to solutions of the original enzyme, no changes of ultraviolet absorbance and fluorescence intensity in the tablet solutions were found. Only small changes were observed in the far ultraviolet circular dichroism spectra. Neither missing nor additional bands were detected with polyacrylamide gel electrophoresis. Heated (150 °C) solid starting material with CHE and POD showed still part of its original enzymatic activity. The ultraviolet absorbance increased with continued heating until precipitation occurred. The circular dichroism spectra are changed clearly.

1. Einleitung

Die Enzyme Butyrylcholinesterase (EC 3.1.1.8; CHE) und Peroxidase (EC 1.11.1.7; POD) erfahren durch eine Tablettierung eine druckabhängige Abnahme ihrer Aktivität [1]. Es wurde geprüft, ob sich bei Messungen der UV-Absorption bei 280 nm, der Fluoreszenzintensität sowie des Circulardichroismus im fernen UV an Lösungen solcher Enzymtabletten Unterschiede zum nichttablettierten Ausgangsmaterial feststellen lassen. Ergänzend wurde die Polyacrylamidgel-Elektrophorese herangezogen. Die entsprechenden proteinanalytischen Daten wurden zum Vergleich mit den Tablettenproben auch von thermisch belastetem Ausgangsmaterial erhoben. Zusätzlich wurde ein Lyophilisat mit Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7; ACHE), deren Aktivität aber nicht bestimmt wurde, in die Untersuchungen einbezogen.

Über proteinanalytische Untersuchungen an tablettierte Enzymen liegen bisher nur vereinzelt Ergebnisse vor [2, 3]. Groves und Teng [3] fanden für Urease mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese einige zusätzliche Banden mit höherem Molekulargewicht. Bei Lipase, α -Amylase und β -Glucuronidase waren keine deutlichen Veränderungen feststellbar. Circulardichroismusspektren von Enzymen nach Einwirkung von Tablettierdruck ergaben bei der Urease Hinweise auf eine geringe Veränderung der Quartär- und Tertiärstruktur, nicht aber der Sekundärstruktur [2]. Für α -Amylase und β -Glucuronidase wurden ein Verlust an α -Helixstruktur und keine Veränderungen der Tertiär- und Quartärstruktur festgestellt. Für Lipase blieb ein deutlicher Effekt aus [3].

Sehr umfangreich hingegen sind die Literaturangaben über Strukturveränderungen gelöster Proteine unter Druck [4–45]. Bei monomeren Proteinen werden erst zwischen 300 und 500 MPa Denaturierungserscheinungen beobachtet [15, 21, 27, 42]. Setzt man oligomere Proteine hydrostatischem Druck aus, so kommt es bei Drücken im Bereich um 300 MPa zur Dissoziation in die Untereinheiten,

da die Bindung zwischen den Proteinmonomeren gegenüber den Bindungen zwischen Protein- und Wassermolekülen bzw. zwischen den Wassermolekülen allein die geringste Energie besitzt und somit am ehesten zerstört wird [11, 15, 18, 21, 22, 24, 27, 28, 39, 45]. Die Dissoziation geht mit einem Verlust an Enzymaktivität einher, der bei kurzzeitiger Einwirkung von Drücken kleiner 300 MPa reversibel ist, wenn bei der Reassoziierung die sterisch korrekte Faltung der Monomeren erfolgt, was bei Tetrameren weniger wahrscheinlich ist als bei Dimeren [16, 21, 28, 45]. Übersteigt der Druck eine proteinabhängige, durchschnittlich bei 300 MPa gelegene Grenze, so treten neben der Dissoziation und fehlerhaften Reassoziierung Denaturierungen in der Tertiär- und Sekundärstruktur auf. Es kann dabei zur Entknäuelung des Proteinmoleküls kommen, in deren Folge sich hydrophobe Strukturelemente aus dem Molekülinneren zur Oberfläche hin ausrichten. Diese hydrophoben Gruppen neigen zu intermolekularen Wechselwirkungen, die zur Bildung von Molekülaggregaten bis hin zu Präzipitationen führen können [22, 31, 43, 44]. Im Gegensatz dazu wurde bei Proteinen mit entsprechenden strukturellen Voraussetzungen, z. B. dem Vorliegen innerer, mit hydrophoben Aminosäureresten ausgekleideter Hohlräume, eine druckbedingte Volumenreduktion des Proteinmoleküls durch intramolekulare hydrophobe Wechselwirkungen nachgewiesen [31, 33, 37]. Eine Veränderung der Anteile der einzelnen Sekundärstrukturelemente durch Einwirkung hoher hydrostatischer Drücke ist vor allem in der neueren Literatur beschrieben worden [14, 17, 30, 32, 35, 40]. Dabei zeigt sich häufig, daß Anteile an α - und β -Strukturelementen zugunsten ungeordneter Strukturen verringert werden, da letztere ein geringeres Volumen in Anspruch nehmen. Die Primärstruktur wird auch bei Einwirkung eines hydrostatischen Druckes von mehreren GPa nicht zerstört [22, 30].

Beim Vergleich der analytischen Untersuchungsergebnisse von in Lösung und in fester Form komprimierten Proteinen ist vor allem das unterschiedliche Angebot an Wasser

zu berücksichtigen. Nach Goossens et al. [30] stellen das Wasser und seine druckabhängig veränderte Struktur die entscheidenden Voraussetzungen für druckbedingte Veränderungen der dreidimensionalen Proteinstruktur dar. Die Anwendung von Tablettierdruck unterscheidet sich vom hydrostatischen Druck des weiteren dahingehend, dass der Tablettierdruck inhomogen auf das Protein wirkt und durch Reibungen zusätzlich lokale Temperaturanstiege aufreten können [46]. Schließlich können proteinanalytische Untersuchungen in Lösungen zeitgleich mit der Druckeinwirkung durchgeführt werden, während bei der Tablettierung entstehende Strukturveränderungen irreversibel sein müssen, um auch nach der Druckentlastung nachweisbar zu sein.

