

Untersuchung der Biokompatibilität planarer Poly(acrylsäure)-Bürsten und des Einflusses von Cosolventien auf die Proteinadsorption

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der
Fakultät Chemie
der
Technischen Universität Dortmund

von **Christian Reichhart**
(geboren in Aachen)

Dortmund, August 2010

Erstgutachter: PD Dr. Claus Czeslik

Zweitgutachter: Prof. Dr. Heinz Rehage

Tag der mündlichen Prüfung:

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn PD Dr. Claus Czeslik für die exzellente Betreuung dieser Doktorarbeit. Aufgrund der Kombination eines ausgesprochen fruchtbaren und interessanten Aufgabenfeldes mit einer umfangreichen und sehr geduldigen Unterstützung mit Rat und Tat ist es erst möglich gewesen, diese Arbeit in ihrer jetzigen Fassung entstehen zu lassen.

Bei Herrn Prof. Dr. Roland Winter bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Bereitstellung von Ausrüstung und Arbeitsumfeld.

Herrn Prof. Dr. Heinz Rehage danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Bei allen Korrekturleserinnen und Korrekturlesern bedanke ich mich für den Einsatz von Zeit und Nerven.

Herrn Dr. Oliver Hollmann, Herrn Dr. Daniel Sellin sowie Frau Dr. Andrea Gohlke danke ich für die praktische Einweisung und die stets vorhandene Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises bedanke ich mich für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft.

Besonders bedanke ich mich bei meiner Familie (meinen Eltern und meinen drei Schwestern) für ihre bedingungslose Unterstützung in all meinen Belangen.

Weiterhin bedanke ich mich bei meinem ehemaligen Chemielehrer, Herrn Dr. Uwe Hofmann, für die Art, mit der er mir früh die Begeisterung für die Chemie nahe gebracht hat, und die Förderung mit viel zeitlichem Einsatz.

Abschließend bedanke ich mich beim Fonds der Chemischen Industrie für die Gewährung und stets unkomplizierte Handhabung meines Promotionsstipendiums.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretischer und methodischer Hintergrund	11
2.1	<i>Proteine</i>	11
2.1.1	Lysozym	12
2.1.2	α -Lactalbumin	13
2.1.3	Serumalbumin	15
2.1.4	Peroxidase	16
2.1.5	Insulin	18
2.2	<i>ATR-FTIR-Spektroskopie mit Proteinen</i>	20
2.2.1	Grundlagen der Spektroskopie	20
2.2.2	Quantenmechanische Grundlage der IR-Spektroskopie	22
2.2.3	IR-Spektroskopie mit Proteinen	24
2.2.4	Messtechnik der Fourier-Transform-IR-Spektroskopie	25
2.2.5	Mathematische Verbesserung der Bandenauflösung	26
2.2.6	Kurvenanpassung zur Quantifizierung der Sekundärstruktur	28
2.2.7	Grenzflächensensitive IR-Spektroskopie mittels ATR-Technik	29
2.3	<i>TIRF-Spektroskopie mit Proteinen</i>	32
2.3.1	Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie	32
2.3.2	Fluoreszenzspektroskopie mit Proteinen	34
2.3.3	Grenzflächensensitive Fluoreszenzspektroskopie mittels TIRF	35
2.4	<i>Enzymkinetik</i>	37
2.4.1	Eigenschaften von Enzymen	37
2.4.2	Michaelis-Menten-Kinetik	38
2.5	<i>Monomolekulare Filme</i>	40
2.5.1	Grenzflächenkonzentration, Oberflächenspannung und Spreitungsdruck	40
2.5.2	Langmuir-Trog	42
2.5.3	Präparation von PAA-Bürsten	44

3	Experimentelles	45
	3.1 Chemikalien und Geräte	45
	3.1.1 Chemikalien	45
	3.1.2 Geräte	46
	3.1.3 Puffersysteme	46
	3.2 Operationen zur Messvorbereitung	47
	3.2.1 Reinigung von Quarzglasplatten für die TIRF-Spektroskopie	47
	3.2.2 Reinigung von internen Reflexionselementen aus Silizium für die ATR-FTIR-Spektroskopie	47
	3.2.3 Reinigung von Siliziumwafern für Enzymkinetikmessungen	47
	3.2.4 Beschichtung von Quarzglasplatten für die TIRF-Spektroskopie mit Poly(styrol)	48
	3.2.5 Beschichtung von internen Reflexionselementen aus Silizium für die ATR-FTIR-Spektroskopie mit Poly(styrol)	48
	3.2.6 Beschichtung von Siliziumwafern für Enzymkinetikmessungen mit Poly(styrol)	48
	3.2.7 Vorbereitung des Langmuir-Troges für die Präparation von planaren PAA-Bürsten ausgehend von Poly(styrol)-beschichteten Oberflächen	49
	3.2.8 Präparation einer planaren PAA-Bürste auf mit Poly(styrol) vorbeschichteten Quarzglasplatten für die TIRF-Spektroskopie mit Hilfe der Langmuir-Blodgett-Technik	49
	3.2.9 Präparation einer planaren PAA-Bürste auf mit Poly(styrol) vorbeschichteten internen Reflexionselementen aus Silizium für die ATR-FTIR-Spektroskopie mit Hilfe der Langmuir-Schäfer-Technik	50
	3.2.10 Präparation einer planaren PAA-Bürste auf mit Poly(styrol) vorbeschichteten Siliziumwafern für Enzymkinetikmessungen mit Hilfe der Langmuir-Blodgett-Technik	52
	3.2.11 Einbau von (modifizierten) Quarzglasplatten in eine TIRF-Versuchsanordnung	52
	3.2.12 Einbau von (modifizierten) internen Reflexionselementen aus Silizium in das ATR-FTIR-Spektrometer	54
	3.2.13 Einbau von (modifizierten) Siliziumwafern in eine selbstgebaute Mikrotiterplatte für Enzymkinetikmessungen	56

3.3	<i>Ablauf der TIRF-Spektroskopie-Experimente</i>	57
3.3.1	Untersuchung der Adsorption von Lysozym und BSA an einer PAA-Bürste in An- und Abwesenheit von Harnstoff mittels TIRF-Spektroskopie bei neutralem / physiologischem pH-Wert	57
3.3.2	Untersuchung der Adsorption von Lysozym und BSA an einer Quarzglas- und Poly(styrol)-Oberfläche in Abhängigkeit von der An- und Abwesenheit von Hofmeistersalzen mittels TIRF-Spektroskopie bei pH = 7	59
3.4	<i>Ablauf der ATR-FTIR-Spektroskopie-Experimente</i>	61
3.4.1	Untersuchung der Struktur von BSA und α -Lactalbumin an einer planaren PAA-Bürste unter pH-neutralen Bedingungen mittels ATR-FTIR-Spektroskopie	62
3.4.2	Untersuchung der Struktur von Lysozym, BSA und RNase A an einer PAA-Bürste in An- und Abwesenheit von Harnstoff mittels ATR-FTIR-Spektroskopie bei neutralem / physiologischem pH-Wert	64
3.4.3	Untersuchung der Struktur von Insulin an einer PAA-Bürste bei pH = 2 in Gegenwart von 2 M Glycerin- sowie 500 mM NaCl-Lösung unter Verwendung der ATR-FTIR-Spektroskopie	66
3.4.4	Untersuchung der Adsorption von Lysozym und BSA an einer Silizium- und Poly(styrol)-Oberfläche in An- und Abwesenheit verschiedener ionischer Cosolventien bei neutralem pH-Wert	67
3.4.5	Ermittlung von Sekundärstrukturanteilen aus der Amid I'-Bande flächennormierter Proteinspektren	68
3.5	<i>Ablauf der Messungen zur Enzymkinetik von HRP</i>	69
3.5.1	Vergleich der enzymatischen Aktivität von Meerrettichperoxidase an einer PAA-Bürste und an einer Siliziumoberfläche bei pH = 7.4	71
3.5.2	Vergleich der enzymatischen Aktivität von Meerrettichperoxidase an einer PAA-Bürste und in Lösung über deren Desorption mit 300 mM Kochsalzlösung bei physiologischem pH-Wert	72
3.5.3	Vergleich der enzymatischen Aktivität von Meerrettichperoxidase an einer PAA-Bürste und in Lösung durch Abblockexperimente mit Rinderserumalbumin bei physiologischem pH-Wert	75

4	Ergebnisse und Diskussion	81
4.1	<i>Struktur von Proteinen an planaren PAA-Bürsten unter pH-neutralen Bedingungen</i>	81
4.1.1	Sekundärstrukturänderungen von Rinderserumalbumin an einer planaren PAA-Bürste im Vergleich zu gelöstem Protein bei neutralem pH-Wert	81
4.1.2	Sekundärstrukturänderungen von α -Lactalbumin an einer planaren PAA-Bürste im Vergleich zu gelöstem Protein unter pH-neutralen Bedingungen	86
4.1.3	Sekundärstrukturänderungen von Hühnerlysozym und Rinderinsulin durch Proteinadsorption an einer PAA-Bürste bei neutralem pH-Wert im Vergleich mit für Rinderserumalbumin und α -Lactalbumin erhaltenen Ergebnissen	89
4.2	<i>Enzymatische Aktivität von Meerrettichperoxidase an einer planaren PAA-Bürste</i>	91
4.2.1	Vergleich der enzymatischen Aktivität von an einer planaren PAA-Bürste und an einer Siliziumoberfläche adsorbierter Meerrettichperoxidase bei pH = 7.4	91
4.2.2	Vergleich der enzymatischen Aktivität von HRP in Lösung und an der PAA-Bürste bei pH = 7.4 durch Proteindesorption mit 300 mM NaCl-Lösung	95
4.2.3	Vergleich der enzymatischen Aktivität von HRP in Lösung und an der PAA-Bürste bei pH = 7.4 durch Abblockexperimente mit Rinderserumalbumin	103
4.3	<i>Struktur und Adsorption von Insulin an einer planaren PAA-Bürste unter sauren Bedingungen und in Anwesenheit von Cosolventien</i>	110
4.3.1	Einfluss von 500 mM NaCl und 2 M Glycerin auf die Sekundärstruktur von an einer PAA-Bürste adsorbiertem Insulin unter sauren Bedingungen	111
4.3.2	Vergleich mit Ergebnissen der Neutronenreflektometrie unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses von Glycerin	116

4.4	<i>Denaturierung von Lysozym und Rinderserumalbumin an einer planaren PAA-Bürste durch Harnstoff</i>	123
4.4.1	Ergebnisse der ATR-FTIR-Spektroskopie für Lysozym an einer planaren PAA-Bürste in An- und Abwesenheit von 9.5 M Harnstoff bei neutralem pH-Wert	124
4.4.2	Ergebnisse der ATR-FTIR-Spektroskopie für BSA an einer planaren PAA-Bürste in An- und Abwesenheit von 8.0 M Harnstoff bei neutralem pH-Wert	129
4.4.3	Fluoreszenzspektroskopische Ergebnisse für Lysozym an einer planaren PAA-Bürste in An- und Abwesenheit von 9.5 M Harnstoff bei neutralem pH-Wert	132
4.4.4	Fluoreszenzspektroskopische Ergebnisse für BSA an einer planaren PAA-Bürste in An- und Abwesenheit von 8.0 M Harnstoff unter pH-neutralen Bedingungen	137
4.5	<i>Proteinadsorption in Gegenwart ionischer Cosolventien</i>	141
4.5.1	ATR-FTIR-spektroskopische Untersuchung der Adsorption von Rinderserumalbumin an einer Silizium- und Poly(styrol)-Oberfläche in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Hofmeistersalzen bei neutralem pH-Wert	142
4.5.2	ATR-FTIR-spektroskopische Untersuchung der Adsorption von Hühnerlysozym an einer Silizium- und Poly(styrol)-Oberfläche in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Hofmeistersalzen bei neutralem pH-Wert	152
4.5.3	TIRF-spektroskopische Voruntersuchungen zum Einfluss der Anwesenheit von Hofmeistersalzen auf die Adsorption von Hühnerlysozym und BSA an einer Silizium- und Poly(styrol)-Oberfläche bei neutralem pH-Wert	155
5	Zusammenfassung	161
6	Literaturverzeichnis	I
7	Anhang	XIII

Weitere Teile im Kopf der Arbeit in dieser Reihenfolge:

Publikationsliste, Abkürzungsverzeichnis

Publikationsliste

Im Rahmen dieser mit einem Promotionsstipendium des Fonds der Chemischen Industrie geförderten Arbeit sind die nachfolgend aufgeführten Publikationen entstanden:

- “Native-Like Structure of Proteins at a Planar Poly(acrylic acid) Brush”;
C. Reichhart, C. Czeslik *Langmuir* **2009**, 25 (2), 1047-1053.

- “A Quantitative Study of the Enzymatic Activity of Horseradish Peroxidase at a Planar Poly(acrylic acid) Brush”;
C. Reichhart, C. Czeslik *Colloids Surf. B* **2010**, 75 (2), 612-616.

