

Urologische Klinik und Poliklinik  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Hartung)

# Verhinderung hitze- und säureinduzierter Proteindenaturierung durch einige niedrig- und hochmolekulare protektive Substanzen, gemessen an der Beeinträchtigung des aktiven Zentrums des Lactatdehydrogenase-Modellenzyms

Stephanie Lina Meeß

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. R. Hartung
2. Univ.-Prof. Dr. A. R. Ludwig

Die Dissertation wurde am 11.10.2005 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.12.2005  
angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>2</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>4</b>
1.1 Allgemeine Einführung.....	4
1.2 Überblick über die Komponenten des angeborenen und adaptiven Immunsystems.....	5
1.2.1 Die Komponenten der angeborenen Immunität.....	5
1.2.2 Die Komponenten der adaptiven Immunität.....	6
1.3 Die zentrale Rolle der Makrophagen in der Funktion des Immunsystems.....	7
1.3.1 Die Phagozytose.....	7
1.3.2 Von Makrophagen freigesetzte Zytokine.....	9
1.3.3 Der Tumornekrosefaktor- $\alpha$ .....	9
1.3.4 Von Makrophagen freigesetzte reaktive Sauerstoffmoleküle und Stickstoffoxide.....	10
1.3.5 Regulationsmechanismen der Makrophagenfunktion.....	11
1.4 Der Einfluss der Makrophagensekretionsprodukte auf die Plasmadestabilisierung.....	13
1.4.1 Der Einfluss von Tumornekrosefaktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1 (IL-1) auf die Plasmadestabilisierung.....	13
1.4.2 Der Einfluss der reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffmoleküle auf die Plasmadestabilisierung.....	14
<b>2 Problemstellung</b> .....	<b>17</b>
2.1 Biochemische Besonderheiten von Enzymen.....	17
2.2 Proteindenaturierung.....	19
2.3 Molekulare Chaperone als physiologische Proteinschutzmechanismen.....	19
2.4 Zielsetzung.....	20
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>22</b>
3.1 Material.....	22
3.1.1 Chemikalien.....	22
3.1.2 Geräte.....	25
3.1.3 Sonstige Materialien.....	25
3.2 Methoden.....	26
3.2.1 Grundprinzip der verwendeten Reaktionslösung.....	26
3.2.2 Versuchsaufbau.....	26
3.2.3 Vorversuche.....	29
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>32</b>
4.1 Der Einfluss der protektiven Substanz auf die Lactatdehydrogenaseaktivität.....	33
4.1.1 Steigerung der Lactatdehydrogenaseaktivität durch die protektive Substanz.....	33
4.1.2 Kein Einfluß der protektiven Substanz auf die Lactatdehydrogenaseaktivität.....	35
4.1.3 Hemmung der Lactatdehydrogenaseaktivität durch die protektive Substanz.....	35

4.2	Der Einfluss der protektiven Substanz auf die durch ein Denaturans gehemmte Enzymaktivität.....	37
4.2.1	Einfluss der protektiven Substanz (P) bei Denaturans (D) = Erwärmung 60 Minuten bei 60°C.....	37
4.2.1.1	Protektiver Effekt der Substanz „P“ auf die Lactatdehydrogenase.....	37
4.2.1.2	Kein Einfluss der protektiven Substanz auf die Lactatdehydrogenasehemmung .....	39
4.2.1.3	Hemmungsverstärkung durch Kombination der protektiven Substanz (P) und der Denaturierung durch Erwärmung (D).....	40
4.2.2	Einfluss der protektiven Substanz (P) bei Denaturans (D) = Perchlorsäure 0,046M.....	43
4.2.2.1	Protektiver Effekt der Substanz P auf die Lactatdehydrogenase .....	43
4.2.2.2	Kein Einfluss der protektiven Substanz auf die Lactatdehydrogenasehemmung .....	46
4.2.2.3	Hemmungsverstärkung durch Kombination der protektiven Substanz (P) und der Denaturierung durch Perchlorsäure (D).....	47
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>49</b>
5.1	Der Einfluss der protektiven Substanz auf die Lactatdehydrogenaseaktivität .....	49
5.2	Der Einfluss der protektiven Substanz auf die Lactatdehydrogenasehemmung .....	51
5.2.1	Der Einfluss der protektiven Substanz auf die Teildenaturierung durch Erwärmung.....	51
5.2.2	Der Einfluss der protektiven Substanz auf die Teildenaturierung durch Perchlorsäure.....	52
5.3	Erfolgversprechende protektive Substanzen .....	53
5.4	Mögliche Einschränkungen der Aussagekraft der Ergebnisse .....	58
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>63</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>65</b>
	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>66</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>69</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>70</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>74</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeine Einführung

Die Immunologie ist gemessen an anderen medizinischen Fächern ein noch sehr junger wissenschaftlicher Fachbereich. Sie begann im späten 18. Jahrhundert mit der von Edward Jenner entwickelten ersten erfolgreichen Impfung gegen Pocken und dem im 19. Jahrhundert von Robert Koch erbrachten Beweis, dass Infektionskrankheiten auf pathogene Mikroorganismen zurückzuführen sind. Bei der Erforschung der körpereigenen Abwehrmechanismen gegen diese Pathogene wurden im späten 19. Jahrhundert mit der Entdeckung der Antikörper durch Emil von Behring und Shibasaburo KITASATO sowie der Entdeckung der Makrophagen durch Elie Metchnikoff die ersten grundlegenden Erkenntnisse über das menschliche Immunsystem gewonnen. Dank der intensiven wissenschaftlichen Forschungen im 20. und 21. Jahrhundert und der Fortschritte auf den Gebieten der Zellkulturtechnik, der Biochemie und der Gentechnologie wurden gerade in den letzten Jahrzehnten entscheidende Fortschritte im Verständnis der körpereigenen Abwehrmechanismen erzielt. Trotz unseres bereits enormen Wissens um die komplexe Funktion des Immunsystems, sind noch immer viele Fragen offen, und die Forschung geht nicht zuletzt auf molekularbiologischer Ebene weiter. ([38] S.1-3; [1] S. 13)

Als primäre Funktion des Immunsystems ist der schnelle und hochspezifische Schutz des Körpers vor infektiösen Mikroorganismen anzusehen. Darüber hinaus spielt es jedoch auch eine zentrale Rolle bei vielen nichtinfektiösen Erkrankungen. So lösen mechanische Verletzungen, verschiedene Giftstoffe und viele Tumore eine Immunreaktion aus, welche es dem Körper ermöglicht, sich gegen diese Einflüsse zu wehren und seine Integrität wieder herzustellen.

Neben den schützenden und lebenswichtigen Funktionen des Immunsystems, kann dieses den Organismus jedoch auch erheblich schädigen. Die Abstoßungsreaktion gegenüber Transplantaten ist ebenso wie die Überempfindlichkeitsreaktion gegenüber an sich harmlosen Fremdartigen eine physiologische jedoch unerwünschte Immunantwort. Bei einem gestörten Unterscheidungsvermögen zwischen Eigen- und Fremdgewebe kommt es zu den sogenannten Autoimmunerkrankungen bei denen körpereigenes Gewebe angegriffen wird. Aufgrund des physiologisch erwünschten schädigenden und zerstörenden Potenzials der immunkompetenten Zellen, kann eine gestörte Regulierung der einzelnen Immunprozesse mit der Folge einer überschießenden Immunantwort zu einer erheblichen Schädigung gesunden körpereigenen Gewebes führen. Auf der anderen Seite kann eine verminderte Immunabwehr beispielsweise aufgrund angeborener Defekte einzelner immunkompetenter Zellen zu einer Abwehrschwäche mit chronisch rezidivierenden Entzündungen oder zur Etablierung chronischer Erkrankungen führen. ([38] S. 2, 37-38, 505-507, 537-539, 560-561; [1] S. 405-451, 472-490; [53] S. 1; [22] S. 1-4; [61] S. 589; [2] S. 645, 655-658; [23] S. 864-865)

## 1.2 Überblick über die Komponenten des angeborenen und adaptiven Immunsystems

Um sich gegen pathogene Mikroorganismen zu schützen, stehen dem Körper verschiedene Abwehrmechanismen zur Verfügung, die sich in zwei Kategorien einteilen lassen: das angeborene oder auch natürliche Immunsystem und das erworbene spezifische oder adaptive Immunsystem. ([38] S. 12; [1] S. 14)

### 1.2.1 Die Komponenten der angeborenen Immunität

Die angeborene Immunität ist erregerspezifisch und verhindert entweder das Eindringen von Mikroorganismen in den Körper oder löst bereits in der Frühphase einer Infektion eine Immunreaktion aus. Zu ihren Bestandteilen zählen die physiko-chemischen Barrieren der Haut und Schleimhäute sowie humorale und zellvermittelte Komponenten. ([38] S. 12-14, 37-47; [1] S. 14)

So können aktivierte Komplementproteine, welche an Mikroorganismen gebunden sind, diese entweder über den Ablauf der Komplementkaskade direkt lysieren oder die Pathogene über eine Opsonierung der Zerstörung durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten zugänglich machen. Ferner wirken aktivierte Komplementproteine als Chemoattraktoren, welche weitere Entzündungszellen anlocken und diese aktivieren. ([53] S. 19-20; [38] S. 46-47)

Makrophagen und neutrophile Granulozyten können Mikroorganismen entweder direkt oder über eine bereits stattgefundene Opsonierung erkennen, phagozytieren und zerstören. Makrophagen sezernieren eine Reihe von löslichen Mittlersubstanzen, welche im Rahmen der Infektabwehr aber auch allgemein bei Entzündungsreaktionen von Bedeutung sind. Hierzu zählen Zytokine und Lipidmediatoren, welche vielfältige lokale und systemische Wirkungen haben. Ferner produzieren Makrophagen und neutrophile Granulozyten toxische Sauerstoff- und Stickstoffderivate, denen eine wichtige Funktion im Rahmen der Zerstörung von Pathogenen zukommt. ([53] S. 18-19; [33] S. 511-512; [41] S. 541-542; [61] S. 589; [38] S. 42-46)

Zu den löslichen Mittlersubstanzen des angeborenen Immunsystems gehören auch die Interferone (IFN). Diese Proteine werden bei einer Virusinfektion von Zellen produziert und hemmen die Virusreplikation. ([38] S. 86-87; [53] S. 18)

Weitere Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind die natürlichen Killerzellen und die dendritischen Zellen. Die natürlichen Killerzellen lösen über eine Freisetzung von zytotoxischen Granula den programmierten Zelltod von mit Viren oder anderen Pathogenen infizierten Zellen und von Tumorzellen aus. Die dendritischen Zellen bringen phagozytierte Erreger über das Lymphsystem zu den Lymphknoten und lösen dort durch Antigenpräsentation die adaptive Immunantwort aus. ([38] S. 7, 22-23, 44, 82, 87-90; [53] S. 2)

All diesen angeborenen nichtadaptiven Abwehrmechanismen ist die unspezifische Immunantwort auf eine Infektion gemein, die unabhängig vom einzelnen Erreger nahezu immer gleich verläuft und die Krankheitserreger entweder sofort zu vernichten vermag oder diese in Schach hält, bis die erworbene adaptive Immunantwort einsetzt. Die natürliche Immunität besitzt kein immunologisches Gedächtnis und führt auch nicht zur Ausbildung einer anhaltenden schützenden Immunität gegen bestimmte Erreger.

Das angeborene Immunsystem ist jedoch kein für sich alleinstehender Abwehrmechanismus in der Frühphase einer Infektion, sondern greift beispielsweise via Antigenpräsentation und Zytokinausschüttung nahtlos über in die erworbene spezifische Immunität. ([38] S. 2, 12-14, 46, 92-93, 99, 417-419; [53] S. 2)

### 1.2.2 Die Komponenten der adaptiven Immunität

Entgeht eine Infektion den angeborenen Abwehrmechanismen oder kann sie von diesen nicht vollständig unter Kontrolle gebracht werden und ist gleichzeitig eine bestimmte Antigenmenge überschritten, so wird die erworbene Immunität aktiviert. Die adaptive Immunantwort verfügt ebenso wie die natürliche Immunität über humorale und zelluläre Komponenten. ([38] S.417-419, 99-100; [1] S. 14; [53] S. 2) Die Antigene von Bakterien, Viren, anderen krankheitserregenden Organismen oder von Toxinen werden von spezifischen Rezeptoren der B-Lymphozyten erkannt und gebunden. Die B-Zellen reifen hierdurch zu Plasmazellen, welche speziell gegen das gebundene Antigen gerichtete Antikörper, sogenannte Immunglobuline (Ig), produzieren und sezernieren. Die freigesetzten Antikörper binden an die jeweiligen Antigene, welche über diese Opsonierung nun der Zerstörung durch Phagozyten oder Komplement zur Verfügung stehen. Immunglobuline können Viren und Toxine durch Antigen-Antikörper-Bindung jedoch auch direkt neutralisieren. Im Rahmen der erworbenen Immunität entwickelt der Körper gegen jedes Antigen einen ganz spezifischen Antikörper. ([53] S. 2-6; [38] S. 99-100, 127-128)

Die T-Lymphozyten besitzen ebenfalls spezifische Rezeptoren, welche Antigene jedoch nur in Kombination mit einem Molekül des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) erkennen. Diese MHC-Restriktion bedeutet, dass nur auf der Oberfläche von anderen Zellen gebundene Pathogene erkannt werden. Es gibt zwei Gruppen von T-Zellen, die sich durch die Corezeptoren CD4 und CD8 unterscheiden, welche jeweils an unterschiedliche MHC-Moleküle binden (MHC-II bzw. MHC-I) und unterschiedliche Funktionen besitzen.

CD8-T-Zellen binden mit Krankheitserregern infizierte Zellen, welche das Antigen und den MHC-I-Komplex präsentieren und töten diese ab. Sie heißen daher auch zytotoxische T-Zellen.

CD4-T-Zellen erkennen und binden Antigene, welche zusammen mit MHC-II-Molekülen von immunkompetenten Zellen präsentiert werden und aktivieren diese. B-Zellen werden zur Antikörperproduktion angeregt und Makrophagen zur Zerstörung des inkorporierten Pathogens. Man nennt die CD4-T-Zellen daher auch T-Helfer-Zellen.

Lymphozyten können ebenfalls Zytokine freisetzen, welche die Immunantwort modulieren. ([53] S. 4, 10-18; [38] S. 100, 112, 115-118, 127-128)

Neben der Erregerspezifität ist die erworbene Immunität durch ein immunologisches Gedächtnis und eine anhaltende Immunität gekennzeichnet. ([38] S. 99-100, 127-128; [1] S. 14)

## 1.3 Die zentrale Rolle der Makrophagen in der Funktion des Immunsystems

Wie bereits aus dem kurzen Überblick in Kapitel 1.2 ersichtlich ist, spielen die Makrophagen nicht nur eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunität, sondern sind auch als antigenpräsentierende Zellen und Effektorzellen für die Aktivierung und Funktion der adaptiven Immunität unerlässlich und nehmen daher für ein adäquates Reaktionsvermögen des Immunsystems eine zentrale Rolle ein. Makrophagen werden jedoch nicht nur im Rahmen von Infektionen aktiv. Auch bei Entzündungen und Traumen sind sie für einen geregelten Heilungsprozess unerlässlich, und schließlich kommt ihnen auch eine zentrale Rolle bei der Bekämpfung von Tumorzellen und bei der Beseitigung von alten und abgestorbenen Zellen, sowie von Zellbestandteilen zu. ([22] S. 1; [2] S. 637, 646-650; [53] S. 18; [29] S. 942; [58] S. 376)

Einige der vielfältigen Effektormechanismen, die sowohl bei der natürlichen, als auch bei der erworbenen Immunität grundsätzlich die gleichen sind, werden im Folgenden kurz dargestellt.

### 1.3.1 Die Phagozytose

Neben den polymorphkernigen Leukozyten (neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten) gehören auch die Makrophagen und die Monozyten zu den „professionellen“ phagozytierenden Zellen des menschlichen Immunsystems. Makrophagen sind ortsständige „Freßzellen“, die von den im Blut zirkulierenden Monozyten abstammen, welche nach einer gewissen Zeit in die meisten Gewebe und Organe einwandern und zu Makrophagen reifen. So kleiden Makrophagen die Sinusoide der Leber und Milz aus und sind beispielsweise in den Alveolen, der Pleura, dem Peritoneum, der Synovialmembran der Gelenke, dem Bindegewebe der Haut, der Submukosa des Gastrointestinaltraktes und als Mikroglia im Gehirn zu finden. ([29] S. 941-942; [24] S. 1015-1017; [38] S. 42; [22] S. 1; [2] S. 637-638)

Makrophagen nehmen nicht nur Pathogene auf, sondern beseitigen auch täglich körpereigene alte und tote Zellen und Zellbestandteile. So „verspeisen“ sie beispielsweise die ausgestoßenen Zellkerne von reifenden roten Blutkörperchen, beseitigen alte Erythrozyten, neutrophile Granulozyten und Plasmazellen und kommen somit ihrer „Reinigungsfunktion“ (*scavenger function*) nach. ([29] S. 941-942; [2] S. 637)

Mit Hilfe verschiedenener Oberflächenmoleküle können Makrophagen die zu phagozytierenden Partikel erkennen. Erst die Bindung an spezielle Rezeptoren aktiviert die Makrophagen, wie auch die anderen Phagozyten, zur Phagozytose. Von der Vielzahl der Rezeptoren, die auf Makrophagen zu finden sind, konnten bisher nur einige als für die Phagozytose relevant identifiziert werden. ([2] S. 638-641, 645-646; [29] S. 942)

Mit Hilfe des Mannoserezeptors, des Scavenger-Rezeptors und des Rezeptors für Lipopolysaccharide können beispielsweise Bestandteile der Oberflächenstruktur von Mikroorganismen erkannt und gebunden werden. Die so fixierten Pathogene können dann direkt phagozytiert werden. ([29] S. 942-946; [2] S. 640-641, 645-646; [38] S. 42-43, 68-73)

Fresszellen vermögen aber auch Bakterien die dieser Erkennung entgehen, sowie Viren und Toxine zu internalisieren, wenn diese von Antikörpern gebunden wurden. Die gebundenen Antikörper können von Fc-Rezeptoren, vor allem Rezeptoren für IgG-Immunglobuline, auf der Makrophagenoberfläche erkannt werden. Über die Fc-Rezeptoren wird nicht nur die Phagozytose vermittelt, einige von ihnen lösen auch die Produktion und Sekretion von Tumornekrosefaktor- $\alpha$  und Superoxidanionen aus. ([38] S. 367-368; [29] S. 942-946; [2] S. 641, 645-646)

Eine weitere Rezeptorenart der Makrophagen, die Komplementrezeptoren, vermögen mit Komplementproteinen opsonierte Pathogene zu erkennen und zu binden. Komplementrezeptoren werden auch mit weiteren Funktionen in Zusammenhang gebracht, so etwa mit der Diapedese und mit der Ansammlung von immunkompetenten Zellen am Entzündungsherd. ([29] S. 942-946; [38] S. 42-43, 368; [2] S. 641, 645-646)

Der Vorgang der Phagozytose ist durch eine „reißverschlussartige“ sukzessive Bindung der Makrophagenrezeptoren an die entsprechenden Liganden gekennzeichnet („Zipper - Mechanismus“), wobei die Makrophagenplasmamembran das aufzunehmende Partikel mit Pseudopodien umfließt, welche sich schließlich berühren und miteinander verschmelzen. Das phagozytierte Partikel befindet sich nun in einem zytoplasmatischen Vesikel, dem sogenannten Phagosom, dessen Wand von Plasmamembrananteilen gebildet wird. ([29] S. 948-949, 953-954; [24] S. 1026; [2] S. 645; [38] S. 43)

Die Phagozytose ist von zwei Komponenten abhängig. Erstens müssen auf der Makrophagenoberfläche mehrere ungebundene Rezeptoren (zum Beispiel Fc $\gamma$ -Rezeptoren) vorhanden sein, welche auf die, dem zu phagozytierenden Partikel hinweisende Membranseite ausgerichtet sein müssen. Hierzu haben die ungebundenen Rezeptoren die Fähigkeit entlang der Plasmamembran zu wandern („laterale Rezeptormobilität“), bis sie in Bereiche hoher Ligandendichte gelangen. Als zweite Voraussetzung, müssen die Liganden (beispielsweise IgG) auf dem zu phagozytierenden Partikel über die gesamte Oberfläche verteilt sein. Ist zum Beispiel nur eine Hemisphäre mit Liganden bedeckt, so kann die Makrophagenplasmamembran das Partikel auch nur zur Hälfte umfließen. ([29] S. 948-949)

Das gebildete Phagosom kann nun mit einem oder mehreren Lysosomen zum Phagolysosom verschmelzen, welches nun die lysosomalen Enzyme enthält und das aufgenommene Partikel verdauen kann. Zu den toxischen Agentien der Makrophagen zählen neben den lysosomalen Enzymen (Lysozym, saure Hydrolasen) auch antimikrobielle Peptide (Defensine, kationische Proteine), eine intravesikuläre Ansäuerung und die Produktion von Sauerstoffderivaten (Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid, Singulett-Sauerstoff, Hydroxylradikale), Stickstoffoxiden und Peroxynitriten. Dieselben toxischen Abwehrmechanismen können Phagozyten auch dann einsetzen, wenn die zu vernichtenden Partikel (z.B. parasitische Würmer oder Tumorzellen) zu groß sind, um aufgenommen werden zu können. In diesem Fall verschmelzen die Lysosomen mit der Phagozytenplasmamembran auf der, dem Pathogen zugewandten Seite im Sinne einer Sekretion. Die toxischen Substanzen kommen somit fast unverdünnt mit der Oberfläche des zu vernichtenden Objektes in Kontakt und können ihre Wirkung voll entfalten. Auch dieser Vorgang ist rezeptorvermittelt und wird durch die Bindung des zu zerstörenden Pathogens an die Oberflächenrezeptoren der Phagozyten ausgelöst. ([38] S. 43, 360-361; [29] S. 948-949; [24] S. 1026; [40] S. 1257-1259; [33] S. 511-517, 521-527; [41] S. 541-569; [2] S. 641-650)

### 1.3.2 Von Makrophagen freigesetzte Zytokine

Neben der direkten Pathogenvernichtung, ist es auch eine wichtige Aufgabe der Makrophagen, weitere phagozytische Zellen und Effektormoleküle zum Entzündungsherd zu locken und damit die Immunantwort zu verstärken. Zu diesem Zweck produzieren aktivierte Makrophagen eine Reihe von Zytokinen. Diese sind eine strukturell sehr inhomogene Gruppe von Molekülen, die oft auch Monokine genannt werden, da sie von der Monozyten-Makrophagen-Linie synthetisiert werden. Zu den wichtigsten Monokinen zählen eine Reihe von Interleukinen (IL-1, IL-6, IL-8 und IL-12) und der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Sie lösen eine Vielzahl lokaler Effekte aus, zu denen eine Aktivierung der Lymphozyten, die chemotaktische Anlockung neutrophiler Granulozyten, eine Aktivierung des Gefäßendothels und die Permeabilitätssteigerung der Gefäßwand, sowie die lokale Zerstörung von Gewebe für einen verbesserten Zugang von Effektorzellen zählen. Neben den lokalen Effekten üben die Zytokine auch systemische Wirkungen aus. So rufen sie Fieber hervor, mobilisieren Metabolite und regen die Leber zur Produktion von Proteinen der akuten Phase an. ([38] S. 13, 44-45, 74-78, 83-86; [2] S. 641-643; [24] S. 1019-1021, 1023)

Die hier genannten Monokine machen nur einen kleinen Teil der menschlichen Zytokine aus und stellen auch nur einen Bruchteil der proinflammatorischen Faktoren dar, die auf vielfältige Weise miteinander interagieren und sich zum Teil auch selbst regulieren. Die Zytokinwirkungen sind unspezifische Abwehrmechanismen, die nicht nur der Kontrolle einer Infektion dienen, sondern generell bei Entzündungen freigesetzt werden. ([22] S. 1; [10] S. 532)

Die Wirkung, Wechselwirkung und Regulierung der proinflammatorischen Faktoren sind noch immer Gegenstand der Forschung. Auf all diese Faktoren hier näher einzugehen, würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Als Beispiel der komplexen Wirkungsweise der Zytokine sei jedoch die Funktion des Tumornekrosefaktors- $\alpha$  kurz dargestellt, insbesondere auch wegen seiner Bedeutung bei der später noch dargestellten Plasmadestabilisierung.

### 1.3.3 Der Tumornekrosefaktor- $\alpha$

Eine der wichtigsten lokalen Wirkungen des Tumornekrosefaktors- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) stellt wohl die Auslösung einer Entzündungsreaktion mit ihren klassischen Symptomen dar.

Durch eine Aktivierung des Gefäßendothels mit folgender Gefäßerweiterung kommt es zu einer gesteigerten Durchblutung und somit zu einer Rötung und Erwärmung des Gewebes (Rubor und Calor). Eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität verbunden mit dem Austreten von Flüssigkeit, Plasmaproteinen, Antikörpern und Komplementproteinen, führen zu einer Gewebeschwellung und zu Schmerzen (Tumor und Dolor) und damit zu einer eingeschränkten Funktion (Functio laesa). ([38] S. 13-14, 45, 82; [22] S.1)

Darüberhinaus induziert TNF- $\alpha$  in Endothelzellen die Expression sogenannter Adhäsionsmoleküle, so dass sich im Blut zirkulierende Entzündungszellen an das Endothel anheften können und deren Extravasation ermöglicht wird. Für die Adhäsion, die Diapedese und die Wanderung der Zellen durch das Gewebe zum

Infektionsherd sind auch bestimmte chemotaktische Zytokine, die sogenannten Chemokine erforderlich, welche außer von Makrophagen auch von anderen Zellen gebildet werden. ([38] S 74-78; [10] S. 532-533, 535-536)

TNF- $\alpha$  leitet, ebenfalls über molekulare Veränderungen auf der Oberfläche von Endothelzellen, die Anheftung von Thrombozyten an der Gefäßwand und die Auslösung einer lokalen Gerinnung ein. Durch den Verschluss der kleinen Blutgefäße wird verhindert, dass Erreger in den Blutstrom gelangen und zu einer Sepsis führen. Statt dessen werden die Pathogene via Lymphdrainage der sich im Gewebe angesammelten Flüssigkeit zu den regionalen Lymphknoten transportiert, wo sie die adaptive Immunität aktivieren können. ([38] S. 82-83; [10] S. 532-533; [42] S. 1093)

Die eben ausgeführten TNF- $\alpha$ -vermittelten Wirkungen sind nur ein Teil des Wirkspektrums und entstehen meist durch das Zusammenwirken mit anderen Zytokinen, vor allem dem Interleukin-1 (IL-1). TNF- $\alpha$  und IL-1 sind dabei zumeist Synergisten.

Diese beiden Zytokine sind beispielsweise auch für die Induktion proinflammatorischer Faktoren wie zum Beispiel Prostaglandine, Thromboxane, Leukotriene und des *platelet activating factor* (PAF), die im Zuge einer Entzündung gebildet werden, und für die Induktion von Hitzeschockproteinen verantwortlich.

TNF- $\alpha$  und IL-1 tragen durch Stimulierung von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und nicht phagozytischen Zellen, auch zur Produktion freier Radikale und reaktiver Sauerstoffmoleküle bei. ([10] S. 532-534; [58] S. 378-379; [20] S.297)

#### **1.3.4 Von Makrophagen freigesetzte reaktive Sauerstoffmoleküle und Stickstoffoxide**

Neben immunmodulierenden Substanzen wie den Zytokinen produzieren Makrophagen auch Substanzen, welche der direkten Pathogenabwehr dienen. Zu diesen Stoffen zählen die reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffderivate. Es hat sich gezeigt, dass diese Oxidantien nicht nur im Rahmen der Infektabwehr einen wichtigen Beitrag zur Keimabtötung leisten, sondern ebenso eine wesentliche Rolle bei der Bekämpfung von Tumorzellen besitzen. Sie sind in der Lage Proteine, Lipide, Lipoproteine, Polysaccharide und Nukleinsäuren zu oxidieren. Ferner werden ihnen chemotaktische und permeabilitätssteigernde und somit proinflammatorische Wirkungen sowie prokoagulatorische und fibrinolytische Eigenschaften zugesprochen. ([33] S. 511-512, 530-531; [61] S. 589; [2] S. 646-650; [30] S. 290, 292-293; [64] S. 208-211; [48] S. 253)

Sauerstoff ist thermodynamisch gesehen ein sehr reaktives Molekül und kann mit vielen Elementen und organischen Molekülen reagieren. Molekularer Sauerstoff ist jedoch sehr inert und bedarf zur Reaktion mit anderen Substanzen eines Katalysators. Wird Sauerstoff allerdings chemisch angeregt oder reduziert, entstehen hoch reaktive und toxische Produkte. Zu diesen zählen Singulett-Sauerstoff, Superoxidationen, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale. ([41] S. 541; [58] S. 376)

Von Singulett-Sauerstoff wird eine toxische Wirkung auf Mikroben angenommen. Superoxidanionen sind nukleophil, wirken reduzierend und können direkt toxisch wirken. Andererseits können sie über eine Reduktion zu den im Folgenden aufgeführten Oxidantien generieren. Die protonierte Form des Superoxidanions, das Perhydroxylradikal, ist ein vermutlich noch stärkeres Oxidans als das Superoxidanion. Das Perhydroxylradikal liegt bei niedrigeren pH-Werten vor, wie sie beispielsweise in den Phagosomen und an der Makrophagenmembran vorkommen, und kann dort direkt schädigen. Wasserstoffperoxid, dessen keimschädigende Wirkung bekannt ist, entfaltet seine toxische Wirkung hauptsächlich über das Enzym Peroxidase. Unter Verbrauch von Wasserstoffionen entstehen hierbei aus Halogenanionen, wie beispielsweise Chlorid, Säuren wie die hypochlorige Säure. Diese können sowohl über eine Halogenierung als auch über eine Oxidierung von Zielzellen bzw. Teilstrukturen des Pathogens ihre toxische Wirkung entfalten. Ferner kann Wasserstoffperoxid im Sinne eines Synergismus mit verschiedenen Proteasen zusammenwirken und deren Effektivität steigern. Hydroxylradikale gehören zu den stärksten Oxidantien. Sie sind hoch reaktiv, haben eine kurze Halbwertszeit und wirken daher in der direkten Umgebung des Entstehungsortes. ([41] S. 542-543, 545-549, 557, 562-563, 569; [2] S. 643, 646-650; [64] S. 206-208, 211-213)

Aktivierte Makrophagen produzieren auch Nitrit, Nitrat und reaktive Stickstoffmoleküle. Stickstoffmonoxid agiert im Rahmen verschiedener physiologischer Funktionen als Botenstoff. Als potenter Vasodilatator nimmt es einen wichtigen Platz in der Blutdruckregulation ein. Ferner führt es zu einer Thrombozytenaggregations- und Thrombozytenadhäsionshemmung, fungiert als Neurotransmitter und führt zu einer Relaxation und Dilatation des Gastrointestinaltraktes. ([48] S. 254, 256; [52] S. 75)

Wenn Stickstoffdioxid im Überfluss vorhanden ist, kann es zytotoxische und mutagene Effekte entwickeln. Stickstoffmonoxid ist ein kurzlebiges Gas mit Eigenschaften eines freien Radikals. Stickstoffmonoxid reagiert leicht mit Superoxidanionen und wird zu Peroxynitrit. Peroxynitrit kann selbst zytotoxisch wirken oder zu den hoch reaktiven und toxischen Hydroxylradikalen und Stickstoffdioxid zerfallen. Stickstoffmonoxid kann auch direkt zu Stickstoffdioxid oxidiert werden. Stickstoffmonoxid kann zudem mit Wasserstoffperoxid reagieren und zytotoxischen Singulett-Sauerstoff produzieren. ([52] S. 75; [48] S. 255-256; [58] S. 376)

Reaktive Stickstoffmoleküle können ihre fungistatische, antibiotische, anti-parasitäre und antineoplastische Wirkung durch eine Hemmung mitochondrialer respiratorischer Enzyme entfalten, wahrscheinlich über ein Zusammenspiel mit TNF- $\alpha$  zytotoxisch wirken und Nitrosamine bilden. Ferner kann Stickstoffdioxid zur Apoptose aktivierter Makrophagen führen. ([41] S. 569; [2] S. 643, 646-650; [48] S. 253-257; [52] S. 75)

### 1.3.5 Regulationsmechanismen der Makrophagenfunktion

Makrophagen spielen in der Wundheilung, Keimabwehr und Tumorbekämpfung eine zentrale Rolle. Mit ihren Sekretionsprodukten wie beispielsweise Zytokinen, reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffmolekülen, Proteasen und Lipiden, um nur einige zu nennen, können Makrophagen neben den gewünschten protektiven Effekten jedoch auch schädigend auf gesundes körpereigenes Gewebe wirken. So

wird am Entzündungsherd sehr oft auch eine deutliche Zellschädigung gesunder Zellen, eine starke Fibrose, eine überschießende Gewebsneubildung oder ganz generell eine massive Zerstörung und Nekrose beobachtet. ([33] S. 511-512, 524; [2] S. 637, 643, 645, 656; [10] S. 532; [43] 59-61)

Die Bildung, Ausschüttung und Wirkung der zerstörerischen Makrophagenprodukte wird auf verschiedenen Ebenen reguliert.