2. Untersuchungen und Ergebnisse

2.1. Enzymaktivität

Durch die Tablettierung der Enzympräparate mit einem Druck von 495 MPa erfuhr die CHE einen Aktivitätsverlust von 11,6%. Der Aktivitätsverlust der POD fiel mit 2,3% deutlich geringer aus. Durch das Erhitzen der Enzympräparate auf 150 °C sank die Aktivität beider Enzyme innerhalb von 5 min um etwa 50%. Während die Aktivität der CHE bei Verlängerung der Belastungsdauer auf 20 min auf 7,2% abfiel, sank die Aktivität der POD nur auf 29,6% (Tabelle).

Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten von den klaren Lösungen der Tabletten und der erhitzten Proben bzw. von

Tabelle: Prüfung von Enzymtabletten und thermisch belastetem Ausgangsmaterial

Präparat	Ausgangsmaterial	Tabletten	Ausgangsmaterial auf 150 °C erhitzt		
			5 min	10 min	20 min
Enzymaktivität (%)					
CHE	100,0	88,4	54,8	34,5	7,2
POD	100,0	97,7	48,9	38,4	29,6
UV-Absorption (A_{280})					
CHE	0,762 (k)	0,756 (k)	0,805 (k)	1,416 (t) 0,882 ^a (t)	1,040 (t) 0,286 ^a (P + k)
POD	0,510 (k)	0,477 (k)	0,593 (k)	0,603 (k)	0,625 (k)
ACHE	0,500 (k)	0,507 (k)	0,534 (k)	0,574 (k)	0,621 (t) 0,180 ^a (P + k)
Fluoreszenzintensität					
CHE	109	109	120	—(t)	44 ^a ; 41 ^b
POD	21	21	21	21	21
ACHE	84	84	76	71	29 ^a ; 30 ^b
CD-Daten (Strukturanteile (%))					
CHE	α : 19,0 β : 37,7 K: 43,4	α : 18,5 β : 41,7 K: 39,8			α : 12,1 β : 65,5 K: 22,4
POD	α : 16,5 β : 51,3 K: 32,2	α : 17,1 β : 54,3 K: 28,6			α : 11,8 β : 60,6 K: 27,6
ACHE	α : 40,0 β : 13,9 K: 46,1	α : 39,2 β : 19,4 K: 41,4			α : 31,8 β : 33,1 K: 35,1
Polyacrylamidgel-Elektrophorese					
CHE		unverändert			
ACHE		unverändert			

(k) klare Lösung; (t) getrübbte Lösung; (P + k) Präzipitat mit klarem Überstand; a im Überstand nach Zentrifugation bestimmt; b zu erwartende Intensität bezogen auf den aus der UV-Absorption berechneten Gehalt an noch löslichem Protein; α : α -Helixstruktur; β : β -Faltblattstruktur; K: statistische Knäuelstruktur

den Überständen der zentrifugierten Lösungen der erhitzten CHE-Proben, die Präzipitate enthielten (vgl. 2.2.).

2.2. UV-Absorption

Die UV-Absorptionen bei 280 nm in den Lösungen der tablettierten und erhitzten Enzympräparate wurden mit den Werten der Ausgangslösungen (unbehandelte Proben) verglichen. Die Absorptionen beziehen sich auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml.

Die Lösungen der Enzymtabletten waren klar. Die Absorptionen der Lösungen aus den CHE- und ACHE-Tabletten waren nicht signifikant verändert, die der Lösungen der POD-Tabletten geringfügig vermindert.

Nach 5minütigem Erhitzen wurden noch klare Lösungen der Enzymproben erhalten, wobei sich die Absorptionen signifikant erhöhten. Die Lösungen der POD-Proben blieben auch nach verlängertem Erhitzen klar, die Absorptionen bei 280 nm stiegen weiter an. Die Lösungen der 10 und 20 min lang erhitzten CHE- und die der 20 min lang erhitzten ACHE-Proben waren getrübt, so dass die in der Tabelle aufgeführten Werte nur orientierenden Charakter haben. Durch 15minütige Zentrifugation bei 1600 U/min gelang es, aus den Lösungen der 20 min lang erhitzten CHE- und ACHE-Proben das Präzipitat abzutrennen und einen klaren Überstand zu erhalten, in dem ebenfalls eine Absorptionsmessung vorgenommen wurde (Tabelle).

2.3. Fluoreszenzintensität

Die Fluoreszenzemission wurde nach Anregung bei 298 nm zwischen 310 und 420 nm registriert und auf eine Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml berechnet. In den Lösungen der Enzymtabletten wurden keine Unterschiede zum Ausgangsmaterial festgestellt (Tabelle).

Nach dem Erhitzen bei 150 °C zeigten die drei untersuchten Enzympräparate ein unterschiedliches Fluoreszenzverhalten. Die Fluoreszenzintensität der POD-Probe veränderte sich über den gesamten Belastungszeitraum nicht. Bei den Proben mit CHE stieg die Fluoreszenzintensität nach 5 min bei 150 °C deutlich an. Nach 10 min war keine Messung mehr durchführbar, da keine klare Lösung erhalten wurde. Nach 20minütigem Erhitzen wurde die Fluoreszenzintensität in dem nach Abzentrifugieren des Präzipitates erhaltenen klaren Überstand bestimmt (vgl. 2.2.). Die Fluoreszenzemission war verringert, was aber hauptsächlich auf die Verminderung der Proteinkonzentration durch Präzipitation zurückzuführen ist. Um diesen Einfluss abzuschätzen, wurde in Kenntnis von UV-Absorption und Proteinkonzentration der Ausgangslösung aus der UV-Absorption des Überstandes die verbliebene Proteinkonzentration errechnet. Unter Zugrundelegung dieser Konzentration wäre eine Fluoreszenzintensität von 41 zu erwarten gewesen. Der gefundene Wert von 44 liegt unter Berücksichtigung der möglichen Fehler, die aus dem beschriebenen Weg der Konzentrationsberechnung resultieren, nur geringfügig über dem Erwartungswert. Die Fluoreszenzintensität der erhitzten ACHE-Proben sank mit zunehmender Belastungsdauer. Wird nach 20minütiger Erhitzungsdauer, wie für die CHE-Proben beschrieben, die Proteinkonzentration im Überstand der zentrifugierten Lösungen für die Berechnung der zu erwartenden Fluoreszenzintensität herangezogen, so ist der gefundene Wert unwesentlich niedriger als der Erwartungswert (Tabelle).

