

**Untersuchung der Struktur von Proteinadsorbaten an festen
und fluiden Grenzflächen**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Dem Fachbereich Chemie der
Universität Dortmund vorgelegt

von
Dipl.-Chem. Guido Jackler
aus Dortmund

Dortmund 2005

	Inhaltsverzeichnis	I
1	Einleitung	1
2	Experimentelles	5
2.1	Präparation der Proben	5
2.2	Proteine	7
2.3	Herstellung der Polyelektrolyt-Multischichten	11
2.4	Herstellung der Polyelektrolyt-Bürsten nach der Langmuir-Schäfer-Methode	13
2.5	Probenpräparation für die CD-Spektroskopie	18
3	Theorie der angewendeten Messmethoden	20
3.1	Grundlagen und Methodik der CD-Spektroskopie	20
3.2	Theorie der CD-Spektroskopie	22
3.3	Messungen am Hahn-Meitner-Institut	25
3.4	Optische Reflektometrie	29
3.5	Druckabhängige optisch-reflektometrische Untersuchung der Adsorption von SNase und Lysozym auf Siliziumdioxid	33
3.6	Neutronenreflektometrie: Grundlagen und Anwendungen	34
3.7	Analyse der Reflektometriedaten	40
4	Theorie der Proteinadsorption	47
4.1	Van der Waals-Kräfte	49
4.2	Elektrostatische Wechselwirkungen	51
4.3	Hydrophober Effekt	52
4.4	Konformationsentropie	53
4.5	<i>Counterion release force</i>	56
4.6	Theorie der Polyelektrolyt-Bürsten	57

5	Ergebnisse und Diskussion	65
5.1	Effekt der Temperatur auf die Adsorption von Lysozym an einer Silizium/Wasser-Grenzfläche	65
5.2	Adsorption von Staphylokokken-Nuclease (SNase) an einer Silizium/Wasser-Grenzfläche	81
5.3	Konzentrationsprofil des Enzyms SNase auf einer Polyelektrolyt-Multischicht	86
5.3.1	Analyse der Neutronenreflektivitätsexperimente	86
5.3.2	Ergebnisse und Diskussion	89
5.4	Proteinadsorption an einer gleichnamig geladenen Polyelektrolyt-Bürste durch Freisetzung von Gegenionen	98
5.4.1	Neutronenreflektivitätsexperimente	98
5.4.2	Quantitatives Modell für die Proteinbindung an einer gleichnamig geladenen Polyelektrolyt-Bürste	109
5.5	Sphärische Polyelektrolyt-Bürsten als Trägerpartikel für Proteine	118
6	Zusammenfassung	125
7	Literaturverzeichnis	133
8	Anhang	138
8.1	Kontaktwinkelmessungen	138
8.2	Tabellen und Abbildungen der Sekundärstruktur-Analyse von BSA	141

1 Einleitung

Proteine stellen Grundbausteine des Lebens dar. Ihre Funktionen sind vielzählig. Sie dienen als Rezeptoren, Hormone, Enzyme für Stoffwechselfvorgänge, inter- und intrazelluläre Signalstoffe und Strukturelemente. Medizinische Verwendung finden sie u.a. als Wirkstoffe wie Antibiotika, Immunoglobuline, tierische und pflanzliche Toxine.

In wässriger Lösung adsorbieren Proteine spontan auf den unterschiedlichsten künstlichen und natürlichen, organischen Oberflächen. Dieser Effekt ist einer der interessantesten in der biophysikalischen Forschung. Auf ihm basiert ein Großteil der Forschung in der Biotechnologie für ein besseres Verständnis natürlicher Abläufe, wie der Aktivität von Enzymen oder dem Ionentransport in Zellen bzw. durch Membranen.

In natürlichen Zellabläufen spielt die Proteinadsorption eine essentielle Rolle. Proteine bzw. Enzyme, die innerhalb und außerhalb der natürlichen Zelle an den Lipidmembranen adsorbiert sind, fungieren in ihrer natürlichen Membranumgebung als Ionenkanäle, Transportproteine oder Katalysatoren. Zwei der wichtigsten Beispiele für biologische Energieumwandlungen in Membransystemen sind die Photosynthese und die oxidative Phosphorylierung. Erstere ermöglicht den Pflanzen die Umwandlung der Energie des Lichtes mit Hilfe von CO₂ und Wasser in chemische Bindungsenergie in Gestalt von Glucose, zweitere die Produktion von Adenosintriphosphat (ATP) [Stryer].

Die treibenden Kräfte für die Proteinadsorption an Grenzflächen sind verschiedenste Faktoren: Van der Waalskräfte, elektrostatische Anziehungskräfte zwischen den geladenen Aminosäureseitenketten der Proteine und der Grenzfläche, Konformationsänderungen des Proteins an der Grenzfläche mit den damit einhergehenden enthalpischen bzw. entropischen Gibbs-Energiegewinnen, aber auch die *counterion release force*, deren Bedeutung in dieser Arbeit erstmalig demonstriert wird [Grünberg].

Die Adsorption von Proteinen ist zum Teil erwünscht, zum Teil aber auch unerwünscht. Sie birgt daher zahlreiche Vor- und Nachteile für das Leben des Menschen und sein Umfeld.

In ökonomischer Sicht verursacht die Adsorption enorme Kosten in der Industrie und Human-Medizin. Aber eben hier eröffnet die Steuerung dieser Adsorption von Peptiden und Proteinen ungeahnte Möglichkeiten durch die Biotechnologie.

Die unerwünschte Adsorption führt jährlich zu hohen Kosten in der Öl-, Nahrungsmittel- und Schiffsindustrie und der Human-Medizin. Sie führt zum sog. *fouling* von Unterwasserkonstruktionen, Schiffsrümpfen, Dockanlagen und Ölförderanlagen [Sever]. Ein substantieller

Verfall der Objekte geht damit einher. Bei Nahrungsmitteln führt sie zur Destabilisation von Lebensmittelemulsionen, die die Haltbarkeit der Produkte herabsetzt.

Bekanntestes Beispiel für eine Proteinadsorption im alltäglichen Leben dürfte wohl die Ablagerung von Lysozym, einem Hauptbestandteil der menschlichen Augenflüssigkeit, auf Kontaktlinsen sein. Ohne regelmäßige Reinigung der Kontaktlinsen mit speziellen Enzymen, die das Lysozym von der Oberfläche lösen, wäre das Tragen der Linsen nur für kurze Zeit möglich, da die Ablagerungen Augenreizungen, Allergien und Entzündungen hervorrufen [Janiak].

Die Ablagerung der Proteine auf künstlichen Implantaten stellt in der Human-Medizin ein großes Problem dar. Sie kann zu Blutgerinnseln führen und Entzündungen auslösen, die zu lebensbedrohlichen Komplikationen bei Patienten führen können. Hierbei spielt besonders das Protein Fibrinogen eine wichtige Rolle. Bei Wunden des menschlichen Körpers adsorbieren die roten Blutplättchen fortwährend aneinander und bilden einen Thrombus, der das verletzte Blutgefäß verstopft und so die Blutung stoppt. Dieses Verhalten kann ebenfalls durch künstliche Materialien hervorgerufen werden, sobald diese mit dem Blutplasma in Kontakt kommen.

Weitere Probleme stellen sich ebenso durch das „*biofouling*“ von Dialysemembranen, sowie durch das Adsorbieren medizinisch aktiver Wirkstoffe an der Oberfläche eines Wirkstoffträgers ein, womit ein Effektivitätsverlust des eingesetzten Medikaments einhergeht. Die Möglichkeiten, die sich aus der gezielten Adsorption von Proteinen ergeben, spiegeln sich in der Entwicklung von Biochips, Biosensoren und Flüssig- bzw. Festphasen-Immuntests (medizinische Diagnostik-Tests, z.B. durch Immobilisierung von Antikörpern, um Antigene einzufangen) wieder [Lottspeich].

Die Herstellung von proteinresistenten, biokompatiblen Oberflächen ist besonders für die Weiterentwicklung der Implantations- und Transplantationstechnik von entscheidender Bedeutung. Stoffe, die diese Resistenz ermöglichen können, sind Polymere. Mit ihrer Hilfe ist es möglich, die Adsorption je nach vorgegebenen Umgebungsbedingungen zu regulieren bzw. zu steuern.

Als außerordentlich hilfreich könnte sich die Verwendung von Polyelektrolyt-Multischichten (PEM's) [Steitz], [Riegler], [Büscher], [Biesheuvel] oder Polyelektrolyt-Bürsten (PEB's) [Czeslik2004], [Wittemann2003] erweisen. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden wird, ist eine Steuerung der Proteinadsorption durch die Regulierung der Umgebungsbedingungen, wie pH-Wert, Konzentration oder Ionenstärke möglich. Sphärische, weiche, dünnwandige PEM's

oder Polyelektrolytbürsten könnten so in Zukunft als Wirkstoffträger (*drug carrier*) eingesetzt werden, die ihre Wirkstoffe nur unter bestimmten Bedingungen und in speziellen Regionen (Entzündungsherde, Tumore, etc.) des menschlichen Körpers freigegeben und somit eine genauere Dosierung sowie eine gezielte örtliche Behandlung möglich machen [Ballauff2004], [Schönhoff]. Solche Mikrokapseln, deren dünne Polyelektrolytschichten in Abhängigkeit des pH-Wertes und der Ionenstärke permeabel für die in ihrem Hohlraum befindlichen kleineren Ionen und Moleküle werden, können ebenso als Mikroreaktoren eingesetzt werden.

Von besonderer Bedeutung ist hierbei, dass viele Enzyme und Proteine, die in PEM's eingebettet bzw. an Polyelektrolytoberflächen adsorbiert sind, nicht aggregieren und zum Großteil ihre native Konformation und ihre Aktivität behalten und so auf einer Oberfläche immobilisiert für Reaktionen bereitstehen [Schönhoff], [Ballauff2004].

Die in dieser Arbeit untersuchten Polyelektrolyt-Bürsten bieten desweiteren ein vielversprechendes Arbeitsfeld in dem Bereich der DNA-Mikroarrays. Die auf funktionalisierten Polymer-Bürsten basierenden Anordnungen dienen auch als Sensoreinheiten oder können als immobilisierte Katalysatoren verwendet werden. Als funktionale Gruppen bieten sich Proteine, DNA-Stränge, komplexierende Agentien, Farbstoffe, photoreaktive Verbindungen, Oligomere oder auch andere Polymere an.

Die Beschichtung von Transplantaten mit ausgesuchten Polymeren, wie Studien zeigen, kann so zum Beispiel in Zukunft die sog. Xeno-Transplantation ermöglichen [Dahm]. Desweiteren kann sie Abstoßungsreaktionen künstlicher Implantate, wie z.B. bei Schönheitsoperationen verwendete Silikonkissen oder Prothesen, verhindern.

Ein weiterer interessanter Einsatzbereich der Polyelektrolyt-Bürsten und Polyelektrolyt-Multischichten ist die Mikro-Nachbildung biologischer Oberflächen. Einer der bekanntesten Effekte, der in der Industrie und Forschung künstlich repliziert wird, ist der Selbstreinigungseffekt von Pflanzenblättern - auch Lotus-Effekt genannt [Barthlott]. Die mit wachsartigen Härchen überzogenen Blätter der Lotusblume oder des Frauenmantels ähneln in ihrer Form denen einer künstlich aufgetragenen Polyelektrolyt-Bürste, mit der Oberflächen schon heute beschichtet werden können.

Für den Schiffsanstrich, der den Bewuchs mit marinen Organismen wie Algen verhindern soll, dient in vielen Ländern immer noch TBT (Tributylzinn). Forschungen zeigen jedoch die Giftigkeit dieser Organometall-Verbindung, die sich als Dauergift in der Nahrungskette anreichert und den Menschen, sowie höhere Säugetiere, die am Ende der Nahrungskette stehen, irreversiblen Schaden im Bereich des vegetativen Nervensystems und ihrer Fertilität

zufügt. Eine Alternative zum immer noch eingesetzten TBT könnten daher neuartige proteinresistente Polymer-Beschichtungen für Schiffsrümpfe und maritime Unterwasserkonstruktionen bieten.

Die Grundlage für diese große Zahl von Entwicklungen ist die Erforschung der Faktoren, die die Stabilität und die Struktur von Proteinen beeinflussen, und die Untersuchung der Triebkraft, die zur Adsorption der Proteinen auf festen oder fluiden Oberflächen führt.

Am Ende dieser Entwicklung sollte die Herstellung proteinresistenter Oberflächen und die Generierung von steuerbaren Proteinresistenzen bzw. gewünschten Proteinadsorptionen stehen.

Die Techniken zur Untersuchung der Proteinadsorption sind vielzählig. Als eine der bedeutendsten Techniken darf diesbezüglich die Neutronenreflektometrie genannt werden, mit der ein exaktes Dichte- und Strukturprofil des Adsorbates erfasst werden kann, und die so den genauesten Einblick in den Aufbau der Schichten bis zur atomaren Ebene ermöglicht.

Weitere zu nennende Methoden sind die optische Reflektometrie und die Ellipsometrie, mit deren Hilfe die Menge des Adsorbates bestimmt und die Kinetik der Adsorption in situ verfolgt werden kann. Desweiteren stehen die CD-Spektroskopie für die Untersuchung von an Kolloidteilchen immobilisierten Proteinen, die konventionelle Fluoreszenz-Spektroskopie und die *total internal reflection fluorescence*-Spektroskopie (TIRF) zur Verfügung.

Mit diesen Techniken sollte es möglich sein, die verschiedenen Arten der Triebkräfte eines Proteins sich auf einer Oberfläche anzulagern, zu untersuchen. Neben den einfachen Triebkräften, wie den elektrostatischen Ionen-Anziehungskräften und der van der Waals-Wechselwirkung, stehen entropische Kräfte, wie die hydrophobe Dehydration, Konformationsänderungen [Roth1993, 1995], [Norde1996], [Zhadanov], [Lee] oder die *counterion release force* [Grünberg], [Meier-Koll] im Vordergrund.

2 Experimentelles

Die Experimente wurden zu Teilen im Hahn-Meitner-Institut (Berlin) und in den Laboren der Universität Dortmund durchgeführt. Die Strukturuntersuchungen konnten mit Hilfe des Neutronen-Reflektometers V6 des Berliner Zentrums für Neutronen-Streuung (BENSC) vorgenommen werden. Alle weiteren spektroskopischen und reflektometrischen Untersuchungen erfolgten in der Arbeitsgruppe Physikalischen Chemie I der Universität Dortmund. In diesem Kapitel sollen kurz die Grundlagen der durchgeführten Experimente und die Versuchsanordnungen erläutert werden. Die theoretischen Grundlagen werden in diesem Verlauf erläutert, soweit sie zur Interpretation der Meßergebnisse erforderlich sind.

2.1 Präparation der Proben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in Tabelle 1 genannten Proteine und Chemikalien verwendet. Die Proteine wurden vorher mittels Gel-Elektrophorese auf ihre Reinheit überprüft.

Tabelle 1: Chemikalienliste

vollständiger Name	Abkürzung	Reinheit	Bezugsquelle
Lysozym		>99 %	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Deutschland)
Staphylokokken-Nuclease	SNase	>99 %	C. A. Royer (Universität Montpellier)
Rinder-Serum-Albumin	BSA	>99 %	Sigma (A-6003) (Taufenkirchen, Deutschland)
Dansyl-Rinder-Serum-Albumin	Dansyl-BSA		M. Ballauff (Universität Bayreuth)
Umkehrosiose-Wasser		18,2 mΩ cm	Elga (Siershahn, Deutschland)
Polystyrolsulfonat	PSS		Aldrich Chemicals (Steinheim, Deutschland)
Sphärische Polyelektrolyt-Bürsten	SPB		M. Ballauff, Polymer-Institut (Universität Bayreuth)
perdeutertes Polystyrol	d-PS		Polymer Standards Service (Mainz, Deutschland)

Polyacrylsäure	PAA	40 Gew.-%	Aldrich (Taufenkirchen, Deutschland)
Polystyrol	PS		Aldrich Chemicals (Steinheim, Deutschland)
Silizium-Einkristall-Block		99,9 %	Siliziumbearbeitung Andrea Holm (Gigerenz, Deutschland)
Silizium-Wafer		99,9 %	Wacker Siltronic (Burghausen)
Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂	30 %	Merck-Schuchardt (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniak p.A.	NH ₃	99,9 %	Aldrich Chemical (Steinheim, Deutschland)
Salpetersäure p.A.	HNO ₃	70 %	Riedel-de Haën (Seelze, Deutschland)
Schwefelsäure	H ₂ SO ₄	95-97 %	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid p.A.	NaCl	> 99,5 %	Sigma (Taufenkirchen, Deutschland)
1,4-Dioxan		99,8 %	Aldrich Chemical (Steinheim, Deutschland)
Polystyrolpolyacrylsäure	PS-PAA	1,09 (M _w /M _n)	Polymer Source (Montreal, Kanada)
2-(4-Morpholino)-ethansulfonsäure	MES	99,5 %	Sigma (Taufenkirchen, Deutschland)
Polyethylenimin	PEI	50 % (w/v)	Sigma Chemical (Taufenkirchen, Deutschland)
Polyallylaminhydrochlorid	PAH		Aldrich Chemical (Steinheim, Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄	> 99 %	Aldrich Chemical (Steinheim, Deutschland)
Natriumacetat	CH ₃ COONa	> 99 %	Sigma Chemical (Taufenkirchen, Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat	NaH ₂ PO ₄	> 99 %	Aldrich Chemicals (Steinheim, Deutschland)
Deuteriumoxid	D ₂ O	> 99,9 % D	Sigma Chemical (Taufenkirchen, Deutschland)
Toluol		> 99,8 %	Aldrich Chemical (Steinheim, Deutschland)

2.2 Proteine

Proteine bestehen aus einer linearen Polypeptidkette und sind zusammengesetzt aus bis zu 20 verschiedenen Aminosäuren. Die für jedes Protein charakteristische Aminosäuresequenz bildet die sogenannte Primärstruktur.

Proteine sind nahezu an allen biologischen Prozessen beteiligt. So können sie die Funktion eines Katalysators für spezielle biochemische Reaktionen in einer Zelle übernehmen oder z.B. den Stofftransport innerhalb der Zelle und darüber hinaus steuern.

Ihre letztendlich spezielle funktionelle Eigenschaft resultiert aus ihrer dreidimensionalen Form - der Sekundärstruktur und der Tertiärstruktur. Der native, energetisch günstigste Zustand des Proteins wird durch seine Primärstruktur festgelegt. Bestandteile der Sekundärstruktur sind α -Helices, β -Faltblätter und Schleifen. Die vollständige Beschreibung der dreidimensionalen Struktur des Proteins findet in der Tertiärstruktur ihren Ausdruck. Hier werden die räumliche Anordnung aller Atome der Peptidkette und alle nichtkovalenten Bindungen (H-Brücken, van der Waals- und hydrophobe Kräfte), die zur Stabilisierung der Struktur beitragen, berücksichtigt.

Im Verlauf dieser Arbeit wird der Aspekt der Proteinfaltung als Funktion der Faktoren Temperatur, Ionenstärke und pH-Wert während der Adsorption des Proteins aus einer Lösung an eine Oberfläche näher beleuchtet werden. Zu den in dieser Arbeit untersuchten Proteinen gehören das Rinder-Serum-Albumin (BSA), die Staphylokokken-Nuclease (SNase), sowie das Hühnereiweiß-Lysozym.

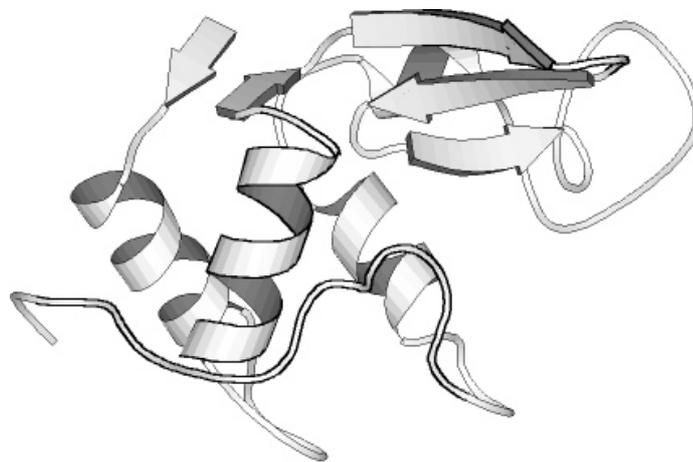


Abbildung 1: Bänder-Diagramm des Hühnereiweiß-Lysozyms (Graphik erstellt mit RasMol – PDB-File: 3LYZ) [PDB].

Hühnereiweiß-Lysozym (Abbildung 1): Seine Funktion ist die Hydrolyse verschiedener Polysaccharide. Die Größe beträgt $3 \times 3 \times 4,5 \text{ nm}^3$, die Molmasse 14300 g mol^{-1} . Das Lysozym besteht aus 129 Aminosäureresten, 4 Disulfid-Brücken, 9 sauren Resten (2 Glu, 7 Asp), 18 basischen Resten (6 Lys, 11 Arg, 1 His) und 6 Tryptophan-Resten. Seine Sekundärstruktur verfügt über 4 α -Helices, 2 3_{10} -Helices, sowie 2 β -Faltblätter. Der isoelektrische Punkt liegt bei einem pH-Wert von 11,1. Die Entfaltungstemperatur ist bei $\text{pH}=7$ $70 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Entfaltungs-Gibbs-Energie beträgt 65 kJ mol^{-1} [Creighton].

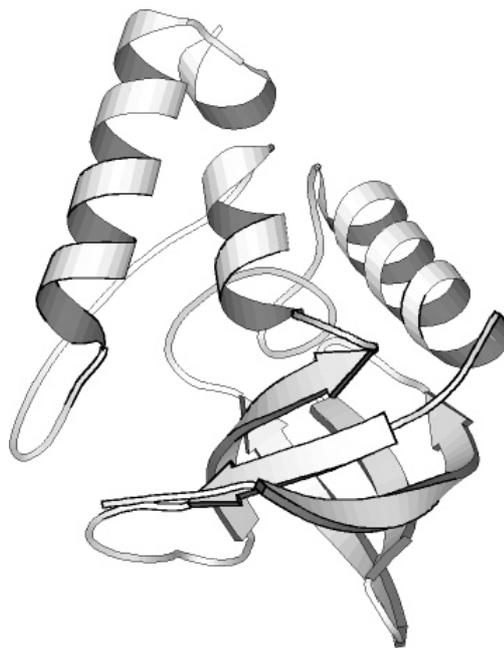


Abbildung 2: Bänder-Diagramm der Staphylokokken-Nuclease (Graphik erstellt mit RasMol - PDB-File: 1EYO) [PDB].

Staphylokokken-Nuclease (SNase) (Abbildung 2): Ihre Funktion ist die Spaltung von DNA und RNA. SNase verfügt über einen Durchmesser von 5 nm. Der Gyrationradius ist 17 \AA . Seine Molmasse beträgt 16800 g mol^{-1} . Sie besteht aus 149 Aminosäureresten, 20 basischen Resten (12 Glu, 8 Asp), 32 sauren Resten (23 Lys, 5 Arg, 4 His), 1 Tryptophan-Rest und besitzt keine Disulfid-Brücken. Ihre Sekundärstruktur verfügt über einen Anteil von ca. 18 % α -Helices und 26 % β -Faltblättern. Der isoelektrische Punkt liegt bei einem pH-Wert von 9,5. Die Entfaltungstemperatur liegt bei $\text{pH}=7$ bei 52°C . Die Entfaltungs-Gibbs-Energie beträgt 24 kJ mol^{-1} .



Abbildung 3: Bänder-Diagramm des Rinder-Serum-Albumins (BSA) Proteins (Graphik erstellt mit RasMol - PDB-File: 1E78) [PDB].

Das relativ flexible Serumalbumin fungiert im tierischen (BSA) bzw. im menschlichen (*human serum albumin*, HSA) Körper als Transportprotein (Abbildung 3). Seine Seitenlängen betragen 8 nm, bei einer Dicke von 3 nm. Die Molmasse des Bovine Serum Albumins ist 66300 g mol^{-1} . Es besteht aus 582 Aminosäureresten, 17 Disulfid-Brücken, einem freien Cystein, 100 sauren Resten (59 Glu, 41 Asp), 99 basischen Resten (59 Lys, 23 Arg, 17 His) und 2 Tryptophan-Resten. Seine Sekundärstruktur besteht zu 70 % aus α -Helices aber keinen β -Faltblättern. Der isoelektrische Punkt liegt bei $\text{pH}=5$ [Peters], [Carter]. Die Entfaltungstemperatur liegt bei einem pH -Wert von 7 bei $62 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Entfaltungs-Gibbs-Energie beträgt 18 kJ mol^{-1} . Der reversible Konformationsübergang zur F-Form findet unter $\text{pH}=4,3$, der zur E-Form unter $\text{pH}=2,7$ statt [Peters].

Die Adsorption der oben beschriebenen Proteine wurde auf den Oberflächen Siliziumdioxid, Kolloidteilchen, Polyelektrolyt-Multischichten und Polyelektrolyt-Bürsten untersucht.

Das Hühnereiweiß-Lysozym wurde von der Firma Roche Molecular Biochemicals (Mannheim), das BSA wurde von der Firma Sigma (Katalognummer A-6003) bezogen. Die SNase wurde in freundlicher Zusammenarbeit von C. A. Royer (Universität Montpellier 1)

präpariert. Die Reinheit des salzfreien Lysozyms und des BSA's wurde mit Hilfe der Gel-Elektrophorese zu > 99 % bestimmt. Die Proteine wurden ohne weitere Reinigung verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer wurden aus den Dinatriumhydrogenphosphat- und MES-Salzen der Firma Merck mit bidestilliertem bzw. mittels des Ionenaustauschsystems „Pure lab classic“ der Firma ELGA gereinigtem Wasser (spezifischer Widerstand: 18 mΩ cm) angesetzt.

Proteinlösungen wurden aus Lösungen der entsprechenden Puffer hergestellt. Ihre Endkonzentration wurde mit Hilfe UV-spektroskopischer Untersuchungen bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. (Extinktionskoeffizienten: Lysozym $\epsilon_{280} = 2,65 \text{ mg}^{-1} \text{ mL cm}^{-1}$ [Steiner], SNase $\epsilon_{280} = 0,93 \text{ mg}^{-1} \text{ mL cm}^{-1}$ [Fuchs], BSA $\epsilon_{280} = 1,346 \text{ mg}^{-1} \text{ mL cm}^{-1}$ [Fasman]).

Die bei optisch-reflektometrischen Untersuchungen eingesetzten Silizium-Scheiben wurden freundlicherweise von der Firma Wacker Siltronic (Burghausen) zur Verfügung gestellt. Die in die Größe 1,5 cm x 2 cm geschnittenen Plättchen wurden mit Aceton und Ethanol von Fettrückständen und anderen Verunreinigungen befreit und anschließend mit einer sog. Piranhia-Lösung (60 % H₂SO₄ (konz.), 30 % H₂O₂ (30%ig), 10% destilliertes Wasser) ca. 10 min bei 90 °C gereinigt. Die so gereinigten Silizium-Plättchen wurden im Anschluss bei einer Temperatur von 1000 °C für ca. 3 Stunden in einem Ofen der Firma Nabertherm (Modell L3/11/CSD) erhitzt. Dieser Vorgang ist notwendig, um eine etwa 100 nm dicke Siliziumoxid-Schicht auf der Wafer-Oberfläche zu erzeugen, die die Detektierung eines Proteinadsorbates mit Hilfe der optischen Reflektometrie ermöglicht.

Die Silizium-Wafer, die bei den neutronenreflektometrischen Experimenten eingesetzt wurden, wurden bei der Firma Siliziumbearbeitung Andrea Holm (Gigerenz) erworben. Ihre Größe beträgt 8 cm x 5 cm x 1,5 cm. Beide großflächigen Seiten besitzen eine feinpolierte Oberfläche. Für die Messungen am System Silizium/Siliziumdioxid/Lysozym erfolgte die Reinigung der Wafer durch 15 minütiges Erhitzen bei ca. 90°C in einer Lösung aus 60 mL Schwefelsäure (96%-ig), 30 mL Wasserstoffperoxid und 10 mL destillierten Wassers (Piranhia-Lösung). Die Bildung der Oxidschicht erfolgte während des Aufheizens des Wafers im Ofen über einen Zeitraum von 100 min auf 700°C. Die thermische Erzeugung der Oxidschicht ist nötig, um die untersuchten Substrate der optisch-reflektometrischen und neutronenreflektometrischen Untersuchungen anzugleichen und, wie schon zuvor erwähnt, die Sensitivität der durchgeführten Messungen für ein Proteinadsorbat zu erhöhen.

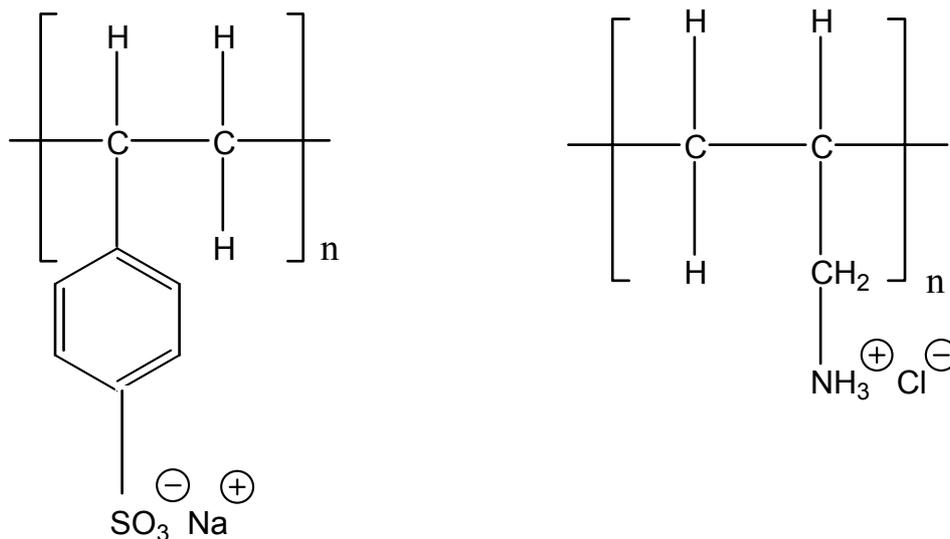
Kontaktwinkeluntersuchungen an Si-Wafern wurden an der Technischen Universität Berlin von Herrn Dr. Steffen Uredat durchgeführt. Beide präparierte Wafertypen, sowohl für die optisch-, als auch für die neutronenreflektometrischen Untersuchungen zeigten eine vollständige Benetzung der Oberfläche mit Wasser. Aus Kontaktwinkelmessungen an den neutronenreflektometrisch untersuchten Wafern ergab sich ein Winkel von 0°, an den Wafern,

die in den optischen Reflektometrie-Experimenten eingesetzt wurden, Kontaktwinkel in einem Bereich von 0-14° (experimenteller Fehler $\pm 5^\circ$).

Die Reinigung der Silizium-Wafer, die mit Polyelektrolyten beschichtet wurden, erfolgte durch Erhitzen in einer Mischung aus einem Teil Wasserstoffperoxid (30 %), einem Teil Ammoniak (30 %) und fünf Teilen destilliertem Wasser bei einer Temperatur von ca. 90 °C und anschließendem Spülen mit reinem Wasser.

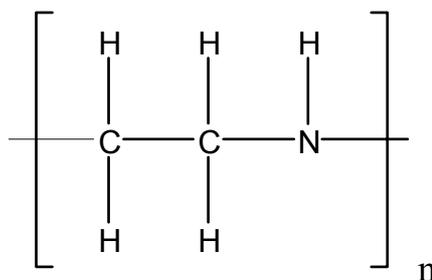
2.3 Herstellung der Polyelektrolyt-Multschichten

Für die Darstellung der Polyelektrolyt-Multschichten wurden die Polymere PEI, PSS und PAH (Abbildung 4) verwendet.



PSS: Polystyrolsulfonat

PAH: Polyallylaminhydrochlorid



PEI: Polyethylenimin

Abbildung 4: Strukturformeln der bei der Präparation nach der *layer by layer*-Methode eingesetzten Polymere.

Alle Polymere wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. Für alle Experimente und Reinigungsschritte wurde ultrareines Wasser verwendet. Die Polymer-Konzentrationen wurden zu $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ eingestellt. Die Zugabe von Natriumchlorid in molaren Größen ermöglicht die sehr genaue Generierung einer gewünschten Schichtdicke einer Polyelektrolyt-Doppelschicht [Decher1992]. Das Einstellen der Ionenstärke erfolgte bei den PSS und PAH Lösung mit NaCl (Merck) auf einen Wert von 1 M. Die NaCl-Konzentration der PEI-Lösung betrug 0 mol L^{-1} .

Die Methode der Herstellung von Polyelektrolyt-Multischichten basiert auf der elektrostatischen Anziehungskraft zwischen unterschiedlichen Ladungen (Abbildung 5). Hierbei sind keine weiteren Aktivierungsschritte, wie eine Temperierung, notwendig.

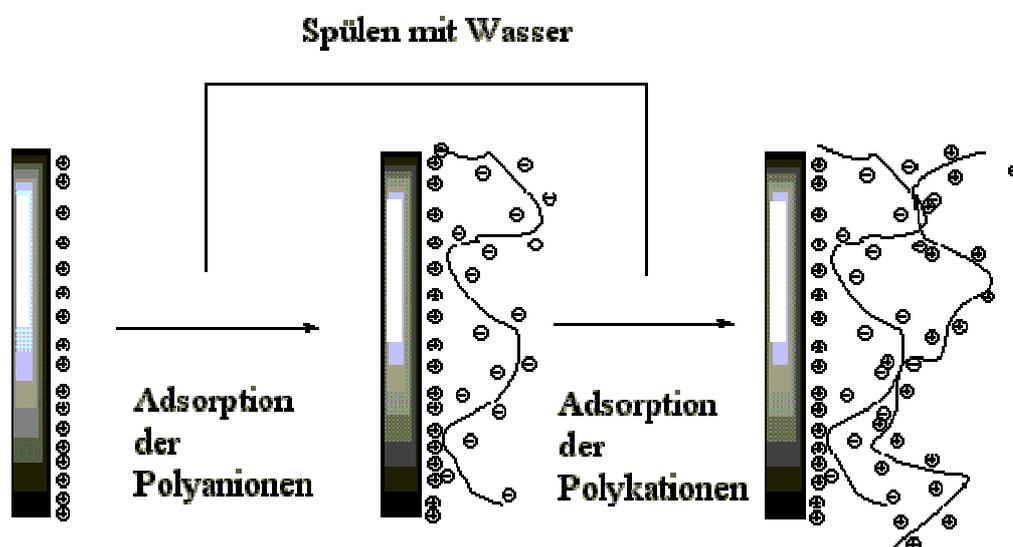


Abbildung 5: Aufbau einer Polyelektrolyt-Multischichten durch alternierende Adsorption von Polyanionen und Polykationen. Polyelektrolyt-Multischichten zeigen i. d. R. eine lineare Korrelation zwischen der absoluten Filmdicke und der Anzahl der adsorbierten Schichten. Eine Variation der mittleren Schichtdicke eines jeden Schichtpaares sowie die absolute Schichtdicke ist durch die Zugabe molarer Mengen von Natriumchlorid möglich [Decher1997].

Die Herstellung der Polyelektrolyt-Multischichten erfolgte durch alternierendes Eintauchen eines gereinigten Wafers in mit den verschiedenen Polymerlösungen gefüllte Bechergläser (Abbildung 6). Hierbei wurde der Siliziumblock zunächst in die PEI-, PSS-, PAH- und alternierend wieder in die PSS-Lösung eingetaucht, bis sechs Polyelektrolyt-Doppelschichten aufgetragen worden sind. Die Eintauchzeit betrug für jeden Vorgang 20 min. Zwischen den einzelnen Eintauchvorgängen wurde der beschichtete Wafer jeweils 2 min mit reinem Wasser gespült (Abbildung 6).

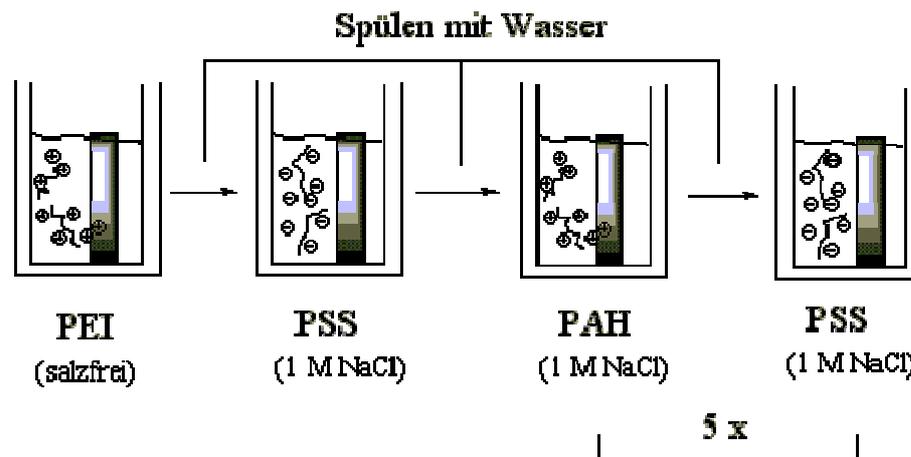


Abbildung 6: Herstellung einer Polyelektrolyt-Multischicht durch alternierendes Eintauchen eines Siliziumwafers in PEI-, PSS- und PAH-Lösungen.

Nach Beendigung der Herstellung der Polyelektrolyt-Multischichten wurde der Wafer für sechs Stunden im Wasserbad zur besseren Verankerung der Polymerschichten bei einer Temperatur von 60 °C erhitzt.

2.4 Herstellung der Polyelektrolyt-Bürsten nach der Langmuir-Schäfer Methode

Für die Darstellung der Polyelektrolyt-Bürsten wurden die Polymere d-PS und PS-PAA (Abbildung 7) verwendet.

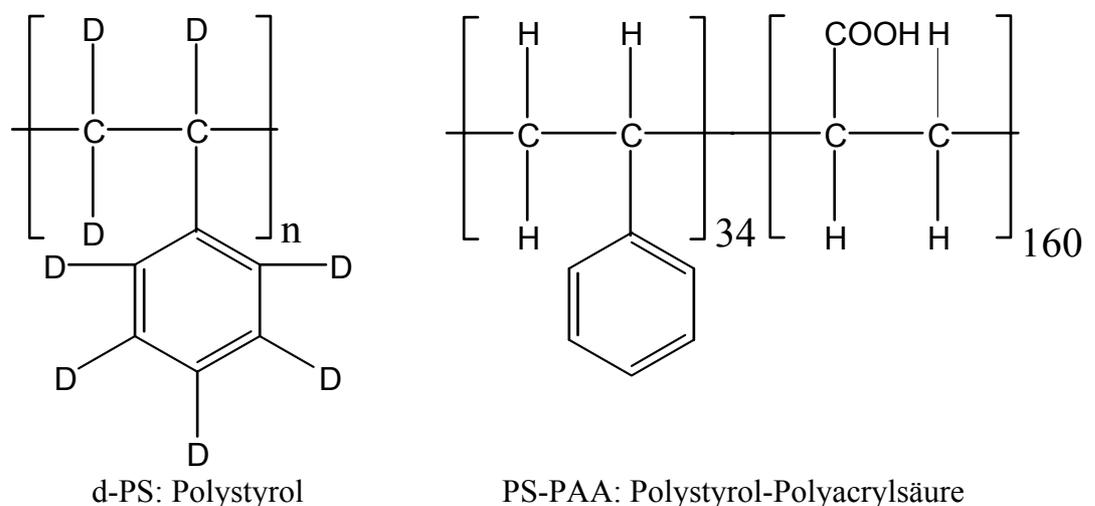


Abbildung 7: Strukturformeln der bei der Präparation nach der Langmuir-Schäfer-Technik eingesetzten Polymere.

Die Präparation der PAA-Bürsten erfolgte mit leichten Modifikationen wie in der Literatur beschrieben [Ulman], [Currie]. Die für die Neutronenreflektometrie zu präparierenden Wafer wurden zunächst nach der RCA-Methode [Kern1978, 1990] gereinigt und anschließend mit perdeutertem Polystyrol beschichtet. Hierzu wird eine d-PS-Lösung auf einen Silizium-Wafer aufgetragen, der anschließend auf 4000 U/min beschleunigt wird (*spin coating*). Verwendet wurde der Spin-Coater KW-4A der Firma Chemat Technology. Die Konzentration des perdeuterten Polystyrols in Toluol beträgt 5,5 mg/ mL. Aufgetragen wird die d-PS Schicht auf die 8 cm x 5 cm große Seite des Silizium-Wafers.

Mit diesem Verfahren konnte eine ungefähr 170 Å-dicke Polystyrol-Schicht hergestellt werden. Die Schichtdicke wurde durch Röntgen-Reflektivitätsmessungen bestimmt. Die Reflektivitätskurven wurden durch Anfitzen eines Schichtenmodells an die experimentellen Daten unter Verwendung der optischen Matrix-Methode analysiert [Hansen].

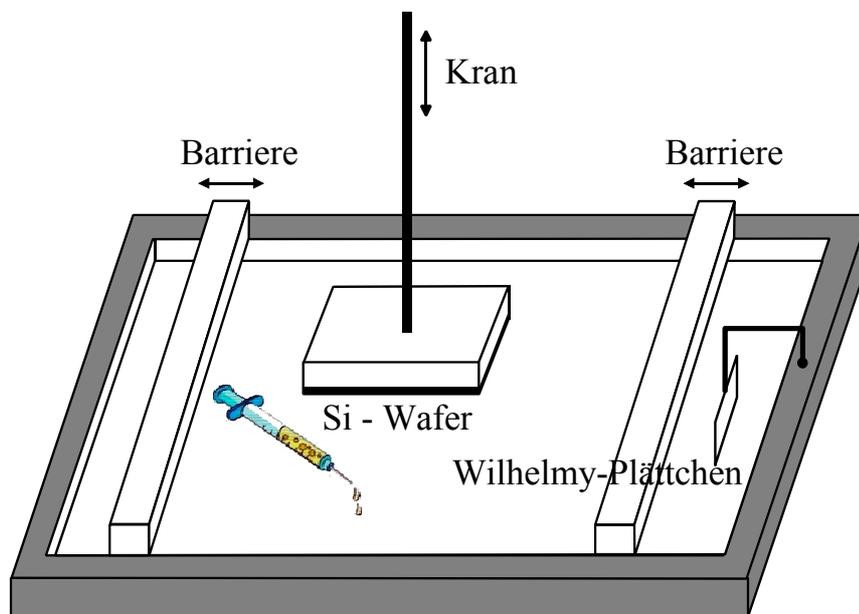


Abbildung 8: Langmuir-Trog mit Kran, Wilhelmy-Plättchen, Barrieren und Silizium-Wafer.

5 mg des Diblock-Copolymers PS-PAA von Polymer Source (Montreal, Kanada) wurden in 3 mL 1,4-Dioxan bei 60 °C gelöst. Das Copolymer besteht aus 34 Styrol- und 160 Acrylsäure-Monomeren. Nach Zugabe von 2 mL Toluol wird die PS-PAA-Lösung mit einer Hamiltonspritze auf der Wasseroberfläche in einem Langmuir-Trog (Abbildung 8) gespreitet, um eine PS-PAA Monoschicht mit einer Packungsdichte von 0,1 Ketten pro nm² zu erhalten (Abbildung 9).

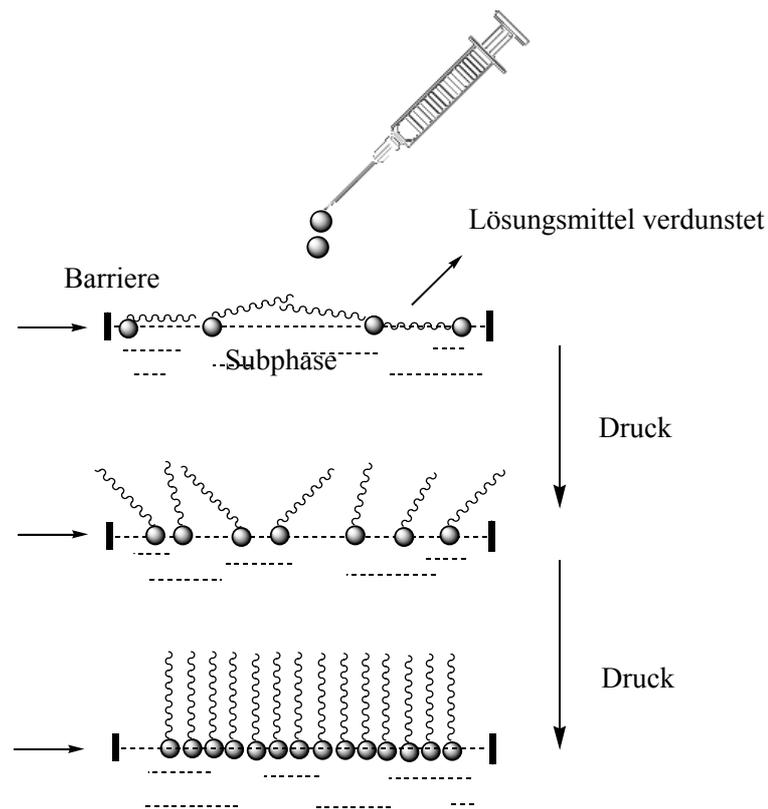


Abbildung 9: Spreiten des PS-PAA-Amphiphils auf der Subphasen-Oberfläche und anschließende Kompression der Moleküle mit Hilfe der Barrieren.

Das Wasser der Subphase beinhaltet 1 mM NaCl und wurde mit einer konzentrierten Salzsäurelösung auf $\text{pH}=4,7$ eingestellt, um die Ladung des Copolymers zu verringern und die Monoschicht des Copolymers auf der Wasseroberfläche zu stabilisieren.

Gemäß der Langmuir-Schäfer-Technik wurde nun der mit d-PS beschichtete Siliziumwafer mit Hilfe eines elektronisch gesteuerten Kranes langsam in die Lösung getaucht, um die PS-PAA-Moleküle auf den Wafer zu übertragen [Roberts], [Ulman]. Aus der Änderung der Oberflächenspannung konnte ein Transferverhältnis von $1,5 \pm 0,3$ für alle drei beschichteten Wafer errechnet werden, was einer *grafting*-Dichte (Verankerungsdichte der Ketten) von $0,15 \text{ nm}^{-2}$ entspricht (Abbildung 10).

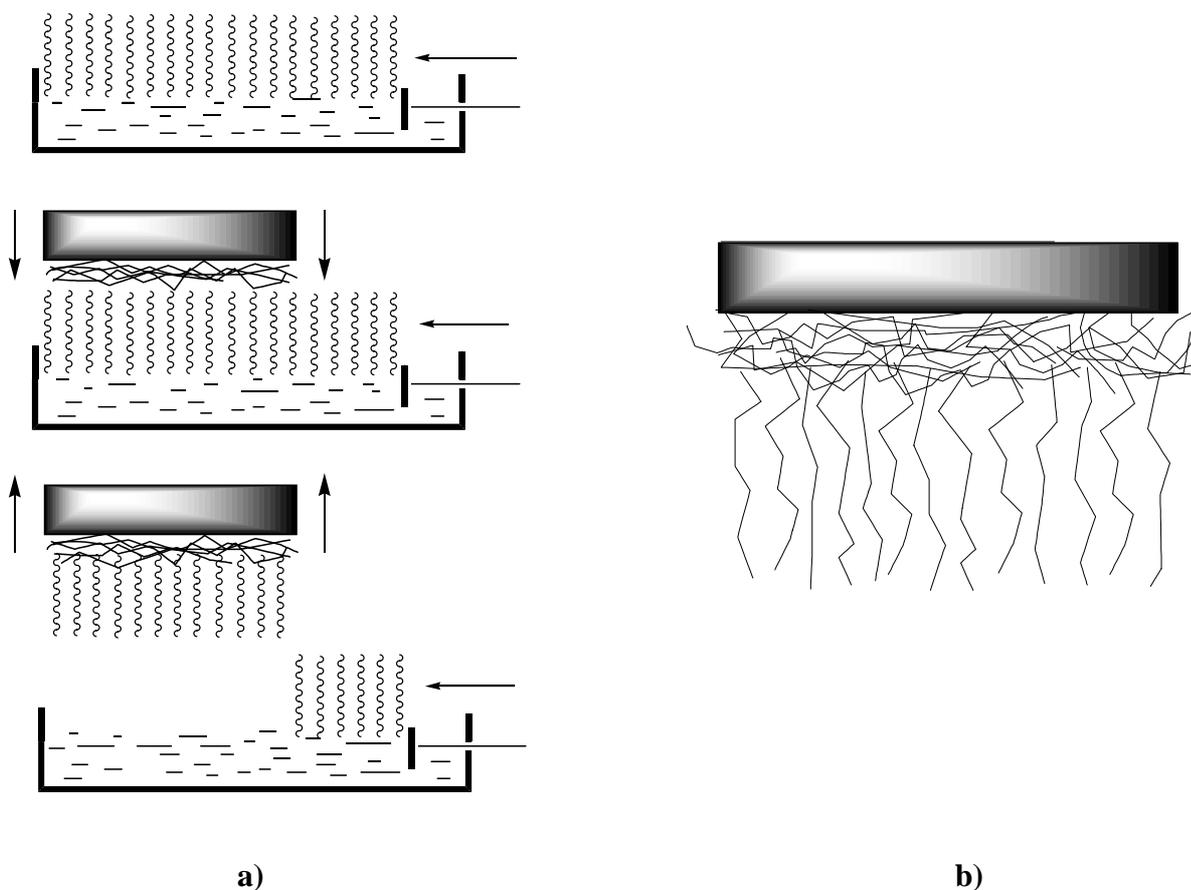


Abbildung 10: a) Aufbringen der PS-PAA Moleküle mit Hilfe eines elektrisch gesteuerten Krans auf die mit d-PS beschichtete Oberfläche des Silizium-Einkristalls
 b) fertige Polyelektrolyt-Bürste

Anschließend wurden die Wafer bei einer Temperatur von 100 °C für ca. 10 min erhitzt, was zu einem Eindringen der PS-Ketten der PS-PAA-Moleküle in die d-PS-Schicht führt. Dabei bildet sich eine stabile und irreversibel fixierte PAA-Bürste.

Die erfolgreiche Präparation planarer PAA-Bürsten auf d-PS-beschichteten Silizium-Wafern wurde mittels Röntgen-Reflektivitätsmessung an der Grenzfläche zur Luft überprüft. Die Analyse der Reflektivitätskurven ergab eine Schichtdickenzunahme von 30 Å aufgrund der Auftragung der PS-PAA Moleküle, was auf eine trockene und kollabierte PAA-Bürste schließen lässt.

Mit einer molaren Masse von 15000 g mol⁻¹ für PS-PAA und einer angenommenen PS-PAA-Dichte von 1 g mL⁻¹ entspricht eine Schichtdicke von 30 Å einer Verankerungsdichte von 0,12 nm⁻², in guter Übereinstimmung mit dem erwarteten Wert von 0,15 nm⁻². Kontaktwinkelmessungen wurden zur weiteren Charakterisierung der hergestellten planaren PAA-Bürsten durchgeführt (siehe Anhang und Abbildungen 11, 12).