Erstens bedarf es zur Ausschüttung und auch zur vermehrten Bildung der Sekretionsprodukte einer adäquaten Stimulierung der Makrophagen über ganz spezielle Signale. Zweitens erfolgt die Sekretion selbst entweder in die Phagosomen oder in den dem Pathogen zugewandten Extrazellulärraum und ist somit örtlich begrenzt. Drittens wird die Produktion von immunstimulierenden Substanzen von der Produktion immunsuppressiver Substanzen im Sinne einer Gegenregulierung begleitet. Und viertens wird die Aktivität der Makrophagensekretionsprodukte durch das Vorhandensein natürlicher Inhibitoren reguliert. Zu diesen zählen auch die Antioxidantien. ([33] S. 514, 520; [2] S. 648, 651-656; [10] S. 536-539; [36] S. 1100-1101; [64] S. 220-222)

Dies bedeutet, dass eine Selbstschädigung durch vielfältige Mechanismen entstehen kann. Bei gestörter Selbsterkennung können Makrophagen ganz gezielt körpereigenes Gewebe angreifen, wenn dieses beispielsweise durch Antikörper markiert ist. Beim Zelluntergang von Makrophagen werden die Sekretionsprodukte nicht mehr zielgerichtet freigesetzt und können so umliegendes Gewebe schädigen. Ebenso kann ein Ungleichgewicht von immunstimulierenden und immunsupprimierenden Faktoren zur körpereigenen Schädigung führen. ([2] S. 656; [10] S. 532, 536-540; [36] S. 1100-1103; [43] S. 59-61)

Zu den immunstimulierenden Makrophagensekretionsprodukten zählen unter anderen die Interleukine IL-1, IL-6 und IL-8, der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  sowie die reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffderivate. ([10] S. 531-535; [36] S. 1100; [2] S. 649)

Zu den immunsuppressiven Substanzen und natürlichen Inhibitoren zählen beispielsweise die Interleukine IL-4, IL-10 und IL-13, Glukokortikoide, das Antithrombin, die Proteine der akuten Phase sowie der IL-1-Rezeptorantagonist und lösliche TNF- $\alpha$ -Rezeptoren. ([10] S. 536-539; [8] S. 1087-1091; [42] S.1095)

Zudem stellen die Hitzeschockproteine, auf die noch im Kapitel 2.3 eingegangen wird, einen Schutzmechanismus körpereigenen Gewebes am Entzündungsherd dar. Sie können Proteine vor einer Denaturierung schützen und bereits geschädigte Proteine wieder reparieren oder teilweise direkt mit Zytokinen interagieren. ([58] S. 375-387; [20] S. 303)

Eine präzise Regulierung der jeweiligen Effektormechanismen ist nicht nur für eine reibungslose Funktion, sondern auch für eine Minimierung der selbstschädigenden Wirkungen von Bedeutung. Im Rahmen der Regulierung ist auch die Individualität eines jeden Menschen von Bedeutung. So ist die Intensität einer Immunantwort von persönlichen prädisponierenden Faktoren abhängig und kann daher für verschiedene Personen auf den gleichen Reiz sehr unterschiedlich ausfallen. ([10] S. 539-540; [2] S. 653-655)

## 1.4 Der Einfluss der Makrophagensekretionsprodukte auf die Plasmadestabilisierung

Anhand von Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1 (IL-1) sowie den reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffmolekülen sollen nun noch ein paar Beispiele für eine mögliche Selbstschädigung und Plasmadestabilisierung durch Makrophagensekretionsprodukte gegeben werden.

### 1.4.1 Der Einfluss von Tumornekrosefaktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1 (IL-1) auf die Plasmadestabilisierung

Wie bereits beschrieben führt TNF- $\alpha$ , vornehmlich im Zusammenspiel mit IL-1, im Rahmen einer Infektion zu einer Gefäßdilatation, einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität und einer lokalen Gerinnung. Dies ist für die Gewährleistung einer ausreichenden Anzahl immunkompetenter Zellen am Infektionsort und eine lokale Infektbekämpfung wichtig. Kommt es zu einer Ausbreitung der Infektion im Sinne einer Sepsis, wird TNF- $\alpha$  systemisch aus den Makrophagen der Leber, Milz und aus anderen Geweben freigesetzt. Diese systemische Freisetzung bewirkt über eine generalisierte Gefäßdilatation und einen generalisierten Verlust von Blutplasma aufgrund der erhöhten Gefäßpermeabilität einen systemischen Blutdruckabfall und führt daher zum Schock. Zudem entsteht durch die vielerorts einsetzende lokale Gerinnung ein Verbrauch an Gerinnungsfaktoren, was im Sinne einer disseminierten intravasalen Gerinnung zu einer lebensbedrohlichen Komplikation des septischen Schocks führt. ([38] S. 82, [8] S. 1087; [42] S. 1093) Über das Auslösen einer lokalen Gerinnung und eine Interaktion mit der Fibrinolyse kommt es ferner zur Reduzierung der Gewebeoxygenierung. ([10] S. 533)

TNF- $\alpha$  und IL-1 leiten ferner über eine Stimulierung weiterer Entzündungsmediatoren eine Potenzierung der Entzündungsreaktion ein.

Zu den systemischen Wirkungen zählen das Entstehen von Fieber, das Umstellen der Stoffwechselsituation auf einen katabolen Stoffwechsel bei gleichzeitiger Appetitminderung und das schnellere Ausreifen der Abwehrzellen im Knochenmark. Bei einer Ausweitung der Entzündungsreaktion kann es zum sogenannten systemischen inflammatorischen Response-Syndrom (SIRS) kommen. ([43] S. 59-60; [10] S. 533; [36] S. 1101-1102)

Über Gegenregulationsmechanismen kann ein hyperinflammatorischer Zustand unter anderem über eine durch TNF- $\alpha$  und IL-1 vermittelte Stressreaktion im Zentralen Nervensystem zur Hemmung proinflammatorischer Prozesse mit Ausbildung eines kompensatorischen antiinflammatorischen Response-Syndroms (CARS) führen. Die entzündlichen Abwehrreaktionen können hierbei so stark gehemmt sein, dass man von einer „Immunparalyse“ spricht und es zu unkontrollierten Infektionen mit Gewebeschäden und Todesfolge kommen kann. ([36] S. 1102-1103)

TNF- $\alpha$  und IL-1 können als stark proinflammatorische Zytokine auch direkt zu destruierenden Prozessen führen. Durch eine Aktivierung der Osteoklasten wird die Osteolyse gefördert. Über einen gesteigerten Proteoglykanabbau induziert IL-1 Knorpelerosionen wie sie bei einer entzündlichen Arthritis vorkommen, und eine Knorpelweichung. TNF- $\alpha$  kann eine Muskelproteolyse und gleichzeitig eine

verminderte Proteinsynthese des Myosins induzieren und daher zum Muskelabbau führen. ([10] S. 533-535)

Ferner induzieren TNF- $\alpha$  und IL-1 in zahlreichen Zellen die Produktion freier Sauerstoff- und Stickstoffradikale und können so indirekt gewebeschädigend wirken. Dies zeigt sich anhand einer Hemmung des zytolytischen Effekts von TNF- $\alpha$  durch Antioxidantien. ([10] S. 534-535; [8] S. 1087; [20] S. 300-302, 304)

TNF- $\alpha$  und IL-1 spielen auch im Rahmen von Autoimmunerkrankungen eine wesentliche Rolle. So sind die Konzentrationen dieser beiden Zytokine beispielsweise bei der rheumatoiden Arthritis stark erhöht. ([43] S. 58-61)

#### 1.4.2 Der Einfluss der reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffmoleküle auf die Plasmadestabilisierung

Die reaktiven Sauerstoffmoleküle können im Rahmen von entzündlichen und ischämischen Prozessen von verschiedensten Zellen, vor allem auch von Makrophagen, gebildet werden. Ihre Produktion erfolgt aufgrund einer Stimulierung der Zellen durch Pathogene oder Zytokine. Jede Entzündungsreaktion führt zur Bildung von reaktiven Sauerstoffmolekülen und umgekehrt. ([20] S. 297; [30] S. 286-288)

Die reaktiven Sauerstoffmoleküle können durch ihre stark oxidierende Wirkung nicht nur Pathogene, sondern auch umliegendes Gewebe schädigen, indem sie Proteine, Lipide, Lipoproteine, Polysaccharide und Nukleinsäuren oxidieren. Sie können somit nicht nur zu Gewebeschäden führen, sondern auch Mutationen, eine Karzinogenese, eine Immunabwehrschwäche, verschiedene Erkrankungen und den Zelltod einleiten. Außerdem spielen sie im Rahmen von Autoimmunerkrankungen eine Rolle. ([2] S. 646, 656-657; [64] S. 208-209; [30] S. 290, 293; [43] S. 59-61)

Reaktive Sauerstoffderivate können zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA und zu Quervernetzungen (*cross-linkages*) führen. Die DNA-Schädigung kann nicht nur zu Chromosomenaberrationen, sondern auch zu onkogenen Transformationen oder direkt zum Zelltod führen. ([64] S. 209; [48] S. 253)

Reaktive Sauerstoffderivate spielen auch bei Mutationen und der Entstehung bösartiger Tumore eine Rolle. Die chronische Aufnahme größerer Mengen oxidierter Lipide wurde beispielsweise mit einer gesteigerten Tumorraten in Verbindung gebracht. Ferner können Makrophagen, welche im Rahmen der Phagozytose unter anderem auch chemische Karzinogene aufnehmen, über deren Metabolisierung zur Tumorentstehung beitragen. ([64] S. 207, 210, 213, 217; [48] S. 253; [2] S. 657)

Über eine Oxidierung ungesättigter Fettsäuren in Membranen können reaktive Sauerstoffmoleküle zu einer Permeabilitätssteigerung und Membranverflüssigung und somit zu einer Freisetzung zytoplasmatischer Bestandteile bzw. zu einer Zytolyse führen. ([10] S. 534-535)

Die Oxidierung von Aminosäuren ruft Proteinveränderungen hervor. Zu ihnen zählen auch eine erhöhte Aggregations-, Fragmentations- und Lysebereitschaft der Proteine. Enzyme können durch reaktive Sauerstoffmoleküle sowohl inaktiviert als auch aktiviert werden. So verstärken sie zum Beispiel die Wirkung der im Rahmen der Entzündung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen freigesetzten Elastase und können so zu einem Lungenemphysem, einer Glomerulonephritis,

einer rheumatoiden Arthritis oder einem akuten Lungenversagen beitragen. Bei einer Oxidierung von Proteinen des Zytoskeletts kommt es zu einer Zerstörung der Organisation und des Zusammenhaltes der Filamente. ([10] S. 534-535; [64] S. 209-210; [30] S. 293-294; [2] S. 656)

Makrophagen spielen eine bedeutende Rolle in der Entwicklung einer Arteriosklerose. Eine Oxidierung von Lipoproteinen, wie Low-Density-Lipoproteinen (LDL), kann diesen eine immunogene Eigenschaft verleihen. Über eine Produktion von anti-LDL Autoantikörpern bilden sich Immunkomplexe mit oxidiertem und mit nicht oxidiertem LDL. Diese Immunkomplexe lagern sich sowohl in Endothelzellen als auch in subendothelialen Makrophagen ab. Makrophagen nehmen die oxidierten LDL-Moleküle unkontrolliert auf und werden zu den sogenannten Schaumzellen. Die Schaumzellen sezernieren wiederum Zytokine, führen zu einer chronischen Entzündung und tragen somit zur Entstehung atheromatöser Plaques bei. ([30] S. 293; [2] S. 656-657)

Auch an den negativen Folgen einer Ischämie und postischämischen Reperfusion sind reaktive Sauerstoffderivate beteiligt. Im Rahmen der Ischämie kommt es zu Enzymveränderungen, welche bei einer Gewebereoxigenierung zu einer massiven Produktion von Sauerstoffradikalen führen. Das bereits ischämisch vorgeschädigte Gewebe wird hierdurch zusätzlich angegriffen. ([30] S. 287, 290-291; [64] S. 208, 217)

Reaktive Sauerstoffmoleküle sind auch am Prozess der Alterung beteiligt. Die mitochondriale Produktion von Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid nimmt mit dem Alter zu und korrespondiert mit den alterungsbedingten oxidativen Zellschäden. ([64] S. 205, 208, 219-220; [30] S. 287)

Zudem konnte gezeigt werden, dass die Produktion reaktiver Sauerstoffmoleküle auch durch ionisierende Strahlung, Röntgenstrahlung und UV-Strahlung, und auch durch einige Medikamente provoziert wird und diese Strahlen und Medikamente so ihre schädigende Wirkung bzw. Nebenwirkung entfalten können. Ebenso können einige Luftschadstoffe wie zum Beispiel Ozon, Stickstoffdioxid, Zigarettenrauch und Asbest durch die Freisetzung reaktiver Sauerstoffmoleküle pathogen wirken. Über die Beziehung von Zigarettenrauch und Freisetzung von reaktiven Sauerstoffprodukten lassen sich auch die bekannten Folgeerkrankungen des Zigarettenkonsums wie etwa Lungenerkrankungen, Lungenkrebs, koronare Herzerkrankung und periphere Arteriosklerose erklären. ([30] S. 290-291; [64] S. 208, 218)

Bei neurologischen Erkrankungen wie zum Beispiel Demenz, Alzheimer- oder Parkinson-Erkrankung wird eine Beteiligung reaktiver Sauerstoffmoleküle diskutiert. Auch beim Diabetes mellitus gibt es Hinweise für eine durch Sauerstoffradikale vermittelte Zerstörung der Inselzellen aufgrund immunologischer Prozesse. ([64] S. 218-219; [58] S. 383)

Neben den reaktiven Sauerstoffmolekülen kommen auch den reaktiven Stickstoffmolekülen wirtsschädigende Wirkungen zu. So kann Peroxynitrit Sulfhydrylgruppen und Membranlipide oxidieren, während Stickstoffdioxid zu DNA-Schäden führen kann. ([48] S. 253, 256)

Stickstoffoxidbildung wurde mit der Neurotoxizität von Glutamat, der Pankreas-B-Zell-Zerstörung durch IL-1, dem Hypotonus von mit TNF oder Interleukin behandelten Patienten und dem Hypotonus von Patienten mit Endotoxinschock in

Zusammenhang gebracht. Ferner kann Stickstoffoxid zur Apoptose aktivierter Makrophagen führen. ([48] S. 254, 256)

Mit Lipopolysacchariden und Zytokinen aktivierte Makrophagen produzieren Nitrit, Nitrat und reaktive Stickstoffmoleküle. Aminosäuren können durch reaktive Stickstoffderivate unter Sauerstoffverbrauch zu Nitrosaminen umgewandelt werden. Hierbei wird zuerst Stickstoffmonoxid zu Stickstoffdioxid umgewandelt, welches mit den stark nitrierenden Distickstofftrioxid und Distickstofftetroxid im Gleichgewicht steht. Diese wiederum können Aminosäuren unter physiologischen Bedingungen zu Nitrosaminen umwandeln. Die karzinogene Wirkung von Nitrosaminen ist bekannt. ([48] S. 253, 256-257)

Im Rahmen bakterieller, parasitärer und viraler Infektionen wurde bei Patienten eine erhöhte Ausscheidung von Nitrat und Nitrosaminosäuren im Urin gefunden, was auf eine erhöhte Produktion von reaktiven Stickstoffderivaten und Nitrosaminen zurückzuführen ist. Aufgrund der bekannten karzinogenen Wirkung der Nitrosamine könnte dies den Zusammenhang zwischen chronischen Infektionen und einer Tumorentstehung darstellen. So sind unter anderen bei einer chronischen Virushepatitis ein erhöhtes Risiko eines hepatozellulären Karzinoms, bei einer Helicobacter pylori-Infektion ein erhöhtes Risiko für ein Magenkarzinom und bei einer humanen Papilloma-Virus-Infektion ein erhöhtes Risiko eines Zervixkarzinoms bekannt. Ebenso ist das Karzinomrisiko bei Leberzirrhose-Patienten erhöht, was sich durch eine chronische Leberentzündung erklären lässt. ([48] S. 254, 257-260)

Stickstoffoxide können die DNA durch Strangbrüche und Deaminierungen schädigen und haben eine mutagene und genozide Wirkung. ([48] S. 260)

Eine übermäßige Produktion von Stickstoffoxiden führt ferner über eine Hemmung der Lymphozytenproliferation zu einer Immunsuppression. ([48] S. 260)

Aufgrund der starken Wirkung auf den Blutdruck wird ein Mangel an Stickstoffmonoxid mit dem essentiellen Hypertonus in Verbindung gebracht, während die gesteigerte Stickstoffmonoxid-Produktion im Rahmen einer Sepsis zu dem fatalen Blutdruckabfall führen könnte. ([52] S. 75-76)

## 2 Problemstellung

In dem vorangehenden Kapitel sollte anhand von Beispielen dargestellt werden, wie immunologische Abwehrmechanismen nicht nur zu einer wichtigen und sinnvollen Bekämpfung und Zerstörung von Bakterien, Viren, Parasiten, neoplastischen Zellen oder Toxinen beitragen, sondern mit denselben Mechanismen auch zu einer, zum Teil erheblichen, Wirtsschädigung führen können.

Es wurde bereits mehrfach versucht über eine gezielte Hemmung einzelner toxischer Substanzen die selbstschädigende Wirkung einzugrenzen oder aufzuheben. So konnte über eine Enzymhemmung (Zyanid/ Peroxidase; N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-Arginin/NO-Synthase) die Generierung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffmoleküle gehemmt werden oder die Wirkung aggressiver Moleküle durch Antioxidantien oder „Substrat-Fänger“ (anti-TNF- $\alpha$  Antikörper/TNF- $\alpha$ ; Superoxid-Dismutase/Superoxidanion; Katalase/Wasserstoffperoxid; L-Ascorbat/NO) neutralisiert werden.

Zumeist musste jedoch erkannt werden, dass mit einer Hemmung aggressiver Moleküle zwar die durch sie ausgelöste Zerstörung eingegrenzt oder verhindert werden konnte, dass aber im Gegenzug eine Immunsuppression resultierte. Je nach Ausprägung der Immunsuppression und je nach primär vorhandenem Pathogen konnte es daher trotzdem zu einer Wirtsschädigung (Superinfektion, Immunparalyse, Karzinomentstehung) kommen. ([41] S. 542-543, 549; [64] S. 220; [48] S. 256-257, 260; [52] S. 75; [36] S. 1102-1103)

Thema dieser Arbeit ist die Frage, inwieweit körpereigenes Gewebe oder körpereigene Strukturen vor schädigenden Einflüssen mittels protektiver Substanzen geschützt werden können.

Als zu schädigende Struktur wurde ein Enzym (Lactatdehydrogenase) gewählt, da Proteine leicht zu denaturieren sind und bei Enzymen eine Denaturierung des aktiven Zentrums über eine Messung der zu katalysierenden Reaktion gut nachweisbar ist. ([45] S. 173)

Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über biochemische Besonderheiten von Proteinen und insbesondere Enzymen gegeben werden.

### 2.1 Biochemische Besonderheiten von Enzymen

Ein Enzym wirkt als Katalysator bei einer chemischen Reaktion in biologischen Systemen und beschleunigt die Substratumsetzung. Hierzu werden die Substratmoleküle an das sogenannte aktive Zentrum gebunden. Das aktive Zentrum befindet sich häufig in einer Vertiefung an der Enzymoberfläche und besitzt funktionelle Gruppen, welche mit dem Substrat interagieren, indem eine Kombination aus Wasserstoffbindungen, ionischen Bindungen und van der Waals-Kräften gebildet wird. Enzyme sind reaktions- und gruppenspezifisch, das heißt, ein Enzym katalysiert nur sehr wenige Reaktionen, oft nur eine Reaktion, und reagiert mit bestimmten chemischen Gruppierungen eines Moleküls. Die Spezifität eines

Enzyms wird über die Größe und Form des aktiven Zentrums bestimmt, sprich von den dort angesiedelten Aminosäureresten. Abbildung 1 zeigt das aktive Zentrum des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Enzyms Lactatdehydrogenase. Die Katalyse entsteht über eine Beeinflussung der Löslichkeit und des elektrostatischen Umfelds sowie über eine Erleichterung der Neuordnung kovalenter Bindungen und des Protonentransfers im Bereich des reaktiven Zentrums. ([45] S. 160,163,167-168; [56] S. 91, 93-94; [39] S. 219; [21] S. 8031; [27] S. 1079; [34] S. 6278; [63] S. 905; [13] S. 892; [55] S. 1-3)

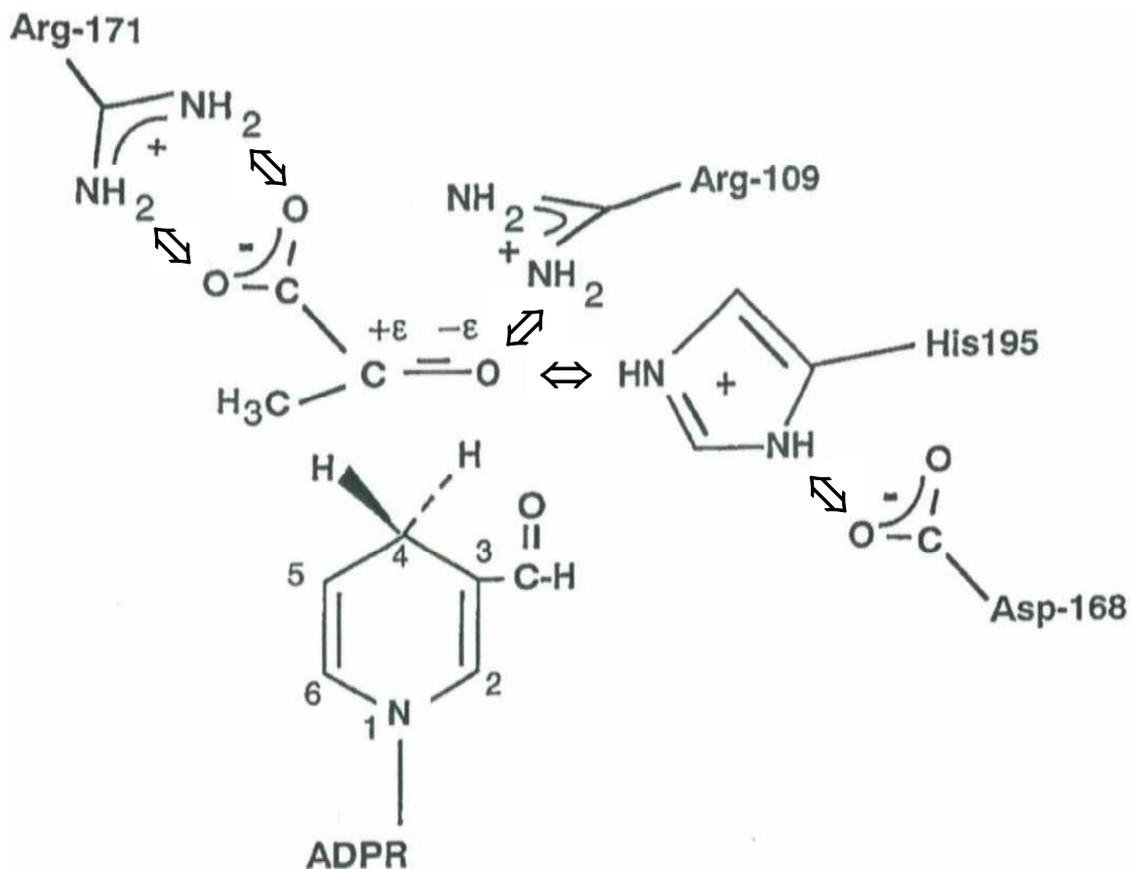


Abbildung 1: Das aktive Zentrum von LDH ([15] S. 187)

Die dreidimensionale Struktur eines Proteins entsteht über Faltungsprozesse und wird von seiner Aminosäuresequenz bestimmt. Da das Enzym trotz potentiell vieler verschiedener Möglichkeiten in seiner nativen Form immer in der gleichen Konformation vorliegt und diese auch bei Renaturierungsversuchen immer wieder einnimmt ist davon auszugehen, dass die native Form die thermodynamisch stabilste Form ist. ([68] S. 189-195; [47] S. 200-202, 207; [65] S. 32-34; [59] S. 19; [4] S. 1309; [19] S. 439; [5] S. 223; [55] S. 1-3)

Die über die Aminosäuresequenz festgelegte Proteinstruktur wird durch die jeweiligen Aminosäurereste über intermolekulare Wechselwirkungen realisiert. Die Funktion eines Enzyms wird jedoch nicht nur von der Konfiguration des aktiven

Zentrums, sondern indirekt auch von der Gesamtkonfiguration des Proteins bestimmt. So können elektrostatische Kräfte über eine längere Distanz wirken oder mobile Enzymschlingen mit dem aktiven Zentrum interagieren. ([68] S. 192; [47] S. 207-208; [17] S. 6235; [16] S. 12228; [57] S. 25334; [44] S. 7826; [49] S. 24758; [46] S. 1168; [3] S. 7801; [9] S. 864; [55] S. 1-11)

Die Aktivität von Enzymen kann durch die Temperatur und den pH-Wert verändert und zum Teil gesteigert werden. Enzyme besitzen jeweils ein Temperatur- und pH-Optimum, welches meist im Bereich des physiologischen Vorkommens liegt. ([45] S. 172-173; [55] S. 1-3)

## 2.2 Proteindenaturierung

Proteine können durch Einwirken von Hitze, Säure, organischen Lösungsmitteln, hohen Salzkonzentrationen, reduzierenden Agentien und Schwermetallionen denaturiert werden. Hierfür ist nicht die Aufspaltung kovalenter Bindungen, sondern eine Neuordnung der Sekundär- und Tertiärstruktur verantwortlich. Über einen Verlust der Sekundär- und Tertiärstruktur geht auch die Katalysefähigkeit des Enzyms verloren. Bei einem Enzym kann es zudem durch eine Beeinflussung des aktiven Zentrums zu einer Funktionsänderung kommen. ([45] S. 172-173; [69] S. 841; [47] S. 200; [13] S. 892; [14] S. 7997; [12] S. 699; [11] S. 249, 251)

## 2.3 Molekulare Chaperone als physiologische Proteinschutzmechanismen

Bei einer Reihe von Erkrankungen konnte als Krankheitsauslöser ein verändertes Protein gefunden werden. So ist beispielsweise bekannt, dass bei Prionenerkrankungen ein fehlgefaltetes Protein ursächlich ist, oder dass die zystische Fibrose durch Defekte an einem membrangebundenen Protein verursacht wird. ([47] S. 203-204)

Um eine regelrechte Proteinfaltung zu gewährleisten gibt es spezialisierte Proteine, sogenannte molekulare Chaperone. Sie können mit teilweise gefalteten oder falsch gefalteten Proteinen interagieren und richtige Faltungswege ebnen oder eine Mikroumgebung bereitstellen, in welcher die Proteinfaltung ablaufen kann. ([47] S. 203-206; [31] S. 330-334; [69] S. 845-846)

Chaperone stabilisieren nicht nur Peptide die gerade synthetisiert werden, um ihre korrekte Faltung zu gewährleisten, sie sind auch für die Faltung einer Reihe von zellulären Proteinen nötig, die sich nicht spontan falten können. Proteine, die ungefaltet durch Membrane geschleust werden müssen, werden durch eine Bindung an Chaperone geschützt und in ungefaltetem Zustand zur Membran transportiert. ([47] S. 203-206; [60] S. 591-601; [7] S. 850-854; [51] S. 34; [31] S. 330; [18] S. 321; [28] S. 33; [26] S. 601; [37] S. 313; [32] S. 349; [25] S. 469; [66] S. 22411; [67] S. 5371; [50] S. 1033-1035)

Molekulare Chaperone oder Hitzeschockproteine sind auch in die Regulierung von Proteinen, beispielsweise von Steroidhormonrezeptoren, involviert. ([6] S. 335-344; [51] S. 34; [58] S. 382)

Den molekularen Chaperonen kommt jedoch noch eine weitere sehr wichtige Aufgabe zu. Sie sind an der Beseitigung schadhafter Proteine, an der Entwirrung

denaturierter Proteinaggregate und an der erneuten Faltung hitzegeschädigter Proteine beteiligt. Zudem können sie die Bildung unpassender Proteinaggregate verhindern, indem sie sich an Bereiche ungefalteter Polypeptide binden die reich an hydrophoben Resten sind. ([51] S. 34; [47] S. 203-206; [66] S. 22411; [67] S. 5371)

Da molekulare Chaperone bei Hitzeeinwirkung, beziehungsweise allgemein Stresseinwirkung auf Zellen vermehrt produziert werden, werden sie auch als Hitzeschockproteine oder Stressproteine bezeichnet. Ihre Produktion wird wohl durch das Vorhandensein denaturierter Proteine gesteigert. In Stresssituationen, in denen sich Proteine nicht richtig falten und aneinander lagern können, werden die Proteine an Stressproteine gebunden und hierdurch geschützt. ([69] S. 845-846; [35] S. 407-424; [54] S. 959-961; [51] S. 34-35)

Eine Entzündung geht mit einer erhöhten Produktion von Stressproteinen einher. Diese wird über Entzündungsmediatoren wie beispielsweise reaktive Sauerstoffderivate, Lipidmediatoren oder Zytokine vermittelt. Die Hitzeschockproteine können den Körper vor den toxischen Effekten dieser Entzündungsmediatoren schützen. ([58] S. 375-387; [51] S. 35)

Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft der Hitzeschockproteine mit bakteriellen Hitzeschockproteinen kommt ihnen eine erhebliche Rolle im Rahmen von Autoimmunerkrankungen zu. Über eine gestörte Selbst-Fremd-Erkennung kann sich die Immunreaktion gegen körpereigene Hitzeschockproteine richten. So wird ihnen beispielsweise eine Rolle bei der autoimmunen Arthritis, dem autoimmunen Diabetes mellitus, den autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen und dem systemischen Lupus erythematodes zugesprochen. ([51] S. 34-36; [69] S. 848-852; [62] S. 1061)

## 2.4 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu testen, ob das Enzym Lactatdehydrogenase künstlich vor einer Denaturierung geschützt werden kann. Hierzu wurde das Enzym vor der Denaturierung mit einer sogenannten protektiven Substanz inkubiert und erst danach der Denaturierung zugeführt.

Sollte ein Schutz möglich sein, so war die Idee, könnten eventuell auch andere physiologische Strukturen oder zum Beispiel Zellen vor schädigenden Einflüssen bewahrt werden, wie sie auch beispielsweise im Rahmen einer Makrophagenhyperaktivierung vorkommen können.

Unter dem Ziel der Zellprotektion wurde davon ausgegangen, dass Enzyme zu den empfindlichsten Zellbestandteilen zählen. So wollten wir für den Fall einer möglichen Zellprotektion zuerst einmal herausfinden, ob es möglich ist, die Enzyme vor schädigenden Einflüssen zu schützen. Sollte es gelingen Enzyme zu protegieren, wäre auch eine Zellprotektion diskutabel.

Für die Teildenaturierung bzw. Enzymhemmung sollten verschiedene Mechanismen getestet werden. Da sich Proteine sowohl durch Hitze als auch durch Säure leicht denaturieren lassen, wurden diese beiden Varianten gewählt. Wir entschieden uns für eine Zielhemmung von ca. 30% bis 35% der normalen Enzymaktivität, entsprechend einer Rest-Enzymaktivität von ca. 65% bis 70%. Wie in den Vorversuchen im Kapitel 3.2.3 beschrieben, konnte eine Erwärmung bei

60°C über 60 Minuten die gewünschte Enzymhemmung um etwa 35% erbringen. Für die Teildenaturierung mit einer Säure wählten wir Perchlorsäure aus. Die Konzentration einer 0,046 M Perchlorsäure wurde ebenfalls über Vorversuche ermittelt und führte zu einer Enzymhemmung von ungefähr 32%.

Die Wahl der zu testenden protektiven Substanzen (Substanz P) wurde einerseits nach physikalisch-chemischen Gesichtspunkten getroffen, andererseits wurden Substanzen gewählt, die sich bei früheren Untersuchungen als potent erwiesen hatten. Eine genaue Auflistung der getesteten Substanzen findet sich im Kapitel 3.1.1 in alphabetischer Reihenfolge. Die Substanzen wurden nicht nur einzeln verwendet, sondern zum Teil auch in Kombination getestet. Insgesamt wurden dreißig Substanzen oder Substanz-Kombinationen ausgewertet. Für die zu verwendende Konzentration der Substanz P zeigte sich, die Verdünnung betreffend, ein breites Wirkspektrum, so dass wir uns nicht auf eine einzige Konzentration beschränkten. Vielmehr wollten wir den verschiedenen wirksamen Verdünnungen Rechnung tragen und entschieden uns für ein feststehendes Verdünnungsspektrum von vier Verdünnungen ( $V1 = 1:10$ ;  $V2 = 1:10^3$ ;  $V3 = 1:10^5$ ;  $V4 = 1:10^6$ ). Die zugrunde liegende Ausgangskonzentration der Substanz P ist in den Ergebnistabellen im Anhang jeweils angeführt.

Jede zu testende Substanz P wurde sowohl im Erwärmungsversuch als auch im Perchlorsäureversuch und jeweils in den oben genannten Verdünnungen V1-V4 verwendet.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien

##### Reaktionslösung:

Zur Herstellung der Reaktionslösung (RL) wurde das „LDH opt.- in vitro Diagnostikum“ der Firma Kone (Best.-Nr. 681LD) verwendet. Gemäß der Arbeitsanleitung wurde der Inhalt einer Flasche des Enzymgemisches (Flasche 2) mit 10 ml der Pufferlösung (Flasche 1) gelöst. Die Reaktionslösung wurde entsprechend der Vorgaben über die Haltbarkeit bei einer Temperatur von +2°C bis +8°C nicht länger als 36 Stunden gelagert.

##### Kontrollserum:

Als Kontrollserum (KS) wurde „Kontrollogen L“ der Firma Behring (Best.-Nr. OTRL20) verwendet und eine Flasche „Kontrollogen L“ mit 5 ml zweifachdestilliertem Wasser gelöst. Das Kontrollserum wurde bei einer Temperatur von +2°C bis +8°C gelagert und bis zu sieben Tage verwendet.

##### Phosphatgepufferte Natriumchlorid - Lösung:

Die phosphatgepufferte Natriumchlorid - Lösung (PBS) wurde unter Verwendung des Mischgerätes durch Lösen einer Tablette der „phosphatgepufferten Natriumchlorid – Tabletten“ der Firma Sigma (Best.-Nr. P-4417) in 200 ml zweifachdestilliertem Wasser hergestellt. Dabei ergab sich eine 0,01 M Natrium- und Kalium-Phosphat-Pufferlösung mit einem pH von 7,4 (7,2-7,6), welche 0,0027 M Kaliumchlorid und 0,137 M Natriumchlorid enthielt.

##### Perchlorsäure:

Gemäß den Verdünnungsversuchen zur optimalen Hemmwirkung der Perchlorsäure wurde 1 ml der „0,33 M Perchlorsäure“ der Firma Boehringer Mannheim (Best.-Nr. 125369) mit 6,2 ml zweifachdestilliertem Wasser 1:7,2 verdünnt und somit eine 0,046 M Perchlorsäure hergestellt.

Protektive Substanz P:

Die zur Enzymprotektion verwendeten Substanzen (P) wurden zum Großteil in Reinform, zum Teil auch in Kombination getestet. Die jeweilige Substanzkonzentration ist in den jeweiligen Ergebnistabellen im Anhang mit angegeben. Dabei wurden Feststoffe mit zweifachdestilliertem Wasser gelöst und Lösungen mit zweifachdestilliertem Wasser verdünnt. Die Substanzen sind im Folgenden alphabetisch aufgelistet.

