

Patrick Wegner

**Untersuchungen zur Charakterisierung
schneller Denaturierungskinetiken von
Enzymen im Zeitbereich von Millisekunden
bis Sekunden**

Diplomarbeit

BEI GRIN MACHT SICH IHR WISSEN BEZAHLT



- Wir veröffentlichen Ihre Hausarbeit, Bachelor- und Masterarbeit
- Ihr eigenes eBook und Buch - weltweit in allen wichtigen Shops
- Verdienen Sie an jedem Verkauf

Jetzt bei www.GRIN.com hochladen
und kostenlos publizieren



Diplomarbeit

Universität Hamburg
Fachbereich Physik

angefertigt im
Medizinischen Laserzentrum Lübeck

**Untersuchungen zur Charakterisierung schneller
Denaturierungskinetiken von Enzymen im
Zeitbereich von Millisekunden bis Sekunden**

von
Patrick Wegner

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	2
2	Theorie	5
2.1	Wärmeleitung und thermische Relaxationszeit	5
2.2	Bewegungsgleichung eines Fluids	8
2.3	Bewegungsgleichung eines fallenden Wassertropfens	11
2.4	Das Cr,Tm,Ho:YAG Lasersystem	13
2.5	Lichtverteilung in Tropfen bei Bestrahlung	14
2.6	Thermische Proteindenaturierung	16
2.7	Das Modellenzym alkalische Phosphatase	20
2.8	Nachweis der Proteinaktivität	21
3	Temperatursprungexperimente mit Kapillaren	22
3.1	Konzept	22
3.2	Material und Methoden	25
3.3	Ergebnisse	28
3.4	Diskussion	34
4	Laserinduzierter Temperatursprung in kleinen Wassertropfen	40
4.1	Konzept	40
4.2	Vorversuche	40
4.3	Konstruktion der klimatisierten Fallstrecke	60
4.4	Test der klimatisierten Fallstrecke	62
4.5	Diskussion	64
5	Zusammenfassung und Ausblick	69
6	Anhang	71
7	Danksagung	74
8	Literaturverzeichnis	76

1 Einleitung

Seit den 60er Jahren wird in vielen Gebieten der Medizin die lineare Absorption des Laserlichts im Gewebe benutzt, um dort gezielt Energie zu deponieren, die dann eine Koagulation oder Ablation bewirken. Bei Fokussierung des Laserlichts liegt die untere Grenze für die Präzision thermischer Gewebseffekte aufgrund der Beugung des Lichts bei 0,5 bis 1 μm . Durch die selektive Absorption der Laserstrahlung in bestimmten Zielstrukturen im Gewebe kann im Prinzip die räumliche Präzision der Energiedeponierung weiter erhöht werden. Die Laserenergie wird dabei nur am Ort der absorbierenden Strukturen deponiert, deren räumliche Ausdehnung damit die prinzipiell erreichbare Präzision vorgibt. Die Temperaturerhöhung in die umgebenden Areale durch Wärmeleitung kann weitgehend vermieden werden, wenn die Laserpulsdauer die thermische Relaxationszeit des Absorbers nicht übersteigt (sog. thermischer Einschluß) [21]. Die thermische Relaxationszeit skaliert dabei mit dem Quadrat des Absorberdurchmessers und ist umgekehrt proportional zu den Wärmeleitungseigenschaften des Absorbermediums. In der Lasermedizin wird dieses Prinzip unter anderem bereits bei der selektiven Schädigung stark absorbierender Zellen im retinalen Pigmentepithel ausgenutzt [7].