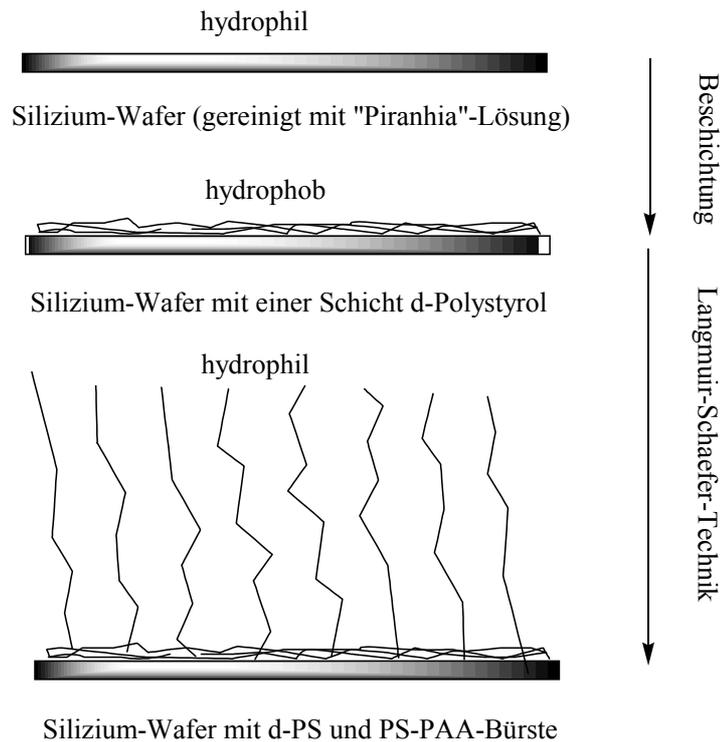


Abbildung 11: Wechsel der Hydrophilie der Si-Wafer-Oberfläche mit fortlaufender Probenbereitung.

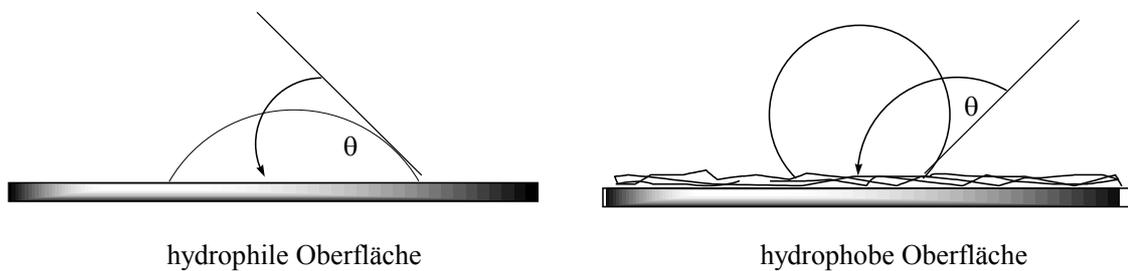


Abbildung 12: Kontaktwinkel-Messung eines Flüssigkeitstropfens auf einer hydrophoben bzw. einer hydrophilen Oberfläche.

Die pH-Werte der Lösungen für Kontaktwinkelmessungen wurden mit Salzsäure oder NaCO_3 und die Ionenstärken mit NaCl eingestellt. Alle Messungen wurden dreimal durchgeführt. Wie die Tabelle A1 (Anhang) zeigt, ist keine signifikante Änderung der Kontaktwinkel als Funktion der Ionenstärke bei niedrigen pH-Werten von etwa 3 zu sehen, bei der die PAA-Ketten der Bürste überwiegend ungeladen sind. Die Erhöhung des pH-Wertes auf 9,1 führt zur Dissoziation der PAA und zur Anwesenheit von Gegenionen. Als Konsequenz daraus ergibt sich, dass die Bürste stärker hydrophil ist bei verringertem Kontaktwinkel.

Bei geringer Ionenstärke der Lösung erzeugen die Gegenionen in der PAA-Bürste einen größeren osmotischen Druck und die PAA-Bürste erscheint stärker hydrophil, wie beobachtet.

Daher bestätigen sowohl die Messungen der Röntgen-Reflektivität, als auch die der Kontaktwinkel die erfolgreiche Präparation der planaren PAA-Bürste auf den Siliziumwafern.

2.5 Probenpräparation für die CD-Spektroskopie

Die CD-spektroskopische Untersuchung der Adsorption von BSA auf sphärischen Polyelektrolyt-Bürsten (SPB) wurde in den Laboren der Physikalischen Chemie I der Universität Dortmund durchgeführt. Bei dem verwendeten Puffer handelte es sich um 10 mM MES-Puffer (pH=6,1). Untersucht wurde mit Dansyl-Gruppen markiertes BSA vor der Adsorption [Wang], [Lakowicz] und mit Dansyl-Gruppen markiertes BSA, das von den SPB desorbiert wurde.

Die Darstellung des desorbierten Dansyl-BSA erfolgte, indem das BSA zunächst auf einer SPB adsorbiert und anschließend wieder desorbiert wurde. Eine equilibrierte Lösung aus BSA und SPB wurde in eine *serum replacement*-Zelle gefüllt. Unter leichtem Rühren wurde die Lösung achtmal mit einer reinen Pufferlösung gewaschen und durch eine Cellulose-Nitratmembran filtriert (Schleicher & Schuell, Kassel, Germany). Die Membran besitzt eine Porengröße von 50 nm, um das Kolloid (Radius des Latexkerns ~ 52 nm) mit dem darauf adsorbiertem BSA zurückzuhalten. Das noch in der Lösung befindliche gelöste und nicht adsorbierte BSA wird abfiltriert.

Dieser Prozess wurde mehrmals wiederholt und zwar diesmal mit einer $0,5 \text{ mol l}^{-1}$ NaCl-Lösung, welche das adsorbierte BSA von der Bürste löst. Die Menge an desorbiertem BSA wurde durch UV-Messungen überprüft. Der Anteil an BSA-Dimeren erhöht sich durch diese Adsorptions-Desorptions-Verfahren laut SDS-PAGE nicht [Jackler2004].

Bei den SPB handelt es sich um Kolloidteilchen mit einem festen Polystyrolkern von ca. 100 nm Durchmesser, auf welchem lange lineare PAA-Ketten verankert sind. Die Arbeitsgruppe Ballauff am Polymer-Institut der Universität Karlsruhe synthetisierte die Kolloide mittels eines Photoinitiators. Hierbei wurde auf die Polystyrol-Latexkügelchen der Photoinitiator HMEM (2—[*p*-(2-Hydroxy-2-methylpropiophenon)]-ethylenglycol-methacrylat) aufgetragen [Ballauff1999] (Abbildung 13).

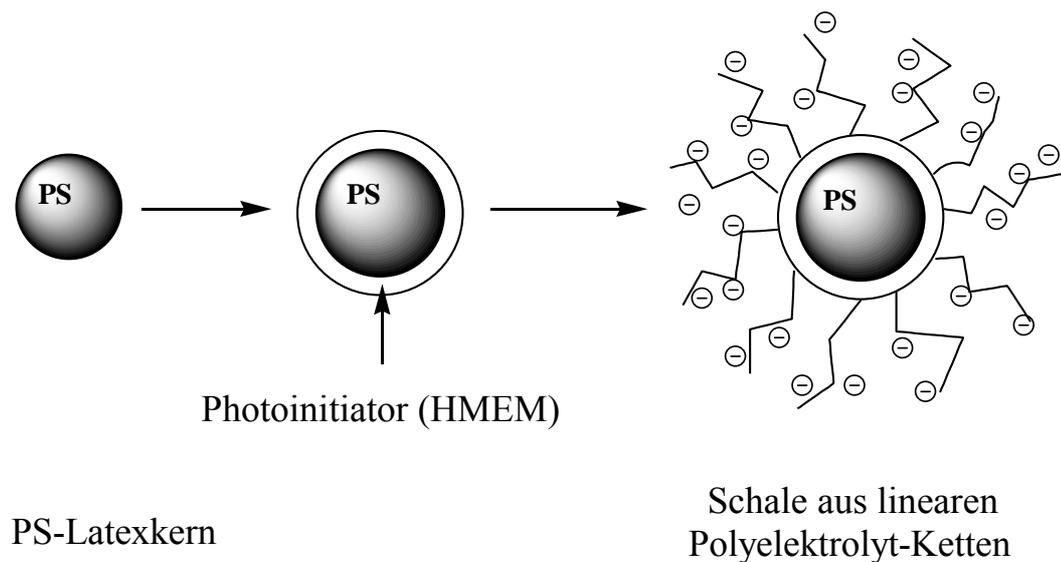


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Synthese einer sphärischen Polyelektrolyt-Bürste.

CD-Spektren wurden im Temperaturbereich zwischen 20 °C und 80 °C aufgenommen. Um den Intensitätsverlust infolge von Strahlungsabsorption durch Luftsauerstoff zu minimieren, wurde das gesamte CD-Spektrometer durchgängig während der Messungen mit Stickstoff gespült. Das Durchflußvolumen wurde auf ca. 3-4 L min⁻¹ eingestellt. Für jedes aufgenommene Spektrum wurden 15–25 Einzelmessungen in einem Wellenlängenbereich von 190-260 nm akkumuliert. Nach der Umrechnung der CD-Spektren in molare Elliptizität erfolgte die Analyse der Sekundärstruktur des BSA in Abhängigkeit der Temperatur. Die Berechnung der Sekundärstruktur ergab die Anteile an α -Helix, parallelen und antiparallelen β -Faltblättern, Schleifen und Zufallsknäuel.

Als Auswerteprogramm wurde die *convex constraint algorithm* (CCA)-Methode [Perczel1991,1992] angewendet. Eine CD-spektroskopische Analyse von BSA, das auf den SPB-Teilchen adsorbiert ist, kann aufgrund der großen UV-Absorption der SPB-Teilchen nicht durchgeführt werden [Urry].

3 Theorie der angewendeten Messverfahren

3.1 Grundlagen und Methodik der CD-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie ist eine Form der Lichtabsorptionsspektroskopie, welche den Unterschied der Absorption rechts- und links-zirkularpolarisierten Lichtes misst. Sie nutzt die Chiralität der zu untersuchenden Moleküle und liefert Messwerte entgegengesetzten Vorzeichens für Enantiomere (Spiegelbildisomere).

Bevorzugte Absorption entweder links- oder rechts-zirkularpolarisierten Lichtes einer Probe, wie z.B. eines Proteins in wässriger Lösung, führt zur Detektion elliptischpolarisierten Lichtes.

Die spektrale Signatur der Elliptizität als Funktion der verschiedenen Wellenlängen liefert strukturelle Informationen über Biomoleküle.

Die CD-Spektroskopie stellt eine nützliche Technik dar, die für Proteinuntersuchungen bezüglich

- der ihrer Sekundärstruktur und Tertiärstruktur
- der Konformationsänderungen
- des Einflusses der Umgebungsbedingungen, wie Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke und Co-Solventien
- der Proteinfaltung und Denaturierung
- der Faltungsdynamik und der Faltungswege

eingesetzt werden kann.

Strukturänderungen in Biomolekülen stellen einen der Wege dar, mit deren Hilfe die biologische Signalübermittlung stattfindet. Die korrekte Faltung eines Proteins ist essentiell für seine spezifische Funktion. Mit Hilfe der CD-Spektroskopie können diese Änderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur durch die elektronische Anregung chromophorer Gruppen im Protein detektiert werden. Der Peptidübergang wird im fernen UV (~190-220 nm), die der aromatischen Aminosäureseitenketten und Disulfidbindungen im nahen UV (~270-290 nm) aufgezeichnet.

Die Abbildung 14 zeigt typische CD-Spektren reiner Sekundärelemente eines Proteins, die sich aus den elektronischen Übergängen der Peptidchromophore im fernen UV ergeben [Yang].

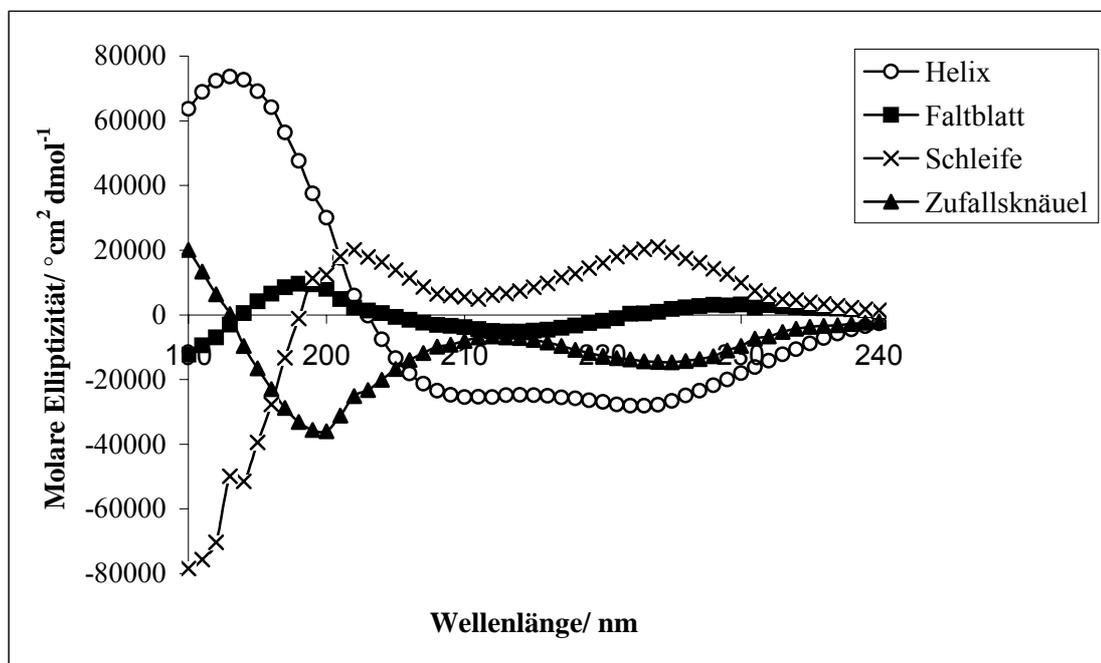


Abbildung 14: CD-Referenzspektren im Wellenlängenbereich des fernen UV unterschiedlicher Sekundärstrukturelemente. Aufgetragen ist die residuengewichtete molare Elliptizität [Yang].

Alle verwendeten Parameter und Einstellung des verwendeten CD-Spektrometers Jasco 715 sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Einstellungen der Messparameter des CD-Spektrometers Jasco-715.

Parameter	Einstellungen
Wellenlängenbereich λ / nm	190-260
Schrittweite $\Delta\lambda$ / nm	1
Auflösung l / nm	1,0
Scan-Geschwindigkeit $(\Delta\lambda/ \Delta t)$ / (nm/ s)	100
Antwortzeit t /s	0,5
Empfindlichkeit Ψ_{\max} / m 0,001°	100
Anzahl der Scans n	20

3.2 Theorie der CD Spektroskopie

Von optischer Aktivität eines Stoffes wird gesprochen, wenn zwei Phänomene auftreten, die optische Rotationsdispersion (ORD) und der Zirkulardichroismus (CD).

Beide zusammengehörigen Phänomene beruhen auf den folgenden Beobachtungen. Durchläuft ein linear polarisierter Lichtstrahl ein nicht absorbierendes jedoch optisch aktives Material, so wird die Polarisationssebene (Schwingungsebene des elektrischen Vektors \vec{E} des linear polarisierten Lichtes) gedreht. Dieses wellenlängenabhängige Phänomen wird optische Rotationsdispersion genannt.

Durchläuft ein linear polarisierter Lichtstrahl ein absorbierendes und optisch aktives Material, so entsteht elliptisch polarisiertes Licht oder, was äquivalent ist, die Absorption des rechts- und links-zirkular polarisierten Lichtes ist verschieden. Auch diese Erscheinung ist wellenlängenabhängig und wird Zirkulardichroismus genannt.

Vor Eintritt des polarisierten Lichtes, das sich in z -Richtung ausbreitet, in ein optisch aktives Medium sind die Phasengeschwindigkeiten v der beiden Vektoren \vec{E}_L und \vec{E}_R gleich groß (Abbildung 15). Die Vektoren des links- und rechts-zirkularpolarisierten Lichtes rotieren entgegengesetzt und gleich schnell, wobei die Polarisationssebene erhalten bleibt. Die Phasengeschwindigkeiten in optisch aktiven Medien sind jedoch verschieden. Nach dem Durchlaufen der optisch aktiven Probe der Schichtdicke d sind die Phasengeschwindigkeiten wieder gleich groß. Die Überlagerung der \vec{E} -Vektoren ergibt eine um α gedrehte Polarisationssebene (Abbildung 15) [Rupp].

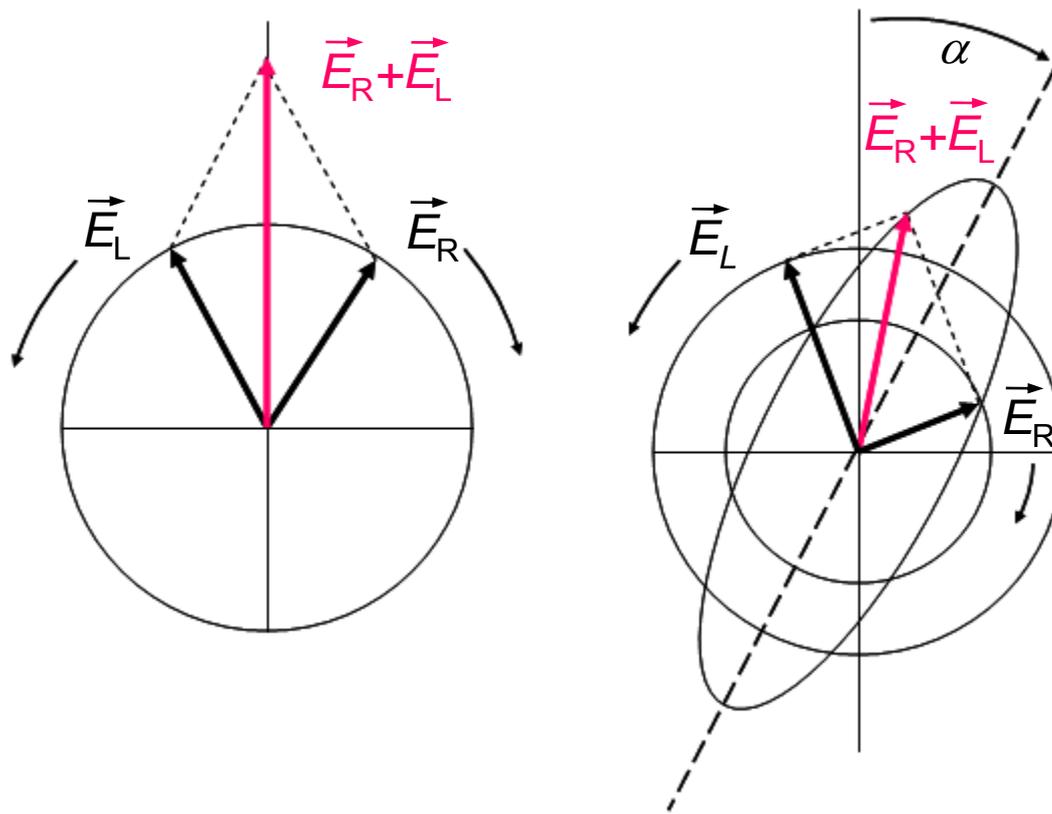


Abbildung 15:

- Linear polarisiertes Licht kann als Superposition zirkular polarisierten Lichtes und gleicher Phase angesehen werden.
- Unterschiedliche Absorption von links- und rechts-zirkular polarisierten Komponenten führt zu Elliptizität und optischer Rotation (OR).

Die Rohdaten, die von einem CD-Spektrometer aufgezeichnet werden, repräsentieren die Elliptizität ψ der Probe als Funktion der Wellenlänge.

$$\psi = \arctan \frac{E_R - E_L}{E_R + E_L} \quad (1)$$

Der Zusammenhang zwischen dem Maß der Absorption, der Extinktion E , und der Konzentration c der Probelösung wird durch das Lambert-Beer'sche Gesetz beschrieben:

$$E = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon c d \quad (2)$$

Die Intensitäten $I_{R,L}$ werden gemäß dem Lambert-Beer'sche Gesetz mit den entsprechenden Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{R,L}$ verknüpft. Für kleine Elliptizitäten ψ gilt näherungsweise der folgende Zusammenhang:

$$\psi = \ln 10 \cdot \frac{180^\circ}{4\pi} \cdot (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \cdot c \cdot d \quad (3)$$

Um einen Vergleich der Elliptizitätswerte verschiedener Proteinen durchführen zu können, müssen die Werte auf die Zahl der Aminosäurereste normiert werden.

Die Normierung der gemessenen Spektren $\psi(\lambda)$ beinhaltet die Berücksichtigung der Durchstrahldicke d der Probe, der Massenkonzentration c des untersuchten Proteins und seiner mittleren residuengewichteten Molmasse MRW (*mean residue weight*):

$$[\psi(\lambda)]_m = \frac{\psi(\lambda) \cdot \text{MRW}}{d \cdot c} \quad (4)$$

Die Anpassung des rechnerisch ermittelten Spektrums an die experimentellen Daten erfolgt zumeist auf der Basis der Methode der kleinsten Fehlerquadrate. Bei der Datenanalyse bedient man sich der Annahme, dass das experimentell aufgenommene, bereits normierte CD-Spektrum eines Proteins $[\psi(\lambda)]_m$ rechnerisch durch Linearkombination von normierten CD-Spektren der unterschiedlichen reinen Sekundärstrukturelemente α -Helix, β -Faltblätter, Schleifen und Zufallsknäuel (Abbildung 14) $[\psi^i(\lambda)]_m$ angepaßt werden kann [Greenfield]:

$$[\psi(\lambda)]_m = \sum_i f_i [\psi^i(\lambda)]_m \quad (5)$$

f_i ist der Anteil des Sekundärstrukturelements i an der Sekundärstruktur des Proteins.

3.3 Messungen am Hahn-Meitner-Institut

Der vom Hahn-Meitner-Institut betriebene Forschungsreaktor BER II (Berliner Experimentierreaktor II) stellt eine der modernsten Forschungseinrichtung Deutschlands für die Struktur- und Materialforschung mit Hilfe von kalten und thermischen Neutronenstrahlen dar.

Das BENS (Berlin Neutron Scattering Center) verfügt über zahlreiche Neutronenbeugungs-Instrumente für die Forschung auf verschiedenen Gebieten, wie z.B. der Kristallographie, der Festkörperphysik, der Polymer- und Struktur-Chemie, der Biologie, sowie der Materialwissenschaften und der angewandten Forschung.

In dieser Arbeit wurde die Neutronen-Reflektometrie zur Strukturaufklärung von Protein/Oberflächen-Systemen, herangezogen. Sie wurde an dem Instrument V6 durchgeführt [Mezei].

Bei dem Forschungsreaktor BER II handelt es sich um einen offenen, leichtwassermoderierten Schwimmbadreaktor. Seine thermische Leistung beträgt 10 MW mit einer thermischen Neutronenflussdichte von 1 bis $2 \cdot 10^{14}$ Neutronen pro Quadratcentimetern und Sekunde.

Ein 32 cm-dicker Beryllium-Mantel, der zur Erhöhung der Neutronenintensität beiträgt, umgibt 30 Uran-Brennelemente.

Neun Strahlrohre und sechs Neutronenleiter ermöglichen die Durchführung von 28 Experimenten (Stand April 2004).

Die langwelligen (langsamen) Neutronen, die sich besonders gut zur atomaren Strukturaufklärung verschiedenster Materialien eignen, werden durch ein Abkühlen thermischer Neutronen in einer kalten Quelle erhalten (Abbildung 16).

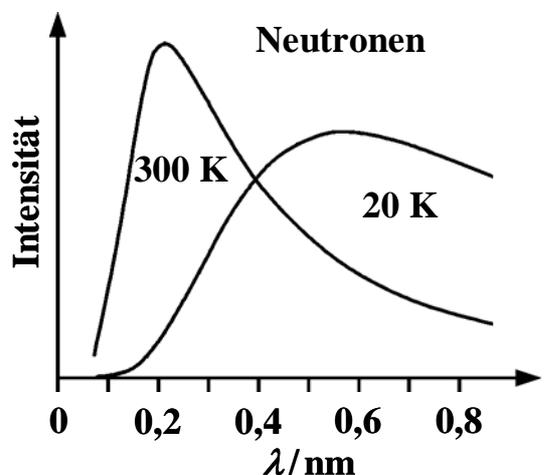


Abbildung 16: Intensität von thermischen und kalten Neutronen [Winter1998].

Als kalte Quelle fungiert eine ca. 10-cm dicke Schicht 25-35 K-kalten Wasserstoffs am Rande des Reaktorkerns.

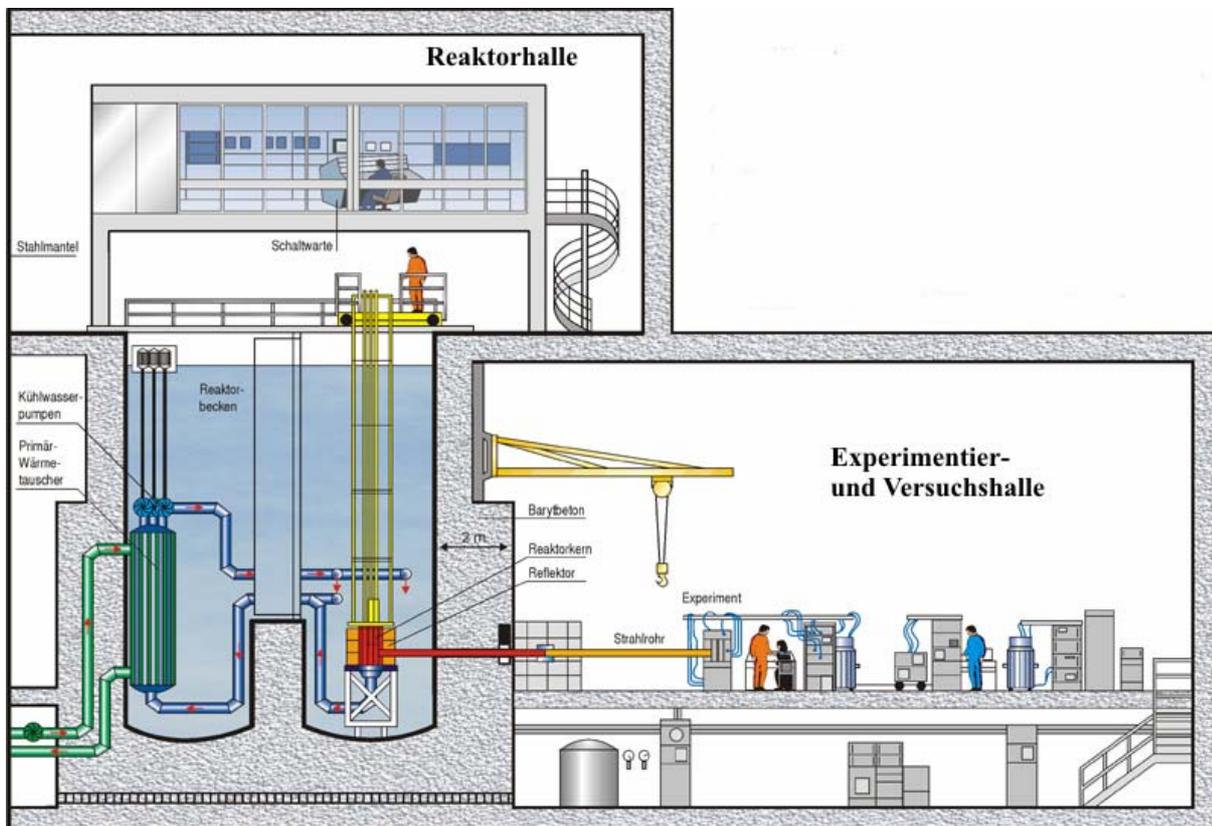


Abbildung 17: Schematischer Aufbau der Neutronenquelle des Hahn-Meitner-Instituts mit Experimentier- und Versuchshalle [HMI/1].

Die erzeugten kalten Neutronen gelangen so durch die Neutronenleiter in die externe Experimentierhalle mit den verschiedenen Instrumenten (Abbildung 17).

Mit dem Reflektometer V6 können Neutronenreflexionen auf glatten bzw. planaren Oberflächen in Abhängigkeit des Einfallwinkels aufgenommen werden.

Die Reflektivität wird durch die Variation des Brechungsindex für Neutronen innerhalb eines Materials bis zu einer Tiefe von ungefähr 100 nm bestimmt, so dass Strukturprofilen studiert werden können.

Ihre Anwendung findet die Reflektometrie vor allem in der Strukturaufklärung von Grenzflächen anorganischer und organischer Materialien, sowie flüssiger und fester Oberflächen.

Das V6-Reflektometer ist am Neutronenleiter NL4 in der Neutronenleiterhalle des Hahn-Meitner-Instituts installiert (Abbildung 18).

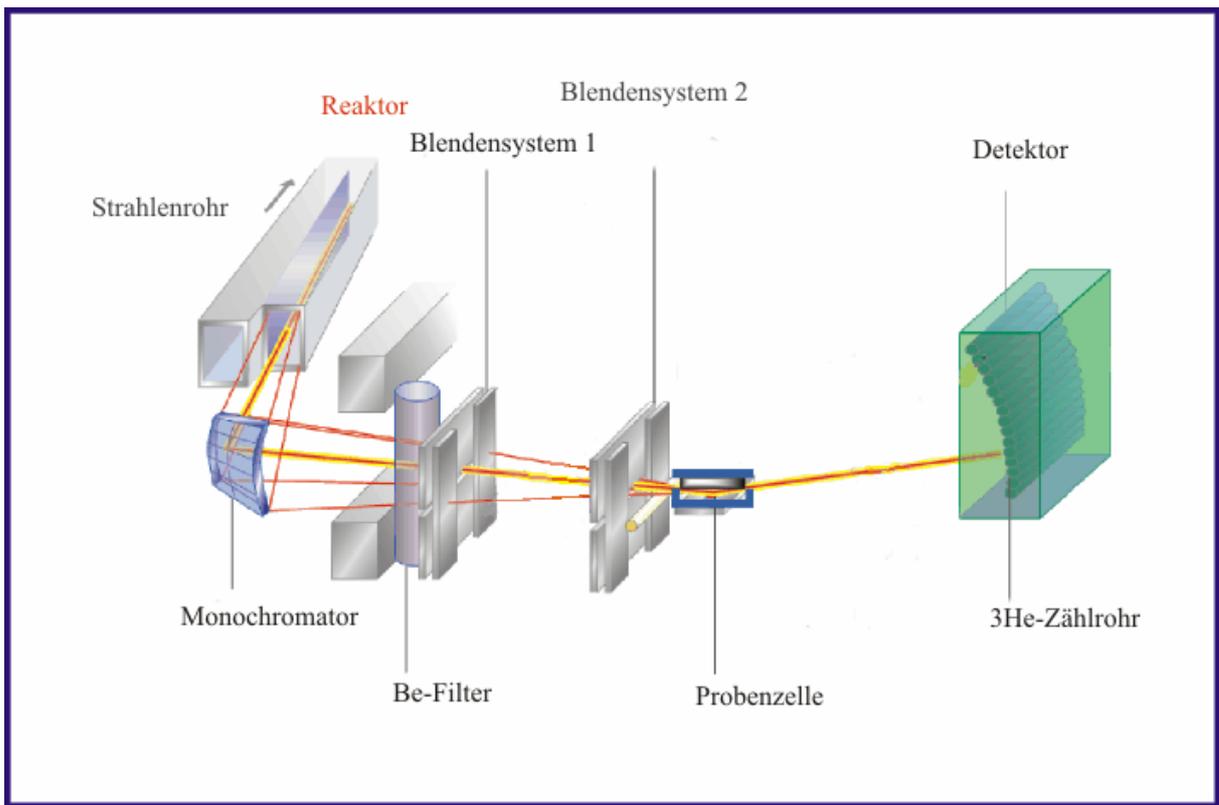


Abbildung 18: Prinzipieller Aufbau des V6-Reflektometers für Neutronenstrahlung am Hahn-Meitner-Institut (Berlin) [HMI/1].

Pyrolytische Graphit-Kristalle fungieren am V6-Reflektometer als Monochromator. In Abhängigkeit des Reflexionswinkels des Monochromators kann die gewünschte Wellenlänge von 0,46 nm eingestellt werden. Der Strahl wird mit der Hilfe von zwei computergesteuerten Cadmium-Blendensystemen begrenzt. Für feste Proben kann der Einfallswinkel durch eine präzise Neigung der Probenoberfläche relativ zum festgelegten, kollimierten Neutronenstrahl variiert werden. Bei flüssigen Proben wird die Probenoberfläche in der horizontalen Position gehalten und der Einfallswinkel des Neutronenstrahls wird durch die exakte Einstellung des Blendensystems variiert. Der hierdurch zur Verfügung stehende Winkelbereich beträgt 0° - 2° . Für die in dieser Arbeit untersuchten Systeme Si-Einkristall/SiO₂/Polyelektrolyt-Multischicht/Proteinadsorbat/Proteinlösung, Si-Einkristall/SiO₂/Polyelektrolyt-Bürste/Proteinadsorbat/Proteinlösung, Silizium-Einkristall/SiO₂/Proteinadsorbat/Proteinlösung wurde ein temperierbarer Teflontrog, der in die Probenzelle integriert ist, verwendet (Abbildung 19).

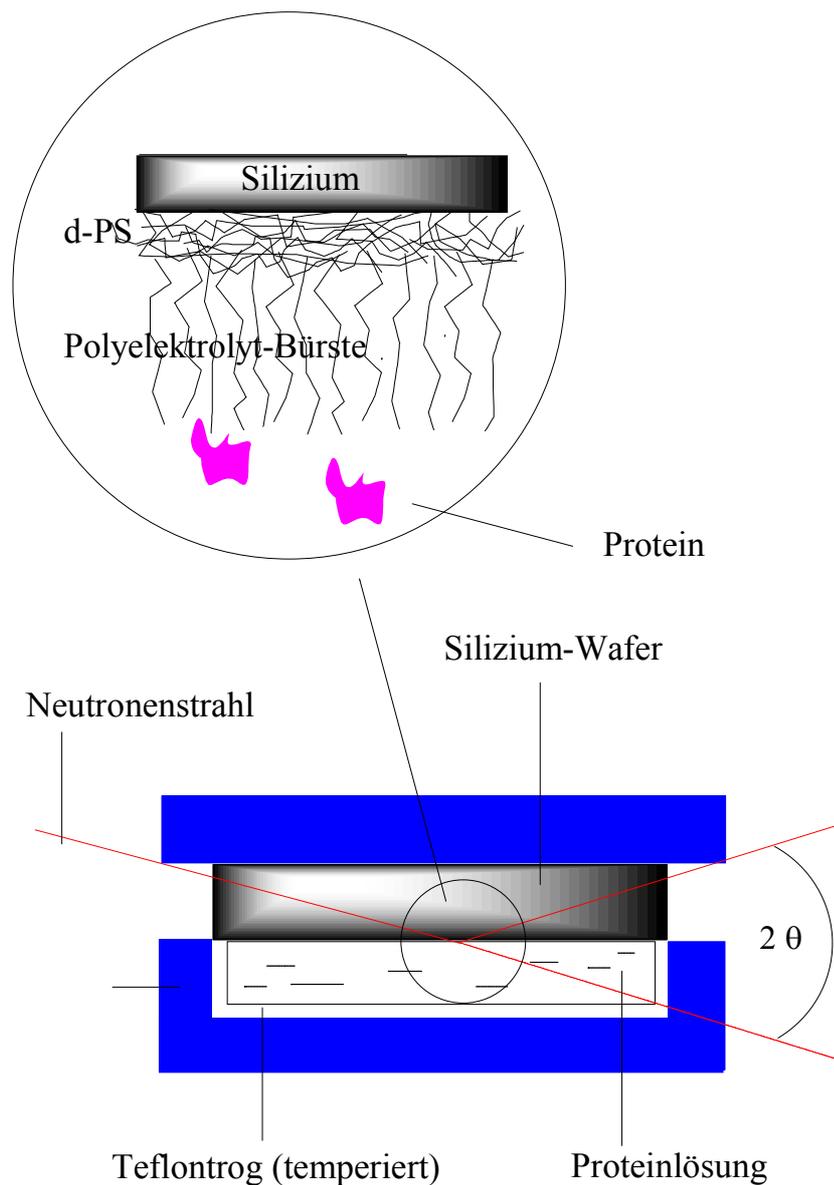


Abbildung 19: Temperierbare Probenzelle mit Neutronenstrahlverlauf und Ausschnitt der Probengrenzfläche am Beispiel des Systems Si-Einkristall/SiO₂/Polyelektrolyt-Bürste/Proteinlösung.

Bei dem verwendeten Detektor handelt es sich um eine Anordnung von ³He-Gas-Zählrohren mit einer mehr als 90 %igen Effizienz bei einer Neutronenwellenlänge von 0,4 nm. Da Neutronen nicht ionisierend sind, können sie nur indirekt nachgewiesen werden, hier durch eine Kernreaktion in den gasgefüllten Zählrohren. Hierbei werden die einfallenden Neutronen durch Kernabsorption in geladene Teilchen umgewandelt und können dann detektiert werden. Die Kernreaktion in den gasgefüllten Zählrohr ist ${}^3_2\text{He} + n \longrightarrow {}^3_1\text{H} + p^+$. Die Bewegungsrichtung der Detektoranordnung ist vertikal. Alle Instrumentenkomponenten werden von einem Computer gesteuert.

Die Rohdaten werden einer Untergrundkorrektur unterworfen und auf die Anzahl der auf die Grenzfläche treffenden Neutronen normiert. Die Auftragung erfolgt als Funktion von $Q = (4\pi/\lambda) \sin \theta$ (wobei λ die Neutronenwellenlänge und θ der Einfallswinkel ist). Die Auswertung erfolgt mit Hilfe des Computerprogramms Parratt32 [HMI/2].

3.4 Optische Reflektometrie

Die Messungen mit Hilfe der optischen Reflektometrie zur quantitativen Bestimmung der Menge der adsorbierten Proteine Lysozym und SNase an einer Silizium/Wasser-Grenzfläche wurden durch Reflexion von Licht durchgeführt. Hierzu wurde das Licht eines He-Ne-Lasers (632,8 nm, 3 mW) an der Oberfläche eines oxidierten Silizium-Plättchens reflektiert. Das oxidierte Silizium-Plättchen befand sich in einer temperierbaren Probenzelle, die mit Proteinlösungen verschiedener Konzentrationen gefüllt wurde (Abbildung 20).

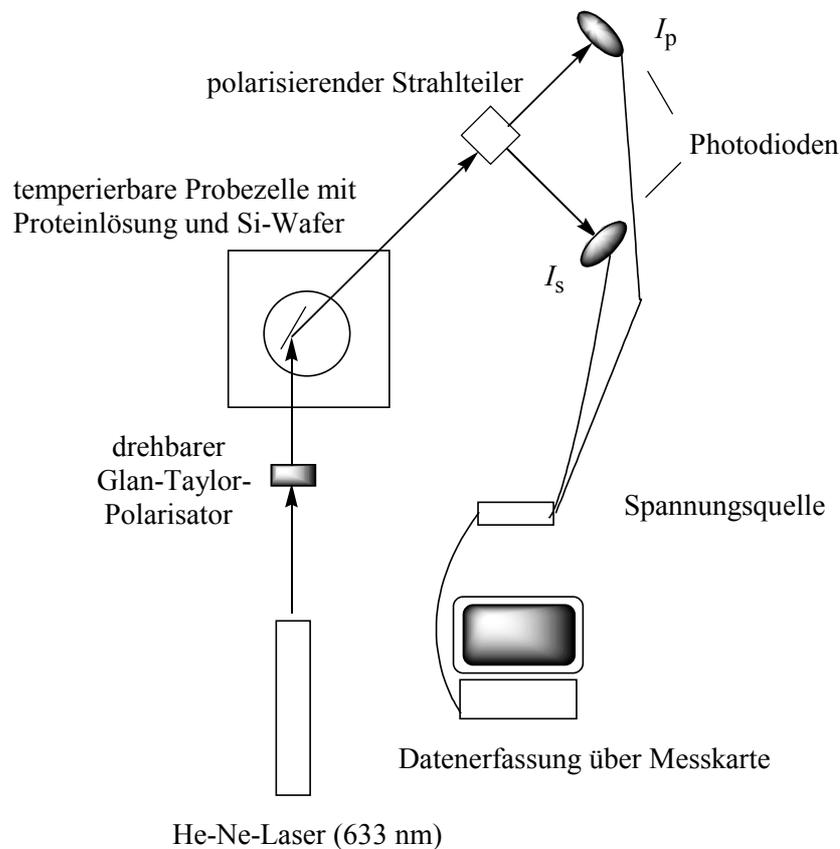


Abbildung 20: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der optischen Reflektometrie.

Der einfallende Laserstrahl steht in einem 70° -Winkel zur Silizium-Wafer-Normalen und wird mit einem drehbaren Glan-Taylor-Polarisator polarisiert. Die Oxidschichtdicke, die für die Sensitivität entscheidend ist, wurde für jeden neuen Silizium-Wafer bestimmt. Sie wurde gemessen, indem die Probezelle mit reinem Puffer gefüllt und der einfallende Strahl im Winkel von 45° zur Reflexionsebene polarisiert wurde. Der reflektierte Strahl wurde nacheinander bei den Winkeln von 0° und 90° mit Hilfe eines zweiten drehbaren Glan-Taylor-Polarisators analysiert, und die entsprechenden Lichtintensitäten I_p und I_s wurden mit Hilfe einer Photodiode detektiert. Das Verhältnis dieser beiden Intensitäten

$$S = \frac{I_p}{I_s} = f \frac{R_p}{R_s} \cdot \frac{I_p^0}{I_s^0} \quad (6)$$

entspricht dem Reflektivitätenverhältnis R_p/R_s . Der Verlustfaktor f ist unter den gegebenen Bedingungen gleich eins. Der Verlustfaktor berücksichtigt Änderungen der einfallenden Intensitäten I_p^0 und I_s^0 an den verschiedenen Glasoberflächen sowie Effizienzunterschiede in der Detektion der beiden polarisierten Lichtkomponenten.

Aus dem Reflektivitätenverhältnis R_p/R_s wird die Oxidschichtdicke, wie in der Literatur [Hansen] beschrieben, unter der Annahme eines Drei-Schichten-Modells Si/SiO₂/Wasser berechnet. Charakterisiert wird dieses angenommene Drei-Schichten-Modell durch drei Brechungsindizes und eine Schichtdicke d (Abbildung 21).

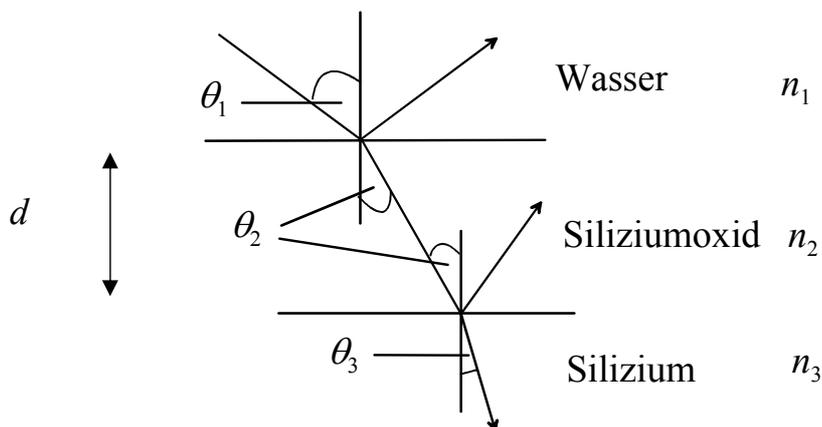


Abbildung 21: Drei-Schichten-Reflektivitäts-Modell

Für die Protein-Adsorptionsexperimente wird der Versuchsaufbau verändert. Der zweite Polarisator wird durch einen polarisierenden Strahlenteiler, der die gleichzeitige Detektierung der Intensitäten I_p und I_s erlaubt, ausgetauscht. Der erste Polarisator wird so eingestellt, dass $S=1$ ist.

Die Adsorption des Proteins wird untersucht, indem kleine Volumina einer Protein-Stammlösung nacheinander zur Pufferlösung in die Probenzelle gegeben werden. Nach jeder Zugabe wird die Änderung von S , die durch die Adsorption des Proteins an der Silizium/Wasser-Grenzfläche hervorgerufen wird, aufgezeichnet, bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat. Die durchschnittliche Dauer für diesen Vorgang betrug ca. 30 Minuten. Gemäß dem in der Literatur beschriebenen Analyseverfahren [Dijt] ist die relative Änderung von S proportional der adsorbierten Masse des Proteins pro Flächeneinheit, Γ :

$$\frac{S - S_0}{S_0} = A \cdot \Gamma \quad (7)$$

mit

$$A = \frac{1}{(R_p/R_s)_0} \cdot \frac{d(R_p/R_s)}{d\Gamma} \quad (8)$$

Der Index 0 bezeichnet das Signal ohne das Protein. Die Adsorptions-Sensitivität A wird auf der Basis eines Vier-Schichten-Modells (Si/SiO₂/Adsorbat/Lösung) mit Hilfe der „Matrix-Methode“ nach Abeles berechnet [Hansen]. Charakterisiert wird dieses Modell durch vier Brechungsindizes und zwei Schichtdicken (Abbildung 22).

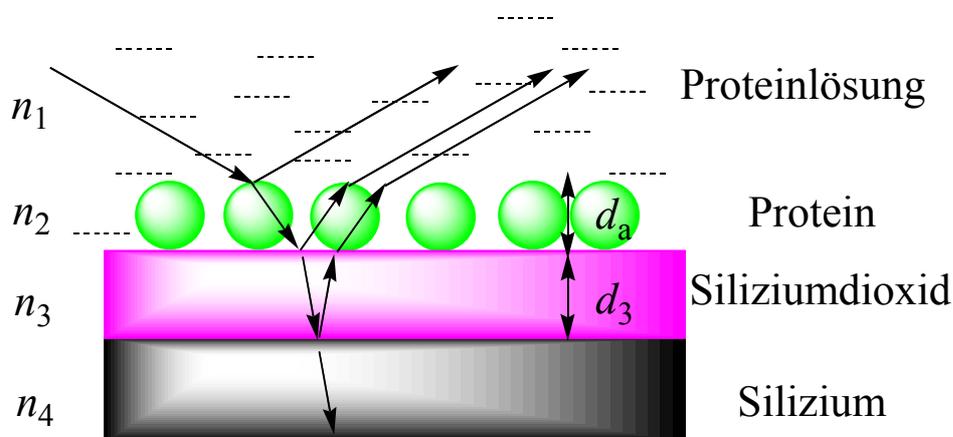


Abbildung 22: Vier-Schichten-Reflektivitäts-Modell

Hierbei wird die zuvor bestimmte Dicke der Siliziumoxid-Schicht d_3 und eine angenommene Schichtdicke des Adsorbates d_a verwendet. Ein d_a -Wert von 4,5 nm entspricht in etwa 1-2 Monoschichten an Lysozym und SNase. Diese Annahme konnte herangezogen werden, da A beinahe unabhängig von der Adsorbat-Schichtdicke d_a ist (Abbildung 23).

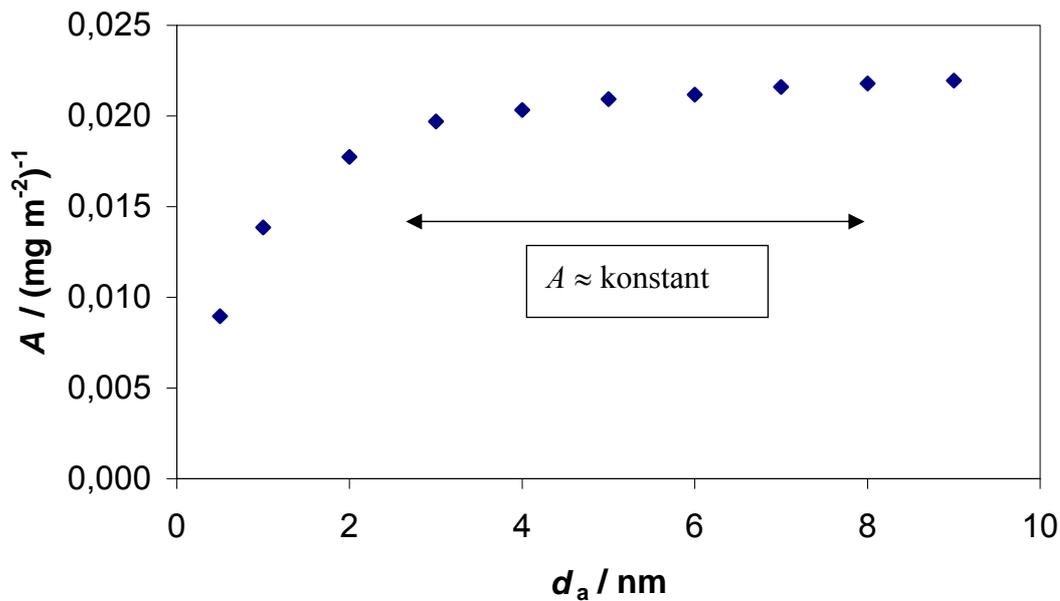


Abbildung 23: Auftragung des Sensitivitätsfaktors A gegen die Bedeckungsdicke d_a am Beispiel einer SNase-Lösung bei 30°C und einer Siliziumdioxidschichtdicke $d_3 = 109$ nm. A kann für den d_a -Bereich zwischen 2 und 8 nm als nahezu konstant angesehen werden.

Der Brechungsindex des Adsorbates wurde aus

$$n_a = n_0 + \frac{dn}{dc} \cdot \frac{\Gamma}{d_a} \quad (9)$$

berechnet [De Feijter], wobei n_0 der Brechungsindex des Puffers und dn/dc die Änderung des Brechungsindex des Adsorbates in Abhängigkeit der Konzentration ist. Der durch eine Versuchsreihe ermittelte Wert dieser Änderung betrug $0,15 \text{ mL g}^{-1}$.

3.5 Druckabhängige optisch-reflektometrische Untersuchung der Adsorption von SNase und Lysozym auf Siliziumdioxid

Ziel dieser Versuchsreihe war die Untersuchung der Adsorption von Proteinen auf Siliziumdioxid unter Einfluß des Druckes und der Temperatur. Um einen Druckbereich von bis zu 4 kbar untersuchen zu können, wurde ein temperierbarer Autoklav entworfen und angefertigt. Eine Spindelpresse der Firma Nova-Swiss diente zur Druckerzeugung. Um die Probe nicht mit dem Druckmedium (destilliertes Wasser) zu kontaminieren, wurde ein Metallbalg verwendet, der beide Medien voneinander trennte. Für den Bau des Druckautoklaven wurde die Legierung Nimonic 90 verwendet. Zwei Fenster aus Glas mit einem Durchmesser von ca. 1 cm sollten den Ein- und Austritt des He-Ne-Lasers ermöglichen.