Unter keiner der Versuchsbedingungen kommt es zu einer Verschiebung der Lage des Emissionsmaximums bei 334 nm.

2.4. Messung des Circular dichroismus (CD)

Die CD-Spektren im fernen UV (190 bis 250 nm) der tablettierte bzw. erhitzten und anschließend gelösten Enzympräparate wurden mit denen der Ausgangsmaterialien verglichen. Bei Vorliegen von Präzipitaten erfolgte die CD-Messung in den durch Zentrifugation geklärten Lösungen. Die molare Konzentration wurde aus der gemessenen UV-Absorption des Überstandes bei 280 nm errechnet (Tabelle), obwohl bei den erhitzten Proben nicht ausgeschlossen werden konnte, daß die UV-Absorption durch denaturiertes, aber noch lösliches Protein beeinflusst wird. Als mittleres Gewicht je Aminosäurerest (mean residue weight, MRW) wurden die für die reinen Enzyme in der Literatur angegebenen Werte verwendet, obwohl die einge-

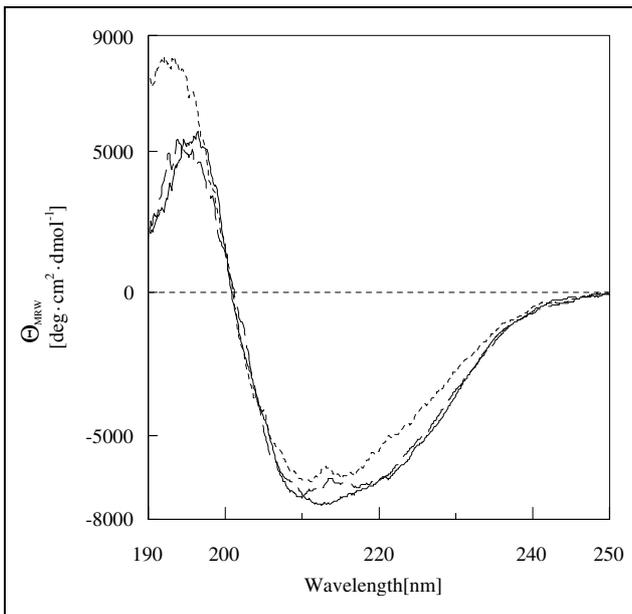


Abb. 1: CD-Spektren der CHE-Proben nach Tablettierung (---) und thermischer Belastung (150 °C, 20 min) (·····) im Vergleich zur Ausgangslösung (—)

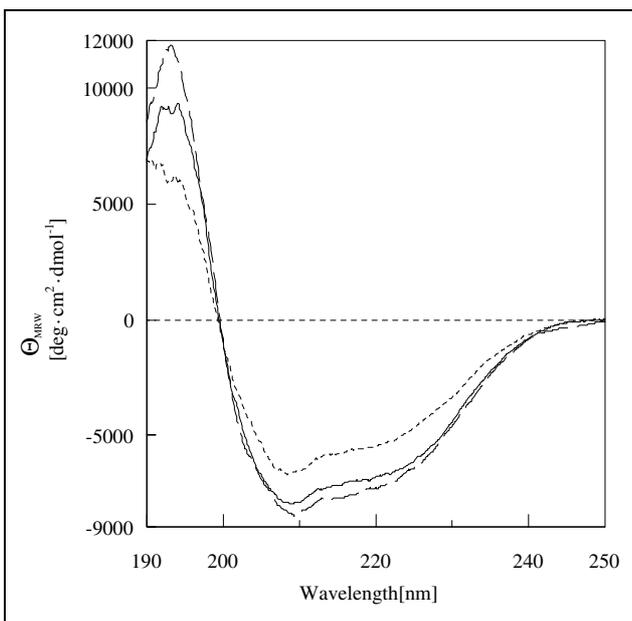


Abb. 2: CD-Spektren der POD-Proben nach Tablettierung (---) und thermischer Belastung (150 °C, 20 min) (·····) im Vergleich zur Ausgangslösung (—)

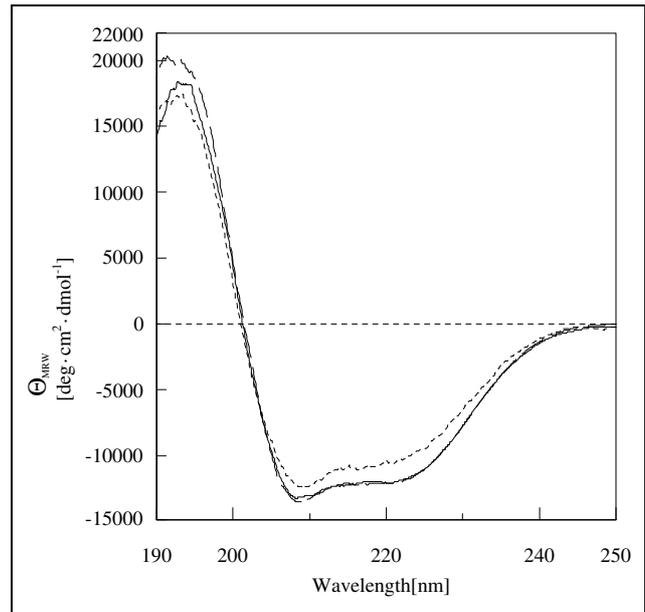


Abb. 3: CD-Spektren der ACHE-Proben nach Tablettierung (---) und thermischer Belastung (150 °C, 20 min) (·····) im Vergleich zur Ausgangslösung (—)

setzten Enzympräparate unterschiedlich hohe Anteile an Begleitproteinen enthielten (vgl. 3.). Danach wurde für CHE und ACHE ein mittleres Gewicht je Aminosäurerest von 115 [47] und für die POD von 110 [48] zugrunde gelegt.

Mit Hilfe einer computerunterstützten Auswertung wurden aus den erhaltenen CD-Spektren die Anteile der verschiedenen Strukturelemente berechnet (Tabelle).