## Acetamid

Sigma (Best. Nr. A-0500), Fw 59.07

## O,O'-Bis(2 aminopropyl)polypropylenglykol 130

Fluka (Best.-Nr. 14531), Mr ~ 230

## Dextran

Sigma (Best.-Nr. D-5251), Av.Mol.Wt.Approx. 500.000

## Dextran

Sigma (Best.-Nr. D-5376), Av.Mol.Wt.Approx. 2.000.000

## Dextransulfat

Sigma (Best.-Nr. D-6001), Av.Mol.Wt. 500.000

## Diethanolamin (bis(2-Hydroxyethyl)amine)

Sigma (Best.-Nr. D-8885), Approx. 98%, Fw 105.1

## N,N'-Dimethylacetamid

Sigma (Best.-Nr. D-5511), Fw 87.12, 99+%

## 1,3-Dimethylharnstoff

Sigma (Best.-Nr. D-6254), Approx. 98%, Fw 88.11

## Dimethylsulfoxid

Sigma (Best.-Nr. D-5879), Fw 78.13, Minimum 99,5% (GC)

## Ethanolamin

Sigma (Best.-Nr. E-6133), Fw 97.54

## Ethylendiamin

Sigma (Best.-Nr. E-2126), Fw 133

## Glycerin

Merck (Best.-Nr. 104094), ca. 87%

## Harnstoff

Sigma (Best.-Nr. U-1250), Fw 60.06

## Hexamethylentetramin

Sigma (Best.-Nr. H-9642), Fw 292.3

## D-Mannit

Sigma (Best.-Nr. M-4125), Fw 182.2

## Methoxypolyethylenglykol

Sigma (Best.-Nr. M-7143), Av.Mol.Wt. 2.000

## 3-Methylpiperidin

Sigma (Best.-Nr. M-0270), Fw 99.18

- 1-Methyl-2-pyrrolidinon  
Sigma (Best.-Nr. M-6762), Fw 99.13
- Polyethylenglykol  
Merck (Best.-Nr. 819003), Av.Mol.Wt. ~ 15.000
- Polyethylenglykol  
Merck (Best.-Nr. 818892), Av.Mol.Wt. ~ 35.000
- Polyethylenglykol-Dimethylether 500  
Merck (Best.-Nr. 814171)
- Polyethylenglykol-Dimethylether 2000  
Merck (Best.-Nr. 814172)
- Polyethylenglykol-Monobutylether  
Roth (Best.-Nr. 5663.1), M ~ 300 g/mol
- Polypropylenglykol 2020  
Roth (Best.-Nr. 8426.1), M 1950-2050 g/mol
- Polyvinylalkohol 72000  
Merck (Best.-Nr. 821038)
- Polyvinylpyrrolidon  
Fluka (Best.-Nr. 81420), Mr 40.000
- Pyridin  
Sigma (Best.-Nr. P-3776), Fw 79.1, 99+%
- D-Sorbit  
Sigma (Best.-Nr. S-1876), Fw 182.2
- 1,1,3,3-Tetramethylharnstoff  
Sigma (Best.Nr. T-3875), Fw 116.2
- Triethanolamin  
Sigma (Best.-Nr. T-1377), Fw 149.2
- Triethylamin  
Sigma (Best.-Nr. T-8521), Fw 137.7

### **3.1.2 Geräte**

#### Mischgerät

Bender&Hobein, Vortex Genie 2

#### Photometer

Beckman, DU-64 Spectrophotometer (UV/VIS)

#### Pipetten

Eppendorf, 0,5 - 10 µl

Eppendorf, 10 - 100 µl

Eppendorf, 100 - 1000 µl

Labsystem, Finnpipette Digital, 200 - 1000 µl

#### Waagen

Sartorius, 0 - 1000 g

Sartorius, 0 - 200 g

Mettler, AT 250, 0 - 200 g

#### Wasserbad

Memmert, temperierbar von 0 - 100°C

### **3.1.3 Sonstige Materialien**

#### Eppendorfcups

Eppendorfcups 1,5 ml

#### Küvetten

Sarstedt, Plastikkuvetten Nr. 67742

#### Pipettenspitzen

Eppendorf, Standardtips, 100 µl

Eppendorf, Standardtips, 1000 µl

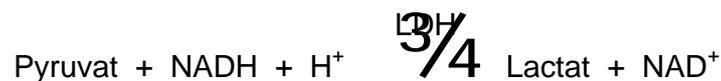
#### Reagenzgläser

Greiner, 5 ml Plastikröhrchen

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Grundprinzip der verwendeten Reaktionslösung

Das im LDH opt.- in vitro Diagnostikum enthaltene Pyruvat reagiert zusammen mit NADH und Wasserstoffionen unter Vorhandensein von LDH (Lactatdehydrogenase) zu Lactat und  $\text{NAD}^+$ .



Die Reaktionslösung dient somit dem Nachweis des Enzyms Lactatdehydrogenase in der getesteten Probe. Als Probe wurde das Kontrollserum (KS) verwendet, welches Lactatdehydrogenase enthält. Zu diesem Zweck wurden 10  $\mu\text{l}$  Probe mit 500  $\mu\text{l}$  Reaktionslösung vermischt. Die Lösung wurde in eine vortemperierte Küvette überführt und die Extinktion im Photometer bei einer Wellenlänge von 340 nm gegen Luft über sechs Minuten abgelesen. Die Extinktionsänderung pro Minute ( $\Delta E/\text{min}$ ) ist direkt proportional zur Enzymaktivität (U/l), welche sich aus dem Produkt aus Extinktionsänderung pro Minute und einer wellenlängenabhängigen Konstanten F (bei 340 nm = 4127) berechnet.

$$\text{Enzymaktivität (U/l)} = (\Delta E/\text{min}) * F$$

### 3.2.2 Versuchsaufbau

In der vorliegenden Arbeit ging es nicht um den Nachweis des Enzyms Lactatdehydrogenase, sondern um dessen Teildenaturierung und Reaktivierung. Das Substrat Pyruvat war in der verwendeten Reaktionslösung (RL) vorhanden, das Enzym Lactatdehydrogenase fand sich im verwendeten Kontrollserum (KS). Als Denaturans (D) wurde gemäß den Vorversuchen einerseits die Hitzedenaturierung durch Erwärmung 60 Minuten lang bei 60°C und andererseits die Säuredenaturierung durch 0,046M Perchlorsäure gewählt. Ziel war es, das Enzym Lactatdehydrogenase vor den schädigenden Einflüssen mit Hilfe einer zu testenden protektiven Substanz (P) zu schützen. Die Substanz P wurde jeweils in verschiedenen Verdünnungen ( $V1 = 1:10$ ,  $V2 = 1:10^3$ ,  $V3 = 1:10^5$ ,  $V4 = 1:10^6$ ) getestet.

Unter der Annahme der vielleicht verbesserten Interaktion zwischen der Lactatdehydrogenase und der protektiven Substanz wurden zu 10  $\mu\text{l}$  Kontrollserum zunächst 10  $\mu\text{l}$  Substanz P pipettiert und vermischt. Erst dann wurde das Denaturans in Form von 10  $\mu\text{l}$  Perchlorsäure bzw. Hitzeschädigung zugegeben. Um ein konstantes Endvolumen von 530  $\mu\text{l}$  zu erhalten, wurde als Füllmaterial phosphatgepufferte Natriumchloridlösung (PBS) verwendet. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Reaktionslösung (RL) gestartet. Die Probe wurde kräftig mit einer Pipette vermischt und anschließend die Extinktionsänderung pro

Minute ( $\Delta E/\text{min}$ ) in einer Plastikkuvette im Spectralphotometer bei einer Wellenlänge von 340 nm gegen Luft gemessen.

Die Enzymaktivität, gemessen als Extinktionsänderung pro Minute, war dabei der ausschlaggebende Wert für die Enzymhemmung und die Enzymreaktivierung. Die Extinktionsänderung wurde über sechs Minuten verfolgt und jeweils der Wert sofort nach Einbringung der Probe in das Photometer und der Wert nach sechs Minuten notiert. Aus den beiden gemessenen Werten wurde die Extinktionsänderung pro Minute ( $\Delta E/\text{min}$ ) berechnet.

Anzumerken ist, dass die Sofortmessung aus Gründen der Mischung und Einbringung in die Kuvette und in das Photometer mit einer Verzögerung von ca. 20 Sekunden behaftet ist.

Die Ansätze der verschiedenen Proben sind in den Pipettierschemen erläutert. Zur Eigenkontrolle wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, bei den Proben „a“ und „b“ jeweils drei identische Ansätze und bei den Proben „c“ und „d“ jeweils vier identische Ansätze hergestellt. Aus den jeweiligen Werten der Extinktionsänderung pro Minute dieser Parallelproben wurde anschließend ein Mittelwert gebildet. Bei den im Ergebnisteil und im Anhang angegebenen Werten handelt es sich jeweils um die errechneten Mittelwerte.

### Verwendete Pipettierschemen:

Für alle Versuche wurden die folgenden Pipettierschemen verwendet. Die Bezeichnung der Proben mit „a“ – „d“ entspricht der Benennung im Ergebnisteil und im Anhang.

#### Pipettierschema für die Kontrollproben:

10 $\mu\text{l}$ KS	10 $\mu\text{l}$ KS
10 $\mu\text{l}$ P	
10 $\mu\text{l}$ PBS	20 $\mu\text{l}$ PBS
500 $\mu\text{l}$ RL	500 $\mu\text{l}$ RL
<hr/>	
530 $\mu\text{l}$ <b>Probe b</b>	530 $\mu\text{l}$ <b>Probe d</b>

(KS = Kontrollserum; P = protektive Substanz; PBS = phosphatgepufferte Natriumchloridlösung; RL = Reaktionslösung)

Die Probe „b“ sollte den alleinigen Effekt der Substanz P auf die Lactatdehydrogenase demonstrieren. Die Probe „d“ stellt die Leerprobe mit normaler Reaktion der Lactatdehydrogenase dar. Die Proben „b“ und „d“ dienten jeweils dem Erwärmungsversuch und dem Säureversuch als Kontrolle.

Pipettierschema für den Erwärmungsversuch:

10 µl KS	10 µl KS
10 µl P	
10 µl PBS	20 µl PBS
D	D
500 µl RL	500 µl RL

530 µl **Probe a**

530 µl **Probe c**

(KS = Kontrollserum; P = protektive Substanz; PBS = phosphatgepufferte Natriumchloridlösung; D = Denaturans; RL = Reaktionslösung)

Die Proben „a“ und „c“ wurden beide vor Zugabe der Reaktionslösung (RL) 60 Minuten lang bei 60°C erwärmt (=D).

Die Probe „a“ soll zeigen, ob die protektive Substanz (P) in der Lage ist, die Lactatdehydrogenase vor dem Denaturans (D) zu schützen. Die Probe „c“ soll die alleinige Enzymhemmung durch das Denaturans (D) gegenüberstellen.

Pipettierschema für den Säureversuch:

10 µl KS	10 µl KS
10 µl P	
10 µl D	10 µl D
	10 µl PBS
500 µl RL	500 µl RL

530 µl **Probe a**

530 µl **Probe c**

(KS = Kontrollserum; P = protektive Substanz; PBS = phosphatgepufferte Natriumchloridlösung; D = Denaturans; RL = Reaktionslösung)

Als Denaturans (D) wurde im Säureversuch 0,046 M Perchlorsäure verwendet.

Die Probe „a“ soll wie im Pipettierschema für den Erwärmungsversuch beschrieben den möglichen Schutz der Lactatdehydrogenase durch die protektive Substanz (P) vor dem Denaturans (D) zeigen. Ebenso dient die Probe „c“ im Säureversuch wie im Erwärmungsversuch der Darstellung der Enzymhemmung durch „D“.

Aufgrund der gleichen Aussageintention wurde die Bezeichnung Probe „a“ und Probe „c“ sowohl im Erwärmungs-, als auch im Säureversuch verwendet. Um einer Verwechslung vorzubeugen werden im Ergebnisteil und im Anhang die beiden Versuche immer getrennt bezeichnet und aufgeführt.

### 3.2.3 Vorversuche

Gemäß der Arbeitsanleitung für „LDH opt. in vitro Diagnostikum“ wurden die Extinktionsabnahmen zunächst 3 Minuten lang jede Minute gemessen. Aufgrund der jedoch geringen Extinktionsabnahme innerhalb der ersten drei Minuten wurde die Messung auf sechs Minuten ausgedehnt.

Zur Vereinfachung des Versuchsablaufs wurden die Messungen auf die Sofortmessung und die Messung nach sechs Minuten reduziert. Auf die einminütige Inkubation vor der ersten Messung wurde verzichtet.

Zur Kostenreduktion wurde anfangs versucht die Reaktion mit 1:10 verdünnter Reaktionslösung zu starten. Auch hierbei zeigte sich eine nur geringe Extinktionsabnahme, sodass wieder auf die unverdünnte Reaktionslösung umgestiegen wurde.

#### Ausschluss von Fremdeinflüssen auf die Extinktion:

Um Fremdeinflüsse auf die Extinktion auszuschließen, wurden im Rahmen der Vorversuche folgende Pipettierschemen ausgetestet.

30 µl PBS 500 µl RL	10 µl P 20 µl PBS 500 µl RL	10 µl D 20 µl PBS 500 µl RL
530 µl	530 µl	530 µl

(PBS = phosphatgepufferte Natriumchloridlösung; RL = Reaktionslösung; P = protektive Substanz; D = Denaturans)

Wie angenommen konnte gezeigt werden, dass ohne Enzym (Kontrollserum=KS) keine Extinktionsänderung zu verzeichnen war. Im Rahmen der natürlichen Schwankungsbreite waren lediglich geringe Extinktionsschwankungen zwischen 0,000  $\Delta E/\text{min}$  und 0,005  $\Delta E/\text{min}$  zu vermerken.

#### Ermittlung der Verdünnungsreihe der protektiven Substanz (P):

Da bei den ersten Versuchen auffiel, dass bei purer Verwendung der Substanz P oder bei geringer Verdünnung derselben (z.B. 1:5) eine Reaktionshemmung und bei einer Verdünnung ab  $1:5 \cdot 10^4$  eine Reaktionsverstärkung auftrat, wurden im Sinne eines „Screening – Verfahrens“ für die Wirkung der protektiven Substanz die Verdünnungen  $V1 = 1:10$ ,  $V2 = 1:10^3$ ,  $V3 = 1:10^5$  und  $V4 = 1:10^6$  eingeführt.

#### Ermittlung der optimalen Hemmung durch Erwärmung:

Erste Versuche mit einer Erwärmung bei 80°C 20 Minuten lang zeigten bereits optisch eine vollständige Denaturierung mit Eiweißausflockung. Ebenso führte eine

Erwärmung von 5 Minuten bei 80°C zu einer Trübung durch Eiweißausflockung. Wie in Tabelle 1 angeführt erfolgte eine Testreihe mit 60°C 30min, 60°C 45min, 60°C 60min, 70°C 5min und 70°C 20min. Es war eine zunehmende Hemmung der Enzymaktivität ( $\Delta E/\text{min}$ ) von im Mittel 0,031  $\Delta E/\text{min}$ ; 0,030  $\Delta E/\text{min}$ ; 0,026  $\Delta E/\text{min}$ ; 0,009  $\Delta E/\text{min}$  und 0,002  $\Delta E/\text{min}$  zu verzeichnen. Es wurden jeweils zwei Parallelansätze für die „Kontrollprobe b“ und vier Parallelansätze für die „Kontrollprobe d“ durchgeführt und jeweils der Mittelwert bestimmt. Die in der Tabelle 1 angegebenen Werte entsprechen den gemittelten Werten  $\Delta E/\text{min}$ .

Da von einer ca. 30%-igen bis 35%-igen Enzymhemmung als optimale Versuchsbedingung ausgegangen wurde, schien bei einer durchschnittlichen Enzymaktivität von 0,040  $\Delta E/\text{min}$  eine Hemmung auf 0,026  $\Delta E/\text{min}$  (= 65% der normalen Enzymaktivität) sinnvoll. So wurde als Enzymhemmung mittels Erwärmung eine Erwärmung von 60 Minuten bei 60°C etabliert.

**Tabelle 1: Versuchsreihe zur optimalen Hemmung durch Erwärmung**

Temperatur Zeit	60°C 30min	60°C 45min	60°C 60min	70°C 5min	70°C 20min
Probe c [ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,031	0,030	0,026	0,009	0,002
Probe d [ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040

Probe c = Kontrollserum + Denaturans + Reaktionslösung

Probe d = Kontrollserum + Reaktionslösung

Die angegebenen Werte entsprechen den gemittelten Extinktionswerten ( $\Delta E/\text{min}$ ).

#### Ermittlung der optimalen Hemmung durch Perchlorsäure:

Wie in Tabelle 2 angeführt wurde zunächst eine Verdünnungsreihe mit 0,33 M Perchlorsäure und den Verdünnungen 1:10, 1:10<sup>2</sup>, 1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>4</sup> und 1:5\*10<sup>4</sup> hergestellt. Es konnte jedoch keinerlei Enzymhemmung festgestellt werden. Im Gegenteil wurde eine Reaktionsbeschleunigung beobachtet, welche mit zunehmender Verdünnung zunächst zunahm und dann ab einer Verdünnung von 1: 10<sup>4</sup> leicht wieder absank. Bei einer „Kontrollprobe d“ von 0,036  $\Delta E/\text{min}$  betragen die durchschnittlichen Extinktionsänderungen pro Minute 0,038; 0,043; 0,049; 0,045 und 0,043. Im Folgenden wurde die 0,33 M Perchlorsäure pur; 1:1,5; 1:2; 1:3 und 1:6 verdünnt verwendet. Bei purer Anwendung und bei der Verdünnung 1:1,5 kam es zu einer kompletten Denaturierung mit optischer Eiweißausfällung. Bei den restlichen Verdünnungen betragen die durchschnittlichen Extinktionsänderungen pro Minute 0,006; 0,006 und 0,012.

Auch bei einer Verdünnung 1:7 war die Hemmwirkung noch zu groß ( $\Delta E/\text{min}$  = 0,009). Bei der Verdünnungsreihe 1:8, 1:9 und 1:10 wurden als  $\Delta E/\text{min}$  die Werte 0,026; 0,031 und 0,031 gemittelt. Bei einer „Kontrollprobe d“ von  $\Delta E/\text{min}$  = 0,027 war hier keinerlei Hemmwirkung mehr nachweisbar. Die optimale Hemmung musste also zwischen den Verdünnungen 1:7 und 1:8 liegen. Bei den Verdünnungen 1:7,5 und 1:7,3 wurden die Werte 0,018 und 0,019 für  $\Delta E/\text{min}$  gemittelt. Für die Verdünnung 1:7,2 wurde ebenfalls der Wert  $\Delta E/\text{min}$  = 0,019 ermittelt. Die „Kontrollprobe d“ ergab für  $\Delta E/\text{min}$  = 0,028. Es wurden für die „Probe c“ jeweils zwei Parallelansätze und für die „Probe d“ jeweils vier Parallelansätze durchgeführt. Aus diesen Werten wurden die Mittelwerte berechnet und verwendet.

Die in Tabelle 2, Tabelle 3, und Tabelle 4 angegebenen Werte entsprechen daher den gemittelten Werten  $\Delta E/\text{min}$ .

Mit einer Hemmung von 32,1% bzw. einer Restenzymaktivität von 67,9% wurde die Enzymhemmung mittels 1:7,2 verdünnter 0,33 M Perchlorsäure gewählt. Dies entspricht einer 0,046 M Perchlorsäure.

**Tabelle 2: Versuchsreihe 1 zur optimalen Hemmung durch Perchlorsäure**

Verdünnung der 0,033M Perchlorsäure	1 : 10	1 : 10 <sup>2</sup>	1 : 10 <sup>3</sup>	1 : 10 <sup>4</sup>	1 : 5*10 <sup>4</sup>
Probe c [ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,038	0,043	0,049	0,045	0,043
Probe d [ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,036	0,036	0,036	0,036	0,036

Probe c = Kontrollserum + Denaturans + Reaktionslösung

Probe d = Kontrollserum + Reaktionslösung

Die angegebenen Werte entsprechen den gemittelten Extinktionswerten ( $\Delta E/\text{min}$ ).

**Tabelle 3: Versuchsreihe 2 zur optimalen Hemmung durch Perchlorsäure**

Verdünnung der 0,033M Perchlorsäure	pur	1 : 1,5	1 : 2	1 : 3	1 : 6	1 : 7	1 : 8	1 : 9	1 : 10
Probe c [ $\Delta E/\text{min}$ ]	denaturiert	0,006	0,006	0,012	0,009	0,026	0,031	0,031	0,031
Probe d [ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,034	0,034	0,034	0,034	0,034	0,027	0,027	0,027	0,027

Probe c = Kontrollserum + Denaturans + Reaktionslösung

Probe d = Kontrollserum + Reaktionslösung

Die angegebenen Werte entsprechen den gemittelten Extinktionswerten ( $\Delta E/\text{min}$ ).

**Tabelle 4: Versuchsreihe 3 zur optimalen Hemmung durch Perchlorsäure**

Verdünnung der 0,033M Perchlorsäure	1 : 7,5	1 : 7,3	1 : 7,2
Probe c [ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,018	0,019	0,019
Probe d [ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,028	0,028	0,028

Probe c = Kontrollserum + Denaturans + Reaktionslösung

Probe d = Kontrollserum + Reaktionslösung

Die angegebenen Werte entsprechen den gemittelten Extinktionswerten ( $\Delta E/\text{min}$ ).

## 4 Ergebnisse

Bei den im folgenden aufgeführten Ergebnissen und Tabellen entsprechen die Werte „a“ – „d“, wie bereits im Kapitel „3.2.2 Versuchsaufbau“ beschrieben, den gemittelten Extinktionsänderungen pro Minute für folgende Proben:

In der „Probe a“ wird das Kontrollserum (KS) mit der protektiven Substanz (P) inkubiert und danach entweder durch das Denaturans (D) = Erwärmung (60 min bei 60°C) oder durch Zusatz von „D“ = Säure (0,046M Perchlorsäure) teildenaturiert. Anschließend wird die Enzymreaktion durch Zugabe der Reaktionslösung (RL) gestartet und die Extinktionsänderung pro Minute über sechs Minuten im Spectralphotometer bei einer Wellenlänge von 340 nm gegen Luft gemessen und notiert.

$$\text{„a} = \text{KS} + \text{P} + \text{D} + \text{RL} \text{“}$$

In der „Probe b“ wird das Kontrollserum (KS) ebenfalls mit der protektiven Substanz (P) inkubiert, jedoch nicht mit einem Denaturans (D) teildenaturiert. Auch hier wird die Enzymreaktion durch Zugabe der Reaktionslösung (RL) gestartet und die Extinktionsänderung pro Minute im Spectralphotometer über sechs Minuten gemessen und notiert.

$$\text{„b} = \text{KS} + \text{P} + \text{RL} \text{“}$$

Die „Probe c“ besteht aus dem mit dem Denaturans (D) = Erwärmung (60 min bei 60°C) oder „D“ = 0,046M Perchlorsäure teildenaturierten Kontrollserum (KS). Die Enzymreaktion wird ebenfalls durch Zugabe der Reaktionslösung (RL) gestartet und wiederum die Extinktionsänderung pro Minute über sechs Minuten protokolliert.

$$\text{„c} = \text{KS} + \text{D} + \text{RL} \text{“}$$

Mit „Probe d“ ist schließlich jene Probe bezeichnet, welche nur aus Kontrollserum (KS) und Reaktionslösung (RL) besteht, und die die reine Enzymreaktion darstellt. Auch diese wird als Extinktionsänderung pro Minute über sechs Minuten dokumentiert.

$$\text{„d} = \text{KS} + \text{RL} \text{“}$$

Der Begriff Substanz P wird auch für Substanzkombinationen verwendet, sofern keine genauere Differenzierung notwendig ist.

Mit V1 - V4 sind die Verdünnungen der protektiven Substanz bezeichnet. Es wurden jeweils vier Verdünnungen mit den Konzentrationen 1:10, 1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>5</sup> und 1:10<sup>6</sup> hergestellt.

V1 = Verdünnung 1:10

V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>

V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>

V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

Die Grundkonzentration der Substanz P, welche den Verdünnungen V1 - V4 zugrunde liegt, ist bei den Ergebnistabellen im Anhang mit angegeben.

Die im Anhang angeführten Ergebnistabellen sind alphabetisch nach den verwendeten protektiven Substanzen geordnet, wobei jeweils die Ergebnisse aus dem Erwärmungs- und dem Säureversuch parallel dargestellt sind.

In den Ergebnistabellen werden nicht nur die bei den einzelnen Verdünnungen V1 - V4 gemessenen Extinktionsänderungen pro Minute mit den Werten „a“ – „d“ dokumentiert, sondern zugleich auch die für die Ergebnisauswertung relevanten Berechnungen aufgeführt.

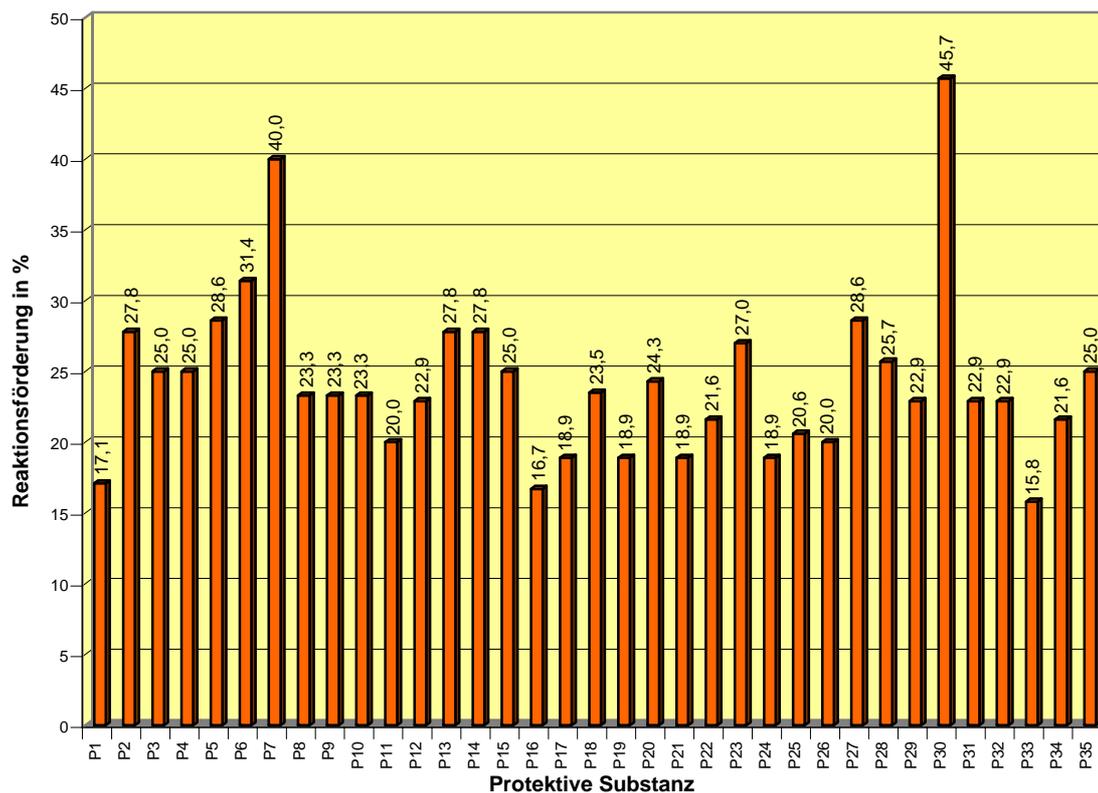
## 4.1 Der Einfluss der protektiven Substanz auf die Lactatdehydrogenaseaktivität

In dem verwendeten Versuchsaufbau repräsentiert die durch die „Probe d“ (d = Kontrollserum + Reaktionslösung) gemessene Extinktionsänderung pro Minute die normale Lactatdehydrogenaseaktivität. Mit der „Probe b“ (b = Kontrollserum + protektive Substanz + Reaktionslösung) wird die Enzymaktivität unter dem Einfluss der protektiven Substanz dargestellt.

Mit Hilfe der Formel  $(d-b) / d * 100$  lässt sich eine Reaktionsförderung beziehungsweise Reaktionsabschwächung direkt in Prozent der normalen Enzymaktivität darstellen.

### 4.1.1 Steigerung der Lactatdehydrogenaseaktivität durch die protektive Substanz

In Abbildung 2 werden all jene Substanzen mit der entsprechenden Verdünnung aufgeführt, die zu einer Steigerung der Lactatdehydrogenaseaktivität von mehr als 15% in der Lage waren. Siebzehn Substanzen mit insgesamt fünfunddreißig Verdünnungen erfüllten mit Werten zwischen 15,8% (Pyridin in V4) und 45,7% (Polyethylenglykolmonobutylether in V1) diese Bedingung. Dabei sind die verschiedenen Verdünnungen V1-V4 in etwa gleich gewichtet: V1:V2:V3:V4 = 9:7:11:8 (V1=1:10, V2=1:10<sup>3</sup>, V3=1:10<sup>5</sup>, V4=1:10<sup>6</sup>).



**Abbildung 2: Steigerung der Lactatdehydrogenaseaktivität durch die protective Substanz**

- P1 = Acetamid (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P2 = O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P3 = O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P4 = O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol (V4 = 1:10<sup>6</sup>)  
P5 = Dextran (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P6 = Dextran (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P7 = Dextran (V4 = 1:10<sup>6</sup>)  
P8 = N,N'-Dimethylacetamid (V1 = 1:10)  
P9 = N,N'-Dimethylacetamid (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P10 = N,N'-Dimethylacetamid (V4 = 1:10<sup>6</sup>)  
P11 = 1,3-Dimethylharnstoff (V1 = 1:10)  
P12 = 1,3-Dimethylharnstoff (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P13 = Ethanolamin (V1 = 1:10)  
P14 = Ethanolamin (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P15 = Ethanolamin (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P16 = Ethanolamin (V4 = 1:10<sup>6</sup>)  
P17 = Ethylendiamin (V1 = 1:10)  
P18 = Hexamethylentetramin (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P19 = D-Mannit (V1 = 1:10)  
P20 = D-Mannit (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P21 = Methoxypolyethylenglykol (V1 = 1:10)  
P22 = Methoxypolyethylenglykol (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P23 = Methoxypolyethylenglykol (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P24 = Methoxypolyethylenglykol (V4 = 1:10<sup>6</sup>)  
P25 = Polyethylenglykol MG15.000 (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P26 = Polyethylenglykoldimethylether 500 (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P27 = Polyethylenglykoldimethylether 2000 (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P28 = Polyethylenglykoldimethylether 2000 (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P29 = Polyethylenglykoldimethylether 2000 (V4 = 1:10<sup>6</sup>)  
P30 = Polyethylenglykolmonobutylether (V1 = 1:10)  
P31 = Polyethylenglykolmonobutylether (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P32 = Polyethylenglykolmonobutylether (V4 = 1:10<sup>6</sup>)  
P33 = Pyridin (V4 = 1:10<sup>6</sup>)  
P34 = D-Sorbit (V1 = 1:10)  
P35 = Triethylamin (V1 = 1:10)

#### 4.1.2 Kein Einfluß der protektiven Substanz auf die Lactatdehydrogenaseaktivität

Tabelle 5 führt jene Substanzen an, welche keinen Einfluss auf die Lactatdehydrogenaseaktivität hatten. Insgesamt konnte nur bei vier Substanzen in jeweils einer Verdünnung eine Aktivitätsänderung von 0% festgestellt werden. Alle anderen Verdünnungen derselben Substanzen hatten einen Einfluss auf die Enzymaktivität.

**Tabelle 5: Die protektive Substanz ohne Einfluss auf die Lactatdehydrogenaseaktivität**

Protektive Substanz	Aktivitätsänderung [%] (d-b)/d * 100
Dextran:Dimethylsulfoxid:Tetramethylharnstoff = 1:1:1 (V4)	0
Diethanolamin (V1)	0
Ethylendiamin (V3)	0
Hexamethylentetramin (V1)	0

V1= Verdünnung 1:10

V3= Verdünnung 1: 10<sup>5</sup>

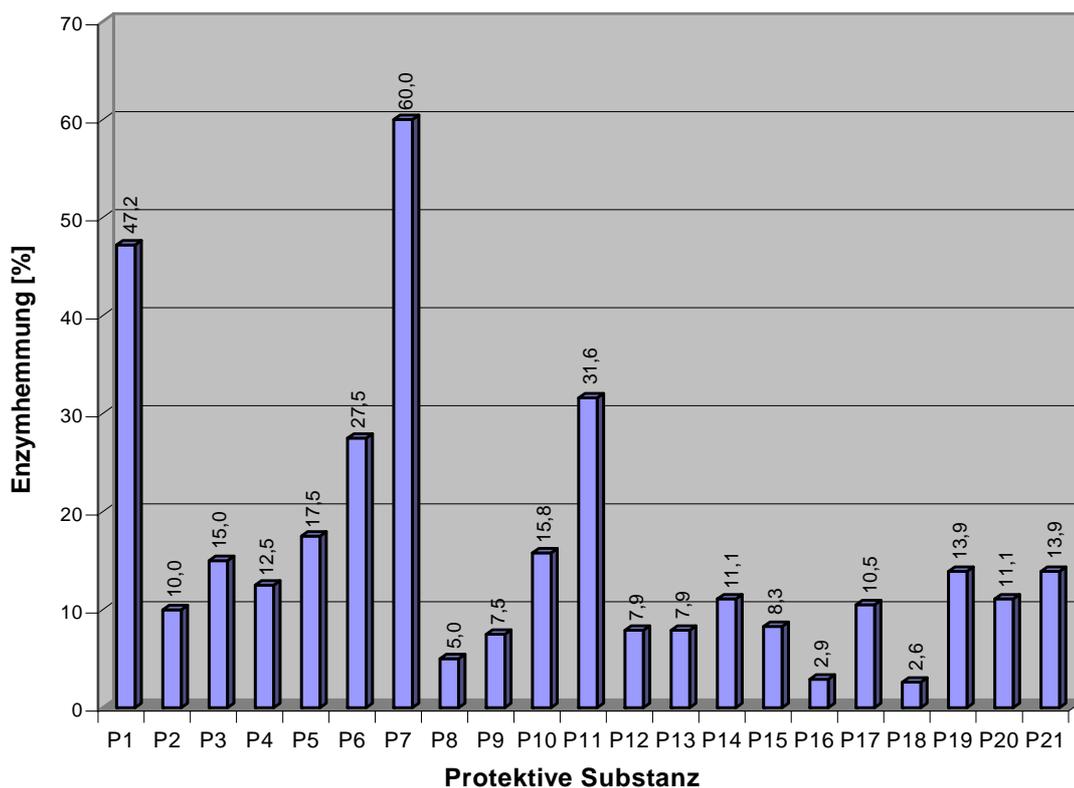
V4= Verdünnung 1: 10<sup>6</sup>

Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung

Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

#### 4.1.3 Hemmung der Lactatdehydrogenaseaktivität durch die protektive Substanz

In den Versuchen musste festgestellt werden, dass von den dreißig zur Protektion verwendeten Substanzen zehn Substanzen mit insgesamt einundzwanzig Verdünnungen einen hemmenden Einfluss zeigten. Die Hemmung der Enzymaktivität lag zwischen 2,6% (Triethanolamin in V4) und 60% (3-Methylpiperidin in V1) der normalen Lactatdehydrogenaseaktivität. In Abbildung 3 sind sämtliche Substanzen aufgeführt, die eine Reaktionsabschwächung provozierten. Auch hier konnte kein Zusammenhang mit der Verdünnung der Substanzen hergestellt werden: V1:V2:V3:V4 = 6:6:5:4 (V1=1:10, V2=1:10<sup>3</sup>, V3=1:10<sup>5</sup>, V4=1:10<sup>6</sup>).