Der Aufbau des optischen Reflektometers unterschied sich nur in der Verwendung der Druckzelle von dem für die temperaturabhängigen reflektometrischen Untersuchungen. Wie bei den temperaturabhängigen Messungen wurde 10 mM-Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6,1 verwendet. Die Konzentration der untersuchten SNase und Lysozym-Lösungen betrug 0,05 mg/ mL. Für jede Messung wurde ein frisch oxidiertes Siliziumplättchen verwendet. Als Untergrundmessung diente die druckabhängige Reflektivität des Si-Plättchens im reinen Puffer bei konstanter Temperatur. Hierauf erfolgte der Austausch des Puffers durch die vortemperierte Proteinlösung und die gleichzeitige Detektion der Protein-Adsorption in Abhängigkeit der Zeit bei Raumdruck. Nach Einstellung des Adsorptionsgleichgewichtes wurde der Autoklav verschlossen und der Druck bei konstanter Temperatur in 200-500 bar Schritten erhöht. Es wurde jeweils ca. 30 Minuten bis zur Gleichgewichtseinstellung gewartet. Die Messung des Reflektivitätenverhältnisses R_p/R_s erfolgte hierbei fortwährend.

In systematischen druckabhängigen Messungen hat sich jedoch gezeigt, dass der Einfluss des Drucks auf das Messsignal sehr viel größer ist, als der der Proteinadsorption an der Si/Wasser-Grenzfläche. Vermutlich war dieser Umstand zusammen mit einer geringen druckinduzierten Doppelbrechung der Glasfenster die Ursache für eine schlechte Reproduzierbarkeit der erhaltenen Messdaten, so dass von weiteren Experimenten abgesehen wurde.

3.6 Neutronenreflektometrie: Grundlagen und Anwendungen

Die Weiterentwicklung der Neutronentechnik hat in den vergangenen Jahren neue Möglichkeiten eröffnet, verschiedenste Oberflächenstrukturen näher zu erforschen. Lange Zeit warf die Analyse der Zusammensetzung im Material verborgener Grenzflächen schwerwiegende Probleme auf, denn die Verwendung von oberflächensensitiven Techniken war nahezu ausgeschlossen. Eine Untersuchung erforderte zunächst eine Entfernung bzw. ein Aufbrechen der Oberschicht, wie die eines Polymerfilms, mit physikalischen „rabiaten“ Methoden (mechanisches oder chemisches *peeling*). Als eine gute Technik zur Untersuchung von Grenzflächenstrukturen in situ erweist sich heute die Neutronenreflektometrie. Sie erlaubt die Erstellung eines Dichteprofiles senkrecht zur Grenzfläche. Ihre Anwendung findet die Neutronenreflektometrie in der Grenzflächen-Chemie (Tenside, Lipide, Polymere, Proteine und Mischungen an flüssig/flüssig- und fest/flüssig-Grenzflächen), sowie in der Charakterisierung von Oberflächen-Magnetismus (magnetische Multischichten, Supraleiter) und festen Filmen (Langmuir-Blodgett-Filme, dünne feste Filme, Multischichten und Polymer-Filme).

Die Vorteile in der Verwendung von Neutronen liegen u.a. in ihren kurzen Wellenlängen begründet. Sie ermöglichen eine hohe räumliche Auflösung im Subnanometerbereich und somit die Untersuchung von einzelnen Atomlagen innerhalb einer Grenzflächenschicht eines Systems. Ihre Eigenschaft, nicht mit Elektronen und Atomkernen wechselzuwirken, erlaubt den Neutronen, tief in kondensierte Materie einzudringen, wobei bis zu 1000 Atomdurchmesser erreicht werden können [Russell1990], [Tolan].

In Tabelle 3 sind einige charakteristische Eigenschaften der Neutronen aufgeführt.

Tabelle 3: Charakteristische, physikalische Eigenschaften der Neutronen [Winter1998] (k_B Boltzmannkonstante, T Temperatur).

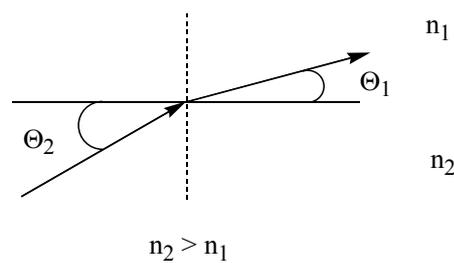
Masse	$m=1,675 \cdot 10^{-27}$ kg
Ladung	$q=0$
Spinquantenzahl	$s=1/2$
Mittlere Energie thermischer Neutronen bei 25 °C	$E = 3/2 k_B T = 39$ meV

Die Schichtdicke von Polyelektrolyt-Multischichten, Polyelektrolyt-Bürsten und Proteinfilmern auf festen Oberflächen kann mit Hilfe unterschiedlicher Methoden analysiert werden. Zu nennen sind hier neben den in dieser Arbeit verwendeten Methoden der Neutronenreflektometrie und optischen Reflektometrie auch die Ellipsometrie, die AFM (*atomic force microscopy*) und die Röntgen-Reflektometrie.

Hierbei sind die Anwendungsmöglichkeiten der obigen Methoden gemäß ihrer spezifischen Vor- und Nachteile gewissen Beschränkungen unterworfen. So zeichnen sich die optische Reflektometrie und die Ellipsometrie durch einen relativ geringen experimentellen Aufwand aus. Zudem lässt sich mit ihnen sehr gut die Kinetik von Adsorptionsprozessen verfolgen (Proteine, Polymere). In der Wellenlänge des Lichtes liegt aber auch ihre geringe Auflösung von Strukturdetails begründet, die keine atomare Auflösung zulässt. Es kann aber die absolute Menge des Adsorbats an einer fest/flüssig-Grenzschicht gemessen werden. Mehr zu dieser Methode kann im Kapitel 3.4 nachgelesen werden.

Die AFM-Methode ermöglicht eine Auflösung von einigen Ångström. Hierbei kann die Schichtdicke des Adsorbates durch Abtastung einer durch das Adsorbat gezogenen Furche („Kratzers“) bestimmt werden. Bei kleinen Bedeckungsgraden ist es mit Hilfe der AFM möglich, einzelne Proteine oder Proteinaggregate auf der Oberfläche zu detektieren. Viele Beispiele hierfür finden sich in der Literatur, wie z.B. AFM-Bilder adsorbierten Insulins, Lysozyms oder anderer Proteine auf Glimmer [Jansen].

Die Reflexion von Licht an einer Grenzfläche ist ein Phänomen, das durch unterschiedliche Brechungsindices auf beiden Seiten der Grenzfläche hervorgerufen wird. Schon in den frühen zwanziger Jahren konnte Compton zeigen, dass Röntgen-Reflexionen denselben Gesetzen folgten, welche schon für die Lichtreflexionen bekannt waren. Sie unterschieden sich nur hinsichtlich der Brechungsindices, die von Elektronendichten abhängig sind. Fermi und Zinn konnten im Jahre 1944 als erste die Reflexion von Neutronen nachweisen. Sie folgt ebenfalls den Gesetzen der optischen Reflexion, unterschied sich allerdings auch hinsichtlich der Brechungsindices der Probe (Abbildung 24).



$$n_1 \cos \Theta_1 = n_2 \cos \Theta_2$$

Abbildung 24: Brechung eines Lichtstrahls nach dem Gesetz von Snell.

Neutronen werden an Atomkernen gestreut. Der Brechungsindex für Neutronen hängt von der sog. Streulängendichte eines Stoffes ab. Die Streulängendichte ist die Summe der atomaren Streulängen des Stoffes pro Stoffvolumen. Eine Streulänge ist ein Maß für die „Streukraft“ eines Atoms und stellt die Amplitude der gestreuten Neutronenwelle dar. In Tabelle 4 sind einige für diese Arbeit relevanten Streulängen zusammengefasst.

Tabelle 4: Übersicht der Streulängen einiger ausgewählter Atome [Cubitt2003].

Atom	Streulänge/ fm	Atom	Streulänge/ fm
^1H	-3,741	O	5,805
^2H (oder D)	6,675	Si	4,151
C	6,648	Cl	9,579

Der Neutronen-Brechungsindex n eines Materials ist eine Funktion der Streulängendichte ρ und der Neutronenwellenlänge λ :

$$n = 1 - \lambda^2 \rho / (2\pi) \quad (10)$$

(Die Absorption der Neutronen ist in dieser Gleichung vernachlässigt.)

Wie bei Licht, tritt auch bei Neutronen Totalreflexion auf, wenn Neutronen bei kleinem Einfallswinkeln in einem Medium mit hohem Brechungsindex auf ein Medium mit niedrigerem Brechungsindex treffen. Da die Neutronen-Brechungsindices der meisten Stoffe

kleiner sind als die der Luft und des Vakuums, wird die externe Neutronen-Reflexion an Materialoberflächen häufig beobachtet.

Der kritische Winkel der Totalreflexion ist so charakterisiert, dass die Reflektivität der Neutronen bei einer vorgegebenen Wellenlänge bei kleineren Winkeln zur Grenzfläche einheitlich ist und bei größeren Winkeln rapide abfällt. Beobachtet wurde die Totalreflexion thermischer Neutronen unterhalb des kritischen Winkels zuerst von Fermi und Zinn. Die experimentelle Bestimmung von Streulängen von Atomkernen geht genau auf dieses beobachtete Phänomen zurück. Dadurch, dass der Brechungsindex von der Streulängendichte eines Stoffes abhängt, kann die Messung des kritischen Winkels der Totalreflexion an diesem Stoff Aufschluß über die Streulängendichte des Stoffes und damit über die Streulänge der Atome geben (Abbildung 25 und Tabelle 5).

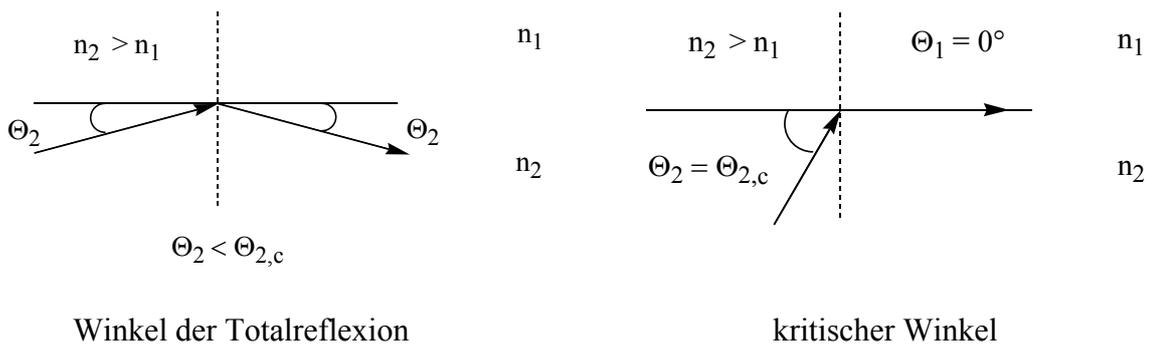


Abbildung 25: Winkel der Totalreflexion und kritischer Winkel für die optische Reflexion und die Neutronenreflexion in Abhängigkeit der Brechungsindices.

Tabelle 5: Beispiele zu Abbildung 24 und 25.

Reflexion	Medium 1	Medium 2
Licht	Luft	Wasser
Neutronen	Si	Luft
Neutronen	D ₂ O	Si

Ein Vorteil der Neutronenreflektometrie stellt die relativ einfach zu erreichende Kontrastvariation dar. Hierbei wird eine Isotopensubstitution durchgeführt (z.B. Austausch von H₂O gegen D₂O).

Im Gegensatz zu den Neutronen wird bei Röntgenstrahlen der Kontrast durch Zusatz elektronenreicher Elementen variiert.

Tabelle 6: Streulängendichten, Brechungsindices für Neutronen ausgesuchter Stoffe [Cubitt2003].

Material	Streulängendichte / 10^{-6}Å^{-2}	Brechungsindex bei $\lambda = 10 \text{Å}$
H ₂ O	-0,56	1,000009
D ₂ O	6,35	0,999899
Si	2,07	0,999967
SiO ₂	3,48	0,999945
Lysozym (D ₂ O)	3,6	0,999943
Lysozym (H ₂ O)	2,0	0,999968
Luft	0	1,000000
Polystyrol	1,8	0,999971
d-Polystyrol	6,0	0,999905

Der große Unterschied in der Streulänge von ¹H und ²H stellt ein ausgezeichnetes Werkzeug zur Markierung von Verbindungen und Molekülgruppen und damit zur Kontrastvariation dar (Tabelle 6). Die Deuterium-Substitution führt hierbei zu i. d. R. vernachlässigbaren Störungen der Struktur.

Wie die optische Reflektometrie erlaubt die Neutronenreflektometrie die Beobachtung von Änderungen innerhalb einer Probe in Abhängigkeit der Zeit. Da die hier verwendeten Neutronen eine thermische Energie von ca. $k_B T$ besitzen und sehr „schonend“ mit der Probe wechselwirken, kann eine Probe mehrmals wiederverwendet werden.

Ein Nachteil der Neutronenreflektometrie liegt jedoch in der Dauer der Messungen. Der Neutronenfluss, der sich nach dem vorhandenen Reaktortyp und seiner Leistungsstärke richtet, kann sehr gering sein. Bei der Untersuchung wasserstoffhaltiger Proben kommt es zudem zu einem erheblichen Beitrag des Untergrundes durch inkohärente Neutronenstreuung. Dies führt zu einer Begrenzung bei den Reflektivitätsmessungen auf 10^{-6} . Unterhalb dieses Wertes ist der Untergrund vergleichbar oder sogar größer als die zu messende Reflektivität selbst.

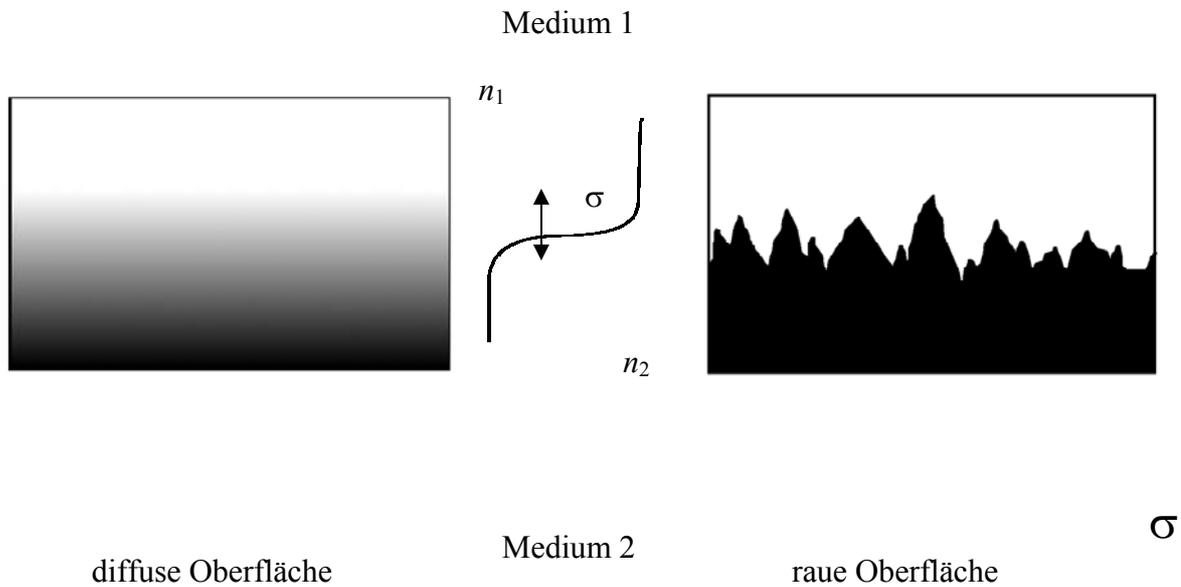


Abbildung 26: Rauigkeit σ einer Oberfläche. n_1 und n_2 sind die Brechungsindices. Die zwei dargestellten Grenzflächen ergeben identische spekuläre Reflexionen. Im Falle der rauen Oberfläche ist jedoch nicht spekuläre (ungerichtete, diffuse) Streuung zu beobachten.

Eine Voraussetzung für erfolgreiche Neutronenreflektometrie-Messungen an Polymeroberflächen ist die sorgfältige Präparation dieser Oberflächen. Die Proben sollten nur eine geringe Rauigkeit von ca. 5 \AA aufweisen. So reduziert sich als Beispiel die Reflektivität bei einem typischen Q -Wert von $0,15 \text{ \AA}^{-1}$ durch eine Rauigkeit $\sigma = 10 \text{ \AA}$ um beinahe den Faktor 10 [Cubitt2003].

Zwei Arten von Rauigkeiten der Grenzflächen können unterschieden werden. Die raue und die diffuse Grenzfläche. Beide zeigen identische spekuläre Reflektivitäten. Die Daten unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer nicht spekulären Streuung.

Eine Grenzfläche kann rau sein. Sie kann Einbuchtungen und Erhebungen aufweisen, die eine fraktalähnliche Struktur bilden. Eine Grenzfläche kann aber auch sehr glatt sein, wenn das eine Material mit dem anderen über einen diffusen Bereich in Kontakt steht. Sowohl im rauen als auch im diffusen Fall wird die Reflektivität durch die Rauigkeit herabgesetzt.

Hinsichtlich des Dichteprofils ist keine Änderung zwischen einer rauen und einer diffusen Grenzfläche zu erkennen. In der Berechnung der Reflektivität R einer Grenzfläche wird die Grenzflächenrauigkeit σ mit dem Faktor $\exp(-0,5 Q_1 Q_2 \sigma^2)$ berücksichtigt (analog zum Debye-Waller-Faktor), wobei Q_1 und Q_2 die Impulsüberträge der Neutronen senkrecht zur

Grenzfläche in den beiden aneinander grenzenden Medien 1 und 2 sind. Diese e-Funktion führt bei großer Rauigkeit σ zu einer schnellen Abnahme der Reflektivität mit zunehmendem Q_1 . Zwischen zwei Fällen kann nun unterschieden werden. Im Falle der diffusen Grenzfläche findet sich der Verlust der reflektierten Intensität in dem transmittierten Strahl wieder, denn hier existieren keine Streulängendichte-Gradienten in irgendeiner anderen Richtung als der parallel zur Normalen der Grenzfläche.

Dies ist nicht der Fall bei der rauen fraktalähnlichen Grenzfläche. Hier erfolgt der Intensitätsverlust durch nicht spekuläre Streuung.

3.7 Analyse der Reflektometriedaten

Eine Analysemethode, die auf die spekularen (spiegelnden) Reflexionsdaten angewandt werden kann, beinhaltet die Konstruktion eines Grenzflächenmodells mit mehreren parallelen Schichten, die jeweils aus einem homogenen Material bestehen. Jede dieser einzelnen Schichten ist genau durch ihre Streulängendichte ρ und ihre Dicke d charakterisiert. Mit Hilfe der optischen Matrix-Methode kann aus diesen beiden Größen die Reflektivität berechnet werden.

Die Grenzflächenrauigkeit σ zwischen zwei aufeinanderliegenden Schichten fließt ebenfalls in dieses Modell ein [Hansen], [Born].

Der Unterschied zwischen dem berechneten Profil und dem gemessenen Profil wird mittels des χ^2 -Wertes nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate minimiert. Die erste und letzte Schicht der Grenzfläche haben eine unbegrenzte Dicke, aber eine feste Streulängendichte.

Durch Variation der Streulängendichte ρ und der Schichtdicke d jeder Schicht sowie der Rauigkeit kann das so berechnete Profil an das gemessene Profil angepasst werden. Obwohl ein berechnetes Profil nicht eine einzige Lösung darstellt, kann durch Kontrastvariation zusammen mit physikalischen und chemischen Randbedingungen sichergestellt werden, dass ein eindeutiges unzweifelhaftes Modell der Grenzfläche erhalten wird. Bei der Kontrastvariation durch $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Austausch werden von demselben System unterschiedliche Reflektivitätskurven aufgenommen, die letztendlich alle dasselbe Strukturprofil aufweisen müssen (Tabelle 7).

Tabelle 7: Ausgewählte Beispiele für Kontrast-*matching* einiger verwendeter Moleküle.

Anteil an D ₂ O/ Vol.-%	Anteil an H ₂ O/ Vol.-%	Streulängendichte / 10 ⁻⁶ Å ² (vergleichbarer Stoff)
100	0	6,4
94,5	5,5	6,0 (d-PS)
56,6	43,4	3,6 (Lysozym (D ₂ O))
50,4	49,6	3,2 (BSA (D ₂ O))
28,3	71,7	1,8 (PS)
0	100	-0,56

Der Vorteil des Siliziums gegenüber anderen Materialien für die Neutronenreflektometrie ist seine relativ gute Durchlässigkeit gegenüber Neutronen. Hierdurch wird es ermöglicht, einen Neutronenstrahl in den Wafer zu leiten und, nachdem er an der Silizium/Siliziumoxid/Luft-Grenzfläche reflektiert wurde, auch wieder hinaus zu leiten.

Das Wellenverhalten der verwendeten Neutronen steht in einer starken Analogie zu dem des Lichts in der klassischen Optik. Die Beschreibung der Brechung, Reflexion und Interferenz von Neutronen kann im Wesentlichen mit Gesetzen der klassischen Optik erfolgen. Die spekulare Reflektivität einer Grenzschicht wird als Funktion des Einfallwinkels gemessen. Dies soll an den Beispielen der Systeme Silizium/Luft und Silizium/d-PS/Luft veranschaulicht werden. In den Abbildungen 27 und 28 ist dies für das System Silizium/Luft gezeigt.

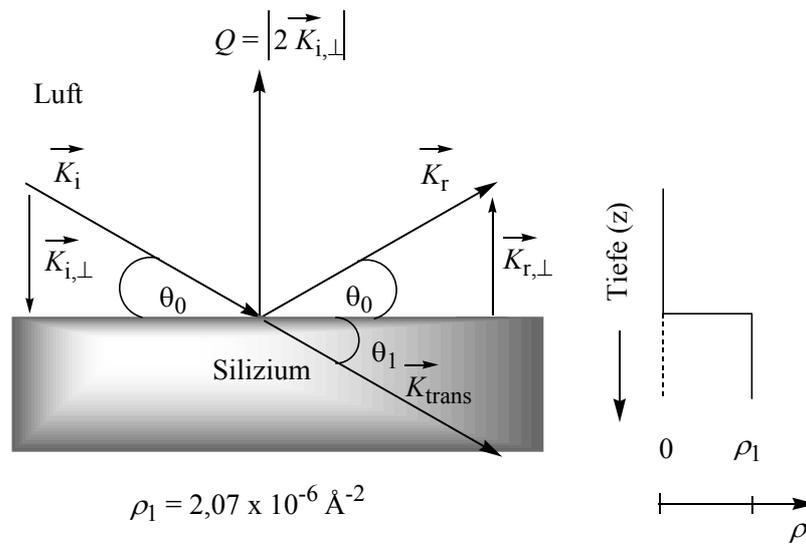


Abbildung 27: Reflexion eines einfallenden Neutronenstrahls an einer idealen Oberfläche. \vec{K}_i und \vec{K}_r sind der einfallende bzw. der reflektierte Wellenvektor mit den Winkeln $\theta_i = \theta_0 = \theta_r$ relativ zur Grenzfläche. Q ist der Impulsübertrag, ρ_1 ist die Streulängendichte des Substrates Silizium. Zur rechten des schematisierten Strahlenverlaufes durch einen Siliziumwafer ist das Streulängendichteprofil als Funktion der Schichtdicke abgebildet.

Die hieraus erhaltene Reflektivitätskurve wird, wie schon zuvor beschrieben, ausgewertet, indem eine berechnete Reflektivitätskurve mit variablen Parametern an sie angefitet wird.

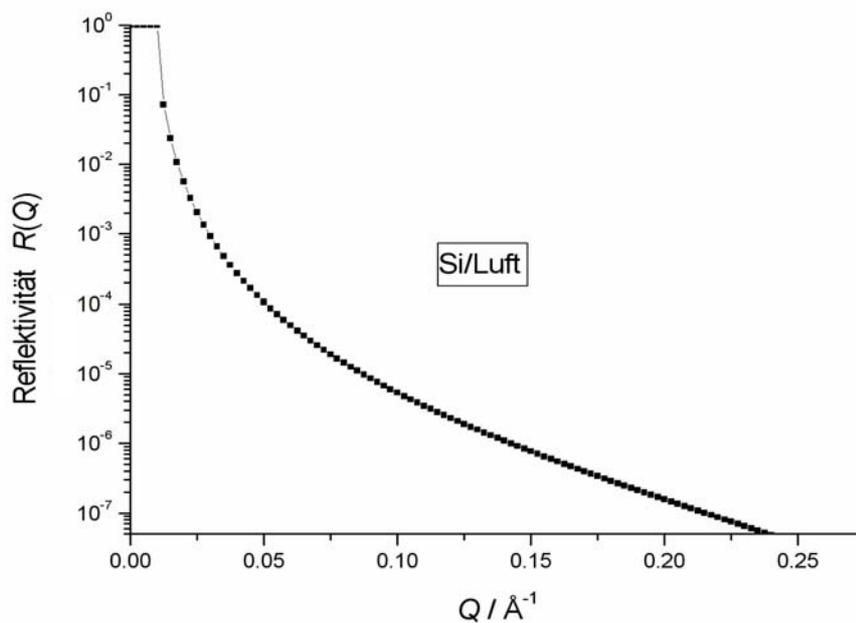


Abbildung 28: Simulation einer spekularen Neutronenreflektivität einer Silizium/Luft-Grenzfläche als Funktion des Impulsübertrages Q .

In den Abbildungen 29 und 30 ist dies für das System Silizium/d-PS/Luft gezeigt.

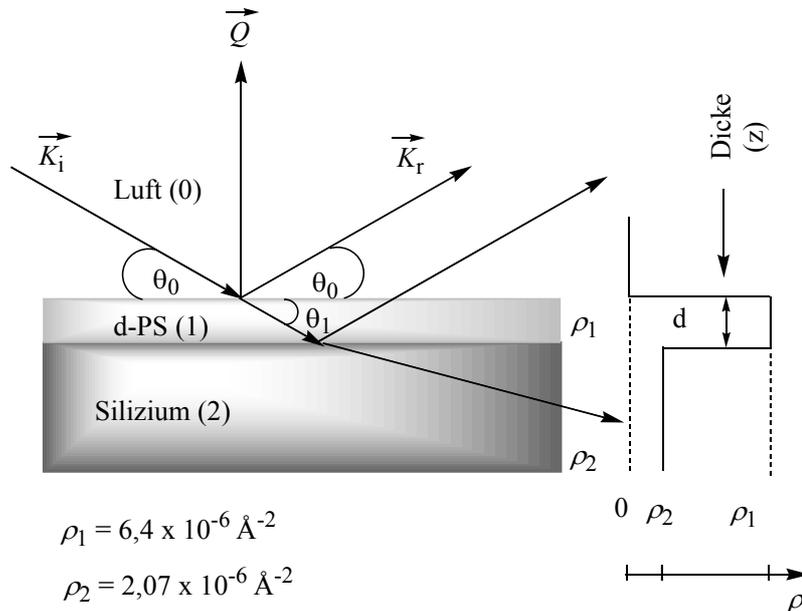


Abbildung 29: Wie in Kapitel 2.4 beschrieben, wurde in diesem Beispiel der Reflektivität der Neutronen für das gewählte System Si/SiO₂ eine weitere zusätzliche Schicht d-PS auf der Oberfläche des Siliziumwafers mit einbezogen.

Abbildung 30 zeigt die entsprechende Reflektivitätskurve.

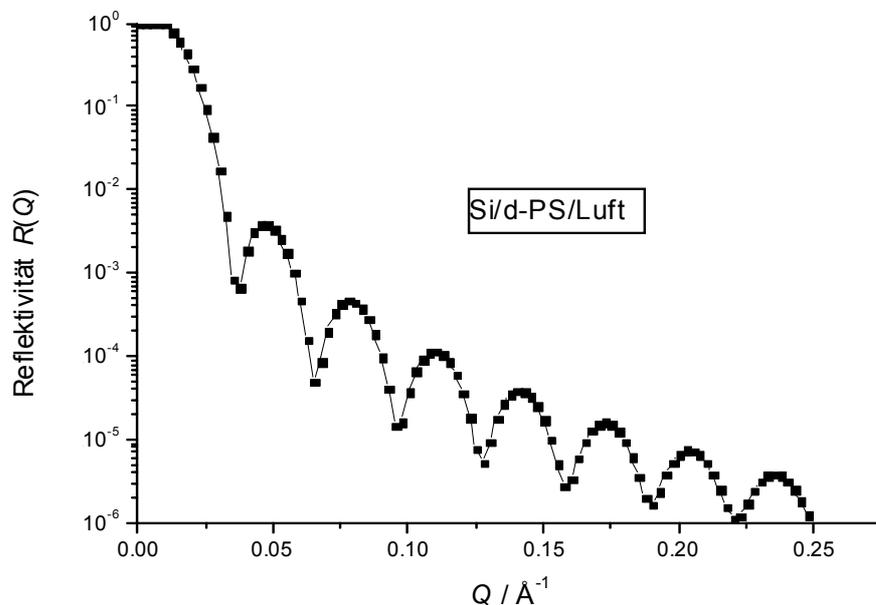


Abbildung 30: Simulation einer spekularen Neutronenreflektivität als Funktion des Impulsübertrages Q an einer 200 \AA dicken Schicht deuterierten Polystyrols auf einem Siliziumwafer. Aus der Beziehung $\Delta Q \approx 2\pi/d$ und der damit verbundenen Breite der Oszillationen kann eine Abschätzung der Schichtdicke vorgenommen werden. Weite Oszillationen deuten auf eine dünne Schicht hin, enge Oszillationen auf eine dickere Schicht.

Wie von der optischen Reflektometrie schon bekannt, kann die Berechnung der Neutronen-Reflektivitätskurve mit Hilfe eines Mehrschichten-Modells durchgeführt werden, welche auf die optische Matrix-Methode nach Wolf und Abeles zurückgeführt werden kann.

Da Neutronen-Reflektivitätskurven bei kleinen Einfallswinkeln relativ zur Grenzfläche gemessen werden, können einzelnen Schichten einfach durch ihre Brechungsindices beschrieben werden.

Abgeleitet wird ein Brechungsindex für Neutronen von der Streulängendichte ρ :

$$n = 1 - \frac{\lambda^2}{2\pi} \rho - i \frac{\lambda}{4\pi} \mu_{\text{Neutron}} \quad (11)$$

hierbei ist λ die Wellenlänge des einfallenden Strahls, μ_{Neutron} ist der lineare Absorptionskoeffizient für Neutronen. μ_{Neutron} ist sehr klein und vernachlässigbar für die meisten Isotope. Man kann mit Hilfe des Snell'schen Gesetzes der Brechung die weitere Berechnung der Reflexionswinkel (relativ zur Grenzschicht) für jede Grenzschicht fortführen.

$$n_i \cos \theta_i = n_{i+1} \cos \theta_{i+1} \quad (12)$$

Der Impulsübertrag Q besitzt sowohl eine parallele als auch eine senkrechte Komponenten in Bezug auf die Grenzfläche. Es ist die senkrechte Komponente, die für die spekulare Reflexion der Neutronen von Bedeutung ist, da sie die Informationen über das Konzentrationstiefe-Profil beinhaltet. Der Neutronen-Impulsübertrag Q_i ist abhängig von der Wellenlänge λ und dem Einfallswinkel θ_i :

$$Q_i = (4\pi / \lambda) \sin(\theta_i) \quad (13)$$

Die z-Komponenten der Streuvektoren zweier aufeinanderfolgender Schichten bestimmen die Reflektivität bzw. den Fresnel-Reflexionskoeffizienten $r_{i,i+1}$ der gemeinsamen Grenzschicht. Mit der Gleichung (14) kann somit die Reflektivität jeder einzelnen Grenzfläche berechnet werden.

$$r_{i,i+1} = \frac{Q_i - Q_{i+1}}{Q_i + Q_{i+1}} \exp\left(-\frac{1}{2} Q_i Q_{i+1} \sigma_{i,i+1}^2\right) \quad (14)$$

Die Exponentialfunktion wird verwendet, um die Grenzflächenrauigkeit $\sigma_{i,i+1}$ zwischen den Schichten i und $i + 1$ zu berücksichtigen.

Für ein Mehrschichtensystem hat sich die Methode nach Abeles bewährt. Bei dieser Methode wird eine charakteristische Matrix für jede einzelne Schicht definiert:

$$M_i = \begin{pmatrix} \exp(i\beta_{i-1}) & r_{i-1,i} \exp(i\beta_{i-1}) \\ r_{i-1,i} \exp(-i\beta_{i-1}) & \exp(-i\beta_{i-1}) \end{pmatrix} \quad (15)$$

Der Phasenverschiebung β_i repräsentiert die optische Pfadlänge in Schicht i senkrecht zur Grenzfläche:

$$\beta_i = \frac{1}{2} n_i Q_i d_i \quad (16)$$

mit n_i und d_i als Brechungsindex bzw. Dicke der Schicht i .

Wenn für jede einzelne Schicht eine Matrix aufgestellt worden ist, wird deren Produkt berechnet:

$$M = M_1 \cdot M_2 \cdot \dots \cdot M_n = \begin{pmatrix} M_{11} & M_{12} \\ M_{21} & M_{22} \end{pmatrix} \quad (17)$$

Die Reflektivität steht dann in Beziehung zu den Matrixelementen, wie folgt:

$$R(Q) = \frac{|M_{12}|^2}{|M_{22}|^2} \quad (18)$$

Q entspricht hierbei dem Impulsübertrag Q_0 der ersten Schicht (Abbildung 29). Somit kann die Reflektivität $R(Q)$ des Multischichtensystems als Funktion der Streulängendichten ρ_i , der

Grenzflächenrauigkeiten $\sigma_{i,i+1}$ und der Schichtdicken d_i berechnet werden. Durch die Variation der Parameter, kann die Reflektivität $R(Q)$ nun an die experimentelle Reflektivitätskurve angepaßt werden.

Mit dieser allgemeine Lösung lassen sich mit Hilfe des Computers sehr leicht Reflektivitätsprofile für Proben mit komplexer innerer Schichtstruktur modellieren und kalkulieren.

4 Theorie der Proteinadsorption

In natürlichen Zellabläufen spielt die Proteinadsorption eine essentielle Rolle. Proteine fungieren innerhalb der Zelle, in der sie z. T. an der Zellmembran adsorbiert sind, als Ionenkanäle, Katalysatoren, Energieerzeuger oder Transportenzyme. Eine Adsorption des Proteins geht oft mit einem teilweisen Verlust seiner Sekundär- und Tertiärstruktur einher. So wurde bereits schon vor 150 Jahren gefolgert, dass Proteine, die in Kontakt mit einer Oberfläche stehen, sich einer Konformationsänderung unterwerfen [Malmsten2003].

Methoden für die Untersuchung der Proteinadsorption sind die Neutronen- und Röntgen-Reflektometrie, die CD-Spektroskopie, die optische Reflektometrie, die Ellipsometrie, die *differential scanning calorimetry*, die Fluoreszenz-Spektroskopie, die Fluoreszenz-Fluktuations-Spektroskopie, TIRF-Spektroskopie (*total internal reflection fluorescence*) und einige mehr.

Die Proteinadsorption auf flüssigen und festen Oberflächen wird nicht nur von der Beschaffenheit des Proteins beeinflusst, sondern auch von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Oberflächen. Da bekanntlich Proteine auf den unterschiedlichsten Oberflächen von Materialien, wie organischen Stoffen, Metallen, Glas, Kunststoffen, adsorbieren, spielt deren Struktur für die Adsorption eine große Rolle. Grundsätzlich kann gesagt werden, dass mit ansteigendem Grad der Hydrophobizität der gewählten Oberfläche die Stärke der Proteinadsorption zunimmt. Dies drückt sich in einer stärkeren Bindung des Proteins auf der Oberfläche aus. Folge sind ein höherer Bedeckungsgrad, Konformationsänderungen und eine irreversible Adsorption. So konnte u.a. in selbst durchgeführten optisch-reflektometrischen Experimenten gezeigt werden, dass eine Verdünnung der Proteinlösung, die mit der Oberfläche in Kontakt steht, nicht zur Desorption des Proteins führt.

In Abbildung 31 sollen schematisch die in dieser Arbeit auf Proteinadsorption untersuchten Oberflächensysteme gezeigt werden.

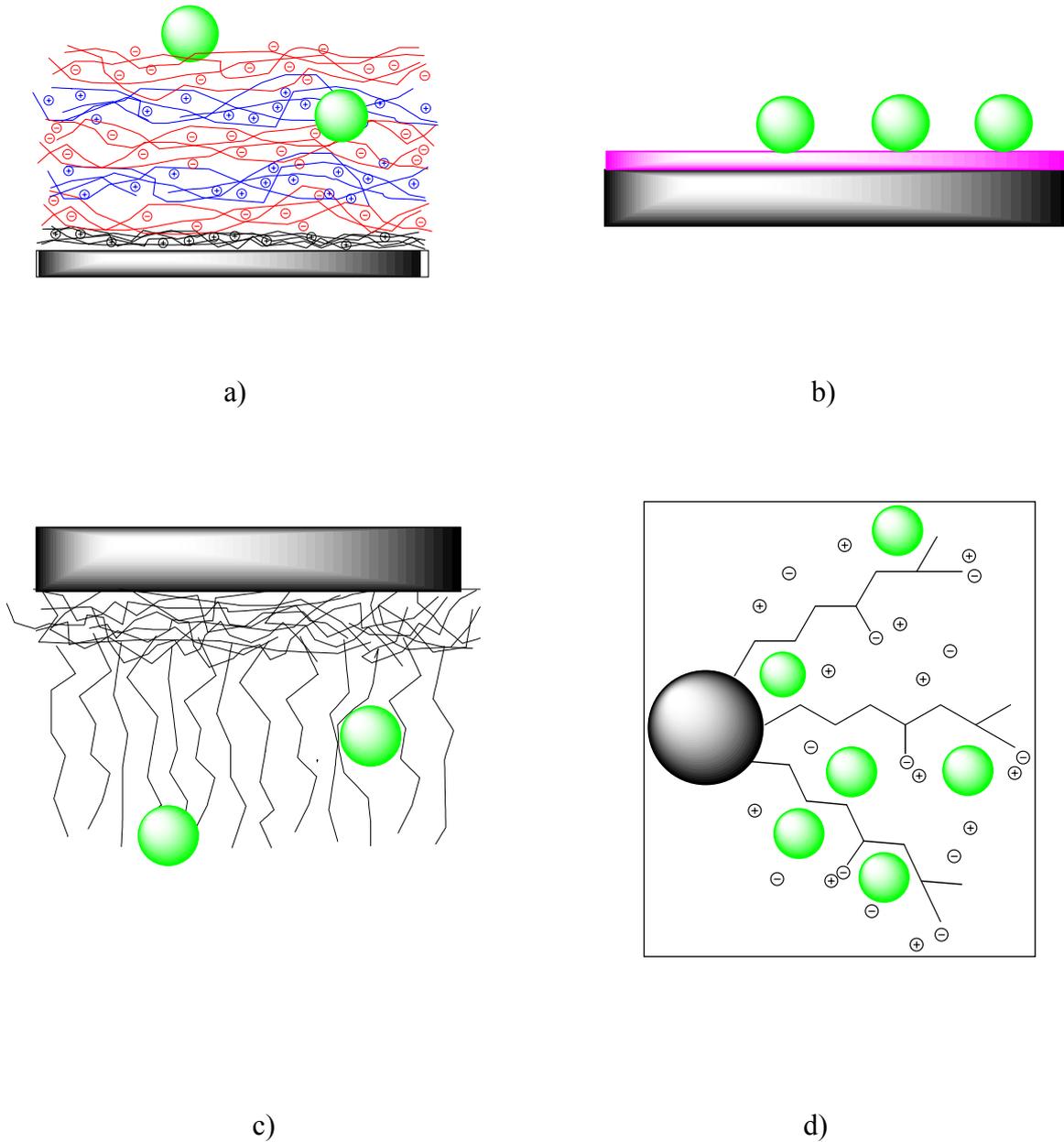


Abbildung 31: Überblick über die vier in dieser Arbeit verwendeten Oberflächen, auf denen die Adsorption unterschiedlicher Proteine untersucht wurde.

- a) Polyelektrolyt-Multschicht (PEM) mit adsorbierten Proteinmolekülen
- b) oxidierte Silizium-Wafer (Si/SiO₂) mit adsorbiertem Protein
- c) planare Polyelektrolyt-Bürsten mit adsorbiertem Protein
- d) sphärische Polyelektrolyt-Bürsten (SPB) mit Polystyrol-Kern und verankerten PAA-Ketten mit adsorbiertem Protein

Proteine sind in ihrem Aufbau sehr komplex. Ihre hydrophilen und hydrophoben Aminosäureseitenketten bedingen ihren amphiphilen Charakter und z. T. ihre hohe Oberflächenaktivität, die zur Adsorption dieser Proteine führt. Van der Waals-Kräfte, die zwischen den Atomen des Proteins und denen des Substrats wirken, sowie die elektrostatischen Anziehungskräfte zwischen den geladenen Seitenketten und der mehr oder weniger stark geladenen Oberfläche sind die einfachsten der relevanten Triebkräfte für eine Proteinadsorption.

Proteine, die in ihrer nur marginal stabilen, nativen Form vorliegen, können durch grenzflächeninduzierte Konformationsänderungen stärker an der Oberfläche gebunden werden. Die Standard-Entfaltungs-Gibbsenergie eines Proteins beträgt zwischen 20 und 60 kJ/ mol.

4.1 Van der Waals-Kräfte

Eine der einfachsten Kräfte, die die Protein-Adsorption unterstützt, ist die van der Waals-Kraft. Diese Anziehungskraft zwischen Atomen und Molekülen ergibt sich aus der Wechselwirkung zweier permanenter Dipole (Keesom-Kraft), einem permanenten Dipol und einem induzierten Dipol (Debye-Kraft) oder zweier induzierter Dipole (London- oder Dispersions-Kraft) [Hiemenz]. In all diesen Fällen ist die korrespondierende potentielle Energie negativ, daher anziehend wirkend, und steigt bis zu einem von Wert von Null mit der Entfernung r gemäß $1/r^6$ an. Nähern sich zwei größere Körper einander und interagieren, kann die sich hieraus ergebende potentielle Energie durch die Aufsummierung aller paarweisen Wechselwirkungen der interagierenden konstituierenden Atome berechnet werden. Dies führt zu einem Ausdruck, der von der Geometrie der Körper und der Art des Materials abhängig ist (Hamaker-Näherung).

Für einen runden Körper, ein Protein repräsentierend, der mit einem planaren Körper als Adsorbens interagiert, sagt die Hamaker-Näherung eine van der Waals-Energieänderung von

$$\Delta G = -\frac{A_{213}}{6} \left(\frac{R}{d} + \frac{R}{d+2R} + \ln \frac{d}{d+2R} \right) \quad (19)$$

bei Annäherung der Körper voraus (mit R als Radius des Proteins und d als Entfernung der Proteinoberfläche zur planaren Oberfläche). A_{213} die Hamaker Konstante des Proteins (2), welches mit dem Adsorbens (3) durch das Lösungsmittel (1) interagiert. Diese Konstante wird aus den Hamaker-Konstanten der individuellen Komponenten gemäß der Gleichung

$$A_{213} = (\sqrt{A_{22}} - \sqrt{A_{11}}) \cdot (\sqrt{A_{33}} - \sqrt{A_{11}}) \quad (20)$$

erhalten.

Aus dieser Gleichung kann geschlussfolgert werden, dass die van der Waals-Wechselwirkung zwischen identischen Materialien immer attraktiv ist ($A_{22}=A_{33}$), wobei aus einer negativen Hamaker-Konstante eine Abstoßung resultiert, sofern A_{11} des Lösungsmittels zwischen A_{22} und A_{33} liegt.

Für ein Proteinmolekül, das mit einer Wasser/Silizium-Grenzfläche wechselwirkt, wurde eine Hamaker-Konstante von $A_{213}=1,65 \text{ kT}$ dokumentiert [Roth1996], einhergehend mit einer Änderung der Gibbs-Energie von $\Delta G = -0,62 \text{ kT}$ für einen Radius von 2 nm und einem Abstand von 0,5 nm, die schrittweise auf $-4,6 \text{ kT}$ herabgesetzt wird, wenn sich das Protein der Grenzfläche auf $d=0,1 \text{ nm}$ nähert (mit k als Boltzmannkonstante und T als absolute Temperatur).

Angemerkt werden muß, dass hier idealisierte Geometrien, wie z.B. Kugeln für Proteine, verwendet werden, und dadurch die van der Waals-Wechselwirkung zur Adsorption überschätzt wird [Roth1996].

Daher darf gesagt werden, dass die van der Waals-Energie einen kleinen, aber nicht zu vernachlässigenden Beitrag zu der Adsorptions-Gibbsenergie der Proteine liefert.

4.2 Elektrostatische Wechselwirkungen

Eine weitere Kraft, die zu betrachten ist, ist die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Ladungen des Proteins und der Oberfläche. Als Ausgangspunkt für diese Betrachtung kann die Poisson-Gleichung herangezogen werden [Yoon], [Roth1993].

$$\nabla^2 \psi = -\frac{\rho}{\varepsilon_0 \varepsilon_r} \quad (21)$$

mit ψ als elektrisches Potential in einem Volumen, das durch die relative Dielektrizitätskonstante ε_r und die Ladungsdichte ρ charakterisiert wird (ε_0 ist die Dielektrizitätskonstante im Vakuum).

Man kann die Poissongleichung für das Proteininnere und die Elektrolytlösung anpassen. Innerhalb des Proteins wird die Ladungsdichte durch die Ladungen an den Seitenketten bestimmt, wohingegen die Konzentration der Gegenionen und Co-Ionen eine entsprechende Ladungsdichte in der Elektrolytlösung ergeben. Wenn die Ionenkonzentrationen von der Boltzmannverteilung bestimmt werden, ist die Ladungsdichte der Elektrolytlösung gegeben durch:

$$\rho_e = \sum_i z_i e c_{i\infty} \exp(-z_i e \psi_e / kT) \quad (22)$$

mit der Valenz z_i , $c_{i\infty}$ als Bulkkonzentration der Ionenspezies i und e der Elementarladung. Der Index e symbolisiert die Elektrolytlösung.

Löst man die zusammengehörigen Poisson-Gleichungen für das Protein und die Elektrolytlösung, erhält man das elektrische Potential über das gesamte Volumen, mit dem die elektrostatische Wechselwirkungsenergie berechnet werden kann [Yoon], [Roth1993]:

$$G = \frac{1}{2} \int_A \sigma \psi_e dA + \frac{1}{2} \sum_j q_j \psi_i(\vec{r}_j) \quad (23)$$

mit ψ_e und ψ_i als elektrische Potentiale in der Elektrolytlösung und dem Proteininneren. σ ist die Oberflächenladungsdichte des Adsorbens und q_j bezeichnet die Proteinladung an der Position \vec{r}_j . Die Integration wird über die Oberfläche A des Adsorbens durchgeführt. Die Summierung erfolgt über alle Proteinladungen j .

Beispielsweise wurden für Lysozym bei einem pH-Wert von 7 elektrostatische Energien im Bereich von $-0,8 kT$ bis $-1,9 kT$ gefunden, je nach Orientierung des Proteins bei einer Oberflächenladungsdichte von $-2,2 \mu\text{C}/\text{cm}^2 = -0,14 \text{ e}/\text{nm}^2$, einer Ionenstärke der Lösung von $0,1 \text{ M}$ und einer Lücke zwischen dem Protein und der adsorbierenden Oberfläche von $0,766 \text{ nm}$ [Roth1993].

4.3 Hydrophober Effekt

Die dritte und vermutlich wichtigste Triebkraft für die Adsorption eines Proteins auf einer Oberfläche sind hydrophobe Wechselwirkungen.

Im allgemeinen beschreibt der Ausdruck „hydrophobe Wechselwirkungen“ die Beobachtung, dass unpolare Moleküle eine geringe Löslichkeit in Wasser besitzen und daher die Tendenz zeigen zu assoziieren.

Ein Beispiel ist die Änderung der Gibbs-Energie für den Transfer eines Cyclohexanmoleküls aus der Bulkflüssigkeit in die wässrige Phase mit $+ 25 \text{ kJ mol}^{-1}$ bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ [Creighton].

Die korrespondierende Transferenthalpie ist annähernd null. Daher wird der Prozess durch eine Abnahme an Entropie charakterisiert. Erklärt werden kann dies durch die Formierung einer geordneten Wasserstruktur, die die Cyclohexanmoleküle umgibt.

Einerseits kann angenommen werden, dass diese Wasserhülle die geringe Löslichkeit eines unpolaren Lösungsmittels in Wasser begünstigt.

Denn ein Wert von annähernd null für die Transferenthalpie weist darauf hin, dass beim Transfer eine unvorteilhafte Trennung der Cyclohexanmoleküle in der flüssigen Phase durch eine vorteilhafte Assoziation anderer Molekülen kompensiert wird.

Die Formation der geordneten Wasserstruktur, die die Cyclohexanmoleküle umgibt, bewirkt diese Enthalpieabnahme.

Andererseits ist die geordnete Struktur der Wasserhülle durch eine verringerte Entropie charakterisiert, was im Wesentlichen die geringe Löslichkeit eines unpolaren Lösungsmittels in Wasser bedingt.

Für unpolare Aminosäureseitenketten wurden Transfer-Gibbs-Energien im Bereich von 84-180 J mol⁻¹ Å⁻² gefunden, die auf die Größe der Oberflächen der Seitenketten bezogen sind [Creighton].

Nimmt man an, dass sich 10 unpolare Seitenketten, jede mit einer Oberfläche von 10 Å² im Kontakt mit Wasser, an der Oberfläche eines Proteins befinden, so beträgt der Beitrag der Dehydration dieser Seitenketten zur Adsorptions-Gibbs-Energie $-3,4 kT$ bis $-7,3 kT$ bei $T=298$ K.

Zusätzlich resultiert ein ähnlicher Gewinn an Gibbs-Energie durch die Dehydration einer hydrophoben Adsorbens-Oberfläche.

Vergleicht man die drei bisher aufgeführten Kräfte miteinander, kann gesagt werden, dass die hydrophobe Wechselwirkung die stärkste treibende Kraft der Proteinadsorption ist, stärker als die elektrostatische Ionen- und die van der Waals-Wechselwirkungen.

4.4 Konformationsentropie

Ein weiterer zu betrachtender Faktor ist eine Konformationsänderung, die ein Protein bei der Adsorption auf einer Oberfläche unterlaufen kann. So führt diese Änderung seiner Struktur zur Optimierung der Wechselwirkung mit der Oberfläche des Adsorbens. In vielen experimentellen Studien konnte dieses Verhalten bereits nachgewiesen werden.