Nach der Tablettierung wurden bei den CHE-, POD- und ACHE-Proben nur geringe Veränderungen in den Anteilen der Sekundärstrukturelemente gefunden (Tabelle, Abb. 1–3). Die quantitative Auswertung ergab eine tendenzielle Zunahme an β -Faltblattstruktur bei Abnahme der statistischen Knäuelstruktur.

Stärkere Veränderungen der CD-Spektren waren nach Erhitzen der Enzympräparate über 20 min bei 150 °C zu beobachten (Abb. 1–3). Diese entsprechen einer Minderung der Anteile an α -Helix- und statistischer Knäuelstruktur sowie einem Zuwachs an β -Faltblattstruktur (Tabelle).

2.5. Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Mit Hilfe der nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach Laemmli [49] wurde geprüft, ob in den Lösungen von Tabletten mit CHE und ACHE Aggregate anderer Molekulargewichte als in den Ausgangslösungen vorliegen. Sowohl bei den CHE- als auch bei den ACHE-Proben sind nach der Tablettierung keine neuen Banden niedrigeren oder höheren Molekulargewichts sichtbar.

3. Diskussion

Im Bereich der Analytik und klinisch-chemischen Diagnostik werden Reagenzien bisher nur selten in Tablettenform angeboten. Das trifft auch für Enzyme zu, die als Hilfsenzyme oder Kontrollmaterialien benötigt werden und wegen ihrer hohen Spezifität zunehmend zum Einsatz kommen [50].

In der Tablette kann die Aktivität von Enzymen durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst sein, wobei neben Wechselwirkungen mit den Tablettierhilfsstoffen vor allem

die Einwirkung der für die Tablettierung notwendigen Druckkräfte eine Rolle spielt [1]. Als Ursache für den Enzymaktivitätsverlust nach Tablettierung, der je nach Enzym bis zu 50% betragen kann, werden entweder durch Partikelreibung bedingte thermische Denaturierungen oder durch druckbedingte Volumenreduktion hervorgerufene konformative Molekülveränderungen angenommen [50].

Zur Untersuchung der Einflüsse von Tablettierdruck und thermischer Energie auf die Struktur von CHE, POD und ACHE in kommerziell erworbenen Enzympräparaten von unterschiedlichem Reinheitsgrad und Alter wurden die Messung der UV-Absorption, der Fluoreszenzintensität und des Circular dichroismus sowie die Polyacrylamidgellelektrophorese herangezogen. Der Anreicherungsgrad des betreffenden Enzyms in einem Präparat richtet sich nach dem Verwendungszweck. So reichen bei Cholinesterase schon geringe Aktivitäten für die Pestizidprüfung durch Enzyminhibierung aus. Wir verwendeten ein solches Lyophilisat aus Pferdeserum für die Tablettierung. Die Bestimmung der Enzymaktivität ergab 6 U/mg (Butyrylthiocholin und 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)). Da angereicherte CHE eine spezifische Aktivität von 778 U/mg (Butyrylthiocholin) erreicht [51], beträgt der Gehalt an aktiver CHE im eingesetzten Präparat etwa 1%. Bei der verwendeten POD betrug die ermittelte Enzymaktivität 171 U/mg (Wasserstoffperoxid und Phenol/4-Aminoantipyrin). Für POD wird eine spezifische Aktivität von 250 U/mg (Guajakol) [52] bzw. 290 U/mg (Guajakol) [53] angegeben. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die POD-Aktivität von 1 U/mg, bestimmt mit Guajakol als Substrat, einer Aktivität von 2,1 U/mg bei Bestimmung mit Phenol/4-Aminoantipyrin entspricht, enthält das von uns verwendete Produkt etwa ein Drittel reine POD. Die Aktivität der ACHE wurde nicht bestimmt. Aufgrund einer scharf von zwei deutlich schwächeren Banden abgegrenzten Hauptbande im Elektropherogramm und einer guten Übereinstimmung des gefundenen CD-Spektrums mit Literaturangaben [54, 55], gehen wir bei dem ACHE-Produkt von einem hohen Anteil des betreffenden Enzyms im eingesetzten Präparat aus.

Bei der Deutung der Ergebnisse der proteinanalytischen Untersuchungen ist zu berücksichtigen, dass die gewonnenen Daten aus der Summe aller im Präparat enthaltenen Proteine resultieren. Da es sich, wie hergeleitet, bei keiner der untersuchten Proben um ein reines Enzym handelt, können aus den proteinanalytischen Daten demnach nur bedingt Schlussfolgerungen auf strukturelle Veränderungen des einzelnen Enzyms gezogen werden.

3.1. Enzymaktivität

Als Ursachen für den bei der Tablettierung von Enzymen auftretenden Aktivitätsverlust wird in der Literatur neben reibungsbedingtem Temperaturspitzen vorrangig die mit der Kompaktierung einhergehende Volumenreduktion angesehen, da die Abnahme der Enzymaktivität mit der Zunahme der scheinbaren Tablettendichte korreliert [1–3, 46, 50, 56]. Die Höhe des Aktivitätsverlustes kann in Abhängigkeit von der strukturellen Stabilität des eingesetzten Enzyms sehr unterschiedlich ausfallen, wie am Beispiel des von uns untersuchten Enzymmaterials ersichtlich wird. Während die CHE bei einem Pressdruck von 495 MPa einen Aktivitätsverlust von 11,6% erfährt, beträgt dieser unter gleichen Bedingungen bei der POD nur 2,3%.

Obwohl keine signifikanten Hinweise auf irreversible und damit mit Hilfe der verwendeten proteinanalytischen Verfahren detektierbare Konformationsänderungen der En-

zyme gefunden wurden, sind in Kenntnis der strukturellen Eigenschaften beider Enzyme die Relationen der Aktivitätsverluste durchaus zu erklären. Die monomere, durch Disulfidbrücken stabilisierte POD besitzt im Vergleich zur tetrameren CHE weniger Möglichkeiten, ihre Raumstruktur durch Druckeinwirkung zu verändern. Des Weiteren ist das katalytische Zentrum der POD in einer tief liegenden „Häm-Tasche“ lokalisiert [57, 58]. Die Bindung der prosthetischen Gruppe in der „Häm-Tasche“ sollte zu der hohen konformativen Stabilität dieses Hohlraumes beitragen. Der aktive Serinrest der CHE befindet sich hingegen nahe der Moleküloberfläche [26]. Das Substrat wird über eine Reihe aromatischer Aminosäurereste zum aktiven Zentrum geleitet und von solchen auch dort in der richtigen Position fixiert [59, 60]. Aufgrund der Flexibilität dieser Molekülregion und der Begünstigung hydrophober Wechselwirkungen durch Druck ist es erklärbar, dass die CHE viel leichter als die POD lokalen Konformationsänderungen unterliegt, die zu Aktivitätsverlusten führen können.