- “Probing Adsorption and Aggregation of Insulin at a Poly(acrylic acid) Brush”;
F. Evers, C. Reichhart, R. Steitz, M. Tolan, C. Czeslik *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, 12 (17), 4375-4382.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung	Deutsche Übersetzung
ACS	<u>A</u> merican <u>C</u> hemical <u>S</u> ociety	
ATR	<u>A</u> ttenuated <u>T</u> otal <u>R</u> eflection	Abgeschwächte Totalreflexion
BSA	<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin	Rinderserumalbumin
DNA	<u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>A</u> cid	Desoxyribonucleinsäure
FSD	<u>F</u> ourier <u>S</u> elf- <u>D</u> econvolution	Fourier Selbstentfaltung
FT	<u>F</u> ourier- <u>T</u> ransform	
ELISA	<u>E</u> nzyme- <u>L</u> inked <u>I</u> mmunosorbent <u>A</u> ssay	Verfahren zum enzymgekoppelten Nachweis von Immunoassoziation
hCG	<u>h</u> umanes <u>C</u> horiongonadotropin	
HRP	<u>H</u> orseradish <u>p</u> eroxidase	Meerrettichperoxidase
IgG	<u>I</u> mmunglobulin <u>G</u>	
Inc.	<u>I</u> ncorporated	
IR	<u>I</u> nfrarot	
IRE	<u>I</u> nternes <u>R</u> eflexionselement	
MCT	<u>M</u> ercury <u>C</u> admium <u>T</u> ellur	Quecksilber Cadmium Tellur
MOPS	3-(<u>N</u> - <u>M</u> orpholino)- <u>p</u> ropansulfonsäure	
NADH	<u>N</u> icotinamidadenin <u>d</u> inukleotid (reduzierte Form)	
PAA	<u>P</u> oly(<u>a</u> crylic <u>a</u> cid)	Poly(acrylsäure)
RCSB	<u>R</u> esearch <u>C</u> ollaboratory for <u>S</u> tructural <u>B</u> ioinformatics	
RNase A	<u>R</u> ibonuclease <u>A</u>	
SAM	<u>S</u> elf <u>A</u> ssembled <u>M</u> onolayer	selbst zusammengesetzte Monoschicht
SGE	<u>S</u> cientific <u>G</u> lass <u>E</u> ngineering	
TIRF	<u>T</u> otal <u>I</u> nternal <u>R</u> eflection <u>F</u> luorescence	Interne Totalreflexion (mit) Fluoreszenz
UCFS	<u>U</u> niversity of <u>C</u> alifornia, <u>S</u> an <u>F</u> rancisco	
USP	<u>U</u> nited <u>S</u> tates <u>P</u> harmacopeia	
UV	<u>u</u> ltraviolett	
WTW	<u>W</u> issenschaftlich- <u>T</u> echnische <u>W</u> erkstätten GmbH	

1 Einleitung

Die Adsorption von Proteinen an Grenzflächen zwischen wässriger und fester Phase hat neben wissenschaftlicher auch für den menschlichen Alltag Bedeutung und kann sowohl erwünschter als auch unerwünschter Natur sein [1]. Nützlich ist es beispielsweise, komplexe Proteingemische mit Hilfe von Biochips anhand ihrer unterschiedlichen Wechselwirkungen mit verschiedenartig modifizierten Oberflächenbereichen aufzutrennen und nachfolgend genauer zu charakterisieren [2]. So können auf der Oberfläche des Chips diverse Antikörper zur spezifischen Anbindung der Proteine angebracht sein. Für unspezifische Wechselwirkungen mit der Oberfläche werden an Bindungsstellen mit z. B. positiven oder negativen Ladungen oder hydrophoben Bereichen die Voraussetzungen geschaffen. Auch eine Anbindung über DNA, Enzyme oder Metallkationen ist möglich (vgl. **Abbildung 1** oben).

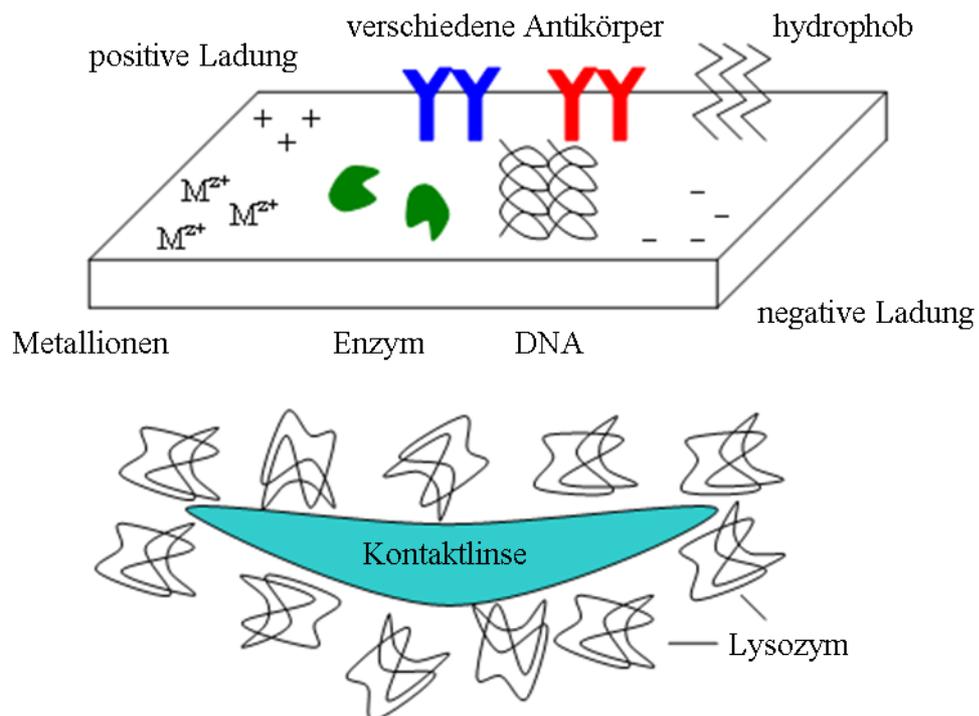


Abbildung 1. Biochips (oben) und Kontaktlinsen (unten) als Beispiele für die Bedeutung der Proteinadsorption an wässrig-festen Grenzflächen.

Eine ganze Serie von Anwendungsmöglichkeiten der spezifischen Adsorption von Proteinen wird unter dem Begriff ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) zusammengefasst. Im Allgemeinen werden hierbei Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen an einer Oberfläche über eine enzymkatalysierte Chromogenumwandlung nachgewiesen [3]. Ein bekanntes Beispiel sind Schwangerschaftstests. Das Schwangerschaftshormon Choriongonadotropin (hCG) fungiert in diesem Zusammenhang als Antigen. Dieses im Urin einer schwangeren

Frau gelöste Protein wird von einem frei beweglichen enzymgekoppelten Antikörper (IgG) gebunden. In der Nachweisregion ist ein Antikörper an der Oberfläche des Teststreifens verankert, der ebenfalls hCG bindet. Auf diese Weise reichert sich dort ein „Sandwich-Komplex“ aus immobilisiertem Antikörper, hCG und dem enzymbeladenen Antikörper an. Die resultierende enzymkatalysierte Farbstoffbildung zeigt das positive Testergebnis an. In einer zweiten Nachweisregion wird der mobile enzymbeladene Antikörper von einem weiteren auf der dortigen Oberfläche fixierten unmittelbar gebunden, so dass in dieser Region unabhängig von der Anwesenheit des Hormons ein Farbstoff gebildet werden sollte, wenn der Test funktionsfähig ist [1].

Oftmals mit unerwünschten Effekten geht die unspezifische Adsorption von Proteinen an Grenzflächen einher, welche Gegenstand dieser Arbeit ist. So müssen Kontaktlinsen unter anderem deswegen regelmäßig gereinigt werden, weil Lysozym, ein in der menschlichen Tränenflüssigkeit vorkommendes Protein, auf der Oberfläche der Linsen einen Biofilm bildet (vgl. **Abbildung 1** unten, Seite 1). Dieser kann zu Augenentzündungen führen und sollte folglich turnusmäßig entfernt werden [4].

Die Fähigkeit von Muscheln, sich über einen proteinbasierten „Klebstoff“ ausgesprochen fest auch an sehr glatte Oberflächen zu heften, mag zwar aus biotechnologischer Sicht von großem Interesse sein; haften die Meeresorganismen allerdings an Schiffen an, bedingen sie durch den Anstieg der Masse und des Strömungswiderstands einen erhöhten Treibstoffverbrauch [5]. Auch an der Abstoßung medizinischer Implantate ist die Adsorption von Proteinen an die körperfremde Oberfläche maßgeblich beteiligt [6].

Um unerwünschte Proteinadsorption zu unterdrücken bzw. nützliche Anwendungen von Proteinadsorbaten ausfindig zu machen, ist es zunächst erforderlich, die Natur der Wechselwirkungen zwischen Protein und Oberfläche zu verstehen. Einen kleinen, aber nicht zu vernachlässigenden Beitrag liefern Van der Waals-Wechselwirkungen. Unter diesem Begriff sind attraktive Interaktionen zweier permanenter Dipole, eines permanenten und eines induzierten Dipols sowie zweier induzierter Dipole zusammengefasst [7]. Diese fallen in der angegebenen Reihenfolge immer stärker mit dem Abstand ab. Auch elektrostatische Wechselwirkungen können eine Rolle spielen, insbesondere bei gegensätzlich geladenen Oberflächen und Proteinen (z. B. Silizium und Lysozym bei neutralem pH-Wert) [8]. Meist ist der Beitrag durch elektrostatische Wechselwirkungen allerdings sekundär. Dies wird beispielsweise durch Messungen des Adsorptionsgrades in Abhängigkeit vom pH-Wert deutlich: Häufig wird eine maximale Adsorption festgestellt, wenn der pH-Wert dem isoelektrischen Punkt des Proteins entspricht. In diesem Fall weist das Protein keine

Nettoladung auf. Die Ursache dieses Effekts liegt vermutlich in der minimierten gegenseitigen elektrostatischen Abstoßung der Proteinmoleküle im Adsorbat [9-10].

Der wahrscheinlich wichtigste Beitrag zur Triebkraft der Adsorption von Proteinen an Oberflächen ist der hydrophobe Effekt. Dieser beruht darauf, dass in wässriger Umgebung vorliegende hydrophobe Oberflächenbereiche des Proteins die Wassermoleküle um sich herum in einer Art Käfigstruktur (Clathrat) anordnen. Der resultierende Zustand ist somit durch eine niedrige Entropie charakterisiert. Dies fällt deshalb ins Gewicht, weil die attraktiven Wechselwirkungen zwischen den Wassermolekülen und dem hydrophoben Bereich relativ schwach sind. Lagert sich eine solche hydrophobe Stelle an eine Oberfläche an, so kann der entropisch ungünstige Wasserkäfig aufgelöst werden. Dieser Effekt fällt besonders stark aus, wenn die Adsorption des Proteins an einer hydrophoben Oberfläche stattfindet, weil in diesem Fall zusätzlich die an dieser Oberfläche angeordneten Wassermoleküle freigesetzt werden [11].

Außerdem muss berücksichtigt werden, dass die native, gefaltete Konformation der Proteine sehr flexibel und insofern nur marginal gegenüber Entfaltung stabilisiert ist; typische Standard-Gibbsenergien der Entfaltung sind im Bereich von 20 kJ mol^{-1} bis 60 kJ mol^{-1} angesiedelt. Demzufolge geht die Adsorption von Proteinen an einer Grenzfläche in vielen Fällen mit einer partiellen Entfaltung des Proteins einher. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn die entfaltenen Proteine stärker attraktiv mit der Oberfläche interagieren als die nativen. Die Konsequenz ist auf der einen Seite eine erhöhte Komplexität: So müssen auch kleine Beiträge zur Wechselwirkung zwischen Protein und Oberfläche berücksichtigt werden, weil sie im Extremfall den Unterschied zwischen entfaltetem und gefaltetem Protein ausmachen können. Auf der anderen Seite heißt das aber auch, dass schon geringe Veränderungen in der Umgebung der Proteine deutliche Effekte haben können und damit deren Verhalten im besten Fall in eine gewünschte Richtung gelenkt werden kann.

Entsprechend sind vielfältige Wege vorstellbar, um Einfluss auf die Wechselwirkungen zwischen Protein und Grenzfläche zu nehmen. Für diese Arbeit sind zwei Ansätze von besonderer Bedeutung. Zum einen können die Eigenschaften der Oberfläche durch deren Beschichtung modifiziert werden. Als Beispiele können Self Assembled Monolayers (SAMs), Polyelektrolyt-Multischichten und Polymerbürsten genannt werden. Schematisch sind diese in **Abbildung 2** (Seite 4) dargestellt. SAMs können unter anderem durch den Kontakt von längerkettigen Alkanthiolen ($\text{R}-(\text{CH}_2)_n\text{-SH}$) mit einer Goldoberfläche erhalten werden [12]. Dabei werden spontan kovalente Schwefel-Gold-Bindungen ausgebildet (vgl. **Abbildung 2** links, Seite 4). Die Charakteristika der Grenzfläche hinsichtlich der Proteinadsorption können

dann durch Variation des Restes R maßgeblich beeinflusst werden. Oligo(ethylenoxid)-Gruppen beispielsweise unterdrücken die Proteinadsorption nahezu vollständig. Eine Anwendung von Polyelektrolyt-Multischichten (**Abbildung 2** Mitte) ist die Erzeugung von Bioreaktoren auf Oberflächen [13-14]. Dazu werden Enzyme, die eine bestimmte Reaktion katalysieren, zwischen den unterschiedlich geladenen Polymerketten der Multischicht entsprechend ihrer Nettoladung eingebettet.