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Entwicklung eines Temperatursprungexperiments sind Teil eines von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Projekts über laser-induzierte thermische Gewebseffekte. Ziel dieses Projektes ist es, grundlegende Erkenntnisse über laser-induzierte thermische Gewebseffekte bei kurzzeitigem Erhitzen des Gewebes zu erlangen. Als Schadensmechanismus bei thermischer Zellschädigung wird allgemein eine Denaturierung der in der Zelle enthaltenen Proteine angenommen. Die Frage, inwieweit Gewebe und Zellen sich thermisch selektiv schädigen lassen, ist also über die Notwendigkeit eines thermischen Einschusses direkt an die Frage gekoppelt, in welchen Zeitskalen eine thermische Proteindenaturierung möglich ist und welche Temperaturen dazu erforderlich sind [19], [28]. Die bereits vorhandenen Kenntnisse der Denaturierungskinetiken der Proteine im Zeitbereich von Sekunden bis Stunden sollen in dem DFG-Projekt bis in kürzere Zeitbereiche erweitert werden [18]. Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Experiment soll über ein Temperatursprungverfahren die Denaturierungskinetiken von ausgewählten Proteinen im Bereich von Millisekunden bis Sekunden zugänglich machen. Allgemein bietet sich der dabei zu konstruierende Aufbau auch als Instrument zur Untersuchung von temperaturabhängigen chemischen Reaktionen an. Im Folgenden werden verschiedene Möglichkeiten von Temperatursprungexperimenten dargestellt und miteinander verglichen.

Eine verbreitete Methode beruht auf einer elektrischen Entladung eines

Kondensators durch die Probenflüssigkeit. Die zu untersuchende Lösung wird mit einem Elektrolyt versetzt, um eine ausreichende Leitfähigkeit der Lösung zu erreichen. Ein Nachteil bei der Durchführung dieser Art von Temperatursprungexperimenten ist das Auftreten hoher elektrischer Feldstärken, die die Proben zusätzlich beeinflussen können. Die Temperatursprungzeiten, die mit diesem Aufbau und Probevolumina von weniger als 1 ml realisiert werden können, liegen typischerweise im Bereich von $250 \mu\text{s}$ bis 1 s, die Temperaturerhöhungen zwischen $\Delta T = 10 - 50 \text{ K}$ [29]. Ein schnelles Abkühlen ist mit diesem Aufbau nicht möglich.

Eine weitere Methode, um Temperatursprungexperimente durchzuführen, besteht in der Kopplung des Probenvolumens an externe Wärmebäder. Im einfachsten Fall wird das Probevolumen in einer Trägervorrichtung durch schnelles Tauchen in das Wärmebad gebracht und nach einer definierten Zeit t wieder entfernt. Die typischen, im Einklang mit der Wärmeleitung zu erhaltenden Temperatursprungzeiten, liegen im Bereich von 500 ms bis 800 ms, bei einer Temperaturerhöhung von 60 K bis 80 K [31]. Schwierig gestaltet sich bei dieser Art von Temperatursprungexperimenten das anschließende schnelle Abkühlen. Die Trägervorrichtung mit der Probe muß hierfür schnell in ein Kältebad transportiert werden. Mechanisch ist diese Art von Temperatursprungexperimenten mit anschließender schneller Abkühlung für Zeiten $t < 1 \text{ s}$ schwer zu realisieren.

Bei Experimenten mit einem laserinduzierten Temperatursprung kann ein kleines Volumen einer wässrigen Lösung durch Absorption eines Laserpulses schnell aufgeheizt werden. Die erreichbare Sprungtemperatur hängt ab von der zur Verfügung stehenden Pulsenergie des Lasersystems. Eine homogene Erwärmung ist dann gegeben, wenn das zu erwärmende Volumen auf die Absorption der Laserstrahlung angepasst wird. Zum Durchführen von Temperatursprungexperimenten in kleinen Volumina stellt ein Cr,Tm,Ho:YAG Lasersystem durch die starke Absorption von $\mu_a = 25 \frac{1}{\text{cm}}$ in Wasser einen guten Kompromiß zwischen benötigter Pulsenergie und Größe des Meßvolumens dar. Mit diesem Laser kann mit einigen hundert Millijoule Pulsenergie ein Meßvolumen von wenigen Mikrolitern auf 100°C homogen erwärmt werden. Allerdings begrenzt die Abkühlung dieses kleinen Volumens die Meßzeit auf maximal 5 Millisekunden [21]. Für die Durchführung von Experimenten mit Temperatursprüngen im Zeitbereich von Millisekunden bis Sekunden ist dieses System nicht geeignet.