Die Enzymproben wurden erhitzt, um ein stark wirksames Denaturierungsverfahren zum Vergleich heranzuziehen, das auch auf festes Enzymmaterial angewendet werden kann. Durch fünfminütiges Erhitzen des Ausgangsmaterials auf 150 °C sinkt die Aktivität der POD ebenso wie die der CHE um ca. 50%. Bei verlängerter Belastungsdauer sinkt die Aktivität der CHE deutlich stärker als die der POD. Die CHE unterliegt aufgrund ihrer beschriebenen strukturellen Eigenschaften offensichtlich einer stärkeren Denaturierung als die POD, für die zudem die Existenz einer hitzelabilen und einer hitzestabilen Fraktion festgestellt worden ist [61]. Die Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchungen bestätigen die unterschiedliche konformative Stabilität beider Enzyme, die sowohl bei thermischen als auch bei hyperbaren Belastungen zum Ausdruck kommt.

3.2. UV-Absorption

Die Absorption ultravioletter Strahlung durch Proteine erfolgt durch aromatische Aminosäurereste des Tryptophans, Tyrosins und Phenylalanins. Die Untersuchungen an Lösungen der druck- und temperaturbelasteten Enzymproben wurden im Absorptionsmaximum bei 280 nm durchgeführt. Im Falle einer Denaturierung von Proteinen in Form einer Entknäuelung können die ins Innere des Moleküls ausgerichteten apolaren Aminosäuren an die Moleküloberfläche gelangen. Diese Veränderung der Zahl der spektroskopisch zugänglichen chromophoren Strukturelemente äußert sich mit der höchsten Empfindlichkeit in einer Absorptionsänderung bei 280 nm.

Lösungen aus CHE-, POD- und ACHE-Tabletten zeigen nur geringfügige Veränderungen der UV-Absorption bei 280 nm im Vergleich zur Ausgangslösung und keine Verschiebung des UV-Maximums zu kürzeren Wellenlängen, wie Horikoshi et al. [62] bei Enzymen nach Einwirkung von Druck- und Scherkräften fanden. Demnach ergeben sich aus der Messung der UV-Absorption keine Hinweise auf tablettierungsbedingte Proteinveränderungen.

Das Erhitzen der Enzymproben mit CHE, POD und ACHE führt zu einer mit der Erhitzungsdauer zunehmenden Denaturierung, was sich in einem Anstieg der UV-Absorption äußert. Im Falle der POD korreliert die Zunahme der UV-Absorption linear mit der Abnahme der Enzymaktivität, so dass anzunehmen ist, dass die von der Entknäuelung betroffenen hydrophoben Aminosäuren im direkten Bezug zum aktiven Zentrum des Enzyms stehen. Bei den CHE- und ACHE-Proben resultiert die Hydrophobisierung

der Proteinoberfläche durch Denaturierung schließlich in einer intermolekularen Aggregation bis hin zur Präzipitation, die bei der POD ausbleibt.

3.3. Fluoreszenzintensität

Wie die UV-Absorption weist auch das Fluoreszenzverhalten von Proteinen auf Veränderungen der Umgebung der chromophoren Aminosäureseitenketten und damit auf Veränderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur hin [63]. Es wurde die Anregungswellenlänge von 298 nm gewählt, so dass nur die Fluoreszenzemission von Tryptophanresten erfasst wird [48]. Das Emissionsmaximum wurde in Übereinstimmung mit Literaturangaben bei 334 nm gefunden [6, 64]. Gelangen Tryptophanreste bei der Proteinknäuelung in hydrophile Umgebung, erfolgt eine Rotverschiebung des Emissionsmaximums, wie von einer Reihe von Autoren bei der Einwirkung hydrostatischen Druckes auf Proteine gefunden wurde [35, 39, 40, 42, 45]. Bei den untersuchten CHE-, ACHE- und POD-Präparaten kommt es weder nach Einwirkung von Tablettierdruck noch durch hohe Temperatur zu einer Verschiebung des Emissionsmaximums in diese Richtung. Demnach verbleiben die Tryptophanreste dieser Enzyme unter den gewählten Bedingungen in ihrer hydrophoben Umgebung. Dennoch kann sowohl die Zu- als auch die Abnahme der Fluoreszenzintensität auf Energieübertragungen oder Veränderungen von Ladungsverhältnissen im Proteinmolekül hinweisen [31, 43, 48, 64].

In den Lösungen der Enzymtabletten mit CHE, POD und ACHE ist die Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Ausgangslösung unverändert. Es liegt somit auch durch die Fluoreszenzmessung kein Hinweis auf eine irreversible strukturelle Veränderung der Enzymproben infolge des Tablettierdruckes vor.

Nach dem Erhitzen der CHE- und ACHE-Proben treten signifikante Veränderungen der Fluoreszenzintensität auf, die auf konformative Änderungen der Proteinstrukturen schließen lassen, ohne dass deren Lage und Art im einzelnen zu deuten sind. Nach Entfernung präzipitierten Proteins durch Zentrifugation zeigt die im Überstand verbleibende Proteinlösung nur geringe Abweichungen der ermittelten Fluoreszenzintensität von dem errechneten Erwartungswert (vgl. 2.3.). Obwohl diese Werte nur bedingt zur Beurteilung struktureller Veränderungen des noch gelösten Proteins herangezogen werden können, da die Berechnung der Proteinkonzentration im Überstand aus der UV-Absorption nur orientierenden Charakter hat, deutet ihre Konstanz über den gesamten Belastungszeitraum darauf hin, dass die thermisch induzierten Konformationsänderungen nicht alle Proteinmoleküle gleichzeitig erfassen, sondern dass mit zunehmender Belastungsdauer immer mehr native Moleküle einbezogen werden.