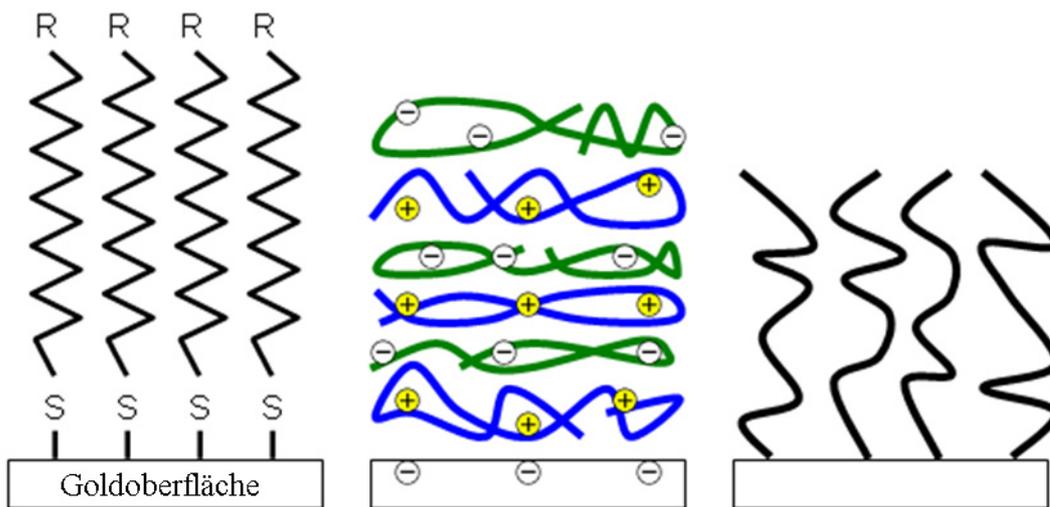


Abbildung 2. SAM (Self Assembled Monolayer, links), Polyelektrolyt-Multischicht (Mitte) und Polymerbürste (rechts) als Beispiele für Grenzflächenbeschichtungen.

Die besondere Eignung von Polyelektrolyt-Multischichten zur Erzeugung von solchen Oberflächenreaktoren besteht darin, dass wichtige Voraussetzungen realisiert werden können: Eine hinreichende Durchlässigkeit der Schicht für Substratmoleküle bei gleichzeitiger fester Verankerung der verwendeten Biokatalysatoren ist ebenso von Bedeutung wie die Wahrung des natürlichen Faltungszustands und damit der Funktion der Proteine. Allerdings ist das System damit auch praktisch nicht mehr veränderbar.

Ist eine variable Steuerung der unspezifischen Proteinadsorption gewünscht, eignen sich bestimmte Polymerbürsten (vgl. **Abbildung 2** rechts). Ein Beispiel hierfür sind polyanionische Poly(acrylsäure)-Bürsten (PAA-Bürsten) [15-16], die auch Gegenstand verschiedener im Rahmen dieser Arbeit durchgeführter Untersuchungen sind. PAA-Bürsten bestehen aus einer dichten Anordnung von Poly(acrylsäure)-Ketten auf einer Oberfläche. Sie können bei niedriger Ionenstärke (z. B. 10 mM) große Mengen an Protein unabhängig vom Vorzeichen der Nettoladung des Proteins unspezifisch binden [17-20]. Durch Erhöhung der Ionenstärke der Proteinlösung auf einige 100 mM wird die Oberfläche hingegen nahezu vollständig proteinresistent. Die Ionenstärke der Lösung fungiert also als Schalter in Bezug

auf die Proteinaffinität der modifizierten Grenzfläche. Zur Erklärung dieser Besonderheit der PAA-Bürste existieren einige Modelle. Bei Proteinen mit positiver Nettoladung können Coulomb-Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Proteinen und den negativ geladenen PAA-Ketten diskutiert werden. Entscheidend dürfte jedoch ein entropischer Effekt sein: Durch die elektrostatische Bindung des Proteins an die Bürste werden sowohl die negativ geladenen Gegenionen des Proteins als auch die positiv geladenen Gegenionen der PAA-Bürste in die Lösung freigesetzt. Dies wird auch als Gegenionenverdampfung bezeichnet. Es liegt nahe, dass diese Triebkraft an Bedeutung verliert, wenn bereits eine hohe Konzentration von Ionen in der Lösung vorliegt. Die Proteinresistenz einer PAA-Bürste in Gegenwart erhöhter Salzkonzentrationen ergibt sich entsprechend zwanglos aus dieser Vorstellung. Auch bei Proteinen mit negativer Nettoladung ist dieser Effekt zu beobachten. Im Falle schwach negativ geladener Proteine ist eine Ladungsumkehr aufgrund der erhöhten Hydroniumionenkonzentration in der PAA-Bürste denkbar [21-22]. In diesem Fall sind die gleichen Triebkräfte zu diskutieren wie bei Proteinen mit positiver Nettoladung. Im Falle stärker negativ geladener Proteine kann immer noch zu Grunde gelegt werden, dass es auch auf der Oberfläche von Proteinen mit negativer Nettoladung positiv geladene Bereiche gibt. Diese Segmente interagieren nach dem oben beschriebenen Prinzip mit den PAA-Ketten, was in der Literatur als *patch-controlled adsorption* bezeichnet wird [17,23]. Bei stark negativ geladenen Proteinen bzw. hohen pH-Werten ist die Annahme größerer positiv geladener Oberflächenregionen wenig plausibel. Da aber auch unter diesen Voraussetzungen eine von der Ionenstärke der Proteinlösung abhängige Adsorption beobachtet werden kann, ist ein Ansatz gefragt, welcher der negativen Gesamtladung des Proteins Rechnung trägt. Hierzu wurde ein *mean-field*-Modell entwickelt, welches negative Potentiale auf der Oberfläche des Proteins und in der Bürste zugrunde legt [24]. Demnach gleichen die Proteinmoleküle in Lösung ihr negatives Oberflächenpotential dadurch aus, dass sie positiv geladene Gegenionen binden. Aufgrund des in der PAA-Bürste generell vorherrschenden negativen Potentials besteht für die Proteinmoleküle nach Eindringen in die PAA-Bürste nicht länger die Notwendigkeit, die Gegenionen festzuhalten. Demzufolge werden sie in die PAA-Bürste freigesetzt, was zu einem Entropiegewinn führt, der die elektrostatische Abstoßung zwischen PAA-Ketten und Proteinoberfläche anscheinend überkompensiert.

Die zuvor vorgestellten Modellvorstellungen bezüglich der Bindung von Proteinen an einer PAA-Bürste implizieren bereits, dass sich die Proteine an PAA-Bürsten nicht wie bei herkömmlichen Oberflächen (z. B. aus Silizium oder Poly(styrol)) auf der Oberfläche ablagern, sondern sich vielmehr über die gesamte Dicke der Bürste verteilen [25-26].

Eine Poly(acrylsäure)-Bürste stellt also eine Grenzflächenmodifikation mit interessanten speziellen Eigenschaften dar. Ziel eines Teils der im Zusammenhang mit dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen war es daher, herauszufinden, wie sich die Anwesenheit einer solchen Bürste auf einer planaren Oberfläche hinsichtlich der Struktur und Funktion der an der Grenzfläche adsorbierten Proteine auswirkt. Für herkömmliche hydrophile (z. B. Silizium) und hydrophobe (z. B. Teflon) Oberflächen sind viele Fälle bekannt, in denen es zu mehr oder weniger stark ausgeprägten Änderungen der Struktur der Proteine im Zuge der Adsorption kommt. Daran ist oft auch eine verminderte Funktionsfähigkeit der Proteine gekoppelt [27-32]. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse sollen dabei helfen, zu beurteilen, ob eine planare Poly(acrylsäure)-Bürste prinzipiell dazu geeignet ist, Anwendung als biokompatible Materialbeschichtung zu finden. Für auf der Oberfläche von sphärischen Kolloidpartikeln angebrachte PAA-Bürsten wurde bereits exemplarisch gezeigt, dass sowohl die Struktur [33] als auch die biologische Aktivität von Proteinen im Vergleich zur Lösung weitgehend erhalten bleiben [34].

Der zweite Ansatz zur Beeinflussung der Wechselwirkung zwischen Proteinen und Grenzflächen (neben der Beschichtung), dem in dieser Arbeit nachgegangen wird, ist die Steuerung der Proteinadsorption durch Cosolventien (Lösungszusätze). Dieser beruht darauf, dass Proteine in Lösung durch Zugabe von Cosolventien stark in ihrer konformellen Stabilität beeinflusst werden können. Beispielsweise werden Glycerin oder Saccharose bei der Isolierung aktiver Enzyme zugesetzt, um deren biologische Aktivität zu erhalten [35]. Zur Ausfällung von Proteinen ohne Verlust ihrer nativen Struktur werden hohe Konzentrationen bestimmter Salze (z. B. Ammoniumsulfat) verwendet [35]. Einen in gewisser Weise gegenteiligen Effekt haben chemische Denaturantien wie Guanidiniumhydrochlorid oder Harnstoff. Diese werden dazu verwendet, das Entfaltungsgleichgewicht von Proteinen zugunsten der entfalteten Struktur zu verschieben [36]. Eine Grundlage für die Systematisierung solcher Effekte für ionische Cosolventien bietet die Hofmeister-Reihe.

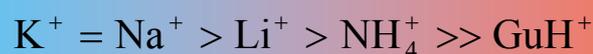
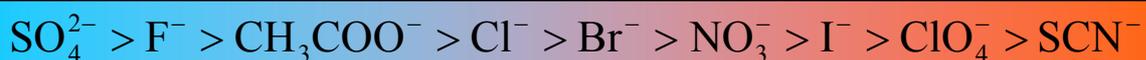


Abbildung 3. Hofmeister-Reihe aus [37] nach [38,39].

In der in **Abbildung 3** als Beispiel gezeigten Hofmeister-Reihe sind die Ionen nach ihrer Tendenz abgestuft, Prozesse, wie z. B. die Faltung von Proteinen oder die Ausbildung von

Protein-Präzipitaten, die zu einer Verringerung der für Wassermoleküle zugänglichen Moleküloberfläche führen, zu begünstigen.

Obwohl eine solche Reihe bereits zum ersten Mal vor über 100 Jahren aufgestellt wurde [40], wird bis heute daran gearbeitet, die Vorgänge hinter den zu beobachtenden Effekten auf molekularer Ebene aufzuklären [41-42]. Symptomatisch hierfür ist, dass sich die genaue Reihenfolge der Ionen in der Hofmeister-Reihe je nach herangezogener Quelle unterscheiden kann. In einer Reihe von Studien wird die Stellung von Ionen in der Hofmeister-Serie mit der Tendenz eines Ions in Verbindung gebracht, sich an der makroskopischen Luft-Wasser-Grenzfläche bzw. an der Oberfläche von in Wasser gelösten Kohlenwasserstoffen anzureichern [37, 43-44]. Dies erscheint plausibel, weil bei einer Proteinfaltung die für eine Anreicherung zur Verfügung stehende (hydrophobe) Oberfläche stark vergrößert wird. In einer weiteren aktuellen Arbeit wird auch ein Zusammenhang zwischen der Inhibierung der Vereinigung von in Wasser vorhandenen Luftblasen durch ein Salz und der Stellung der enthaltenen Ionen in der Hofmeisterreihe aufgezeigt. Dabei kommt es interessanter Weise im Wesentlichen auf die Kombination der Ionen an [45]. Wiederum an anderer Stelle wird der Einfluss eines Hofmeister-Ions auf die Proteinlöslichkeit mit der Grenzflächenspannung zwischen Protein und Lösung verknüpft [46]. Auch dieser Ansatz ist verständlich: Eine Abnahme der Grenzflächenspannung zwischen Protein und Lösung bedeutet die Abnahme der Tendenz des Proteins, seine Oberfläche zu verkleinern; folglich wird eine Entfaltung begünstigt und das Protein besser gelöst.

Ionische Verbindungen, deren Anionen auf der linken Seite der Hofmeisterserie (z. B. **Abbildung 3**, Seite 6) zu finden sind, werden häufig als kosmotrop bezeichnet, während solche, deren Anionen auf der rechten Seite zu finden sind, in vielen Fällen als chaotrop gelten – der Effekt des jeweiligen Anions ist nicht selten dominant [36]. Auch ungeladene Verbindungen werden entsprechend ihrer Eigenschaften in diese Terminologie mit einbezogen. Eine wörtliche Interpretation dieser Begriffe hinsichtlich der Struktur von Wasser in der Bulk-Phase (chaotropes = structure breakers, kosmotropes = structure makers) ist allerdings umstritten. So wird beispielsweise darauf hingewiesen [37], dass die Annahme von Wechselwirkungen, welche in konzentrierten Salzlösungen Einfluss auf die Ordnung von Wasser über eine längere Distanz haben, weder durch Aktivitätsdaten von Wasser [47] noch durch spektroskopische Ergebnisse [48-49] gestützt wird.

In der Regel kann die Auffassung vertreten werden, dass kosmotrope Cosolventien, welche die native Struktur der Proteine stabilisieren und bei hohen Konzentrationen ausfällend wirken, von der Protein-Wasser-Grenzfläche (weitgehend) ausgeschlossen werden. Die

Proteinoberfläche wird also bevorzugt hydratisiert. Dagegen werden chaotrope Agenzien, die zu einer Denaturierung von Proteinen führen können, eher an der Grenzfläche angetroffen. Für den (partiellen) Ausschluss eines Cosolvens von der Protein-Wasser-Grenzfläche können grundsätzlich zwei Ursachen angeführt werden: Zum einen können Cosolventien, die deutlich größer als Wasser sind, nur bis auf einen entsprechend größeren Abstand an die Grenzfläche heran. Dies wirkt einer Entfaltung entgegen: Aufgrund der größeren Proteinoberfläche im denaturierten Zustand käme es zu einer starken Erweiterung des thermodynamisch ungünstigen sterischen Ausschlussvolumens, in dem sich die großen Cosolvensmoleküle nicht aufhalten können. Zum anderen können die Wechselwirkungen zwischen Wasser und Cosolvens günstiger sein als die Wechselwirkungen zwischen Grenzfläche und Cosolvens, was zu einer Anreicherung des Cosolvens in der Bulk-Phase gegenüber der Protein-Wasser-Grenzfläche führt. Für die Relevanz solcher relativ unspezifischen Wechselwirkungen spricht auch die Tatsache, dass oft hohe Konzentrationen an Cosolvens (z. T. bis an die Löslichkeitsgrenze) für eine maßgebliche Veränderung von Proteineigenschaften erforderlich sind [36, 50-51]. Daneben zeigen beispielsweise auch molekulardynamische Simulationen von Proteinen in Gegenwart von Harnstoff (chaotrop) und Glycerin (kosmotrop), dass unter vergleichbaren Bedingungen Harnstoffmoleküle an der Protein-Wasser-Grenzfläche häufiger anzutreffen sind als Glycerinmoleküle [52-53].