**Abbildung 3: Hemmung der Lactatdehydrogenaseaktivität durch die protective Substanz**

- P1 = O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol (V1 = 1:10)  
P2 = N,N'-Dimethylacetamid (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P3 = Harnstoff (V1 = 1:10)  
P4 = Harnstoff (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P5 = Harnstoff (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P6 = Harnstoff (V4 = 1:10<sup>6</sup>)  
P7 = 3-Methylpiperidin (V1 = 1:10)  
P8 = 3-Methylpiperidin (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P9 = 3-Methylpiperidin (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P10 = 1-Methyl-2-pyrrolidinon (V1 = 1:10)  
P11 = 1-Methyl-2-pyrrolidinon (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P12 = 1-Methyl-2-pyrrolidinon (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P13 = 1-Methyl-2-pyrrolidinon (V4 = 1:10<sup>6</sup>)  
P14 = Polyethylenglykol MG35.000 (V1 = 1:10)  
P15 = Polyethylenglykol MG35.000 (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P16 = Polypropylenglykol (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P17 = Pyridin (V1 = 1:10)  
P18 = Triethanolamin (V4 = 1:10<sup>6</sup>)  
P19 = Triethylamin (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P20 = Triethylamin (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P21 = Triethylamin (V4 = 1:10<sup>6</sup>)

All jene Substanzen und Verdünnungen die nicht in Abbildung 2, Tabelle 5 und Abbildung 3 aufgelistet sind, hatten eine positive Wirkung auf die Lactatdehydrogenaseaktivität, welche jedoch gemessen an der normalen Enzymaktivität kleiner als 15% war.

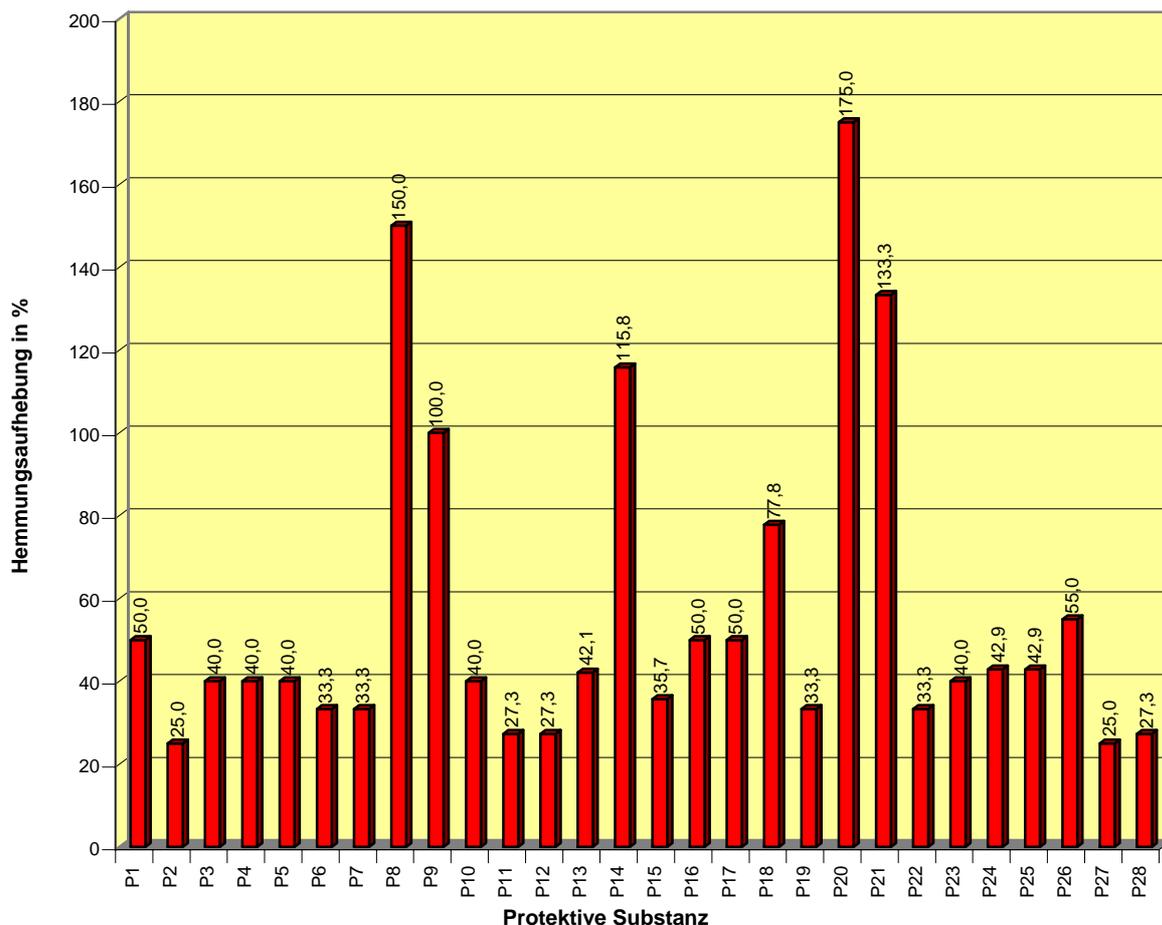
## 4.2 Der Einfluss der protektiven Substanz auf die durch ein Denaturans gehemmte Enzymaktivität

Um Hemmungsschwankungen in der Berechnung zu berücksichtigen wurden nicht die Absolutwerte verwendet, sondern die Hemmung durch das Denaturans (D) und der Einfluss der protektiven Substanz (P) in Relation zueinander gesetzt. Dies kommt in der Formel  $(a-c) / (d-c) * 100$  zum Ausdruck. Gleichzeitig lässt sich durch diese Formel die Hemmungsaufhebung bzw. auch -verstärkung durch P direkt in Prozent der durch D verursachten Enzymhemmung ausdrücken. Die in der „Probe d“ (d = Kontrollserum + Reaktionslösung) gemessene Extinktionsänderung pro Minute entspricht der normalen Lactatdehydrogenaseaktivität, während in der „Probe c“ (c = Kontrollserum + Denaturans + Reaktionslösung) die durch D abgeschwächte Enzymaktivität dargestellt wird. In der „Probe a“ (a = Kontrollserum + protektive Substanz + Denaturans + Reaktionslösung) wird schließlich jene Lactatdehydrogenaseaktivität gemessen, welche unter dem Einfluss von P und D vorhanden war. Dabei wurde das Kontrollserum zuerst mit P inkubiert und anschließend mit D teildenaturiert.

### 4.2.1 Einfluss der protektiven Substanz (P) bei Denaturans (D) = Erwärmung 60 Minuten bei 60°C

#### 4.2.1.1 Protektiver Effekt der Substanz „P“ auf die Lactatdehydrogenase

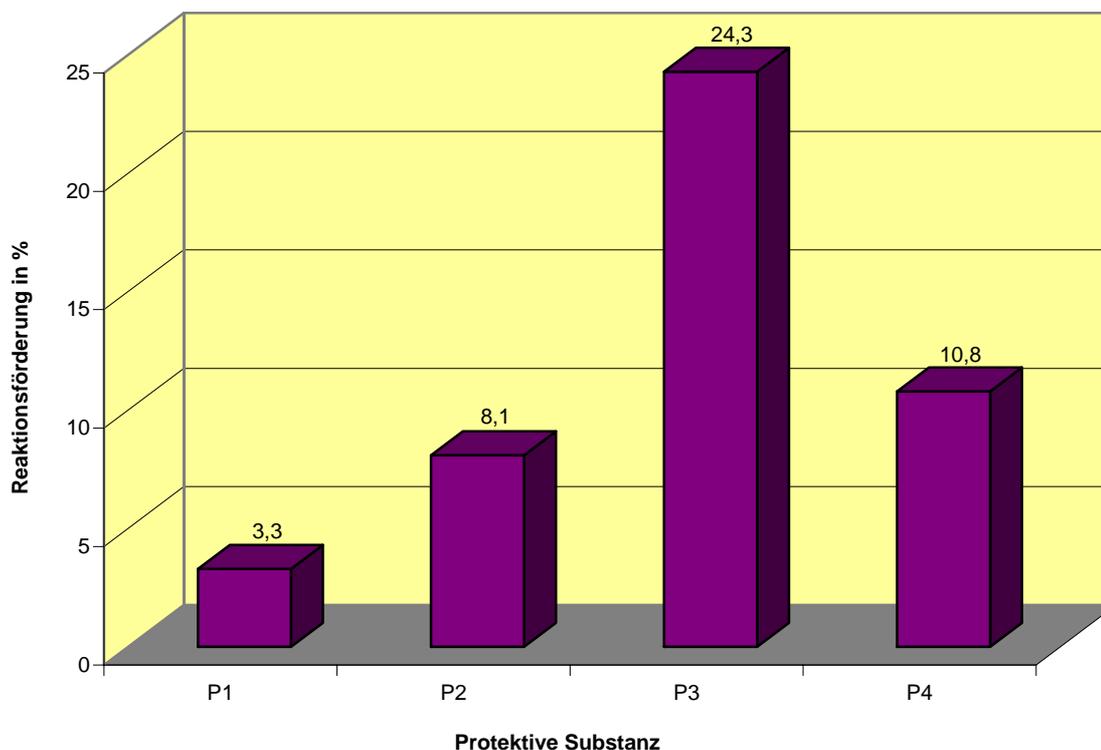
In Abbildung 4 werden alle Substanzen mit der entsprechenden Verdünnung aufgeführt, die eine Hemmungsaufhebung von 25% oder mehr verursachten. Zur Darstellung der Hemmungsaufhebung wird die Formel  $(a-c) / (d-c) * 100$  verwendet. Die Prozentangabe bezieht sich auf die durch die Erwärmung verursachte Hemmung, welche mit 100% angesetzt wird. Achtzehn Substanzen in insgesamt achtundzwanzig Verdünnungen erfüllten diese Bedingung. Bei der Hemmungsaufhebung wurden Werte zwischen 25% (Acetamid in V3 und Triethanolamin in V2) und 77,8% (D-Mannit in V2) erreicht. Drei der Substanzen konnten mit fünf Verdünnungen eine komplette Hemmungsaufhebung erzielen und die Enzymaktivität z.T. sogar noch beschleunigen. Dabei erreichte N,N'-Dimethylacetamid in einer Verdünnung von  $1:10^6$  (=V4) eine 100%-ige Hemmungsaufhebung und konnte somit den Ausgangswert bzw. Kontrollwert „d“ wiedererlangen. In der Verdünnung V2 (=  $1:10^3$ ) wurde sogar ein Wert von 150% erzielt. Die Substanz Methoxypolyethylenglykol war mit den Werten 133,3% in der Verdünnung V3 und 175% in der Verdünnung V2 ebenfalls sehr erfolgreich. Ethylendiamin führte immerhin in der Verdünnung V4 zu einer Hemmungsaufhebung von 115,8%. Die an den Ergebnissen beteiligten Verdünnungen waren wie folgt verteilt: V1:V2:V3:V4 = 3:7:11:7 (V1=1:10, V2=1:10<sup>3</sup>, V3=1:10<sup>5</sup>, V4=1:10<sup>6</sup>).



**Abbildung 4: Partielle oder komplette Aufhebung der durch Erwärmung verursachten Hemmung der Lactatdehydrogenaseaktivität mittels der protektiven Substanz**

- P1 = Acetamid (V1 = 1:10)  
P2 = Acetamid (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P3 = Dextran (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P4 = Dextran:Dimethylsulfoxid:Tetramethylharnstoff = 1:1:1 (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P5 = Dextransulfat (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P6 = Diethanolamin (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P7 = Diethanolamin (V4 = 1:10<sup>6</sup>)  
P8 = N,N'-Dimethylacetamid (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P9 = N,N'-Dimethylacetamid (V4 = 1:10<sup>6</sup>)  
P10 = N,N'-Dimethylacetamid:Tetramethylharnstoff = 1:1 (V4 = 1:10<sup>6</sup>)  
P11 = Ethanolamin (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P12 = Ethanolamin (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P13 = Ethylendiamin (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P14 = Ethylendiamin (V4 = 1:10<sup>6</sup>)  
P15 = Glycerin (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P16 = Hexamethylentetramin (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P17 = Hexamethylentetramin (V4 = 1:10<sup>6</sup>)  
P18 = D-Mannit (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P19 = D-Mannit (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P20 = Methoxypolyethylenglykol (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P21 = Methoxypolyethylenglykol (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P22 = 3-Methylpiperidin (V4 = 1:10<sup>6</sup>)  
P23 = 1-Methyl-2-pyrrolidinon (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P24 = Polyvinylpyrrolidon (V1 = 1:10)  
P25 = Polyvinylpyrrolidon (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P26 = Triethanolamin (V1 = 1:10)  
P27 = Triethanolamin (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P28 = Triethylamin (V4 = 1:10<sup>6</sup>)

Die zusätzliche Aktivitätsförderung der Lactatdehydrogenase, gemessen an der normalen Aktivität (= Probenwert „d“), wird mit der Formel  $(d-a) / d * (-100)$  in Prozent dargestellt und in Abbildung 5 angegeben. Bei den drei Substanzen mit insgesamt vier Verdünnungen ergaben sich für die Reaktionsförderung Werte von 3,3% (N,N'-Dimethylacetamid in V2) bis 24,3% (Methoxypolyethylenglykol in V2). Die einzelnen Verdünnungen waren mit  $V1:V2:V3:V4 = 0:2:1:1$  verteilt ( $V1=1:10$ ,  $V2=1:10^3$ ,  $V3=1:10^5$ ,  $V4=1:10^6$ ).



**Abbildung 5: Über die Hemmungsaufhebung hinausgehende Lactatdehydrogenaseförderung durch die protektive Substanz im Erwärmungsversuch**

- P1 = N,N'-Dimethylacetamid ( $V2 = 1:10^3$ )  
 P2 = Ethylendiamin ( $V4 = 1:10^6$ )  
 P3 = Methoxypolyethylenglykol ( $V2 = 1:10^3$ )  
 P4 = Methoxypolyethylenglykol ( $V3 = 1:10^5$ )

#### 4.2.1.2 Kein Einfluss der protektiven Substanz auf die Lactatdehydrogenasehemmung

Tabelle 6 beinhaltet jene protektive Substanzen „P“ mit ihren Verdünnungen, mit denen die durch Erwärmung verursachte Lactatdehydrogenasehemmung nicht verhindert werden konnte. Die Extinktionsänderungen pro Minute waren daher für die Proben „a“ und „c“ identisch. Gemäß der Formel  $(a-c) / (d-c) * 100$  beträgt die Aktivitätsänderung 0%. Insgesamt zehn Substanzen mit fünfzehn Verdünnungen konnten die Teildenaturierung durch Erwärmung nicht beeinflussen. Die beteiligten Verdünnungen waren mit  $V1:V2:V3:V4 = 1:3:6:5$  zugunsten der mittel- bis höhergradigen Verdünnungen verteilt ( $V1=1:10$ ,  $V2=1:10^3$ ,  $V3=1:10^5$ ,  $V4=1:10^6$ ).

**Tabelle 6: Die protektive Substanz ohne Einfluss auf die durch Erwärmung verursachte Hemmung der Lactatdehydrogenaseaktivität**

Protektive Substanz	Aktivitätsänderung [%] (a-c)/(d-c) * 100
N,N'-Dimethylacetamid : Tetramethylharnstoff = 1:1 (V3)	0
Harnstoff (V1)	0
Harnstoff (V4)	0
Hexamethylentetramin (V3)	0
3-Methylpiperidin (V2)	0
3-Methylpiperidin (V3)	0
Polyethylenglykol MG15.000 (V2)	0
Polyethylenglykoldimethylether 500 (V2)	0
Polyethylenglykoldimethylether 500 (V3)	0
Polyethylenglykoldimethylether 2000 (V3)	0
Polyethylenglykoldimethylether 2000 (V4)	0
Polyethylenglykolmonobutylether (V4)	0
Polypropylenglykol (V3)	0
Polypropylenglykol (V4)	0
D-Sorbit (V4)	0

V1=Verdünnung 1:10

V2=Verdünnung 1:10<sup>3</sup>

V3=Verdünnung 1:10<sup>5</sup>

V4=Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung

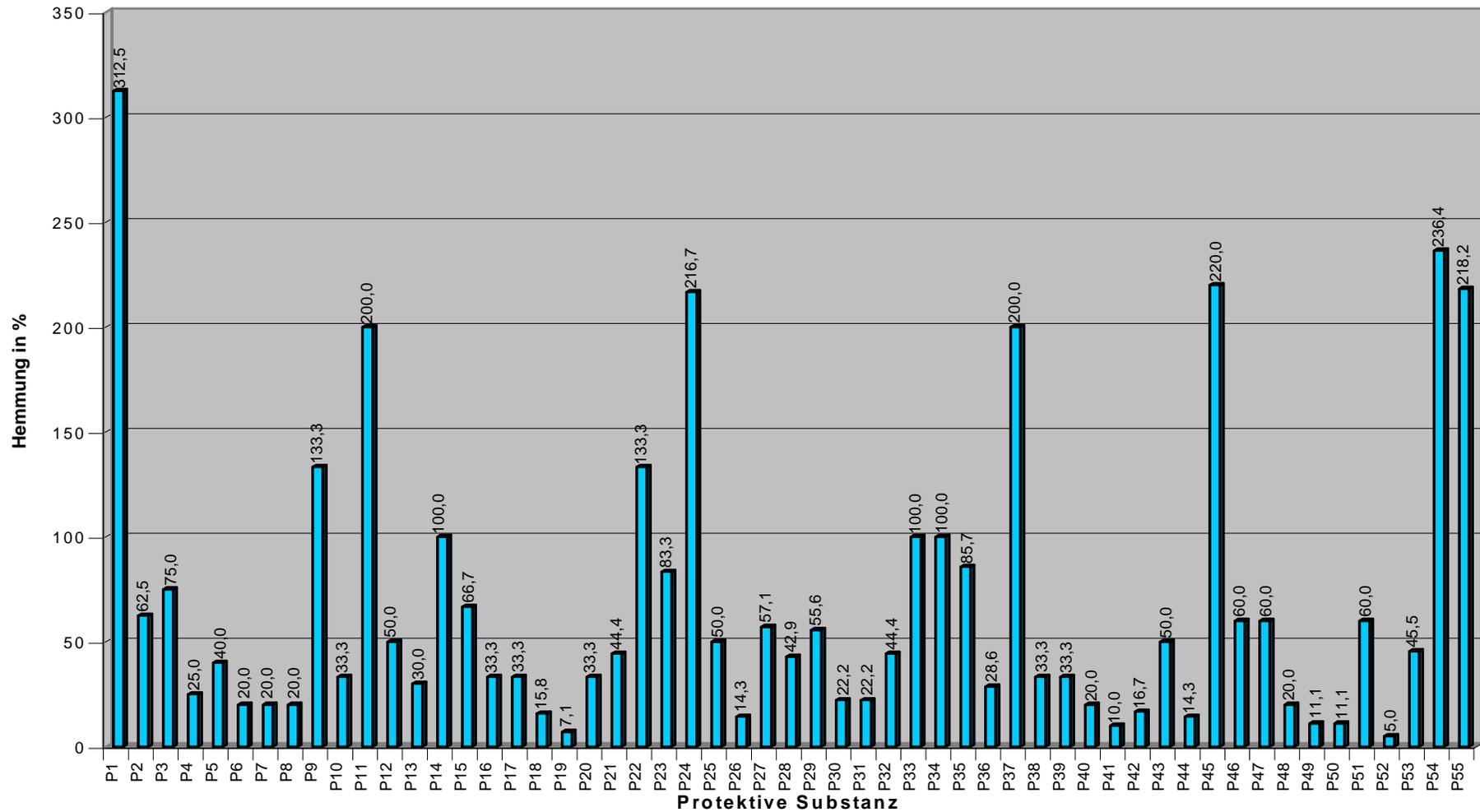
Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung

Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

#### 4.2.1.3 Hemmungsverstärkung durch Kombination der protektiven Substanz (P) und der Denaturierung durch Erwärmung (D)

Bei den Versuchen wurde nicht nur ein protektiver oder fehlender Einfluss der Substanz P auf die Lactatdehydrogenaseaktivität beobachtet, sondern ebenso eine Hemmungsverstärkung beim Zusammenwirken von P und D festgestellt. In Abbildung 6 wird dies, wiederum bezogen auf die durch das Denaturans „D“ alleine verursachte Aktivitätsminderung (= 100%), in Prozent als zusätzliche Hemmung dargestellt. Dabei wurde die Formel  $(a-c) / (d-c) * (-100)$  verwendet.

Siebenundzwanzig Substanzen mit fünfundfünfzig Verdünnungen führten zu einer Hemmungsverstärkung. Die Werte lagen zwischen 5% (Triethanolamin in V4) und 312,5% (O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol in V1) und entsprechen, wie bereits angemerkt, der zusätzlichen Hemmung. Die an der Hemmungsverstärkung beteiligten Verdünnungen waren mit V1:V2:V3:V4 = 22:11:12:10 eher zugunsten der niedriger verdünnten Proben verteilt (V1=1:10, V2=1:10<sup>3</sup>, V3=1:10<sup>5</sup>, V4=1:10<sup>6</sup>).



**Abbildung 6: Verstärkung der durch die Erwärmung hervorgerufenen Hemmung der Lactatdehydrogenaseaktivität durch die protektive Substanz**

Legende siehe nächste Seite

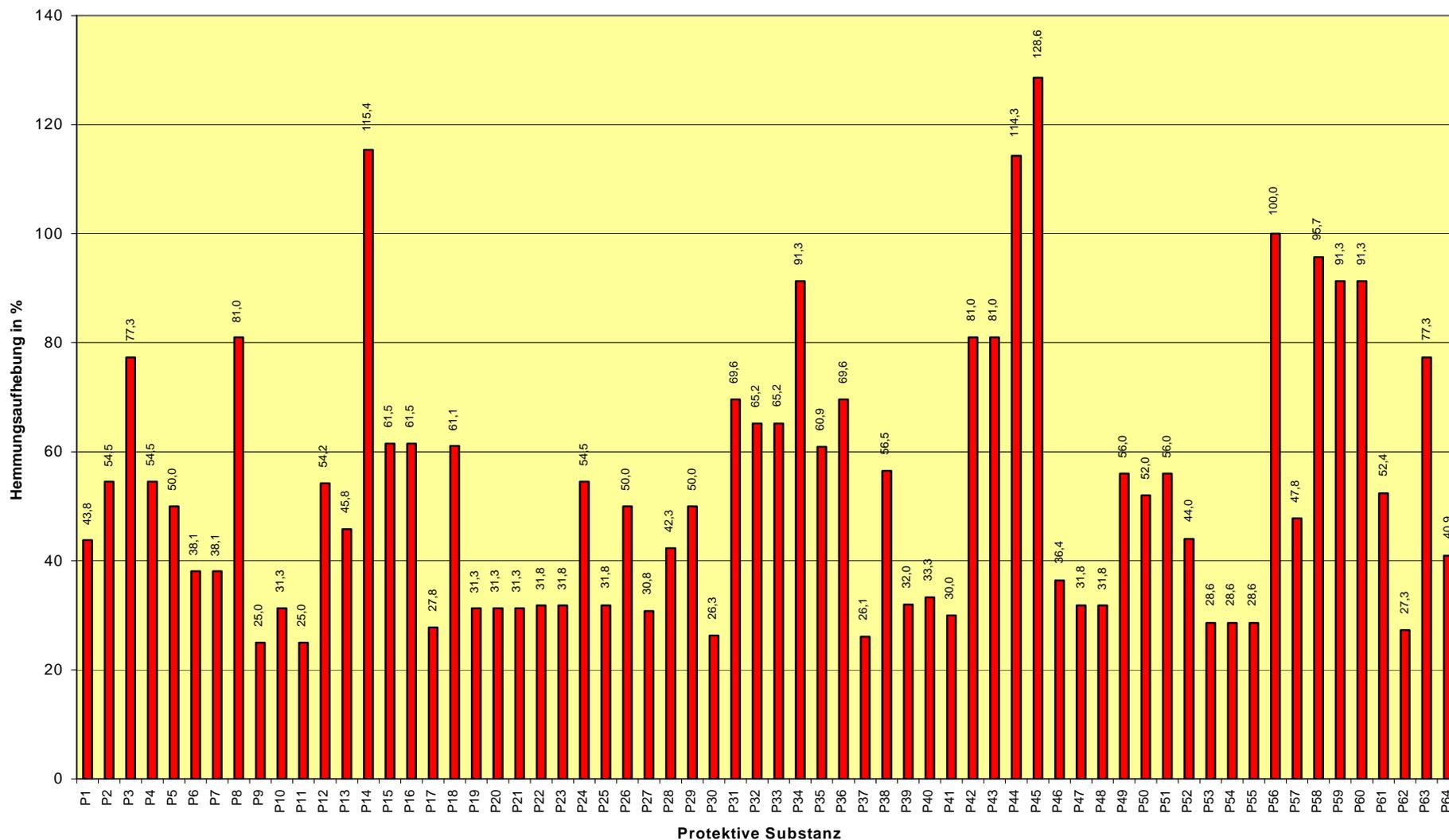
- P1 = O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol (V1 = 1:10)  
P2 = O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P3 = O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P4 = O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol (V4 = 1:10<sup>6</sup>)  
P5 = Dextran (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P6 = Dextran (V4 = 1:10<sup>6</sup>)  
P7 = Dextran:Dimethylsulfoxid:Tetramethylharnstoff (V1 = 1:10)  
P8 = Dextransulfat (V1 = 1:10)  
P9 = Diethanolamin (V1 = 1:10)  
P10 = Diethanolamin (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P11 = N,N'-Dimethylacetamid (V1 = 1:10)  
P12 = N,N'-Dimethylacetamid (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P13 = N,N'-Dimethylacetamid:Tetramethylharnstoff (V1 = 1:10)  
P14 = 1,3-Dimethylharnstoff (V1 = 1:10)  
P15 = 1,3-Dimethylharnstoff (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P16 = 1,3-Dimethylharnstoff (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P17 = 1,3-Dimethylharnstoff (V4 = 1:10<sup>6</sup>)  
P18 = Ethylendiamin (V1 = 1:10)  
P19 = Glycerin (V1 = 1:10)  
P20 = Hexamethylentetramin (V1 = 1:10)  
P21 = D-Mannit (V1 = 1:10)  
P22 = D-Mannit (V4 = 1:10<sup>6</sup>)  
P23 = Methoxypolyethylenglykol (V4 = 1:10<sup>6</sup>)  
P24 = 3-Methylpiperidin (V1 = 1:10)  
P25 = 1-Methyl-2-pyrrolidinon (V1 = 1:10)  
P26 = Polyethylenglykol MG15.000 (V1 = 1:10)  
P27 = Polyethylenglykol MG15.000 (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P28 = Polyethylenglykol MG15.000 (V4 = 1:10<sup>6</sup>)  
P29 = Polyethylenglykol MG35.000 (V1 = 1:10)  
P30 = Polyethylenglykol MG35.000 (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P31 = Polyethylenglykol MG35.000 (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P32 = Polyethylenglykol MG35.000 (V4 = 1:10<sup>6</sup>)  
P33 = Polyethylenglykoldimethylether 500 (V1 = 1:10)  
P34 = Polyethylenglykoldimethylether 500 (V4 = 1:10<sup>6</sup>)  
P35 = Polyethylenglykoldimethylether 2000 (V1 = 1:10)  
P36 = Polyethylenglykoldimethylether 2000 (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P37 = Polyethylenglykolmonobutylether (V1 = 1:10)  
P38 = Polyethylenglykolmonobutylether (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P39 = Polyethylenglykolmonobutylether (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P40 = Polypropylenglykol (V1 = 1:10)  
P41 = Polypropylenglykol (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P42 = Polyvinylalkohol (V1 = 1:10)  
P43 = Polyvinylalkohol (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P44 = Polyvinylpyrrolidon (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P45 = Pyridin (V1 = 1:10)  
P46 = Pyridin (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P47 = Pyridin (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P48 = Pyridin (V4 = 1:10<sup>6</sup>)  
P49 = D-Sorbit (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P50 = D-Sorbit (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P51 = Triethanolamin (V3 = 1:10<sup>5</sup>)  
P52 = Triethanolamin (V4 = 1:10<sup>6</sup>)  
P53 = Triethylamin (V1 = 1:10)  
P54 = Triethylamin (V2 = 1:10<sup>3</sup>)  
P55 = Triethylamin (V3 = 1:10<sup>5</sup>)

Die nicht in Abbildung 4, Tabelle 6 und Abbildung 6 aufgeführten Substanzen und Verdünnungen erbrachten eine partielle Hemmungsaufhebung der Lactat-dehydrogenaseaktivität von weniger als 25%.

## 4.2.2 Einfluss der protektiven Substanz (P) bei Denaturans (D) = Perchlorsäure 0,046M

### 4.2.2.1 Protektiver Effekt der Substanz P auf die Lactatdehydrogenase

Abbildung 7 enthält alle Substanzen mit ihren Verdünnungen, welche die Enzymhemmung durch Perchlorsäure um 25% oder mehr aufheben konnten. Mit der Formel  $(a-c) / (d-c) * 100$  wird die Hemmungsaufhebung in Prozent der durch die Säure verursachten Hemmung (= 100%) berechnet. Sechszwanzig Substanzen erfüllten diese Bedingung mit insgesamt vierundsechzig Verdünnungen. Die Hemmungsminderung reichte von 25% (Dextran:Dimethylsulfoxid:Tetramethylharnstoff = 1:1:1 in V3 und Dextransulfat in V2) bis zu 95,7% (D-Sorbit in V2), bzw. bis zu 128,6% (Polyethylenglykoldimethylether 2000 in V4) bei jenen Substanzen, die sogar zu einer Aktivitätsbeschleunigung führten. Pyridin erreichte in der Verdünnung 1:10 (=V1) eine komplette Hemmungsaufhebung (= 100%). Diethanolamin führte in der Verdünnung V1 zu einer 115,4%-igen Hemmungsaufhebung. Polyethylenglykoldimethylether 2000 konnte in zwei Verdünnungen ( $1:10^5 = V3$  und  $1:10^6 = V4$ ) mit Werten von 114,3% und 128,6% eine Reaktionsbeschleunigung bewirken. Die einzelnen Verdünnungen waren mit  $V1:V2:V3:V4 = 14:13:20:17$  etwas zugunsten der höheren Verdünnungen verteilt ( $V1=1:10$ ,  $V2=1:10^3$ ,  $V3=1:10^5$ ,  $V4=1:10^6$ ).