Die Fluoreszenz der POD wird weder durch die Tablettierung noch durch Erhitzen verändert. Die besondere Stabilität des einzigen Tryptophanrestes 117 der Meerrettich-POD ist auf seine Lage in einer aus zwei helikalen Abschnitten gebildeten Schleife zurückzuführen. Auch die Möglichkeit einer Fluoreszenzlöschung dieses Tryptophanrestes durch das im Holoenzym gebundene Häm ist im Hinblick auf die geringe Fluoreszenzintensität zu berücksichtigen [57].

3.4. Circular dichroismus

Mit Hilfe der Circular dichroismus-Spektren von Peptiden und Proteinen im Bereich des fernen UV können Aus-

gen zu deren Sekundärstruktur gemacht werden. Oberhalb von 250 nm wird das CD-Spektrum durch aromatische Aminosäurereste und Disulfidbrücken bestimmt. Die computerunterstützte Ermittlung der prozentualen Anteile einzelner Elemente an der Sekundärstruktur basiert auf dem Vergleich des zu analysierenden Spektrums mit Spektren von Verbindungen definierter Struktur. Das CD-Spektrum der reinen α -Helix ist durch zwei negative Elliptizitätsbanden bei 222 und 208 nm sowie eine positive Bande bei 192 nm charakterisiert. Die β -Faltblattstruktur zeigt eine negative Bande bei 216 nm und eine positive zwischen 195 und 200 nm. Neben der Lage der Banden spielt deren Intensität bei der Beurteilung des Beitrages zu einer Struktur eine Rolle [65, 66].

Bei allen drei untersuchten Enzymproben sind nach der Tablettierung nur sehr geringe Veränderungen der Sekundärstrukturelemente nachweisbar (Tabelle). Obwohl diese Veränderungen lediglich tendenziellen Charakter haben, stimmen sie mit beschriebenen Effekten hydrostatischer Druckeinwirkung auf andere Proteine überein [30, 35]. Da jedoch die spezifische Eigenschaft der Enzymaktivität sowohl der CHE als auch der POD eine Verminderung erfährt, sollte eine druckinduzierte Beeinflussung der aktiven Konformation der Enzymmoleküle vorliegen. Bei der POD mag diese Beeinflussung so gering sein, dass sie trotz einer verhältnismäßig hohen Reinheit des eingesetzten Präparates nicht nachweisbar ist, was mit dem geringen tablettierungsbedingten Aktivitätsverlust in Übereinstimmung steht. Bei der CHE kann nicht ausgeschlossen werden, dass unter der Druckeinwirkung strukturelle Veränderungen auftreten, die jedoch aufgrund des hohen Anteils an Fremdprotein im eingesetzten Präparat nicht detektierbar sind. Bei der Beurteilung der CD-Spektren in Hinblick auf Indizien für die verringerte Enzymaktivität ist außerdem zu berücksichtigen, dass aufgrund der höheren konformativen Flexibilität des aktiven Zentrums von Enzymen im Vergleich zum Gesamtmolekül bereits lokale Strukturveränderungen erfolgt sein können, während mit Verfahren wie der CD-Messung, die die Struktur des ganzen Moleküls erfassen, noch keine Abweichungen ermittelt werden können [45, 67].

Erst nach dem Erhitzen der Enzymproben über den Zeitraum von 20 min werden rechnerisch deutliche Unterschiede zum Ausgangsmaterial in Bezug auf die Anteile der einzelnen Sekundärstrukturelemente, insbesondere der β -Faltblattstruktur, festgestellt. Daran dürften insbesondere die verminderten Beträge der negativen Elliptizitäten bei 222 und 208 nm beteiligt sein. Die Abnahme der Elliptizitäten der negativen Cotton-Effekte insgesamt, sowie die stärkere Abnahme der Elliptizität bei 222 nm im Vergleich zu der bei 208 nm sind sowohl bei der ACHE als auch bei der POD als ein Indiz für Denaturierungen beschrieben worden, die mit Enzyminaktivierungen einhergehen [47, 54, 57, 68]. Die gefundenen, auf eine Denaturierung hinweisenden Veränderungen der Sekundärstruktur der untersuchten Enzymproben sollten demnach neben der Präzipitation (CHE) zumindest teilweise für die Minderung der CHE- und POD-Aktivität nach zwanzigminütigem Erhitzen auf 150 °C verantwortlich sein.

4. Experimenteller Teil

4.1. Material

Cholinesterase vom Pferd (EC 3.1.1.8) [6,0 U/mg]: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen; Peroxidase aus Meerrettich (EC 1.11.1.7) [171,1 U/mg]: Boehringer Mannheim GmbH; Acetylcholinesterase aus Rindererythrozyten (EC 3.1.1.7): Serva Feinchemie GmbH & Co., Heidelberg. Alle

weiteren Substanzen und Reagenzien sind als kommerzielle Produkte erhältlich und wurden in p.a.-Qualität verwendet.

4.2. Tablettierung

Die Matrize der Tablettenpresse (Korsch Pharmapress 103, Korsch-Pressen Berlin) wird von Hand mit 50,0 mg des Enzyms befüllt und bei 495 MPa zu biplanen, facettierten Tabletten eines Durchmessers von 6 mm komprimiert (weitere Tablettierbedingungen nach [1]).

Die Tabletten werden zunächst in 5,0 ml Wasser gelöst. Die Lösung wird für die weiteren Untersuchungen entsprechend den Angaben mit Wasser verdünnt.

4.3. Erhitzen der Enzympräparate

5,0 mg Enzymprobe werden in gerätespezifische Ampullen eingewogen. Das Erhitzen erfolgt über 5, 10 und 20 min bei 150 °C in einem TCS-Metallblock-Thermostat (Labor Technik Barkey, Bielefeld). Nach dem Abkühlen wird die Masse mit 5,0 ml Wasser aus der Ampulle gespült und für die weiteren Untersuchungen entsprechend den Angaben mit Wasser verdünnt.