Wie im vorausgegangenen Abschnitt dargestellt ist, sind sowohl die Adsorption von Proteinen an Grenzflächen als auch die Beeinflussung der Proteineigenschaften in Lösung durch Cosolventien bekannte und z. T. detailliert bearbeitete Forschungsgebiete. Bisher wurden allerdings wenige Untersuchungen durchgeführt, bei denen das Augenmerk auf den Proteineigenschaften bei gleichzeitiger Anwesenheit eines Cosolvens und einer Grenzfläche lag (vgl. **Abbildung 4**, Seite 9). Zwar sind einige Studien zur Proteinadsorption an wässrig-festen Grenzflächen in Gegenwart von Salzen bereits durchgeführt worden [54-57]; jedoch wurde in diesen Studien mit Abänderungen der Konzentration des Salzes gearbeitet, um den Einfluss elektrostatischer Wechselwirkungen auf die Proteinadsorption zu charakterisieren. Eine systematische Variation der Art des eingesetzten Salzes nach der Hofmeister-Serie (vgl. **Abbildung 3**, Seite 6) war jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeiten.

Im Zusammenhang mit der Untersuchung proteinresistenter Oberflächenbeschichtungen wurde die Hypothese aufgestellt, dass es zu einer Proteinresistenz der Oberfläche kommt, wenn die Eigenschaften der dort angebrachten chemischen Gruppen denen von kosmotropen Verbindungen ähneln. Unter der Voraussetzung des Ausschlusses kosmotroper Substanzen von der Proteinoberfläche erscheint dieser Befund nachvollziehbar, da im Umkehrschluss

auch Proteine von einer Oberfläche mit kosmotropen Gruppen ausgeschlossen werden sollten [58-59].

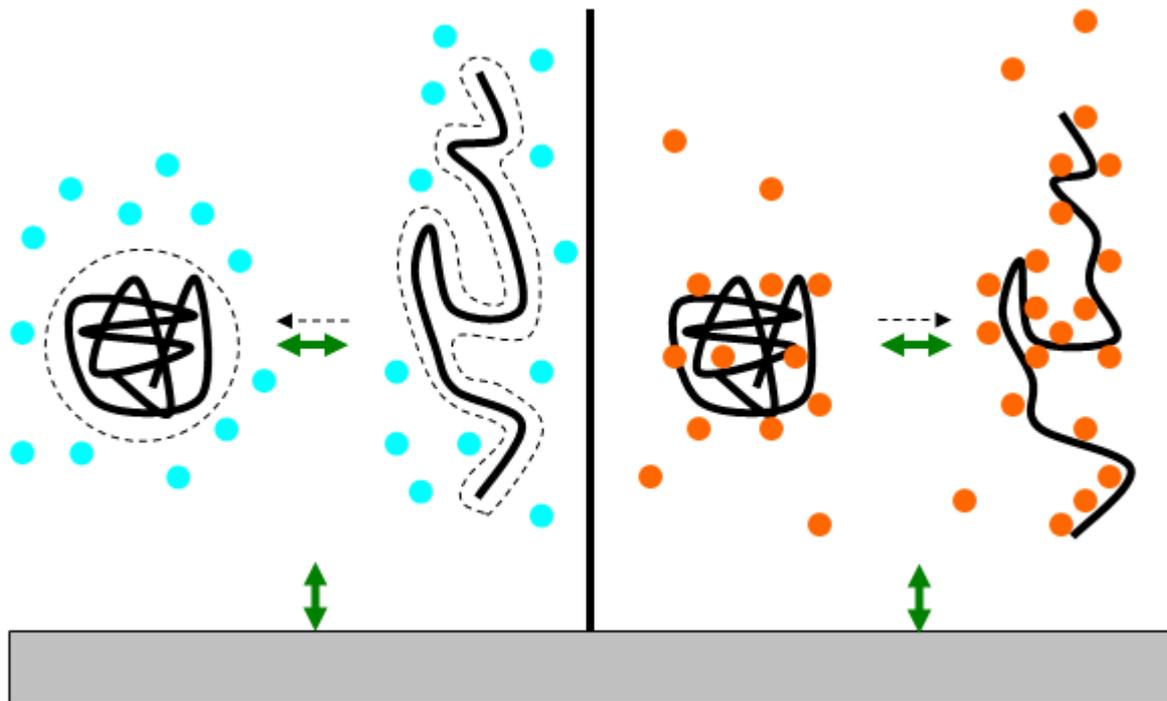


Abbildung 4. Proteinadsorption in Gegenwart von kosmotropen (links, hellblaue Kreise) und chaotropen (rechts, orangefarbene Kreise) Cosolventien.

In einer jüngeren Untersuchung wurde erstmalig der Effekt verschiedenartiger gelöster Salze auf die Kraft, die benötigt wird, um adsorbierte Proteine von einer Oberfläche zu entfernen, analysiert. Für Spinnenseidenproteine an einer hydrophoben Oberfläche in Gegenwart des jeweiligen Cosolvens wurde mittels Einzelmolekül-Kraftspektroskopie eine umso größere Desorptionskraft ermittelt, je weiter das jeweils zugesetzte Anion auf der linken Seite der Hofmeisterreihe zu finden ist (Dihydrogenphosphat > Chlorid > Iodid) [60]. Aber auch nicht-ionische Cosolventien haben anscheinend einen Einfluss. So wird die Masse an Ribonuclease A, die durch mesoporöses Glas adsorbiert wird, durch die Gegenwart von Glycerin (kosmotrop) und Harnstoff (chaotrop) verändert. Glycerin führt dabei zu einer Abnahme, Harnstoff hingegen zu einer Zunahme der adsorbierten Masse. Weil eine (partielle) Entfaltung des Proteins durch Harnstoff erleichtert wird, können die Proteinmoleküle vermutlich leichter in die engen Poren des Glases diffundieren. Umgekehrt sollte Glycerin dies erschweren [61]. In weitergehenden Untersuchungen wurde mit Hilfe der optischen und der Neutronen-Reflektometrie die Adsorption von Ribonuclease A an verschiedenen Grenzflächen in Gegenwart von nicht-ionischen und ionischen Cosolventien verfolgt [62-63]. In Gegenwart von Glycerin kann ein starker Rückgang des Adsorptionsgrades von

Ribonuclease A an einer Siliziumoxid-Wasser-Grenzfläche verzeichnet werden. Harnstoff führt ebenfalls zu einer Verminderung des Adsorptionsgrades, wenngleich in geringerem Ausmaß. In beiden Fällen bleibt die Dicke des Adsorbats hiervon weitgehend unberührt; der Volumenbruch des Proteins im Adsorbat wird allerdings geringer [62]. Für ionische Cosolventien können ähnliche Effekte beobachtet werden. In diesem Zusammenhang wurde die Adsorption von Ribonuclease A allerdings nicht an einer negativ geladenen Siliziumoxid-Wasser-Grenzfläche, sondern an einer ungeladenen Poly(styrol)-Wasser-Grenzfläche betrachtet. Dadurch konnten elektrostatische Einflüsse möglichst gering gehalten werden, um trotz der hohen Ionenstärke in Lösung eine gesicherte Aussage hinsichtlich der Position der jeweiligen Ionen in der Hofmeisterreihe zu erhalten. Sowohl die kosmotropen Salze Natriumsulfat und Ammoniumsulfat als auch die chaotropen Salze Natriumthiocyanat und Calciumthiocyanat führen im Vergleich zu Natriumchlorid zu einer deutlichen Verringerung des Adsorptionsgrades von Ribonuclease A an der Poly(styrol)-Oberfläche bei weitgehend unveränderter Dicke des Adsorbats [63]. Prinzipiell lassen sich die erhaltenen Ergebnisse anhand der Einflüsse von kosmotropen und chaotropen Substanzen auf die Proteinstabilität diskutieren: So ist es auf der einen Seite denkbar, dass durch die bevorzugte Hydratation der Proteinoberfläche aufgrund der Gegenwart kosmotroper Verbindungen ein direkter Kontakt der Proteinmoleküle mit der jeweiligen Grenzfläche erschwert wird. Auf der anderen Seite kann eine Abschwächung hydrophober Wechselwirkungen, welche eine entscheidende Triebkraft der Proteinadsorption darstellen (vgl. Seite 3), aufgrund einer Anreicherung chaotroper Cosolventien an der Proteinoberfläche ins Feld geführt werden. Allerdings lassen die Ergebnisse beider Studien keine Rückschlüsse auf eine durchgehende Systematik von kosmotropen zu „neutralen“ bis zu chaotropen Verbindungen hinsichtlich der in diesen Ausarbeitungen betrachteten Eigenschaften der Proteinadsorbate zu. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend gesagt sind mit der Proteinadsorption an einer Poly(acrylsäure)-Bürste und dem Einfluss von Cosolventien auf die Proteinadsorption zwei Themenkomplexe Hauptgegenstand dieser Arbeit, die in unterschiedlichem Ausmaß im Interesse bisheriger Forschungsarbeiten standen. Demzufolge eignen sich die hier dargestellten Ergebnisse in Bezug auf Poly(acrylsäure)-Bürsten auf einer planaren Oberfläche zur Charakterisierung der Biokompatibilität dieser Materialbeschichtung, während im Zusammenhang mit der Proteinadsorption in Gegenwart von Cosolventien ein grundlegender Beitrag zu einem noch wenig erforschten Gebiet geleistet wird.

2 Theoretischer und methodischer Hintergrund

2.1 Proteine

Für alles bekannte Leben auf diesem Planeten sind Proteine von grundlegender Relevanz. Mit der Katalyse essentieller chemischer Reaktionen, der Schaffung von Stützstrukturen und dem zielgerichteten Transport von Stoffen sind nur einige der bedeutsamsten Funktionen dieser Biopolymere aufgeführt. Ihre Baupläne sind bei allen Lebewesen im Erbgut in Form von DNA codiert. Hiervon ausgehend werden sie in einer ausgefeilten molekularen Maschinerie aus in den meisten Fällen 20 verschiedenartigen α -Aminocarbonsäuren zusammengefügt; deren Kombination führt beim Menschen zu Ketten mit einer durchschnittlichen Länge von ca. 430 monomeren Einheiten. Zwar ist mit der als Primärstruktur bezeichneten Abfolge dieser Aminosäuren in der Polypeptidkette bereits die spätere Aufgabe des Proteins festgelegt, jedoch ist es nur in einer bestimmten dreidimensionalen Struktur – der nativen Struktur – zweckdienlich. Diese Konformation besitzt im Allgemeinen unter allen möglichen dreidimensionalen Anordnungen des Biomakromoleküls eine minimale Gibbsenergie.

Bei globulären Proteinen sind bis zu vier Strukturierungsebenen maßgeblich. Zunächst werden von der Primärstruktur ausgehend allgemeine Faltungsmuster ausgebildet. Diese werden als Sekundärstruktur bezeichnet. Am häufigsten finden sich α -Helices und β -Faltblätter (in den folgenden Darstellungen von Proteinen rot bzw. violett dargestellt), die im Wesentlichen durch vom Peptidrückgrat ausgebildete Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden. Für die Ausbildung einer diesen Elementen übergeordneten dreidimensionalen Struktur sind Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Aminosäureseitenketten von zentraler Bedeutung. So wird die so genannte Tertiärstruktur beispielsweise durch Disulfidbrücken zwischen Cysteinseitenketten, elektrostatische Wechselwirkungen, den hydrophoben Effekt oder auch sterische Hinderung stabilisiert. Kommt es noch zur Zusammenlagerung mehrerer Proteinuntereinheiten, ist schließlich von Quartärstruktur die Rede. Dass die korrekte Faltung von Proteinen eine wichtige Grundlage allen Lebens ist, wird auch daran deutlich, dass sie teils unter hohem Energieaufwand bei ihrem Weg von der ungefalteten in die richtige gefaltete Konformation begleitet werden. In vielen Fällen kommen dabei Faltungshelferproteine, die so genannten Chaperone, zum Einsatz [64]. Folglich sollte beispielsweise bei der Beurteilung der Biokompatibilität einer Grenzflächenbeschichtung die Struktur adsorbierter Proteine ein wichtiges Kriterium sein.

Leistungsfähige grenzflächensensitive Methoden, die hierüber Rückschlüsse zulassen, sind Gegenstand der folgenden Abschnitte 2.2 (Seite 20 ff.) sowie 2.3 (Seite 32 ff.). Im weiteren Verlauf des aktuellen Abschnitts soll detaillierter auf die in dieser Arbeit verwendeten Proteine¹ eingegangen werden. Für diese findet sich eine kurze Zusammenfassung relevanter Eigenschaften in **Tabelle 1**.

Tabelle 1. Wichtige Eigenschaften der untersuchten Proteine.

Protein	molare Masse / (kg mol^{-1})	isoelektrischer Punkt (pH-Wert)	Entfaltungsgibbsenergie / (kJ mol^{-1})
Lysozym	14.6 [65]	11 [66]	63 [67]
α -Lactalbumin	14.2 [68]	4.2 [69]	27 [70]
Serumalbumin	68 [71]	5.3 [72-73]	18 [74]
Meerrettichperoxidase	40 [75]	(Isoformen) [76, 77]	(Isoformen) [76, 77]
Insulin	5.8 [65]	5.3 [78]	19 [79]
Ribonuclease	13.7 [80]	9.3 [77]	45 [67]

Die Untersuchung von Modellproteinen mit unterschiedlicher Nettoladung, Größe und Strukturstabilität hat zum Ziel, möglichst allgemeine Aussagen bezüglich der Proteinadsorption unter den betrachteten Bedingungen treffen zu können.