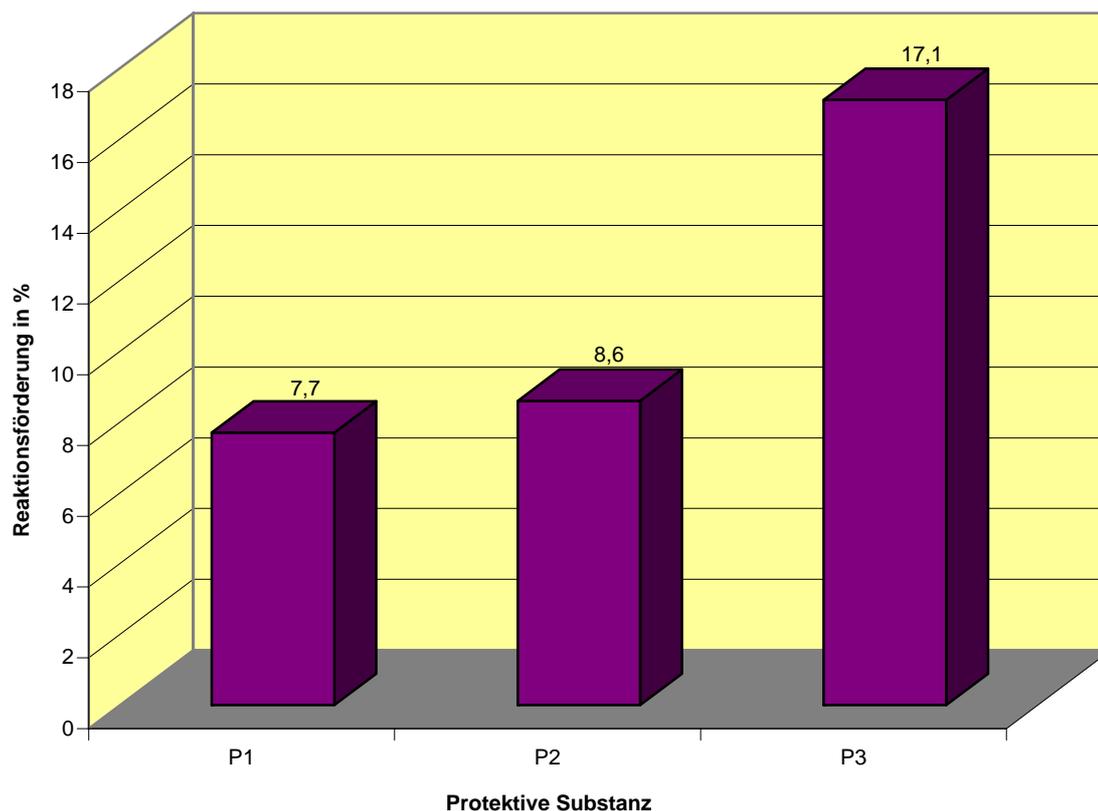


**Abbildung 7: Partielle oder komplette Aufhebung der durch Perchlorsäure verursachten Hemmung der Lactatdehydrogenaseaktivität mittels der protektiven Substanz**

Legende siehe nächste Seite

- P1 = Acetamid ( $V3 = 1:10^5$ )  
P2 = O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol ( $V1 = 1:10$ )  
P3 = O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol ( $V2 = 1:10^3$ )  
P4 = O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol ( $V3 = 1:10^5$ )  
P5 = O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol ( $V4 = 1:10^6$ )  
P6 = Dextran ( $V1 = 1:10$ )  
P7 = Dextran ( $V3 = 1:10^5$ )  
P8 = Dextran ( $V4 = 1:10^6$ )  
P9 = Dextran:Dimethylsulfoxid:Tetramethylharnstoff=1:1:1 ( $V3 = 1:10^5$ )  
P10 = Dextran:Dimethylsulfoxid:Tetramethylharnstoff=1:1:1 ( $V4 = 1:10^6$ )  
P11 = Dextransulfat ( $V2 = 1:10^3$ )  
P12 = Dextransulfat ( $V3 = 1:10^5$ )  
P13 = Dextransulfat ( $V4 = 1:10^6$ )  
P14 = Diethanolamin ( $V1 = 1:10$ )  
P15 = Diethanolamin ( $V2 = 1:10^3$ )  
P16 = Diethanolamin ( $V3 = 1:10^5$ )  
P17 = N,N'-Dimethylacetamid ( $V3 = 1:10^5$ )  
P18 = N,N'-Dimethylacetamid ( $V4 = 1:10^6$ )  
P19 = N,N'-Dimethylacetamid:Tetramethylharnstoff=1:1 ( $V1 = 1:10$ )  
P20 = N,N'-Dimethylacetamid:Tetramethylharnstoff=1:1 ( $V2 = 1:10^3$ )  
P21 = N,N'-Dimethylacetamid:Tetramethylharnstoff=1:1 ( $V3 = 1:10^5$ )  
P22 = 1,3-Dimethylharnstoff ( $V3 = 1:10^5$ )  
P23 = Ethanolamin ( $V2 = 1:10^3$ )  
P24 = Ethanolamin ( $V3 = 1:10^5$ )  
P25 = Ethanolamin ( $V4 = 1:10^6$ )  
P26 = Glycerin ( $V3 = 1:10^5$ )  
P27 = Harnstoff ( $V1 = 1:10$ )  
P28 = Harnstoff ( $V3 = 1:10^5$ )  
P29 = Harnstoff ( $V4 = 1:10^6$ )  
P30 = Hexamethylentetramin ( $V1 = 1:10$ )  
P31 = D-Mannit ( $V1 = 1:10$ )  
P32 = D-Mannit ( $V2 = 1:10^3$ )  
P33 = D-Mannit ( $V3 = 1:10^5$ )  
P34 = D-Mannit ( $V4 = 1:10^6$ )  
P35 = Methoxypolyethylenglykol ( $V1 = 1:10$ )  
P36 = Methoxypolyethylenglykol ( $V2 = 1:10^3$ )  
P37 = Methoxypolyethylenglykol ( $V3 = 1:10^5$ )  
P38 = Methoxypolyethylenglykol ( $V4 = 1:10^6$ )  
P39 = 3-Methylpiperidin ( $V4 = 1:10^6$ )  
P40 = Polyethylenglykol MG15.000 ( $V4 = 1:10^6$ )  
P41 = Polyethylenglykol MG35.000 ( $V1 = 1:10$ )  
P42 = Polyethylenglykoldimethylether 2000 ( $V1 = 1:10$ )  
P43 = Polyethylenglykoldimethylether 2000 ( $V2 = 1:10^3$ )  
P44 = Polyethylenglykoldimethylether 2000 ( $V3 = 1:10^5$ )  
P45 = Polyethylenglykoldimethylether 2000 ( $V4 = 1:10^6$ )  
P46 = Polyethylenglykolmonobutylether ( $V2 = 1:10^3$ )  
P47 = Polyethylenglykolmonobutylether ( $V3 = 1:10^5$ )  
P48 = Polyethylenglykolmonobutylether ( $V4 = 1:10^6$ )  
P49 = Polyvinylalkohol ( $V1 = 1:10$ )  
P50 = Polyvinylalkohol ( $V2 = 1:10^3$ )  
P51 = Polyvinylalkohol ( $V3 = 1:10^5$ )  
P52 = Polyvinylalkohol ( $V4 = 1:10^6$ )  
P53 = Polyvinylpyrrolidon ( $V1 = 1:10$ )  
P54 = Polyvinylpyrrolidon ( $V2 = 1:10^3$ )  
P55 = Polyvinylpyrrolidon ( $V4 = 1:10^6$ )  
P56 = Pyridin ( $V1 = 1:10$ )  
P57 = D-Sorbit ( $V1 = 1:10$ )  
P58 = D-Sorbit ( $V2 = 1:10^3$ )  
P59 = D-Sorbit ( $V3 = 1:10^5$ )  
P60 = D-Sorbit ( $V4 = 1:10^6$ )  
P61 = Triethanolamin ( $V3 = 1:10^5$ )  
P62 = Triethylamin ( $V2 = 1:10^3$ )  
P63 = Triethylamin ( $V3 = 1:10^5$ )  
P64 = Triethylamin ( $V4 = 1:10^6$ )

Die zusätzliche Reaktionsbeschleunigung der Lactatdehydrogenase wird in Abbildung 8 dargestellt. Mit der Formel  $(d-a) / d * (-100)$  wird die Aktivitätsförderung in Prozent der normalen Enzymaktivität angegeben. Die zwei Substanzen, die mit insgesamt drei Verdünnungen eine Enzymaktivitätsförderung bewirken konnten, erreichten dabei eine Reaktionsbeschleunigung von 7,7% (Diethanolamin in V1) bis 17,1% (Polyethylenglykoldimethylether 2000 in V4). Die Verdünnungen waren mit  $V1:V2:V3:V4 = 1:0:1:1$  relativ gleichmäßig verteilt ( $V1=1:10$ ,  $V2=1:10^3$ ,  $V3=1:10^5$ ,  $V4=1:10^6$ ).



**Abbildung 8: Über die Hemmungsaufhebung hinausgehende Lactatdehydrogenaseförderung durch die protective Substanz im Perchlorsäureversuch**

P1 = Diethanolamin ( $V1 = 1:10$ )  
 P2 = Polyethylenglykoldimethylether 2000 ( $V3 = 1:10^5$ )  
 P3 = Polyethylenglykoldimethylether 2000 ( $V4 = 1:10^6$ )

#### 4.2.2.2 Kein Einfluss der protektiven Substanz auf die Lactatdehydrogenasehemmung

Tabelle 7 gibt die Substanzen wieder, die die durch Perchlorsäure induzierte Teildenaturierung der Lactatdehydrogenase nicht beeinflussen konnten. Die Enzymaktivitäten, dargestellt durch die Extinktionsänderung pro Minute, waren für die Proben „a“ und „c“ identisch, die Aktivitätsänderung beträgt gemäß der Formel  $(a-c) / (d-c) * 100$  gleich 0%. Dies trifft in der Verdünnung V1 sowohl für die

Substanzkombination Dextran:Dimethylsulfoxid:Tetramethylharnstoff = 1:1:1 als auch für Ethanolamin zu.

**Tabelle 7: Die protektive Substanz ohne Einfluss auf die durch Perchlorsäure verursachte Hemmung der Lactatdehydrogenaseaktivität**

Protektive Substanz	Aktivitätsänderung [%] (a-c)/(d-c) * 100
Dextran: Dimethylsulfoxid: Tetramethylharnstoff= 1:1:1 (V1)	0
Ethanolamin (V1)	0

V1=Verdünnung 1:10

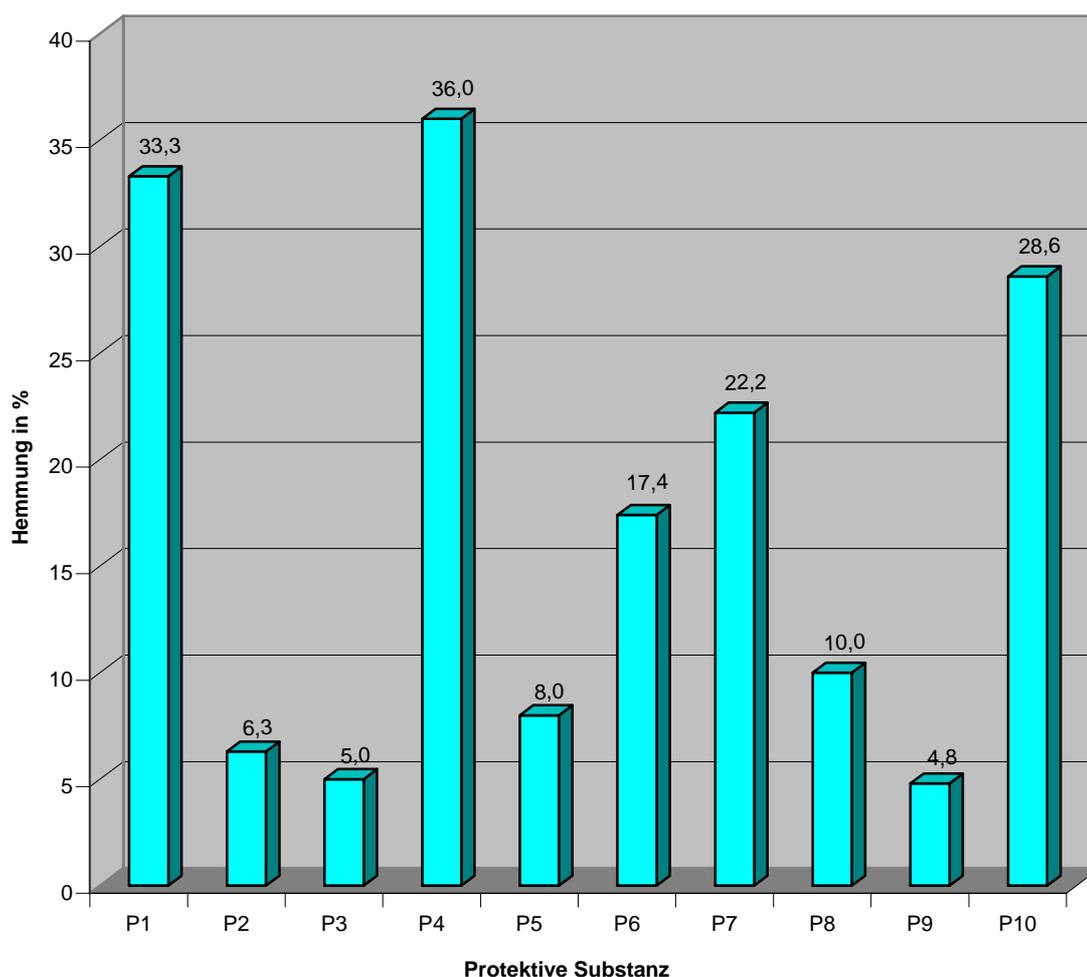
Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung

Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung

Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

#### 4.2.2.3 Hemmungsverstärkung durch Kombination der protektiven Substanz (P) und der Denaturierung durch Perchlorsäure (D)

Auch bei den Teildenaturierungsversuchen mit Perchlorsäure wurde durch den Einsatz der protektiven Substanz „P“ nicht nur ein protektiver Effekt beobachtet. In Abbildung 9 sind die P-Substanzen mit den entsprechenden Verdünnungen aufgelistet, welche durch Kombination mit der Perchlorsäure zu einer verstärkten Enzymhemmung führten. Die zusätzliche Aktivitätsabnahme der Lactatdehydrogenase bei Kombination von P und D wird an der Enzymhemmung bei reiner Verwendung des Denaturans (= 100%) gemessen. Die Formel  $(a-c) / (d-c) * (-100)$  gibt dies in Prozent wieder. Neun Substanzen bewirkten mit insgesamt zehn Verdünnungen eine Hemmungsverstärkung. Die zusätzliche Enzymhemmung betrug zwischen 4,8% (Polypropylenglykol in V2) und 36% (3-Methylpiperidin in V1). Die jeweiligen Verdünnungen waren mit einem Anteil von V1:V2:V3:V4 = 3:4:0:3 beteiligt (V1=1:10, V2=1:10<sup>3</sup>, V3=1:10<sup>5</sup>, V4=1:10<sup>6</sup>).



**Abbildung 9: Verstärkung der durch Perchlorsäure hervorgerufenen Hemmung der Lactatdehydrogenaseaktivität durch die protektive Substanz**

- P1 = Dextransulfat (V1 = 1:10)
- P2 = N,N'-Dimethylacetamid:Tetramethylharnstoff (V4 = 1:10<sup>6</sup>)
- P3 = Ethylendiamin (V4 = 1:10<sup>6</sup>)
- P4 = 3-Methylpiperidin (V1 = 1:10)
- P5 = 3-Methylpiperidin (V2 = 1:10<sup>3</sup>)
- P6 = 1-Methyl-2-pyrrolidinon (V4 = 1:10<sup>6</sup>)
- P7 = Polyethylenglykol MG15.000 (V2 = 1:10<sup>3</sup>)
- P8 = Polyethylenglykol MG35.000 (V2 = 1:10<sup>3</sup>)
- P9 = Polypropylenglykol (V2 = 1:10<sup>3</sup>)
- P10 = Triethanolamin (V1 = 1:10)

Die nicht in Abbildung 8, Tabelle 7 und Abbildung 9 aufgeführten Substanzen und Verdünnungen führten zu einer partiellen Hemmungsaufhebung der Lactatdehydrogenaseaktivität von weniger als 25%.

## 5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, auszutesten ob es möglich ist das Enzym Lactatdehydrogenase vor einer Denaturierung teilweise oder ganz zu schützen. Als „Enzymmodellschädigung“ diente eine Hitze- und Säureteildenaturierung der Enzymproteine. Dabei wurde für die Hitzeteildenaturierung eine Enzymerwärmung auf 60°C gewählt, welche über einen Zeitraum von 60 Minuten einwirkte. Für die Teildenaturierung mit Säure wurde eine 0,046M Perchlorsäure verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde als Versuchsenzym die Lactatdehydrogenase gewählt. Für den Enzymschutz wurden insgesamt dreißig sogenannte protektive Substanzen beziehungsweise Substanzkombinationen (Substanz P) gewählt, die in verschiedenen Verdünnungen getestet wurden.

Das Augenmerk galt insbesondere zwei Wechselwirkungsmöglichkeiten zwischen der Lactatdehydrogenase und der Substanz P. Einerseits interessierte der Einfluss, den die protektive Substanz auf die normale Enzymaktivität bewirken konnte, andererseits sollte gezeigt werden, ob es möglich wäre mit der Substanz P die Teildenaturierung der Lactatdehydrogenase durch Erwärmung bzw. Perchlorsäure zu verhindern oder wenigstens zu vermindern. Die entsprechende Wirkung der protektiven Substanz wurde als erfolgreich angesehen, wenn die Substanz P die normale Enzymaktivität um mehr als 15% erhöhen konnte oder die durch das Denaturans verursachte Enzymhemmung um mindestens 25% vermindern konnte.

### 5.1 Der Einfluss der protektiven Substanz auf die Lactatdehydrogenaseaktivität

Ein positiver Einfluss der protektiven Substanz (Substanz P) auf die Enzymaktivität, sprich eine Reaktionsbeschleunigung, wurde als durchaus wünschenswert angesehen. Prinzipiell waren jedoch drei verschiedene Wechselwirkungen möglich. Die Substanz P konnte den erwünschten reaktionsbeschleunigenden Einfluss haben, die Enzymaktivität völlig unberührt lassen oder aber sogar zu einer Reaktionsabschwächung bzw. Enzymhemmung führen. Bei den verwendeten dreißig Substanzen und Substanzkombinationen mit jeweils vier Verdünnungsstufen, wurden alle drei Wirkungsmöglichkeiten beobachtet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2, Tabelle 5 und Abbildung 3 zusammengefasst. Die Annahme, dass die unterschiedlichen Wirkungsweisen mit den verschiedenen protektiven Substanzen in Zusammenhang stehen oder von der jeweiligen Verdünnung abhängig sind, war naheliegend.

Bei genauer Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass bei den Proben, die zu der erwünschten reaktionsbeschleunigenden Wirkung führten, die „fördernden“ P-Substanzen sehr durchmischt waren. Eine Zuordnung zu chemischen Stoffklassen fällt schwer. Die Substanzen, die besonders potent waren und eine Reaktionsförderung von mehr als 15% erreichten, waren meist in mehreren Verdünnungsstufen erfolgreich. Die Substanzen 1,3-Dimethylharnstoff (V1,V3), D-Mannit (V1,V2), sowie O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol (V2,V3,V4), Dextran (V2,V3,V4), N,N'-Dimethylacetamid (V1,V3,V4), Polyethylenglykoldimethylether

2000 (V2,V3,V4) und Polyethylenglykolmonobutylether (V1,V3,V4) wären hier zu nennen. Ethanolamin und Methoxypolyethylenglykol zählten sogar mit jeweils allen vier Verdünnungsstufen zu den erfolgreichen Substanzen. Ein Zusammenhang zwischen der reaktionsbeschleunigenden Wirkung und der verwendeten Substanz P an sich, ist also nicht von der Hand zu weisen. Betrachtet man die zehn besten Ergebnisse, so zeigen sich auch hier Substanzwiederholungen (siehe Tabelle 8). Eine Relation zu den verwendeten Verdünnungsstufen lässt sich nicht herstellen ( $V1=1:10$ ,  $V2=1:10^3$ ,  $V3=1:10^5$ ,  $V4=1:10^6$ ).

**Tabelle 8: Die zehn besten Ergebnisse bei der Steigerung der Enzymaktivität durch die protektive Substanz**

Protektive Substanz	Reaktionsförderung [%] (b-d)/d * 100
Polyethylenglykolmonobutylether (V1)	45,7
Dextran (V4)	40,0
Dextran (V3)	31,4
Dextran (V2)	28,6
Polyethylenglykoldimethylether 2000 (V2)	28,6
O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol (V2)	27,8
Ethanolamin (V1)	27,8
Ethanolamin (V2)	27,8
Methoxypolyethylenglykol (V3)	27,0
Polyethylenglykoldimethylether 2000 (V3)	25,7
O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol (V3)	25,0
O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol (V4)	25,0
Ethanolamin (V3)	25,0
Triethylamin (V1)	25,0
D-Mannit (V2)	24,3
Hexamethylentetramin (V3)	23,5

V1 = Verdünnung 1:10

V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>

V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>

V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung

Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

Auch bei den Substanzen die zu einer Enzymhemmung führten, wirkten meist mehrere, wenn nicht sogar alle Verdünnungsstufen einer Substanz hemmend. Als Beispiel seien die Substanzen Polyethylenglykol MG35.000 (V1,V2), 3-Methylpiperidin (V1,V2,V3) und Triethylamin (V2,V3,V4) sowie Harnstoff und 1-Methyl-2-pyrrolidinon in jeweils allen Verdünnungen aufgeführt. Die hemmende Wirkung schien also substanzabhängig zu sein, ein direkter Zusammenhang mit den chemischen Stoffklassen oder den Verdünnungsstufen konnte hier jedoch nicht beobachtet werden ( $V1=1:10$ ,  $V2=1:10^3$ ,  $V3=1:10^5$ ,  $V4=1:10^6$ ).

Ohne Einfluss auf die Lactatdehydrogenaseaktivität waren nur sehr wenige Substanzen (siehe Tabelle 5). Die vier in Frage kommenden Proben waren durch jeweils unterschiedliche protektive Substanzen mit den unterschiedlichsten Verdünnungen charakterisiert. So konnte auch hier kein Zusammenhang mit speziellen „neutralen“ Substanzen oder mit bestimmten Verdünnungen hergestellt werden.

Die verschiedenen Wirkungsweisen sind demnach wahrscheinlich substanzabhängig, jedoch nicht verdünnungsabhängig.

## 5.2 Der Einfluss der protektiven Substanz auf die Lactatdehydrogenasehemmung

Ziel war es, die Teildenaturierung der Lactatdehydrogenase durch Erwärmung bzw. Perchlorsäure zu verhindern oder wenigstens zu vermindern. Prinzipiell waren vier verschiedene Wirkungsweisen der protektiven Substanzen (P) möglich. Die Substanz P konnte einerseits keinerlei Einfluss auf die Teildenaturierung der Lactatdehydrogenase haben, oder die Enzymhemmung sogar noch verstärken. Andererseits konnte die Substanz P zu der gewünschten Enzymprotektion führen und die Enzymhemmung mindern bzw. die Lactatdehydrogenaseteildenaturierung vollkommen verhindern. Zusätzlich war bei einer sehr potenten Substanz P auch an eine zusätzliche Reaktionsbeschleunigung der ursprünglichen Enzymaktivität zu denken. Bei insgesamt dreißig protektiven Substanzen bzw. Substanzkombinationen mit jeweils vier verschiedenen Verdünnungsstufen, waren sowohl bei den Erwärmungsversuchen als auch bei den Säureversuchen jeweils alle vier Wirkungsvarianten vertreten.

### 5.2.1 Der Einfluss der protektiven Substanz auf die Teildenaturierung durch Erwärmung

Betrachtet man die erwünschte Enzymprotektive Wirkung der Substanz P (siehe auch Abbildung 4) so fällt auf, dass von den achtzehn protektiven Substanzen, die die Teildenaturierung der Lactatdehydrogenase um 25% oder mehr vermindern konnten zehn Substanzen mit jeweils zwei Verdünnungen vertreten waren, während die restlichen acht Substanzen in nur einer Verdünnung wirksam waren. Acetamid (V1,V3), Diethanolamin (V3,V4), N,N'-Dimethylacetamid (V2,V4), Ethanolamin (V2,V3), Ethylendiamin (V3,V4), Hexamethylentetramin (V2,V4), D-Mannit (V2,V3), Methoxypolyethylenglykol (V2,V3), Polyvinylpyrrolidon (V1,V3) und Triethanolamin (V1,V2) sind die jeweils doppelt vertretenen P-Substanzen. Ein Zusammenhang zwischen der verwendeten Substanz P an sich und der protektiven Wirkung scheint somit gegeben. Bei den zehn oben genannten Substanzen die in zwei Verdünnungen protektiv waren, waren die beteiligten Verdünnungen mit  $V1:V2:V3:V4 = 3:6:7:4$  eher zugunsten der mittleren Verdünnungen ( $1:10^3$  und  $1:10^5$ ) verteilt. Bei Betrachtung der Verdünnungsverteilung aller in Abbildung 4 aufgeführten protektiven Substanzen sind die mittleren bis höhergradigen Verdünnungsstufen bevorzugt:  $V1:V2:V3:V4 = 3:7:11:7$  ( $V1=1:10$ ,  $V2=1:10^3$ ,  $V3=1:10^5$ ,  $V4=1:10^6$ ).

Bei vier Versuchen konnte die Lactatdehydrogenaseteildenaturierung nicht nur komplett verhindert werden, sondern zusätzlich auch noch eine Enzymaktivitätssteigerung erreicht werden (siehe Abbildung 5). Auch hier war Methoxypolyethylenglykol mit den Verdünnungen V2 und V3 doppelt vertreten. N,N'-Dimethylacetamid (V2) und Ethylendiamin (V4) waren mit jeweils einer Verdünnung an den guten Ergebnissen beteiligt. Ein direkter Zusammenhang mit

einer Stoffklasse oder einer Verdünnung kann bei diesen Ergebnissen nicht festgestellt werden ( $V1=1:10$ ,  $V2=1:10^3$ ,  $V3=1:10^5$ ,  $V4=1:10^6$ ).

Sieht man sich jene protektive Substanzen an, die keinerlei Einfluss auf die Lactatdehydrogenase-Teildenaturierung hatten, so fällt wiederum auf, dass viele Substanzen mit zwei Verdünnungen vertreten sind. Harnstoff ( $V1, V4$ ), 3-Methylpiperidin ( $V2, V3$ ), Polyethylenglykoldimethylether 500 ( $V2, V3$ ), Polyethylenglykoldimethylether 2000 ( $V3, V4$ ) und Polypropylenglykol ( $V3, V4$ ) zählen hierzu (siehe Tabelle 6). Ein direkter Zusammenhang mit einer Stoffklasse kann nicht hergestellt werden. Auffallend ist jedoch, dass in den fünfzehn Versuchen, in denen die Enzymaktivitätshemmung durch die protektive Substanz nicht beeinflusst wurde, fünfmal eine Polyethylenglykol-Ether-Verbindung beteiligt war. Auffallend ist auch, dass die Verdünnungen mit  $V1:V2:V3:V4 = 1:3:6:5$  eher zugunsten der höhergradigen Verdünnungen verteilt sind ( $V1=1:10$ ,  $V2=1:10^3$ ,  $V3=1:10^5$ ,  $V4=1:10^6$ ).

Bei den Substanzen, die zu einer zusätzlichen Hemmungsverstärkung der Lactatdehydrogenaseaktivität führten, imponiert wiederum der Zusammenhang zu der jeweiligen Substanz, da diese meistens mit mehreren Verdünnungen hemmend wirkte. Wie in Abbildung 6 sichtbar, sind die P-Substanzen Dextran ( $V3, V4$ ), Diethanolamin ( $V1, V2$ ), N,N'-Dimethylacetamid ( $V1, V3$ ), D-Mannit ( $V1, V4$ ), Polyethylenglykoldimethylether 500 ( $V1, V4$ ), Polyethylenglykoldimethylether 2000 ( $V1, V2$ ), Polypropylenglykol ( $V1, V2$ ), Polyvinylalkohol ( $V1, V3$ ), D-Sorbit ( $V2, V3$ ) und Triethanolamin ( $V3, V4$ ) mit jeweils zwei Verdünnungsstufen vertreten. Polyethylenglykol MG15.000 ( $V1, V3, V4$ ), Polyethylenglykolmonobutylether ( $V1, V2, V3$ ) und Triethylamin ( $V1, V2, V3$ ) sind mit jeweils drei Verdünnungsstufen beteiligt. O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol, 1,3-Dimethylharnstoff, Polyethylenglykol MG35.000 und Pyridin führten in allen vier Verdünnungen zu einer zusätzlichen Enzymhemmung. Ein direkter Zusammenhang der Enzymhemmung mit den einzelnen Substanzen ist also durchaus gegeben, ein Zusammenhang zu bestimmten Stoffklassen lässt sich allerdings nicht herleiten. Mit einer Verdünnungsverteilung von insgesamt  $V1:V2:V3:V4 = 22:11:12:10$  und  $V1:V2:V3:V4 = 10:6:8:5$  bei den mehrfach genannten Substanzen, sind die Verdünnungen bis auf eine deutliche Betonung von  $V1 (=1:10)$  ansonsten eher homogen verteilt ( $V1=1:10$ ,  $V2=1:10^3$ ,  $V3=1:10^5$ ,  $V4=1:10^6$ ).

## 5.2.2 Der Einfluss der protektiven Substanz auf die Teildenaturierung durch Perchlorsäure

Betrachtet man die protektiven Substanzen (P), die zu einer Hemmungsminderung von 25% oder mehr führten (siehe Abbildung 7), so fällt auf, dass sechszwanzig P-Substanzen diese Prämisse erfüllen und zumeist in mehreren Verdünnungsstufen erfolgreich waren. Eine Wirkungsabhängigkeit von der jeweils verwendeten Substanz liegt gerade im Hinblick auf die Mehrfachnennungen nahe. Als Beispiel für Doppelnennungen seien Dextran:Dimethylsulfoxid:Tetramethylharnstoff = 1:1:1 ( $V3, V4$ ) und N,N'-Dimethylacetamid ( $V3, V4$ ) aufgeführt. Bei den Dreifachnennungen sind Dextran ( $V1, V3, V4$ ), Dextransulfat ( $V2, V3, V4$ ), Diethanolamin ( $V1, V2, V3$ ), N,N'-Dimethylacetamid:Tetramethylharnstoff = 1:1 ( $V1, V2, V3$ ), Ethanolamin ( $V2, V3, V4$ ), Harnstoff ( $V1, V3, V4$ ), Polyethylenglykolmonobutylether ( $V2, V3, V4$ ), Polyvinylpyrrolidon ( $V1, V2, V4$ ) und Triethylamin ( $V2, V3, V4$ ) zu

erwähnen. O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol, D-Mannit, Methoxy-polyethylenglykol, Polyethylenglykoldimethylether 2000, Polyvinylalkohol und D-Sorbit erfüllten mit allen vier Verdünnungen die oben genannte Prämisse. Bei Betrachtung der beteiligten Verdünnungen ( $V1:V2:V3:V4 = 14:13:20:17$ ) sind die höhergradigen Verdünnungen eher bevorzugt ( $V1=1:10$ ,  $V2=1:10^3$ ,  $V3=1:10^5$ ,  $V4=1:10^6$ ).

Es gibt zwei protektive Substanzen mit insgesamt drei Verdünnungen, die nicht nur die Teildenaturierung der Lactatdehydrogenase durch Perchlorsäure verhinderten, sondern zugleich zu einer Reaktionsbeschleunigung des Enzyms führten. Dies sind Diethanolamin in V1 und Polyethylenglykoldimethylether 2000 in den Verdünnungen V3 und V4 (siehe auch Abbildung 8). Eine Zugehörigkeit zu chemischen Stoffklassen oder eine Verdünnungsabhängigkeit ist bei diesen guten Ergebnissen nicht zu sehen ( $V1=1:10$ ,  $V2=1:10^3$ ,  $V3=1:10^5$ ,  $V4=1:10^6$ ).

Nur zwei Substanzen bzw. Substanzkombinationen waren ohne Einfluss auf die Teildenaturierung der Lactatdehydrogenase durch Perchlorsäure.

Dextran:Dimethylsulfoxid:Tetramethylharnstoff = 1:1:1 und Ethanolamin waren jeweils in der Verdünnung V1 wirkungslos. Eine Zuordnung zu einer chemischen Stoffklasse ist ebenso wie eine Abhängigkeit von der jeweiligen Substanz (z.B. durch Mehrfachnennung) nicht gegeben. Auffällig ist jedoch, dass bei beiden Substanzen die Verdünnung V1 ( $=1:10$ ) ohne Wirkung war.

Die neun protektiven Substanzen, die die durch die Perchlorsäure verursachte Enzymhemmung noch weiter verstärkten, waren sehr unterschiedlich und es war nur eine Mehrfachnennung zu registrieren. 3-Methylpiperidin führte in den Verdünnungsstufen V1 und V2 zu einer Hemmungsverstärkung. Eine Abhängigkeit dieser Ergebnisse von chemischen Stoffklassen oder den verwendeten Substanzen an sich ist kaum anzunehmen. Ebenso ist eine Verdünnungsabhängigkeit bei einer Verdünnungsverteilung von  $V1:V2:V3:V4 = 3:4:0:3$  eher unwahrscheinlich. Vielmehr ist eine zufällige Verteilung der P-Substanzen und Verdünnungen zu erwägen ( $V1=1:10$ ,  $V2=1:10^3$ ,  $V3=1:10^5$ ,  $V4=1:10^6$ ).

### 5.3 Erfolgversprechende protektive Substanzen

Betrachtet man die Mehrfachnennungen von protektiven Substanzen bei den Versuchen zur Reaktionsförderung der Lactatdehydrogenase welche eine Förderung von mindestens 15% erreichten, so finden sich insgesamt neun Substanzen (siehe Abbildung 2). Zwei Substanzen sind doppelt vertreten, fünf Substanzen dreifach und zwei Substanzen mit allen vier Verdünnungen.

Im Rahmen der Hemmungsaufhebung konnten bei den Erwärmungsversuchen insgesamt zehn Substanzen mit jeweils zwei Verdünnungen eine Hemmungsaufhebung von mindestens 25% erreichen. Eine Dreifach- oder Vierfachnennung war nicht zu verzeichnen (siehe Abbildung 4).

Bei den Versuchen mit Perchlorsäurehemmung waren siebzehn Substanzen in der Lage mit mehreren Verdünnungen eine mindestens 25%-ige Hemmungsaufhebung

zu bewirken. Zwei Substanzen waren doppelt vertreten, neun Substanzen dreifach und sechs Substanzen vierfach (siehe Abbildung 7).

Insgesamt vier protektive Substanzen sind in allen drei Versuchsreihen mit jeweils zwei Verdünnungen mehrfach vertreten. Diese sind N,N'-Dimethylacetamid, Ethanolamin, D-Mannit und Methoxypolyethylenglykol.

Vergleicht man die protektiven Substanzen die bei den Versuchen zur Hemmungsaufhebung sowohl bei den Erwärmungs-, als auch Säureversuchen mit einer mindestens 25%-igen Hemmungsaufhebung mehrfach vertreten sind, so gilt dies für sechs P-Substanzen. Diese sind Diethanolamin, N,N'-Dimethylacetamid, Ethanolamin, D-Mannit, Methoxypolyethylenglykol und Polyvinylpyrrolidon.

Betrachtet man die zehn besten Ergebnisse bei der Steigerung der Lactatdehydrogenaseaktivität durch die Substanz P (siehe Tabelle 8) und vergleicht man die Ergebnisse mit der über die Hemmungsaufhebung hinausgehenden Lactatdehydrogenaseförderung durch die protektive Substanz bei den Erwärmungs- und Säureversuchen (siehe Abbildung 5 und Abbildung 8), so finden sich nur zwei Substanzen, die sowohl eine alleinige Reaktionsförderung des Enzyms, als auch eine über die komplette Hemmungsaufhebung hinausgehende Reaktionsförderung bewirken können. Dies sind die P-Substanzen Methoxypolyethylenglykol und Polyethylenglykoldimethylether 2000. Auffallend ist, dass beide Substanzen mit je zwei Verdünnungen bei den Hemmungsversuchen erfolgreich waren. Auffallend ist auch, dass die beiden Substanzen jeweils mit der Verdünnung V3 ( $1:10^5$ ) sowohl bei der alleinigen Enzymförderung als auch bei den Hemmungsversuchen zu den besten Substanzen zählen.