4.4. Aktivitätsbestimmungen

Die Aktivität der CHE wird in einem kinetischen Verfahren (405 nm) mit Butyrylthiocholin als Substrat und 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) als Indikator bei 37 °C bestimmt [1].

Die Aktivität der POD wird in einem kinetischen Verfahren (510 nm) mit Wasserstoffperoxid als Substrat und Phenol/4-Aminoantipyrin als Indikator bei 25 °C bestimmt [1].

4.5. Messung der UV-Absorption

Von Lösungen des Enzym-Ausgangsmaterials und der Tabletten wird die UV-Absorption bei einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml bestimmt. Bei den Lösungen der erhitzten Enzymproben, die Präzipitate enthalten, wird die UV-Absorption in dem durch Zentrifugation bei 1600 g/min (15 min) (Megafuge 1,0 R, Heraeus Sepatech GmbH, Osterode) geklärten Überstand ermittelt. Die Bestimmung erfolgt gegen das Lösungsmittel in einer Schichtdicke von 10 mm bei einer Wellenlänge von 280 nm mit einem UVIKON 930 (Kontron Instruments GmbH, Neufahrn).

4.6. Messung der Fluoreszenzintensität

Von den Lösungen des Ausgangsmaterials, den Tablettenlösungen, den Lösungen erhitzter Enzymproben und den Überständen der Lösungen mit hitzeinduzierten Präzipitaten werden 100 µl mit 2000 µl Wasser verdünnt (Konzentration der Messlösungen 17 bis 48 µg/ml). Die Fluoreszenzspektren (Doppelbestimmung) wurden nach Anregung bei 298 nm mit einer Geschwindigkeit von 400 nm/min bei einer Spaltbreite von 5 nm in einem Bereich von 310 bis 420 nm mit einem Perkin Elmer Luminescence Spectrometer LS 50 (Bodenseewerk P.E. & Co. GmbH, Stuttgart) aufgenommen.

4.7. Messung des Circular dichroismus

Die Konzentrationen der Lösungen des Ausgangsmaterials, der Tablettenlösungen, der Lösungen erhitzter Enzymproben und der Überstände der Lösungen mit hitzeinduzierten Präzipitaten betragen 1,6 bis $2,2 \cdot 10^{-3}$ M (berechnet auf MRW) (0,18 bis 0,25 mg/ml). Die CD-Spektren (Doppelbestimmung) wurden bei einer Spaltbreite von 1 nm, einer Auflösung von 0,1 nm/Messpunkt und einer Geschwindigkeit von 50 nm/min mit einem Jasco J-720 Spectropolarimeter (Japan Spectroscopic Co., LTD, Tokyo, Japan) in einem Bereich von 190 bis 250 nm aufgenommen. Der Stickstofffluss betrug 3 l/min. Die Sekundärstrukturanteile wurden mit einem PC-Programm J-700 für Windows (Japan Spectroscopic Co., LTD, Tokyo, Japan) berechnet (MRW für CHE und ACHE = 115, für POD = 110).

4.8. Nichtdenaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Es wurde das Verfahren nach Laemmli mit 7,5% Polyacrylamidgel verwendet [49].

Literatur

- Schulz, B.; Schmidt, P. C.; Stoeva, S.; Voelter, W.; Göckeritz, D.: *Pharmazie* **52**, 785 (1997)
- Zarrintan, M. H.; Teng, C. D.; Groves, M. J.: *Pharm. Res.* **7**, 247 (1990)
- Groves, M. J.; Teng, C. D.; in: Ahern, T. J.; Mannig, M. C. (Eds.): *Stability of Protein Pharmaceuticals, Part A: Chemical and Physical Pathways of Protein Degradation*, p. 311, Plenum Press, New York 1992
- Penniston, J. T.: *Arch. Biochem. Biophys.* **142**, 322 (1971)
- Li, T. M.; Hook, J. W., III; Drickamer, H. G.; Weber, G.: *Biochemistry* **15**, 3205 (1976)