Es wird vermutet, dass der Verlust der Sekundärstruktur des Proteins zu einer Erhöhung der Konformationsentropie des Proteins führen kann [Norde1996]. Als Beispiel für diesen Verlust sei die Reduzierung des Anteils an α -Helices des Rinder-Serum-Albumins (BSA) aufgezeigt, dass bei der Adsorption auf einer Siliziumoberfläche eine Abnahme im α -Helix-Anteil von 74 % auf 38 % erfährt. 210 Aminosäurereste sind in diesem Vorgang involviert. Werden nur 2 Konformationen von diesen Aminosäureresten im Mittel angenommen (etwa 8 Konformationen können für ein vollständig entfaltetes Protein angenommen werden), so resultiert daraus ein Entropiegewinn von $k \ln 2^{210}$, was einer Adsorptions-Gibbs-Energie von $-146 kT$ entspricht.

Dieses oben aufgeführte Beispiel zeigt, dass eine Zunahme der Konformationsentropie bei einer partiellen Entfaltung des Proteins während des Adsorptionsvorganges auf einer Oberfläche die stärkste Triebkraft der Adsorption darstellen kann. Eine beobachtete adsorptionsinduzierte Konformationsänderung eines Proteins geht jedoch nicht notwendigerweise mit einer Erhöhung der Anzahl der Freiheitsgrade der Aminosäurereste einher.

Die Idee, dass der Anstieg der Konformationsentropie eines Proteinmoleküls eine wichtige Triebkraft für die Proteinadsorption ist, wird unterstützt durch den Vergleich des Adsorptionsverhaltens von Proteinen mit unterschiedlicher Stabilität im Blick auf ihr Bestreben zur Entfaltung [Norde1996], [Arai1990]. Auch hierzu ein Beispiel: Das wenig stabile Protein α -Lactalbumin weist eine Entfaltungs-Gibbs-Energie von 21 kJ/ mol auf und adsorbiert auf α -Fe₂O₃ trotz elektrostatischer Abstoßung. Der Adsorptionsprozess wird daher offenbar durch den Anstieg der Konformationsentropie einhergehend mit dem adsorptionsinduzierten Entfalten des α -Lactalbumins gesteuert. Als Vergleich steht hierzu das Lysozym, ein sehr stabiles Protein mit einer Entfaltungsgibbsenergie von 60 kJ/ mol, welches auf α -Fe₂O₃ nur unter elektrostatischer Anziehung adsorbiert.

In Abbildung 32 werden alle vier schon beschriebenen Triebkräfte der Proteinadsorption schematisch aufgezeigt.

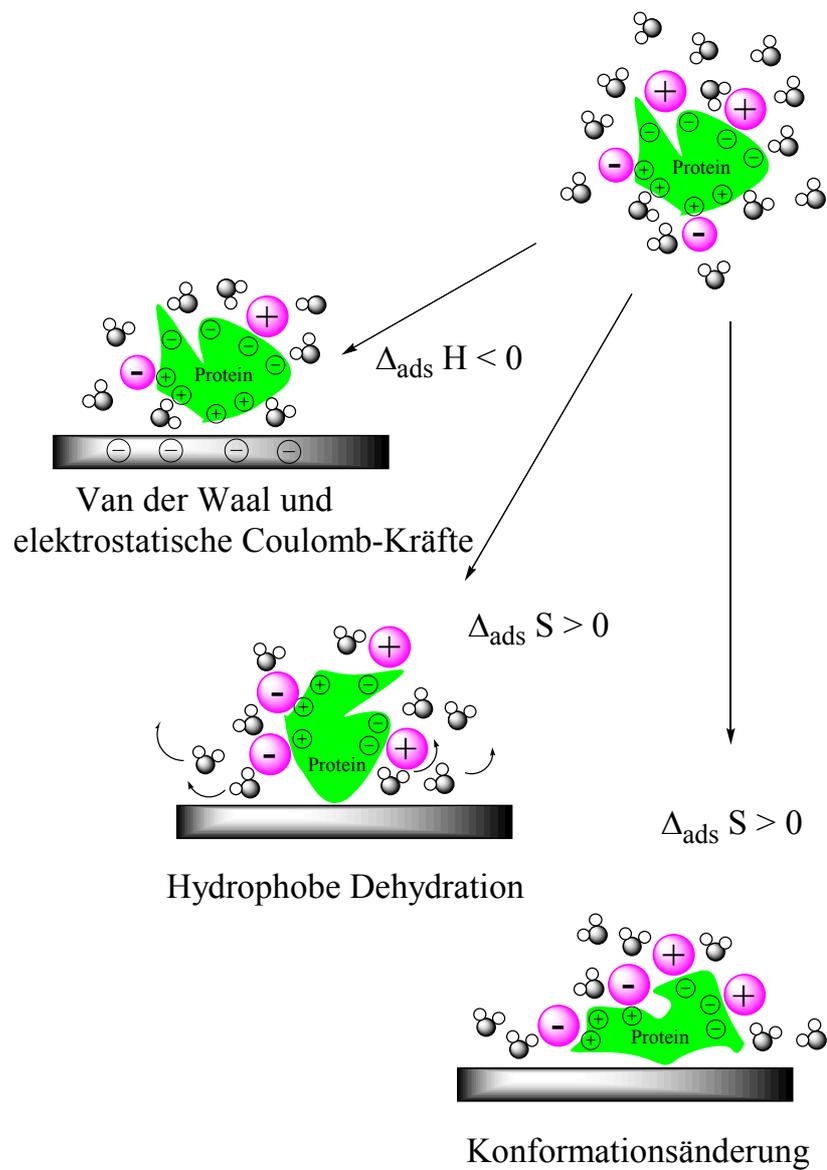


Abbildung 32: Schematische Abbildung eines Proteins, das über geladene Aminosäurereste, polare und hydrophobe Regionen, Hydratisierung und Gegenionen verfügt, und seine Wechselwirkungen mit einer Oberfläche. Die Adsorption wird attraktiv für das Protein, wenn $\Delta G < 0$ ist ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$).

4.5 Counterion release force

Eine weitere im Rahmen dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit H. H. von Grünberg untersuchte Adsorptionskraft ist die sogenannte *counterion evaporation* [Grünberg] bzw. *counterion release force*. Sie ist relevant für Oberflächen, die stark geladen sind und demnach viele Gegenionen in ihrer Nähe aufweisen. Solche Oberflächen sind z.B. sog. Polyelektrolytbürsten, bei denen Polyelektrolytketten einseitig an die feste Phase gebunden sind. Man hat gefunden, dass die Gegenionen der Polyelektrolytketten die Bürste nicht verlassen können. Da ein Proteinmolekül i. d. R. viele elektrische Ladungen an seiner Oberfläche aufweist, kann es als multivalentes Gegenion wirken. Bei der Adsorption eines Proteinmoleküls an einer Polyelektrolytbürste, wie z.B. positiv geladenes Lysozym an einer negativ geladenen PAA-Bürste, werden einwertige Gegenionen der Polyelektrolytbürste durch das Proteinmolekül ersetzt und in die Lösung freigesetzt. Diese Freisetzung ist mit einem Entropieanstieg verbunden und verläuft daher spontan. In Zusammenarbeit mit H. H. von Grünberg wurde auch der Fall untersucht, wenn das Protein wie die Polyelektrolytbürste negativ geladen ist. Auch für diesen Fall kann gezeigt werden, dass eine Gegenionen-Freisetzung die dominierende treibende Kraft für eine Proteinadsorption darstellt, die die direkte elektrostatische Abstoßung deutlich überkompensiert. Die Theorie hierzu wird weiter unten zusammen mit den entsprechenden experimentellen Untersuchungen ausführlich diskutiert.

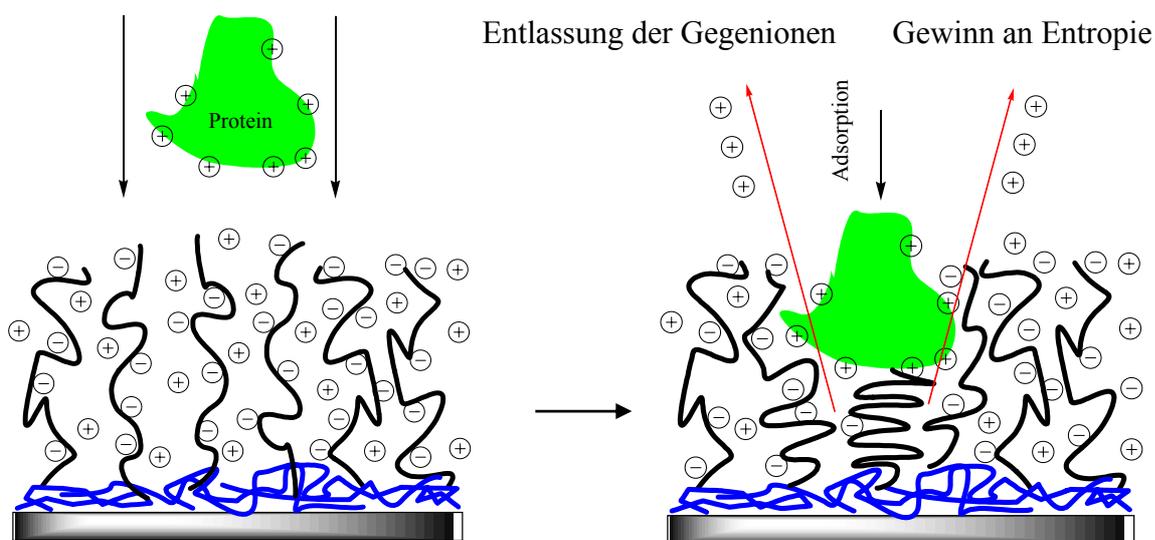


Abbildung 33: Schematische Darstellung der Adsorption eines Proteins auf einer Polyelektrolytbürste nach der *counterion release force*-Theorie. Die Adsorption wird attraktiv, wenn durch die Entlassung von Gegenionen aus der Polyelektrolyt-Bürste die Entropie zunimmt [Grünberg].

4.6 Theorie der Polyelektrolyt-Bürsten

In der Literatur werden zwei Arten von Polyelektrolyt-Bürsten beschrieben: zum einen die sog. *quenched* Polyelektrolytbürsten mit einem festem Anteil an Ladungen (z.B. auf der Oberfläche verankerte Natrium-polystyrolsulfonatketten) und zum anderen die sog. *annealed* Polyelektrolytbürsten mit einem variablen Anteil an Ladungen (z.B. auf der Oberfläche verankerte Polyacrylsäureketten, Abbildung 34).

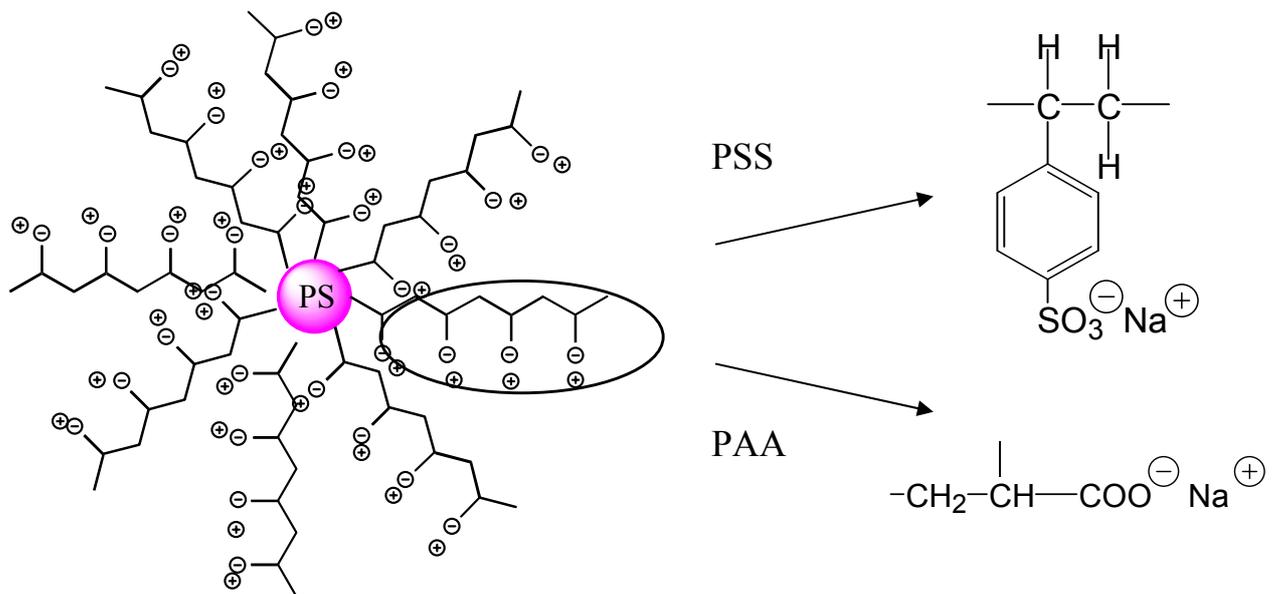


Abbildung 34: Schematische Darstellung der beiden Bürstentypen am Beispiel einer sphärischen Polyelektrolyt-Bürste.

Das Verhalten von auf einer Oberfläche verankerten schwachen Polyelektrolyten kann beschrieben werden. Hierfür entwickelten Israëls, Leermaker und Fler eine *self-consistent mean-field*-Theorie (SCF) [Israëls1994]. In diesen Systemen ist die Ladung der Bürstensegmente abhängig von der lokalen Umgebung, wie z. B. dem pH-Wert der Lösung. Für Bürsten, die schwache Säuregruppen wie Carboxyl-Gruppen tragen, ist der Grad der Dissoziation eine Funktion des lokalen pH-Wertes. Hierbei unterscheidet sich das Verhalten der *annealed* Bürsten in Bezug auf deren Bürstendicke und Abhängigkeit von der Salzkonzentration von dem Verhalten der Bürsten mit konstanter Ladungsdichte.

Nach der Theorie von Fler et al. können verschiedenen Parameter, wie die Bürstenhöhe, in Abhängigkeit der Dissoziation und der Salzkonzentration berechnet werden. Das verwendete Modell ist eine Weiterentwicklung des Scheutjens-Fler-Modells [Scheutjens1979, 1980] und des Mehrschichten-Modells nach Stern [Israëls1993], [Evers]. Ersteres Modell beschreibt die Adsorption ungeladener Homopolymere und zweiteres die elektrostatischen

Wechselwirkungen eines schwachen Polyelektrolyten. Weitergehend wurde von Fleer et al. noch ein Zwei-Zustand-Modell, das das Säure-Base-Gleichgewicht der Ketten beschreibt, mit einbezogen.

Im Folgenden werden die wesentlichen Ideen und Ergebnisse der Theorie von Fleer et al. skizziert.

Für ein Segment eines schwachen Polyelektrolyten kann das Säure-Base-Gleichgewicht



formuliert werden (mit HA als undissoziiertes Segment, A⁻ als dissoziiertes Segment und H⁺ als Proton). Das Gleichgewicht kann über die Gleichgewichtskonstante K_a und die Konzentrationen beschrieben werden:

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (25)$$

Der Grad der Dissoziation wird über α ausgedrückt:

$$\alpha = \frac{[\text{A}^-]}{[\text{A}^-] + [\text{HA}]} \quad (26)$$

Mit dem Gewichtungsfaktor $G_A(z)$ wird die Wahrscheinlichkeit angegeben, ein Segment des Typs A in einer Schicht z zu finden (Abbildung 35):

$$G_A(z) = e^{-\mu_A(z)/kT} \quad (27)$$

mit $\mu_A(z)$ als mittlere Wechselwirkungsenergie. Per Definition ist die Konzentration der Segmente A in der Lösung null.

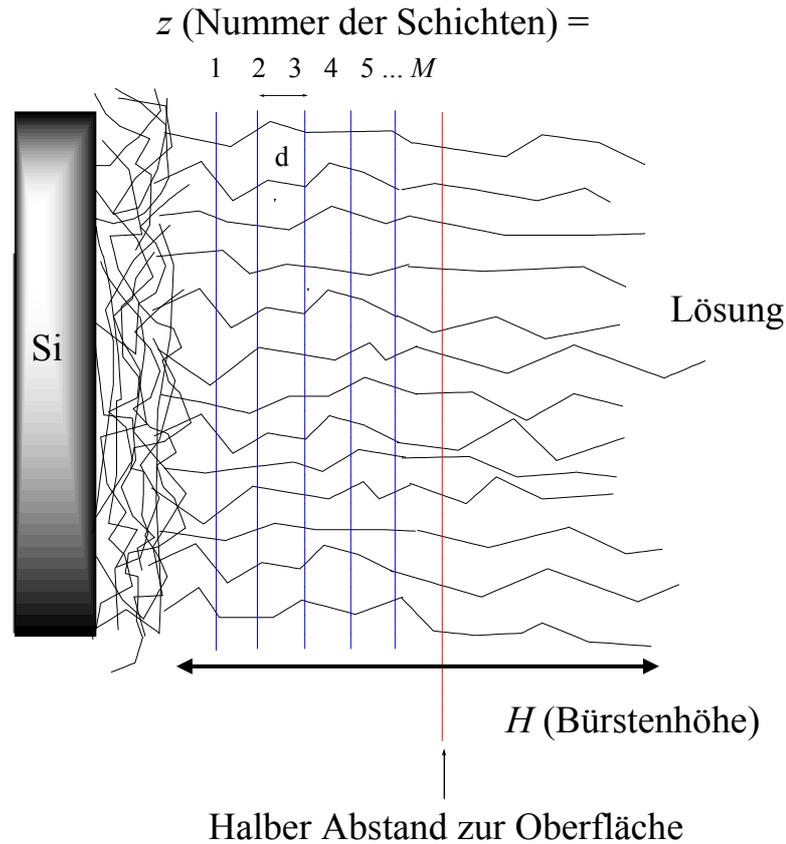


Abbildung 35: Mit diesem schematischen Modell ist es möglich, verschiedenen Parameter, wie die Bürstenhöhe, in Abhängigkeit von dem Grad der Dissoziation und der Salzkonzentration darzustellen. Der hieraus ermittelte Gewichtungsfaktor $G_A(z)$ stellt die statistische Wichtung für das Auffinden eines Segmentes des Types A in einer Schicht z dar.

Unter Berücksichtigung des obigen Säure-Base-Gleichgewichtes gilt entsprechend:

$$G_A(z) = \alpha^b G_{A^-}(z) + (1 - \alpha^b) G_{HA}(z) \quad (28)$$

mit $G_{HA}(z)$ und $G_{A^-}(z)$ als Gewichtungsfaktoren der Segmente in ihrer Säure- und Baseform und α^b als Dissoziationsgrad in Lösung:

$$\alpha^b = \frac{K_a}{K_a + [H^+]} \quad (29)$$

Der lokale Dissoziationsgrad $\alpha(z)$ in Schicht z berechnet sich dagegen zu:

$$\alpha(z) = \alpha^b G_{A^-}(z) / G_A(z) \quad (30)$$

Die nicht elektrostatischen Beiträge zur mittleren Wechselwirkungsenergie werden als identisch für $[HA]$ und $[A^-]$ angenommen. Hierdurch kann das Verhältnis $G_{A^-}(z)$ zu $G_{HA}(z)$ durch einen Boltzmannfaktor mit dem elektrostatischen Potential $y(z)$ ausgedrückt werden:

$$G_{A^-}(z)/G_{HA}(z) = e^{y(z)} \quad (31)$$

($y(z)$ wird in Einheiten von kT pro Elementarladung e ausgedrückt, um Dimensionslosigkeit zu erlangen.)

Für Polyelektrolyt-Bürsten nimmt das elektrostatische Potential $y(z)$ negative Werte relativ zur Lösung an ($G_{A^-}(z) < G_{HA}(z)$). Nun kann die Gleichung (30) durch Einsetzen der Gleichungen (28), (29) und (31) neu geschrieben werden:

$$\alpha(z) = \frac{K_a}{K_a + [H^+] e^{-y(z)}} \quad (32)$$

Auf der Grundlage dieser Gleichungen kann der Dissoziationsgrad α und die Bürstendicke H in Abhängigkeit der Salzkonzentration in Lösung berechnet werden.

Die Ergebnisse dieser Theorie sind in den Abbildungen 36 und 37 sowie in Tabelle 8 zusammengefasst.

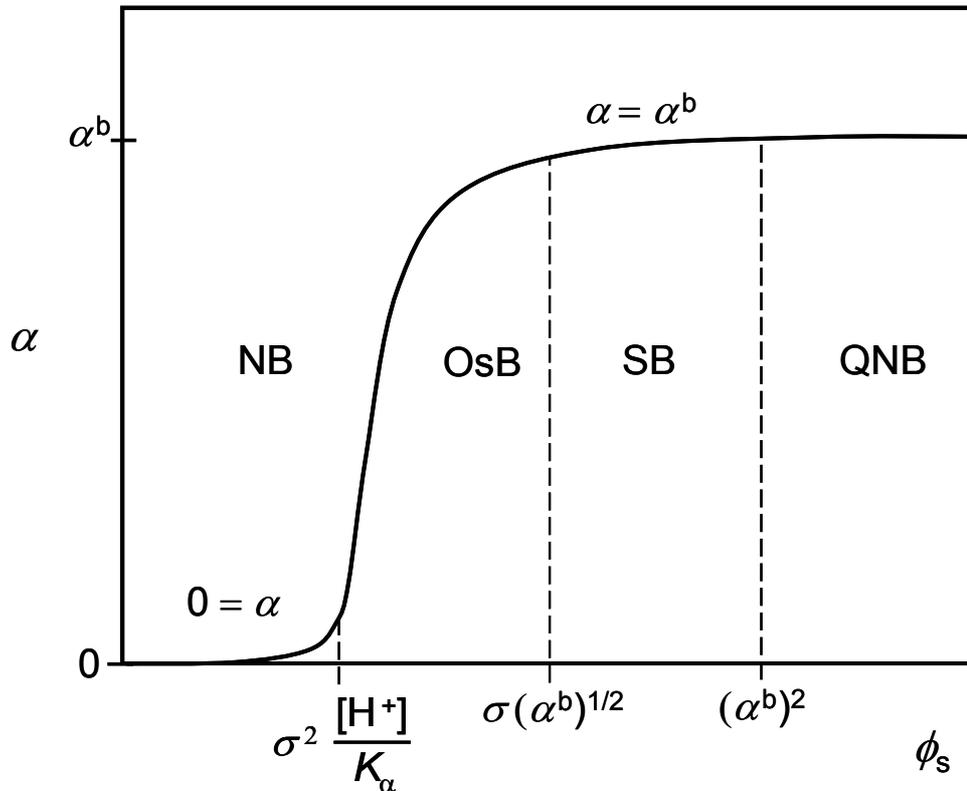


Abbildung 36: Auftragung des Grades der Dissoziation α gegen die Salzkonzentration ϕ_s einer schwachen Polyelektrolytbürste [Israëls1994]. Zur Erläuterung der Symbole siehe Tabelle 8.

Tabelle 8: Die vier wichtigsten von neun bekannten Bürsten-Regimen einer Polyelektrolyt-Bürste in Abhängigkeit der Salzkonzentration (zunehmend von oben nach unten); mit H der Bürstendicke, N der Anzahl der Polyelektrolyt-Segmente, σ der Verankerungsdichte (*grafting density*), ν dem Segmentvolumen und ϕ_s dem Volumenbruch der Kationen. Die angegebenen Beziehungen gelten für einen konstanten Dissoziationsgrad α_0 [Israëls1994].

Bürsten-Regime	Bürstendicke H
Neutrale Bürste (nur bei schwachen Bürsten wie PAA)	$H = \nu^{1/3} N \sigma^{1/3}$ (33)
Osmotische Bürste (OsB)	$H \sim N \alpha_0^{1/2}$ (34)
Salzhaltige Bürste (SB)	$H \sim N(\sigma \nu_{\text{eff}})^{1/3}$ mit $\nu_{\text{eff}} = \nu + \alpha_0^2 / \phi_s$ (35)
Quasi-neutrale Bürste (QNB)	$H \sim N^{1/3} \nu^{1/3}$ (36)

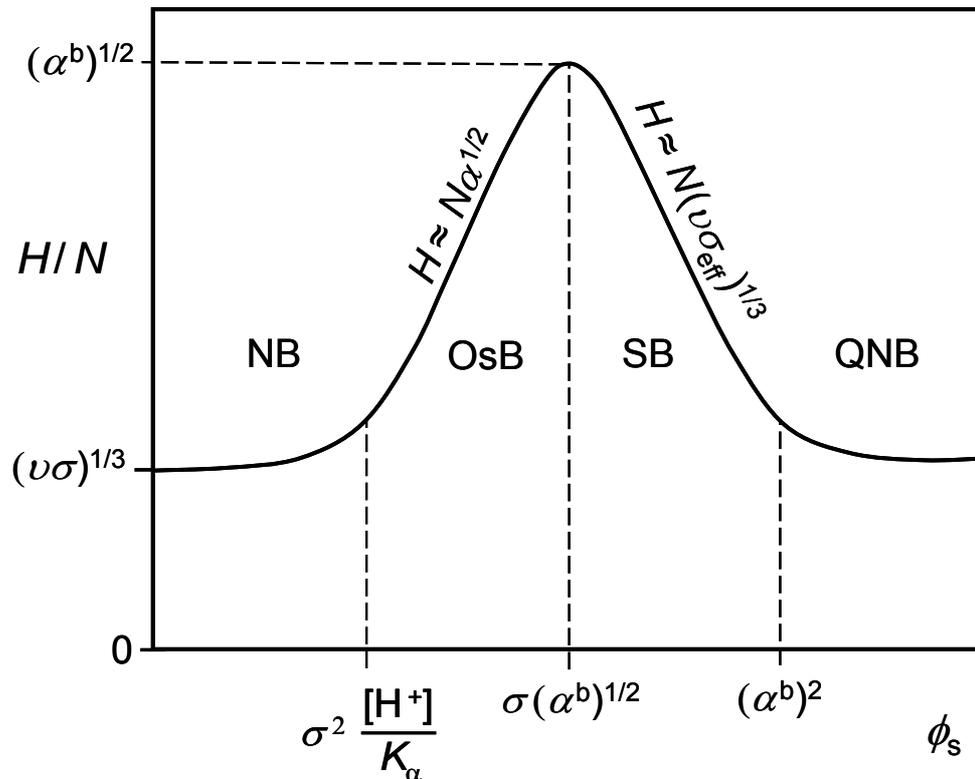


Abbildung 37: Bürstendicke H als Funktion der Salzkonzentration ϕ_s . Der in dieser Arbeit eingehend untersuchte Bereich ist der der salzhaltigen Bürste (SB). Das Maximum der Bürstehöhe H befindet sich an der OsB/ SB-Grenze [Israëls1994]. Zur Erläuterung der Symbole siehe Tabelle 8.

Zur Veranschaulichung der wichtigsten Bürsten-Regime sollen in den Abbildungen 38 und 39 drei Regime - die osmotische Bürste, die salzhaltige Bürste und die quasi-neutrale Bürste - schematisch dargestellt werden.

Wenn die Debye-Länge κ^{-1} sehr viel kleiner als die Bürstendicke H ist, werden die mobilen Gegenionen der geladenen Gruppen in der Bürste gefangen gehalten. Der ansteigende osmotische Druck lässt die Bürste durch das Eindringen von Wassermolekülen anschwellen (Abbildung 39). Bei niedrigen Salzkonzentrationen ϕ_s führt dies zu einem osmotischem Bürstenregime (OsB), in dem die Bürstehöhe H unabhängig von der Verankerungsdichte σ ist, aber proportional zur Kettenlänge N und der Quadratwurzel der Ladungsdichte (Tabelle 8).

Steigt die Salzkonzentration ϕ_s weiter an, dringt Salz in die Bürste ein und schirmt die elektrostatischen Wechselwirkungen ab. Ab einem bestimmten Salzgehalt (Abbildung 38) ist der Übergang von einer osmotischen (OsB) zu einer salzhaltigen Bürste (SB) gegeben.

Der Wert der Salzkonzentration ϕ_s beim Übergang von der OsB zur SB wird gefunden, indem die Bürstenhöhen Gleichungen (34 und 35) gleichgesetzt werden.

$$\alpha_0^{1/2} \sim (\sigma \alpha_0^2 / \phi_s)^{1/3} \text{ bzw. } \phi_s \sim \sigma \alpha_0^{1/2} \quad (37)$$

Wird die Salzkonzentration ϕ_s weiter erhöht, nimmt das effektive ausgeschlossene Volumen v_{eff} ab.

Für $\phi_s \approx \alpha_0^2$ wird das quasi-neutrale Bürstenregime erreicht, bei dem $v_{\text{eff}} \approx v$. Dadurch reduziert sich die Gleichung (35) für die salzhaltige Bürste (SB) zu dem bekannten Ausdruck für die neutrale Bürste. In diesem Regime sind alle elektrostatischen Wechselwirkungen vollständig durch den Überschuss an Salz abgeschirmt.

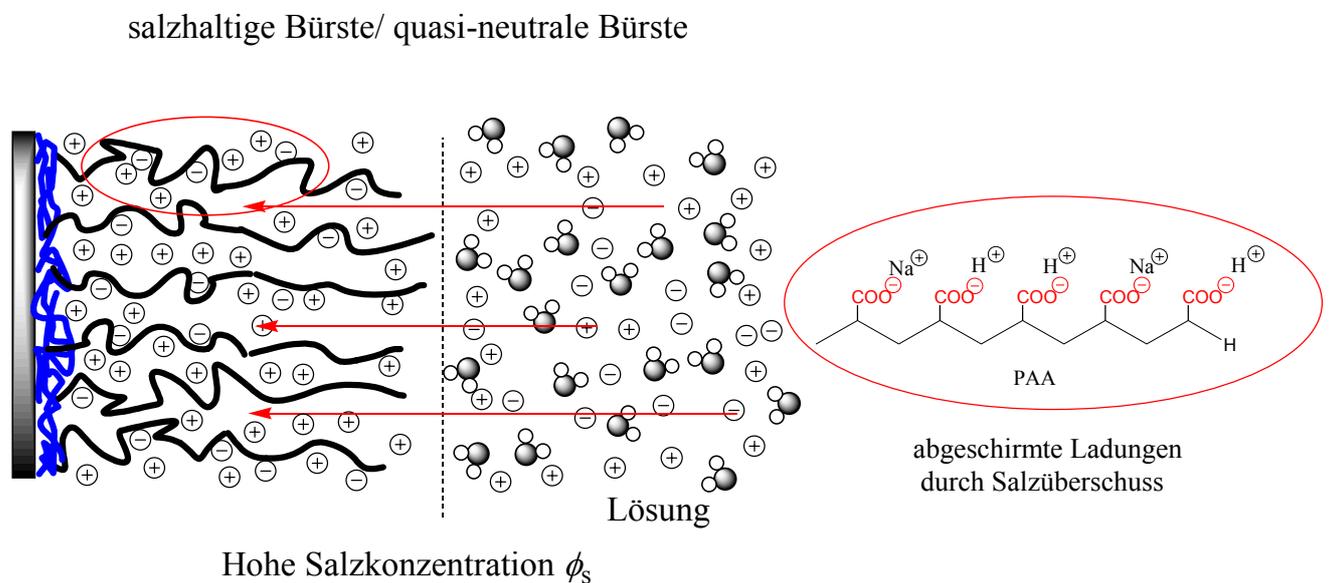


Abbildung 38: Darstellung des Bürsten-Regimes einer salzhaltigen Bürste (SB). Bei hoher Salzkonzentration ϕ_s dringt das Salz in die Bürste ein und schirmt die Ladungen der Kette ab. Wird die Salzkonzentration ϕ_s noch weiter erhöht, so wird aus der salzhaltigen Bürste eine quasi-neutrale Bürste.

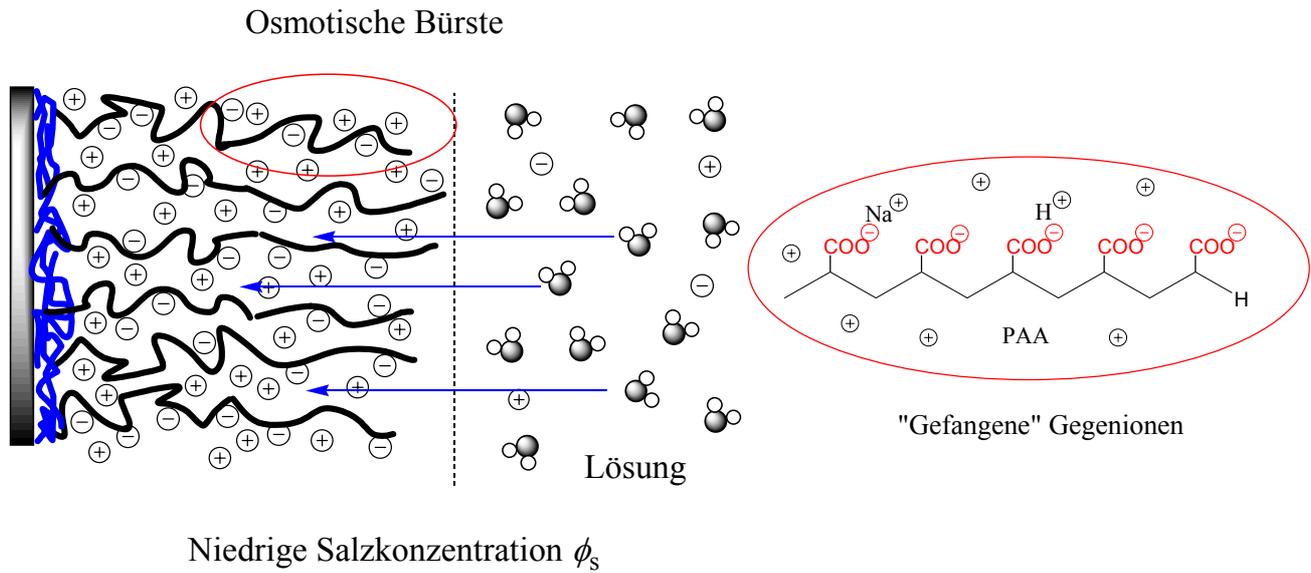


Abbildung 39: In der osmotischen Bürste sind die mobilen Gegenionen der geladenen Gruppen des Polyelektrolytes in der weichen Bürste gefangen. Der ansteigende osmotische Druck hat ein Schwellen der Bürste zur Folge.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Effekt der Temperatur auf die Adsorption von Lysozym an einer Silizium/Wasser-Grenzfläche

Die Adsorption von Lysozym an einer Silizium/Wasser-Grenzfläche in Abhängigkeit der Temperatur und Konzentration wurde mit Hilfe der optischen Reflektometrie und der Neutronenreflektometrie untersucht. Die Neutronenreflektivitätsmessung sind, wie schon in Kapitel 3.3 beschrieben, am Hahn-Meitner-Institut (Berlin) durchgeführt worden. Gemessen wurden die Neutronenreflektivitäten bei 23, 63 und 80 °C. Für jede Temperatur wurden drei Lysozym-Lösungen mit reinem D₂O, einer D₂O/H₂O-Mischung mit einem Volumenverhältnis von 80,1 : 19,9 und einer D₂O/H₂O-Mischung mit einem Volumenverhältnis von 65,7 : 34,3 als Lösungsmittel verwendet. Die Lysozymkonzentration betrug 0,09 mg mL⁻¹. Vor jeder Messreihe erfolgte die Einstellung der Temperatur, die Spülung der Probezelle mit Lysozymlösung und die Equilibrierung der Probe über den Zeitraum von 30 Minuten.

Die Messungen der optischen Reflektometrie erfolgten am Lehrstuhl Physikalische Chemie I der Universität Dortmund. Es wurde die Adsorbatmasse des Lysozyms an einer Siliziumdioxid/Wasser-Grenzfläche in einem Temperaturbereich von 20 - 80 °C und bei Lysozymkonzentrationen von 0,031, 0,055, 0,073 und 0,088 mg mL⁻¹ gemessen.

Die Ergebnisse der optischen Reflektometrie sind in Abbildung 40 und 41 gezeigt. In Abbildung 40 ist die adsorbierte Masse an Lysozym pro Oberfläche Γ in Abhängigkeit der Proteinkonzentration c aufgetragen.

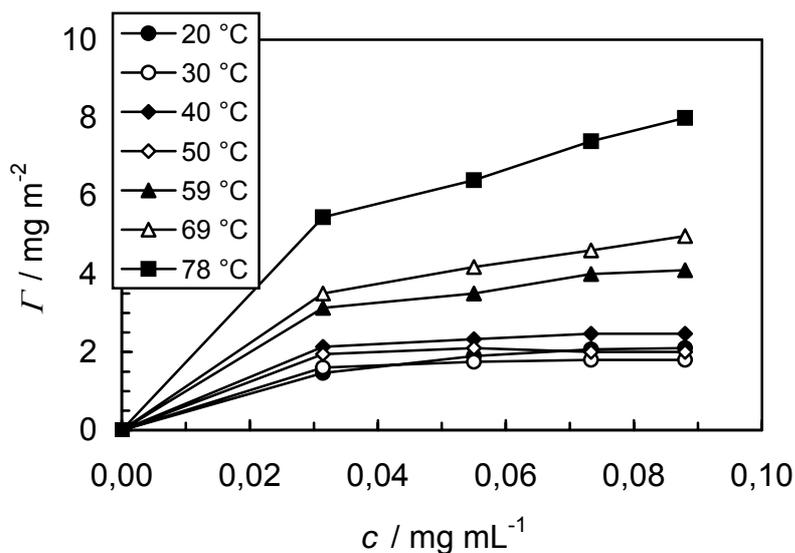


Abbildung 40: Auftragung des Bedeckungsgrades Γ des Proteins Lysozym auf einer Siliziumdioxid-Oberfläche gegen die Proteinkonzentration c in Lösung in Abhängigkeit der Temperatur T . Bei Temperaturen von 20-50°C liegt das gelöste Lysozym in seiner gefalteten Form vor und erreicht einen Plateauwert, welcher der Dicke einer Monolage des Proteins entspricht (Abbildung 45 A). Bei höheren Temperaturen, bei denen Lysozym adsorptions-induziert teilweise entfaltet oder vollständig denaturiert in Lösung vorliegt, wird ein Plateauwert nicht erreicht. Es bilden sich mehrlagige Strukturen (Abbildung 45 B, C).

In Abbildung 41 ist die adsorbierte Masse an Lysozym pro Fläche Γ als Funktion der Temperatur T gezeigt (die Daten wurden entlang der Temperaturachse durch gleitende Mittelung geglättet).

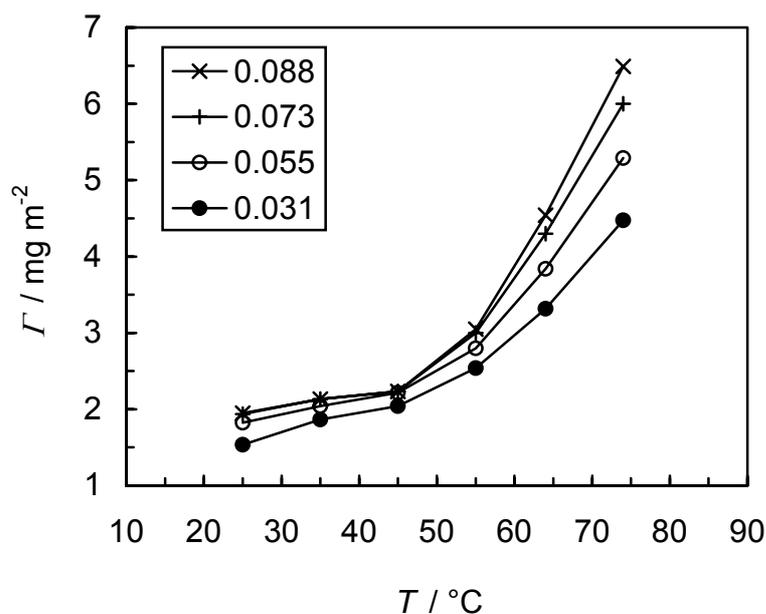


Abbildung 41: Adsorbierte Masse Γ an Lysozym an einer Silizium/Wasser-Grenzfläche pro Fläche als Funktion der Temperatur T . Die Daten wurden mit der Methode der optischen Reflektometrie bei verschiedenen Lösungskonzentrationen, die in der Legende aufgeführt sind, gemessen.

Bei einer Temperatur von 25 °C und einer Lösungskonzentration von 0,088 mg mL⁻¹ wird ein Wert von $\Gamma = 2 \text{ mg m}^{-2}$ gefunden. Dieser Wert steht in guter Übereinstimmung mit bereits in der Literatur veröffentlichten entsprechenden Werten. Zum Beispiel beobachteten Buijs und Hlady einen Wert von 2,4 mg m⁻² (0,05 mg mL⁻¹ Lysozymkonzentration) [Buijs], 1,4 mg m⁻² wurden von Norde und Anusiem (0,07 mg mL⁻¹) [Norde1992] und 1,7 mg mL⁻¹ wurden von Lu et al. (0,03 mg mL⁻¹) [Su1998/3] gefunden.

Mit ansteigender Temperatur ist ein Anstieg der adsorbierten Lysozymmasse über den gesamten Temperaturbereich und bei allen Lösungskonzentrationen zu beobachten (Abbildung 41).

Gemäß dem Prinzip von Le Chatelier zeigt dieses Ergebnis deutlich, dass die Adsorption des Lysozyms an einer Silizium/Wasser-Grenzfläche ein endothermer Prozess ist und somit $\Delta_{\text{ads}}H > 0$. Daher muß dieser Vorgang der Adsorption durch einen Anstieg der Entropie gesteuert sein.

Wird ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen adsorbiertem und gelöstem Lysozym angenommen, so kann mit Hilfe der Beziehung (38 a bzw. 38 b) unter isosteren Bedingungen ($\Gamma = \text{konst.}$) die isostere Adsorptionsenthalpie ΔH_{Γ} und die isostere Adsorptionsentropie ΔS_{Γ}^0 für das Lysozym berechnet werden. Denn im Gleichgewicht zwischen Proteinlösung und Proteinadsorbat gilt unter isosteren Bedingungen:

$$d \ln [c / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})] = \frac{\Delta H_{\Gamma}}{R} \cdot d(1/T) \quad (38a)$$

bzw.

$$\ln [c / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})] = \frac{\Delta H_{\Gamma}}{RT} - \frac{\Delta S_{\Gamma}^0}{R} \quad (38b)$$

mit der Proteinkonzentration c in Lösung, der isosteren Adsorptionsenthalpie ΔH_{Γ} und der isosteren Adsorptionsentropie ΔS_{Γ}^0 . Aus der graphischen Auftragung $\ln c$ gegen T^{-1} erhält man aus der Steigung des Graphen ΔH_{Γ} und aus dem y-Achsenabschnitt ΔS_{Γ}^0 (Abbildung 42).

Die Abbildung 42 und die Tabelle 9 zeigen die thermodynamische Auswertung der Lysozym-Adsorptionsdaten im Temperaturbereich 25 – 55 °C bei pH=7.

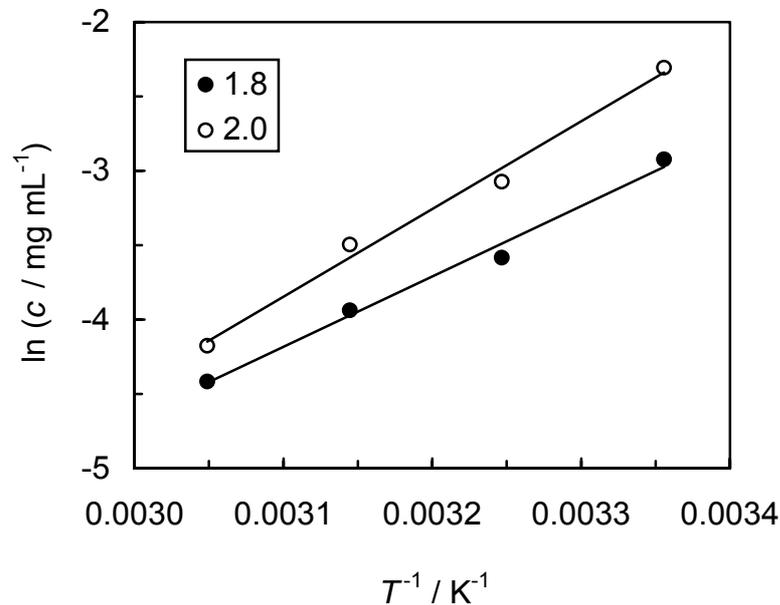


Abbildung 42: Graphische Auswertung isosterer Adsorptionsdaten des Lysozyms zwischen 25 und 55 °C bei pH=7. Es werden Daten für $\Gamma = 1,8 \text{ mg m}^{-2}$ und $2,0 \text{ mg m}^{-2}$ gezeigt.

Tabelle 9: Isostere Enthalpie und Entropie der Proteinadsorption (Lysozym). Die Adsorptions-Gibbs-Energie kann mit der Gleichung $\Delta G_{\Gamma}^0 = \Delta H_{\Gamma} - T\Delta S_{\Gamma}^0$ ermittelt werden. Sie ist bei beiden Belegungsgraden ($1,8$ und $2,0 \text{ mg m}^{-2}$) negativ und erklärt die spontane Adsorption des Lysozyms auf der Siliziumdioxid-Oberfläche.

$\Gamma / \text{mg m}^{-2}$	$\Delta H_{\Gamma} / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S_{\Gamma}^0 / \text{J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$
1,8	39	158
2,0	49	183

Bei einem pH-Wert von 7 wird die temperaturabhängige Entfaltung des gelösten Lysozyms zwischen 70 und 78 °C beobachtet [Van Stokkum], [Privalov1974]. Somit adsorbieren bei geringeren Temperaturen zwischen 25 - 55 °C (Abbildung 41) native Lysozymmoleküle auf der Siliziumoberfläche.

Die Adsorption des nativen Lysozyms an einer Si/Wasser-Grenzfläche ist wahrscheinlich mit einer partiellen Entfaltung der Proteinmoleküle verbunden. Dies wurde auch mittels Fluoreszenz-Spektroskopie gefunden [Czeslik2001].

Die partielle Entfaltung kann zum einen zu einer Optimierung der hydrophoben Wechselwirkung führen, zum anderen steigt möglicherweise die Konformationsentropie des Proteins. Beide Mechanismen lassen den Adsorptionsprozess entropisch gesteuert erscheinen. Eine Zunahme der Konformationsentropie des Lysozyms bei Adsorption an einer Si/Wasser-Grenzfläche tritt jedoch offenbar nicht auf, da sich die Umorientierungsdynamik der Trp-Seitenketten des Lysozyms durch Adsorption auf einer Quarzoberfläche nur wenig ändert [Czeslik2003]. Die Idee [Norde1992], [Arai1990], dass thermodynamisch weniger stabile Proteinmoleküle eine höhere Affinität zu Grenzflächen besitzen als stabilere Proteinmoleküle, wird durch die hier erhaltenen Ergebnisse sehr stark unterstützt, da eine Erhöhung der Temperatur eine Erniedrigung der Entfaltungs-Gibbs-Energie eines Proteins zur Folge hat.

Lysozymmoleküle, die auf einer Oberfläche adsorbieren, welche bereits mit Proteinmolekülen bedeckt ist, können vor ihrer Adsorption aufgrund der hohen Proteinkonzentration innerhalb des Adsorbates, wie kürzlich von Ball und Ramsden [Ball2000] diskutiert, aggregieren. Somit spiegelt die Thermodynamik des Adsorptionsprozesses des Lysozyms auf einer Silizium/Wasser-Grenzfläche sowohl Protein-Oberflächen- als auch Protein-Protein-Wechselwirkungen wider.

Eine konformelle Modifikation des Proteins kann jedoch nicht die größte entropische Triebkraft für die starke Lysozymadsorption bei 74 °C (Abbildung 41) sein, da bei dieser Temperatur das gelöste Lysozym nahezu entfaltet vorliegt. Wenn das Protein in seinem denaturierten Zustand vorliegt, sind seine unpolaren Aminosäurereste dem Wasser ausgesetzt. Diese Reste werden durch Adsorption auf der Siliziumoberfläche oder durch Adsorption auf einem bereits adsorbierten Protein dem Wasser wieder entzogen. Diese hydrophobe Dehydratisierung führt zu einem Anstieg der Entropie durch eine ansteigende Reorientierungsmobilität der Wassermoleküle.

Bei dazwischenliegenden Temperaturen von 55-74 °C (Abbildung 41) dürften sowohl eine partielle Entfaltung nativer Lysozymmoleküle, als auch die hydrophobe Dehydratisierung entfalteter Lysozymmoleküle eine Rolle für den Adsorptionsprozess spielen. Wie in den FTIR-Studien von van Stokkum et al. berichtet [Van Stokkum], erfolgt ein erhöhter H-D-Austausch in gelöstem Lysozym bei Temperaturen, die 46 °C überschreiten, was einer kollabierten bzw. stark flexiblen Tertiärstruktur des Proteins zuzuschreiben wäre. Diese flexible Struktur vermag die konformellen Umordnungen des adsorbierenden Lysozyms vorantreiben.

Desweiteren, wie in kürzlich durchgeführten Fluoreszenzstudien [Czeslik2001] gefunden wurde, sinkt die Entfaltungstemperatur des Lysozyms drastisch ab, wenn das Lysozym auf Silizium-Partikeln adsorbiert. Ähnliche Beobachtungen wurden von Jones et al. gemacht [Ball1995], [Green1999], [Jones], die die thermische Entfaltung und die Aggregation des Lysozyms und des BSA, adsorbiert an unterschiedlichen Oberflächen, mit Hilfe der *attenuated total reflection* FTIR-Spektroskopie studierten.

Daher ist es wahrscheinlich, dass bei Temperaturen von 55 - 74 °C adsorptions-induzierte Änderungen der Konformation des Lysozyms gleichbedeutend mit einer nahezu vollständigen Entfaltung sind.

Dobson et al. [Wedin] analysierten den Austausch des Wasserstoffs am N-Atom in der Indolgruppe der Trp-Reste des Lysozyms mit Hilfe der NMR-Spektroskopie. In dieser Studie wurde gefunden, dass der für den H-D-Austausch bei Temperaturen über 60 °C durch eine Entfaltung des Lysozyms bestimmt wird. Man kann spekulieren, dass diese temporär entfalteten Lysozymmoleküle zum Teil durch hydrophobe Wechselwirkungen an der Silizium/Wasser-Grenzfläche adsorbieren.

Bei einem pH-Wert von 7 besitzt Lysozym eine positive Nettoladung, wohingegen die Siliziumoberfläche negativ geladen ist.

Die resultierenden attraktiven Coulomb-Wechselwirkungen zwischen dem Lysozymmolekül und der Siliziumoberfläche sollten, eigentlich zu einem exothermen Adsorptionsprozess führen. Da aber der Adsorptionsprozess endotherm verläuft, scheinen demnach die attraktiven Coulomb-Wechselwirkungen durch signifikante abstoßende Protein-Protein-Wechselwirkungen innerhalb des Adsorbates, welche wahrscheinlich elektrostatischen Ursprunges ist, überkompensiert werden.

Zusätzlich wird eine positive Enthalpieänderung erwartet, da adsorptionsinduzierte Konformationsmodifizierungen des Lysozyms mit dem Brechen von internen nichtkovalenten Proteinbindungen verbunden sind.