2.1.1 Lysozym

Lysozym ist ein Enzym (Glykosidase), welches beim Menschen in Speichel, Tränen und anderen Ausscheidungen zu finden ist. Dort fungiert es als natürliches Antibiotikum, indem es die hydrolytische Spaltung von in der Zellwand mancher Bakterien vorkommenden Polysaccharidketten katalysiert. Als Folge der dadurch fehlenden Stabilisierung platzen betroffene Bakterien aufgrund des osmotischen Drucks [64]. Lysozym ist ein vergleichsweise kleines Protein; das für diese Arbeit verwendete Hühnerlysozym besteht aus 129 Aminosäuren, woraus ein Molekulargewicht von ca. 14.6 kg mol^{-1} [65] resultiert. Weiterhin zeichnet es sich durch eine hohe strukturelle Stabilität aus. Diese wird auch über die Quervernetzung durch vier Disulfidbrücken sichergestellt (vgl. gelb eingefärbte Bereiche in **Abbildung 5**, Seite 13). Neben ausgedehnten helicalen Bereichen (rot in **Abbildung 5**, Seite 13) findet sich auch eine antiparallele β -Faltblattstruktur (violett in **Abbildung 5**, Seite 13).

¹ Auf eine detaillierte Beschreibung von Ribonuclease wird verzichtet, weil dieses Protein nur Gegenstand einer einzigen Ergänzungsmessung ist.

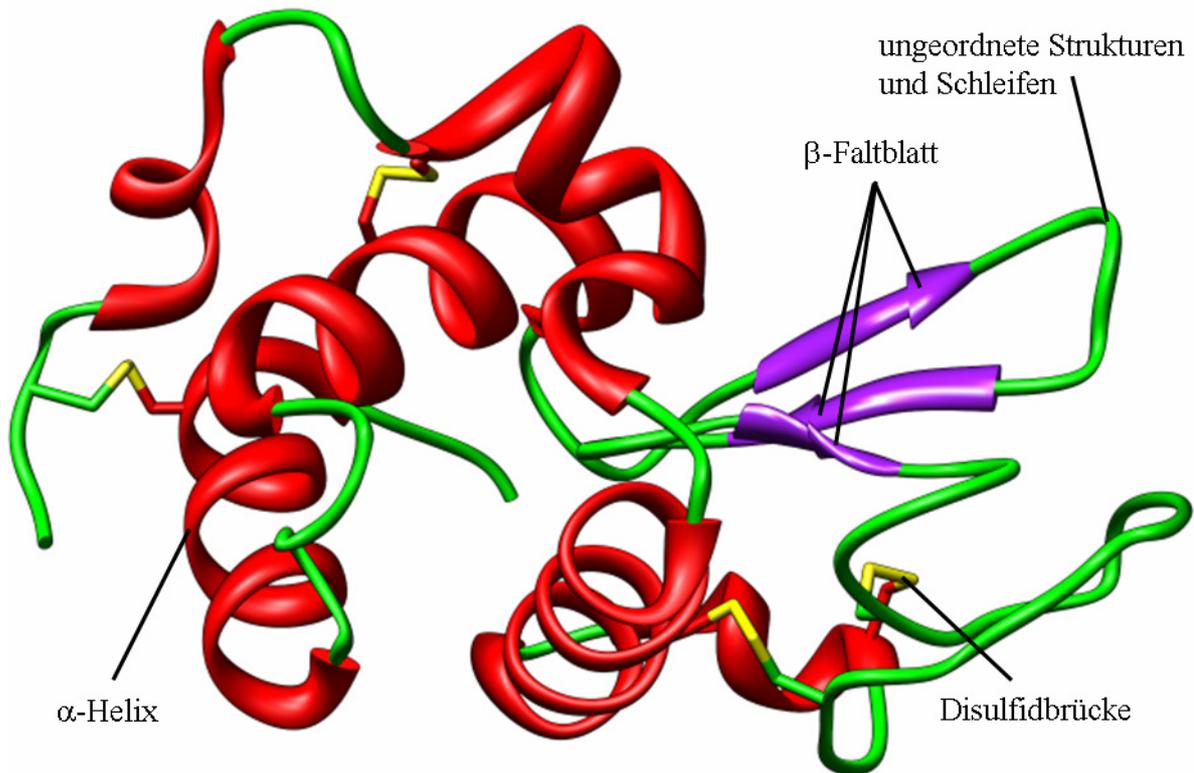


Abbildung 5. Bändermodell von Hühnerlysozym (erstellt in UCSF Chimera 1.2422 [81] auf Basis des Datensatzes 2VB1 [82] der RCSB Proteindatenbank [83]).

Es hat einen hohen isoelektrischen Punkt bei $\text{pH} = 11$ [66], so dass es bei neutralem pH -Wert eine positive Nettoladung aufweist. Hühnerlysozym war das erste Enzym, für welches ein hoch aufgelöstes Elektronendichteprofil auf Basis von Röntgenuntersuchungen erhalten werden konnte [84]. Unter anderem steht mit Hühnereiweiß, in dem es in großen Mengen vorkommt, eine günstige Bezugsquelle zur Verfügung [65].

2.1.2 α -Lactalbumin

Bei Betrachtung von **Abbildung 6** (Seite 14) fällt sofort auf, dass α -Lactalbumin eine große strukturelle Ähnlichkeit mit Lysozym aufweist (**Abbildung 5**). Es wird genau wie Lysozym durch vier Disulfidbrücken stabilisiert und auch die Verteilung von helicalen Bereichen (rot) und Faltblattbereichen ist außergewöhnlich vergleichbar. Auch die Länge der Polypeptidkette von 123 Aminosäuren (ca. 14.2 kg mol^{-1}) ist ziemlich ähnlich. Insofern überrascht nicht, dass auch dieses in der Milch von Säugetieren vorkommende Protein mit der Umsetzung von Zucker in Verbindung zu bringen ist: Die Galactosyltransferase katalysiert den letzten Schritt in der Biosynthese von Milchzucker, wenn α -Lactalbumin als Untereinheit an dieses Enzym gebunden ist [65, 68].

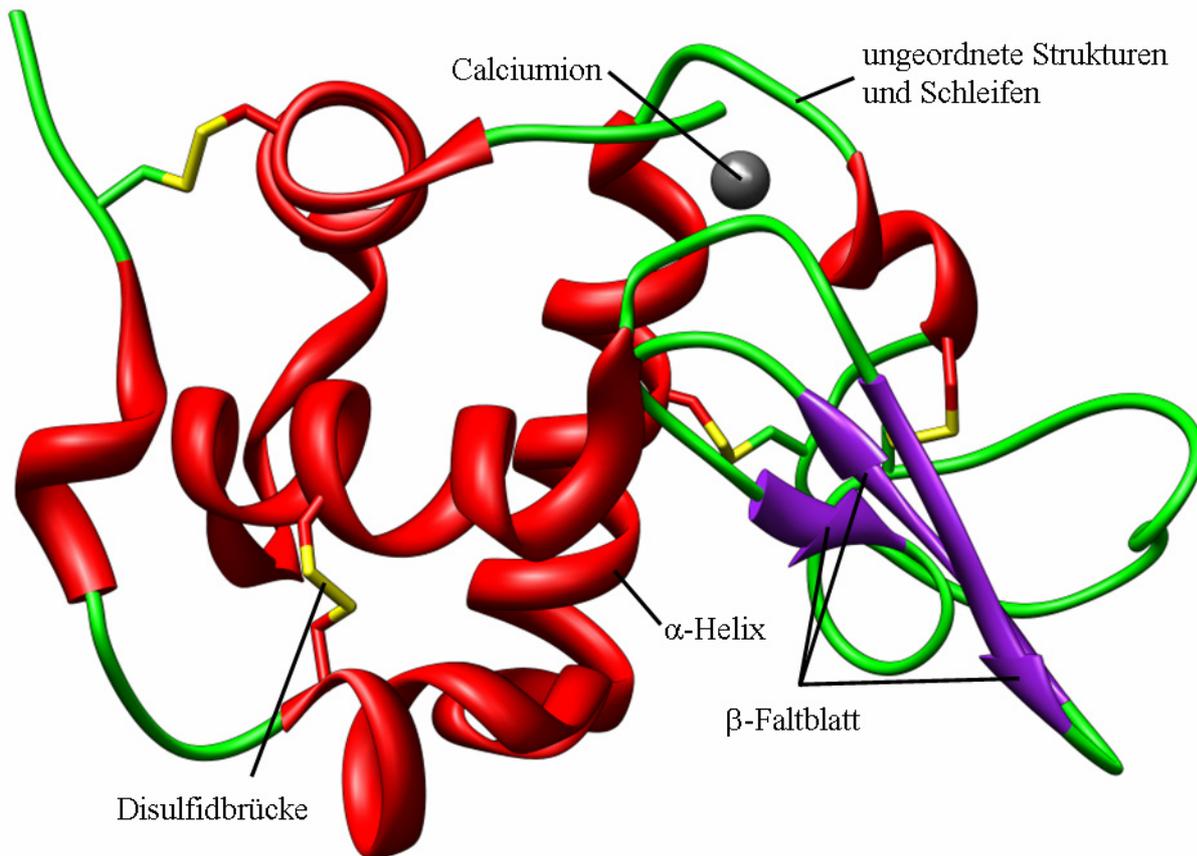


Abbildung 6. Bändermodell von α -Lactalbumin vom Rind (Erstellt in UCSF Chimera 1.2422 [81] auf Basis des Datensatzes 1F6S [85] der RCSB Proteindatenbank [83]).

Ein wichtiger Unterschied zwischen Lysozym und α -Lactalbumin besteht sicherlich darin, dass in letzterem viele saure Aminosäureseitenketten vorzufinden sind. Folglich weist das Biopolymer in pH-neutralem wässrigem Milieu eine negative Nettoladung auf; der isoelektrische Punkt liegt bei $\text{pH} = 4.2$ [69]. Hierin kann ein weiterer Unterschied der beiden Proteine als begründet angesehen werden: α -Lactalbumin bindet vorzugsweise Calciumionen (in **Abbildung 6** grau dargestellt), wodurch die Stabilität seiner nativen Struktur erhöht wird. Darüber hinaus beschleunigt die Anwesenheit von Calciumionen den Faltungsvorgang des Proteins. Dennoch ist selbst in Gegenwart von Calciumionen die native Struktur von α -Lactalbumin gegenüber Entfaltung deutlich weniger stabil als die von Lysozym [70]. Die im Falle der Abwesenheit von Calciumionen nochmals drastisch abgesenkte strukturelle Stabilität macht α -Lactalbumin für die Erforschung von partiell gefalteten Zuständen (z.B. „molten globule“) interessant [68]. Außerdem sind über die oben beschriebene physiologische Bedeutung des α -Lactalbumins hinaus weitere biologische Funktionen des Proteins Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten (z. B. [86]).

2.1.3 Serumalbumin

Mit Serumalbumin ist ein großes Protein Gegenstand der Untersuchungen in dieser Arbeit. Dennoch besteht es aus nur einer Polypeptidkette, die je nach Spezies aus 580-585 Aminosäurebausteinen besteht. Tryptophan- und Methioninseitenketten kommen darin ausgesprochen selten vor, dafür finden sich viele geladene Funktionalitäten der Seitenketten von Glutamin- und Asparaginsäure, Lysin sowie Arginin. Die Struktur lässt sich in drei etwa gleich große Domänen einteilen. Wie in **Abbildung 7** ersichtlich ist, sind helicale Strukturen (rot) das vorherrschende Sekundärstrukturelement.

Die Biosynthese der Serumalbumine erfolgt in der Leber. Die Bezeichnung deutet bereits darauf hin, dass sie aus Blutserum gewonnen werden können, in dem sie die größte Proteinpopulation darstellen. Sie besitzen antioxidative Funktionen; außerdem besteht ihre Aufgabe in der Regulierung des osmotischen Drucks und im Transport einer großen Bandbreite an Substanzen, wie z. B. Fettsäuren, Metallionen oder Hormone. Aber auch exogene Substanzen wie Medikamente können abhängig von deren Eigenschaften stark von Albumin gebunden werden [72-73, 87].