- Li, T. M.; Hook, J. W., III; Drickamer, H. G.; Weber, G.: *Biochemistry* **15**, 5571 (1976)
- Engelborghs, Y.; Heremans, K. A. H.; De Maeyer, L. C. M.: *Nature* **259**, 686 (1976)
- Morlid, E.: *Adv. Prot. Chem.* **34**, 93 (1981)
- Chrysomallis, G. S.; Torgerson, P. M.; Drickamer, H. G.; Weber, G.: *Biochemistry* **20**, 3955 (1981)
- Müller, K.; Lüdemann, H.-D.; Jaenicke, R.: *Naturwissenschaften* **68**, 524 (1981)
- Jaenicke, R.: *Naturwissenschaften* **70**, 332 (1983)
- King, L.; Weber, G.: *Biochemistry* **25**, 3632 (1986)
- Gekko, K.; Hasegawa, Y.: *Biochemistry* **25**, 6563 (1986)
- Wong, P. T. T.; Heremans, K.: *Biochim. Biophys. Acta* **956**, 1 (1988)
- Lüdemann, H.-D.: *Makromol. Chem., Macromol. Symp.* **17**, 29 (1988)
- Ruan, K.; Weber, G.: *Biochemistry* **28**, 2144 (1989)
- Heremans, L.; Heremans, K.: *Biochim. Biophys. Acta* **999**, 192 (1989)
- Balny, C.; Masson, P.; Travers, F.: *High Pressure Research* **2**, 1 (1989)
- Masson, P.; Balny, C.: *Biochim. Biophys. Acta* **1041**, 223 (1990)
- Erijman, L.; Weber, G.: *Biochemistry* **30**, 1595 (1991)
- Silva, J. L.; Weber, G.: *Annu. Rev. Phys. Chem.* **44**, 89 (1993)
- Heremans, K.: *NATO ASI Ser., Ser. C* **401**, 443 (1993)
- Weber, G.: *NATO ASI Ser., Ser. C* **401**, 471 (1993)
- Weber, G.: *NATO ASI Ser., Ser. C* **401**, 489 (1993)
- Kunugi, S.: *Prog. Polym. Sci.* **18**, 805 (1993)
- Masson, P.; Gouet, P.; Cléry, C.: *J. Mol. Biol.* **238**, 466 (1994)
- Gross, M.; Jaenicke, R.: *Eur. J. Biochem.* **221**, 617 (1994)
- Kornblatt, J. A.; Kornblatt, M. J.; Hui Bon Hoa, G.: *Biochemistry* **34**, 1218 (1995)
- Cléry, C.; Renault, F.; Masson, P.: *FEBS Letters* **370**, 212 (1995)
- Goossens, K.; Smeller, L.; Frank, J.; Heremans, K.: *Eur. J. Biochem.* **236**, 254 (1996)
- Galazka, V. B.; Sumner, I. G.; Ledward, D. A.: *Food Chem.* **57**, 393 (1996)
- Hayakawa, I.; Linko, Y.-Y.; Linko, P.: *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **29**, 756 (1996)
- Akasaka, K.; Tezuka, T.; Yamada, H.: *J. Mol. Biol.* **271**, 671 (1997)
- Ruan, K.; Lange, R.; Bec, N.; Balny, C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **239**, 150 (1997)
- Kunugi, S.; Kitayaki, M.; Yanagi, Y.; Tanaka, N.; Lange, R.; Balny, C.: *Eur. J. Biochem.* **248**, 567 (1997)
- Heremans, K.; Smeller, L.: *Biochim. Biophys. Acta* **1386**, 353 (1998)
- Ruan, K.; Lange, R.; Zhou, Y.; Balny, C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 844 (1998)
- Balny, C.; Lange, R.; Heitz, F.; Connelly, J. P.; Saldana, J.-L.; Ruan, K.: *Rev. High Pressure Sci. Technol.* **7**, 1292 (1998)
- Bessiere, P.; Cottin, P.; Balny, C.; Ducastaing, A.; Bancel, F.: *Biochim. Biophys. Acta* **430**, 254 (1999)
- Ruan, K.; Lange, R.; Meersmann, F.; Heremans, K.; Balny, C.: *Eur. J. Biochem.* **265**, 79 (1999)
- Kornblatt, J. A.; Kornblatt, M. J.; Cléry, C.; Balny, C.: *Eur. J. Biochem.* **265**, 120 (1999)
- Dumoulin, M.; Ueno, H.; Hayashi, R.; Balny, C.: *Eur. J. Biochem.* **262**, 475 (1999)
- Galazka, V. B.; Smith, D.; Ledward, D. A.; Dickinson, E.: *Food Hydrocolloids* **13**, 81 (1999)
- Smeller, L.; Rubens, P.; Heremans, K.: *Biochemistry* **38**, 3816 (1999)
- Zhou, J. M.; Zhu, L.; Balny, C.: *Eur. J. Biochem.* **267**, 1247 (2000)
- Wurster, D. E.; Ternik, R. L.: *J. Pharm. Sci.* **84**, 190 (1995)
- Lüllmann, H.; Preuner, J.: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **280**, 339 (1973)
- Schmid, F. X.: in Creighton, T. E.: *Protein structure*, p. 251, IRL Press, Oxford 1989
- Laemmli, U. K.: *Nature* **227**, 680 (1970)
- Schulz, B.; Schmidt, P. C.: *Pharmazie* **50**, 519 (1995)
- Main, A. R.; Soucie, W. G.; Buxton, I. L.; Arinc, E.: *Biochem. J.* **143**, 733 (1974)
- Boehringer Mannheim GmbH: *Biochemicals Catalog*, S. 328 (1997)
- Enzyme Handbook: *Peroxidase*, p. 3, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1997
- Wu, C.-S. C.; Gan, L.; Yang, J. T.: *Biochim. Biophys. Acta* **911**, 25 (1987)
- Manavalan, P.; Taylor, P.; Johnsson, Jr., W. C.: *Biochim. Biophys. Acta* **829**, 365 (1985)
- Nürnberg, E.; Hamperl, W.: *Acta Pharm. Technol.* **32**, 182 (1986)
- Pappa, H. S.; Cass, E. G.: *Eur. J. Biochem.* **212**, 227 (1993)
- Poulos, T. L.; Freer, S. T.; Alden, R. A.; Edwards, S. L.; Skogland, U.; Takio, K.; Eriksson, B.; Xuong, N.; Yonetani, T.; Kraut, K.: *J. Biol. Chem.* **255**, 575 (1980)
- Sussman, J. L.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Tokor, L.; Silman, I.: *Science* **253**, 872 (1991)

- 60 Ripoll, D. R.; Faerman, C. H.; Axelsen, P. H.; Silman I.; Sussman, J. L.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 5128 (1993)
- 61 Hendrickx, M.; Saraiva, J.; Lyssens, J.; Oliveira, J.; Tobback, P.: Int. J. Food Sci. Technol. **27**, 33 (1992); C. A. **116**, 2307726 (1992)
- 62 Horikoshi, I.; Takeguchi, N.; Morii, M.; Sano, A.: Yakugaku Zasshi **97**, 148 (1977)
- 63 Shirley, B. A.: in: Ahern, T. J.; Mannig, M. C. (Eds.): Stability of Protein Pharmaceuticals, Part A: Chemical and Physical Pathways of Protein Degradation, p. 167, Plenum Press, New York 1992
- 64 Pearlman, R.; Bewley, T. A.: in: Wang, Y. J.; Pearlman, R. (Eds.): Stability and Characterization of Protein and Peptide Drugs, p. 1, Plenum Press, New York 1993
- 65 Greenfield, N.; Fasman, G. D.: Biochemistry **8**, 4108 (1969)
- 66 Woody, R. W.: in: Udenfriend, S.; Meienhofer, J. (Eds.): The Peptides, Vol. 7, p. 15, Academic Press, INC., Orlando 1985
- 67 Tsou, C.-L.: Science **262**, 380 (1993)
- 68 Strickland, E. H.; Kay, E.; Shannon, L. M.: J. Biol. Chem. **245**, 1233 (1970)

Eingegangen am 2. Februar 2001
Angenommen am 27. Februar 2001

Dr. Birgit Schulz
Forschungszentrum Sensorik
Greifswald e.V.
Brandteichstraße 19
D-17489 Greifswald