Haynes und Norde [Haynes] maßen die Enthalpie der Adsorption von Lysozym auf negativ geladenem Polystyrol mit der isothermen Titrations-Mikrokalorimetrie. Mit ansteigender Oberflächenbedeckung fanden sie eine ansteigende Adsorptionenthalpie in ihrer Studie in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit ermittelten isothermen Adsorptionenthalpien (s. Tabelle 9). Beobachtet wurde jedoch in den Kalorimetrie-Experimenten, dass der Adsorptionsprozess auch bei hoher Oberflächenbelegung exothermer Natur ist, was aber

vermutlich auf die unterschiedlichen Substrate, die verwendet wurden, und auf ein Fehlen isosterer experimenteller Bedingungen zurückgeführt werden kann.

Dagegen wurde für die Aggregation von BSA mit PAH bei pH-Werten, bei denen starke Bindung auftritt, gefunden, dass eine Freisetzung von Gegenionen zu einer entropiegetriebenen Wechselwirkung zwischen dem Protein und dem Polyelektrolyt führt.

Im Vergleich zu einem Polyelektrolyten wird die Silizium/Wasser-Grenzfläche aber durch eine kleinere Ladung charakterisiert, so dass eine Freisetzung der Gegenionen wohl keine signifikante Triebkraft ist.

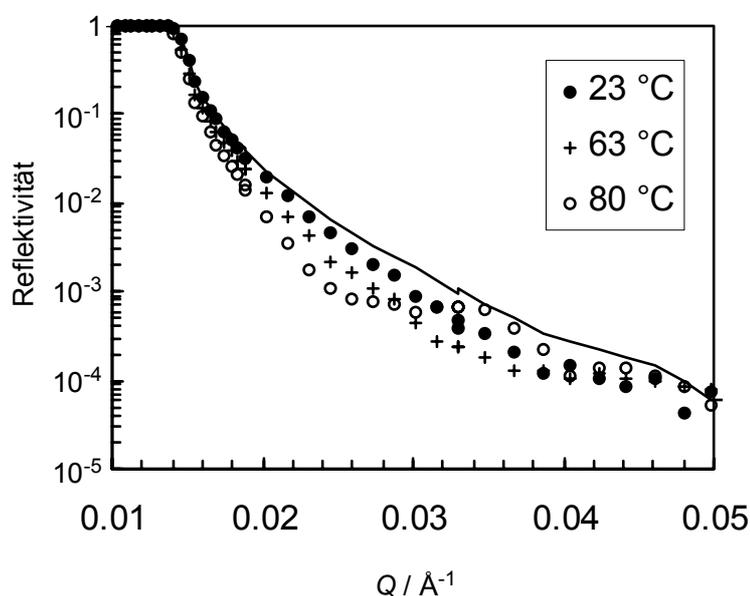


Abbildung 43: Neutronenreflektivitäten der Grenzfläche zwischen Silizium und einer Lysozymlösung gemessen bei 23, 63, 80 °C. Die Lysozymkonzentration betrug $0,09 \text{ mg mL}^{-1}$ mit D_2O als Lösungsmittel. Zum Vergleich zeigt die durchgezogene Linie die Reflektivitätskurve ohne Protein. Die Reflektivitäten sind hier nur für einen beschränkten Q -Bereich aufgezeigt, um den temperatur-induzierten Einfluss zu verdeutlichen.

Wie bereits erwähnt, wurde die Struktur des Lysozymadsorbates an einer Silizium/Wasser-Grenzfläche bei 23, 63 und 80 °C auch mit Hilfe der Neutronenreflektometrie charakterisiert.

Wie in Abbildung 43 zu sehen ist, führt die Formation des Lysozymadsorbates auf der oxidierten Siliziumoberfläche zu einer signifikanten Änderung der gemessenen Neutronenreflektivität.

Zudem werden systematische Änderungen beobachtet, wenn die Temperatur erhöht wird.

Bei jeder Temperatur wurden drei verschiedene Reflektivitätskurven gemessen, die bei verschiedenen $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ -Verhältnissen aufgenommen wurden (Abbildung 44).

Die Kurven sind auf Basis eines Zwei-Schichten-Modells Silizium/Siliziumoxid/Adsorbat/Lösung analysiert worden, wobei die berechneten Neutronenreflektivitätskurven an die experimentell ermittelten Reflektivitäten angefügt wurden.

Die Reflektivitäten wurden, wie schon in Kapitel 3.7 beschrieben, nach der optischen Matrix-Methode berechnet [Hansen].

In der Analyse betrug die Streulängendichte des Siliziumsubstrates $\rho_0 = 2,07 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$, und die der Lösung wurde auf den Wert $\rho_3 = 6,37 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ (100 Vol.-% D₂O), $5,0 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ (80,1 Vol.-% D₂O) oder $4,0 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ (65,7 Vol.-% D₂O) bei 23 °C eingestellt.

Die Streulängendichte der als porös angenommen Siliziumoxidschicht ist berechnet worden nach:

$$\rho_1 = \rho(\text{SiO}_x) \phi(\text{SiO}_x) + \rho_3 [1 - \phi(\text{SiO}_x)] \quad (39)$$

mit der Streulängendichte $\rho(\text{SiO}_x)$ und dem Volumenbruch $\phi(\text{SiO}_x)$ des oxidierten Siliziums. Die Streulängendichte des Adsorbates wurde nach folgendem Modell berechnet:

$$\rho_2 = \rho(\text{Lysozym}) \phi(\text{Lysozym}) + \rho_3 [1 - \phi(\text{Lysozym})] \quad (40)$$

mit der Streulängendichte $\rho(\text{Lysozym})$ und dem Volumenbruch $\phi(\text{Lysozym})$ des Lysozyms in dem Adsorbat. $\rho(\text{Lysozym})$ wurde zu $3,60 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ (100 Vol.-% D₂O), $3,28 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ (80,1 Vol.-% D₂O) oder $3,05 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ (65,7 Vol.-% D₂O) bei 23 °C angesetzt.

Diese Werte wurden unter der Annahme eines vollständigen Austausches acider Wasserstoffatome des Proteinmoleküls durch die Wasserstoffatome des Wassers (H oder D) berechnet. Diese Annahme ist sinnvoll, da sie mit FTIR-Spektren von in D₂O gelöstem Lysozym konsistent ist.

Für jede Temperatur wurde eine globale Anpassungsprozedur der drei gemessenen Neutronen-Reflektivitätskurven durchgeführt. Das heißt, dass drei Reflektivitätskurven simultan durch Variation von acht Parametern angepasst wurden: $\rho(\text{SiO}_x)$, $\phi(\text{SiO}_x)$, $\phi(\text{Lysozym})$, die Oxidschichtdicke d_1 , die Adsorbatschichtdicke d_2 , sowie die drei Grenzflächenrauigkeiten σ_{01} , σ_{12} und σ_{23} .

Dieser Anpassungsprozedur folgend, erhält man innerhalb der physikalischen Grenzen eindeutige Strukturprofile für 23, 63 und 80 °C.

Temperaturgemittelte Werte von $\rho(\text{SiO}_x) = (3,71 \pm 0,09) \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$, $\phi(\text{SiO}_x) = 0,70 \pm 0,08$, $d_1 = (55 \pm 3) \text{ \AA}$ und $\sigma_{01} = (10 \pm 1) \text{ \AA}$ wurden erhalten, die dann als feste Parameter in einer zweiten globalen Anpassungsprozedur verwendet wurden. In dieser gab es nur noch vier globale Fit-Parameter ($\phi(\text{Lysozym})$, d_2 , σ_{12} , σ_{23}) für drei Reflektivitätskurven. Die endgültigen Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefasst und die korrespondierenden berechneten Neutronen-Reflektivitäten sind in Abbildung 44 als durchgezogene Kurven gezeigt.

Tabelle 10: Struktur eines Lysozymadsorbates an einer Si/Wasser-Grenzfläche, wie sie mit der Neutronenreflektometrie erhalten wurde. d_2 ist die Schichtdicke des Adsorbates, $\phi(\text{Lysozym})$ ist der Volumenbruch des Lysozyms in dem Adsorbat, σ_{12} ist die Oxidschicht/Adsorbat-Grenzflächenrauigkeit, σ_{23} ist die Rauigkeit der Adsorbat/ Lösungs-Grenzfläche, und Γ ist die adsorbierte Masse an Lysozym pro Oberfläche.

	Temperatur / °C			
	23 ^b	63 ^b	80 ^b	80 ^a
$d_2 / \text{\AA}$	38	53	86	94
$\phi(\text{Lysozym})$	0,33	0,41	0,45	0,41
$\sigma_{12} / \text{\AA}$	10	3	3	3
$\sigma_{23} / \text{\AA}$	12	15	44	15
$\Gamma / \text{mg m}^{-2}$	1,8	3,1	5,5	5,5

^a Daten aus Neutronenreflektivitäten im Q -Bereich $Q = 0 - 0,03 \text{ \AA}^{-1}$.

^b Daten aus Neutronenreflektivitäten im Q -Bereich $Q = 0 - 0,12 \text{ \AA}^{-1}$.

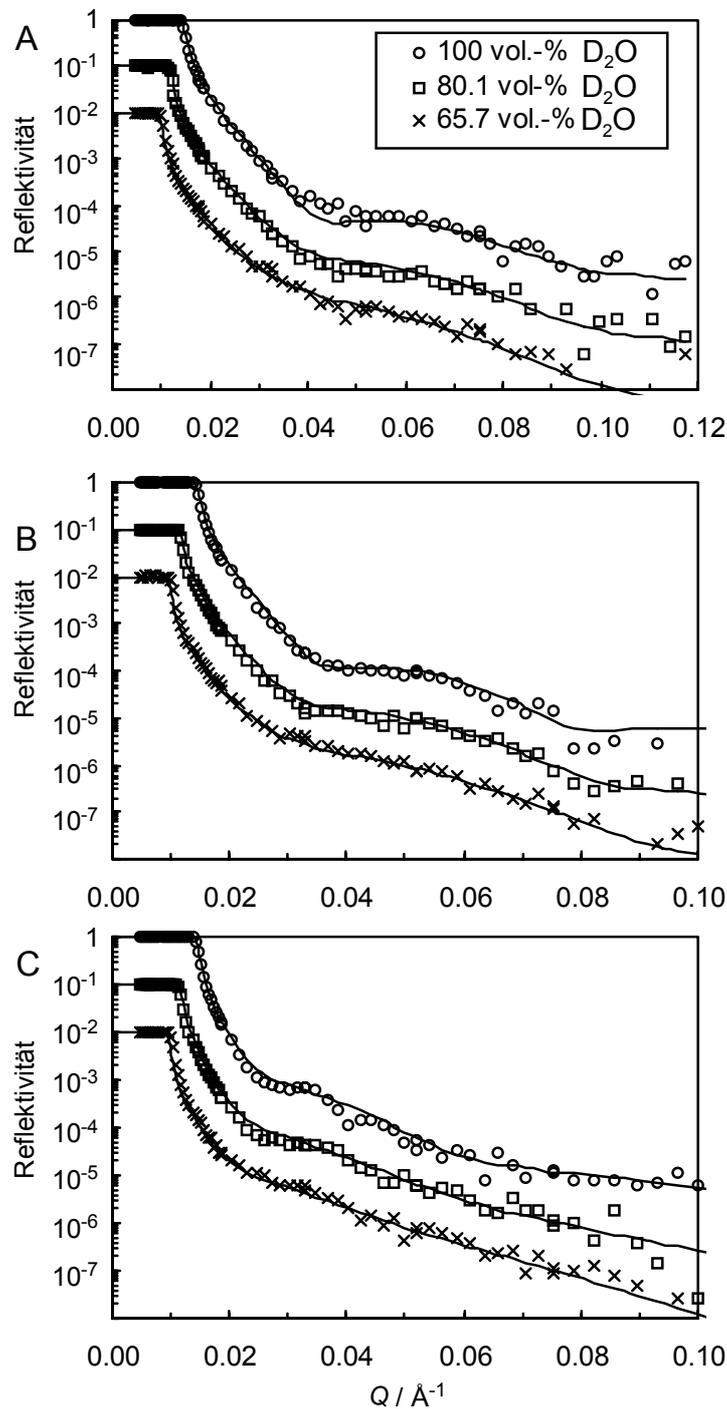


Abbildung 44: Neutronenreflektivitätskurven der Grenzfläche zwischen Silizium und einer Lysozymbilung gemessen bei 23 °C (A), 63 °C (B), und 80 °C (C). Die Lysozymbilungskonzentration betrug $0,09 \text{ mg mL}^{-1}$ und das $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ -Verhältnis der Lösung wurde variiert, wie in der Legende aufgeführt. Die Auftragungen wurden entlang der Reflektivitätsachse zur besseren Übersicht um die Faktoren 0,1 für 80,1 Vol.-% D_2O und 0,01 für 65,7 Vol.-% D_2O verschoben. Die durchgezogenen Linien stellen die besten Fits für ein angenommenes Vier-Schichten-Modell Silizium/Siliziumdioxid/Adsorbat/Lösung dar.

Wie aus Tabelle 10 ersichtlich, besitzt das Lysozymadsorbat, welches sich auf der Siliziumoberfläche in Kontakt mit der Lysozymlösung bei einer Konzentration von $0,09 \text{ mg mL}^{-1}$ gebildet hat, eine Schichtdicke von $d_2 = 38 \text{ \AA}$ bei $23 \text{ }^\circ\text{C}$. Ein etwas kleinerer Wert von 30 \AA wurde in den Neutronenreflektivitätsstudien von Lu et al. gefunden [Su1998/3], [Green2001], [Su1998/2], wobei angeführt werden muß, dass eine geringere Lösungskonzentration von $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$ verwendet wurde.

Bei einer Lysozym-Molekülgröße von $30 \times 30 \times 45 \text{ \AA}^3$ [Creighton], liegt die Annahme nahe, dass viele der auf der Silizium/Wasser-Grenzfläche adsorbierten Lysozymmoleküle eine Orientierung aufweisen, bei der die lange Molekülachse parallel zur Grenzfläche liegt (Abbildung 45 A).

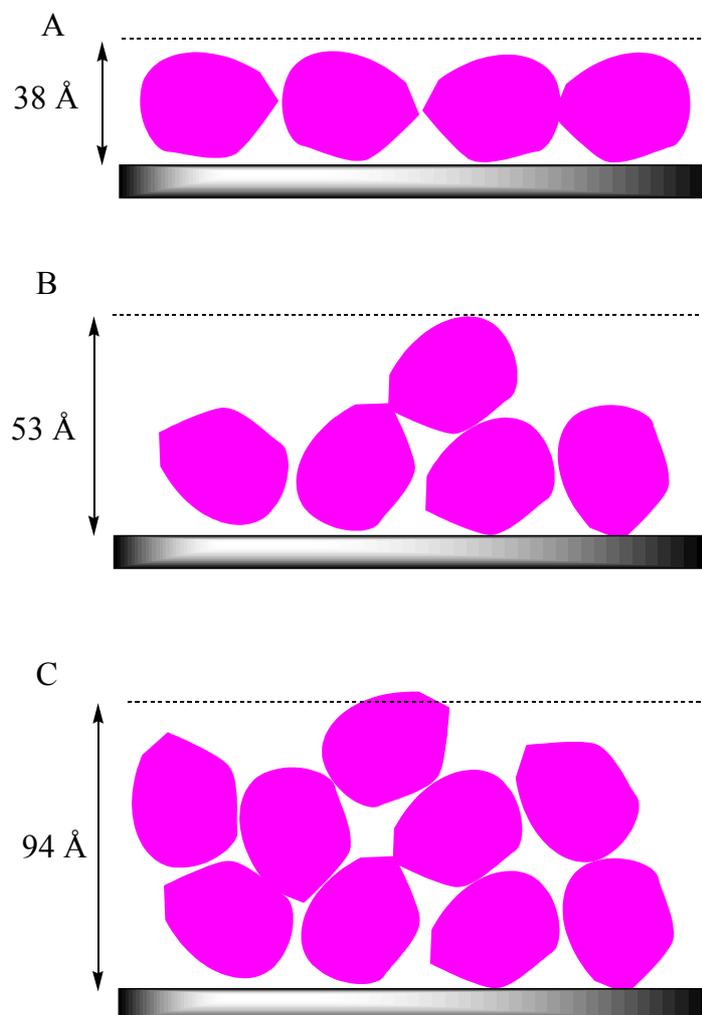


Abbildung 45: Schematische Zeichnung der vorgeschlagenen Struktur eines Lysozymadsorbates bei $23 \text{ }^\circ\text{C}$ (A), $63 \text{ }^\circ\text{C}$ (B) und $80 \text{ }^\circ\text{C}$ (C).

Der Volumenbruch des Lysozyms innerhalb eines Lysozym-Adsorbates an einer Si/Wasser-Grenzfläche wurde zu $\phi(\text{Lysozym}) = 0,33$ bei einer Temperatur von 23 °C (Tabelle 10) gefunden. Dieser Wert zeigt an, dass das Adsorbat einen beträchtlichen Anteil an Wasser beinhaltet, welches die Hohlräume füllt und das nahezu gefaltete Lysozymmolekül hydratisiert.

Aus d_2 und $\phi(\text{Lysozym})$ kann nun die adsorbierte Masse des Lysozyms pro Oberflächeneinheit berechnet werden, mit

$$\Gamma = d_2 \phi(\text{Lysozym}) \frac{m}{V} \quad (41)$$

mit der Masse m und dem Volumen V des Lysozymmoleküls. Für $m = 2,38 \times 10^{-17}$ mg und $V = 16700 \text{ \AA}^3$ [Creighton] wurde ein Oberflächenbedeckung von $\Gamma = 1,8 \text{ mg m}^{-2}$ für 23 °C erhalten, was in guter Übereinstimmung mit den Daten der optischen Reflektometrie steht (Abbildung 41).

Zum Vergleich: Wenn eine Oberfläche mit elliptisch geformten Molekülen mit Durchmessern von 30 und 45 Å in einer verzerrt hexagonalen Anordnung dicht belegt ist, sind 8,6 Moleküle pro 100 \AA^2 zu finden, was einer Bedeckung von $2,0 \text{ mg m}^{-2}$ entspricht.

Wenn die Temperatur von 23 auf 63 °C angehoben wird, zeigen die neutronenreflektometrischen Daten (Tabelle 10) einen Anstieg der adsorbierten Masse an Lysozym von 1,8 auf $3,1 \text{ mg m}^{-2}$.

Man kann berechnen, dass eine Oberflächenbedeckung von $3,0 \text{ mg m}^{-2}$ an Lysozym mit einer dichtgepackten hexagonalen Anordnung von nativen Lysozymmolekülen, die senkrecht zur Oberfläche ausgerichtet sind, übereinstimmt.

Wenngleich etwas höhere Mengen an adsorbiertem Lysozym bei den optisch-reflektometrischen Messungen beobachtet wurden (Abbildung 41), wird der Effekt der Temperatur auf den Grad der Adsorption des Lysozyms an einer Silizium/Wasser-Grenzfläche durch die neutronenreflektometrischen Studien bestätigt.

Auf Basis der in Tabelle 10 aufgeführten Daten kann der temperaturinduzierte Anstieg der Lysozymadsorption zum einen durch einen Anstieg der Schichtdicke des Adsorbates und zum anderen durch einen Anstieg des Volumenbruches des Lysozyms in dem Adsorbat erklärt werden.

Eine Schichtdicke von 53 Å bei 63 °C stimmt größtenteils mit der Formation einer Lysozimschicht überein, in der die lange Achse der Lysozymmoleküle senkrecht zur Silizium/Wasser-Grenzfläche ausgerichtet ist.

Es muss jedoch beachtet werden, dass bei 63 °C eine große adsorptionsinduzierte Konformationsumformung der Lysozymmoleküle, vielleicht sogar eine vollständige Entfaltung, an einer Si/Wasser-Grenzfläche stattfindet. Verglichen mit den Daten, die bei einer Temperatur von 23 °C erhalten wurden, ist bei 63 °C der Volumenbruch des Lysozyms in dem Adsorbat auf 0,41 angestiegen, wohingegen die Rauigkeit der Siliziumoxid/Adsorbat-Grenzfläche auf den Wert 3 Å abgenommen hat (Tabelle 10).

Dies zeigt, dass die Packung der Lysozymmoleküle sehr dicht wird und die Kontaktfläche zwischen den Molekülen und der Siliziumoberfläche ansteigt, wie es schematisch in Abbildung 45 wiedergegeben wird.

Die Qualität der Fits der Neutronendaten hängt allerdings nicht stark von den Rauigkeiten des Lysozymadsorbates ab, was sich in einem Fehler von einigen Ångström für diese Parameter widerspiegelt.

Adsorbiert Lysozym an einer Silizium/Wasser-Grenzfläche bei einer Temperatur von 80 °C, wird mit Hilfe der neutronenreflektometrischen Experimente eine Oberflächenbedeckung von 5,5 mg m⁻² gefunden (Tabelle 10).

Im Hinblick auf die verschiedenen angewandten Methoden steht ein Wert von ungefähr 7 mg m⁻², wie er in den oben beschriebenen optisch-reflektometrischen Experimenten gefunden wurde, in guter Übereinstimmung mit dieser Oberflächenbedeckung. Eine adsorbierte Lysozymmenge von 5,5 mg m⁻² entspricht einer Anzahl von 23 Molekülen auf einem Oberflächen-Bereich von 100 x 100 Å². Erklärt werden kann dies nur mit einer Multischicht-Struktur. Eine Multischichtadsorption wird auch durch die große Dicke des Adsorbates von 86 Å angezeigt (Tabelle 10).

Bei 80 °C stimmen die angepassten Neutronenreflektivitätskurven in dem Q -Bereich von ungefähr 0,03 - 0,05 Å⁻¹ nicht ganz mit den experimentell aufgenommenen Daten überein (Abbildung 44 C). Dieser Bereich wurde schätzungsweise 1-3 h nach dem Start des Experimentes aufgenommen. Wie in Studien von Remmele et al. gefunden wurde [Remmele], ist ein Aufheizen gelösten Lysozyms von mehr als 1 h bei 76 °C nötig, um einen irreversiblen Verlust der Enzymaktivität und eine irreversible Konformationsänderung einhergehend mit dem Bruch der S-S-Bindungen im Lysozymmolekül herbeizuführen.

Daher zeigen wahrscheinlich die bei 80 °C aufgenommenen Neutronenreflektivitäten für $Q > 0,03 \text{ \AA}^{-1}$ (Abbildung 44 C) ein Adsorbat aus teilweise thermisch zerfallenen Lysozymmolekülen an.

Eine weitere globale Analyse wurde durchgeführt, nur dieses Mal wurde die Analyse auf einen Q -Bereich von 0 - $0,033 \text{ \AA}^{-1}$ beschränkt, was einer Aufnahmezeit von unter 1 h entspricht.

Die Anpassungsergebnisse, die in Tabelle 10 aufgeführt sind und in Abbildung 46 zu sehen sind, zeigen, dass bei dem Erhitzen von 63 auf 80 °C nur ein Anstieg der Schichtdicke des Adsorbates zu sehen ist, wobei der Volumenbruch des Lysozyms innerhalb des Adsorbates und die Grenzflächenrauigkeit im Wesentlichen unverändert bleiben (Abbildung 45 C).

Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Struktur der Lysozymmoleküle, die bei 63 °C auf der Silizium/Wasser-Grenzfläche adsorbiert sind, eher denen bei 80 °C entsprechen, als denen bei 23 °C. Da Lysozym bei 80 °C thermisch entfaltet ist, müssen sich bei 63 °C die adsorbierten Lysozymmoleküle einer großen Konformationsänderungen unterwerfen.

Der Vollständigkeit halber wurde auch eine Analyse der bei 80 °C in einem Q -Bereich von 0,033 bis $0,052 \text{ \AA}^{-1}$ aufgenommenen Neutronenreflektivitätsdaten durchgeführt.

Hierbei konnte kein sinnvoller globaler Fit für alle drei Neutronenreflektivitätskurven, die durch Kontrastvariation erhalten wurden, gefunden werden. Zurückzuführen dürfte dies darauf sein, dass die Daten dieses Q -Bereiches die fortlaufende Adsorption des teilweise thermisch zerfallenen Lysozyms widerspiegeln. Aus diesem Grund wurde nur die Reflektivitätskurve zur Analyse herangezogen, die mit reinem D_2O gemessen wurde.

Der beste erhaltene Fit ist in Abbildung 46 gezeigt, der einer Adsorbatschichtdicke von 526 \AA , einem Lysozym-Volumenbruch in dem Adsorbat von 0,37, einer Adsorbat/Lösungs-Rauigkeit von 41 \AA sowie einer Oberflächenbedeckung von 28 mg m^{-2} entspricht.

Diese Ergebnisse belegen das thermisch induzierte Ausfällen der Lysozymlösung unter Bildung einer dicken Oberflächenschicht aus entfalteteten, zerfallenen und aggregierten Lysozymmolekülen.

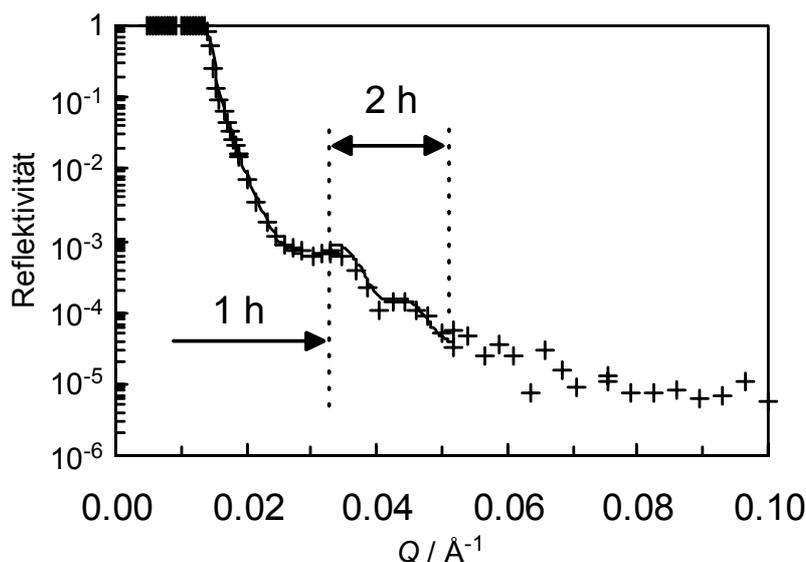


Abbildung 46: Auf Grund des thermischen Zerfalls des Lysozyms, welcher nach ca. 1 Stunde bei einer Temperatur von 80 °C eintritt, wurden die Neutronenreflektivitäten, die bei 80 °C mit reinem D₂O als Lösungsmittel gemessen wurden, separat in dem Q -Bereich von 0 – 0,033 Å⁻¹ angefitet. Der Q -Bereich von 0 – 0,033 Å⁻¹ ist innerhalb der ersten Stunde, der Q -Bereich von 0,033 – 0,052 Å⁻¹ in den darauffolgenden 2 Stunden aufgenommen worden.

Zusammenfassend kann in dieser Studie festgestellt werden, dass bei einer Temperaturerhöhung von 20 auf 80 °C, der Grad der Lysozymadsorption auf einer Siliziumoberfläche stark ansteigt, was durch optisch-reflektometrische und neutronen-reflektometrische Messungen nachgewiesen werden konnte.

Diese Beobachtung zeigt einen endothermen und daher entropiegetriebenen Adsorptionsprozess. Der Anstieg an Entropie ist wahrscheinlich auf konformelle Modifikationen des Proteinmoleküls bei niedrigen Temperaturen und auf die Dehydratation von hydrophoben Proteinresten bei hohen Temperaturen zurückzuführen.

Eine Temperaturerhöhung hat zur Folge, dass die native Lysozymstruktur destabilisiert wird und adsorptions-induzierte Konformationsänderungen bevorzugt werden.

Aus Neutronenreflektivitätsmessungen konnte entnommen werden, dass der Anstieg der Lysozymadsorption beim Aufheizen von 23 auf 63 °C durch einen Anstieg sowohl der Adsorbatschichtdicke als auch des Volumenbruches in dem Adsorbat hervorgerufen wird. Aus einem weiteren Aufheizen auf 80 °C resultiert lediglich ein weiteres Anwachsen der Schichtdicke des Lysozymadsorbates, was zu einer Multischicht-Struktur führt.

Obwohl gelöstes Lysozym bei einer Temperatur von 70-78 °C (pH=7) entfaltet, erscheint die Struktur der adsorbierten Lysozymmoleküle bei 63 °C eher der bei 80 °C ähnlich als der bei

23 °C. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen überein, die in einer kürzlich durchgeführten Fluoreszenz-Spektroskopie-Studie gefunden wurden.

5.2 Adsorption von Staphylokokken-Nuclease (SNase) an einer Silizium/Wasser-Grenzfläche

Zusätzlich zu den Untersuchungen der Adsorption des stabilen Proteins Hühnereiweiß-Lysozym auf oxidiertem Silizium wurde unter den gleichen Versuchsbedingungen und bei ähnlichen Konzentrationen auch der Grad der Adsorption eines weniger stabilen Proteins, der SNase, an einer Silizium/Wasser-Grenzfläche als Funktion der Temperatur T bei $\text{pH} = 7$ mit Hilfe der optischen Reflektometrie charakterisiert. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen ist die SNase (isoelektrischer Punkt bei $\text{pH}=9,5$) genau wie Lysozym positiv geladen. Die Adsorption des Proteins aus der Lösung auf die Si-Oberfläche erfolgt somit unter attraktiven Coulomb-Wechselwirkungen.

Ähnlich wie beim Lysozym zeigen auch die Adsorptionsisothermen der SNase in einem Temperaturbereich von 20 bis 40 °C, in dem SNase in Lösung gefaltet vorliegt, Plateauwerte (Abbildung 47), die in etwa einer Monoschicht an Proteinmolekülen auf der Siliziumdioxid-Oberfläche entsprechen. Ab 50 °C steigt die Masse an adsorbierter SNase parallel mit der Entfaltung der SNase in Lösung an.

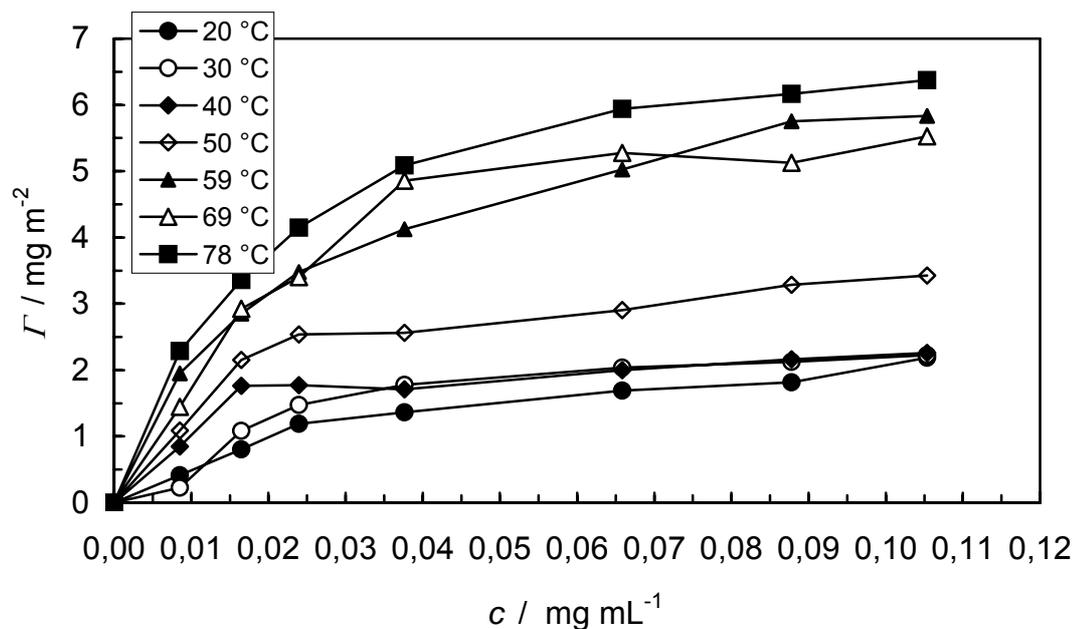


Abbildung 47: Auftragung des Bedeckungsgrades Γ des Proteins SNase auf einer Siliziumdioxid-Oberfläche gegen die Proteinkonzentration c in Lösung in Abhängigkeit der Temperatur bei $\text{pH}=7$.

In Abbildung 48 ist die adsorbierte Masse Γ an SNase pro Oberfläche gegen die Temperatur T bei pH=7 aufgetragen (die Daten wurden entlang der Temperaturachse durch gleitende Mittelung geglättet). Bei einer Temperatur von 25 °C und einer Lösungskonzentration von 0,088 mg mL⁻¹ wird ein Wert von 2 mg m⁻² gefunden.

Dieser Wert entspricht annähernd dem Wert, der schon zuvor für das unter ähnlichen Bedingungen untersuchte Lysozym gemessen werden konnte.

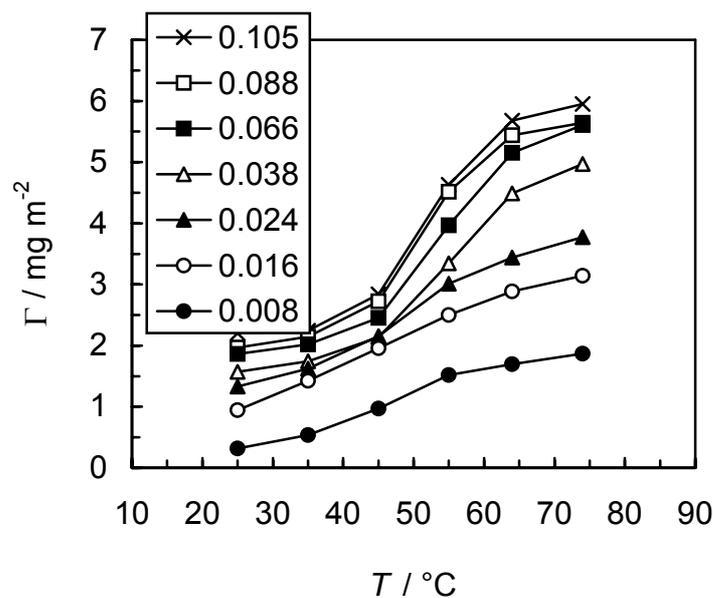


Abbildung 48: Adsorbierte Masse Γ der SNase pro Oberfläche als Funktion der Temperatur T bei pH=7. Die Daten wurden mit der Methode der optischen Reflektometrie bei verschiedenen Lösungskonzentrationen (in mg mL⁻¹), die in der Legende aufgeführt sind, gemessen.

Mit ansteigender Temperatur ist ein Anstieg der SNase-Adsorbatmasse über den gesamten Temperaturbereich und bei allen Lösungskonzentrationen zu beobachten. Desweiteren ist zu sehen, dass der Grad der Adsorption mit ansteigender Proteinkonzentration steigt (Abbildung 48).

Gemäß dem Prinzip von Le Chatelier zeigt dieses Ergebnis, wie bei den Untersuchungen des Lysozyms schon zuvor beobachtet, recht deutlich, dass die Adsorption der SNase an einer Silizium/Wasser-Grenzfläche ein endothermer Prozess ist. Daher muß der Vorgang der Adsorption auch hier durch einen Anstieg der Entropie gesteuert werden.

Die temperaturinduzierte Zunahme des Adsorptionsgrades von SNase auf SiO₂ unterhalb der Entfaltungstemperatur von 54 °C in Lösung zeigt [Privalov1994], dass die Adsorptionstendenz zunimmt, wenn die Stabilität der gefalteten SNase abnimmt (Abbildung 48).

Wie schon beim Lysozym zuvor beobachtet, führt auch bei der SNase die Destabilisierung des gefalteten Zustandes bei Temperaturerhöhung zu einem gesteigerten Adsorptionsgrad (Abbildung 48). Wahrscheinlich können die instabileren Proteinmoleküle durch Konformationsänderungen eine größere Zahl von Bindung zu der Oberfläche ausbilden.

Wie aus Abbildung 47 ersichtlich, erreichen die Adsorptionsisothermen bei Temperaturen zwischen 59 und 78 °C keine Plateauwerte, sondern weisen einen steten Anstieg der Adsorbatmenge auf. Zurückzuführen ist dies, wie es beim Lysozym mit Hilfe der Neutronenreflektometrie gemessen werden konnte, auf eine Mehrschichtenbildung in dem Adsorbat der SNase auf einer Siliziumdioxid-Oberfläche. Bei geringeren Temperaturen von 20-40 °C, also unterhalb der Denaturierungstemperatur von 54 °C, sind die in Lösung nativ vorliegenden SNase-Moleküle auf der Siliziumoberfläche in einer Monoschicht adsorbiert.

Die dominante entropische Triebkraft der Adsorption wird wahrscheinlich auch hier eine Konformationsmodifikation der SNase sein, die eine Optimierung der hydrophoben Wechselwirkungen ermöglicht.

In diesem Temperaturbereich ist der Effekt der Temperatur auf den Grad der Adsorption bei kleinen SNase-Konzentrationen besonders ausgeprägt. Unter diesen Bedingungen ist die Siliziumoberfläche nicht vollständig von SNase bedeckt, so dass adsorbierte SNase-Molekülen durch Spreiten auf der Oberfläche ihre Kontaktfläche erhöhen können.

Die Idee, dass thermodynamisch wenig stabile Proteinmoleküle eine höhere Affinität zu Grenzflächen besitzen als stabilere Moleküle, wird, wie schon bei Lysozym beobachtet, durch diese Ergebnisse belegt, da mit zunehmender Temperatur die Entfaltungs-Gibbs-Energie der SNase sinkt.

Liegt die SNase bei hohen Temperaturen in Lösung bereits im entfalteten Zustand vor, führen hydrophobe Wechselwirkungen direkt zu einem hohen Adsorptionsgrad der SNase an einer Silizium/Wasser-Grenzfläche.

Wie für das Lysozym, können auch für die SNase bei konstantem Bedeckungsgrad der Siliziumdioxid-Oberfläche ($\Gamma = \text{konst.}$) unter der Annahme eines Gleichgewichts zwischen adsorbiertem und gelöstem Protein die isostere Adsorptionenthalpie ΔH_{Γ} und die isostere Adsorptionentropie ΔS_{Γ}^0 mit Hilfe der Gleichung (38 b) und einer graphischen Auftragung (Abbildung 49) ermittelt werden. Für den Temperaturbereich von 25–55 °C, einem pH-Wert von 7 und Bedeckungsgraden von 1,0, 1,8 und 2,0 mg m⁻² wurden die in Tabelle 11 aufgeführten Werte erhalten.

Tabelle 11: Isostere Adsorptionenthalpie und Adsorptionentropie des Proteins SNase auf einer Siliziumdioxid-Oberfläche in einem Temperaturbereich von 25-55 °C bei pH=7.

$\Gamma / \text{mg m}^{-2}$	$\Delta H_{\Gamma} / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S_{\Gamma}^0 / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
1,0	38	158
1,8	49	191
2,0	54	200

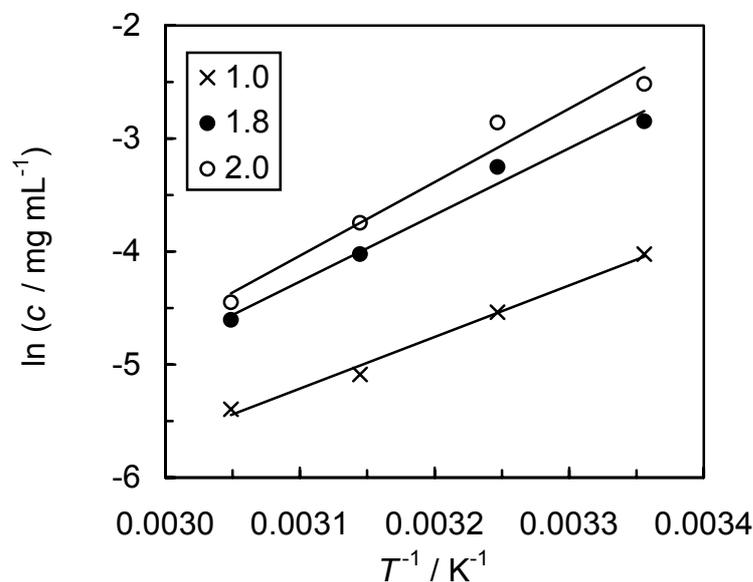


Abbildung 49: Graphische Analyse isosterer Adsorptionsdaten der SNase in Abhängigkeit der Temperatur. Der Belegungsgrad ist in der Legende in der Einheit mg m^{-2} angegeben.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass genau wie bei dem zuvor untersuchtem Lysozym auch SNase eine positive Enthalpieänderung bei der Adsorption aus einer Proteinlösung auf eine oxidierte Siliziumoberfläche aufweist. Die Coulomb-Wechselwirkung zwischen Substrat und den Proteinmolekülen ist jedoch attraktiv auf Grund ungleichnamiger Ladungen. Bei einem pH-Wert von 7 sind sowohl Lysozym (isoelektrischer Punkt bei $\text{pH} = 11,1$) als auch SNase (isoelektrischer Punkt bei $\text{pH} = 9,5$) positiv geladen; demgegenüber trägt das Siliziumdioxid eine negative Oberflächenladung.

Innerhalb des Adsorbats gibt es aber repulsive Coulomb-Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Proteinmolekülen. Zudem werden bei adsorptionsinduzierten Konformations-

änderungen der Proteine interne, nicht kovalente Bindungen aufgebrochen, so dass die jeweiligen Adsorptionsprozesse endotherm sind. Größere ΔH_T -Werte der SNase (Tabelle 11) bei stärkerer Oberflächenbelegung werden durch eine größere Zahl an repulsiven Protein-Protein-Wechselwirkungen verursacht.

Da die spontane Adsorption der SNase, wie auch bei Lysozym beobachtet, auf SiO_2 endotherm verläuft, müssen hierbei positive Entropieänderungen auftreten. Diese können im Wesentlichen auf eine Dehydratisierung hydrophober Substrat- und Proteinoberflächen zurückgeführt werden.

Zum anderen werden durch Protein-Substrat-Wechselwirkungen die Protein-Moleküle partiell entfaltet, so dass deren Konformationsentropie möglicherweise etwas zunimmt [Czeslik2001].

5.3 Konzentrationsprofil des Enzyms SNase auf einer Polyelektrolyt-Multischicht

5.3.1 Analyse der Neutronenreflektivitätsexperimente

Die Datenanalyse der Neutronenreflektivitätsexperimente erfolgte nach dem in Kapitel 3.7 beschriebenen Prinzip. Hierbei werden berechnete Kurven den experimentell aufgenommenen Neutronen-Reflektometrie Kurven durch Variation von Modell-Parametern angepaßt. Die Berechnung erfolgt auf Basis der optischen Matrix-Methode nach Abeles [Hansen], [Born].

Im verwendeten Strukturmodell wird jede einzelne Schicht durch deren Streulängendichte ρ und deren Schichtdicke d charakterisiert. Zudem wird die Grenzfläche zwischen zwei Schichten durch die Rauigkeit σ beschrieben. Fitparameter sind die Streulängendichte und die Schichtdicke jeder einzelnen Schicht, die Rauigkeit zwischen zwei Schichten, sowie die Streulängendichten der ersten und der letzten einseitig begrenzten Schicht. In unserem System sind diese Schichten der Silizium-Wafer und die Probenlösung.

Die Differenz zwischen einer gemessenen und einer berechneten Neutronenreflektivitätskurve wird wie folgt quantifiziert:

$$\chi^2 = \frac{1}{n} \sum_i \left(\frac{R_{i, \text{gem}} - R_{i, \text{ber}}}{R_{i, \text{gem}}} \right)^2 \quad (42)$$

mit der Zahl n der Datenpunkte und der gemessenen bzw. der berechneten Reflektivität $R_{i, \text{gem}}$ und $R_{i, \text{ber}}$ des Datenpunktes i .

Wie im Kapitel 3.7 beschrieben, wurde eine Kontrastvariation für jede Probe durchgeführt. Die so zu jeder Probe aufgenommenen Neutronenreflektivitätskurven wurden mit einem globalen Fit analysiert, wobei die gleichen Schichtdicken und die gleichen Grenzflächenrauigkeiten zur Berechnung der Neutronenreflektivitätskurven verwendet wurden.

Diese globale Analyse reduziert die Anzahl der Streulängendichteprofile, die mit den experimentellen Daten konsistent sind.

Die Streulängendichten des Silizium-Wafers und der Probenlösung wurden während des Anpassungsprozesses festgehalten und nicht variiert.

Die Werte wurden auf $2,07 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ für das Silizium, $6,37 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ für die D₂O-Lösung und $4,64 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ für die D₂O/H₂O-Lösung (HDO) festgelegt [NCNR].

An dieser Stelle muß noch bemerkt werden, dass die Streulängendichte jeder einzelnen zwischen Si und Lösung liegenden Schicht nicht direkt als Fitparameter verwendet, sondern in folgenden Ausdruck zerlegt wurde:

$$\rho_i = \rho_{\text{Pol}} \phi_{\text{Pol},i} + \rho_{\text{Pro}} \phi_{\text{Pro},i} + \rho_{\text{Lös}} (1 - \phi_{\text{Pol},i} - \phi_{\text{Pro},i}) \quad (43)$$

mit ρ_{Pol} , der Streulängendichte des reinen Polyelektrolyten (variabler Fitparameter), ρ_{Pro} , der des reinen Proteins (nicht variabler Parameter) und $\rho_{\text{Lös}}$, der der Probenlösung (nicht variabler Parameter). $\phi_{\text{Pol},i}$ und $\phi_{\text{Pro},i}$ sind die Volumenbrüche des Polyelektrolyten und des Proteins in der Schicht i (variable Parameter). Die Streulängendichte der SNase wurde aus ihrer Summenformel und ihrem Volumen berechnet. Werte von $3,15 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ (in D₂O bei 22 °C), $3,12 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ (in D₂O bei 42 °C), $2,80 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ (in HDO bei 22 °C), $2,77 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ (in HDO bei 42 °C) wurden bestimmt und in der Analyse verwendet.

Um die Polyelektrolyt-Multischichten in Kontakt mit der Pufferlösung ohne Protein zu beschreiben, wurde ein Zwei-Schichten-Modell gewählt (Abbildung 50 A). Hierbei repräsentiert die erste Schicht die Polyelektrolyt-Multischicht (Index 1), die in Kontakt mit dem Silizium-Wafer steht, wobei die zweite Schicht (Index 2) sich über die oberen 50 Å der Polyelektrolyt-Multischicht erstreckt. Die zweite Schicht wurde eingeführt, da im folgenden angenommen wird, dass Proteinmoleküle teilweise in diese Schicht eindringen können.

Wie noch gezeigt werden wird, besitzen die Polyelektrolytschichten in den durchgeführten Experimenten eine Gesamtdicke von etwa 310 Å. Bei 12 präparierten Schichten, also 6 Doppellagen, entspricht dies einer Einzelschichtdicke von 25,8 Å. Die Polyelektrolyt-Schichten überlappen teilweise. Die Breite des Konzentrationsprofils einer Schicht ergibt sich aus dem doppelten Wert der Einzelschicht zu 51,6 Å [Decher1997].

Man kann annehmen, dass SNase sehr stark unter elektrostatisch anziehenden Bedingungen mit der letzten, äußeren PSS-Schicht in Wechselwirkung tritt und in sie teilweise eindringt. Deshalb ist es von enormer Wichtigkeit, dass die Streulängendichte der oberen 50 Å der Polyelektrolyt-Multischicht in Abwesenheit des Proteins exakt ermittelt wird. Die Änderung dieser Streulängendichte durch die Anwesenheit des Proteins liefert dann den Volumenbruch

des Proteins innerhalb der Polyelektrolyt-Multischicht (Abbildung 50 B). In Anwesenheit des Proteins wird das oben beschriebene Strukturmodell noch um eine weitere Schicht erweitert, um dem Proteinadsorbat Rechnung zu tragen. Zusätzlich wurde getestet, ob das Protein nur in der oberen, 25 Å-dicken, Polyelektrolytschicht (Abbildung 50 C) vorzufinden ist.

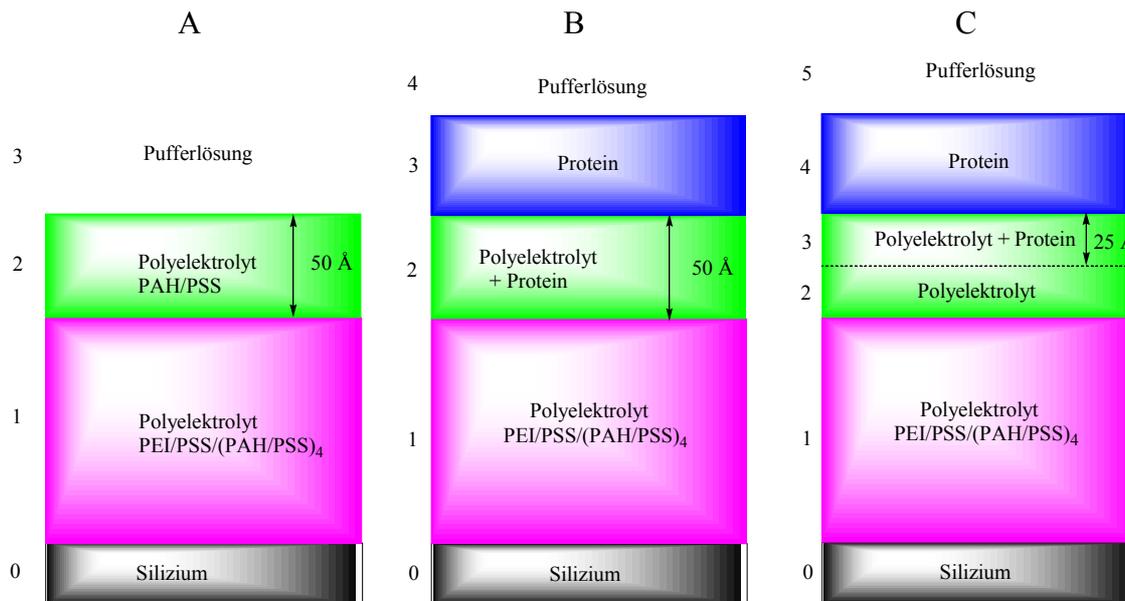


Abbildung 50: Schematische Darstellung des Modells der Grenzflächenstruktur, mit dem die gemessenen Neutronenreflektivitätskurven analysiert werden. A: Struktur in Abwesenheit des Proteins. Eine obere Polyelektrolytschicht von 50 Å Dicke wird angenommen, in die das Proteinmolekül nach der Adsorption eindringen kann. B: Struktur bei Anwesenheit des Proteins. Die Proteinmoleküle sind in der oberen Polyelektrolytschicht eingebettet und bilden eine zusätzliche Adsorbatschicht. C: Proteinmolekülen wird nur "erlaubt", in die obere, 25 Å-starke Polyelektrolytschicht einzudringen.

5.3.2 Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 51 sind Neutronenreflektivitätskurven aufgezeigt, die für eine Si-PEI-PSS-(PAH-PSS)₅-Pufferlösungs-Grenzfläche in Abwesenheit von SNase (pD= 7,5, 22 °C) erhalten wurden.