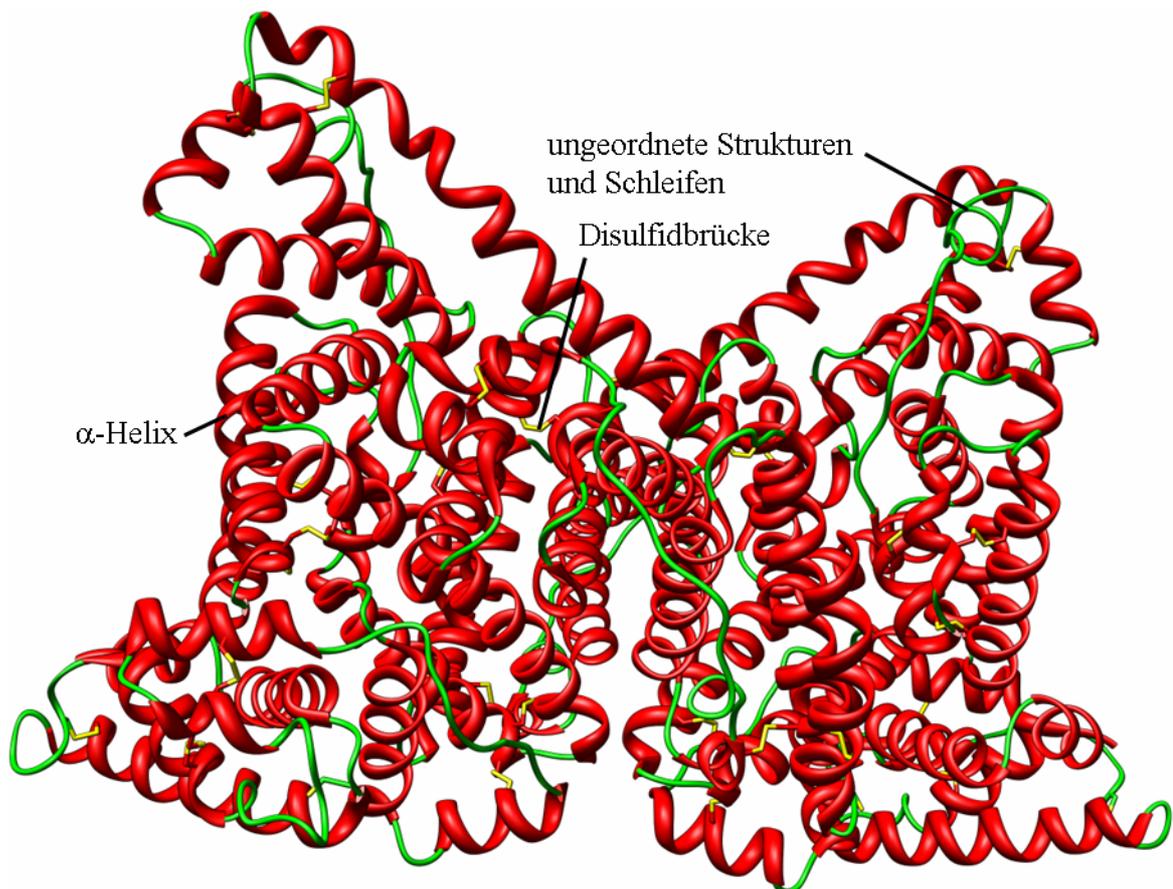


Abbildung 7. Bändermodell eines Dimers von humanem Serumalbumin (Erstellt in UCSF Chimera 1.2422 [81] auf Basis des Datensatzes 1AO6 [88] der RCSB Proteindatenbank [83]).

Von den gebundenen Verbindungen kann auch der Ladungszustand des Proteins abhängen: Für Proben, die im Wesentlichen frei von Fettsäuren sind, kann ein isoelektrischer Punkt bei $\text{pH} = 5.3$ zugrunde gelegt werden [72-73]. Die native Struktur ist auch beim Serumalbumin ähnlich wie bei α -Lactalbumin deutlich labiler als bei Lysozym [74].

Das in dieser Arbeit verwendete Rinderserumalbumin findet unter anderem Anwendung bei Enzymaktivitätsassays (vgl. auch Kapitel 1, Seite 1 f.). Weil es sich den meisten Nachweisreaktionen gegenüber inert verhält, wird es zum Blocken von Oberflächen verwendet, um unspezifische Proteinadsorption zu unterdrücken [89]. Eine weitere biotechnologische Applikation ist der Einsatz beim Umgang mit Zellkulturen. Beispielsweise können Serumalbumine Zellen vor Schäden durch mechanische Belastung schützen. Weil sie außerdem von Zellen aufgenommen werden können, kann in Abhängigkeit von den gebundenen Liganden in einem weiten Bereich Einfluss auf Vorgänge im Zellinneren genommen werden, unter anderem auf das Zellwachstum [87].

2.1.4 Peroxidase

Peroxidasen gehören zu den Häm-Proteinen, d.h. sie haben ein Eisenion und Protoporphyrin als prosthetische Gruppe (in **Abbildung 8**, Seite 17 orange bzw. weiß) gebunden. Das Molekulargewicht bewegt sich im Bereich von $30\text{-}150 \text{ kg mol}^{-1}$. Sie werden den Oxidoreduktasen zugeordnet. Diese Art von Enzymen katalysiert die Reduktion von Peroxiden, wie z.B. dem Zellgift Wasserstoffperoxid, bei gleichzeitiger Oxidation einer Reihe von anorganischen und organischen Substanzen. Manche Peroxidasen sind für ein Substrat (z.B. NADH) spezifisch, während andere eine Reihe von Reaktionspartnern binden können [90]. Im Laufe der Umsetzung der Substrate durchläuft das System verschiedene Zwischenstufen. Eine zentrale Rolle spielen dabei unterschiedliche Oxidationsstufen des gebundenen Eisens [91].

Die in dieser Arbeit verwendete Meerrettichperoxidase hat ein Molekulargewicht von ca. 40 kg mol^{-1} [75]. Von der aus Meerrettich isolierten Peroxidase existieren mehrere Isoformen mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten [76-77]. Dies erschwert eine Aussage über den isoelektrischen Punkt der verwendeten Proteinprobe.

Ein Beispiel für die Anwendung der Meerrettichperoxidase ist die Entfernung von Schadstoffen aus Abwässern. Geläufig ist auch die Anwendung in ELISAs (vgl. Abschnitt 1, Seite 1 f.). Hierbei wird HRP als das antikörpergebundene Enzym eingesetzt, welches die Chromogenumwandlung katalysiert.

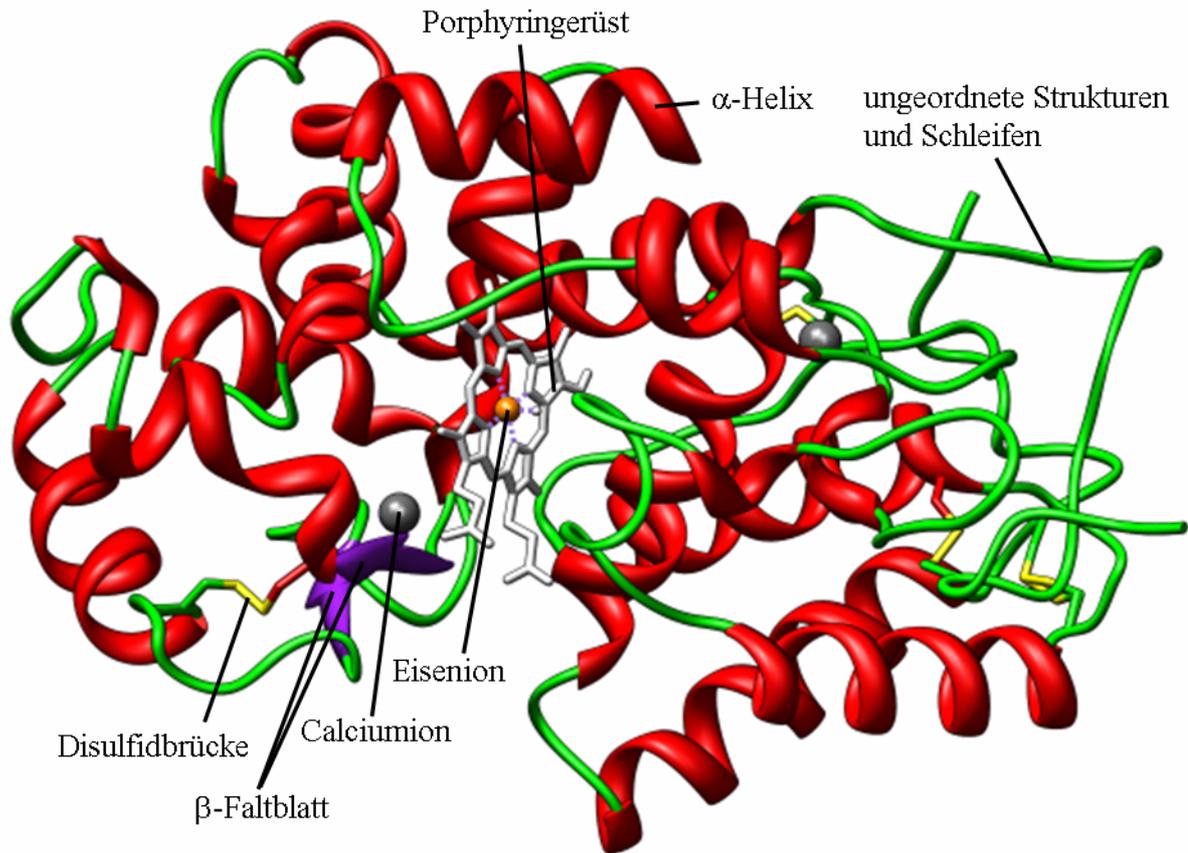


Abbildung 8. Bändermodell von Meerrettichperoxidase (Erstellt in UCSF Chimera 1.2422 [81] auf Basis des Datensatzes 1HCH [91] der RCSB Proteindatenbank [83]).

In eine ähnliche Richtung geht auch die Anwendung in analytischen und diagnostischen Kits [90]. Für diese Arbeit ist die Reaktion von Amplex Red[®] (**Abbildung 9** links) zu intensiv fluoreszierendem Resorufin (**Abbildung 9** rechts) von Bedeutung, mittels derer sich die enzymatische Aktivität von Meerrettichperoxidase gut quantifizieren lässt.

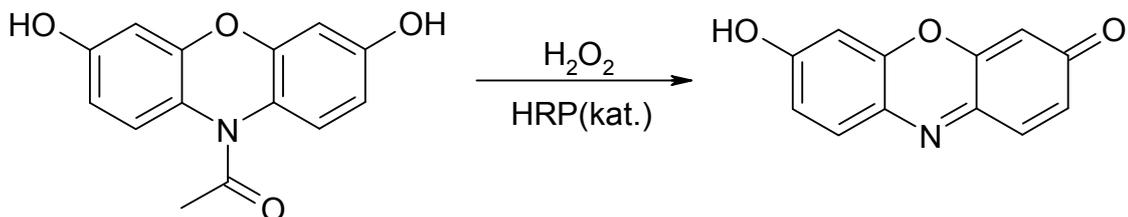


Abbildung 9. Reaktionsschema für die von HRP katalysierte Bildung von Resorufin (rechts) aus Amplex Red[®] (links).

Die in **Abbildung 9** dargestellte Reaktion läuft mit einer 1:1-Stöchiometrie ab, d.h. aus einem Äquivalent Amplex Red[®] wird durch Umsetzung mit der gleichen Menge an Wasserstoffperoxid eine Formeleinheit Resorufin gebildet. Frühere Studien erklären dies dadurch, dass die Reaktion in einem einzigen Schritt unter simultaner Übertragung von zwei Elektronen stattfindet [92-93]. Aktuelle Erkenntnisse aus der Einzelmolekülspektroskopie

deuten jedoch auf zwei Reaktionsschritte hin: Zunächst wird eine Radikalzwischenstufe gebildet, indem ein Elektron von Amplex Red[®] auf die Meerrettichperoxidase übertragen wird. Nachfolgend kommt es in einem enzymunabhängigen Schritt zur Disproportionierung zweier dieser Radikale, wobei unter Bildung eines Resorufinmoleküls ein Molekül Amplex Red[®] zurückerhalten wird [94]. Dennoch steht mit der Kombination Amplex Red[®] / Meerrettichperoxidase / Wasserstoffperoxid ein hochempfindliches System zum quantitativen Nachweis sowohl von kleinsten Mengen an Wasserstoffperoxid als auch von enzymatischer Aktivität zur Verfügung [95-96].

2.1.5 Insulin

Im Vergleich zu den anderen vorgestellten Proteinen ist Insulin ein sehr kleines Molekül. Nach der gängigen Terminologie wird es aus diesem Grunde eher als Polypeptid bezeichnet. Es besteht aus zwei Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die kürzere A-Kette besteht im Allgemeinen aus 21 und die längere B-Kette aus 30 Aminosäuren, woraus ein Molekulargewicht von nur 5.8 kg mol^{-1} resultiert. Die A-Kette (**Abbildung 10**, jeweils außen) wird zusätzlich durch eine weitere interne Disulfidbrücke stabilisiert [65, 97].

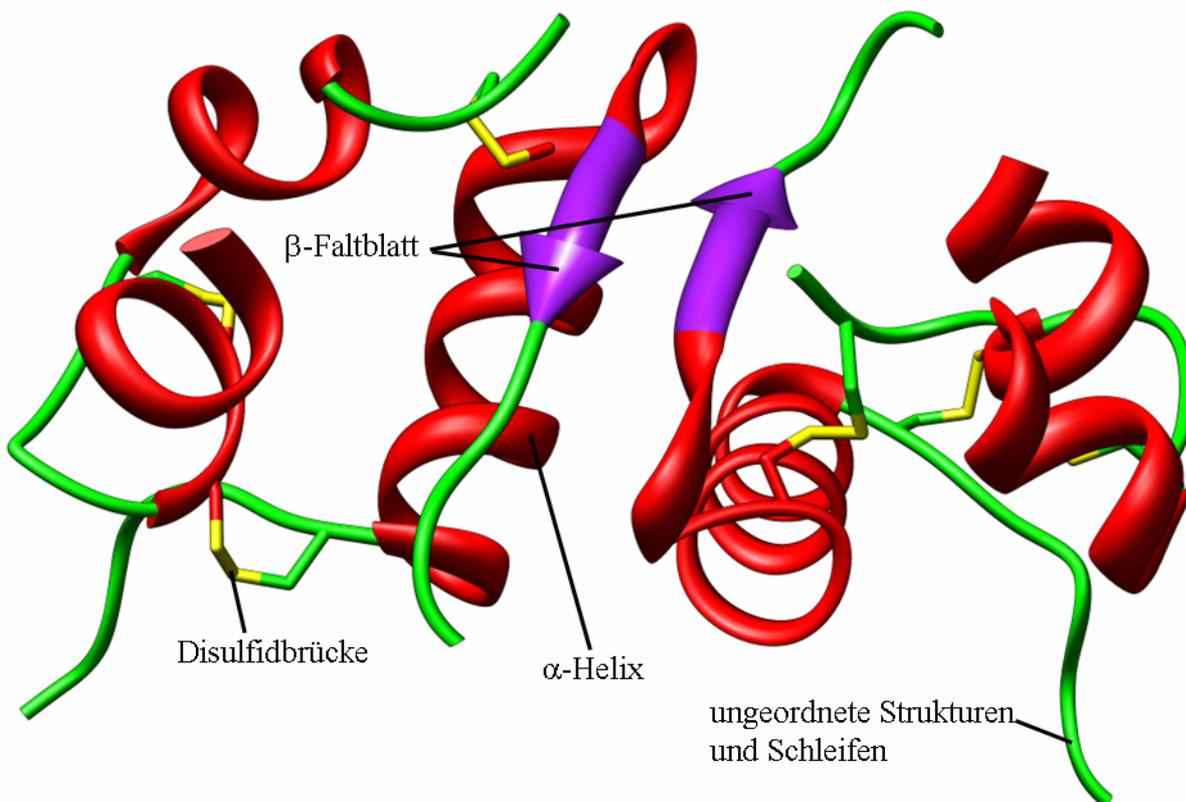


Abbildung 10. Bändermodell eines Insulindimers unter sauren Bedingungen (pH = 2) (Erstellt in UCSF Chimera 1.2422 [81] auf Basis des Datensatzes 1GUJ [97] der RCSB Proteindatenbank [83]).