Für den angestrebten Zeitbereich von Millisekunden bis Sekunden ergeben sich für Temperatursprungexperimente zwei verhältnismäßig einfach zu realisierende Ansätze, die im Rahmen dieser Arbeit im Hinblick auf den zu erreichenden Zeitbereich und prinzipielle Realisierbarkeit untersucht werden sollen.

1. Der Temperatursprung wird durchgeführt in einer dünnwandigen Kapillare kleineren Querschnitts, die innen von der zu untersuchenden Flüssigkeit durchströmt und von außen in Wärmebädern geheizt oder gekühlt wird. Eine gleiche Verweildauer der einzelnen Fluidelemente der Lösung muß in den Zonen erhöhter Temperatur gewährleistet sein, genauso wie ein schneller Temperaturanstieg innerhalb der gesamten Kapillare, um auch Temperatursprungzeiten von wenigen Millisekunden realisieren zu können. Die zu erreichenden Sprungtemperaturen können durch das Wärmebad von außen vorgegeben werden. Die Sprungzeiten sind einerseits abhängig von der erreichbaren Geschwindigkeit der strömenden Lösung und andererseits limitiert durch die Zeit, die die Wärmeleitung benötigt, um die Lösung in der Kapillare zu erwärmen. Es kann durch den kontinuierlichen Fluß der Lösung ein hoher Probendurchsatz erwartet werden.

Bei der Realisierung des Experiments ergaben sich grundsätzliche Probleme alle diese Anforderungen gemeinsam über einen weiten Zeitbereich zu erfüllen. Um einen möglichst großen Zeitbereich der Sprungzeit mit einem Aufbau abzudecken, wurde ein weiterer Aufbau entwickelt.

2. Über die Absorption eines Laserpulses eines Cr,Tm,Ho:YAG Lasersystems wird ein frei fallender Wassertropfen aufgeheizt, der nach dem Zurücklegen einer bestimmten Fallstrecke in einen gekühlten Auffangbehälter fällt. Für einen Tropfendurchmesser von wenigen zehn Mikrometern kann mit einem Lasersystem eine homogene Erwärmung gewährleistet werden. Die zu erreichende Sprungzeit kann bestimmt werden über die Länge der Fallstrecke des frei fallenden Wassertropfens in Luft. Um ein schnelles Abkühlen oder Verdunsten der Tropfen zu vermeiden, müssen die Tropfen durch Luft mit einer Luftfeuchte von fast 100% und einer Temperatur, die der Sprungtemperatur entspricht, fallen.

Die Erreichbarkeit dieser Konzepte soll zudem nach Möglichkeit an einem Modellsystem qualitativ demonstriert werden.

2 Theorie

2.1 Wärmeleitung und thermische Relaxationszeit

Die zeitliche und räumliche Entwicklung einer Temperaturverteilung innerhalb eines Volumens wird durch die Wärmeleitungsgleichung beschrieben:

$$\nabla^2 T = \frac{1}{\alpha} \frac{\partial T}{\partial t} - \frac{Q(x, y, z, t)}{K}. \quad (1)$$

In Gln. 1 ist T die Temperatur, α die thermische Diffusivität des Mediums, t die Zeit, Q die Rate, mit der pro Zeit- und Volumeneinheit Wärme erzeugt wird und K die Wärmeleitfähigkeit des Mediums. Die Wärmeleitfähigkeit und thermische Diffusivität sind stoffspezifisch und hängen über die Dichte ρ und die Wärmekapazität c voneinander ab.

$$\alpha = \frac{K}{\rho \cdot c} \quad (2)$$

Zur Lösung dieser Gleichung müssen neben den Parametern α und dem Quellterm auch noch die entsprechenden zeitlichen und räumlichen Randbedingungen bekannt sein. Allgemein kann diese partielle Differentialgleichung nicht analytisch gelöst werden. Für einige Spezialfälle lassen sich jedoch geschlossene Lösungen finden. Mit diesen kann die Temperaturentwicklung in vielen Fällen abgeschätzt werden. Aufgrund der Linearität der Differentialgleichung können einzelne Lösungen der Gleichung superponiert werden, solange das Volumen bezüglich der thermischen Eigenschaften homogen ist.