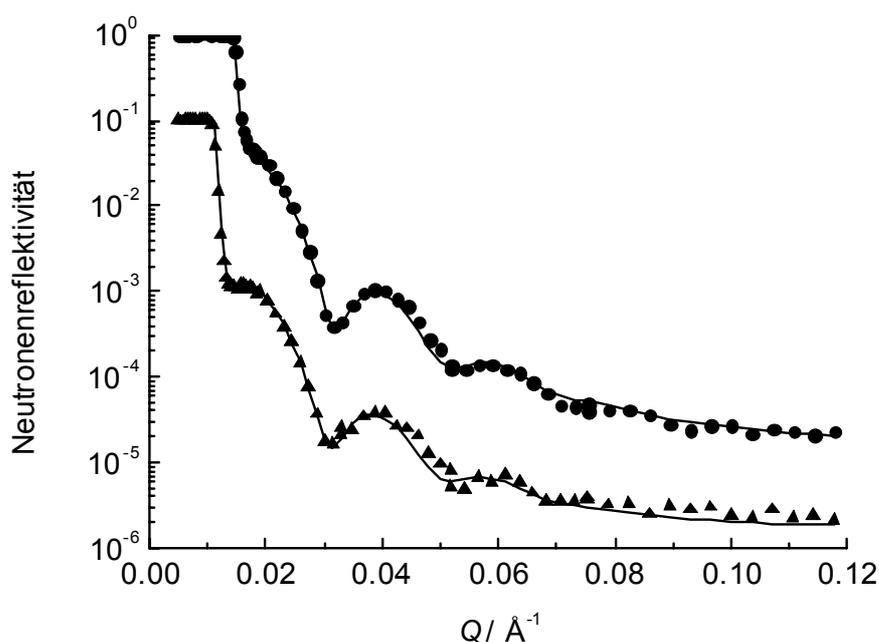


Abbildung 51: Neutronenreflektivitätskurven einer Polyelektrolyt-Multischicht an der Grenzfläche zwischen einem Silizium-Wafer und einer Pufferlösung ohne Protein (pD = 7,5, $T = 22$ °C). Die Symbole repräsentieren die experimentellen Daten mit D₂O als Lösungsmittel (gefüllte Kreise) und HDO als Lösungsmittel (Dreiecke, verschoben um den Faktor 0,1 auf der Reflektivitätsachse), wobei die durchgezogene Linien den globalen Fit beider Kurven zeigen.

Die beiden gemessenen Kurven, die mit D₂O und HDO als Lösungsmittel aufgenommen wurden, sind mit Hilfe eines globalen Fits entsprechend dem Strukturmodell, das in Abbildung 50 A gezeigt ist, analysiert worden.

Die sich hieraus ergebenden Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Die berechneten Neutronenreflektivitätskurven werden in Abbildung 51 als durchgezogene Linien gezeigt.

Die Tabelle 12 enthält zusätzlich die Daten einer zweiten Polyelektrolyt-Multischicht, die auf dieselbe Weise hergestellt, aber bei einem kleineren pD-Wert von 4,9 charakterisiert wurde.

Wie aus der Tabelle 12 ersichtlich, sind die Strukturen der beiden Polyelektrolyt-Multischichten beinahe identisch und werden offensichtlich nicht durch die pD-Werte beeinflusst.

Tabelle 12: Struktur einer Si-PEI-PSS-(PAH-PSS)₅-Pufferlösung-Grenzfläche.^a

pD	$d_1 / \text{Å}$	$d_2 / \text{Å}$	$\rho_{\text{Pol}} / \text{Å}^{-2}$	$\phi_{\text{Pol},1}$	$\phi_{\text{Pol},2}$
4,9	262	50	$2,26 \cdot 10^{-6}$	0,53	0,50
7,5	260	50	$2,32 \cdot 10^{-6}$	0,53	0,61

^a Für jeden pD-Wert wurde ein anderer Si-Wafer verwendet. Die Abbildung 50 A zeigt das angenommene Strukturmodell. d_2 wurde nicht variiert. ρ_{Pol} ist für D₂O als Lösungsmittel angegeben. Die Grenzflächenrauigkeiten betragen $\sigma_{01} = 31 \text{ Å}$, $\sigma_{12} = 5 \text{ Å}$, $\sigma_{23} = 3 \text{ Å}$.

Bei beiden pD-Werten liegt der Volumenbruch des Polyelektrolyten bei ca. 0,53. Die Streulängendichten wurden zu $2,3 \times 10^{-6} \text{ Å}^{-2}$ bestimmt, was in guter Übereinstimmung mit den Werten anderer Studien steht [Steitz], [Estrela-Lopis].

Der leicht erhöhte Volumenbruch $\phi_{\text{Pol},2}$ bei einem pD-Wert von 7,5 kann von einem leichten Austrocknen der äußeren Polyelektrolyt-Multischichtregion während des Herstellungsprozesses herrühren.

Angemerkt werden muß, dass die relativ große Rauigkeit σ_{01} verwendet wurde, um den Übergang vom Silizium-Wafer zur ersten PSS-Schicht zu modellieren und dabei die Siliziumdioxid-Schicht und die anfängliche PEI-Schicht mit einzubeziehen.

Abbildung 52 zeigt ausgewählte Neutronenreflektometrie Kurven der Si-PEI-PSS-(PAH-PSS)₅-Pufferlösung-Grenzfläche vor und nach der Zugabe von 0,05 mg/mL SNase (D₂O als Lösungsmittel, pD= 4,9). Entsprechende Daten wurden bei einem pD-Wert von 7,5 erhalten.

Aus den Daten in Abbildung 52 A ist ersichtlich, dass SNase an der Polyelektrolyt-Multischicht gebunden wird. Zu erkennen ist dies an der Oszillation im Bereich von $Q = 0,03 - 0,05 \text{ Å}^{-1}$, die sich zu kleineren Q -Werten verschiebt, wenn SNase zur Pufferlösung bei 22 °C hinzugegeben wird.

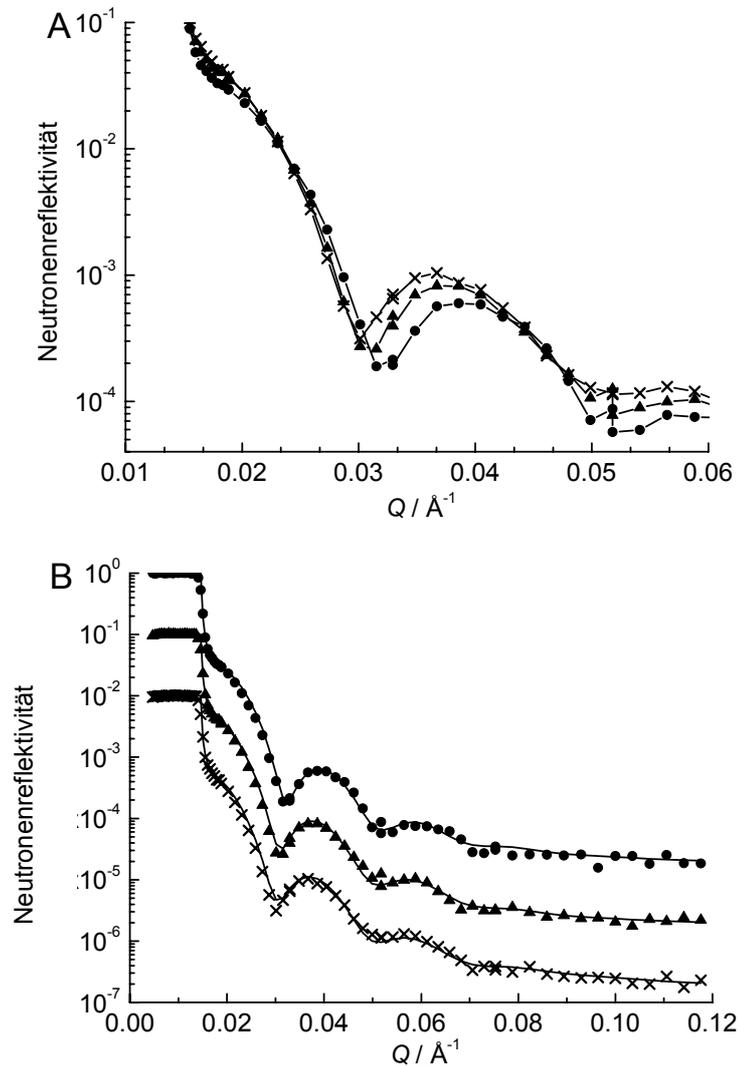


Abbildung 52: Neutronreflektivitätskurven einer Si-PEI-PSS-(PAH-PSS)₅-Lösung-Grenzfläche mit D₂O als Lösungsmittel bei pD= 4,9. In Diagramm A sind die gemessenen Reflektivitäten über einen begrenzten Q -Bereich gezeigt, um die Änderungen bei Bindung der SNase an die Polyelektrolyt-Multischicht bei verschiedenen Temperaturen zu zeigen. Dargestellt werden die Werte für die Pufferlösung bei 22 °C (Kreise), die Pufferlösung mit einer SNase-Konzentration von 0,05 mg/mL bei 22 °C (Dreiecke) und die Pufferlösung mit einer SNase-Konzentration von 0,05 mg/mL bei 42 °C (Kreuze). In Diagramm B sind dieselben gemessenen Kurven zusammen mit den gefitteten Neutronenreflektivitätskurven (durchgezogene Linien) als Symbole gezeigt. Zur besseren Übersicht wurden die Daten auch hier entlang der Reflektivitätsachse verschoben.

Diese Verschiebung ist noch deutlicher zu sehen, wenn die Temperatur auf 42 °C erhöht wird, was auf einen temperaturinduzierten Anstieg der adsorbierten Menge an SNase schließen läßt. Im Allgemeinen weist eine Verschiebung der Oszillationen einer Neutronenreflektivitätskurve zu kleineren Q -Werten auf ein Anwachsen der Filmdicke zwischen zwei Medien hin. Dies ist eine Folge der abnehmenden Breite ΔQ der Oszillationen mit zunehmender Filmdicke d ($\Delta Q \approx 2\pi/d$). Hier bewirkt die Bildung eines Proteinadsorbates auf der Polyelektrolyt-Multischicht einen Anstieg der Schichtdicke.

Das Protein ist aber auch in der Lage, in die letzte PSS-Schicht der Polyelektrolyt-Multischichten einzudringen.

Die in Anwesenheit der SNase gemessenen Neutronenreflektivitätskurven wurden auf Basis der Strukturmodelle in den Abbildungen 50 B und 50 C analysiert.

Während des Anpassungsvorganges der in der Anwesenheit der SNase bei den pD-Werten von 4,9 und 7,5 gemessenen Neutronenreflektivitätskurven wurden die entsprechenden Strukturdaten der Polyelektrolyt-Multischichten (Tabelle 12) als feste Parameter herangezogen.

Die Dicke des Proteinadsorbates, der Volumenbruch des Proteins im Adsorbat, sowie der Volumenbruch des Proteins in der oberen, 50 bzw. 25 Å-dicken Schicht der Polyelektrolyt-Multischichten wurden als Fit-Parameter verwendet (Abbildung 50 B und 50 C).

Somit existieren nur noch drei freie Parameter beim globalen Fit der zwei Neutronenreflektivitätskurven, die bei zwei verschiedenen Kontrasten aufgenommenen wurden.

Interessanterweise wurde gefunden, dass der globale χ^2 -Wert gemäß der Gleichung (42) ein Minimum durchläuft, wenn der Volumenbruch des Proteins in der oberen Polyelektrolyt-Multischichtenregion ansteigt (Abbildung 53).

So wurden zum Beispiel bei einem pD-Wert von 4,9 und einer Temperatur von 22 °C vergleichbare Minima bei 7 % und 15 % (50 Å Eindringtiefe, Abbildung 50 B) und bei 23 % (25 Å Eindringtiefe, Abbildung 50 C) gefunden.

Bei einem pD-Wert von 7,5 und einer Temperatur von 22 °C finden sich vergleichbare Minima bei 1 % (50 Å Eindringtiefe, Abbildung 50 B) und bei 3 % und 30 % (25 Å Eindringtiefe, Abbildung 50 C).

Somit ist ein klarer Trend auszumachen, demzufolge die SNase teilweise in die oberen Regionen der Polyelektrolyt-Multischichten nach der Adsorption eindringt. Es ist möglich zu beurteilen, ob diese Minima physikalisch sinnvollen Strukturen entsprechen. So sollte die

Schichtdicke des Adsorbates nicht bedeutend kleiner sein als der Durchmesser der SNase (45 Å) [Panick] und der Volumenbruch des Proteins innerhalb des Adsorbates nicht größer als 50 % [Jackler2002] sein.

Auf Basis dieser Kriterien können zwei Minima ausgesucht (markiert in Abbildung 53) und die Grenzflächenstrukturen abgeleitet werden.

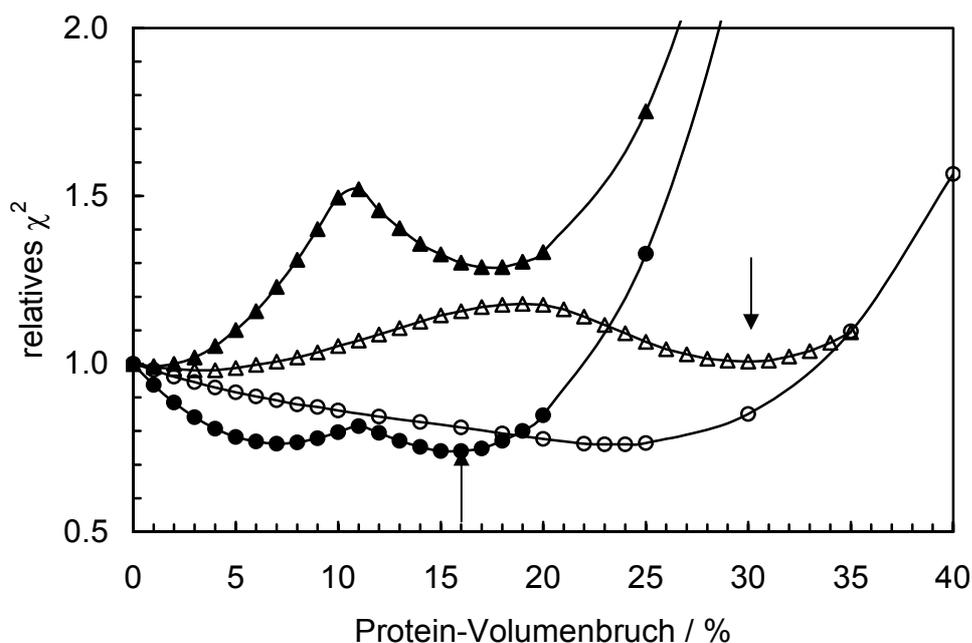


Abbildung 53: Qualität der Datenanpassung als Funktion des Volumenbruches des Proteins in den oberen 50 Å der Polyelektrolyt-Multischicht (gefüllte Symbole, siehe Abbildung 50 B) und in den oberen 25 Å der Polyelektrolyt-Multischicht (nicht gefüllte Symbole, siehe Abbildung 50 C). Die Neutronenreflektivitätskurven bei pD = 4,9 und 22 °C (gefüllte and ungefüllte Kreise) und bei pD = 7,5 und 22 °C (gefüllte und ungefüllte Dreiecke) wurden analysiert. Die χ^2 -Werte sind normiert auf die Werte von χ^2 , wenn keine SNase in dem Polyelektrolyt eingebettet ist. Die physikalisch wahrscheinlichsten Minima sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

In ähnlicher Weise werden so die Ergebnisse der Messungen erhalten, die bei 42 °C durchgeführt wurden.

In Tabelle 13 wird die räumliche Verteilung der SNase, die mit den Polyelektrolyt-Multischichten interagiert, für die verschiedenen untersuchten Bedingungen zusammengefasst.

Tabelle 13: Räumliche Verteilung der SNase, die mit einer Si-PEI-PSS-(PAH-PSS)₅-Pufferlösungs-Grenzfläche wechselwirkt.^a

pD	$T / ^\circ\text{C}$	Modell	$\phi_{\text{Pro},2}$	$\phi_{\text{Pro},3}$	$d_3 / \text{Å}$
4,9	22	Abb. 50 B	0,15	0,14	45
4,9	42	Abb. 50 B	0,23	0,19	48
			$\phi_{\text{Pro},3}$	$\phi_{\text{Pro},4}$	$d_4 / \text{Å}$
7,5	22	Abb. 50 C	0,30	0,29	39
7,5	42	Abb. 50 C	0,35	0,38	43

^a Für jeden pD-Wert wurde ein anderer Si-Wafer verwendet.

Für den pD-Wert von 4,9 und D₂O als Lösungsmittel sind die berechneten Neutronenreflektivitätskurven in Abbildung 52 B als durchgängige Linien ersichtlich.

Die Profile der Volumenbrüche für den Polyelektrolyt und das Protein bei pD= 4,9 bzw. 7,5 sind in Abbildung 54 aufgezeigt.

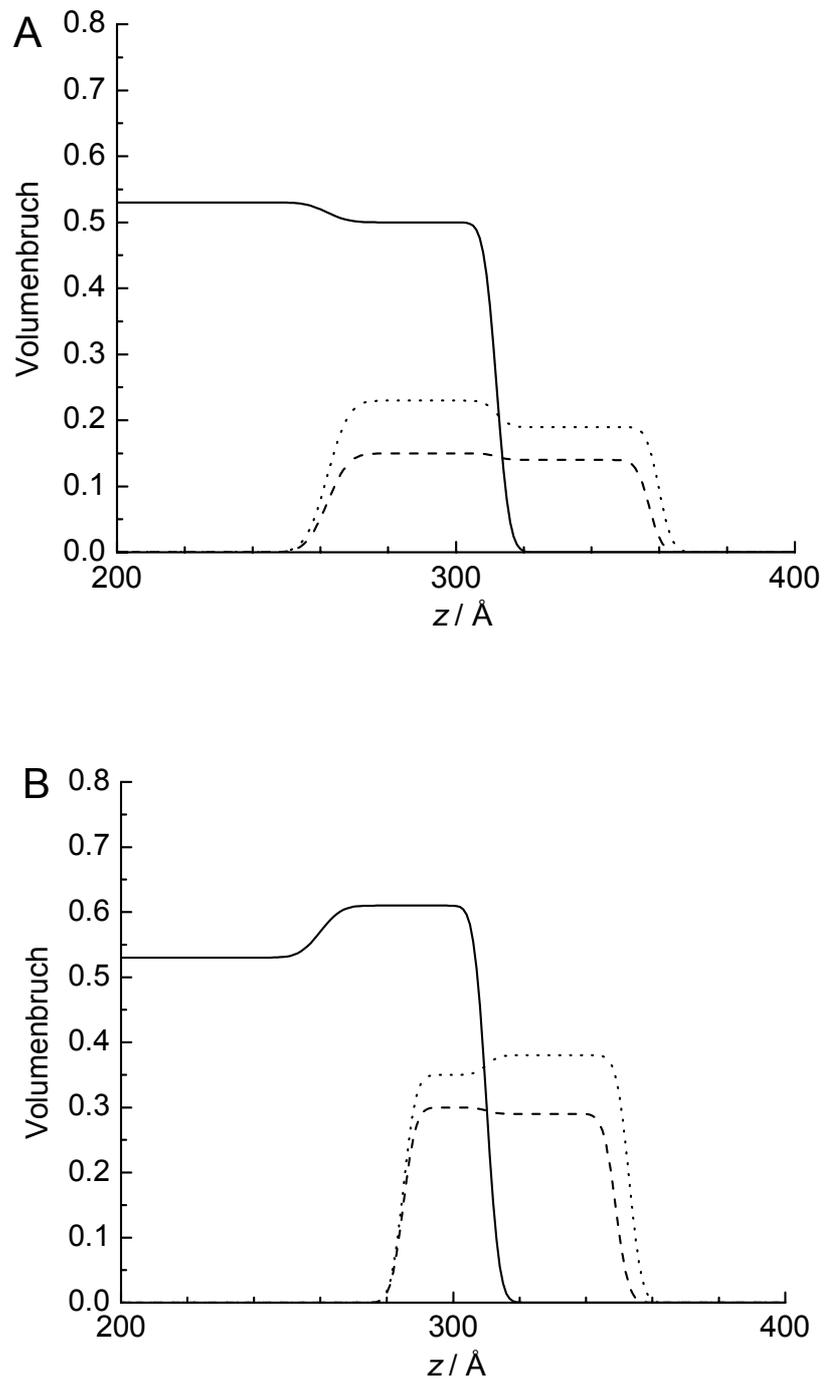


Abbildung 54: Volumenbruchprofile der Polyelektrolyt-Multischicht (durchgezogene Linie), SNase bei 22 °C (gestrichelte Linie) und SNase bei 42 °C (gepunktete Linie). Die Daten wurden bei $pD = 4,9$ (A) und $pD = 7,5$ (B) erhalten. Die Oberfläche des Silizium-Wafers ist bei $z = 0$ lokalisiert.

Die Profile wurden aus den Werten berechnet, die in Tabelle 12 und 13 aufgeführt sind. Bei beiden pD-Werten zeigen die Profile sehr klar, dass die SNase nach Adsorption in die Polyelektrolyt-Multischicht eindringt.

Dieses Verhalten kann wie folgt beim Betrachten der gefundenen Ergebnissen erklärt werden. So adsorbiert mit ansteigender Temperatur eine ansteigende Menge an SNase an der Polyelektrolyt-Multischicht (Abbildung 54 A und 54 B).

Bei einem pD-Wert von 4,9 wächst die Grenzflächenkonzentration des Proteins von 1,8 mg m⁻² bei 22 °C auf 2,7 mg m⁻² bei 42 °C. Bei einem pD-Wert von 7,5 wurde sie zu 2,5 mg m⁻² bei 22 °C und 3,3 mg m⁻² bei 42 °C berechnet. Folglich wird die Adsorption der SNase an der Polyelektrolyt-Multischicht durch einen Anstieg der Entropie getrieben.

Zurückzuführen ist der Anstieg der Entropie letztendlich auf hydrophobe Wechselwirkungen bzw. auf eine Komplexierung zwischen den Proteinmolekülen und den Polyelektrolyt-Ketten. Im letzteren Fall binden die negativ geladenen PSS-Ketten an die positiv geladenen SNase-Moleküle, wobei eine entsprechende Anzahl an monovalenten Gegenionen freigesetzt wird.

Hierbei ist sehr interessant festzustellen, dass bei einem pD-Wert von 4,9 SNase tiefer in die Polyelektrolyt-Multischicht eindringt als bei einem pD-Wert von 7,5 (Abbildung 54). Desweiteren ist bei pD= 4,9 der temperaturinduzierte Anstieg der Masse an adsorbierter SNase innerhalb der oberen Polyelektrolyt-Multischicht größer als auf der Multischicht (Abbildung 54 A). Somit scheint es, dass SNase vorzugsweise bei kleinen pD-Werten in die Polyelektrolyt-Multilayer eindringt, bei denen das Protein stark geladen ist und eine große Anzahl an negativ geladenen Gegenionen trägt. Folglich beruht das Eindringen der SNase in die Polyelektrolyt-Multischicht wahrscheinlich auf der Komplexierung zwischen den SNase-Molekülen und den PSS-Ketten.

In dieser Studie wurden mit Hilfe der Neutronenreflektometrie Volumenbruch-Profile des Proteins SNase bestimmt, welches an einer Polyelektrolyt Multischicht adsorbiert. Die Experimente wurden bei pD-Werten durchgeführt, bei denen SNase eine positive Nettoladung trägt und unter elektrostatisch anziehenden Bedingungen mit der letzten PSS-Schicht der Polyelektrolyt-Multischichten interagiert.

Die Analyse der Neutronenreflektivitätskurven zeigt, dass SNase teilweise nach der Adsorption in die Polyelektrolyt-Multischichten eindringt. Dieses Eindringen ist um so stärker favorisiert, je stärker die positive Ladung des Protein ist.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass unter diesen Bedingungen die SNase-Moleküle und die PSS-Ketten mittels einer Komplexierung interagieren. Einher geht dies mit der Freisetzung von Gegenionen, was einer entropisch getriebenen Kraft der Proteinadsorption entspricht.

5.4 Proteinadsorption an einer gleichnamig geladenen Polyelektrolyt-Bürste durch Freisetzung von Gegenionen

5.4.1 Neutronenreflektivitätsexperimente

Eine planare PAA-Bürste wurde, wie zuvor in Kapitel 2.4 beschrieben, präpariert, indem PS-PAA-Moleküle an einen d-PS Film gebunden wurden, der auf einem Silizium-Wafer aufgetragen wurde (Abbildung 55).

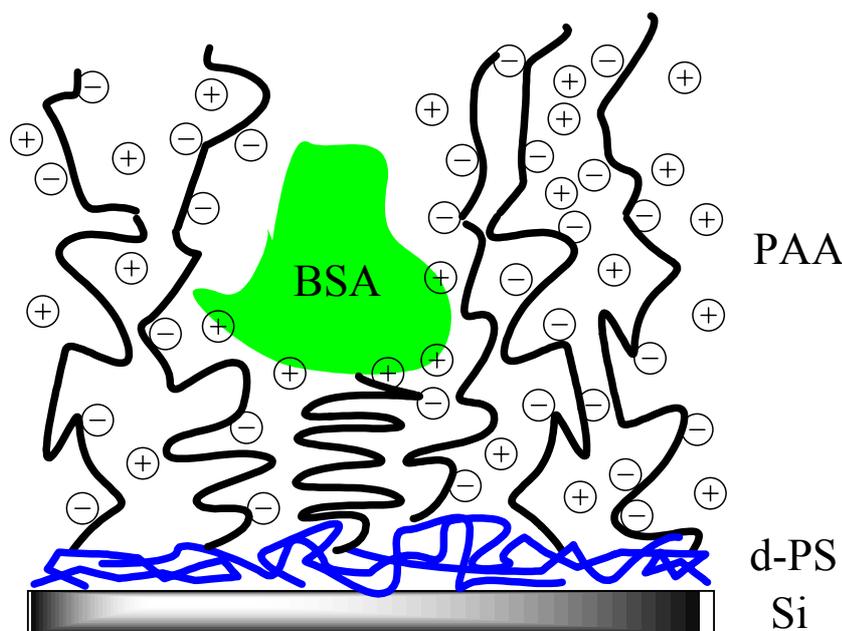


Abbildung 55: Schematische Zeichnung einer planaren Polyacrylsäure (PAA)-Bürste, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurde. Präpariert wurde sie auf Basis eines Silizium-Wafers (Si), der mit einer dünnen Schicht d-PS beschichtet ist. Die PAA-Bürste bindet große Mengen an BSA, wobei bei höheren Ionenstärken eine Proteinresistenz der PAA-Bürste beobachtet werden konnte.

Die erfolgreiche Präparation der planaren Bürste wurde durch Röntgenreflektivitätsmessungen (Abbildung 56) und Kontaktwinkelmessungen (Abbildungen A2, A3, A4) überprüft.

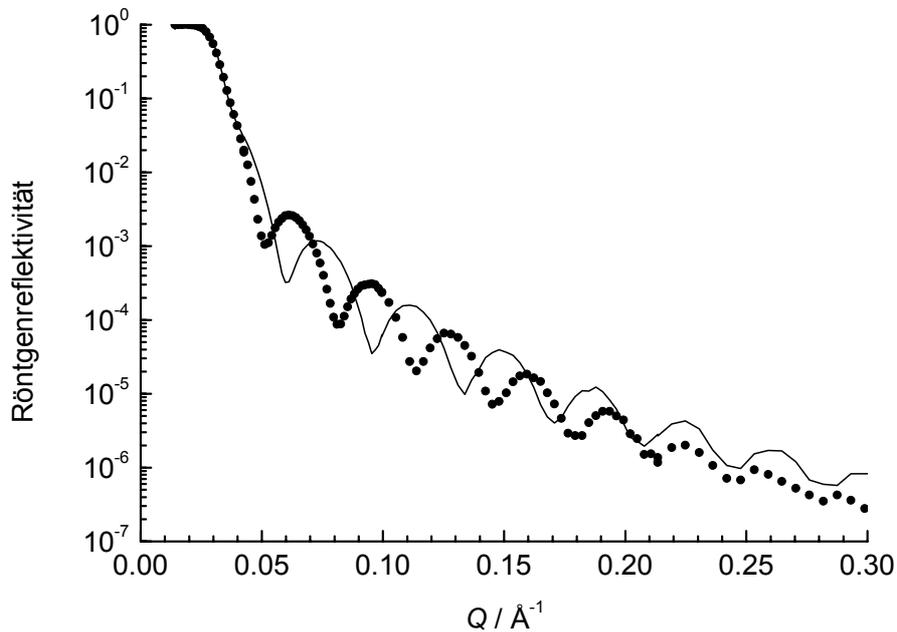


Abbildung 56: Röntgenreflektivitätskurve eines Silizium-Wafers an der Luft. Der Wafer wurde mit einem dünnen Film deuterierten Polystyrols (d-PS) beschichtet. Die Reflektivitäten wurden vor (durchgezogene Linie) und nach der Präparation (Symbole) der Polyacrylsäure-Bürste vermessen. Die Daten stimmen mit einer Schichtdicke von 169 Å für den d-PS Film und 29 Å für die trockene und kollabierte Bürste überein.

In Abbildung 57 sind die Neutronenreflektivitätskurven einer Si/Lösung-Grenzfläche gezeigt, die mit einer planaren PAA-Bürste modifiziert wurde. Zur Verdeutlichung der Unterschiede zwischen den Kurven wurden sie auf die Neutronenreflektivität einer glatten Si/D₂O-Grenzfläche normiert.

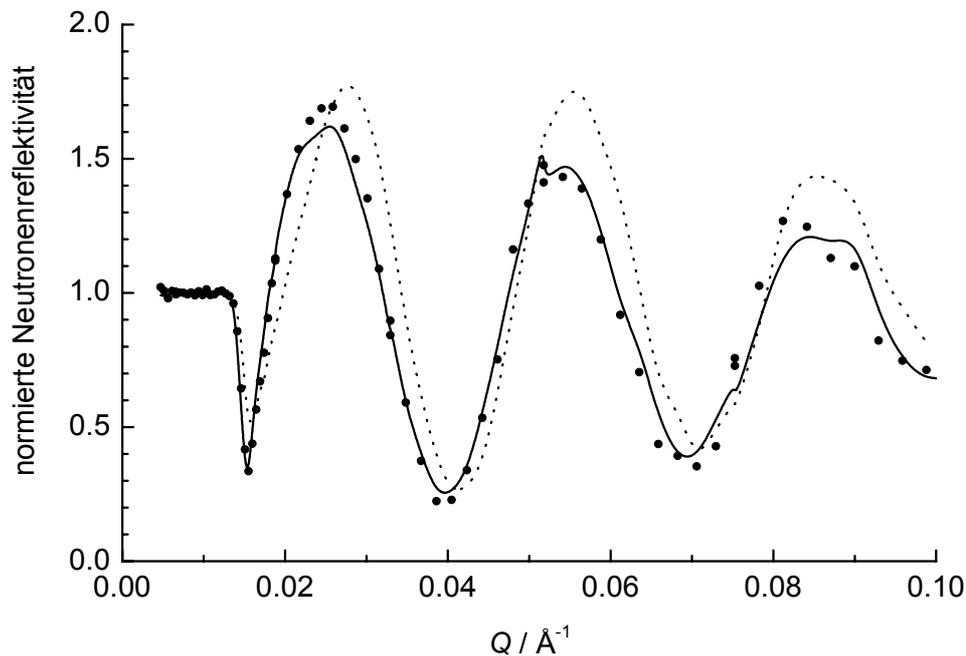


Abbildung 57: Neutronenreflektivitätskurven einer Si/Lösung-Grenzfläche, die mit einer planaren PAA-Bürste modifiziert wurde. Die Reflektivitätskurven wurden auf die einer glatten Si/D₂O-Grenzfläche normiert. Die gestrichelte Linie stellt die Neutronenreflektivität der Si/d-PS/PS-PAA/Lösung-Grenzfläche dar, die mit einer D₂O-Pufferlösung ohne BSA erhalten wurde. Wenn BSA mit einer Konzentration von 0,05 mg/mL anwesend ist, ändert sich die Neutronenreflektivität der Grenzfläche merkbar (durchgezogene Linie), was eine Bindung des BSA an die PAA-Bürste anzeigt. Weitere Zugabe von 0,2 M NaCl zu der BSA-Lösung ändert die Neutronenreflektivität nicht signifikant (Symbole).

Die Daten, die in Abbildung 57 gezeigt werden, wurden mit D₂O als Lösungsmittel erhalten. D₂O besitzt eine Streulängendichte von $6,37 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$, was in etwa der Streulängendichte der auf das Silizium aufgetragenen deuterierten Polystyrolschicht entspricht ($6,42 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$). Die beobachteten Oszillationen für die D₂O-Puffer-Probe (Abbildung 57, gestrichelte Linie) bestätigen jedoch die Anwesenheit einer PAA-Bürste, die mit PS-PAA-Molekülen gebildet wurde.

Denn die PS-PAA-Moleküle sind nicht perdeutert und haben eine geringere Streulängendichte als D₂O.

Wenn BSA der D₂O-Pufferlösung mit einer Konzentration von $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ hinzugegeben wird, ändert sich die Neutronenreflektivität der Si/PAA-Bürste/Lösungs-Grenzfläche merklich (Abbildung 57, durchgezogene Linie). Die Änderung weist auf eine Änderung des Streulängendichteprofiles der Grenzfläche hin und kann nur durch das Binden der BSA-Moleküle an die PAA-Bürste erklärt werden.

Da ein pD-Wert von 6,9 gewählt wurde, besitzt das BSA (isoelektrischer Punkt 5,0) eine negative Netto-Ladung, und die PAA-Bürste liegt in einem dissoziierten Zustand vor. Folglich adsorbiert BSA auf der PAA-Bürste unter elektrostatisch abstoßenden Kräften.

Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit aktuellen Studien, in denen die Bindung von BSA an sphärischen PAA-Bürsten beobachtet wurde [Czeslik2004/1], [Witteman2003]. Wie in Abbildung 57 gesehen werden kann, beeinflusst die Zugabe von 0,2 M NaCl zu der BSA-Lösung offensichtlich nicht die Neutronenreflektivität der Si/PAA-Bürste/Lösungs-Grenzfläche, was anzeigt, dass der Grad der BSA-Bindung an einer planaren PAA-Bürste nicht durch diese Erhöhung der Ionenstärke beeinträchtigt wird.

Für eine weitere Charakterisierung des Einflusses der Ionenstärke auf den Grad der BSA-Bindung an eine planare PAA-Bürste wurden Neutronenreflektivitäts-Experimente an einem neuen Silizium-Wafer mit einer PAA-Bürste durchgeführt. Die mit D₂O als Lösungsmittel erhaltenen Daten sind in Abbildung 58 gezeigt. Vergleichbare Daten wurden mit HDO (75 Vol.-% D₂O) als Lösungsmittel aufgenommen. Wieder werden Oszillationen in den Neutronenreflektivitätskurven für die D₂O-Puffer-Probe ohne BSA (Abbildung 58, durchgezogene Linie) detektiert, was für die Anwesenheit einer PAA-Bürste spricht.

Interessanterweise wird keine Änderung in der Neutronenreflektivität nach Zugabe von 0,05 mg mL⁻¹ BSA und 0,5 M NaCl zur Puffer-Lösung detektiert (Abbildung 58, Symbole).

Das Ergebnis ist bemerkenswert, da es klar zeigt, dass eine Proteinresistenz der planaren PAA-Bürste bei erhöhter Ionenstärke von 0,5 M besteht.

Diese salzinduzierte Resistenz basiert nicht auf der Abschirmung direkter elektrostatisch anziehender Kräfte, da BSA und die PAA-Bürste negativ geladen sind. Somit konnte die salzinduzierte Proteinresistenz, die schon für sphärische PAA-Bürstenpartikel gefunden wurde [Czeslik2004/1], [Wittemann2003], hier für eine planare PAA-Bürste reproduziert werden.

Letztendlich, wie der Abbildung 58 zu entnehmen ist, ändert sich die Neutronenreflektivität der Si/PAA-Bürste/Lösungs-Grenzfläche signifikant, wenn die Probenzelle mit einer BSA-Lösung gleicher Konzentration aber ohne NaCl gespült wird.

Diese Beobachtung bestätigt eindeutig, dass BSA bei geringen Salzkonzentrationen an der PAA-Bürste bindet, obwohl unter diesen Bedingungen die elektrostatische Abstoßung am größten ist. Eine Ionenstärke von 0,2 M ist offenbar niedrig genug, diese Bindung zu ermöglichen (Abbildung 57).

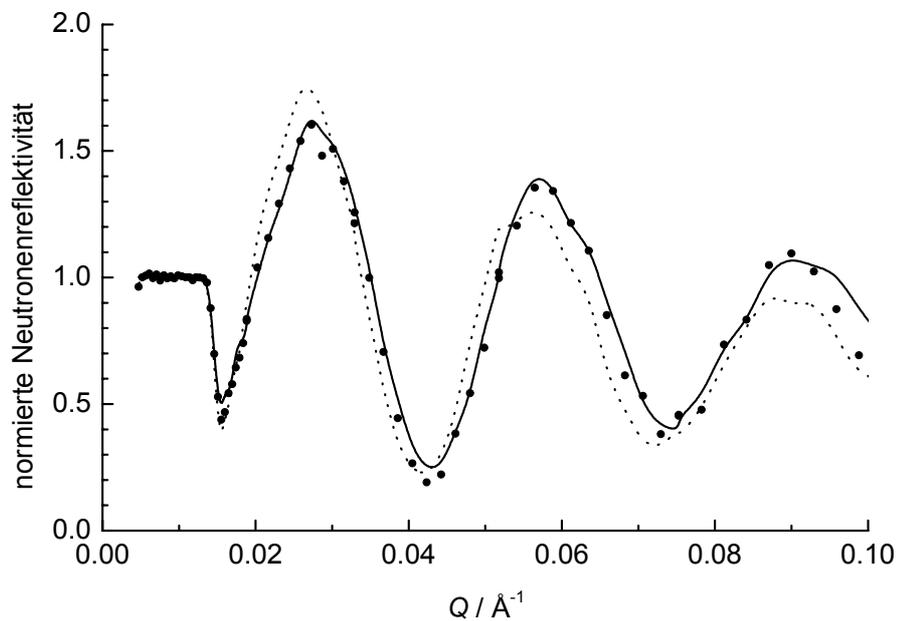


Abbildung 58: Neutronenreflektivitätskurven einer Si/Lösung-Grenzfläche, die mit einer planaren PAA-Bürste modifiziert wurde (anderer Si-Wafer als in Abbildung 57). Die Reflektivitätskurven wurden auf die einer glatten Si/D₂O-Grenzfläche normiert. Die durchgezogene Linie stellt die Neutronenreflektivität der Si/d-PS/PS-PAA/Lösung-Grenzfläche dar, die mit einer D₂O-Pufferlösung ohne BSA erhalten wurde. Zugabe von 0,05 mg/mL BSA und 0,5 M NaCl ändert die Neutronenreflektivität nicht signifikant (Symbole), was eine Proteinresistenz der PAA-Bürste anzeigt. Wird die Bürste jedoch mit einer 0,05 mg/mL BSA-Lösung ohne NaCl gespült, so ändert sich die Neutronenreflektivität merkbar (gepunktete Linie), da nun BSA auf der PAA-Bürste bei niedriger Ionenkonzentration bindet.

Das Streulängendichteprofil einer Si/PAA-Bürste/Lösungs-Grenzfläche in Abwesenheit und in Anwesenheit von BSA wurden erhalten, indem, wie schon in den Grundlagen der Neutronenstreuung Kapitel 3.6 beschrieben, ein Schichten-Strukturmodell an die experimentellen Neutronenreflektivitätsdaten nach der optischen Matrix-Methode angepasst wurde [Hansen].

Hierfür wurden globale Fits von jeweils zwei Neutronenreflektivitätskurven ermittelt, die sich in ihren Streulängendichtekontrasten unterschieden.

Dieses globale Fitting ermöglicht somit die gleichzeitige Analyse zweier verschiedener Neutronenreflektivitätskurven, die zu derselben Grenzflächenstruktur gehören.

Um die Analyse so einfach wie möglich zu halten, aber dennoch physikalisch sinnvolle Ergebnisse zu erhalten, wurde ein Drei-Schichten-Modell angenommen. Hierbei stellt der d-PS-Film (Index 1) die erste, eine innere Bürstenschicht (Index 2) die zweite und eine äußere

Bürstenschicht (Index 3) die dritte Schicht dar. Der Si-Wafer (Index 0) und die Lösung (Index 4) schließen diese Schichten ein.

Die Zusammensetzung der inneren Bürste ist nicht exakt definiert, sie deckt die Kontakt-Region zwischen den PS-PAA-Molekülen und der d-PS-Schicht ab.

Das Lösungsmittel wurde entweder mit D₂O oder HDO hergestellt. Das Schichtenmodell wird vollständig durch drei Arten von Parametern beschrieben: der Streulängendichte ρ einer Schicht, der Schichtdicke d und der Grenzflächenrauigkeit σ . Während des globalen Anpassungsprozesses werden die Schichtdicken und die Rauigkeiten für beide Reflektivitätskurven gleich gehalten, die unterschiedliche Kontraste aufweisen. Dies führt zu einer starken Reduzierung der Anzahl der Profile, die den Neutronenreflektivitätsdaten entsprechen.

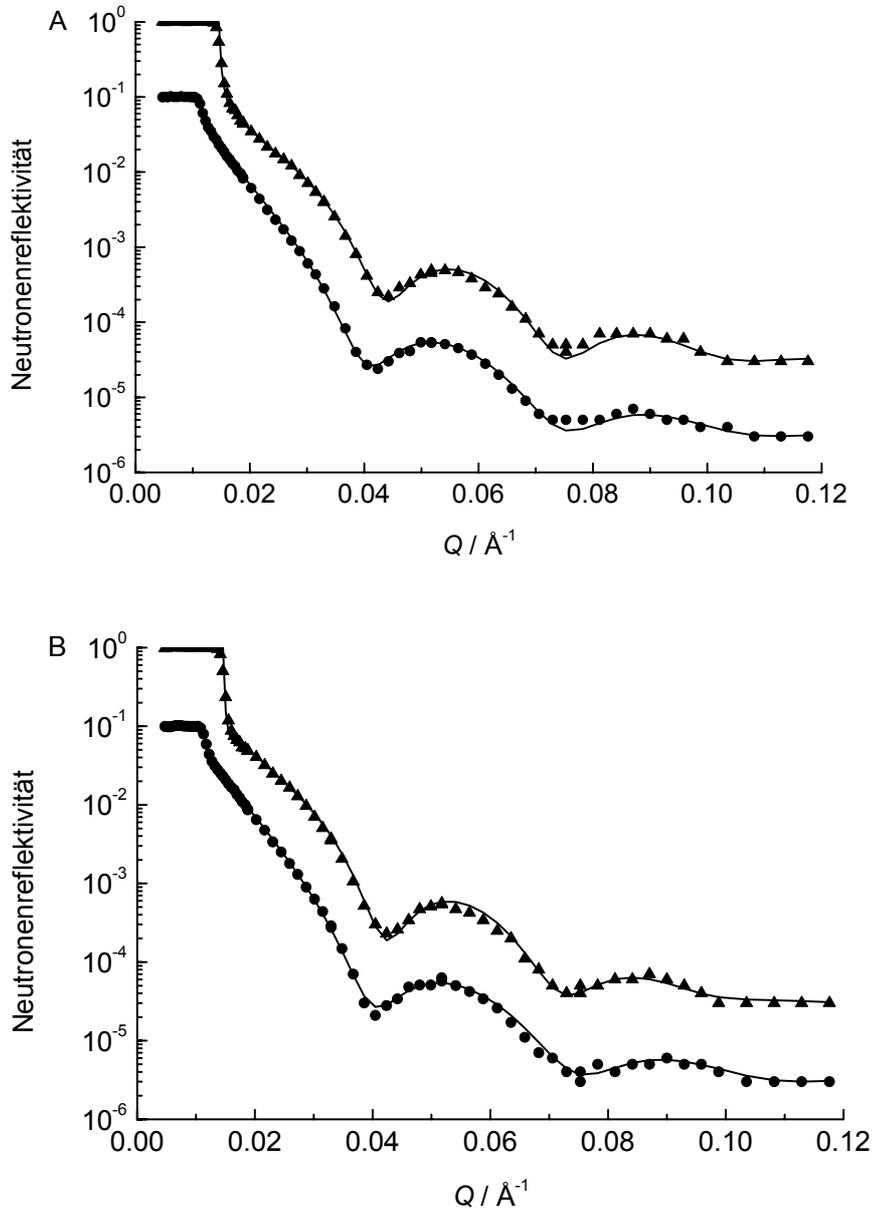


Abbildung 59: Neutronenreflektivitätskurven einer Si/Lösung-Grenzfläche, die mit einer planaren PAA-Bürste modifiziert wurde. Die Symbole repräsentieren die experimentellen Daten, die durchgängigen Linien zeigen globale Fits auf Basis eines Schichtenmodells für die Grenzflächenstruktur, wie im Text beschrieben. Die Daten wurden mit D_2O (Dreiecke) und einer 3:1 Mischung aus $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ (Kreise) als Lösungsmittel bei Abwesenheit (A) und in Anwesenheit von 0,05 mg/mL BSA (B) erhalten. Kein Salz wurde zu diesen Proben hinzugegeben. Die HDO-Daten wurden um einen Faktor 0,1 entlang der Neutronenreflektivitätsachse zur Verdeutlichung verschoben.

Für die Datenanpassung wurden die Streulängendichte des Silizium-Wafers auf $\rho_0 = 2,07 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$, die des d-PS Films auf $\rho_1 = 6,42 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ und die der Lösung auf $\rho_4 = 6,37 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ für D₂O oder auf $\rho_4 = 4,64 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ für HDO festgelegt [Higgins], [NCNR]. Um die Neutronenreflektivitätskurven der Proben mit Pufferlösung (Abbildung 59 A) anzupassen, werden sowohl die Schichtdicken d_1 , d_2 und d_3 als auch die Streulängendichten ρ_2 und ρ_3 als variabel angenommen. Mit Ausnahme der Rauigkeit σ_{01} , die auch die dünne Siliziumoxidschicht modelliert, zeigten die Rauigkeiten σ_{12} , σ_{23} und σ_{34} nur wenig Abhängigkeit von den Daten. Die Werte $\sigma_{01} = 13 \text{ \AA}$, $\sigma_{12} = 10 \text{ \AA}$, $\sigma_{23} = 8 \text{ \AA}$ und $\sigma_{34} = 80 \text{ \AA}$ wurden als Ergebnis der Anpassungsprozedur erhalten. Für die Anpassung der Neutronenreflektivitätskurven der BSA-Lösungs-Proben wurden die Anpassungsparameter der Puffer-Lösungsproben als Startwerte gewählt. Dabei zeigte sich, dass nur d_2 , d_3 und ρ_3 variiert werden mußten. Die erhaltenen Fits sind in Abbildung 59, die entsprechenden Streulängendichteprofile sind in Abbildung 60 gezeigt.

Wie in Abbildung 60 ersichtlich, ist ein lokales Minimum in dem Streulängendichte-Profil auszumachen. Dieses zeigt die innere Bürstenschicht, welche hauptsächlich durch die PS-Kettenenden der PS-PAA-Moleküle, die auf der d-PS-Schicht verankert sind, gebildet wird.

Aus der Differenz der beiden Streulängendichte-Profile, die die Grenzflächenstruktur mit und ohne BSA (Abbildung 60) zeigen, kann abgeleitet werden, dass BSA tief in die PAA-Bürste eindringt, wenn es an die PAA-Bürste bei niedriger Ionenstärke gebunden wird (Abbildung 61).

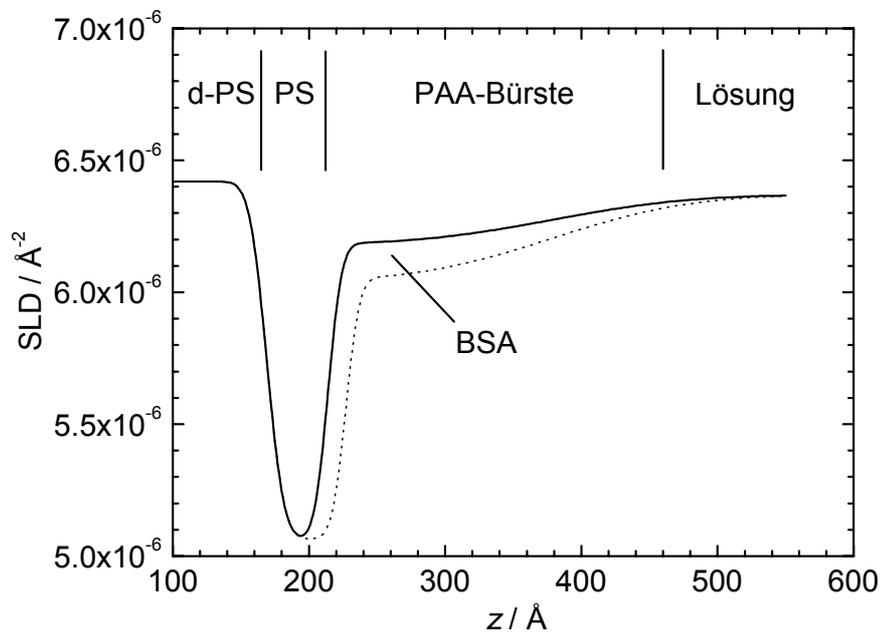


Abbildung 60: Die Abbildung zeigt das Streulängendichteprofil einer Si/Lösungs-Grenzfläche, die mit einer PAA-Bürste modifiziert wurde. Die Profile sind als Funktion der Distanz z von der Si-Oberfläche dargestellt. Die durchgezogene Linie entspricht der D_2O -Pufferlösung ohne BSA; die gestrichelte Linie zeigt das Profil, wenn $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ BSA der Lösung hinzugegeben wird. Kein Salz wurde zu den Proben gegeben. Die Differenz zwischen diesen beiden Profilen ist proportional zum Volumenbruch des BSA senkrecht zur Grenzfläche.

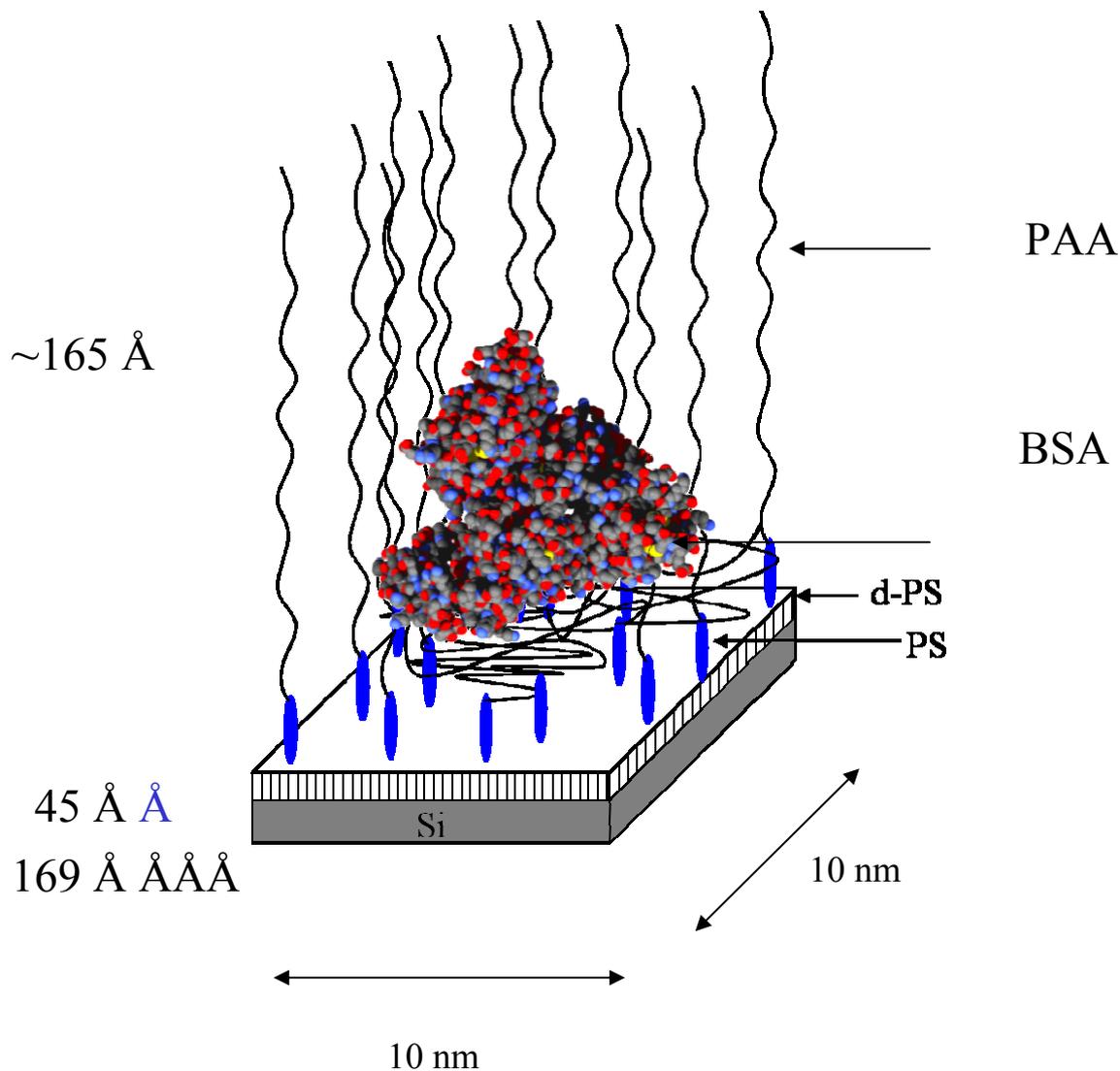


Abbildung 61: Visualisierte dreidimensionale Darstellung der Adsorption eines BSA-Proteins an einer PAA-Bürste. Das verwendete PS-PAA-Copolymer besteht aus 34 Styrol- und 160 Acrylsäure-Monomeren. Die Verankerungsdichte der PAA-Bürste auf der 169 Å-dicken d-PS-Schicht beträgt 15 PAA-Ketten auf 100 nm², die Bürstendicke etwa 17 nm und die Größe des BSA-Moleküls 80 x 80 x 30 Å³. Während des Adsorptionsprozesses dringt das BSA in die Polyelektrolytbürste ein.

Das Volumenbruch-Profil der BSA-Moleküle senkrecht zur Grenzfläche kann berechnet werden aus:

$$f(z) = \frac{\rho''(z) - \rho'(z)}{\rho_{\text{BSA}} - \rho_{\text{Lösung}}} \quad (44)$$

wobei $\rho''(z)$ und $\rho'(z)$ die Streulängendichteprofile darstellen, die in Abbildung 60 für die BSA-Lösungs- und Pufferlösung-Probe gezeigt sind. ρ_{BSA} ist die Streulängendichte eines BSA-Moleküls, welche aus dessen Summenformel und Volumen erhalten wurde.

$\rho_{\text{Lösung}} = \rho_4$ ist die Streulängendichte der Lösung. Gleichung (44) basiert auf der Annahme, dass die Volumina des BSA, der PAA und des Wassers additiv sind und die Adsorption des BSA an der Bürste nur den Austausch des Wassers durch das Protein beinhaltet.

Aus dem integrierten Volumenbruch-Profil, erhält man die adsorbierte Masse an BSA pro Fläche:

$$\Gamma = \frac{M}{V} \int_0^{\infty} f(z) dz \quad (45)$$

mit $M = 66267 \text{ g mol}^{-1}$, der molaren Masse, und $V = 48574 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$, dem molaren Volumen von BSA [Carter].

Mit $\rho_{\text{BSA}} = 3,19 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ (in D_2O) wurde eine Oberflächenkonzentration von $\Gamma = 1,5 \text{ mg m}^{-2}$ gefunden. Dieser Wert ist, verglichen mit einem gefundenen Wert von $0,5 \text{ mg m}^{-2}$ für BSA auf einer planaren Siliziumoberfläche bei $\text{pH} = 7$ ($0,15 \text{ mg mL}^{-1}$ BSA in Lösung, Ionenstärke $0,02 \text{ M}$) [Su1998/1], relativ hoch.

Der Grund für diese Differenz liegt wohl in der Verteilung der BSA-Moleküle innerhalb der dreidimensionalen PAA-Bürste, im Gegensatz zur gewöhnlichen Proteinadsorption auf einer zweidimensionalen Oberfläche.

5.4.2 Quantitatives Modell für die Proteinbindung an einer gleichnamig geladenen Polyelektrolyt-Bürste

Im Folgendem soll kurz ein theoretisches Modell vorgestellt werden, das in Zusammenarbeit mit H. H. von Grünberg (Universität Graz) entwickelt wurde, um die Adsorption von BSA an einer PAA-Bürste zu erklären.

Bei hohen Ionenstärken von 0,5 M sind die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den BSA-Molekülen und der PAA-Bürste stark abgeschirmt. Unter diesen Bedingungen erscheint die PAA-Bürste proteinresistent (Abbildung 58 und siehe Referenzen [Czeslik2004/1], [Wittmann2004]). Van der Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem BSA und der PAA-Bürste können daher vernachlässigt werden.

Die beobachtete Proteinresistenz der PAA-Bürste bei hoher Ionenstärke mag mit der einer ungeladenen PEO-Bürste verglichen werden [Szeifer], [Halperin], [Jeon1991/1], [Jeon1991/2]. Die auf der Oberfläche verankerten Polymerketten dieser Bürste bilden eine sterische Barriere für die sich annähernden Proteinmoleküle. Im allgemeinen wird die Proteinresistenz durch die Erhöhung der Verankerungsdichte, Länge und Flexibilität der Polymerketten verstärkt.

Das in dieser Arbeit untersuchte System zeigt eine relativ hohe Verankerungsdichte der Ketten von $0,15 \text{ nm}^{-2}$, die den BSA-Molekülen keinen direkten Kontakt mit der d-PS-Schicht erlaubt.

Das BSA-Molekül besitzt annähernd die Form eines gleichseitigen Dreiecks (Abbildung 3) mit einer Seitenlängen von 8 nm und einer Dicke von 3 nm [Carter], während der durchschnittliche Abstand zwischen den PAA-Ketten mit 2-3 nm angenommen werden kann.

Desweiteren wird die Flexibilität der PAA-Ketten bei hoher Ionenstärke erhalten, wohingegen sie bei niedriger Ionenstärke durch den osmotischen Druck innerhalb der Bürste herabgesetzt wird.

Auf der anderen Seite sind elektrostatische Wechselwirkungen sehr wichtig bei niedrigen Salzkonzentrationen. BSA besitzt jedoch bei $\text{pH} = 7$ eine negative Netto-Ladung von $-18e$ [Peters]. Dennoch bindet BSA bei niedriger Ionenstärke stärker an und dringt tiefer in die PAA-Bürste ein (Abbildung 57, 58 und 60).

Somit muß für diesen Prozess eine Triebkraft wirken, die nicht der van der Waals- und der hydrophoben Wechselwirkung entspricht, und die direkte elektrostatische Abstoßungskräfte überkompensiert.

In kürzlich veröffentlichten Studien wurde postuliert, dass Proteine an sphärische PAA-Bürsten-Partikel aufgrund einer Freisetzung von Gegenionen binden, was einer starken entropischen Trieb-Kraft entsprechen würde [Czeslik2004/1], [Wittmann2004].

Man kann auf der Grundlage eines einfachen *mean-field*-Modells in der Tat die Proteinadsorption an eine Polyelektrolytbürste durch eine Freisetzung von Gegenionen erklären.

Man betrachtet hierzu ein Protein-Molekül mit Z negativen Ladungen ($-Z < 0$), das in einer 1:1-Elektrolyt-Lösung gelöst ist. In der Lösung, weit vom Protein entfernt, liegt das chemische Potential der Ionen fest und wird durch die Konzentration c_s bestimmt. Hier wird das elektrostatische Potential auf 0 gesetzt (Referenzpunkt). Unter Vernachlässigung von Krümmungseffekten kann die elektrische Doppelschicht, die die Proteinmoleküle umgibt, als Doppelschicht einer planaren elektrisch geladenen Wand (Gouy-Chapmann-Theorie) modelliert werden.

Es kann gezeigt werden, dass die freie Energie, die in der Gouy-Chapmann-Doppelschicht enthalten ist, gegeben ist durch [Evans]:

$$\Omega_{DS} = 2ZkT \left[\ln(\sqrt{s^2 + 1} + s) - \frac{\sqrt{s^2 + 1} - 1}{s} \right] \quad (46)$$

mit k , der Boltzmannkonstanten, T , der Temperatur, und s als reduzierten Oberflächenparameter, definiert als:

$$s = \frac{2\pi\lambda_B |\sigma_{\text{Protein}}|}{\kappa} \quad (47)$$

λ_B ist die Bjerrum-Länge, $\sigma_{\text{Protein}} = -Z/A$ ist die Proteinoberflächen-Ladungsdichte, die aus der Anzahl der Ladungen Z und der Größe der Oberfläche A berechnet wird, und $\kappa^2 = 8\pi\lambda_B c_s$.

Für ein gelöstes BSA-Molekül bei einem pH-Wert von 7 gilt $Z = 18$, $A = 282 \text{ nm}^2$ (berechnet als dem Lösungsmittel zugängliche Oberfläche) und $\sigma_{\text{Protein}} = -0,0638 \text{ nm}^{-2}$ [Carter], [Peters].

Für $T = 298 \text{ K}$, $c_S = 10 \text{ mM} \cdot N_A = 6,022 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-3}$ erhält man $\lambda_B = 0,719 \text{ nm}$, $\kappa^{-1} = 3,03 \text{ nm}$, $s = 0,873$ und somit eine freie Energie pro Protein von $\Omega_{DS} = +14,9 \text{ kT}$.

Die interessante Frage ist nun, ob die Energie Ω_{DS} , die in der elektrischen Doppelschicht steckt, abnimmt, wenn das Proteinmolekül in die negativ geladene Polyelektrolyt-Bürste übertragen wird. Wenn Ω_{DS} abnimmt, wird das Protein spontan an der Bürste binden.

Um Ω_{DS} für ein Protein-Molekül innerhalb einer Polyelektrolyt-Bürste abzuschätzen, werden die chemischen Details der Bürste vernachlässigt und es wird für das Innere der Bürste ein konstantes negatives Potential $\bar{\Phi}$ angenommen. Dieses Donnan-Potential resultiert aus dem bekannten Donnan-Effekt [Donnan], [Overbeek], [Tamashiro], [Deserno].

Das Potential bestimmt die Konzentration der Gegenionen und Coionen innerhalb der Bürste gemäß:

$$c_+ = c_s \exp(-\bar{\Phi}) > c_s \quad c_- = c_s \exp(+\bar{\Phi}) < c_s \quad (48)$$

Angemerkt werden muß, dass normierte Potentiale verwendet werden, z.B.: $\bar{\Phi} = e\bar{\psi} / kT$.

Die Gegenionen und Co-Ionen innerhalb der Bürste ergeben die mittlere Ionenladungsdichte

$$\rho = c_+ - c_- = -2c_s \sinh \bar{\Phi} \quad (49)$$

Setzt man Elektroneutralität für die Bürstenschicht voraus, so gleicht diese Ladungsdichte der negativen mittleren Ladungsdichte ρ_p des Polyelektrolyten.

Somit ist eine Berechnung des Donnan-Potentials $\bar{\Phi}$ möglich. Für eine Polyelektrolytbürste wird ρ_p abgeschätzt gemäß:

$$\rho_p = - \frac{gL}{d\lambda_B} \quad (50)$$

Der Referenz [Hariharan] folgend, kann die effektive Anzahl der Ladungen pro Polyelektrolyt-Kette aus L/λ_B berechnet werden, was aus der Gegenionen-Kondensations-Theorie resultiert [Manning].

Da die Entfernung zwischen den Ladungen auf einer PAA-Kette 0,25 nm ist und die Bjerrum-Länge 0,719 nm bei 298 K beträgt, kondensieren Gegenionen und neutralisieren einige der PAA-Ladungen.

Bei einer Verankerungsdichte von $g = 0,15 \text{ nm}^{-2}$, einer PAA-Kettenlänge von $L = 40 \text{ nm}$ (160 Monomere multipliziert mit 0,25 nm) und einer PAA-Bürstendicke von $d \approx 17 \text{ nm}$, erhält man $\rho_p = -0,491 \text{ nm}^{-3}$ und ein Donnan-Potential von $\bar{\Phi} = -4,40$ (Gleichung 49) innerhalb der PAA-Bürste.

Vereinfacht gesehen würde man annehmen, dass ein negativ geladenes Proteinmolekül ($-Z < 0$) niemals bei den vorherrschenden abstoßend wirkenden elektrostatischen Wechselwirkungen in eine negativ geladene Bürste ($\bar{\Phi} < 0$) eindringt, da die elektrostatische Wechselwirkungsenergie positiv ist:

$$\Omega_1 = -ZkT\bar{\Phi} \quad (51)$$

Viel wichtiger als diese abstoßende Energie ist jedoch die Änderung in der freien Energie der Protein-Doppelschicht durch das Transferieren des Proteinmoleküls in die Bürste.

Da ein Überschuss an positiven Ionen in der Bürste vorzufinden ist, werden weniger Ionen in der Doppelschicht benötigt, um die Proteinladungen abzuschirmen.

Dementsprechend wird die Energie, die in der Doppelschicht gespeichert wird, deutlich reduziert.

Diese Energiedifferenz wird im folgenden näher bestimmt.

Ausgangspunkt ist ein modifiziertes Gouy-Chapmann-Problem einer unendlich ausgedehnten, planaren, geladenen Oberfläche (mit der Oberflächenladungsdichte des Proteinmoleküls) in Kontakt mit einer Elektrolytlösung (eine Polyelektrolytbürste darstellend), die das Donnan-Potential $\bar{\Phi}$ aufweist.

$$\frac{d^2\phi(x)}{dx^2} = \kappa^2 \sinh \phi(x) \quad (52)$$

$$\phi(\infty) = \bar{\Phi} \quad (53a)$$

$$\frac{d\phi(x)}{dx} = \begin{cases} +2\kappa s & \text{für } x = 0 \\ 0 & \text{für } x = \infty \end{cases} \quad (53b)$$

dabei ist $\phi(x) = \bar{\Phi} + \Delta\phi(x)$ das Potential im Abstand x von der planaren Oberfläche innerhalb der Polyelektrolytbürste. Gleichung (53 a) und (53 b) definieren die Randbedingungen.

Dieses Randwert-Problem (Gleichung 52, 53 a, 53 b) wird zu dem ursprünglichen Gouy-Chapmann-Problem, wenn $\bar{\Phi} = 0$.

Im Gegensatz zu dem ursprünglichen Gouy-Chapmann-Problem kann kein analytischer Ausdruck für $\phi(x)$ gegeben werden. Die erste Integration kann dagegen aber durchgeführt werden:

$$\frac{d\phi(x)}{dx} = \pm\kappa\sqrt{2(\cosh\phi(x) - \cosh\bar{\Phi})} \quad (54)$$

Diese Ableitung ist positiv für den Fall, dass eine negativ geladene Oberfläche wie hier betrachtet wird, ansonsten ist sie negativ.

Gleichung 54 ist nur für $|\phi(x)| > |\bar{\Phi}|$ gültig.

Sie wird in Kombination mit Gleichung (53 b) verwendet, um das Oberflächenpotential $\phi(0)$ mit dem reduzierten Oberflächenparameter s in Beziehung zu setzen.

Angemerkt werden sollte, dass das Oberflächenpotential ebenfalls von dem Donnan-Potential $\bar{\Phi}$ abhängt.

Für das hier untersuchte System ($s = 0,873$, $\bar{\Phi} = -4,40$) wird ein Oberflächenpotential von $\phi(0) = -4,44$ innerhalb der Bürste gefunden, was gerade mal um 0,04 kleiner ist als der Referenzwert $\bar{\Phi}$.

Im Gegensatz hierzu ist das Oberflächenpotential des BSA außerhalb der Bürste gegeben durch $\phi(0) = -2\ln(\sqrt{s^2 + 1} + s)$. Daraus ergibt sich ein Wert von $-1,58$ (mit einem Referenzwert von 0).

Es ist nun möglich, die freie Energie zu berechnen (genauer gesagt, die freie Energie eines μ, T, V -Ensembles), die in der elektrischen Doppelschicht des Proteinmoleküls innerhalb der Polyelektrolyt-Bürste gespeichert ist:

$$\Omega_{\text{DS}}(s, \bar{\Phi}) = \frac{kTA}{8\pi\lambda_{\text{B}}} \int_0^{\infty} \left(\frac{d\phi(x)}{dx} \right)^2 dx + kTA \int_0^{\infty} \sum_{i=\pm} \left[\rho_i \left(\ln \frac{\rho_i}{c_s} - 1 \right) - c_i \left(\ln \frac{c_i}{c_s} - 1 \right) \right] dx \quad (55)$$

Der erste Term beschreibt die elektrostatische Energie, die in der Doppelschicht aus mobilen und gebundenen Ladungen gespeichert ist; der zweite Term kann auf die Entropie der mobilen Ionen innerhalb der Doppelschicht zurückgeführt werden. $\rho_{\pm} = c_s \exp(\mp\phi)$ gibt die lokalen Ionendichten an.

$\Omega_{\text{DS}}(s, \bar{\Phi})$ wird relativ zu der freien Energie des Proteins ohne Ladungen ($s \rightarrow 0$), aber innerhalb der Bürste gemessen.

Werden die Gleichungen 48 und 54 verwendet, kann Gleichung 55 umgeschrieben werden als

$$\Omega_{\text{DS}}(s, \bar{\Phi}) = \frac{ZkT}{2s} \int_{\phi(0, \bar{\Phi})}^{\bar{\Phi}} \frac{\phi \sinh \phi - \bar{\Phi} \sinh \bar{\Phi}}{\sqrt{2(\cosh \phi - \cosh \bar{\Phi})}} d\phi \quad (56)$$

Dies ist die benötigte freie Energie zur Aufladung der Proteinoberfläche, die in Kontakt mit der Salzlösung steht, in der das Potential $\bar{\Phi}$ anliegt.

Für $\bar{\Phi} = 0$ reduziert sich die Gleichung zum klassischen Gouy-Chapmann-Ausdruck (Gleichung 46). Bemerkenswert ist hier, dass die Gleichung 56 ebenso die einfachen elektrostatischen Wechselwirkungsenergien enthält.

Nun kann die Änderung in der freien Energie für das Eindringen eines Proteinmoleküls aus einer Lösung (in der $\bar{\Phi} = 0$ ist) in eine Polyelektrolytbürste aus der Differenz

$$\Delta\Omega(s, \bar{\Phi}) = \Omega_{\text{DS}}(s, \bar{\Phi}) - \Omega_{\text{DS}}(s, 0) \quad (57)$$

erhalten werden.

Gleichung 57 ist die Nettoenergie, die sich beim Entladen des Proteins außerhalb der Bürste ($-\Omega_{\text{DS}}(s, 0)$) und beim Aufladen des Proteins innerhalb der Bürste ($+\Omega_{\text{DS}}(s, \bar{\Phi})$) ergibt.

In Abbildung 62 ist $\Delta\Omega(s, \bar{\Phi})$ gegen $-s$ für zwei unterschiedliche Werte von $\bar{\Phi}$ aufgetragen. Bemerkenswert ist, dass $\Delta\Omega(s, \bar{\Phi})$ negativ ist, und zwar für alle Werte von $-s$, was aussagt, dass es wegen des Donnan-Potentials vorteilhafter ist, das Protein innerhalb und nicht außerhalb der Bürste aufzuladen.

Mit anderen Worten, eine bedeutende Menge an freier Energie wird bei dem Übergang eines negativ geladenen Proteinmoleküls aus der Lösung in eine negativ geladene Bürste gewonnen.

Für das untersuchte System ergibt sich $\Delta\Omega(0,873, -4,40) = -13,7 kT$, was zeigt, dass negativ geladenes BSA spontan bei niedrigen Ionenstärken an eine negativ geladene Polyelektrolytbürste bindet. Beobachtet werden konnte dies in neutronenreflektometrischen Experimenten (s.o.) und in kürzlich durchgeführten Studien an sphärischen PAA-Bürsten-Partikeln [Czeslik2004/1], [Wittemann2004]. Für eine hohe Ionenstärke von $c_S = 500 \text{mM} \cdot N_A = 0,301 \text{ nm}^{-3}$ gilt $\kappa^{-1} = 0,429 \text{ nm}$, $s = 0,124$, und $\Delta\Omega(0,124, -4,40) = -2,2 kT$.

Somit wird die freie Bindungsenergie des BSA an einer PAA-Bürste drastisch reduziert, was die PAA-Bürste praktisch proteinresistent macht. Es muss aber bemerkt werden, dass die hier verwendete Betrachtungsweise auf einigen sehr vereinfachten Annahmen und Näherungen beruht, wie z.B. dem Vernachlässigen von mikroskopischen Details innerhalb der Polyelektrolytbürste durch Verwendung des Donnan-Potentials.

Ein besseres detaillierteres Modell muß den Wechselwirkungen zwischen den diskreten Ladungsverteilungen der Polyelektrolyt-Bürste und des Proteins Rechnung tragen.

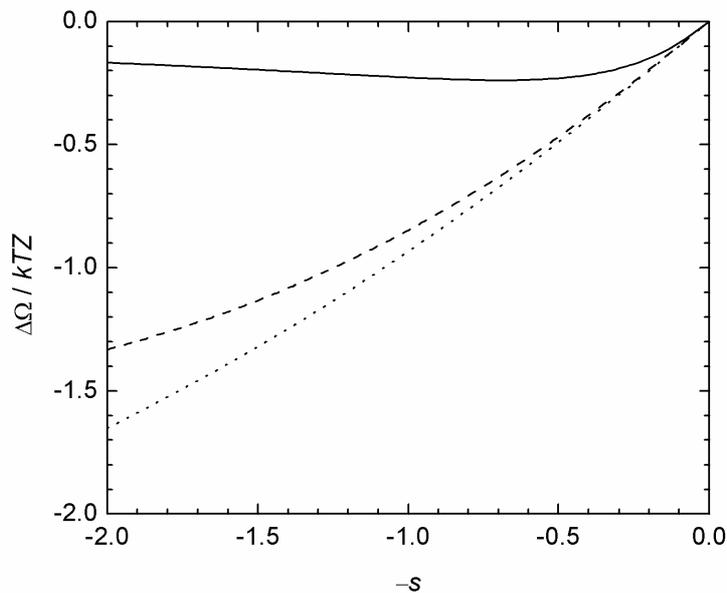


Abbildung 62: Änderung in der freien Energie, wenn ein negativ geladenes Proteinmolekül, charakterisiert durch den reduzierten Oberflächenparameter s , in eine negativ geladene Polyelektrolytbürste eindringt, die durch das konstant negative Potential $\bar{\Phi}$ charakterisiert ist. Die freie Energiedifferenz ist normiert auf die thermische Energie kT und die Anzahl an Proteinladungen Z . Es ist $\bar{\Phi} = -1,0$ (durchgezogene Linie) und $\Phi = -4,4$ (gestrichelte Linie), wie im experimentell untersuchten BSA/PAA-System. Zum Vergleich ist das Negative der freien Energie der Doppelschicht des Proteinmoleküls außerhalb der Bürste (Gleichung 46) als gepunktete Linie gezeigt.

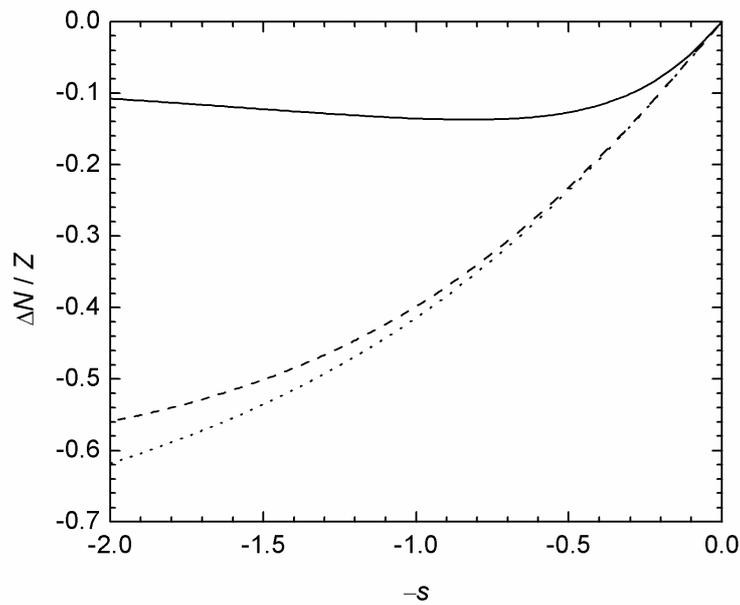


Abbildung 63: Anzahl der freigesetzten Ionen, wenn ein negativ geladenes Protein-Molekül (charakterisiert durch den Parameter s) in eine negativ geladene Polyelektrolytbürste (charakterisiert durch ein konstant negatives Potential Φ) eindringt. Die Daten wurden auf die Anzahl der Proteinladungen Z normiert und sind für dieselben Parameter, wie in Abbildung 62 verwendet, dargestellt. Die gepunktete Linie zeigt den Grenzfall, wenn alle Ionen des Proteins aus der Doppelschicht entlassen werden.

Letztendlich ist es von Interesse, die genaue Anzahl der Ionen (Gegenionen plus Coionen) in der elektrischen Doppelschicht eines Proteinmoleküls in Lösung ($\bar{\Phi} = 0$) und innerhalb der Polyelektrolytbürste ($\bar{\Phi} < 0$) zu bestimmen:

$$N_{\text{DS}}(s, \bar{\Phi}) = \frac{Z}{4s} \int_{\phi(0, \bar{\Phi})}^{\bar{\Phi}} \sqrt{2(\cosh \phi - \cosh \bar{\Phi})} d\phi \quad (58)$$

Diese Zahl stellt den Überschuss der Ionen in dem Volumen der Doppelschicht relativ zur Referenzlösung dar [Meier-Koll]. Die Anzahl der Ionen, die von der Oberfläche des Proteinmoleküls freigesetzt werden, wenn es aus der Lösung in die Polyelektrolytbürste übergeht, ist gegeben durch

$$\Delta N(s, \bar{\Phi}) = N_{\text{DS}}(s, \bar{\Phi}) - N_{\text{DS}}(s, 0) \quad (59)$$

Für die Auftragung von $\Delta N(s, \bar{\Phi})$ in Abbildung 63 werden die gleichen Parameter wie in Abbildung 62 verwendet. $\Delta N(s, \bar{\Phi})$ ist immer negativ, was zeigt, dass Ionen in der Tat von der Proteinoberflächen freigesetzt werden.

Für BSA-Moleküle, die in eine PAA-Bürste eindringen, ergibt sich ein Wert von $\Delta N(0,873, -4,40) = -0,36Z = -6,5$. D.h., es befinden sich 6,5 Ionen weniger in der Protein-Doppelschicht, wenn das Protein sich innerhalb der Bürste befindet. Somit wurden Ionen aus der Bürste freigesetzt bzw. „verdampft“. Der Grund für diesen Verlust an Ionen ist der enorme Überschuß an positiv geladenen Gegenionen in der PAA-Bürste.

Das Dichteprofil der BSA-Gegenionen in der PAA-Bürste fällt nur bis zu dem Wert c_+ und nicht bis zu dem Wert c_s wie in der Lösung ab ($c_+ > c_s$ Gleichung 48), was eine geringere Anzahl von BSA-Gegenionen innerhalb der PAA-Bürste hervorruft.

Zusammengefasst heißt das, dass die vorherrschende Triebkraft für das Binden eines Proteinmoleküls an einer gleichnamigen Polyelektrolyt-Bürste auf einen Gewinn an freier Energie einhergehend mit einer Ionen-„Verdampfung“ zurückzuführen ist.

5.4 Sphärische Polyelektrolyt-Bürsten als Trägerpartikel für Proteine

Sphärische Polyelektrolyt-Bürsten (SPB) wurden in einigen kürzlich veröffentlichten Studien als neue und sehr interessante Substrate beschrieben, die die Immobilisierung von Proteinen in Lösung ermöglichen [Wittmann2003]. Die Kolloidgröße der Partikel mit ihrer sehr großen Oberfläche ermöglicht die Bindung von enormen Mengen an Protein. Die wässrigen Suspensionen der kolloiden Partikel dienen als ideales Modellsystem für die Untersuchung der Adsorption von gelösten Proteinen auf festen Oberflächen. Studiert werden kann dieses System mit einer Vielzahl an Messmethoden [Kawaguchi], [Ballauff2003], von denen in dieser Arbeit die CD-Spektroskopie verwendet wurde. Sie ermöglicht es, Informationen über die Sekundärstruktur eines Proteins unter unterschiedlichen Bedingungen zu erhalten.

Das besondere an diesen neuen sphärischen Kolloiden ist, dass ihre Proteinbindungskapazität durch die Ionenstärke der Lösung kontrolliert werden kann [Czeslik2004/1]. So konnte anhand einer planaren PAA-Bürste (Kapitel 5.4) bereits in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Polyelektrolytbürste, welche bei pH-Werten von 6,1 und einer niedrigen Ionenstärke große Mengen an BSA adsorbiert, bei moderaten Ionenstärken von 500 mM proteinresistent ist. Zudem ermöglicht das Spülen mit einer Salzlösung mit einer Ionenstärke von 500 mM die fast quantitative Entfernung des zuvor auf der Polyelektrolytbürste adsorbierten BSA.

Die außerordentliche Fähigkeit einer negativ geladenen sphärischen Polyelektrolytbürste, negativ geladene Proteine anzubinden, ist auf die Freilassung von Gegenionen (*counterion release force*) zurückzuführen [Grünberg].

In dieser Studie wurde mit einer Dansyl-Gruppe markiertes BSA verwendet [Lakowicz], um auch Fluoreszenz-Studien durchführen zu können [Jackler2004]. Die Markierung mit einer Dansyl-Gruppe, wie ein Vergleich mit Literaturdaten des nicht markierten BSA zeigte, hatte keinen Einfluss auf die Struktur des BSA [Jackler2004]. BSA wurde für diese Studie aufgrund seines isoelektrischen Punktes von pH=5 [Peters], [Carter] und seiner durch α -Helices bestimmten Sekundärstruktur ausgewählt. Der niedrige isoelektrische Punkt von pH=5 hat den Vorteil, dass die kolloidale Suspension sphärischer PAA-Bürsten-Partikeln bei neutralen pH-Werten nicht durch die Zugabe von BSA destabilisiert wird.

Die Sekundärstruktur des BSA wurde mit Hilfe einer sogenannten *convex constraint*-Analyse (CCA, Programm Version 1.0 [Perczel1, Perczel2] und alternativ mit der Methode nach Yang (Linearkombination von Referenzspektren) berechnet.

In der CCA-Methode wird ein Satz aus CD-Spektren in gemeinsame reine Komponenten über den Wellenlängenbereich 195-240 nm zerlegt. Im Gegensatz zu der Methode nach Yang [Yang] hängt die CCA-Methode nicht von bereits bekannten Proteinstrukturen, die mit der Röntgenkristallographie analysiert wurden, ab.

In dieser Arbeit wurden die gemessenen CD-Kurven des Dansyl-BSA an einen CD-Datensatz von 26 globulären Proteinen, wie sie von [Perczel1] verwendet wurden, angehängt.

Die CD-Spektren wurden in 4 Komponenten aufgeteilt, welche den Sekundärstrukturelementen α -Helix, β -Faltblatt, Schleife und Zufallsknäuel entsprechen (Abbildung 14).

Die gefundenen RMS-Abweichungen (*root mean squares*) zwischen den gemessenen und den aus den Kurven der Komponenten berechneten Kurven waren sehr klein. Der mittlere Wert der Abweichung betrug 2,3 (RMS-Werte unter 10 sind im allgemeinen akzeptabel).

Die Abweichungen wurden bestimmt nach:

$$\text{RMS} = 100 \cdot \left[\sum_i (\theta_{\text{gem},i} - \theta_{\text{ber},i})^2 / \sum_i \theta_{\text{gem},i}^2 \right]^{1/2} \quad (60)$$

mit i , der Laufzahl der Datenpunkte eines CD-Spektrums, $\theta_{\text{gem},i}$, der gemessenen molaren Elliptizität, und $\theta_{\text{ber},i}$, der berechneten molaren Elliptizität. Alle Experimente wurden mindestens zweimal durchgeführt.

Die Sekundärstruktur des Modellproteins BSA wird von seinem Anteil an α -Helices dominiert. Daher lässt sich anhand einer Reduzierung des α -Helix-Anteils eine partielle Entfaltung des Proteins (siehe Spektren in den Abbildungen 64 und 65) ersehen. Im Vergleich zum gelösten, nicht bereits adsorbierten BSA, für das eine molare Elliptizität von über $40000^\circ\text{cm}^2 \text{ d mol}^{-1}$ bei 195 nm gemessen werden konnte (Abbildung 64 A), zeigt BSA unter anderen Bedingungen (adsorbiert, desorbiert, pH=3,35) bei 195 nm eine verringerte molare Elliptizität, die auf einen partiellen Verlust an α -Helices hindeutet (Abbildung 64 B, C und 65 D, E).

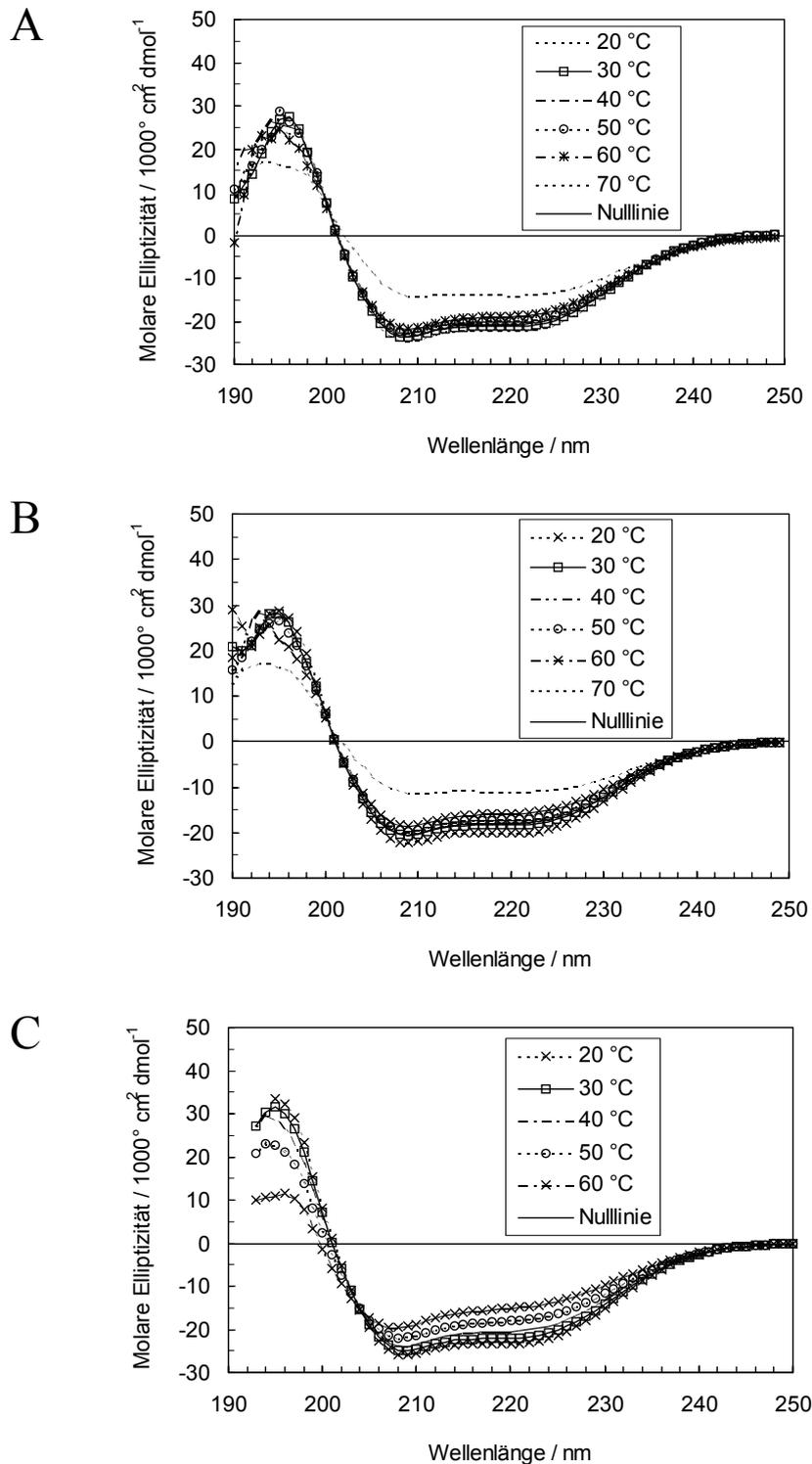


Abbildung 64: CD-Spektren von BSA bei 20 - 70 °C vor der Adsorption (A), desorbiert von der SPB (B), und bei erniedrigtem pH-Wert von 3,35 (C). Die CD-Spektren zeigen bei 20 °C eine Proteinstruktur mit einem großen Anteil an α -Helices.

Hier muss allerdings angemerkt werden, dass die CD-Spektren des BSA in Anwesenheit der SPB-Teilchen vermutlich aufgrund einer starken Absorption und Streuung des UV-Lichts durch die SPB-Teilchen verzerrt erscheinen, so dass eine quantitative Auswertung dieser Spektren nicht möglich ist.

In Tabelle 14 sind die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse des BSA gezeigt. Wie in dem Kapitel 3.1 beschrieben, wurden die CD-Spektren nach der CCA-Methode in α -Helix-, β -Faltblatt, Schleifen- und Zufallsknäuel-Komponenten aufgelöst. Der alternativen Linearkombinationsmethode nach Yang liegen die röntgenkristallographischen Datensätze schon bekannter Modellproteine zu Grunde. Da der Fehler bei der Yang-Analyse (gemittelter RMS-Wert ~ 8) gegenüber der CCA-Analyse (gemittelter RMS-Wert ~ 2) schlechter war, werden die Ergebnisse der Yang-Methode nur zum Vergleich im Anhang (Abbildung A 6 und Tabelle A2) gezeigt. Für die Diskussion und den Vergleich mit Literaturdaten werden im weiteren Verlauf die Ergebnisse der CCA-Methode verwendet.

Die Sekundärstrukturanteile für gelöstes, nicht zuvor adsorbiertes BSA, für von SPB-Teilchen desorbiertes BSA, sowie für nicht zuvor adsorbiertes BSA bei pH=3,35 sind in der Tabelle 14 gezeigt.

Der gemessene α -Helix-Anteil von 68 % für gelöstes BSA vor der Adsorption steht in guter Übereinstimmung mit den Studien von Carter et al. sowie Kossovsky et al. [Carter], [Kossovsky]. In allen unter nicht nativen Bedingungen durchgeführten CD-spektroskopischen Messungen des BSA sinkt dieser Anteil an α -Helices, wohingegen der Anteil an β -Faltblatt- und Zufallsknäuel-Strukturen ansteigt. Der stets beobachtete höhere β -Faltblatt-Anteil bei höheren Temperaturen spiegelt eine intermolekulare β -Faltblatt-Formation wider, die während der temperaturinduzierten Proteinaggregation auftritt [Green1999].

Das desorbierte BSA, welches zuvor schon auf SPB-Teilchen adsorbiert war, hat sich größtenteils zurück in seine native Form gefaltet. Relativ zum nativen BSA ist der α -Helix-Anteil des desorbierten BSA nur um 11 % kleiner, während der β -Faltblatt-Anteil gleich und vernachlässigbar bleibt (Tabelle 14).

Tabelle 14 : Sekundärstruktur des BSA vor der Adsorption, von SPB-Teilchen desorbiert und bei pH=3,35.

<i>T</i> / °C	Anteil der Sekundärstrukturelemente/ %				RMS - Fehler
	α -Helix	β -Faltblatt	Schleife	Zufallsknäuel	
gelöstes BSA					
20	68	0	27	5	1,4
30	66	3	26	5	1,2
40	64	5	24	7	1,2
50	59	9	22	10	1,8
desorbiertes BSA					
20	57	1	36	5	4,2
30	57	2	32	9	2,0
40	56	3	31	10	2,2
50	56	4	30	11	1,6
pH=3,35					
20	58	0	29	13	2,9
30	56	0	29	15	1,6
40	52	1	30	18	1,7
50	43	4	32	20	2,3

Der beim desorbierten BSA beobachtete Verlust an α -Helices wird durch Schleifen-Formationen kompensiert. Der Anteil an Zufallsknäuel bleibt hingegen unverändert.

Für das desorbierte BSA werden keine Anzeichen für einen höheren Grad an Proteinaggregation im Vergleich zum gelösten zuvor nicht adsorbierten BSA gefunden, was auf eine nativ-ähnliche Struktur des desorbierten BSA hinweist.

Im Gegensatz zur Adsorption eines Proteins auf einer festen Oberfläche bewirkt der fluide Charakter der SPB-Teilchen offenbar keine großen Konformationsänderungen bei der Adsorption des Proteins.

Wohingegen auf einer festen Oberfläche nur das Protein zur Optimierung der Protein-Oberflächen-Wechselwirkung durch eine Konformationsänderung beitragen kann, so kann die Optimierung des Kontaktes zwischen dem Protein und den SPB-Teilchen auch durch eine Reorientierung der flexiblen Polyelektrolytketten erreicht werden.

Letztendlich ist es noch interessant, die partielle Entfaltung des BSA, die bei Senkung des pH-Wertes eintritt, mit der adsorptions-induzierten Konformationsänderung während der Protein-SPB-Wechselwirkung zu vergleichen.

Natives BSA bildet durch Senkung des pH-Wertes die sogenannte F-Form zwischen pH=4,3 und 2,7 aus. Bei noch niedrigerem pH-Wert entfaltet BSA zur sogenannten E-Form [Dockal]. Obwohl keine so niedrigen pH-Werte an der SPB/Wasser-Grenzfläche erwartet werden, kann die F- bzw. E-Form dennoch durch Wechselwirkung mit den Polyelektrolyt-Ketten der SPB-Teilchen favorisiert sein.

In der Abbildung 46 C sind CD-Spektren von BSA bei pH=3,35 gezeigt. Die daraus erhaltenen Sekundärstrukturelemente sind in Tabelle 14 aufgeführt. Bei 20 °C und pH=3,35 wurden 58 % α -Helix-, 0 % β -Faltblatt-, 29 % Schleifen- und 13 % Zufallsknäuel-Anteil mit Hilfe der CCA-Analyse gefunden.

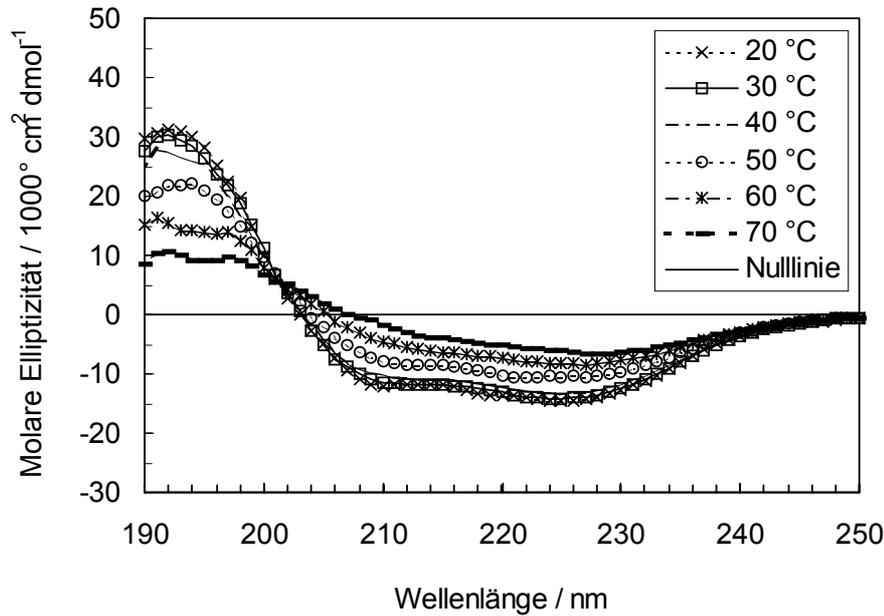
Diese Konformationsanteile stimmen mit denen eines partiell entfalteten Proteins bei erniedrigten pH-Werten überein, was in dem Wechsel von α -Helix- zu Zufallsknäuel-Strukturen zu sehen ist.

Da jedoch die Wechselwirkung des BSA mit den SPB-Teilchen zu einer teilweisen Umformung der α -Helices in Schleifen führt, zeigen die CD-Experimente klar, dass die Konformation des BSA, die durch die Wechselwirkung des BSA mit den SPB-Teilchen induziert wird, nicht mit der F-Form bzw. E-Form des BSA in Beziehung steht, was wiederum in guter Übereinstimmung mit den Fluoreszenz-Experimenten von Czeslik et al. steht [Jackler2004].

Die CD-Spektren des BSA in Anwesenheit der SPB-Teilchen (Abbildung 65) dürfen aufgrund theoretischer Überlegungen, wie bereits erwähnt, nicht quantitativ ausgewertet werden [Urry].

Führt man dennoch eine Sekundärstrukturanalyse durch, findet man eine starke Abnahme des Anteils an α -Helices und eine entsprechende Zunahme des Anteils an β -Faltblättern. Bei einem Massenverhältnis von 0,4 : 1 (BSA : SPB) sind die α -Helices des BSA scheinbar völlig verschwunden, dagegen beträgt der β -Faltblatt-Anteil etwa 80 %. Auch wenn adsorptionsinduzierte Konformationsänderungen des BSA durch Wechselwirkung mit den SPB-Teilchen sicherlich auftreten (BSA hat eine relativ kleine Entfaltung-Gibbs-Energie), so erscheint ein solch hoher β -Faltblatt-Anteil jedoch eher unwahrscheinlich, was bestätigt, dass die CD-Spektren durch den störenden Einfluss der SPB-Teilchen verzerrt werden.

D



E

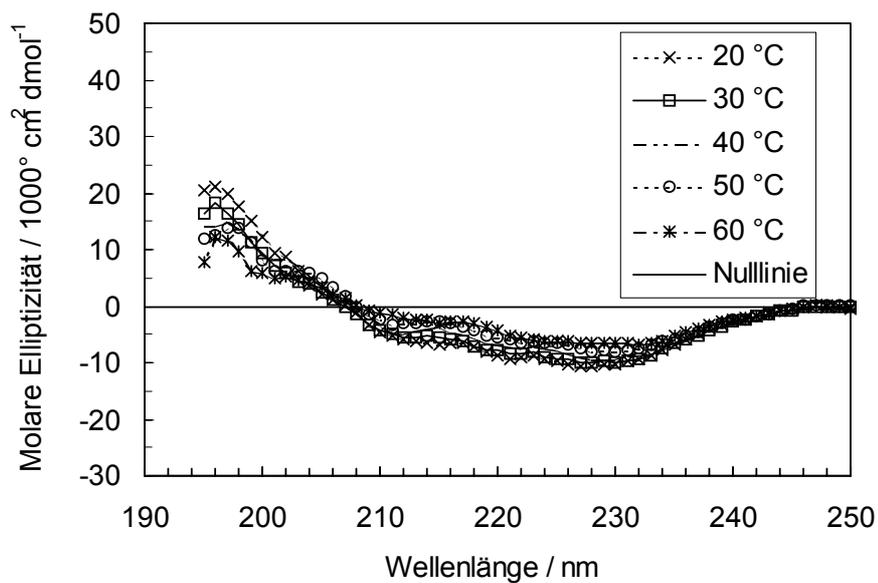


Abbildung 65: Aufgenommene CD-Spektren in dem Wellenlängenbereich 190-250 nm in Abhängigkeit der Temperatur T , aufgetragen in der Einheit molare Elliptizität, bei $\text{pH}=6,1$. Die Abbildung D zeigt an sphärischen Polyelektrolytbürsten adsorbiertes BSA bei einem Massenverhältnis von 2,7 : 1 (BSA : SPB), Abbildung E an sphärischen Polyelektrolytbürsten adsorbiertes BSA bei einem Verhältnis von 0,4 : 1 (BSA : SPB).

6 Zusammenfassung

Proteine bestehen aus einer linearen Polypeptidkette aus bis zu 20 verschiedenen Aminosäuren. Sie sind nahezu an allen biologischen Prozessen beteiligt. Die Proteine fungieren in den Zellen als Katalysatoren für biochemische Reaktionen und steuern den selektiven Stofftransport innerhalb und über das System der Zelle hinaus. Ihre letztendlich spezielle funktionelle Eigenschaft resultiert aus ihrer dreidimensionalen Form der Sekundärstruktur, sowie ihrer Tertiärstruktur. Dieser native, energetisch günstigste Zustand des Proteins wird durch seine Primärstruktur festgelegt. Bestandteile dieser Sekundärstruktur sind α -Helices, β -Faltblätter, Schleifen und Zufallsknäuel.

Steht eine Proteinlösung in Kontakt mit einer festen Oberfläche oder einer Oberfläche mit fluidem Charakter (Polyelektrolyt-Bürsten), adsorbieren Proteine spontan an der Flüssigkeit/Festkörper-Grenzfläche. Eine große Anzahl von Triebkräften wird für diesen Vorgang diskutiert. Hierzu zählen u. a. Konformationsänderungen des Proteins, elektrostatische Anziehungs- und van der Waals-Kräfte, aber auch das in dieser Arbeit beschriebene in Zusammenarbeit mit H. H. von Grünberg entwickelte Modell der *counterion release force*.

Zur Untersuchung der Adsorption der Proteine Hühnereiweiß-Lysozym, Staphylokokken-Nuclease (SNase), sowie Rinder-Serum-Albumin (BSA) auf Siliziumdioxid, Polyelektrolyt-Multischichten (PEM), planaren Polyelektrolyt-Bürsten (PEB) und fluiden sphärischen Polyelektrolyt-Bürsten (SPB) wurden die folgenden Messmethoden in dieser Arbeit angewendet: die Neutronenreflektometrie, die optische Reflektometrie und die CD-Spektroskopie.

Die Neutronenreflexionsexperimente wurden am Hahn-Meitner-Institut Berlin, die CD-Spektroskopie und die optische Reflektometrie in den Laboren des Lehrstuhls für Physikalische Chemie I an der Universität Dortmund durchgeführt.

Adsorption von gelöstem Lysozym und SNase an einer Silizium/Wasser-Grenzfläche

Sowohl Lysozym als auch SNase weisen positive Enthalpieänderungen bei ihrer Adsorption aus der Lösung auf oxidiertes Silizium auf. Entropische Kräfte müssen daher bei diesem Vorgang über enthalpische dominieren.

Die Wechselwirkung zwischen dem Substrat und den Proteinmolekülen ist attraktiv auf Grund der ungleichnamigen Ladungen. Beide untersuchten Proteine besitzen bei einem pH-Wert von 7 eine positive Nettoladung; das Siliziumdioxid ist demgegenüber negativ geladen. Ein größerer ΔH -Wert bei einer stärkeren Protein-Oberflächenbelegung wird durch eine größere Zahl an repulsiven Protein-Protein-Wechselwirkungen verursacht.

Positive Entropieänderungen können zum einen in einer partiellen Dehydratisierung der hydrophoben Substrat- und Proteinoberflächen begründet sein. Zum anderen werden wahrscheinlich durch Protein-Substrat-Wechselwirkungen Lysozym- und SNase-Moleküle partiell entfaltet, so dass deren Konformationsentropie zunehmen sollte.

Eine Temperaturerhöhung hat zur Folge, dass die native Proteinstruktur destabilisiert wird und adsorptions-induzierte Konformationsänderungen bevorzugt werden.

Aus Neutronenreflektivitätsmessungen der Adsorption des Lysozyms auf Siliziumdioxid konnte entnommen werden, dass der Anstieg der Adsorption durch Aufheizen von 23 auf 63 °C durch einen Anstieg sowohl der Adsorbatschichtdicke als auch des Volumenbruches in dem Adsorbat hervorgerufen wird. Aus einem weiteren Aufheizen auf 80 °C resultiert lediglich ein weiteres Anwachsen der Schichtdicke des Lysozymadsorbates, was zu einer Multischicht-Struktur führt. Obwohl gelöstes Lysozym bei einer Temperatur von 70-78 °C (pH=7) entfaltet, erscheint die Struktur der adsorbierten Lysozymmoleküle bei 63 °C eher der bei 80 °C ähnlich, als der bei 23 °C.

Proteinadsorption an einer gleichnamig geladenen Polyelektrolyt-Bürste

Die variable Proteinbindungskapazität einer planaren PAA-Bürste wurde mit Hilfe der Neutronenreflektometrie und theoretischer Überlegungen charakterisiert.

Nachgewiesen werden konnte, dass bei niedriger Ionenstärke große Mengen negativ geladener BSA-Moleküle an einer gleichnamigen PAA-Bürste binden. Bei einer erhöhten Ionenstärke von 0,5 M konnte jedoch mit Hilfe der Neutronenreflektometrie eine Proteinresistenz der Oberfläche beobachtet werden. Diese experimentellen Nachweise entsprechen zuvor durchgeführten Studien an sphärischen PAA-Bürsten-Partikeln. Die Analyse der Neutronenreflektometriekurven zeigt, dass die BSA-Moleküle tief in die PAA-Bürste eindringen. Alle Experimente weisen darauf hin, dass direkte elektrostatische, van der Waals- und hydrophobe Wechselwirkungen nicht für die Proteinaffinität einer PAA-Bürste bei niedriger Ionenstärke verantwortlich sind. Ein einfaches *mean field*-Modell ist im Rahmen dieser Arbeit entwickelt worden, das den Gewinn von freier Energie durch Freisetzung von Gegenionen, wenn ein Protein-Molekül aus der Lösung in eine gleichnamiggeladene Polyelektrolyt-Bürste eindringt, voraussagt. Diese Gegenionen-„Verdampfung“ ist entropischer Natur und kann über abstoßend wirkende Coulomb-Energien dominieren, wie in dem BSA/PAA-System. Die experimentellen und theoretischen Ergebnisse dieser Studie legen somit eine neue fundamentale Triebkraft für die Proteinadsorption an Grenzflächen nahe. Die Änderung der Ionenstärke einer Proteinlösung im Bereich einiger 100 mM läßt die Struktur und Dynamik eines gelösten Proteinmoleküls unberührt. Das „Schalten“ der Proteinaffinität einer PAA-Bürste durch Änderung der Ionenstärke der Lösung ist wahrscheinlich unabhängig von dem untersuchten Protein, was den Einsatz einer PAA-Bürste in biotechnologischen Anwendung als sehr erfolgsversprechend erscheinen läßt. Zum einen scheint eine einfache und günstige Möglichkeit gegeben, Oberflächen in einem salzhaltigen Medium proteinresistent zu machen (Abbildung 66).

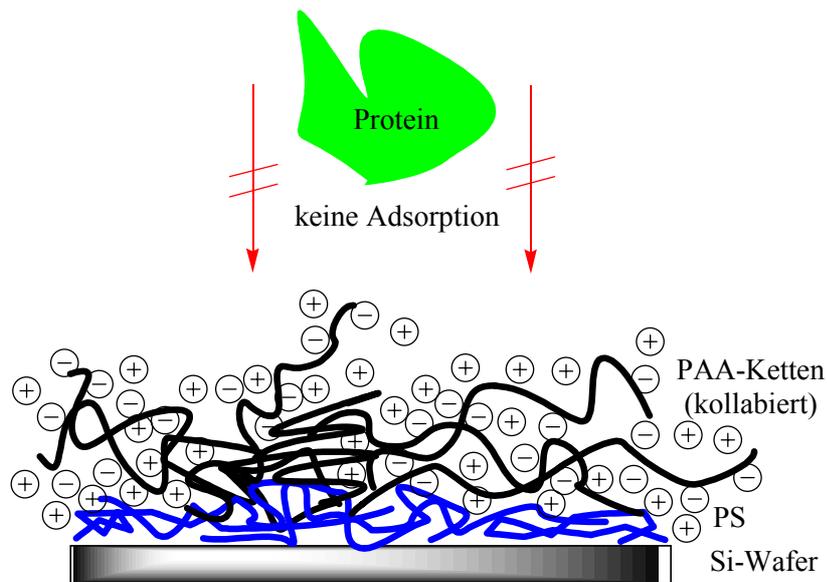


Abbildung 71: Bei hoher Ionenstärke in der Lösung erscheint eine PAA-Bürste proteinresistent.

Zum anderen ist die Verwendung als Wirkstoffträger oder Nanoreaktoren in Form von sphärischen Polyelektrolytbürsten denkbar, bei denen die Wirkstoffe (Enzyme) an der Polyelektrolytbürste zunächst immobilisiert und später durch Erhöhung des Salzgehaltes in ihrer Umgebung wieder freigesetzt werden (Abbildung 67).

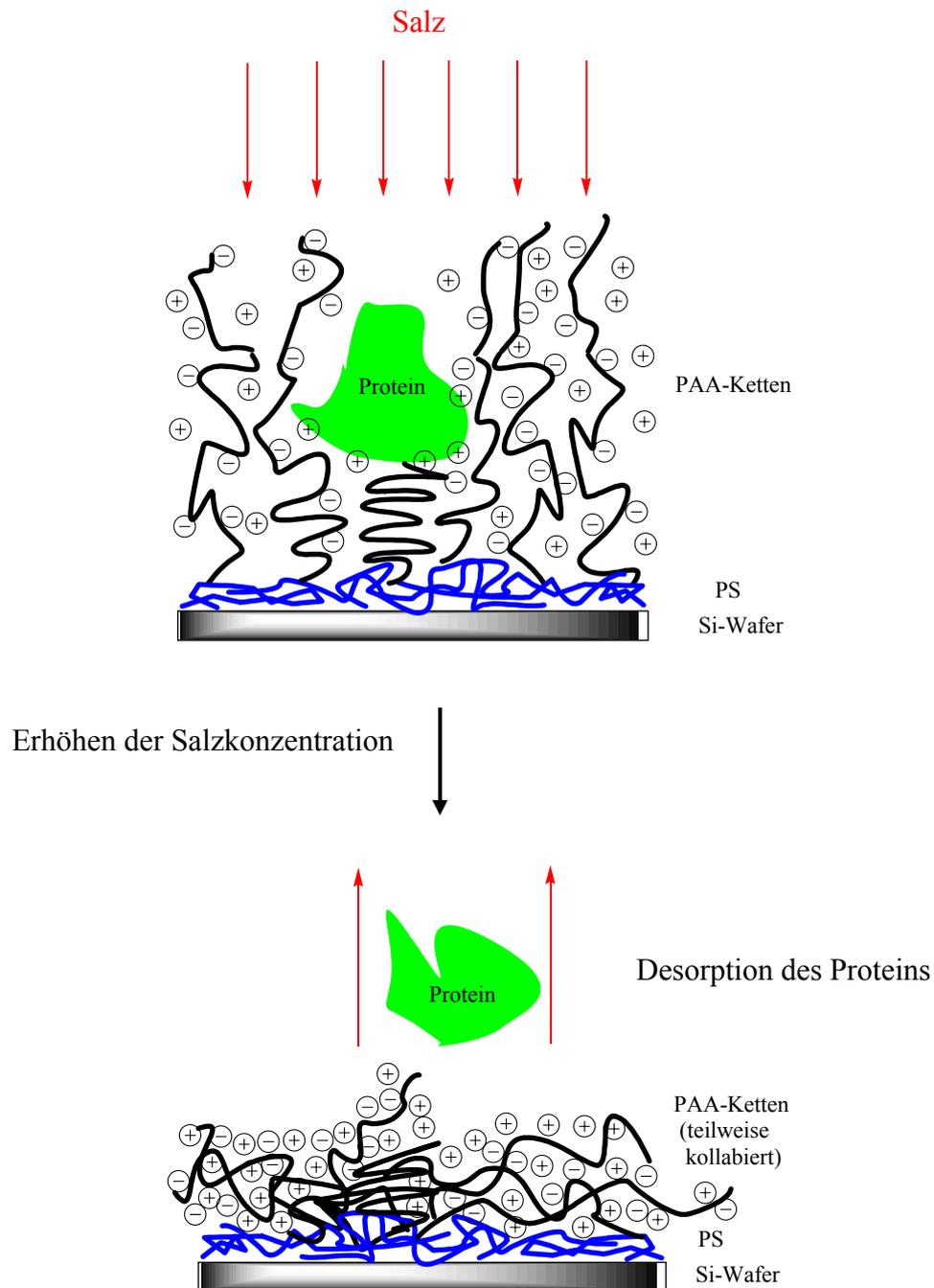


Abbildung 67: Proteindesorption durch Erhöhen der Salzkonzentration. Die hohe Salzkonzentration führt zu einem Kollabieren der Polyelektrolyt-Bürste und zur gleichzeitigen Desorption des adsorbierten Proteins. Hohe Salzkonzentrationen bewirken eine Proteinresistenz der mit einer Polyelektrolytbürste beschichteten Oberfläche. So kann die Protein-Adsorption nicht nur durch die Wahl der Salzkonzentration kontrolliert, sondern auch von Beginn an unterbunden werden.

Besonders wichtig ist hierbei der Aspekt, dass, wie im Rahmen dieser Arbeit (s. u.) und in den Studien von [Ballauff2004] gezeigt werden konnte, Proteine nach der salzinduzierten

Desorption aus der Polyelektrolyt-Bürste ihre Konformation und biologische Aktivität nahezu beibehalten.

Adsorption von SNase an einer Polyelektrolyt-Multischicht

Polyelektrolyt-Multischichten bieten ein neues Forschungsfeld für die Beschichtung von planaren und kolloiden Substraten. Ihre Herstellung ist einfach. Alternierender Kontakt eines geladenen Substrates mit positiven bzw. negativen Polyelektrolyten führt zu einer selbstanordnenden (*self-assembled*) Multischicht, die einzigartige Eigenschaften aufweist. Der schrittweise Aufbau eines dreidimensionalen Schichtensystems erlaubt den Einbau einer Vielzahl von Verbindungen und Partikeln, wie Proteinen, Nanopartikeln, Biopolymeren (DNA) und vielen anderen Stoffen. Zu den möglichen Anwendungsbereichen dieser planaren Schichtensysteme zählt der Gebrauch als Matrixmaterial für funktionalisierte oder biologische molekulare Funktionseinheiten, wie Biosensoren, Trennungsmembranen oder ähnliches.

In dieser Arbeit wurde die räumliche Verteilung des Proteins SNase, das mit einer planaren Polyelektrolyt-Multischicht interagiert, mit Hilfe neutronenreflektometrischer Messungen bestimmt.

Durchgeführt wurden die Messungen bei den Temperaturen 22 °C und 42 °C und bei zwei unterschiedlichen Nettoladungen des Proteins (isoelektrischer Punkt der SNase: 9,5), die durch Wahl des pD-Wertes zu 4,9 bzw. 7,5 erreicht wurde. Die Polyelektrolyt-Multischicht wurde auf einem Silizium-Wafer durch das Auftragen von Polyethylenimin (PEI), Polystyrolsulfonat (PSS) und Polyallylaminhydrochlorid (PAH) in der Reihenfolge Si-PEI-PSS-(PAH-PSS)₅ hergestellt. Unter Kontrastvariation wurden für jede Bedingung von Temperatur und pD-Wert zwei unterschiedliche Reflektivitätskurven gemessen. Aus der Analyse der Reflektivitäts-Kurven konnte das Protein-Dichteprofil senkrecht zur Grenzfläche berechnet werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die SNase teilweise in die Polyelektrolyt-Multischicht nach der Adsorption bei allen untersuchten Versuchsbedingungen eindringt. Die gemessenen Neutronenreflektivitäten stimmen mit einer Eindringtiefe von 50 Å bei einem pH-Wert von 4,9 und 25 Å bei 7,5 überein.

Da SNase einen isoelektrischen Punkt von 9,5 hat, trägt das Protein bei beiden untersuchten pD-Werten eine positive Netto-Ladung und interagiert mit der äußeren letzten PSS-Schicht unter elektrostatisch anziehenden Kräften. Mit ansteigender Temperatur steigt die Menge an adsorbiertem Protein bei beiden pD-Werten an, was die Dominanz einer entropisch treibende Kraft anzeigt. Bei einem pD-Wert von 4,9, bei dem eine relativ hohe Proteinladung vorliegt, ist der temperaturinduzierte Massenanstieg der immobilisierten Proteinmoleküle stärker innerhalb der Polyelektrolytschicht ausgeprägt. Hingegen hat bei einem pD-Wert von 7,5, der näher am isoelektrischen Punkt der SNase liegt, die Erhöhung der Temperatur den Effekt, dass sich die Proteinmoleküle außerhalb der Polyelektrolyt-Multischicht an der Wassergrenzfläche anreichern. Daraus kann geschlossen werden, dass das Eindringen der SNase in eine Polyelektrolyt-Multischicht hauptsächlich auf einem Komplexierungsmechanismus beruht aufgrund einer Entlassung von Gegenionen.

Sphärische Polyelektrolyt-Bürsten als Trägerpartikel für Proteinen

Sphärische Polyelektrolyt-Bürsten (SPB) sind eine neue und sehr interessante Art von Kolloid-Partikeln. Sie bestehen aus einem Polystyrolkern, auf dem lange Ketten aus Polyacrylsäure (PAA) oder Polystyrolsäure (PSS) verankert sind. Bei geringer Ionenstärke adsorbieren Proteine spontan auf diesen Partikeln. Eine ihrer besonderen Eigenschaften ist ihre Proteinresistenz bei moderaten Salzkonzentrationen. Daher ist es möglich, durch Erhöhung der Ionenstärke bereits adsorbiertes Protein wieder von den Polyelektrolytketten zu lösen. Dadurch, dass Enzyme auf den SPB geladen und wieder entlassen werden können, bietet sich in Zukunft eine mögliche Anwendung als Wirkstoffträger an. Desweiteren scheint eine mögliche Anwendung als Nanoreaktor, der das immobilisierte Enzym nach einer gewünschten Reaktion wieder aus den SPB entlassen kann, sehr erfolgsversprechend.

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie wurde in dieser Arbeit die Konformation eines Proteins, welches mit einer sphärischen Polyelektrolytbürste wechselwirkt, untersucht. Rinder-Serum-Albumin (BSA) wurde als Modellprotein gewählt. Es trägt bei neutralen pH-Werten aufgrund seines isoelektrischen Punktes von pH=5 eine negative Nettoladung und besteht in seiner Sekundärstruktur größtenteils aus α -Helices.

Die Ergebnisse der CD-Messungen zeigen, dass BSA durch Wechselwirkung mit SPB, d.h. nach einem Adsorptions-Desorptions-Prozess, nur geringfügig seine Sekundärstruktur verändert. Dabei stehen die beobachteten Konformationsänderungen nicht in Zusammenhang mit denen, die in Lösung bei niedrigen pH-Werten gefunden werden. SPB erweisen sich somit als vielversprechende Trägerpartikel für Proteine, da sie eine schonende Proteinumgebung bereit stellen.

7 Literaturverzeichnis

- [Arai1990] Arai, T.; Norde, W. *Colloids Surf.* **1990**, *51*, 1-15.
- [Arai1999] Arai, S.; Hirai, M. *Biophys. J.* **1999**, *76*, 2192-2197.
- [Ball1995] Ball, A.; Jones, R. A. L. *Langmuir* **1995**, *11*, 3542-3548.
- [Ball2000] Ball, V.; Ramsden, J. J. *Colloids Surf. B* **2000**, *17*, 81-94.
- [Ballauff1999] Ballauf, M.; Sharma, G. *Macromolecules*, **1999**, *32*, 6043-6046.
- [Ballauff2003] Ballauf, M. *Macromol. Chem. Phys.* **2003**, *204*, 220-234.
- [Ballauff2004] Ballauf, M.; Neumann, T.; Haupt, B. *Macromolecular Bioscience* **2004**, *4*, 13-16.
- [Barthlott] Barthlott, W.; Neinhuis, C. *Planta* **1997**, *202*, 1.
- [Biesheuvel] Biesheuvel, P. M.; Cohen Stuart, M. A. *Langmuir* **2004**, *20*, 4764-4770.
- [Born] Born, M.; Wolfe, E. *In Principles of Optics*, Cambridge University Press: Cambridge **1999**.
- [Büscher] Büscher, K.; Graf, K.; Ahrens, H.; Helm, C. A. *Langmuir* **2002**, *18*, 3585-3591.
- [Buijs] Buijs, J.; Hlady, V. J. *Colloid Interface Sci.* **1997**, *190*, 171-181.
- [Carter] Carter, D. C.; Ho, J. X. *Adv. Protein Chem.* **1994**, *45*, 153-203.
- [Cubitt2003] Cubitt, R.; Fragneto, G. *Langmuir* **2003**, *19*, 7685-7687.
- [Currie] Currie, E. P. K.; Sieval, A. B.; Avena, M.; Zuilhof, H.; Sudhölter, E. J. R.; Cohen Stuart, M. A. *Langmuir* **1999**, *15*, 7116-7118.
- [Creighton] Creighton, T. E. *Proteins*; W. H. Freeman and Company: New York, **1993**.
- [Czeslik2001] Czeslik, C.; Winter, R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3*, 235-239.
- [Czeslik2003] Czeslik, C.; Royer, C.; Hazlett, T.; Mantulin, W. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 2533-2541.
- [Czeslik2004/1] Czeslik, C.; Jansen, R.; Ballauff, M.; Wittemann, A.; Royer, C. A.; Gratton, E.; Hazlett, T. *Phys. Rev. E* **2004**, *69*, 021401.
- [Czeslik2004/2] Czeslik, C. *Z. Phys. Chem.* **2004**, *218*, 771-801.
- [Czeslik2004/3] Czeslik, C.; Jackler, G.; Steitz, R.; von Grünberg, H.-H. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 13395-13402.

- [Dahm] Dahm, M.; Pruefer, D.; Oster, O.; Groh, E.; Oelert, H. *J. Heart Valve Disease* **1996**, *5*, 148.
- [De Feijter] De Feijter, J. A.; Benjamins, J.; Veer, F. A. *Biopolymers* **1978**, *17*, 1759-1772.
- [Dockal] Dockal, M.; Carter, D. C.; Rüker; F. *J. Biol Chem* **2000**, *275*, 3042-3050.
- [Decher1992] Decher, G.; Schmitt, J. *Progress in Colloid & Polymer Science* **1992**, *89*, 160-164.
- [Decher1997] Decher, G. *Science* **1997**, *277*, 1232-1237.
- [Deserno] Deserno, M.; von Grünberg, H. H. *Phys. Rev. E* **2002**, *66*, 011401.
- [Dijt] Dijt, J. C.; Cohen Stuart, M. A.; Fler, G. J. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1994**, *50*, 79-101.
- [Donnan] Donnan, F. G. *Chem. Rev.* **1924**, *1*, 73-90.
- [Estrela-Lopis] Estrela-Lopis, I.; Leporatti, S.; Moya, S.; Brandt, A.; Donath, E. and Möhwald, H. *Langmuir* **18**, 7861-7866 (2002).
- [Evans] Evans, D. F.; Wennerström, H. *The Colloidal Domain: Where Physics, Chemistry, Biology and Technology Meet*; VCH: New York, **1994**.
- [Evers] Evers, O. A.; Scheutjens, J. M. H. M.; Fler, G. J. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1990**, *86*, 1333.
- [Fasman] Fasman, D. G. *Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, CRC Press: Boston **1992**.
- [Feijter] Feijter, J. A. de; Benjamins, J.; Veer, F. A. *Biopolymers* **1978**, *17*, 1759.
- [Fuchs] Fuchs, S.; Cuatrecasas, P.; Anfinsen, C. B. *J. Biol. Chem* **1967**, *242*, 4768-4770.
- [Green1999] Green, R. J.; Hopkinson, I.; Jones, R. A. L. *Langmuir* **1999**, *15*, 5102-5110.
- [Green2001] Green, R. J.; Su, T. J.; Lu, J. R.; Penfold, J. J. *Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 1594-1602.
- [Greenfield] Greenfield, N. *J. Anal. Biochem.* **1996**, *235*, 1-10.
- [Grünberg] von Grünberg, H. H.; Fleck, C. *Physical Review E* **2001**, *63*, 061804.
- [Hansen] Hansen, W. N. *J. Opt. Soc. Am.* **1968**, *58*, 380-390.
- [Halperin] Halperin, A. *Langmuir* **1999**, *15*, 2525-2533.
- [Hariharan] Hariharan, R.; Biver, C.; Russel, W. B. *Macromolecules* **1998**, *31*, 7514-7518.
- [Haynes] Haynes, C. A.; Norde, W. *J. Colloid Interface Sci.* **1995**, *169*, 313-328.

- [Hiemenz] Hiemenz, P. C.; Rajagopalan, R. *Principles of colloid and surface chemistry* Marcel Dekker: New York **1997**.
- [Higgins] Higgins, J. S.; Benoît, H. C. *Polymers and Neutron Scattering*; Oxford University Press: Oxford **1996**.
- [HMI/1] <http://www.hmi.de/bensc/instrumentation/instrumente/v6/v6.html>
- [HMI/2] www.hmi.de/bensc/instrumentation/instrumente/v6/refl/parratt_en.htm
- [Israëls1993] Israëls, R.; Leermakers F. M.; G. J. Fleer *Macromolecules* **1993**, *26*, 5405.
- [Israëls1994] Israëls, R.; Leermakers F. M.; G. J. Fleer *Macromolecules* **1994**, *27*, 3087-3093.
- [Jackler2002] Jackler, G.; Steitz, R.; Czeslik, C.; *Langmuir* **2002**, *18*, 6565-6570.
- [Jackler2004] Jackler, G.; Wittemann, A.; Ballauff, M.; Czeslik, C. *Spectroscopy* **2004**, *18*, 289-299.
- [Janiak] Janiak, C. *Chem. unserer Zeit* **2001**, *55*, 348.
- [Jansen] Jansen, R. *J. Mol. Biol.* **2004**, submitted.
- [Jeon1991/1] Jeon, S. I.; Lee, J. H.; Andrade, J. D.; de Gennes, P. G. *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *142*, 149-158.
- [Jeon1991/2] Jeon, S. I.; Andrade, J. D. *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *142*, 159-166.
- [Jones] Jones, R. A. L.; Richards, R. W. *Polymers at Surfaces and Interfaces*; Cambridge University Press: Cambridge **1999**.
- [Kawaguchi] Kawaguchi, H. *Prog. Polym. Sci.* **2000**, *25*, 1171-1210.
- [Kern1978] Kern, E; Vossen, J. *Thin Film Processes* Academic Press: New York **1978**.
- [Kern1990] Kern, W. *J. Electrochem. Soc.* **1990**, *137*, 1887-1892.
- [Kossovsky] Kossovsky, N.; Nguyen, A.; Sukiassians, K.; Festekjian, A.; Gelman, A.; Sponsler, E. *J. Colloid Interface Sci.* **1994**, *166*, 350-355.
- [Lakowicz] Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* Kluwer Academic/ Plenum, New York **1999**.
- [Lee] Lee, S. J.; Park, K. *J. Vac. Sci. Technol. A* **1994**, *12*, 2949-2955.
- [Lottspeich] Lottspeich, F.; Zorbas, H. (eds.) *Bioanalytik* **1998**, Spektrum, Heidelberg.
- [Malmsten2003] Malmsten, M. (ed.) *Biopolymers at interfaces*; Marcel Dekker: New York **2003**.
- [Manning] Manning, G. S. *J. Chem. Phys.* **1969**, *51*, 924-933.

- [Meier-Koll] Meier-Koll, A.; Fleck, C. C.; von Grünberg, H. H. *J. Phys.: Condens. Matter* **2004**, *16*, 6041-6052.
- [Mezei] Mezei, F.; Golub, R.; Klose, F.; Toews, H. *Physica B* **1995**, *213/214*, 898-900.
- [NCNR] <http://www.ncnr.nist.gov/resources/n-lengths/list.html>
- [Neumann] Neumann, T.; Haupt, B.; Ballauff, M. *Macromol. Biosci.* **2004**, *4*, 13-16.
- [Ngankam] Ngankam, A. P.; Mao, G. and Van Tassel, P. R. *Langmuir* **2004**, *20*, 3362-3370.
- [Norde1992] Norde, W.; Anusiem, A. C. I. *Colloids Surf.* **1992**, *66*, 73-80.
- [Norde1996] Norde, W. *Macromol. Symp.* **1996**, *103*, 5-18.
- [Overbeek] Overbeek, J. T. G. *Prog. Biophys. Biophys. Chem.* **1956**, *6*, 58-84.
- [Panick] Panick G.; Malessa R.; Winter R.; Rapp G.; Frye K. J.; Royer C. A. *J. Mol. Biol.* **1998**, *275*, 389-402.
- [Perczel1991] Perczel, A.; Hollosi, M.; Tusnady, G., Fasman, G. D. *Protein Engineering* **1991**, *4*, 669-679.
- [Perczel1992] Perczel, A.; Park, K.; Fasman, G. D. *analyt. Biochem.* **1992**, *203*, 83-93.
- [PDB] <http://www.rcsb.org/pdb/>
- [Peters] Peters, T. *Adv. Protein Chem.* **1985**, *37*, 161-245.
- [Privalov1974] Privalov, P. L.; Khechinashvili, N. N. *J. Mol. Biol.* **1974**, *86*, 665-684.
- [Remmele] Remmele, R. L.; McMillan, P.; Bieber, A. *J. Prot. Chem.* **1990**, *9*, 475-486.
- [Riegler] Riegler, H.; Essler, F. *Langmuir* **2002**, *18*, 6694-6698.
- [Roberts] Roberts, G. (ed.) *Langmuir-Blodgett Films*; Plenum Press: New York, **1990**.
- [Roth1993] Roth, C. M.; Lenhoff, A. M. *Langmuir* **1993**, *9*, 962-972.
- [Roth1995] Roth, C. M.; Lenhoff, A. M. *Langmuir* **1995**, *11*, 3500-3509.
- [Roth1996] Roth, C. M.; Neal, B. L.; Lenhoff, A. M. *Biophys. J.* **1996**, *70*, 977.
- [Rupp] <http://www-structure.llnl.gov/cd/cdtutorial.htm>
- [Russell1990] Russell, T. P. *Mater. Sci. Rep.* **1990**, *5*, 171-271.
- [Scheutjens1979] Scheutjens, J. M. H. M.; Fleer, G. J. *J. Phys. Chem.* **1979**, *83*, 1619.
- [Scheutjens1980] Scheutjens, J. M. H. M.; Fleer, G. J. *J. Phys. Chem.* **1979**, *84*, 178.
- [Schönhoff] Schönhoff, M. *Colloid and Interface Science* **2003**, *8*, 86-95.
- [Sever] Sever, M. J.; Weisser, J. T.; Monahan, J.; Srinivasan, S.; Wilker, J. J. *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 454.

- [Steiner] Steiner, R. F. *Biochim. Biophys. Acta* **1964**, 79, 51-63.
- [Steitz] Steitz, R.; Leiner, V.; Siebrecht, R.; von Klitzing, R. *Colloids Surf. A* **163**, 63-70 (2000).
- [Stryer] Stryer, L. *Biochemie*, Spektrum: Heidelberg **1990**.
- [Su1998/1] Su, T. J.; Lu, J. R.; Thomas, R. K.; Cui, Z. F.; Penfold, J. *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, 8100-8108.
- [Su1998/2] Su, T. J.; Lu, J. R.; Thomas, R. K.; Cui, Z. F.; Penfold, J. *Langmuir* **1998**, 14, 438-445.
- [Su1998/3] Su, T. J.; Lu, J. R.; Thomas, R. K.; Cui, Z. F.; Penfold, J. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, 203, 419-429.
- [Szleifer] Szleifer, I. *Biophys. J.* **1997**, 72, 595-612.
- [Tamashiro] Tamashiro, M. N.; Levin, Y.; Barbosa, M. C. *Eur. Phys. J. B* **1998**, 1, 337-343.
- [Tolan] Tolan, M. Press, W. Z. *Kristallogr.* **1998**, 213, 319-336.
- [Ulman] Ulman, A. *An Introduction to ultrathin organic films: from Langmuir-Blodgett to self-assembly* **1997**, Academic Press Inc..
- [Urry] Urry, D. W. *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, 265, 115-168.
- [Van Stokkum] Van Stokkum, I. H. M.; Linsdell, H.; Hadden, J. M.; Haris, P. I.; Chapman, D.; Bloemendal, M. *Biochemistry* **1995**, 34, 10508-10518.
- [Wang] Wang, R.; Bright, F. V. *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 4231-4238.
- [Wedin] Wedin, R. E.; Delepierre, M.; Dobson, C. M.; Poulsen, F. M. *Biochemistry* **1982**, 21, 1098-1103.
- [Winter1998] Winter, R.; Noll, F. *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, Teubner Studienbücher: Stuttgart **1998**.
- [Wittemann2003] Wittemann, A.; Haupt, B.; Ballauff, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, 5, 1671-1677.
- [Wittemann2004] Wittemann, A.; Ballauff, M. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 2813-2819.
- [Yang] Yang, J. T. *Method in Enzymol.* **1998**, 130, 208.
- [Yoon] Yoon, B. J.; Lenhoff, A. M. *J. Phys. Chem.* **1992**, 96, 3130.
- [Zhdanov] Zhdanov, V. P.; Kasemo, B. *Langmuir* **2001**, 17, 5407-5409.

8 Anhang

8.1 Kontaktwinkelmessungen

Alle Kontaktwinkelmessungen wurden an der Technischen Universität Berlin von Herrn Dr. Steffen Uredat durchgeführt. Die Messungen erfolgten an einer am Hahn-Meitner-Institut (Berlin) präparierten PAA-Bürste, die auf einen mit d-PS beschichteten Si-Wafer nach der Langmuir-Schäfer-Methode aufgetragen wurde.

Die Form eines Tropfens (ein Ergebnis seiner Gibbs-Energie) wird auf einer flachen homogenen Oberfläche von der Gibbs-Energie, dieser Oberfläche beeinflusst. Die Beziehung zwischen der Gibbs-Energie der Oberfläche und einem Kontaktwinkel wird durch die Gleichung A1 nach Young beschrieben.

$$\gamma_{LV} \cos\theta = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} \quad (\text{A1})$$

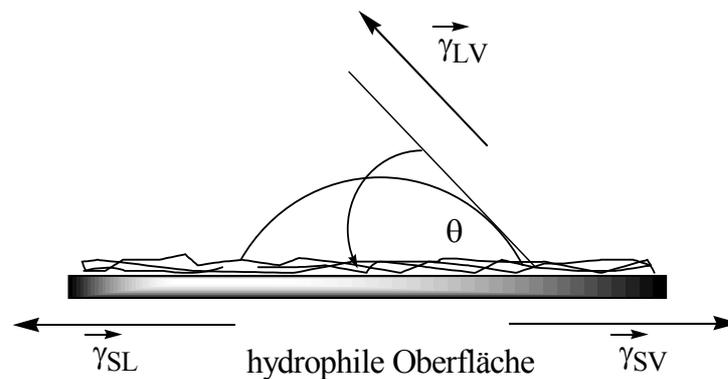


Abbildung A1: Interpretation der auf einen Tropfen wirkenden Kräfte und des so resultierenden unikalen Kontaktwinkels am Beispiel einer hydrophilen Oberfläche (γ kennzeichnet die Grenzflächenspannung an der fest/ flüssig-(SL), flüssig/ gasförmig-(LV) und der fest/ gasförmig-(SV) Grenzfläche).

Die erhaltenen Daten wurden nur qualitativ hinsichtlich der Hydrophilie bzw. Hydrophobizität der präparierten Oberfläche interpretiert. Zu sehen sind die Ergebnisse in den Abbildungen A2, A3 und A4, sowie in Tabelle A1. Hierbei wurden unterschiedliche Salzkonzentration und pH-Werte der Lösung untersucht.

Tabelle A1: Aus drei Messungen gemittelte Kontaktwinkel verschiedener Lösungen auf einer trockenen PAA-Bürste ($\pm 3^\circ$ Fehler).

pH	Ionenstärke	Kontaktwinkel
3.4	10 mM	72°
3.2	500 mM	74°
9.1	10 mM	45°
9.1	500 mM	58°

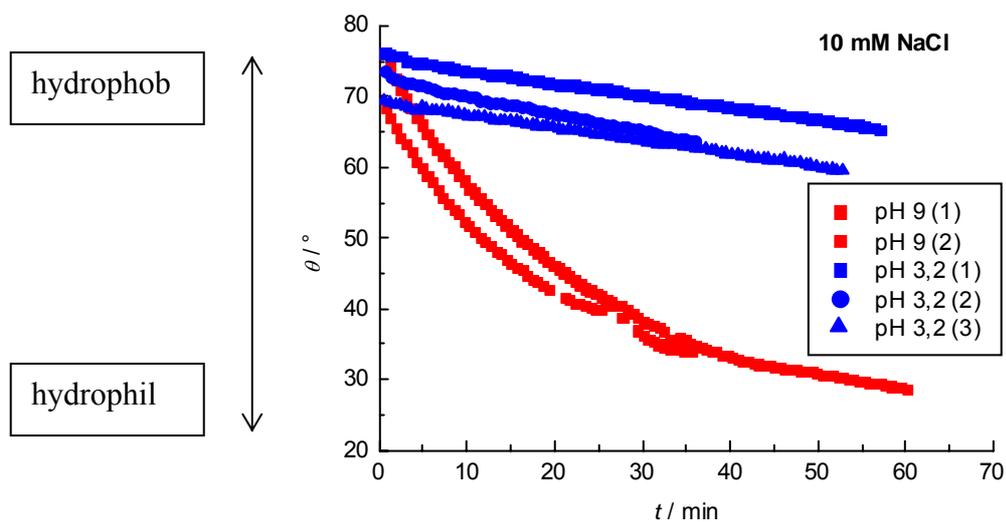


Abbildung A2: Kontaktwinkelmessungen auf einer PAA-Bürste (Verankerungsdichte $0,15 \text{ nm}^2$) bei einer Ionenkonzentration von 10 mM NaCl und pH-Werten von 9 und 3,2.

Bei niedrigen Salzkonzentrationen und einem alkalischen pH-Wert sind die Polyacrylsäureketten größtenteils dissoziiert, was zu einer hydrophilen Oberfläche führt. Ein niedriger pH-Wert bewirkt eine Protonierung der Ketten und erzeugt eine hydrophobere Oberfläche.

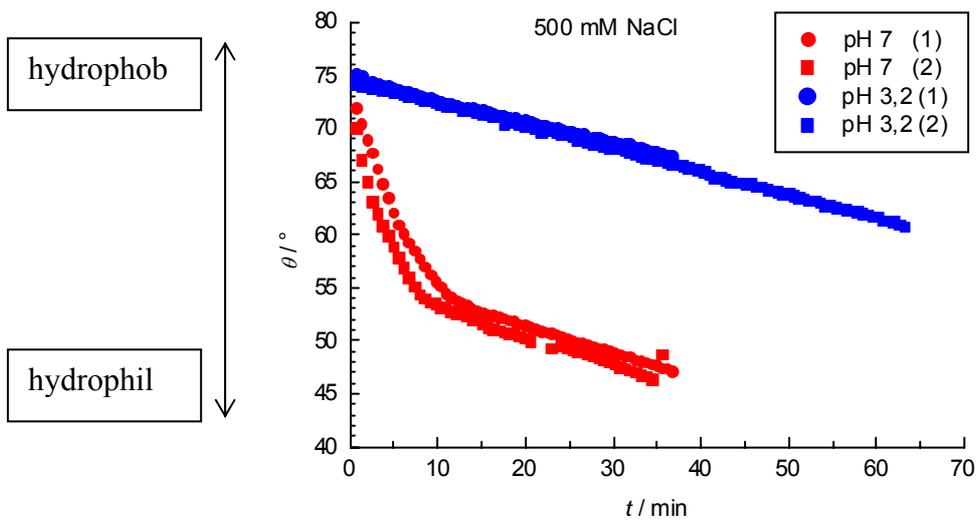


Abbildung A3: Kontaktwinkelmessungen auf einer PAA-Bürste (Verankerungsdichte $0,15 \text{ nm}^2$) bei einer Ionenkonzentration von 500 mM NaCl und pH-Werten von 7 und 3,2.

Bei hoher Salzkonzentration und neutralem pH-Wert sind die Polyacrylsäure-Ketten größtenteils dissoziiert, was zu einer hydrophilen Oberfläche führt. Ein niedriger pH-Wert bewirkt wiederum eine Protonierung der Ketten und erzeugt eine hydrophobere Oberfläche.

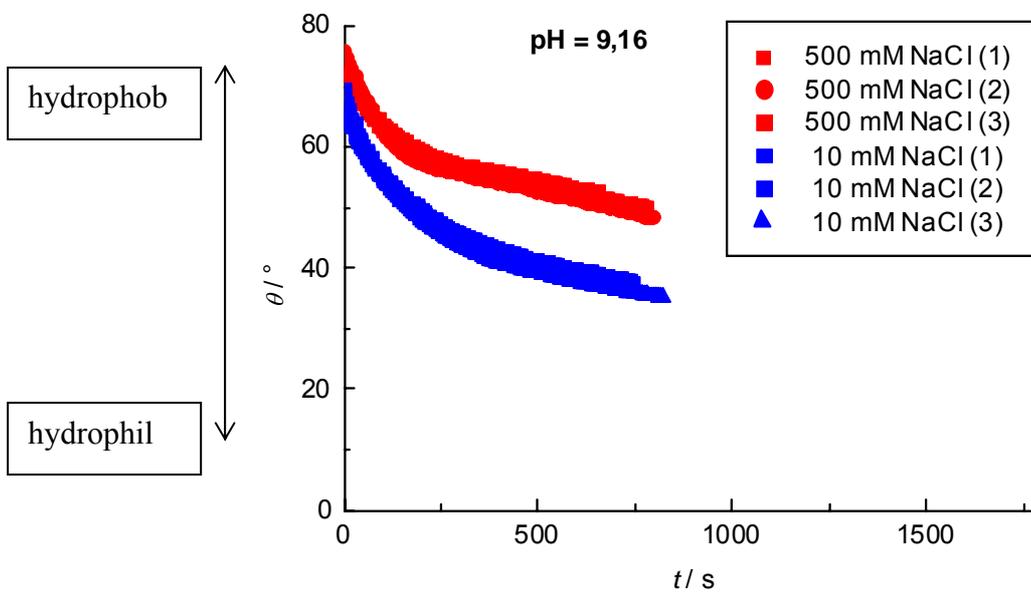


Abbildung A4: Kontaktwinkelmessungen auf einer PAA-Bürste (Verankerungsdichte $0,15 \text{ nm}^2$) bei Ionenkonzentrationen von 10 mM und 500 mM NaCl und einem pH-Wert von 9,16.

Wird das Verhalten einer PAA-Bürste in einer alkalischen Lösung betrachtet, so kann der Effekt der Salzkonzentration auf das Verhalten der Bürste interpretiert werden: Eine niedrige

Salzkonzentration führt zu einem hohen osmotischen Druck in der Bürste, wodurch die Bürste hydrophiler erscheint. Bei hoher Salzkonzentration im Tropfen sinkt der osmotische Druck, und es ergibt sich ein größerer Kontaktwinkel.

8.2 Tabellen und Abbildungen der Sekundärstrukturanalyse von BSA

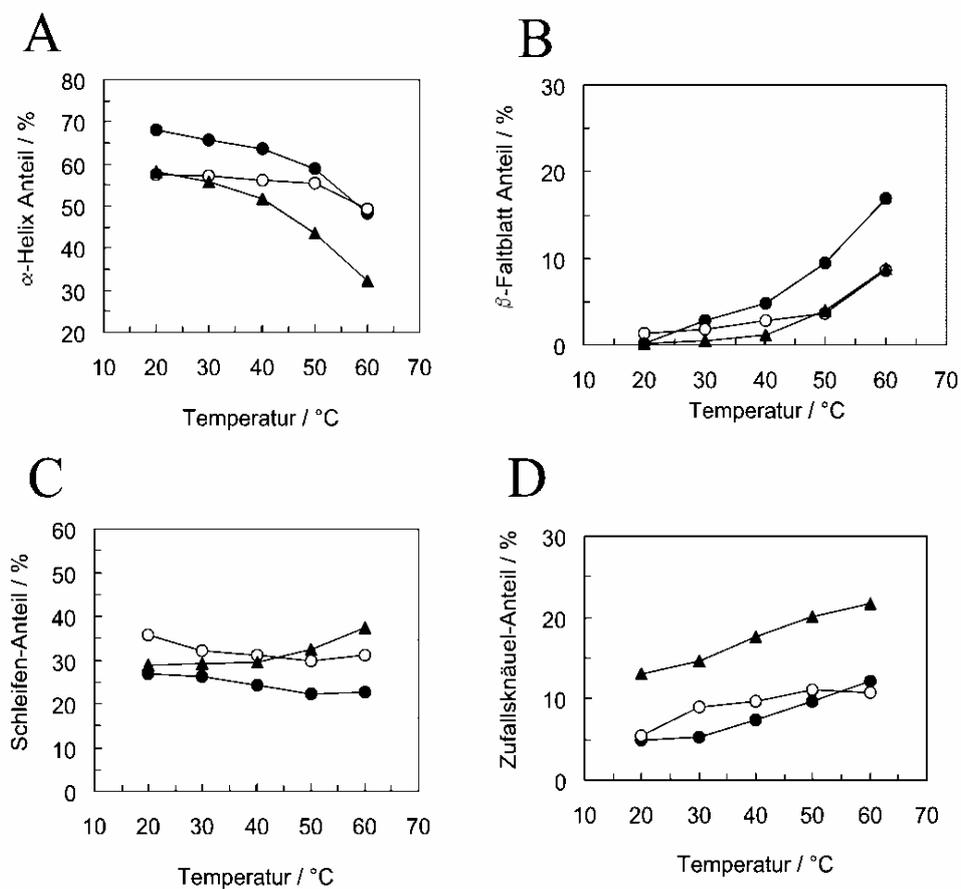


Abbildung A5: Sekundärstrukturanteile von BSA berechnet nach der CCA-Methode aus CD-Spektren in Abhängigkeit der Temperatur. Die gefüllten Kreise zeigen die Sekundärstruktur des in 10 mM MES-Puffer (pH=6,1) gelösten BSA, die nicht gefüllten Kreise die des in 10 mM MES-Puffer (pH=6,1) gelösten desorbierten BSA und die gefüllten Dreiecke die Sekundärstruktur des BSA bei einem pH-Wert von 3,35 in 10 mM MES-Puffer. Die Abbildung A zeigt den Sekundärstrukturanteil an α -Helices, Abbildung B den Sekundärstrukturanteil an β -Faltblättern, Abbildung C den Sekundärstrukturanteil an Schleifen und Abbildung D den Sekundärstrukturanteil an Zufallsknäueln.

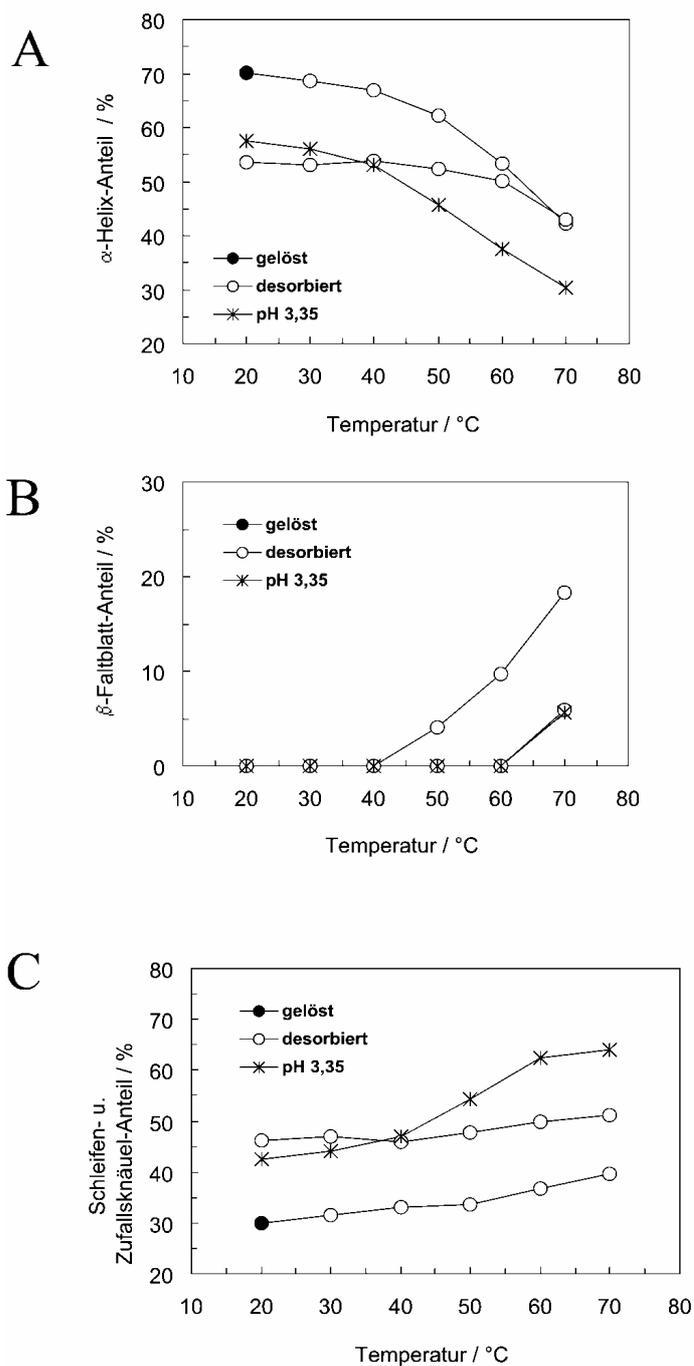


Abbildung A6: Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse nach Yang (Linearkombination von Referenzspektren). Die Sekundärstrukturanteile an α -Helix (A), β -Faltblatt (B), sowie Schleife und Zufallsknäuel (C) sind in Abhängigkeit der Temperatur für einen Bereich von 20 – 70 °C aufgetragen.

Tabelle A2: Auswertung nach Yang.

Temperatur/ °C	α -Helix/ %	β -Faltblatt/ %	Schleife/ %	Zufallsknäuel/ %	Schleife + Zufallsknäuel/ %
gelöstes BSA (pH=6,1)					
20	70,1	0,0	2,5	27,4	29,9
30	68,6	0,0	3,5	28,0	31,5
40	66,9	0,0	4,7	28,5	33,2
50	62,3	4,1	5,8	27,9	33,6
60	53,5	9,7	8,1	28,8	36,9
70	42,2	18,3	1,3	25,3	39,6
desorbiertes BSA (pH=6,1)					
20	53,7	0,0	15,2	31,1	46,3
30	53,1	0,0	16,9	30,0	46,9
40	54,0	0,0	15,8	30,3	46,1
50	52,4	0,0	18,4	29,3	47,7
60	50,2	0,0	17,9	32,0	49,9
70	42,9	5,9	22,8	28,5	51,3
gelöstes BSA (p=3,35)					
20	57,6	0,0	12,0	30,5	42,5
30	56,0	0,0	11,9	32,2	44,1
40	53,1	0,0	13,2	33,7	46,9
50	45,7	0,0	17,6	36,7	54,3
60	37,5	0,0	19,3	43,3	62,6
70	30,4	5,6	19,0	45,1	64,1

Meinen herzlichsten Dank...

Ohne das Vertrauen von Prof. Dr. Roland Winter wäre diese Arbeit niemals möglich gewesen. Deshalb gilt mein größter Dank ihm.

Mein allerherzlichster Dank gilt Dr. Claus Czeslik für die interessante Themenstellung und seine kompetente Betreuung sowie die stete Diskussionsbereitschaft, die diese Arbeit erst ermöglicht haben. Seine unermüdete Unterstützung ermöglichte die Veröffentlichung dieser interessanten Ergebnisse.

An dieser Stelle möchte ich Prof. Dr. J. Pohl für die freundliche Übernahme des Koreferats danken.

Für die freundschaftliche und erfolgreiche Zusammenarbeit bei meinen Forschungsaufenthalten am Hahn-Meitner-Institut (BENSC) in Berlin bedanke ich mich insbesondere bei Dr. Roland Steitz.

Bei Dr. Jörg Eisenblätter, Dr. Christine Lorkowski, Dr. Kai Hochgesand, Dipl.-Chem. Julia Kraineva, Dipl.-Chem. Chiara Nicolini und Dipl.-Biochem. Karsten Vogtt bedanke ich mich für freundliche Bereitschaft, mir bei wissenschaftlichen und weniger wissenschaftlichen Fragestellungen und Diskussionen zur Seite zu stehen.

Allen Mitarbeitern, insbesondere Dr. Heinz Herberhold, Dipl.-Phys. Nicolai Smolin, Dr. Sascha Fahsel, Monika Khurana und allen anderen des Arbeitskreises PC I, möchte ich für das freundschaftliche Arbeitsklima und die stets vorhandene Bereitschaft zur Zusammenarbeit danken.