Bei dem Versuch der Reaktionsförderung der Lactatdehydrogenase durch die protektive Substanz, also ohne Hemmung des Enzyms durch Erwärmung oder Säure, bewirkt Methoxypolyethylenglykol in allen vier Verdünnungen eine Steigerung der Lactatdehydrogenaseaktivität, jedoch nur in der Verdünnung V3 ( $1:10^5$ ) zählt diese Substanz mit 27,0% zu den zehn Besten in dieser Versuchsreihe.

Methoxypolyethylenglykol erreicht bei den Erwärmungsversuchen in den Verdünnungen V2 ( $1:10^3$ ) und V3 ( $1:10^5$ ) eine über die komplette Hemmungsaufhebung hinausgehende Reaktionsförderung der Lactatdehydrogenase von 24,3% und 10,8%. Mit der Verdünnung V1 ( $1:10$ ) kann eine Hemmungsaufhebung von 8,3% erzielt werden, während Methoxypolyethylenglykol in der Verdünnung V4 ( $1:10^6$ ) eine Hemmungsverstärkung von 83,3% bewirkt.

Beim Säureversuch ist Methoxypolyethylenglykol mit allen vier Verdünnungen an der partiellen Hemmungsaufhebung beteiligt, kann jedoch in keiner Verdünnungsstufe eine komplette Hemmungsaufhebung erreichen (Hemmungsaufhebung von 26,1% bis 69,6%).

Polyethylenglykoldimethylether 2000 erreicht bei den Versuchen zur Reaktionsförderung des Enzyms mit drei Verdünnungen ( $V2=1:10^3$ ,  $V3=1:10^5$ ,  $V4=1:10^6$ ) eine Steigerung der Lactatdehydrogenaseaktivität über 15%. Mit der Verdünnung V2 und V3 ist diese Substanz mit 28,6% und 25,7% sogar zweimal bei den zehn besten Ergebnissen der Versuchsreihe vertreten.

Im Rahmen der mittels Perchlorsäure verursachten Enzymhemmung konnte Polyethylenglykoldimethylether 2000 mit allen vier Verdünnungen eine Hemmungsaufhebung erzielen. In den Verdünnungen V1 (1:10) und V2 (1:10<sup>3</sup>) war nur eine partielle Hemmungsaufhebung möglich (jeweils 81,0%), mit den Verdünnungen V3 (1:10<sup>5</sup>) und V4 (1:10<sup>6</sup>) konnte nicht nur eine komplette Hemmungsaufhebung erreicht werden, sondern zusätzlich eine Reaktionsförderung von 8,6% beziehungsweise 17,1% erzielt werden.

Bei den Erwärmungsversuchen konnte Polyethylenglykoldimethylether keine Hemmungsaufhebung bewirken, im Gegenteil verursachte die Substanz in den Verdünnungen V1 (1:10) und V2 (10<sup>3</sup>) eine Hemmungsverstärkung von 85,7% und 28,6%. In den Verdünnungen V3 (1:10<sup>5</sup>) und V4 (1:10<sup>6</sup>) war keine Beeinflussung der Enzymhemmung möglich.

Bei der Betrachtung der zehn besten Ergebnisse im Rahmen der Steigerung der Lactatdehydrogenaseaktivität durch die protektive Substanz fallen neben der Mehrfachnennung von Polyethylenglykoldimethylether 2000 weitere Mehrfachnennungen von P-Substanzen auf (siehe Tabelle 8). Dextran und O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol sind jeweils in den Verdünnungen V2 (1:10<sup>3</sup>), V3 (1:10<sup>5</sup>) und V4 (1:10<sup>6</sup>) dreimal vertreten. Ethanolamin ist ebenfalls dreimal genannt, allerdings mit den Verdünnungen V1 (1:10), V2 (1:10<sup>3</sup>) und V3 (1:10<sup>5</sup>).

O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol konnte im Rahmen der Säureversuche mit allen vier Verdünnungen eine partielle Hemmungsaufhebung bewirken (50,0% bis 77,3%). Bei den Erwärmungsversuchen jedoch kam es bei allen vier Verdünnungen zu einer Hemmungsverstärkung (25,0% bis 312,5%).

Dextran konnte die Lactatdehydrogenasehemmung durch Perchlorsäure mit allen vier Verdünnungen partiell aufheben, jedoch nur mit drei Verdünnungen (V1, V3, V4) über 25% (38,1%, 38,1%, 81%). Die Enzymhemmung mittels Erwärmung konnte Dextran nur in den Verdünnungen V1 (1:10) und V2 (1:10<sup>3</sup>) mit einer Hemmungsaufhebung von 10,0% und 40,0% positiv beeinflussen. Mit den Verdünnungen V3 (1:10<sup>5</sup>) und V4 (1:10<sup>6</sup>) bewirkte Dextran im Erwärmungsversuch sogar eine Hemmungsverstärkung des Enzyms von 40,0% beziehungsweise 20,0%.

Ethanolamin konnte in den Erwärmungsversuchen in allen vier Verdünnungen eine partielle Hemmungsaufhebung bewirken, in den Verdünnungen V2 (1:10<sup>3</sup>) und V3 (1:10<sup>5</sup>) sogar über 25% (jeweils 27,3%). Bei einer Enzymhemmung durch Perchlorsäure konnte Ethanolamin mit den Verdünnungen V2 bis V4 eine partielle Hemmungsaufhebung erreichen (31,8%, 54,5%, 31,8%). In der Verdünnung V1 konnte die Enzymhemmung nicht beeinflusst werden. (V1=1:10, V2=1:10<sup>3</sup>, V3=1:10<sup>5</sup>, V4=1:10<sup>6</sup>).

Fasst man die in diesem Kapitel genannten protektiven Substanzen, welche durch Mehrfachnennung auffallen und daher als erfolgversprechend anzusehen sind, zusammen, so handelt es sich insgesamt um neun Substanzen. Diese sind: O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol, Dextran, Diethanolamin, N,N'-Dimethylacetamid, Ethanolamin, D-Mannit, Methoxypolyethylenglykol, Polyethylenglykoldimethylether 2000 und Polyvinylpyrrolidon. In Abbildung 10 und Tabelle 9 sind diese Substanzen zum Vergleich dargestellt.

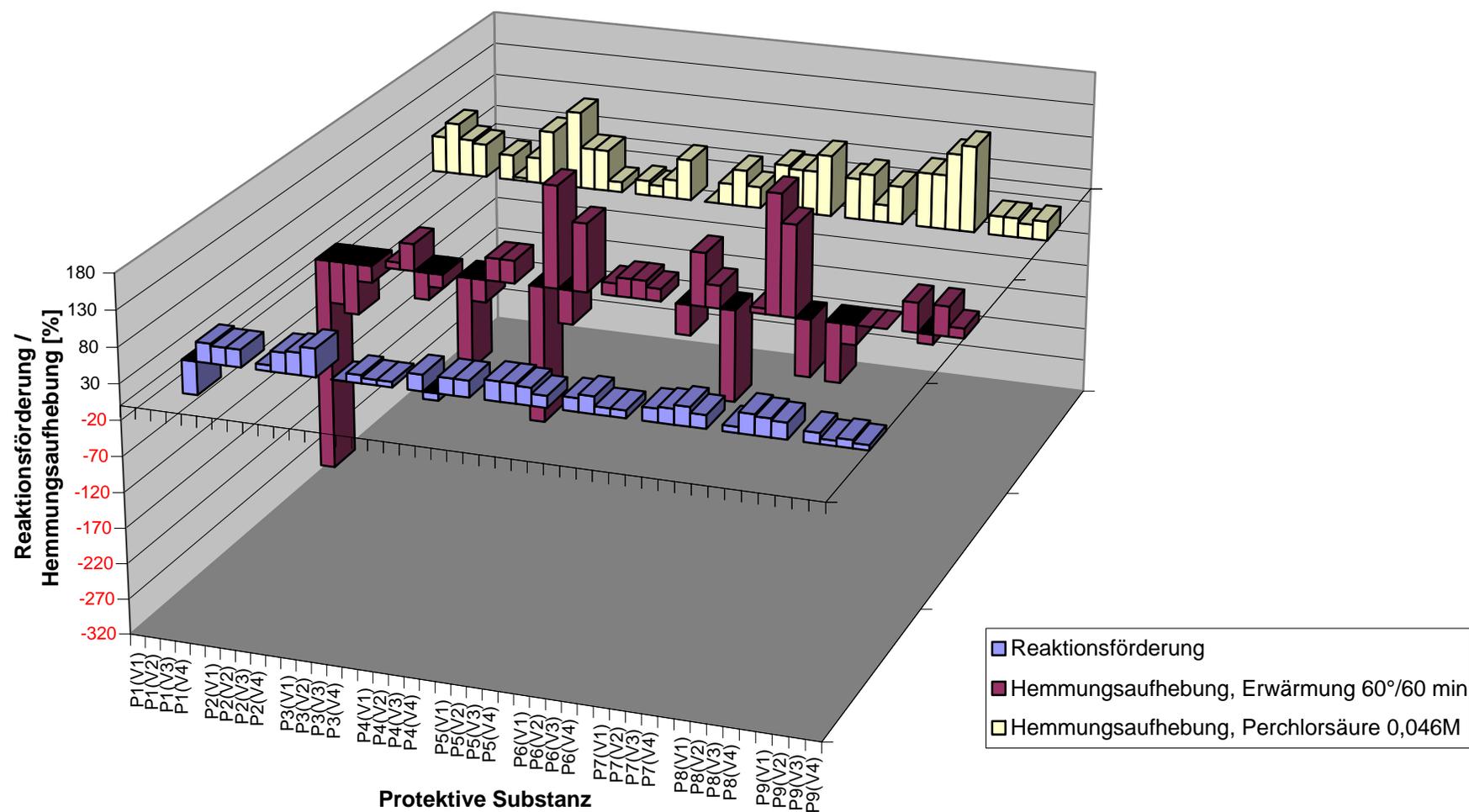


Abbildung 10: Diagramm zu den erfolgreichsten protektiven Substanzen

Legende siehe Tabelle 9: Die erfolgreichsten protektiven Substanzen

Tabelle 9: Die erfolgreichsten protektiven Substanzen

Protektive Substanz	Verdünnung	Reaktions- förderung	Hemmungs- aufhebung, Erwärmung 60°/60 min	Hemmungs- aufhebung, Perchlorsäure 0,046M
		(d-b)/d * (-100)	(a-c)/(d-c) * 100	(a-c)/(d-c) * 100
<b>O,O'-bis(2-Aminopropyl)- polypropylenglykol</b> =P1	P1(V1)	-47,2%	-312,5%	54,5%
	P1(V2)	27,8%	-62,5%	77,3%
	P1(V3)	25,0%	-75,0%	54,5%
	P1(V4)	25,0%	-25,0%	50,0%
<b>Dextran</b> =P2	P2(V1)	8,6%	10,0%	38,1%
	P2(V2)	28,6%	40,0%	4,8%
	P2(V3)	31,4%	-40,0%	38,1%
	P2(V4)	40,0%	-20,0%	81,0%
<b>Diethanolamin</b> =P3	P3(V1)	0,0%	-133,3%	115,4%
	P3(V2)	11,5%	-33,3%	61,5%
	P3(V3)	7,7%	33,3%	61,5%
	P3(V4)	7,7%	33,3%	15,4%
<b>N,N'-Dimethylacetamid</b> =P4	P4(V1)	23,3%	-200,0%	22,2%
	P4(V2)	-10,0%	150,0%	16,7%
	P4(V3)	23,3%	-50,0%	27,8%
	P4(V4)	23,3%	100,0%	61,1%
<b>Ethanolamin</b> =P5	P5(V1)	27,8%	18,2%	0,0%
	P5(V2)	27,8%	27,3%	31,8%
	P5(V3)	25,0%	27,3%	54,5%
	P5(V4)	16,7%	18,2%	31,8%
<b>D-Mannit</b> =P6	P6(V1)	18,9%	-44,4%	69,6%
	P6(V2)	24,3%	77,8%	65,2%
	P6(V3)	10,8%	33,3%	65,2%
	P6(V4)	10,8%	-133,3%	91,3%
<b>Methoxypolyethylenglykol</b> =P7	P7(V1)	18,9%	8,3%	60,9%
	P7(V2)	21,6%	175,0%	69,6%
	P7(V3)	27,0%	133,3%	26,1%
	P7(V4)	18,9%	-83,3%	56,5%
<b>Polyethylenglykoldimethyl- ether 2000</b> =P8	P8(V1)	8,6%	-85,7%	81,0%
	P8(V2)	28,6%	-28,6%	81,0%
	P8(V3)	25,7%	0,0%	114,3%
	P8(V4)	22,9%	0,0%	128,6%
<b>Polyvinylpyrrolidon</b> =P9	P9(V1)	14,8%	42,9%	28,6%
	P9(V2)	7,4%	-14,3%	28,6%
	P9(V3)	11,1%	42,9%	21,4%
	P9(V4)	7,4%	14,3%	28,6%

V1 = Verdünnung 1:10  
V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

## 5.4 Mögliche Einschränkungen der Aussagekraft der Ergebnisse

In Tabelle 10 sind die Kontrollproben aller dreißig Enzymversuche angegeben. Der Kontrollwert „d“ entspricht der „normalen“ Enzymreaktion der Lactatdehydrogenase. Die Proben bestehen nur aus dem das Enzym enthaltende Kontrollserum (KS) und der Reaktionslösung (RL). Die Enzymaktivität angegeben mit der aus zumeist vier Parallelproben gemittelten Extinktionsänderung pro Minute schwankt hierbei von 0,026  $\Delta E/\text{min}$  bis 0,040  $\Delta E/\text{min}$ . Die durchschnittliche Extinktionsänderung pro Minute beträgt 0,035  $\Delta E/\text{min}$ . Bei identischen Versuchsbedingungen ist anzunehmen, daß diese nicht unerhebliche Schwankungsbreite durch die verschiedenen Chargen des Kontrollserums und der Reaktionslösung bedingt ist. Um diese Aktivitätsschwankungen weitgehend zu eliminieren, wurden alle Berechnungen auf die jeweils verwendeten Kontrollseren und Reaktionslösungen, sprich den jeweiligen Kontrollwert „d“ bezogen.

**Tabelle 10: Kontrollwerte der Leerprobe (Probe d)**

Protective Substanz	Probe d [ $\Delta E/\text{min}$ ]
Acetamid	0,035
O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol	0,036
Dextran	0,035
Dextran:Dimethylsulfoxid:Tetramethylharnstoff = 1:1:1	0,039
Dextransulfat	0,036
Diethanolamin	0,026
N,N'-Dimethylacetamid	0,030
N,N'-Dimethylacetamid:Tetramethylharnstoff = 1:1	0,039
1,3-Dimethylharnstoff	0,035
Ethanolamin	0,036
Ethylendiamin	0,037
Glycerin	0,037
Harnstoff	0,040
Hexamethylentetramin	0,034
D-Mannit	0,037
Methoxypolyethylenglykol	0,037
3-Methylpiperidin	0,040
1-Methyl-2-pyrrolidinon	0,038
Polyethylenglykol MG15000	0,034
Polyethylenglykol MG35000	0,036
Polyethylenglykoldimethylether 500	0,030
Polyethylenglykoldimethylether 2000	0,035
Polyethylenglykolmonobutylether	0,035
Polypropylenglykol	0,034
Polyvinylalkohol	0,037
Polyvinylpyrrolidon	0,027
Pyridin	0,038
D-Sorbit	0,037
Triethanolamin	0,038
Triethylamin	0,036

Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

Auch bei den Kontrollproben für die Teildenaturierung mit Erwärmung und Säure zeigten sich z.T. erhebliche Schwankungen im Vergleich der dreißig Kontrollen. Für die Berechnungen wurden die Werte wie oben erwähnt mit der Formel  $(d-c)/d * 100$  immer auf die Probe „d“ bezogen um die Schwankungen der verschiedenen Chargen auszugleichen.

Trotzdem waren bei den Ergebnissen der Kontrollproben für die Teildenaturierung der Lactatdehydrogenase durch Erwärmung (60min bei 60°C) Enzymhemmungen von 6,7% bis 52,6% zu vermerken (siehe Tabelle 11). Die durchschnittliche Hemmung betrug 25,0% der normalen Enzymaktivität. Der Versuchsaufbau war immer gleich und auch identisch zu jenem, der im Rahmen der Vorversuche zur Ermittlung der „optimalen“ Hemmung verwendet wurde. Die „optimale“ Hemmung lag in den Vorversuchen bei 35%. Bei gleichem Versuchsaufbau und der im Vergleich zu den Säureversuchen größeren Schwankungsbreite der Enzym-

hemmung muss die Fehlerquelle wohl am ehesten in der Verwendung des Wasserbades gesucht werden. Da die Proben bei immer gleicher Temperatur (60°C) in das Wasserbad eingebracht wurden, muss eine Inkonzanz der Temperaturanzeige, sprich des Thermometers oder eine mangelnde Durchmischung angenommen werden.

**Tabelle 11: Kontrollwerte der Denaturierung durch Erwärmung (Probe c)**

Protektive Substanz	Probe c [ $\Delta E/\text{min}$ ]	(d-c)/d * 100 [%]
Acetamid	0,023	34,3
O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol	0,028	22,2
Dextran	0,025	28,6
Dextran:Dimethylsulfoxid:Tetramethylharnstoff = 1:1:1	0,029	25,6
Dextransulfat	0,031	13,9
Diethanolamin	0,020	23,1
N,N'-Dimethylacetamid	0,028	6,7
N,N'-Dimethylacetamid:Tetramethylharnstoff = 1:1	0,029	25,6
1,3-Dimethylharnstoff	0,032	8,6
Ethanolamin	0,025	30,6
Ethylendiamin	0,018	51,4
Glycerin	0,023	37,8
Harnstoff	0,025	37,5
Hexamethylentetramin	0,028	17,6
D-Mannit	0,028	24,3
Methoxypolyethylenglykol	0,025	32,4
3-Methylpiperidin	0,028	30,0
1-Methyl-2-pyrrolidinon	0,028	26,3
Polyethylenglykol MG15000	0,027	20,6
Polyethylenglykol MG35000	0,027	25,0
Polyethylenglykoldimethylether 500	0,028	6,7
Polyethylenglykoldimethylether 2000	0,028	20,0
Polyethylenglykolmonobutylether	0,032	8,6
Polypropylenglykol	0,024	29,4
Polyvinylalkohol	0,031	16,2
Polyvinylpyrrolidon	0,020	25,9
Pyridin	0,033	13,2
D-Sorbit	0,028	24,3
Triethanolamin	0,018	52,6
Triethylamin	0,025	30,6

Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung

Bei den Kontrollproben für die Teildenaturierung der Lactatdehydrogenase durch Verwendung 0,046 M Perchlorsäure schwankten die Enzymhemmungen von 41,0% bis 67,6% (siehe Tabelle 12). Die durchschnittliche Hemmung betrug 57,6% der normalen Enzymaktivität. Auch hier war der Versuchsaufbau immer gleich und auch identisch zu jenem, der im Rahmen der Vorversuche zur Ermittlung der „optimalen“ Hemmung verwendet wurde. Die „optimale“ Verdünnung lag in den

Vorversuchen zwischen 1:7 und 1:8 der 0,33 M Perchlorsäure und wurde mit einer Hemmung von 32,1% bei einer Verdünnung von 1:7,2 gewählt.

Bemerkenswert ist allerdings, dass trotz der ungewollten vermehrten Hemmung durch Perchlorsäure sehr gute Ergebnisse in der Hemmungsaufhebung zu verzeichnen sind.

**Tabelle 12: Kontrollwerte der Denaturierung durch Perchlorsäure (Probe c)**

Protektive Substanz	Probe c [ $\Delta E/\text{min}$ ]	(d-c)/d * 100 [%]
Acetamid	0,019	45,7
O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol	0,014	61,1
Dextran	0,014	60,0
Dextran:Dimethylsulfoxid:Tetramethylharnstoff = 1:1:1	0,023	41,0
Dextransulfat	0,012	66,7
Diethanolamin	0,013	50,0
N,N'-Dimethylacetamid	0,012	60,0
N,N'-Dimethylacetamid:Tetramethylharnstoff = 1:1	0,023	41,0
1,3-Dimethylharnstoff	0,013	62,9
Ethanolamin	0,014	61,1
Ethylendiamin	0,017	54,1
Glycerin	0,019	48,6
Harnstoff	0,014	65,0
Hexamethylentetramin	0,015	55,9
D-Mannit	0,014	62,2
Methoxypolyethylenglykol	0,014	62,2
3-Methylpiperidin	0,015	62,5
1-Methyl-2-pyrrolidinon	0,015	60,5
Polyethylenglykol MG15000	0,016	52,9
Polyethylenglykol MG35000	0,016	55,6
Polyethylenglykoldimethylether 500	0,012	60,0
Polyethylenglykoldimethylether 2000	0,014	60,0
Polyethylenglykolmonobutylether	0,013	62,9
Polypropylenglykol	0,013	61,8
Polyvinylalkohol	0,012	67,6
Polyvinylpyrrolidon	0,013	51,9
Pyridin	0,017	55,3
D-Sorbit	0,014	62,2
Triethanolamin	0,017	55,3
Triethylamin	0,014	61,1

Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung

Um auch die Schwankungen im Bereich der Teildenaturierungen auszugleichen, wurden bei den Ergebnisberechnungen die Werte immer auf die jeweiligen Kontrollproben „c“, bestehend aus Kontrollserum (KS), Denaturans (D) und der Reaktionslösung (RL), bereinigt.

Eine Einflussgröße wurde in unseren Versuchen und auch Betrachtungen zur Vereinfachung des Versuchsaufbaus außer Acht gelassen. Dies ist die Abhängigkeit der Enzymreaktion vom pH-Wert. Dieser wird sowohl durch die Zugabe von Perchlorsäure zur Probe, als auch durch die Erwärmung der Probe verändert und wurde von uns nicht bestimmt. Möglicherweise mögen die beobachteten Ergebnisschwankungen zum Teil auch auf pH-Veränderungen zurückzuführen sein.

Bei Betrachtung der Ergebnisse ist ebenso zu bedenken, dass es sich in der vorliegenden Arbeit um eine Art Trendsuche handelt. Da jeweils nur zumeist drei Parallelansätze für die Proben „a“ und „b“ und zumeist vier Parallelansätze für die Proben „c“ und „d“ angefertigt wurden, wurden die Berechnungen keinem statistischen Programm unterzogen. Die Ergebnisse repräsentieren lediglich Tendenzen, die zur genaueren Prüfung einer weiteren Arbeit mit entsprechend mehr Parallelansätzen bedürfen.

## 6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Erfassung des etwaigen protektiven Effekts verschiedener Testsubstanzen auf physiologisch vorkommende Proteine. Lactatdehydrogenase wurde als Vertreter von Enzymen gewählt, deren aktives Zentrum bekanntlich besonders empfindlich gegenüber schädlichen Einflüssen ist, wie zum Beispiel Hitze oder Säure. Die Teildenaturierung des Enzyms wurde durch Erwärmung 60 Minuten bei 60°C und mit 0,046 molarer Perchlorsäure erreicht. Die Lactatdehydrogenase sollte mittels dreißig auszutestenden sogenannten protektiven Substanzen (Substanz P) vor der Denaturierung ganz oder teilweise geschützt werden. Zudem wurde versucht, die Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms Lactatdehydrogenase durch die gleichen Substanzen im Sinne einer Reaktionsförderung zu beschleunigen.

Im Sinne einer groben Suche nach geeigneten protektiven Substanzen wurden soweit nicht anders angegeben jeweils drei parallele Ansätze verwendet. Es wurden hieraus jeweils die Mittelwerte gebildet und auf eine statistische Auswertung verzichtet. Im Sinne dieses „Screenings“ wurden die protektiven Substanzen zudem jeweils in vier verschiedenen Verdünnungen (1:10, 1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>5</sup>, 1:10<sup>6</sup>) verwendet.

Im Rahmen dieser Trendsuche zeigten sich bei mehreren ausgetesteten Substanzen reaktionsfördernde Wirkungen bei alleiniger Mischung der Lactatdehydrogenase mit der Substanz P. Ebenso konnten protektive Wirkungen verschiedener Substanzen bei den Denaturierungsversuchen beobachtet werden. Diese reichten von einer partiellen Verhinderung der Denaturierung, über eine komplette Hemmungsaufhebung bis zu einer Reaktionsförderung des Enzyms.

Vielfach waren bei den jeweiligen Versuchsaufbauten Substanzen in verschiedenen Verdünnungen erfolgreich. Überdies konnten einige Substanzen, teils in mehreren Verdünnungen, sowohl die Reaktionsgeschwindigkeit der Lactatdehydrogenase beschleunigen, als auch die Teildenaturierung durch Säure oder Hitze partiell aufheben. Insgesamt vier Substanzen konnten mit jeweils zwei Verdünnungen eine Reaktionsförderung der Lactatdehydrogenaseaktivität von mindestens 15% und eine Hemmungsaufhebung von mindestens 25% sowohl im Erwärmungs-, als auch im Säureversuch erreichen.

Fasst man die Ergebnisse zusammen, so kristallisieren sich neun besonders erfolgreiche P-Substanzen heraus. Diese sind:

- O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol
- Dextran
- Diethanolamin
- N,N'-Dimethylacetamid
- Ethanolamin
- D-Mannit
- Methoxypolyethylenglykol
- Polyethylenglykoldimethylether 2000
- Polyvinylpyrrolidon

Da es sich bei dieser Arbeit um eine Art Trendsuche handelt, sollte zur genaueren Prüfung beziehungsweise zur Verifizierung der Ergebnisse eine weitere Arbeit mit entsprechend mehr Parallelansätzen und statistischer Auswertung durchgeführt werden. Es empfiehlt sich, vor allem die oben genannten neun Substanzen in dieser Weise erneut zu betrachten.

## **Danksagung**

Für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit möchte ich mich bei dem Direktor der Urologischen Klinik im Klinikum Rechts der Isar, Herrn Prof. Dr. med. R. Hartung, sehr herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. P. Leskovar, der stets bereit war auftretende Probleme ausführlich zu besprechen, und der mich bei meiner Arbeit nicht nur exzellent betreute, sondern mir bis zum Schluss motivierend und unterstützend zur Seite stand.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern des Urologischen Forschungslabors für die gute Zusammenarbeit und die stete Hilfsbereitschaft bei organisatorischen und technischen Problemen.

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Versuchsreihe zur optimalen Hemmung durch Erwärmung.....	30
Tabelle 2:	Versuchsreihe 1 zur optimalen Hemmung durch Perchlorsäure .....	31
Tabelle 3:	Versuchsreihe 2 zur optimalen Hemmung durch Perchlorsäure .....	31
Tabelle 4:	Versuchsreihe 3 zur optimalen Hemmung durch Perchlorsäure .....	31
Tabelle 5:	Die protektive Substanz ohne Einfluss auf die Lactatdehydrogenaseaktivität .....	35
Tabelle 6:	Die protektive Substanz ohne Einfluss auf die durch Erwärmung verursachte Hemmung der Lactatdehydrogenaseaktivität .....	40
Tabelle 7:	Die protektive Substanz ohne Einfluss auf die durch Perchlorsäure verursachte Hemmung der Lactatdehydrogenaseaktivität .....	47
Tabelle 8:	Die zehn besten Ergebnisse bei der Steigerung der Enzymaktivität durch die protektive Substanz.....	50
Tabelle 9:	Die erfolgreichsten protektiven Substanzen.....	57
Tabelle 10:	Kontrollwerte der Leerprobe (Probe d) .....	59
Tabelle 11:	Kontrollwerte der Denaturierung durch Erwärmung (Probe c) .....	60
Tabelle 12:	Kontrollwerte der Denaturierung durch Perchlorsäure (Probe c).....	61
Tabelle 13:	Acetamid (0,8g/20ml) Denaturans = Erwärmung (60°C,60min) .....	74
Tabelle 14:	Acetamid (0,8g/20ml) Denaturans = Perchlorsäure (0,046M).....	75
Tabelle 15:	O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol MG230 (pur) Denaturans = Erwärmung (60°C,60min).....	76
Tabelle 16:	O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol MG230 (pur) Denaturans = Perchlorsäure (0,046M) .....	76
Tabelle 17:	Dextran MG500.000 (0,8g/20ml) Denaturans = Erwärmung (60°C,60min).....	77
Tabelle 18:	Dextran MG500.000 (0,8g/20ml) Denaturans = Perchlorsäure (0,046M) .....	77
Tabelle 19:	Dextran MG2.000.000 (0,8g/20ml) : Dimethylsulfoxid (20%) : Tetramethylharnstoff (20%;1:10 vorverd.) = 1:1:1 Denaturans = Erwärmung (60°C,60min) .....	78
Tabelle 20:	Dextran MG2.000.000 (0,8g/20ml) : Dimethylsulfoxid (20%) : Tetramethylharnstoff (20%;1:10 vorverd.) = 1:1:1 Denaturans = Perchlorsäure (0,046M) .....	79
Tabelle 21:	Dextransulfat (0,8g/20ml) Denaturans = Erwärmung (60°C,60min) .	80
Tabelle 22:	Dextransulfat (0,8g/20ml) Denaturans = Perchlorsäure (0,046M) ....	80
Tabelle 23:	Diethanolamin (1:10 vorverdünnt) Denaturans = Erwärmung (60°C,60min).....	81
Tabelle 24:	Diethanolamin (1:10 vorverdünnt) Denaturans = Perchlorsäure (0,046M) .....	81
Tabelle 25:	N,N'-Dimethylacetamid (1:10 vorverdünnt) Denaturans = Erwärmung (60°C,60min) .....	82
Tabelle 26:	N,N'-Dimethylacetamid (1:10 vorverdünnt) Denaturans = Perchlorsäure (0,046M) .....	82
Tabelle 27:	N,N'-Dimethylacetamid (1:10 vorverd.) : Tetramethylharnstoff (20%;1:10 vorverd.) = 1:1 Denaturans = Erwärmung (60°C,60min) .	83

Tabelle 28:	N,N'-Dimethylacetamid (1:10 vorverd.) : Tetramethylharnstoff (20%;1:10 vorverd.) = 1:1 Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)....	84
Tabelle 29:	1,3-Dimethylharnstoff (0,8g/20ml) Denaturans = Erwärmung (60°C,60min).....	85
Tabelle 30:	1,3-Dimethylharnstoff (0,8g/20ml) Denaturans = Perchlorsäure (0,046M) .....	85
Tabelle 31:	Ethanolamin (0,8g/20ml) Denaturans = Erwärmung (60°C,60min) ..	86
Tabelle 32:	Ethanolamin (0,8g/20ml) Denaturans = Perchlorsäure (0,046M) .....	86
Tabelle 33:	Ethylendiamin (0,8g/20ml) Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)	87
Tabelle 34:	Ethylendiamin (0,8g/20ml) Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)...	87
Tabelle 35:	Glycerin (1:10 vorverdünnt) Denaturans = Erwärmung (60°C,60min).....	88
Tabelle 36:	Glycerin (1:10 vorverdünnt) Denaturans = Perchlorsäure (0,046M) .	88
Tabelle 37:	Harnstoff (0,8g/20ml) Denaturans = Erwärmung (60°C,60min).....	89
Tabelle 38:	Harnstoff (0,8g/20ml) Denaturans = Perchlorsäure (0,046M) .....	89
Tabelle 39:	Hexamethylentetramin (0,8g/20ml) Denaturans = Erwärmung (60°C,60min).....	90
Tabelle 40:	Hexamethylentetramin (0,8g/20ml) Denaturans = Perchlorsäure (0,046M) .....	90
Tabelle 41:	D-Mannit (0,8g/20ml) Denaturans = Erwärmung (60°C,60min).....	91
Tabelle 42:	D-Mannit (0,8g/20ml) Denaturans = Perchlorsäure (0,046M) .....	91
Tabelle 43:	Methoxypolyethylenglykol MG2.000 (0,8g/20ml) Denaturans = Erwärmung (60°C,60min) .....	92
Tabelle 44:	Methoxypolyethylenglykol MG2.000 (0,8g/20ml) Denaturans = Perchlorsäure (0,046M) .....	92
Tabelle 45:	3-Methylpiperidin (1:10 vorverdünnt) Denaturans = Erwärmung (60°C,60min).....	93
Tabelle 46:	3-Methylpiperidin (1:10 vorverdünnt) Denaturans = Perchlorsäure (0,046M) .....	94
Tabelle 47:	1-Methyl-2-pyrrolidinon (1:10 vorverdünnt) Denaturans = Erwärmung (60°C,60min) .....	95
Tabelle 48:	1-Methyl-2-pyrrolidinon (1:10 vorverdünnt) Denaturans = Perchlorsäure (0,046M) .....	95
Tabelle 49:	Polyethylenglykol MG15.000 (0,8g/20ml) Denaturans = Erwärmung (60°C,60min).....	96
Tabelle 50:	Polyethylenglykol MG15.000 (0,8g/20ml) Denaturans = Perchlorsäure (0,046M) .....	96
Tabelle 51:	Polyethylenglykol MG35.000 (0,8g/20ml) Denaturans = Erwärmung (60°C,60min).....	97
Tabelle 52:	Polyethylenglykol MG35.000 (0,8g/20ml) Denaturans = Perchlorsäure (0,046M) .....	97
Tabelle 53:	Polyethylenglykoldimethylether 500 (1:10 vorverdünnt) Denaturans = Erwärmung (60°C,60min) .....	98
Tabelle 54:	Polyethylenglykoldimethylether 500 (1:10 vorverdünnt) Denaturans = Perchlorsäure (0,046M) .....	98
Tabelle 55:	Polyethylenglykoldimethylether 2000 (0,8g/20ml) Denaturans = Erwärmung (60°C,60min) .....	99
Tabelle 56:	Polyethylenglykoldimethylether 2000 (0,8g/20ml) Denaturans = Perchlorsäure (0,046M) .....	99