Abkühlung einer unendlich ausgedehnten Ebene

Für eine eindimensionale Geometrie kann Gln. 1 vereinfacht werden:

$$\frac{\partial^2 T}{\partial x^2} - \frac{1}{\alpha} \frac{\partial T}{\partial t} = -\frac{Q}{K}. \quad (3)$$

Wird in einer Schicht der Stärke l Wärme mit einer konstanten Rate Q produziert, die von der Temperatur unabhängig ist, kann Gln. 3 über einen Tausch der Variablen in eine homogene Form überführt werden. Mit den Randbedingungen, daß im Bereich für $x > 0$ zum Zeitpunkt $t = 0$ die Anfangstemperatur $T = 0$ ist und daß über die Grenze $x = 0$ kein Wärmefluß stattfindet, kann die Temperatur innerhalb und außerhalb des Bereiches $0 < x < l$ für $t > 0$ bestimmt werden. Man erhält [9]:

$$T = \frac{\alpha Q t}{K} \left\{ 1 - 2i^2 \operatorname{erfc} \frac{l-x}{2\sqrt{\alpha t}} - 2i^2 \operatorname{erfc} \frac{l+x}{2\sqrt{\alpha t}} \right\}, \text{ für } 0 < x < l \quad (4)$$

und

$$T = \frac{2\alpha Qt}{K} \left\{ i^2 \operatorname{erfc} \frac{x-l}{2\sqrt{\alpha t}} - i^2 \operatorname{erfc} \frac{x+l}{2\sqrt{\alpha t}} \right\}, \text{ für } x > l, \quad (5)$$

mit

$$i^2 \operatorname{erfc} x = \int_x^\infty i^1 \operatorname{erfc} \xi d\xi = \frac{1}{4} \cdot ((1 + 2x^2) \operatorname{erfc} x - \frac{2}{\sqrt{\pi}} x e^{-x^2}). \quad (6)$$

Es gilt:

$$\operatorname{erfc} x = 1 - \operatorname{erf} x = \frac{1}{\sqrt{\pi}} \int_x^\infty e^{-\omega^2} d\omega.$$

Durch Spiegelung der Lösung an der Ebene bei $x = 0$ erhält man gleichzeitig die Lösung für ein Volumen von $x = -l$ bis $x = l$, in dem mit konstanter Rate Q Wärme produziert wird, die dann bei $x = -l$ und $x = l$ in das geheizte Volumen diffundiert. Aufgrund der Symmetrie gilt für die Lösung, daß $\frac{\partial T}{\partial x}$ bei $x = 0$ verschwindet. Damit findet an dieser Stelle auch kein Wärmestrom statt, und damit ist auch die notwendige Randbedingung der Lösung in Gln. 4 und Gln. 5 erfüllt.

Abkühlzeit eines zylindrischen Volumens

Im Folgenden soll abgeschätzt werden, welche Zeit Wärme benötigt, um aus einem zylindrischen Volumen abzufließen, dessen Radius im Verhältnis zur Länge klein ist. Dazu sei ein unendlich langer Zylinder mit dem Radius R der Anfangstemperatur T_0 betrachtet, dessen Umgebung die Temperatur 0 aufweist. Zur Lösung des Problems wird der in Gln. 1 angegebene Quellterm gleich null gesetzt. Mit den Randbedingungen

$$T(r, 0) = T_0 \text{ für } |r| \leq a$$

und

$$T(r, 0) = 0 \text{ für } |r| > a$$

ist es möglich, die Temperatur auf der Zylinderachse zu jeder beliebigen Zeit t anzugeben [9]:

$$T(0, t) = T_0 (1 - e^{-\frac{a^2}{4\alpha t}}). \quad (7)$$

Mit dieser Lösung kann die Abkühlzeit des betrachteten zylindrischen Volumens leicht abgeschätzt werden. Die Zeit, in der die Temperatur auf der Zylinderachse auf $\frac{T_0}{e}$ abgefallen ist, ergibt sich zu: