

Chapter 6

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde das Modelprotein RNase A in verschiedene mesoporöse Silikatmaterialien, wie MCM-48, SBA-15, C₁₆-MCM-41 und C₁₂-MCM-41 eingekapselt. Diese Materialien besitzen eine glasähnliche Wandstruktur und definierte Poren, so dass sie eine begrenzte hydrophile Mikroumgebung bilden. Die durchschnittliche Porengröße dieser Materialien ist entsprechend 25 Å, 58 Å, 40 Å bzw. 30 Å; die spezifischen Porenvolumina betragen 0.93 cm³ g⁻¹, 1.25 cm³ g⁻¹, 0.86 cm³ g⁻¹ bzw. 0.70 cm³ g⁻¹.

Es hat sich gezeigt, daß alle untersuchten mesoporösen Molekularsiebe ein hohes Potential aufweisen Proteine sehr schnell zu immobilisieren. Für die hexagonalen Phasenmaterialien MCM-41 und SBA-15 entspricht die Menge des immobilisierten Proteins einer Funktion aus Porengröße und dem spezifischen Porenvolumen (z.B. SBA-15 > C₁₆-MCM-41 > C₁₂-MCM-41). Die kubische, miteinanderwobene Porenstruktur von MCM-48 scheint günstiger für den Proteintransfer und die Migration im Inneren der Mesoporen zu sein. Obwohl die Porengröße des kubischen MCM-48 (2.5 nm) kleiner ist als die des hexagonalen C₁₂-MCM-41 (3 nm), ist die Menge an immobilisiertem Protein im MCM-48 höher. Für alle vier untersuchten Materialien nimmt die Menge an immobilisiertem Protein mit abnehmendem spezifischem Porenvolumen ab (z.B. SBA-15 > C₁₆-MCM-41 > MCM-48 > C₁₂-MCM-41). Die Menge an immobilisiertem Protein kann ebenfalls durch die elektrische Ladung, die Hydrophobizität und der Stabilität der Proteinstruktur beeinflusst werden. Die Proteinbeladung wurde durch eine Veränderung des pH-Wertes der Proteinlösung und durch das Einführen von Co-Solventien eingestellt. Die maximale Beladung wurde bei pH 7 und 9 erreicht, was nahe am isoelektrischen Punkt der RNase A (9.6) ist. Das Hinzufügen von chaotropen Co-Solventien wie Urea, führt zu einer höheren Proteinbeladung, z.B. von 108 mg/g zu 126 mg/g für 3.5 M Urea im Falle von MCM-48. Andererseits führen ein geringerer

pH-Wert und das Hinzufügen von kosmotropen Co-Solventien wie Glycerol, zu einer geringeren Proteinbeladung, z.B. von 108 mg/g zu 98 mg/g für 3.5 M Glycerol bei Verwendung von MCM-48. Die hauptsächliche Antriebskraft für die Proteinmigration in die MPS Poren ist wahrscheinlich die hydrophobe Dehydratation, doch auch elektrostatische, dipolare und dispersive Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen tragen zur Adsorptionsaffinität bei [Norde 1996, Roth 1993].

Die "difference scanning calorimetry" (DSC) und die "pressure perturbation calorimetry" (PPC) wurden hier angewendet, um die Stabilität und die Volumenveränderung ebenso wie die Hydratationseigenschaften des eingeschlossenen Proteins als eine Funktion des pH-Wertes und verschiedener Co-Solventien zu evaluieren. Aufgrund eines signifikanten stabilisierenden Effekts, weist das immobilisierte Protein eine große Verschiebung (über 30°C bei pH 5.5) in der Entfaltungstemperatur im Raum von 25-58 Å auf. Diese Stabilisierung wird gegenüber der temperatur-induzierten Entfaltung weiterhin mit einem Protein verstärkt, welches bei höherem pH-Wert immobilisiert wird. Die Übergangstemperatur T_m für ein eingeschlossenes Protein z.B. steigt von 98°C bei pH 5.5 auf 107°C bei pH 9 im Falle von C₁₆-MCM-41; die maximale Proteinbeladung wurde nahe des isoelektrischen Punkts beobachtet. Es wurde ebenfalls herausgefunden, daß das Hinzufügen von kosmotropen (Glycerol) und chaotropen (Urea) Co-Solventien unterschiedliche Einflüsse auf die Proteinimmobilität und auf das Entfaltungsszenario hat.

In Verbindung mit MPS ist das Protein teilweise eingeschlossen. Jedoch ein Teil der Proteinfraction verbleibt in der Pufferlösung und entfaltet wie ein freies, nicht eingeschlossenes Protein. Das entfaltete Protein vergrößert die für das Lösungsmittel zugängliche Oberfläche ("accessible surface area", ASA) des Proteins, was zu einer höheren Affinität der Adsorption an die Silikatoberfläche des MPS führt. Bei der Verwendung von Urea findet ein Adsorptionsprozess solchen Maßes nicht statt, da die ASA des entfalteten Proteins größtenteils von Urea gebunden wird. Eine Aggregation des adsorbierten entfalteten Proteins wird durch die Präsenz von Glycerol begünstigt. Das Protein RNase A, eingeschlossen in die Mesoporen des MPS, entfaltet bei sehr viel höheren Temperaturen im Vergleich zum freien Protein. Dies geschieht wahrscheinlich nicht nur wegen des ausgeschlossenen Volumens sondern auch wegen der Zunahme der Hydratation des Proteins in den engen Mesoporen, wie es die PPC Ergebnisse veranschaulichen. Es wurde gezeigt, dass α und $d\alpha/dT$ Werte für das Protein, eingebaut in SBA-15, sich drastisch verstärken und pH abhängig sind. Beispielsweise betragen bei pH 2 die Werte für $\alpha(10^\circ\text{C})$ und $d\alpha/dT$ $1.1 \times 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ und $-8.3 \times 10^{-6} \text{ K}^{-2}$, bei pH 5.5 $\alpha(10^\circ\text{C})$ und $d\alpha/dT$ $1.4 \times 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ und $-1.5 \times 10^{-5} \text{ K}^{-2}$ und bei

pH 9 $\alpha(10^\circ\text{C})$ und $d\alpha/dT$ $2.1 \times 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ und $-2.9 \times 10^{-5} \text{ K}^{-2}$, verglichen mit den korrespondierenden Werten von $0.85 \times 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ und $-4 \times 10^{-6} \text{ K}^{-2}$ für RNase A in reiner Pufferlösung. Die sehr viel höheren α und niedrigeren $d\alpha/dT$ Werte für das eingekapselte Protein indizieren, dass das Protein in den Silikatporen stärker hydratisiert ist. Auch für die mit Glycerol und Urea beinhaltenden Proteinproben, führt das Einschließen zu einer Zunahme der Entfaltungstemperatur im Vergleich zum freien Protein. So beträgt z.B. $\Delta T_m \approx 37^\circ\text{C}$ bei Präsenz von 3.5 M Glycerol und ungefähr 35°C bei 3.5 M Urea. Doch immer noch ist es nicht ganz klar, ob und in welchem Maße, das eingeschlossene Protein Aggregate bildet. Was aber klar ist, ist dass das unterstützende Material mit einer festen Porenanzahl eine normale dreidimensionale Aggregation ausschließen sollte.