Tabelle 57:	Polyethylenglykolmonobutylether (1:10 vorverdünnt) Denaturans = Erwärmung (60°C,60min) .....	100
Tabelle 58:	Polyethylenglykolmonobutylether (1:10 vorverdünnt) Denaturans = Perchlorsäure (0,046M) .....	100
Tabelle 59:	Polypropylenglykol MG1950-2050 (1:20 vorverdünnt) Denaturans = Erwärmung (60°C,60min) .....	101
Tabelle 60:	Polypropylenglykol MG1950-2050 (1:20 vorverdünnt) Denaturans = Perchlorsäure (0,046M) .....	101
Tabelle 61:	Polyvinylalkohol MG72.000 (0,8g/20ml) Denaturans = Erwärmung (60°C,60min).....	102
Tabelle 62:	Polyvinylalkohol MG72.000 (0,8g/20ml) Denaturans = Perchlorsäure (0,046M) .....	102
Tabelle 63:	Polyvinylpyrrolidon MG40.000 (0,8g/20ml) Denaturans = Erwärmung (60°C,60min) .....	103
Tabelle 64:	Polyvinylpyrrolidon MG40.000 (0,8g/20ml) Denaturans = Perchlorsäure (0,046M) .....	103
Tabelle 65:	Pyridin (1:10 vorverdünnt) Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)	104
Tabelle 66:	Pyridin (1:10 vorverdünnt) Denaturans = Perchlorsäure (0,046M) .	104
Tabelle 67:	D-Sorbit (0,8g/20ml) Denaturans = Erwärmung (60°C,60min) .....	105
Tabelle 68:	D-Sorbit (0,8g/20ml) Denaturans = Perchlorsäure (0,046M).....	105
Tabelle 69:	Triethanolamin (0,8g/20ml) Denaturans = Erwärmung (60°C,60min).....	106
Tabelle 70:	Triethanolamin (0,8g/20ml) Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)	106
Tabelle 71:	Triethylamin (0,8g/20ml) Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)	107
Tabelle 72:	Triethylamin (0,8g/20ml) Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)...	107

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Das aktive Zentrum von LDH ([15] S. 187) .....	18
Abbildung 2:	Steigerung der Lactatdehydrogenaseaktivität durch die protektive Substanz.....	34
Abbildung 3:	Hemmung der Lactatdehydrogenaseaktivität durch die protektive Substanz.....	36
Abbildung 4:	Partielle oder komplette Aufhebung der durch Erwärmung verursachten Hemmung der Lactatdehydrogenaseaktivität mittels der protektiven Substanz .....	38
Abbildung 5:	Über die Hemmungsaufhebung hinausgehende Lactatdehydrogenaseförderung durch die protektive Substanz im Erwärmungsversuch .....	39
Abbildung 6:	Verstärkung der durch die Erwärmung hervorgerufenen Hemmung der Lactatdehydrogenaseaktivität durch die protektive Substanz.....	41
Abbildung 7:	Partielle oder komplette Aufhebung der durch Perchlorsäure verursachten Hemmung der Lactatdehydrogenaseaktivität mittels der protektiven Substanz .....	44
Abbildung 8:	Über die Hemmungsaufhebung hinausgehende Lactatdehydrogenaseförderung durch die protektive Substanz im Perchlorsäureversuch .....	46
Abbildung 9:	Verstärkung der durch Perchlorsäure hervorgerufenen Hemmung der Lactatdehydrogenaseaktivität durch die protektive Substanz.....	48
Abbildung 10:	Diagramm zu den erfolgreichsten protektiven Substanzen.....	56

## Literaturverzeichnis

- [1] Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S.: „Immunologie“; Hans Huber Verlag, Bern / Göttingen, 1996, 1. Auflage
- [2] Adams D.O., Hamilton T.A.: „Macrophages as Destructive Cells in Host Defense“, in „Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates“, Gallin J.I., Goldstein I.M., Snyderman R.; Raven Press, Ltd., New York, 1992, 2nd Edition, 637-662
- [3] Ahrweiler P.M., Frieden C.: „Effects of point mutations in a hinge region on the stability, folding, and enzymatic activity of Escherichia coli dihydrofolate reductase.“; Biochemistry 30 (1991) 7801-7809
- [4] Anfinsen C.B., Haber E., Sela M., White F.M.: „The kinetics of formation of Native Ribonuclease during oxidation of the Reduced Polypeptide chain.“; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 47 (1961) 1309-1314
- [5] Anfinsen C.B.: „Principles that govern the folding of protein chains.“; Science 181 (1973) 223-230
- [6] Beato M.: „Gene regulation by steroid hormones.“; Cell 56 (1989) 335-344
- [7] Beckmann R.P., Mizzen L.E., Welch W.J.: „Interaction of hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly events.“; Science 248 (1990) 850-854
- [8] Bloos F., Reinhart K.: „Antiinflammatorische Therapie in der Sepsis: wann und für wen?“; Chirurg 73 (2002) 1087-1092
- [9] Bullerjahn A.M., Freisheim J.H.: „Site-directed deletion mutants of a carboxyl-terminal region of human dihydrofolate reductase.“; J. Biol. Chem. 267 (1992) 864-870
- [10] Cavaillon J.-M.: „Les cytokines de l'inflammation.“; C. R. Soc. Biol. 189 (1995) 531-544
- [11] Chun P.W.: „Application of Planck-Benzinger Relationships to Biology.“; Methods Enzymol. 295 (1998) 227-268
- [12] Clarke A.R., Wigley D.B., Chia W.N., Barstow D., Atkinson T., Holbrook J.J.: „Site-directed mutagenesis reveals role of mobile arginine residue in lactate dehydrogenase catalysis.“; Nature 324 (1986) 699-702
- [13] Cortes A., Emery D.C., Halsall D.J., Jackson R.M., Clarke A.R., Holbrook J.J.: „Charge balance in the (alpha)-hydroxyacid dehydrogenase vacuole: An acid test.“; Protein Sci. 1 (1992) 892-901
- [14] Deng H., Burgner J., Callender R.: „Raman Spectroscopic Studies of the Effects of Substrate Binding on Coenzymes Bound to Lactate Dehydrogenase.“; J. Am. Chem. Soc. 114 (1992) 7997-8003
- [15] Deng H., Callender R.: „Raman Spectroscopic Studies of the Structures, Energetics and Bond Distortions of Substrates Bound to Enzymes.“; Methods Enzymol. 308 (1999) 176-201
- [16] Dong Q., Liu F., Myers A.M., Fromm H.J.: „Evidence for an Arginine Residue at the Substrate Binding Site of Escherichia coli Adenylosuccinate Synthetase as Studied by Chemical Modification and Site-directed Mutagenesis.“; J. Biol. Chem. 266 (1991) 12228-12233
- [17] Dong Q., Fromm H.J.: „Chemical modification of adenylosuccinate synthetase from Escherichia coli by pyridoxal 5'-phosphate. Identification of an active site lysyl residue.“; J. Biol. Chem. 265 (1990) 6235-6240

- [18] Ellis R.J., van der Vies S.M.: „Molecular chaperones“; *Annu. Rev. Biochem.* 60 (1991) 321-347
- [19] Epstein C.J., Goldberger R.F., Anfinsen C.B.: „The genetic control of tertiary protein structure: Studies with model systems.“; *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 27 (1963) 439-449
- [20] Ferlat S., Favier A.: „Facteur nécrosant des tumeurs (TNF) et radicaux libres de l'oxygène: conséquences potentielles pour l'immunité.“; *C. R. Soc. Biol.* 187 (1993) 296-307
- [21] Fersht A.R.: „Dissection of the structure and activity of the tyrosyl-tRNA synthetase by site-directed mutagenesis.“; *Biochemistry* 26 (1987) 8031-8037
- [22] Gallin J.I., Goldstein I.M., Snyderman R.: „Overview“, in „Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates“, Gallin J.I., Goldstein I.M., Snyderman R.; Raven Press, Ltd., New York, 1992, 2nd Edition, 1-4
- [23] Gallin J.I.: „Disorders of Phagocytic Cells“, in „Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates“, Gallin J.I., Goldstein I.M., Snyderman R.; Raven Press, Ltd., New York, 1992, 2nd Edition, 859-874
- [24] Gallin J.I.: „Inflammation“, in „Fundamental Immunology“, Paul W.E.; Raven Press, Ltd., New York, 1993, 3rd Edition, 1015-1032
- [25] Gatenby A.A., Viitanen P.V.: „Structural and functional aspects of chaperonin-mediated protein folding.“; *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45 (1994) 469-491
- [26] Georgopoulos C., Welch W.J.: „Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones.“; *Annu. Rev. Cell Biol.* 9 (1993) 601-634
- [27] Gerlt J.A.: „Relationships between Enzymatic Catalysis and Active Site Structure Revealed by Applications of Site-Directed Mutagenesis.“; *Chem. Rev.* 87 (1987) 1079
- [28] Gething M.J., Sambrook J.: „Protein folding in the cell.“; *Nature* 355 (1992) 33-45
- [29] Greenberg S., Silverstein S.C.: „Phagocytosis“, in „Fundamental Immunology“, Paul W.E.; Raven Press, Ltd., New York, 1993, 3rd Edition, 941-964
- [30] Hakim J.: „Formes réactives de l'oxygène et inflammation.“; *C. R. Soc. Biol.* 187 (1993) 286-295
- [31] Hemmingsen S.M., Woolford C., van der Vies S.M., Tilly K., Dennis D.T., Georgopoulos C.P., Hendrix R.W., Ellis R.J.: „Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly.“; *Nature* 333 (1988) 330-334
- [32] Hendrick J.P., Hartl F.U.: „Molecular chaperone functions of heat-shock proteins.“; *Annu. Rev. Biochem.* 62 (1993) 349-384
- [33] Henson P.M., Henson J.E., Fittschen C., Bratton D.L., Riches D.W.H.: „Degranulation and Secretion by Phagocytic Cells“, in „Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates“, Gallin J.I., Goldstein I.M., Snyderman R.; Raven Press, Ltd., New York, 1992, 2nd Edition, 511-539
- [34] Hibler D.W., Stolorow N.J., Reynolds M.A., Gerlt J.A., Wilde J.A., Bolton P.H.: „Site-directed Mutants of Staphylococcal Nuclease. Detection and Localization by Proton NMR Spectroscopy of Conformational Changes Accompanying Substitutions for Glutamic Acid-43.“; *Biochemistry* 26 (1987) 6278-6286

- [35] Hightower L.E.: „Cultured animal cells exposed to amino acid analogues or puromycin rapidly synthesize several polypeptides.“; *J.Cell Physiol.* 102 (1980) 407-427
- [36] Höflich C., Volk H.-D.: „Immunmodulation in der Sepsis.“; *Chirurg* 73 (2002) 1100-1104
- [37] Horwich A.L., Willison K.R.: „Protein folding in the cell: functions of two families of molecular chaperone , hsp 60 and TF55-TCP1.“; *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol.Sci.* 339 (1993) 313-326
- [38] Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M.: „Immunologie“; Gustav Fischer Verlag, Heidelberg / Berlin, 2002, 5. Auflage
- [39] Jencks W.P.: „Binding energy, specificity and enzymic catalysis - The circe effect.“; *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 43 (1975) 219-410
- [40] Kaufmann S.H.E.: „Immunity to Intracellular Bacteria“, in „Fundamental Immunology“, Paul W.E.; Raven Press, Ltd., New York, 1993, 3rd Edition, 1251-1286
- [41] Klebanoff S.J.: „Oxygen Metabolites from Phagocytes“, in „Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates“, Gallin J.I., Goldstein I.M., Snyderman R.; Raven Press, Ltd., New York, 1992, 2nd Edition, 541-588
- [42] Kujath P., Bouchard R., Shekarriz H., Eckmann C.: „Antikoagulation in der Sepsistherapie: Korrektur der Mikrozirkulation oder Ansatz an der Endothelzellefunktion?“; *Chirurg* 73 (2002) 1093-1099
- [43] Lefkowitz D.L., Mills K., Lefkowitz S.S., Bollen A., Moguilevsky N.: „Neutrophil-macrophage interaction: a paradigm for chronic inflammation.“; *Med. Hypotheses* 44 (1995) 58-62
- [44] Li L., Falzone C.J., Wright P.E., Benkovic S.J.: „Functional role of a mobile loop of Escherichia coli dihydrofolate reductase in transition-state stabilization.“; *Biochemistry* 31 (1992) 7826-7833
- [45] Löffler G., Petrides P.E.: „Physiologische Chemie: Lehrbuch der medizinischen Biochemie und Pathobiochemie für Studierende und Ärzte“; Springer Verlag, Berlin / Heidelberg, 1988, 4. Auflage
- [46] Mas M.T., Bailey J.M., Resplandor Z.E.: „Site-directed mutagenesis of histidine-388 in the hinge region of yeast 3-phosphoglycerate kinase: effects on catalytic activity and activation by sulfate.“; *Biochemistry* 27 (1988) 1168-1172
- [47] Nelson D., Cox M.: „Lehninger Biochemie“, „Die dreidimensionale Struktur von Proteinen“; Springer Verlag, Berlin / Heidelberg, 2001, 3. Auflage, 165-211
- [48] Ohshima H., Bartsch H.: „Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis.“; *Mutat.Res.* 305 (1994) 253-264
- [49] Pan Q.W., Tanase S., Fukumoto Y., Nagashima F., Rhee S., Rogers P.H., Arnone A., Morino Y.: „Functional roles of valine 37 and glycine 38 in the mobile loop of porcine cytosolic aspartate aminotransferase.“; *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 24758-24765
- [50] Park S., Liu G., Topping T.B., Cover W.H., Randall L.L.: „Modulation of folding pathways of exported proteins by the leader sequence.“; *Science* 239 (1988) 1033-1035
- [51] Parnham M.J., Feige U.: „Meeting Report: Structural and functional properties of heat-shock proteins in inflammation and immunity.“; *Agents Actions* 35 (1992) 34-36

- [52] Patel N.B.: „Nitric Oxide: A New Biological Messenger Molecule.“; East Afr.Med.J. 71 (1994) 75-76
- [53] Paul W.E.: „The Immune System: An Introduction“, in „Fundamental Immunology“, Paul W.E.; Raven Press, Ltd., New York, 1993, 3rd Edition, 1-20
- [54] Pelham H.R.B.: „Speculations on the functions of the major heat shock and glucose regulated proteins.“; Cell 46 (1986) 959-961
- [55] Perutz M.F.: „Introductory Lecture: What are Enzyme Structures telling Us?“; Faraday Discuss. 93 (1992) 1-11
- [56] Plapp B.V.: „Site-Directed Mutagenesis: A Tool for Studying Enzyme Catalysis.“; Methods Enzymol. 249 (1995) 91-119
- [57] Poland B.W., Silva M.M., Serra M.A., Cho Y., Kim K.H., Harris E.M., Honzatko R.B.: „Crystal structure of adenylosuccinate synthetase from Escherichia coli. Evidence for convergent evolution of GTP-binding domains.“; J. Biol. Chem. 268 (1993) 25334-25342
- [58] Polla B.S., Cossarizza A.: „Stress proteins in inflammation“, in „Stress-Inducible Cellular Responses“, Feige U., Morimoto R.I., Yahara I., Polla B.; Birkhäuser Verlag, Basel, 1996, 375-391
- [59] Rehm H.-J., Reed G.: „Biotechnology : A Multi-Volume Comprehensive Treatise“; Wiley-VCH, Weinheim, 1995, 2nd. Edition, Vol.9,
- [60] Rothman J.E.: „Polypeptide chain binding protein: catalysts of protein folding and related processes in cells.“; Cell 59 (1990) 591-601
- [61] Rotrosen D.: „The Respiratory Burst Oxidase“, in "Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates", Gallin J.I., Goldstein I.M., Snyderman R.; Raven Press, Ltd., New York, 1992, 2nd Edition, 589-601
- [62] Schwartz R.S.: „Autoimmunity and Autoimmune Diseases“, in „Fundamental Immunology“, Paul W.E.; Raven Press, Ltd., New York, 1993, 3rd Edition, 1033-1097
- [63] Sprang S., Standing T., Fletterick R.J., Stroud R.M., Finer-Moore J., Xuong N.H., Hamlin R., Rutter W.J., Craik C.S.: „The three-dimensional structure of Asn 102 mutant of trypsin: role of Asp 102 in serine protease catalysis.“; Science 237 (1987) 905-909
- [64] Stohs S.J.: „The Role of Free Radicals in Toxicity and Disease.“; J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol. 6 (1995) 205-228
- [65] Stryer L.: „Biochemie“, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft, Heidelberg / Berlin, 1. Auflage, 1990
- [66] Taguchi H., Konishi J., Ishii N., Yoshida M.: „A chaperonin from a thermophilic bacterium, Thermus thermophilus, that controls refoldings of several thermophilic enzymes.“; J. Biol. Chem. 266 (1991) 22411-22418
- [67] Taguchi H., Yoshida M.: „Chaperonin from Thermus thermophilus can protect several enzymes from irreversible heat denaturation by capturing denaturation intermediate.“; J. Biol. Chem. 268 (1993) 5371-5375
- [68] Voet D., Voet J.G.: „Biochemie“, „Faltung, Dynamik und strukturelle Evolution der Proteine“; VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1. Auflage, 1992, 189-205
- [69] Welch W.J., Winfield J.B.: „The Stress Response and the Immune System“, in „Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates“, Gallin J.I., Goldstein I.M., Snyderman R.; Raven Press, Ltd., New York, 1992, 2nd Edition, 841-857

# Anhang

**Tabelle 13: Acetamid (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,029	0,024	0,026	0,024
	b	[ΔE/min]	0,037	0,037	0,041	0,038
	c	[ΔE/min]	0,023	0,023	0,023	0,023
	d	[ΔE/min]	0,035	0,035	0,035	0,035
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	65,7	65,7	65,7	65,7
	b/d * 100	[%]	105,7	105,7	117,1	108,6
	a/d * 100	[%]	82,9	68,6	74,3	68,6
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	34,3	34,3	34,3	34,3
	(d-b)/d * 100	[%]	-5,7	-5,7	-17,1	-8,6
	(d-a)/d * 100	[%]	17,1	31,4	25,7	31,4
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	50,0	8,3	25,0	8,3

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

**Tabelle 14: Acetamid (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,021	0,021	0,026	0,020
	b	[ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,037	0,037	0,041	0,038
	c	[ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,019	0,019	0,019	0,019
	d	[ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,035	0,035	0,035	0,035
Enzym-Aktivität in %	$c/d * 100$	[%]	54,3	54,3	54,3	54,3
	$b/d * 100$	[%]	105,7	105,7	117,1	108,6
	$a/d * 100$	[%]	60,0	60,0	74,3	57,1
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	$(d-c)/d * 100$	[%]	45,7	45,7	45,7	45,7
	$(d-b)/d * 100$	[%]	-5,7	-5,7	-17,1	-8,6
	$(d-a)/d * 100$	[%]	40,0	40,0	25,7	42,9
Aufhebung der Hemmung in %	$(a-c)/(d-c) * 100$	[%]	12,5	12,5	43,8	6,3

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

**Tabelle 15: O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol MG230 (pur)**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,003	0,023	0,022	0,026
	b	[ΔE/min]	0,019	0,046	0,045	0,045
	c	[ΔE/min]	0,028	0,028	0,028	0,028
	d	[ΔE/min]	0,036	0,036	0,036	0,036
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	77,8	77,8	77,8	77,8
	b/d * 100	[%]	52,8	127,8	125,0	125,0
	a/d * 100	[%]	8,3	63,9	61,1	72,2
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	22,2	22,2	22,2	22,2
	(d-b)/d * 100	[%]	47,2	-27,8	-25,0	-25,0
	(d-a)/d * 100	[%]	91,7	36,1	38,9	27,8
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	-312,5	-62,5	-75,0	-25,0

**Tabelle 16: O,O'-bis(2-Aminopropyl)-polypropylenglykol MG230 (pur)**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,026	0,031	0,026	0,025
	b	[ΔE/min]	0,019	0,046	0,045	0,045
	c	[ΔE/min]	0,014	0,014	0,014	0,014
	d	[ΔE/min]	0,036	0,036	0,036	0,036
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	38,9	38,9	38,9	38,9
	b/d * 100	[%]	52,8	127,8	125,0	125,0
	a/d * 100	[%]	72,2	86,1	72,2	69,4
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	61,1	61,1	61,1	61,1
	(d-b)/d * 100	[%]	47,2	-27,8	-25,0	-25,0
	(d-a)/d * 100	[%]	27,8	13,9	27,8	30,6
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	54,5	77,3	54,5	50,0

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

**Tabelle 17: Dextran MG500.000 (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,026	0,029	0,021	0,023
	b	[ΔE/min]	0,038	0,045	0,046	0,049
	c	[ΔE/min]	0,025	0,025	0,025	0,025
	d	[ΔE/min]	0,035	0,035	0,035	0,035
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	71,4	71,4	71,4	71,4
	b/d * 100	[%]	108,6	128,6	131,4	140,0
	a/d * 100	[%]	74,3	82,9	60,0	65,7
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	28,6	28,6	28,6	28,6
	(d-b)/d * 100	[%]	-8,6	-28,6	-31,4	-40,0
	(d-a)/d * 100	[%]	25,7	17,1	40,0	34,3
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	10,0	40,0	-40,0	-20,0

**Tabelle 18: Dextran MG500.000 (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,022 <sup>1</sup>	0,015	0,022	0,031
	b	[ΔE/min]	0,038	0,045	0,046	0,049
	c	[ΔE/min]	0,014	0,014	0,014	0,014
	d	[ΔE/min]	0,035	0,035	0,035	0,035
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	40,0	40,0	40,0	40,0
	b/d * 100	[%]	108,6	128,6	131,4	140,0
	a/d * 100	[%]	62,9	42,9	62,9	88,6
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	60,0	60,0	60,0	60,0
	(d-b)/d * 100	[%]	-8,6	-28,6	-31,4	-40,0
	(d-a)/d * 100	[%]	37,1	57,1	37,1	11,4
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	38,1	4,8	38,1	81,0

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

<sup>1</sup> 2 Werte

**Tabelle 19: Dextran MG2.000.000 (0,8g/20ml) : Dimethylsulfoxid (20%) : Tetramethylharnstoff (20%;1:10 vorverd.) = 1:1:1**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,027	0,031	0,033	0,031
	b	[ΔE/min]	0,043	0,040	0,044	0,039
	c	[ΔE/min]	0,029	0,029	0,029	0,029
	d	[ΔE/min]	0,039	0,039	0,039	0,039
Enzym-Aktivität in %	$c/d * 100$	[%]	74,4	74,4	74,4	74,4
	$b/d * 100$	[%]	110,3	102,6	112,8	100,0
	$a/d * 100$	[%]	69,2	79,5	84,6	79,5
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	$(d-c)/d * 100$	[%]	25,6	25,6	25,6	25,6
	$(d-b)/d * 100$	[%]	-10,3	-2,6	-12,8	0,0
	$(d-a)/d * 100$	[%]	30,8	20,5	15,4	20,5
Aufhebung der Hemmung in %	$(a-c)/(d-c) * 100$	[%]	-20,0	20,0	40,0	20,0

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

**Tabelle 20: Dextran MG2.000.000 (0,8g/20ml) : Dimethylsulfoxid (20%) : Tetramethylharnstoff (20%;1:10 vorverd.) = 1:1:1**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,023	0,024	0,027	0,028
	b	[ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,043	0,040	0,044	0,039
	c	[ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,023	0,023	0,023	0,023
	d	[ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,039	0,039	0,039	0,039
Enzym-Aktivität in %	$c/d * 100$	[%]	59,0	59,0	59,0	59,0
	$b/d * 100$	[%]	110,3	102,6	112,8	100,0
	$a/d * 100$	[%]	59,0	61,5	69,2	71,8
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	$(d-c)/d * 100$	[%]	41,0	41,0	41,0	41,0
	$(d-b)/d * 100$	[%]	-10,3	-2,6	-12,8	0,0
	$(d-a)/d * 100$	[%]	41,0	38,5	30,8	28,2
Aufhebung der Hemmung in %	$(a-c)/(d-c) * 100$	[%]	0,0	6,3	25,0	31,3

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

**Tabelle 21: Dextransulfat (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,030	0,032	0,033	0,032
	b	[ΔE/min]	0,037	0,038	0,038	0,041
	c	[ΔE/min]	0,031	0,031	0,031	0,031
	d	[ΔE/min]	0,036	0,036	0,036	0,036
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	86,1	86,1	86,1	86,1
	b/d * 100	[%]	102,8	105,6	105,6	113,9
	a/d * 100	[%]	83,3	88,9	91,7	88,9
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	13,9	13,9	13,9	13,9
	(d-b)/d * 100	[%]	-2,8	-5,6	-5,6	-13,9
	(d-a)/d * 100	[%]	16,7	11,1	8,3	11,1
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	-20,0	20,0	40,0	20,0

**Tabelle 22: Dextransulfat (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,004	0,018	0,025	0,023
	b	[ΔE/min]	0,037	0,038	0,038	0,041
	c	[ΔE/min]	0,012 <sup>2</sup>	0,012 <sup>2</sup>	0,012 <sup>2</sup>	0,012 <sup>2</sup>
	d	[ΔE/min]	0,036	0,036	0,036	0,036
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	33,3	33,3	33,3	33,3
	b/d * 100	[%]	102,8	105,6	105,6	113,9
	a/d * 100	[%]	11,1	50,0	69,4	63,9
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	66,7	66,7	66,7	66,7
	(d-b)/d * 100	[%]	-2,8	-5,6	-5,6	-13,9
	(d-a)/d * 100	[%]	88,9	50,0	30,6	36,1
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	-33,3	25,0	54,2	45,8

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

<sup>2</sup> 3 Werte

**Tabelle 23: Diethanolamin (1:10 vorverdünnt)**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,012	0,018	0,022	0,022
	b	[ΔE/min]	0,026	0,029	0,028	0,028
	c	[ΔE/min]	0,020	0,020	0,020	0,020
	d	[ΔE/min]	0,026	0,026	0,026	0,026
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	76,9	76,9	76,9	76,9
	b/d * 100	[%]	100,0	111,5	107,7	107,7
	a/d * 100	[%]	46,2	69,2	84,6	84,6
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	23,1	23,1	23,1	23,1
	(d-b)/d * 100	[%]	0,0	-11,5	-7,7	-7,7
	(d-a)/d * 100	[%]	53,8	30,8	15,4	15,4
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	-133,3	-33,3	33,3	33,3

**Tabelle 24: Diethanolamin (1:10 vorverdünnt)**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,028	0,021	0,021	0,015
	b	[ΔE/min]	0,026	0,029	0,028	0,028
	c	[ΔE/min]	0,013	0,013	0,013	0,013
	d	[ΔE/min]	0,026	0,026	0,026	0,026
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	50,0	50,0	50,0	50,0
	b/d * 100	[%]	100,0	111,5	107,7	107,7
	a/d * 100	[%]	107,7	80,8	80,8	57,7
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	50,0	50,0	50,0	50,0
	(d-b)/d * 100	[%]	0,0	-11,5	-7,7	-7,7
	(d-a)/d * 100	[%]	-7,7	19,2	19,2	42,3
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	115,4	61,5	61,5	15,4

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

**Tabelle 25: N,N'-Dimethylacetamid (1:10 vorverdünnt)**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,024	0,031	0,027	0,030 <sup>3</sup>
	b	[ΔE/min]	0,037	0,027	0,037	0,037
	c	[ΔE/min]	0,028	0,028	0,028	0,028
	d	[ΔE/min]	0,030	0,030	0,030	0,030
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	93,3	93,3	93,3	93,3
	b/d * 100	[%]	123,3	90,0	123,3	123,3
	a/d * 100	[%]	80,0	103,3	90,0	100,0
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	6,7	6,7	6,7	6,7
	(d-b)/d * 100	[%]	-23,3	10,0	-23,3	-23,3
	(d-a)/d * 100	[%]	20,0	-3,3	10,0	0,0
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	-200,0	150,0	-50,0	100,0

**Tabelle 26: N,N'-Dimethylacetamid (1:10 vorverdünnt)**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,016	0,015	0,017	0,023
	b	[ΔE/min]	0,037	0,027	0,037	0,037
	c	[ΔE/min]	0,012	0,012	0,012	0,012
	d	[ΔE/min]	0,030	0,030	0,030	0,030
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	40,0	40,0	40,0	40,0
	b/d * 100	[%]	123,3	90,0	123,3	123,3
	a/d * 100	[%]	53,3	50,0	56,7	76,7
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	60,0	60,0	60,0	60,0
	(d-b)/d * 100	[%]	-23,3	10,0	-23,3	-23,3
	(d-a)/d * 100	[%]	46,7	50,0	43,3	23,3
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	22,2	16,7	27,8	61,1

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

<sup>3</sup> 2 Werte

**Tabelle 27: N,N'-Dimethylacetamid (1:10 vorverd.) : Tetramethylharnstoff (20%;1:10 vorverd.) = 1:1**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,026	0,031	0,029 <sup>4</sup>	0,033 <sup>4</sup>
	b	[ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,040	0,041	0,044	0,041
	c	[ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,029	0,029	0,029	0,029
	d	[ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,039	0,039	0,039	0,039
Enzym-Aktivität in %	$c/d * 100$	[%]	74,4	74,4	74,4	74,4
	$b/d * 100$	[%]	102,6	105,1	112,8	105,1
	$a/d * 100$	[%]	66,7	79,5	74,4	84,6
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	$(d-c)/d * 100$	[%]	25,6	25,6	25,6	25,6
	$(d-b)/d * 100$	[%]	-2,6	-5,1	-12,8	-5,1
	$(d-a)/d * 100$	[%]	33,3	20,5	25,6	15,4
Aufhebung der Hemmung in %	$(a-c)/(d-c) * 100$	[%]	-30,0	20,0	0,0	40,0

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

<sup>4</sup> 2 Werte

**Tabelle 28: N,N'-Dimethylacetamid (1:10 vorverd.) : Tetramethylharnstoff (20%;1:10 vorverd.) = 1:1**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ $\Delta E$ /min]	0,028	0,028	0,028	0,022
	b	[ $\Delta E$ /min]	0,040	0,041	0,044	0,041
	c	[ $\Delta E$ /min]	0,023	0,023	0,023	0,023
	d	[ $\Delta E$ /min]	0,039	0,039	0,039	0,039
Enzym-Aktivität in %	$c/d * 100$	[%]	59,0	59,0	59,0	59,0
	$b/d * 100$	[%]	102,6	105,1	112,8	105,1
	$a/d * 100$	[%]	71,8	71,8	71,8	56,4
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	$(d-c)/d * 100$	[%]	41,0	41,0	41,0	41,0
	$(d-b)/d * 100$	[%]	-2,6	-5,1	-12,8	-5,1
	$(d-a)/d * 100$	[%]	28,2	28,2	28,2	43,6
Aufhebung der Hemmung in %	$(a-c)/(d-c) * 100$	[%]	31,3	31,3	31,3	-6,3

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

**Tabelle 29: 1,3-Dimethylharnstoff (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ $\Delta E$ /min]	0,029	0,030	0,031	0,031
	b	[ $\Delta E$ /min]	0,042	0,039	0,043	0,040
	c	[ $\Delta E$ /min]	0,032	0,032	0,032	0,032
	d	[ $\Delta E$ /min]	0,035	0,035	0,035	0,035
Enzym-Aktivität in %	$c/d * 100$	[%]	91,4	91,4	91,4	91,4
	$b/d * 100$	[%]	120,0	111,4	122,9	114,3
	$a/d * 100$	[%]	82,9	85,7	88,6	88,6
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	$(d-c)/d * 100$	[%]	8,6	8,6	8,6	8,6
	$(d-b)/d * 100$	[%]	-20,0	-11,4	-22,9	-14,3
	$(d-a)/d * 100$	[%]	17,1	14,3	11,4	11,4
Aufhebung der Hemmung in %	$(a-c)/(d-c) * 100$	[%]	-100,0	-66,7	-33,3	-33,3

**Tabelle 30: 1,3-Dimethylharnstoff (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ $\Delta E$ /min]	0,016	0,018	0,020	0,018
	b	[ $\Delta E$ /min]	0,042	0,039	0,043	0,040
	c	[ $\Delta E$ /min]	0,013	0,013	0,013	0,013
	d	[ $\Delta E$ /min]	0,035	0,035	0,035	0,035
Enzym-Aktivität in %	$c/d * 100$	[%]	37,1	37,1	37,1	37,1
	$b/d * 100$	[%]	120,0	111,4	122,9	114,3
	$a/d * 100$	[%]	45,7	51,4	57,1	51,4
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	$(d-c)/d * 100$	[%]	62,9	62,9	62,9	62,9
	$(d-b)/d * 100$	[%]	-20,0	-11,4	-22,9	-14,3
	$(d-a)/d * 100$	[%]	54,3	48,6	42,9	48,6
Aufhebung der Hemmung in %	$(a-c)/(d-c) * 100$	[%]	13,6	22,7	31,8	22,7

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

**Tabelle 31: Ethanolamin (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ $\Delta E$ /min]	0,027	0,028	0,028	0,027
	b	[ $\Delta E$ /min]	0,046	0,046	0,045	0,042
	c	[ $\Delta E$ /min]	0,025	0,025	0,025	0,025
	d	[ $\Delta E$ /min]	0,036	0,036	0,036	0,036
Enzym-Aktivität in %	$c/d * 100$	[%]	69,4	69,4	69,4	69,4
	$b/d * 100$	[%]	127,8	127,8	125,0	116,7
	$a/d * 100$	[%]	75,0	77,8	77,8	75,0
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	$(d-c)/d * 100$	[%]	30,6	30,6	30,6	30,6
	$(d-b)/d * 100$	[%]	-27,8	-27,8	-25,0	-16,7
	$(d-a)/d * 100$	[%]	25,0	22,2	22,2	25,0
Aufhebung der Hemmung in %	$(a-c)/(d-c) * 100$	[%]	18,2	27,3	27,3	18,2

**Tabelle 32: Ethanolamin (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ $\Delta E$ /min]	0,014	0,021	0,026	0,021
	b	[ $\Delta E$ /min]	0,046	0,046	0,045	0,042
	c	[ $\Delta E$ /min]	0,014	0,014	0,014	0,014
	d	[ $\Delta E$ /min]	0,036	0,036	0,036	0,036
Enzym-Aktivität in %	$c/d * 100$	[%]	38,9	38,9	38,9	38,9
	$b/d * 100$	[%]	127,8	127,8	125,0	116,7
	$a/d * 100$	[%]	38,9	58,3	72,2	58,3
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	$(d-c)/d * 100$	[%]	61,1	61,1	61,1	61,1
	$(d-b)/d * 100$	[%]	-27,8	-27,8	-25,0	-16,7
	$(d-a)/d * 100$	[%]	61,1	41,7	27,8	41,7
Aufhebung der Hemmung in %	$(a-c)/(d-c) * 100$	[%]	0,0	31,8	54,5	31,8

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

**Tabelle 33: Ethylendiamin (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,015	0,020	0,026	0,040
	b	[ΔE/min]	0,044	0,041	0,037	0,039
	c	[ΔE/min]	0,018	0,018	0,018	0,018
	d	[ΔE/min]	0,037	0,037	0,037	0,037
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	48,6	48,6	48,6	48,6
	b/d * 100	[%]	118,9	110,8	100,0	105,4
	a/d * 100	[%]	40,5	54,1	70,3	108,1
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	51,4	51,4	51,4	51,4
	(d-b)/d * 100	[%]	-18,9	-10,8	0,0	-5,4
	(d-a)/d * 100	[%]	59,5	45,9	29,7	-8,1
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	-15,8	10,5	42,1	115,8

**Tabelle 34: Ethylendiamin (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,018	0,021	0,020	0,016
	b	[ΔE/min]	0,044	0,041	0,037	0,039
	c	[ΔE/min]	0,017 <sup>5</sup>	0,017 <sup>5</sup>	0,017 <sup>5</sup>	0,017 <sup>5</sup>
	d	[ΔE/min]	0,037	0,037	0,037	0,037
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	45,9	45,9	45,9	45,9
	b/d * 100	[%]	118,9	110,8	100,0	105,4
	a/d * 100	[%]	48,6	56,8	54,1	43,2
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	54,1	54,1	54,1	54,1
	(d-b)/d * 100	[%]	-18,9	-10,8	0,0	-5,4
	(d-a)/d * 100	[%]	51,4	43,2	45,9	56,8
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	5,0	20,0	15,0	-5,0

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

<sup>5</sup> 3 Werte

**Tabelle 35: Glycerin (1:10 vorverdünnt)**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,022	0,024 <sup>6</sup>	0,028 <sup>6</sup>	0,025
	b	[ΔE/min]	0,041	0,041	0,040	0,039
	c	[ΔE/min]	0,023	0,023	0,023	0,023
	d	[ΔE/min]	0,037	0,037	0,037	0,037
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	62,2	62,2	62,2	62,2
	b/d * 100	[%]	110,8	110,8	108,1	105,4
	a/d * 100	[%]	59,5	64,9	75,7	67,6
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	37,8	37,8	37,8	37,8
	(d-b)/d * 100	[%]	-10,8	-10,8	-8,1	-5,4
	(d-a)/d * 100	[%]	40,5	35,1	24,3	32,4
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	-7,1	7,1	35,7	14,3

**Tabelle 36: Glycerin (1:10 vorverdünnt)**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,022 <sup>7</sup>	0,023	0,028 <sup>7</sup>	0,021 <sup>7</sup>
	b	[ΔE/min]	0,041	0,041	0,040	0,039
	c	[ΔE/min]	0,019	0,019	0,019	0,019
	d	[ΔE/min]	0,037	0,037	0,037	0,037
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	51,4	51,4	51,4	51,4
	b/d * 100	[%]	110,8	110,8	108,1	105,4
	a/d * 100	[%]	59,5	62,2	75,7	56,8
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	48,6	48,6	48,6	48,6
	(d-b)/d * 100	[%]	-10,8	-10,8	-8,1	-5,4
	(d-a)/d * 100	[%]	40,5	37,8	24,3	43,2
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	16,7	22,2	50,0	11,1

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

<sup>6</sup> 2 Werte

<sup>7</sup> 2 Werte

**Tabelle 37: Harnstoff (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,025	0,028	0,026	0,025
	b	[ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,034	0,035	0,033	0,029
	c	[ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,025	0,025	0,025	0,025
	d	[ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,040	0,040	0,040	0,040
Enzym-Aktivität in %	$c/d * 100$	[%]	62,5	62,5	62,5	62,5
	$b/d * 100$	[%]	85,0	87,5	82,5	72,5
	$a/d * 100$	[%]	62,5	70,0	65,0	62,5
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	$(d-c)/d * 100$	[%]	37,5	37,5	37,5	37,5
	$(d-b)/d * 100$	[%]	15,0	12,5	17,5	27,5
	$(d-a)/d * 100$	[%]	37,5	30,0	35,0	37,5
Aufhebung der Hemmung in %	$(a-c)/(d-c) * 100$	[%]	0,0	20,0	6,7	0,0

**Tabelle 38: Harnstoff (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,022	0,017	0,025	0,027
	b	[ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,034	0,035	0,033	0,029
	c	[ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,014	0,014	0,014	0,014
	d	[ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,040	0,040	0,040	0,040
Enzym-Aktivität in %	$c/d * 100$	[%]	35,0	35,0	35,0	35,0
	$b/d * 100$	[%]	85,0	87,5	82,5	72,5
	$a/d * 100$	[%]	55,0	42,5	62,5	67,5
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	$(d-c)/d * 100$	[%]	65,0	65,0	65,0	65,0
	$(d-b)/d * 100$	[%]	15,0	12,5	17,5	27,5
	$(d-a)/d * 100$	[%]	45,0	57,5	37,5	32,5
Aufhebung der Hemmung in %	$(a-c)/(d-c) * 100$	[%]	30,8	11,5	42,3	50,0

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

**Tabelle 39: Hexamethylentetramin (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ $\Delta E$ /min]	0,026	0,031	0,028	0,031
	b	[ $\Delta E$ /min]	0,034	0,039	0,042	0,039
	c	[ $\Delta E$ /min]	0,028	0,028	0,028	0,028
	d	[ $\Delta E$ /min]	0,034	0,034	0,034	0,034
Enzym-Aktivität in %	$c/d * 100$	[%]	82,4	82,4	82,4	82,4
	$b/d * 100$	[%]	100,0	114,7	123,5	114,7
	$a/d * 100$	[%]	76,5	91,2	82,4	91,2
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	$(d-c)/d * 100$	[%]	17,6	17,6	17,6	17,6
	$(d-b)/d * 100$	[%]	0,0	-14,7	-23,5	-14,7
	$(d-a)/d * 100$	[%]	23,5	8,8	17,6	8,8
Aufhebung der Hemmung in %	$(a-c)/(d-c) * 100$	[%]	-33,3	50,0	0,0	50,0

**Tabelle 40: Hexamethylentetramin (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ $\Delta E$ /min]	0,020	0,017	0,018	0,019
	b	[ $\Delta E$ /min]	0,034	0,039	0,042	0,039
	c	[ $\Delta E$ /min]	0,015	0,015	0,015	0,015
	d	[ $\Delta E$ /min]	0,034	0,034	0,034	0,034
Enzym-Aktivität in %	$c/d * 100$	[%]	44,1	44,1	44,1	44,1
	$b/d * 100$	[%]	100,0	114,7	123,5	114,7
	$a/d * 100$	[%]	58,8	50,0	52,9	55,9
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	$(d-c)/d * 100$	[%]	55,9	55,9	55,9	55,9
	$(d-b)/d * 100$	[%]	0,0	-14,7	-23,5	-14,7
	$(d-a)/d * 100$	[%]	41,2	50,0	47,1	44,1
Aufhebung der Hemmung in %	$(a-c)/(d-c) * 100$	[%]	26,3	10,5	15,8	21,1

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

**Tabelle 41: D-Mannit (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ $\Delta E$ /min]	0,024	0,035	0,031	0,016
	b	[ $\Delta E$ /min]	0,044	0,046	0,041	0,041
	c	[ $\Delta E$ /min]	0,028	0,028	0,028	0,028
	d	[ $\Delta E$ /min]	0,037	0,037	0,037	0,037
Enzym-Aktivität in %	$c/d * 100$	[%]	75,7	75,7	75,7	75,7
	$b/d * 100$	[%]	118,9	124,3	110,8	110,8
	$a/d * 100$	[%]	64,9	94,6	83,8	43,2
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	$(d-c)/d * 100$	[%]	24,3	24,3	24,3	24,3
	$(d-b)/d * 100$	[%]	-18,9	-24,3	-10,8	-10,8
	$(d-a)/d * 100$	[%]	35,1	5,4	16,2	56,8
Aufhebung der Hemmung in %	$(a-c)/(d-c) * 100$	[%]	-44,4	77,8	33,3	-133,3

**Tabelle 42: D-Mannit (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ $\Delta E$ /min]	0,030	0,029	0,029	0,035
	b	[ $\Delta E$ /min]	0,044	0,046	0,041	0,041
	c	[ $\Delta E$ /min]	0,014	0,014	0,014	0,014
	d	[ $\Delta E$ /min]	0,037	0,037	0,037	0,037
Enzym-Aktivität in %	$c/d * 100$	[%]	37,8	37,8	37,8	37,8
	$b/d * 100$	[%]	118,9	124,3	110,8	110,8
	$a/d * 100$	[%]	81,1	78,4	78,4	94,6
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	$(d-c)/d * 100$	[%]	62,2	62,2	62,2	62,2
	$(d-b)/d * 100$	[%]	-18,9	-24,3	-10,8	-10,8
	$(d-a)/d * 100$	[%]	18,9	21,6	21,6	5,4
Aufhebung der Hemmung in %	$(a-c)/(d-c) * 100$	[%]	69,6	65,2	65,2	91,3

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

**Tabelle 43: Methoxypolyethylenglykol MG2.000 (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,026	0,046	0,041 <sup>8</sup>	0,015
	b	[ΔE/min]	0,044	0,045	0,047	0,044
	c	[ΔE/min]	0,025	0,025	0,025	0,025
	d	[ΔE/min]	0,037	0,037	0,037	0,037
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	67,6	67,6	67,6	67,6
	b/d * 100	[%]	118,9	121,6	127,0	118,9
	a/d * 100	[%]	70,3	124,3	110,8	40,5
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	32,4	32,4	32,4	32,4
	(d-b)/d * 100	[%]	-18,9	-21,6	-27,0	-18,9
	(d-a)/d * 100	[%]	29,7	-24,3	-10,8	59,5
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	8,3	175,0	133,3	-83,3

**Tabelle 44: Methoxypolyethylenglykol MG2.000 (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,028	0,030	0,020	0,027
	b	[ΔE/min]	0,044	0,045	0,047	0,044
	c	[ΔE/min]	0,014	0,014	0,014	0,014
	d	[ΔE/min]	0,037	0,037	0,037	0,037
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	37,8	37,8	37,8	37,8
	b/d * 100	[%]	118,9	121,6	127,0	118,9
	a/d * 100	[%]	75,7	81,1	54,1	73,0
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	62,2	62,2	62,2	62,2
	(d-b)/d * 100	[%]	-18,9	-21,6	-27,0	-18,9
	(d-a)/d * 100	[%]	24,3	18,9	45,9	27,0
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	60,9	69,6	26,1	56,5

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

<sup>8</sup> 2 Werte

**Tabelle 45: 3-Methylpiperidin (1:10 vorverdünnt)**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung		V1	V2	V3	V4	
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,002 <sup>9</sup>	0,028 <sup>10</sup>	0,028 <sup>10</sup>	0,032
	b	[ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,016	0,038	0,037	0,041
	c	[ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,028	0,028	0,028	0,028
	d	[ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,040	0,040	0,040	0,040
Enzym-Aktivität in %	$c/d * 100$	[%]	70,0	70,0	70,0	70,0
	$b/d * 100$	[%]	40,0	95,0	92,5	102,5
	$a/d * 100$	[%]	5,0	70,0	70,0	80,0
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	$(d-c)/d * 100$	[%]	30,0	30,0	30,0	30,0
	$(d-b)/d * 100$	[%]	60,0	5,0	7,5	-2,5
	$(d-a)/d * 100$	[%]	95,0	30,0	30,0	20,0
Aufhebung der Hemmung in %	$(a-c)/(d-c) * 100$	[%]	-216,7	0,0	0,0	33,3

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung

Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung

Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung

Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10

V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>

V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>

V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

<sup>9</sup> 1 Wert

<sup>10</sup> 2 Werte

**Tabelle 46: 3-Methylpiperidin (1:10 vorverdünnt)**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung		V1	V2	V3	V4	
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,006 <sup>11</sup>	0,013 <sup>11</sup>	0,019 <sup>11</sup>	0,023 <sup>12</sup>
	b	[ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,016	0,038	0,037	0,041
	c	[ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,015	0,015	0,015	0,015
	d	[ $\Delta E/\text{min}$ ]	0,040	0,040	0,040	0,040
Enzym-Aktivität in %	$c/d * 100$	[%]	37,5	37,5	37,5	37,5
	$b/d * 100$	[%]	40,0	95,0	92,5	102,5
	$a/d * 100$	[%]	15,0	32,5	47,5	57,5
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	$(d-c)/d * 100$	[%]	62,5	62,5	62,5	62,5
	$(d-b)/d * 100$	[%]	60,0	5,0	7,5	-2,5
	$(d-a)/d * 100$	[%]	85,0	67,5	52,5	42,5
Aufhebung der Hemmung in %	$(a-c)/(d-c) * 100$	[%]	-36,0	-8,0	16,0	32,0

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung

Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung

Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung

Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10

V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>

V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>

V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

<sup>11</sup> 2 Werte

<sup>12</sup> 1 Wert

**Tabelle 47: 1-Methyl-2-pyrrolidinon (1:10 vorverdünnt)**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,023	0,030	0,032	0,030
	b	[ΔE/min]	0,032	0,026	0,035	0,035
	c	[ΔE/min]	0,028	0,028	0,028	0,028
	d	[ΔE/min]	0,038	0,038	0,038	0,038
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	73,7	73,7	73,7	73,7
	b/d * 100	[%]	84,2	68,4	92,1	92,1
	a/d * 100	[%]	60,5	78,9	84,2	78,9
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	26,3	26,3	26,3	26,3
	(d-b)/d * 100	[%]	15,8	31,6	7,9	7,9
	(d-a)/d * 100	[%]	39,5	21,1	15,8	21,1
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	-50,0	20,0	40,0	20,0

**Tabelle 48: 1-Methyl-2-pyrrolidinon (1:10 vorverdünnt)**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,019	0,019	0,017	0,011
	b	[ΔE/min]	0,032	0,026	0,035	0,035
	c	[ΔE/min]	0,015	0,015	0,015	0,015
	d	[ΔE/min]	0,038	0,038	0,038	0,038
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	39,5	39,5	39,5	39,5
	b/d * 100	[%]	84,2	68,4	92,1	92,1
	a/d * 100	[%]	50,0	50,0	44,7	28,9
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	60,5	60,5	60,5	60,5
	(d-b)/d * 100	[%]	15,8	31,6	7,9	7,9
	(d-a)/d * 100	[%]	50,0	50,0	55,3	71,1
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	17,4	17,4	8,7	-17,4

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

**Tabelle 49: Polyethylenglykol MG15.000 (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,026 <sup>13</sup>	0,027	0,023	0,024
	b	[ΔE/min]	0,037	0,041	0,037	0,037
	c	[ΔE/min]	0,027	0,027	0,027	0,027
	d	[ΔE/min]	0,034	0,034	0,034	0,034
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	79,4	79,4	79,4	79,4
	b/d * 100	[%]	108,8	120,6	108,8	108,8
	a/d * 100	[%]	76,5	79,4	67,6	70,6
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	20,6	20,6	20,6	20,6
	(d-b)/d * 100	[%]	-8,8	-20,6	-8,8	-8,8
	(d-a)/d * 100	[%]	23,5	20,6	32,4	29,4
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	-14,3	0,0	-57,1	-42,9

**Tabelle 50: Polyethylenglykol MG15.000 (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,019	0,012	0,018	0,022
	b	[ΔE/min]	0,037	0,041	0,037	0,037
	c	[ΔE/min]	0,016 <sup>14</sup>	0,016 <sup>14</sup>	0,016 <sup>14</sup>	0,016 <sup>14</sup>
	d	[ΔE/min]	0,034	0,034	0,034	0,034
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	47,1	47,1	47,1	47,1
	b/d * 100	[%]	108,8	120,6	108,8	108,8
	a/d * 100	[%]	55,9	35,3	52,9	64,7
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	52,9	52,9	52,9	52,9
	(d-b)/d * 100	[%]	-8,8	-20,6	-8,8	-8,8
	(d-a)/d * 100	[%]	44,1	64,7	47,1	35,3
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	16,7	-22,2	11,1	33,3

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

<sup>13</sup> 2 Werte

<sup>14</sup> 3 Werte

**Tabelle 51: Polyethylenglykol MG35.000 (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ $\Delta E$ /min]	0,022	0,025	0,025	0,023
	b	[ $\Delta E$ /min]	0,032	0,033	0,037	0,039
	c	[ $\Delta E$ /min]	0,027	0,027	0,027	0,027
	d	[ $\Delta E$ /min]	0,036	0,036	0,036	0,036
Enzym-Aktivität in %	$c/d * 100$	[%]	75,0	75,0	75,0	75,0
	$b/d * 100$	[%]	88,9	91,7	102,8	108,3
	$a/d * 100$	[%]	61,1	69,4	69,4	63,9
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	$(d-c)/d * 100$	[%]	25,0	25,0	25,0	25,0
	$(d-b)/d * 100$	[%]	11,1	8,3	-2,8	-8,3
	$(d-a)/d * 100$	[%]	38,9	30,6	30,6	36,1
Aufhebung der Hemmung in %	$(a-c)/(d-c) * 100$	[%]	-55,6	-22,2	-22,2	-44,4

**Tabelle 52: Polyethylenglykol MG35.000 (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ $\Delta E$ /min]	0,022	0,014	0,017	0,017
	b	[ $\Delta E$ /min]	0,032	0,033	0,037	0,039
	c	[ $\Delta E$ /min]	0,016	0,016	0,016	0,016
	d	[ $\Delta E$ /min]	0,036	0,036	0,036	0,036
Enzym-Aktivität in %	$c/d * 100$	[%]	44,4	44,4	44,4	44,4
	$b/d * 100$	[%]	88,9	91,7	102,8	108,3
	$a/d * 100$	[%]	61,1	38,9	47,2	47,2
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	$(d-c)/d * 100$	[%]	55,6	55,6	55,6	55,6
	$(d-b)/d * 100$	[%]	11,1	8,3	-2,8	-8,3
	$(d-a)/d * 100$	[%]	38,9	61,1	52,8	52,8
Aufhebung der Hemmung in %	$(a-c)/(d-c) * 100$	[%]	30,0	-10,0	5,0	5,0

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

**Tabelle 53: Polyethylenglykoldimethylether 500 (1:10 vorverdünnt)**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,026	0,028	0,028	0,026
	b	[ΔE/min]	0,033	0,034	0,036	0,034
	c	[ΔE/min]	0,028	0,028	0,028	0,028
	d	[ΔE/min]	0,030	0,030	0,030	0,030
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	93,3	93,3	93,3	93,3
	b/d * 100	[%]	110,0	113,3	120,0	113,3
	a/d * 100	[%]	86,7	93,3	93,3	86,7
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	6,7	6,7	6,7	6,7
	(d-b)/d * 100	[%]	-10,0	-13,3	-20,0	-13,3
	(d-a)/d * 100	[%]	13,3	6,7	6,7	13,3
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	-100,0	0,0	0,0	-100,0

**Tabelle 54: Polyethylenglykoldimethylether 500 (1:10 vorverdünnt)**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,015 <sup>15</sup>	0,013	0,016	0,016
	b	[ΔE/min]	0,033	0,034	0,036	0,034
	c	[ΔE/min]	0,012	0,012	0,012	0,012
	d	[ΔE/min]	0,030	0,030	0,030	0,030
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	40,0	40,0	40,0	40,0
	b/d * 100	[%]	110,0	113,3	120,0	113,3
	a/d * 100	[%]	50,0	43,3	53,3	53,3
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	60,0	60,0	60,0	60,0
	(d-b)/d * 100	[%]	-10,0	-13,3	-20,0	-13,3
	(d-a)/d * 100	[%]	50,0	56,7	46,7	46,7
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	16,7	5,6	22,2	22,2

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

<sup>15</sup> 2 Werte

**Tabelle 55: Polyethylenglykoldimethylether 2000 (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,022	0,026	0,028	0,028
	b	[ΔE/min]	0,038	0,045	0,044	0,043
	c	[ΔE/min]	0,028	0,028	0,028	0,028
	d	[ΔE/min]	0,035	0,035	0,035	0,035
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	80,0	80,0	80,0	80,0
	b/d * 100	[%]	108,6	128,6	125,7	122,9
	a/d * 100	[%]	62,9	74,3	80,0	80,0
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	20,0	20,0	20,0	20,0
	(d-b)/d * 100	[%]	-8,6	-28,6	-25,7	-22,9
	(d-a)/d * 100	[%]	37,1	25,7	20,0	20,0
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	-85,7	-28,6	0,0	0,0

**Tabelle 56: Polyethylenglykoldimethylether 2000 (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,031	0,031	0,038	0,041
	b	[ΔE/min]	0,038	0,045	0,044	0,043
	c	[ΔE/min]	0,014	0,014	0,014	0,014
	d	[ΔE/min]	0,035	0,035	0,035	0,035
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	40,0	40,0	40,0	40,0
	b/d * 100	[%]	108,6	128,6	125,7	122,9
	a/d * 100	[%]	88,6	88,6	108,6	117,1
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	60,0	60,0	60,0	60,0
	(d-b)/d * 100	[%]	-8,6	-28,6	-25,7	-22,9
	(d-a)/d * 100	[%]	11,4	11,4	-8,6	-17,1
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	81,0	81,0	114,3	128,6

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

**Tabelle 57: Polyethylenglykolmonobutylether (1:10 vorverdünnt)**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,026	0,031	0,031	0,032
	b	[ΔE/min]	0,051	0,040	0,043	0,043
	c	[ΔE/min]	0,032	0,032	0,032	0,032
	d	[ΔE/min]	0,035	0,035	0,035	0,035
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	91,4	91,4	91,4	91,4
	b/d * 100	[%]	145,7	114,3	122,9	122,9
	a/d * 100	[%]	74,3	88,6	88,6	91,4
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	8,6	8,6	8,6	8,6
	(d-b)/d * 100	[%]	-45,7	-14,3	-22,9	-22,9
	(d-a)/d * 100	[%]	25,7	11,4	11,4	8,6
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	-200,0	-33,3	-33,3	0,0

**Tabelle 58: Polyethylenglykolmonobutylether (1:10 vorverdünnt)**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,016 <sup>16</sup>	0,021 <sup>16</sup>	0,020 <sup>16</sup>	0,020 <sup>16</sup>
	b	[ΔE/min]	0,051	0,040	0,043	0,043
	c	[ΔE/min]	0,013	0,013	0,013	0,013
	d	[ΔE/min]	0,035	0,035	0,035	0,035
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	37,1	37,1	37,1	37,1
	b/d * 100	[%]	145,7	114,3	122,9	122,9
	a/d * 100	[%]	45,7	60,0	57,1	57,1
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	62,9	62,9	62,9	62,9
	(d-b)/d * 100	[%]	-45,7	-14,3	-22,9	-22,9
	(d-a)/d * 100	[%]	54,3	40,0	42,9	42,9
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	13,6	36,4	31,8	31,8

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

<sup>16</sup> 2 Werte

**Tabelle 59: Polypropylenglykol MG1950-2050 (1:20 vorverdünnt)**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,022	0,023	0,024	0,024
	b	[ΔE/min]	0,035	0,036	0,033	0,035
	c	[ΔE/min]	0,024	0,024	0,024	0,024
	d	[ΔE/min]	0,034	0,034	0,034	0,034
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	70,6	70,6	70,6	70,6
	b/d * 100	[%]	102,9	105,9	97,1	102,9
	a/d * 100	[%]	64,7	67,6	70,6	70,6
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	29,4	29,4	29,4	29,4
	(d-b)/d * 100	[%]	-2,9	-5,9	2,9	-2,9
	(d-a)/d * 100	[%]	35,3	32,4	29,4	29,4
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	-20,0	-10,0	0,0	0,0

**Tabelle 60: Polypropylenglykol MG1950-2050 (1:20 vorverdünnt)**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,014	0,012	0,014	0,017
	b	[ΔE/min]	0,035	0,036	0,033	0,035
	c	[ΔE/min]	0,013	0,013	0,013	0,013
	d	[ΔE/min]	0,034	0,034	0,034	0,034
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	38,2	38,2	38,2	38,2
	b/d * 100	[%]	102,9	105,9	97,1	102,9
	a/d * 100	[%]	41,2	35,3	41,2	50,0
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	61,8	61,8	61,8	61,8
	(d-b)/d * 100	[%]	-2,9	-5,9	2,9	-2,9
	(d-a)/d * 100	[%]	58,8	64,7	58,8	50,0
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	4,8	-4,8	4,8	19,0

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

**Tabelle 61: Polyvinylalkohol MG72.000 (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,030	0,032 <sup>17</sup>	0,028 <sup>17</sup>	0,032 <sup>17</sup>
	b	[ΔE/min]	0,038	0,040	0,038	0,040
	c	[ΔE/min]	0,031	0,031	0,031	0,031
	d	[ΔE/min]	0,037	0,037	0,037	0,037
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	83,8	83,8	83,8	83,8
	b/d * 100	[%]	102,7	108,1	102,7	108,1
	a/d * 100	[%]	81,1	86,5	75,7	86,5
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	16,2	16,2	16,2	16,2
	(d-b)/d * 100	[%]	-2,7	-8,1	-2,7	-8,1
	(d-a)/d * 100	[%]	18,9	13,5	24,3	13,5
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	-16,7	16,7	-50,0	16,7

**Tabelle 62: Polyvinylalkohol MG72.000 (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,026	0,025	0,026	0,023
	b	[ΔE/min]	0,038	0,040	0,038	0,040
	c	[ΔE/min]	0,012 <sup>18</sup>	0,012 <sup>18</sup>	0,012 <sup>18</sup>	0,012 <sup>18</sup>
	d	[ΔE/min]	0,037	0,037	0,037	0,037
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	32,4	32,4	32,4	32,4
	b/d * 100	[%]	102,7	108,1	102,7	108,1
	a/d * 100	[%]	70,3	67,6	70,3	62,2
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	67,6	67,6	67,6	67,6
	(d-b)/d * 100	[%]	-2,7	-8,1	-2,7	-8,1
	(d-a)/d * 100	[%]	29,7	32,4	29,7	37,8
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	56,0	52,0	56,0	44,0

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

<sup>17</sup> 2 Werte

<sup>18</sup> 3 Werte

**Tabelle 63: Polyvinylpyrrolidon MG40.000 (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,023	0,019	0,023	0,021
	b	[ΔE/min]	0,031	0,029	0,030	0,029
	c	[ΔE/min]	0,020	0,020	0,020	0,020
	d	[ΔE/min]	0,027	0,027	0,027	0,027
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	74,1	74,1	74,1	74,1
	b/d * 100	[%]	114,8	107,4	111,1	107,4
	a/d * 100	[%]	85,2	70,4	85,2	77,8
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	25,9	25,9	25,9	25,9
	(d-b)/d * 100	[%]	-14,8	-7,4	-11,1	-7,4
	(d-a)/d * 100	[%]	14,8	29,6	14,8	22,2
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	42,9	-14,3	42,9	14,3

**Tabelle 64: Polyvinylpyrrolidon MG40.000 (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,017	0,017	0,016	0,017
	b	[ΔE/min]	0,031	0,029	0,030	0,029
	c	[ΔE/min]	0,013	0,013	0,013	0,013
	d	[ΔE/min]	0,027	0,027	0,027	0,027
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	48,1	48,1	48,1	48,1
	b/d * 100	[%]	114,8	107,4	111,1	107,4
	a/d * 100	[%]	63,0	63,0	59,3	63,0
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	51,9	51,9	51,9	51,9
	(d-b)/d * 100	[%]	-14,8	-7,4	-11,1	-7,4
	(d-a)/d * 100	[%]	37,0	37,0	40,7	37,0
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	28,6	28,6	21,4	28,6

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

**Tabelle 65: Pyridin (1:10 vorverdünnt)**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,022	0,030	0,030	0,032
	b	[ΔE/min]	0,034	0,042	0,041	0,044
	c	[ΔE/min]	0,033	0,033	0,033	0,033
	d	[ΔE/min]	0,038	0,038	0,038	0,038
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	86,8	86,8	86,8	86,8
	b/d * 100	[%]	89,5	110,5	107,9	115,8
	a/d * 100	[%]	57,9	78,9	78,9	84,2
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	13,2	13,2	13,2	13,2
	(d-b)/d * 100	[%]	10,5	-10,5	-7,9	-15,8
	(d-a)/d * 100	[%]	42,1	21,1	21,1	15,8
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	-220,0	-60,0	-60,0	-20,0

**Tabelle 66: Pyridin (1:10 vorverdünnt)**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,038	0,021	0,021	0,018
	b	[ΔE/min]	0,034	0,042	0,041	0,044
	c	[ΔE/min]	0,017	0,017	0,017	0,017
	d	[ΔE/min]	0,038	0,038	0,038	0,038
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	44,7	44,7	44,7	44,7
	b/d * 100	[%]	89,5	110,5	107,9	115,8
	a/d * 100	[%]	100,0	55,3	55,3	47,4
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	55,3	55,3	55,3	55,3
	(d-b)/d * 100	[%]	10,5	-10,5	-7,9	-15,8
	(d-a)/d * 100	[%]	0,0	44,7	44,7	52,6
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	100,0	19,0	19,0	4,8

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

**Tabelle 67: D-Sorbit (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,029	0,027	0,027	0,028
	b	[ΔE/min]	0,045	0,041	0,042	0,041
	c	[ΔE/min]	0,028	0,028	0,028	0,028
	d	[ΔE/min]	0,037	0,037	0,037	0,037
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	75,7	75,7	75,7	75,7
	b/d * 100	[%]	121,6	110,8	113,5	110,8
	a/d * 100	[%]	78,4	73,0	73,0	75,7
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	24,3	24,3	24,3	24,3
	(d-b)/d * 100	[%]	-21,6	-10,8	-13,5	-10,8
	(d-a)/d * 100	[%]	21,6	27,0	27,0	24,3
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	11,1	-11,1	-11,1	0,0

**Tabelle 68: D-Sorbit (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ΔE/min]	0,025	0,036	0,035	0,035
	b	[ΔE/min]	0,045	0,041	0,042	0,041
	c	[ΔE/min]	0,014	0,014	0,014	0,014
	d	[ΔE/min]	0,037	0,037	0,037	0,037
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	37,8	37,8	37,8	37,8
	b/d * 100	[%]	121,6	110,8	113,5	110,8
	a/d * 100	[%]	67,6	97,3	94,6	94,6
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	62,2	62,2	62,2	62,2
	(d-b)/d * 100	[%]	-21,6	-10,8	-13,5	-10,8
	(d-a)/d * 100	[%]	32,4	2,7	5,4	5,4
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	47,8	95,7	91,3	91,3

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

**Tabelle 69: Triethanolamin (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ $\Delta E$ /min]	0,029 <sup>19</sup>	0,023 <sup>19</sup>	0,006 <sup>19</sup>	0,017
	b	[ $\Delta E$ /min]	0,040	0,041	0,040	0,037
	c	[ $\Delta E$ /min]	0,018	0,018	0,018	0,018
	d	[ $\Delta E$ /min]	0,038	0,038	0,038	0,038
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	47,4	47,4	47,4	47,4
	b/d * 100	[%]	105,3	107,9	105,3	97,4
	a/d * 100	[%]	76,3	60,5	15,8	44,7
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	52,6	52,6	52,6	52,6
	(d-b)/d * 100	[%]	-5,3	-7,9	-5,3	2,6
	(d-a)/d * 100	[%]	23,7	39,5	84,2	55,3
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	55,0	25,0	-60,0	-5,0

**Tabelle 70: Triethanolamin (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ $\Delta E$ /min]	0,011	0,020	0,028	0,021
	b	[ $\Delta E$ /min]	0,040	0,041	0,040	0,037
	c	[ $\Delta E$ /min]	0,017 <sup>20</sup>	0,017 <sup>20</sup>	0,017 <sup>20</sup>	0,017 <sup>20</sup>
	d	[ $\Delta E$ /min]	0,038	0,038	0,038	0,038
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	44,7	44,7	44,7	44,7
	b/d * 100	[%]	105,3	107,9	105,3	97,4
	a/d * 100	[%]	28,9	52,6	73,7	55,3
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	55,3	55,3	55,3	55,3
	(d-b)/d * 100	[%]	-5,3	-7,9	-5,3	2,6
	(d-a)/d * 100	[%]	71,1	47,4	26,3	44,7
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	-28,6	14,3	52,4	19,0

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

<sup>19</sup> 2 Werte

<sup>20</sup> 3 Werte

**Tabelle 71: Triethylamin (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Erwärmung (60°C,60min)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ $\Delta E$ /min]	0,020	-0,001	0,001	0,028
	b	[ $\Delta E$ /min]	0,045	0,031	0,032	0,031
	c	[ $\Delta E$ /min]	0,025	0,025	0,025	0,025
	d	[ $\Delta E$ /min]	0,036	0,036	0,036	0,036
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	69,4	69,4	69,4	69,4
	b/d * 100	[%]	125,0	86,1	88,9	86,1
	a/d * 100	[%]	55,6	-2,8	2,8	77,8
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	30,6	30,6	30,6	30,6
	(d-b)/d * 100	[%]	-25,0	13,9	11,1	13,9
	(d-a)/d * 100	[%]	44,4	102,8	97,2	22,2
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	-45,5	-236,4	-218,2	27,3

**Tabelle 72: Triethylamin (0,8g/20ml)**  
Denaturans = Perchlorsäure (0,046M)

Verdünnung			V1	V2	V3	V4
gemittelte Messwerte als Absolutwerte	a	[ $\Delta E$ /min]	0,018	0,020	0,031	0,023
	b	[ $\Delta E$ /min]	0,045	0,031	0,032	0,031
	c	[ $\Delta E$ /min]	0,014	0,014	0,014	0,014
	d	[ $\Delta E$ /min]	0,036	0,036	0,036	0,036
Enzym-Aktivität in %	c/d * 100	[%]	38,9	38,9	38,9	38,9
	b/d * 100	[%]	125,0	86,1	88,9	86,1
	a/d * 100	[%]	50,0	55,6	86,1	63,9
Abnahme der Enzym- Aktivität in %	(d-c)/d * 100	[%]	61,1	61,1	61,1	61,1
	(d-b)/d * 100	[%]	-25,0	13,9	11,1	13,9
	(d-a)/d * 100	[%]	50,0	44,4	13,9	36,1
Aufhebung der Hemmung in %	(a-c)/(d-c) * 100	[%]	18,2	27,3	77,3	40,9

Probe a = Kontrollserum+protektive Substanz+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe b = Kontrollserum+protektive Substanz+Reaktionslösung  
 Probe c = Kontrollserum+Denaturans+Reaktionslösung  
 Probe d = Kontrollserum+Reaktionslösung

V1 = Verdünnung 1:10  
 V2 = Verdünnung 1:10<sup>3</sup>  
 V3 = Verdünnung 1:10<sup>5</sup>  
 V4 = Verdünnung 1:10<sup>6</sup>

(Letzte Seite)