Insulin war das erste „Protein“, dessen Primärstruktur ermittelt wurde [98]. Aufgrund seiner großen Bedeutung für den menschlichen Stoffwechsel ist es auch heute noch Gegenstand einer Vielzahl von Untersuchungen. In diesem Zusammenhang fungiert es als Hormon, welches auf vielfältigen Wegen eine Absenkung des Blutzuckerspiegels zugunsten einer Speicherung von Nährstoffen bewirkt. Im Brennstoffmetabolismus stellt es entsprechend eine Art Gegenspieler zu dem Hormon Glukagon dar. Störungen im Wechselspiel dieser beiden Signalmoleküle sind mit der Krankheit Diabetes assoziiert, sie können beispielsweise auf einem Mangel an Insulin (Typ I Diabetes) oder auf (zunehmender) Unempfindlichkeit der Körperzellen gegenüber diesem Botenstoff (Typ II Diabetes) beruhen [65].

Insulin weist eine vom wässrigen Milieu (z.B. pH-Wert, Vorhandensein von Zinkionen) abhängige Tendenz auf, Assoziate wie Dimere oder Hexamere zu bilden [99]. Diese spielen für die Verarbeitung und den Transport von Insulin bei dessen Biosynthese in der Bauchspeicheldrüse eine wichtige Rolle [100]. Allerdings kann es auch zur Ausbildung fibrillärer Aggregate kommen, in denen die native Proteinstruktur zugunsten intermolekularer β -Faltblattstrukturen nahezu vollständig degradiert ist. Die Anordnung vieler dieser β -Faltblätter führt zu einer übergeordneten schraubenartigen Struktur, die thermodynamisch sehr stabil ist. Sie weist eine gewisse Ähnlichkeit zur helicalen Struktur der Stärke auf, so dass diese Arrangements auch als Amyloide bezeichnet werden. Die notwendige Destabilisierung der nativen Struktur zur Bildung solcher Aggregate kann in saurer Lösung durch hohe Temperaturen geschehen (z.B. 60 °C, pH = 2) [101-103]. Doch auch die Zugabe chemischer Denaturantien [104-105] oder eine längere Umwälzung der Proteinlösung an einer hydrophoben Oberfläche können dies bewerkstelligen [106].

Amyloidfibrillen werden mit einer Vielzahl an Krankheiten wie Alzheimer, BSE oder auch Diabetes Typ II in Verbindung gebracht. Mit einem Protein, welches die Untersuchung des Einflusses eines Cosolvens oder einer Grenzflächenbeschichtung auf die fibrilläre Aggregation ermöglicht, wird die Auswahl an untersuchten Proteinen daher sinnvoll abgerundet. Für die beschriebenen Untersuchungen wurde Rinderinsulin verwendet (isoelektrischer Punkt bei pH = 5.3 [78]), weil es eine stärker ausgeprägte Tendenz zur Aggregation zeigt als menschliches Insulin [97].

2.2 ATR-FTIR-Spektroskopie mit Proteinen

2.2.1 Grundlagen der Spektroskopie [107]

Die Basis aller spektroskopischen Methoden ist die Wechselwirkung zwischen Strahlung und Materie. Aus dieser lassen sich abhängig von der Energie E der Strahlung verschiedenste Informationen über das untersuchte System erhalten. Ein Spektrum ist in diesem Zusammenhang die Korrelation einer Intensität I oder eines daraus abzuleitenden Parameters mit einer Größe, welche mit der Energie der Strahlung assoziiert ist. Die Zusammenhänge zwischen verschiedenen Maßen, die in Spektren häufig anstelle der Energie der Strahlung verwendet werden, liefert Gleichung (1):

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c_0}{\lambda} = h \cdot c_0 \cdot \tilde{\nu} \quad (1)$$

Dabei ist h das Plancksche Wirkungsquantum ($h = 6.626 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$ [108]), c_0 die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum ($c_0 = 2.998 \cdot 10^8 \text{ m s}^{-1}$ [108]) und ν die Frequenz der Strahlung. In Fluoreszenzspektren wird z. B. häufig die Wellenlänge λ der Strahlung aufgetragen, während hingegen in IR-Spektren typischerweise die Energie der Strahlung in Form der Wellenzahl $\tilde{\nu}$ angegeben wird.

Mögliche Resultate der Interaktion zwischen Materie und Licht sind die Absorption und die Streuung der Strahlung. Bei der reinen Absorptionsspektroskopie werden aus den aufgenommenen Energien Rückschlüsse über charakteristische Eigenschaften der untersuchten Substanz gezogen. Dies geschieht in vielen Fällen unter Anwendung quantenmechanischer Modelle (vgl. z. B. Kapitel 2.2.2, Seite 22 ff.). Bei Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes (Gleichung 2) lassen sich auch Erkenntnisse über die Konzentration c der absorbierenden Spezies mit dem Extinktionskoeffizienten $\varepsilon(E)$ gewinnen:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d = \log_{10} \frac{I_0}{I} \quad (2)$$

Dabei ist I_0 die eingestrahelte Intensität, während I die nach dem Durchgang durch die Probe verbliebene Intensität darstellt. A ist die Absorbanz oder auch Extinktion der Probe, d repräsentiert die Durchstrahldicke.

Prinzipiell kann es zu einer Absorption von Strahlung kommen, wenn bei einem Übergang von einem niedrigeren Energieniveau in ein höheres die Energiedifferenz ΔE zwischen diesen

Zuständen (genau) durch die Energie $h \cdot \nu$ eines Photons aufgebracht wird (Bohrsche Frequenzbedingung). Beispielsweise werden bei elektronischen Übergängen Energiedifferenzen überbrückt, die der Energie von Lichtteilchen des sichtbaren und ultravioletten Lichts entsprechen ($\lambda = 200\text{-}800\text{ nm}$), während zur direkten Anregung höherer Schwingungsniveaus IR-Licht mit einer Wellenlänge von $1\text{ }\mu\text{m}$ bis $100\text{ }\mu\text{m}$ benötigt wird.

Die Existenz von Energiezuständen ergibt sich aus der Lösung der Schrödingergleichung. Ob nun zwischen zwei existenten Zuständen Übergänge möglich sind, hängt aber noch von weiteren Faktoren ab: Einer davon ist die Besetzung der Zustände. Die Besetzungszahl eines bestimmten Zustandes N_i relativ zur Gesamtzahl N aller besetzten Zustände hängt aufgrund der Boltzmannverteilung von der Energie E_i dieses Zustandes ab. Daneben spielt dessen Entartungsgrad g_i eine Rolle. Dabei sind in Gleichung (3) k_B die Boltzmannkonstante ($k_B = 1.381 \cdot 10^{-23}\text{ J K}^{-1}$ [108]) und T die absolute Temperatur:

$$\frac{N_i}{N} = \frac{g_i \exp(-E_i \cdot k_B^{-1} \cdot T^{-1})}{\sum_{i=1}^N g_i \exp(-E_i \cdot k_B^{-1} \cdot T^{-1})} \quad (3)$$

So kann z. B. die Anregung nicht aus Zuständen heraus erfolgen, die gar nicht besetzt sind. Aus der quantenmechanischen Störungstheorie folgt außerdem, dass ein Übergang nur dann beobachtet werden kann, wenn für sein Übergangsdipolmoment $\vec{\mu}_{21}$ Ungleichung (4) erfüllt ist:

$$\vec{\mu}_{21} = \int \Psi_2^* \hat{\mu} \Psi_1 dV \neq 0 \quad (4)$$

In das elektrische Übergangsdipolmoment fließen also die Wellenfunktion des Teilchens (z. B. eines Elektrons) im Grundzustand Ψ_1 , dessen konjugiert komplexe Wellenfunktion im angeregten Zustand Ψ_2^* sowie über den Dipolmomentoperator $\hat{\mu}$ die Ortskoordinaten, entlang derer der Übergang stattfindet, ein. Die Integration erfolgt über das gesamte Volumen V des betrachteten Systems. Wenn sich also z.B. entlang einer bestimmten Raumrichtung die beiden angesprochenen Wellenfunktion geeignet überlappen und in den anderen beiden davon unabhängigen Raumrichtungen nicht, so wird der Übergang mit vergleichsweise hoher Wahrscheinlichkeit in dieser bestimmten Raumrichtung erfolgen. Letztlich ist die Intensität eines Übergangs nach Zusammenhang (5)

$$I \propto \mu_{21}^2 E_0^2 \quad (5)$$

sowohl zum Betragsquadrat des Übergangsdipolmoments als auch zum Quadrat der Amplitude des elektrischen Feldes E_0 der zur Anregung verwendeten elektromagnetischen Strahlung proportional.

2.2.2 Quantenmechanische Grundlage der IR-Spektroskopie [107, 109]

Bei der Infrarotspektroskopie handelt es sich um ein typisches Beispiel für die Absorptionsspektroskopie. Entsprechend werden aus der Absorption bestimmter Frequenzen des eingestrahnten Infrarotlichts aufgrund möglicher Schwingungsanregungen in einer Substanz Rückschlüsse auf deren Eigenschaften gezogen. Aus der Berechnung der Übergangsdipolmomente für Schwingungsübergänge ergibt sich, dass nur solche Molekülschwingungen IR-aktiv sind, bei denen sich das Dipolmoment während des Schwingungsvorgangs ändert. So sind beispielsweise zweiatomige Moleküle, die aus nur einer Atomsorte bestehen, in IR-Spektren nicht sichtbar. Das einfachste Modell zur Erklärung des Schwingungsspektrums zweiatomiger Moleküle ist der harmonische Oszillator. Dieser besteht aus zwei massebehafteten Punkten mit den Massen m_1 und m_2 , die durch eine Feder mit der Kraftkonstante k miteinander verbunden sind.

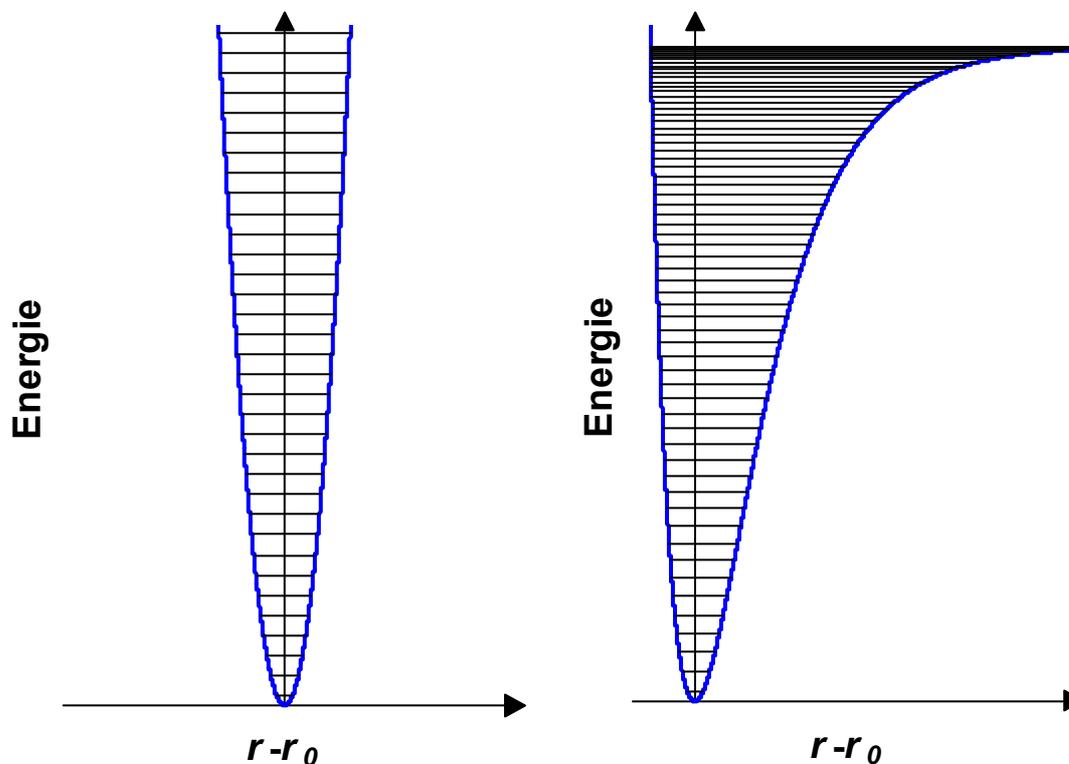


Abbildung 11. Potentialverlauf (blau) als Funktion der Auslenkung aus der Ruhelage $r - r_0$ und Energieniveaus der Schwingung (horizontale Linien) für einen harmonischen Oszillator (links) und einen anharmonischen Oszillator (rechts).

Der Potentialverlauf als Funktion des Abstands ist demnach durch das Hookesche Gesetz bestimmt und in **Abbildung 11** links (Seite 22) schematisch in blau dargestellt. Durch Lösung der Schrödingergleichung für ein solches System wird nachfolgender Ausdruck (Gleichung (6.1)) für die Energieniveaus E_h des harmonischen Oszillators als Funktion der Schwingungsquantenzahl ν ($\nu = 0, 1, 2, 3, \dots$) erhalten, wobei ν_h dessen Eigenfrequenz und μ die reduzierte Masse darstellt:

$$E_h(\nu) = h \cdot \nu_h \cdot \left(\nu + \frac{1}{2} \right) \quad \text{mit} \quad \nu_h = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \text{und} \quad \mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2} \quad (6.1 - 6.3)$$

Die Energieniveaus E_h sind also äquidistant, außerdem gibt es eine endliche Nullpunktsenergie mit $E_h(0) = 0.5 h \cdot \nu_h$. Weil die einzigen erlaubten Übergänge diejenigen zwischen benachbarten Energieniveaus sind ($\Delta\nu = \pm 1$) und die Energiedifferenz zwischen zwei solchen Niveaus immer gleich ist, kann von einem reinen harmonischen Oszillator nur eine Strahlungsfrequenz (nämlich ν_h) absorbiert werden. Eine Weiterentwicklung des harmonischen Oszillators ist der anharmonische Oszillator. Das Potential für den anharmonischen Oszillator (**Abbildung 11** rechts in blau, Seite 22) berücksichtigt auf der einen Seite die Möglichkeit der Dissoziation eines zweiatomigen Moleküls. Demzufolge flacht das Potential bei großen Auslenkungen aus der Ruhelage mit zunehmender Entfernung immer weiter ab. Auf der anderen Seite wird der starken Abstoßung Rechnung getragen, die auftritt, wenn sich zwei Atome zu nahe kommen (z. B. Pauli-Repulsion). Dies ist durch einen im Vergleich zum harmonischen Oszillator steileren Anstieg des Potentials für eine Annäherung der Schwingungspartner berücksichtigt. Auf Basis dieser Voraussetzungen liefert die Schrödingergleichung für die Energieniveaus E_a des anharmonischen Oszillators nachfolgenden Zusammenhang:

$$E_a(\nu) = h \cdot \nu_a \cdot \left(\nu + \frac{1}{2} \right) - h \cdot \nu_a \cdot x_a \cdot \left(\nu + \frac{1}{2} \right)^2 \quad (7)$$

In Gleichung (7) ist ν_a die hypothetische Schwingungsfrequenz des anharmonischen Oszillators um seine Ruhelage und x_a eine dimensionslose Anharmonizitätskonstante mit geringem positivem Wert. Es ergeben sich einige Unterschiede zum harmonischen Oszillator. So werden mit zunehmender Schwingungsquantenzahl ν die Abstände zwischen den Energieniveaus $E_a(\nu+1) - E_a(\nu)$ sukzessive geringer, bis es schließlich beim Erreichen der höchstmöglichen Schwingungsquantenzahl ν_{\max} zur Dissoziation des Moleküls kommt.

Hierdurch und durch veränderte Auswahlregeln ($\Delta v = \pm 1, \pm 2, \dots$) kann sowohl die Beobachtung von „hot bands“ (Übergänge mit $\Delta v = +1$ ausgehend von $E_a(v > 0)$) bei hohen Temperaturen als auch die Existenz von wenig intensiven Oberschwingungen (Übergänge mit $\Delta v = +2, +3$ usw. in der Regel ausgehend von $E_a(0)$) erklärt werden.

Für mehratomige Moleküle lassen sich alle Schwingungen in Normalschwingungen zerlegen. Solchen Schwingungen, bei denen es weder zu einer Verlagerung des Molekülschwerpunkts noch zu einer Rotation kommt, ist eine für sie charakteristische Frequenz zugeordnet. Diese ist prinzipiell mit ν_h bzw. ν_a vergleichbar (s. Seite 23). Grundsätzlich lassen sich Valenz- oder Streck-schwingungen, bei denen sich hauptsächlich der Bindungsabstand ändert, von Deformationsschwingungen unterscheiden. Letztere sind durch eine periodische Änderung der Bindungswinkel bei weitgehend konstantem Bindungsabstand charakterisiert.

2.2.3 IR-Spektroskopie mit Proteinen [109-110]

Die Anzahl der möglichen Normalschwingungen eines Moleküls steigt mit dessen Größe. Weil Proteine sehr große Moleküle sind, steht der Erkenntnisgewinn aus der Beschreibung der komplexen Vielfalt aller denkbaren Schwingungen in keinem Verhältnis zum damit verbundenen Aufwand, falls eine solche Analyse überhaupt möglich ist. Allerdings schwingen bestimmte Gruppen in solchen hochmolekularen Verbindungen relativ unabhängig vom Rest des Moleküls, so dass charakteristische Gruppenfrequenzen beobachtet werden können. Wichtig für die IR-Spektroskopie mit Proteinen sind in diesem Zusammenhang vor allem die verschiedenen Schwingungen der Peptidbindungen. Einige der neun bekannten Amid-Gruppenschwingungen sind in **Tabelle 2** aufgeführt:

Tabelle 2. Beispiele für Amid-Gruppenschwingungen in Proteinen [111-115].

Bande	$\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$	Hauptbeiträge
Amid-I	1690 - 1600	C=O-Streckschwingung
Amid-II	1575 - 1480	N—H-Biegeschwingung ² , C—N-Streckschwingung
Amid-III	1301 - 1229	N—H-Biegeschwingung, C—N-Streckschwingung
Amid-IV	767 - 625	O=C—N-Biegeschwingung
Amid-A	3300	N—H-Streckschwingung

Die genaue Lage der Amidbanden ist dabei von der Umgebung der Amidchromophore abhängig, so dass hieraus Rückschlüsse auf die Sekundärstruktur der untersuchten Proteine gezogen werden können. Hierfür bietet sich aufgrund ihrer hohen Intensität insbesondere die

² eine Form der Deformationsschwingung

Amid I-Bande (bzw. die Amid I'-Bande im Lösungsmittel D₂O) an. Theoretische Rechnungen und Untersuchungen von Modellpeptiden und -proteinen zeigen, dass sich den verschiedenen Sekundärstrukturelementen unterschiedliche Wellenzahlen innerhalb der Amid I-Bande zuordnen lassen. Für D₂O als Lösungsmittel, welches aufgrund der Überlagerung der Amid I-Bande mit der H₂O-Deformationsschwingung verwendet wird, ergeben sich die in **Tabelle 3** dargestellten Wellenzahlbereiche:

Tabelle 3. Wellenzahlbereiche verschiedener Sekundärstrukturelemente in der Region der Amid I'-Bande nach [110, 116-117].

Sekundärstrukturelement	Wellenzahlbereich (extreme Werte)		typischer Wert / cm ⁻¹
	untere Grenze / cm ⁻¹	obere Grenze / cm ⁻¹	
β-Faltblatt ³	1615	1638	1630
	1672	1694	1679
ungeordnete Strukturen	1639	1654	1645
α-Helix	1642	1660	1652
Schleifenstrukturen	1653	1691	1671

Die Unterschiede zwischen verschiedenen Sekundärstrukturelementen kommen z. B. durch unterschiedlich starke Wasserstoffbrückenbindungen zum Carbonylsauerstoffatom zustande. Zudem hängen die Kopplungen der Übergangsdipolmomente benachbarter Chromophore ebenfalls von deren Anordnung im jeweiligen Sekundärstrukturelement ab.

2.2.4 Messtechnik der Fourier-Transform-IR-Spektroskopie [109-110]

Es war lange Zeit eine große Schwierigkeit, die feinen Ausprägungen, welche das Proteinspektrum durch die verschiedenen Sekundärstrukturelemente erhält, überhaupt erkennbar zu machen. Ein wichtiger Fortschritt in diese Richtung war die Entwicklung einer nun bereits seit längerem etablierten Messtechnik: Im Unterschied zu älteren Versuchsaufbauten wird hierbei nicht mehr jede Wellenlänge über ein dispersives Element einzeln gemessen, sondern der ganze Frequenzbereich gleichzeitig erfasst. Damit kann ein wesentlich höheres Signal-zu-Rausch-Verhältnis und eine höhere Spektrenaufnahmefrequenz erreicht werden. Zentraler Bestandteil eines solchen modernen Spektrometers ist ein Michelson-Interferometer (vgl. **Abbildung 12**, Seite 26). Entsprechend trifft das Infrarotlicht der Strahlungsquelle zunächst auf einen halbdurchlässigen Spiegel. Dadurch wird es in zwei Strahlen aufgeteilt, so dass ein Teil des Lichts auf einen beweglichen Spiegel und der andere Teil auf einen fest positionierten Spiegel trifft. Beide Strahlen werden an den jeweiligen

³ Die Bande mit der höheren Wellenzahl hat im Allgemeinen eine geringe Intensität.

Spiegeln reflektiert und kehren danach zum Strahlteiler zurück, wo sie interferieren. Hiernach gelangt die Strahlung nach partieller Absorption durch die zu untersuchende Substanz in der Probenkammer zum Detektor.

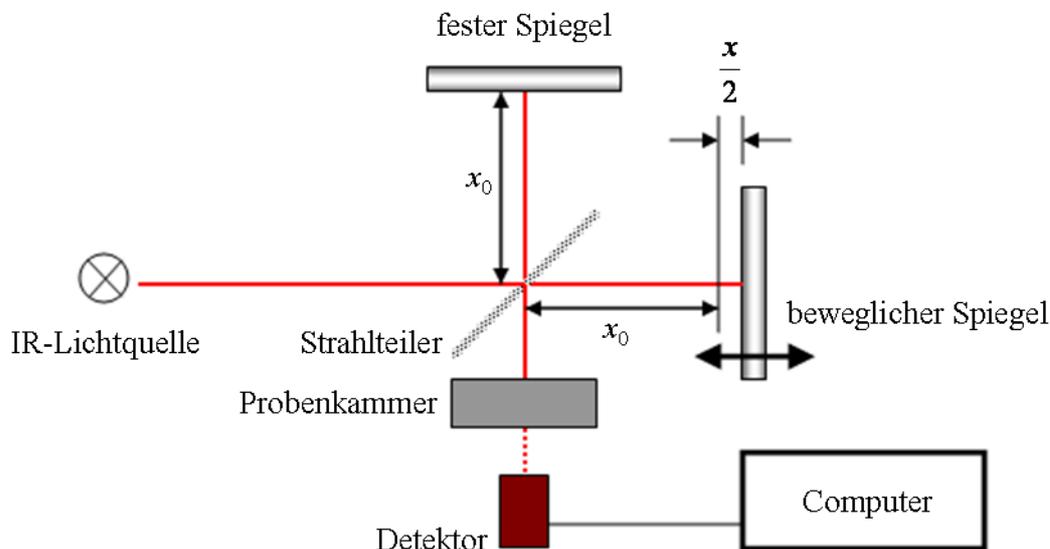


Abbildung 12. Skizze eines FTIR-Spektrometers mit Michelson-Interferometer mit x_0 als Abstand zwischen festem Spiegel und Strahlteiler.

Durch Messung der Intensität I bei gleichzeitiger Variation der Position des beweglichen Spiegels und damit der optischen Weglängendifferenz x der beiden Strahlen wird das Interferogramm $I(x)$ erhalten. Das zugehörige Spektrum (z. B. $A(\tilde{\nu})$) kann hieraus durch Fouriertransformation gewonnen werden. Bei der FTIR-Spektroskopie wird statt eines optischen Monochromators also ein mathematischer verwendet.

2.2.5 Mathematische Verbesserung der Bandenauflösung

Allein durch Anwendung der FTIR-Spektroskopie ist eine Feststellung der Lage der Banden verschiedener Sekundärstrukturelemente im Regelfall nicht möglich. Aus diesem Grunde werden mathematische Methoden verwendet, um die Positionen der Subbanden der verschiedenen Sekundärstrukturelemente zu ermitteln. Eine Möglichkeit ist die Applikation der Fourier Self-Deconvolution (FSD). Diese basiert auf der Annahme, dass das eigentliche Spektrum $A_+(\tilde{\nu})$ durch instrumentelle Einflüsse und die Datenbehandlung verbreitert ist. Die hierdurch entstehenden systematischen Fehler werden durch eine Bandenformfunktion $G(\tilde{\nu})$ zusammengefasst.

$$A(\tilde{\nu}) = A_+(\tilde{\nu}) * G(\tilde{\nu}) \quad (8)$$

Das aufgenommene Spektrum $A(\tilde{\nu})$ ist nach Gleichung (8) (Seite 26) das Ergebnis einer Faltung eines verbesserten Spektrums $A_+(\tilde{\nu})$ mit der Bandenformfunktion $G(\tilde{\nu})$. Dabei ist * der Faltungsoperator. Wie bereits in Kapitel 2.2.4 (Seite 26) angesprochen wurde, ist das erhaltene Spektrum $A(\tilde{\nu})$ das Ergebnis einer Fouriertransformation eines Interferogramms $I(x)$. Insofern lässt sich durch Anwendung von inverser Fouriertransformation $F^{-1}\{\}$ auf beide Seiten von Gleichung (8) Gleichung (9.1) erhalten und damit eine verbesserte Version des Interferogramms $I_+(x)$ nach Gleichung (9.2):

$$I(x) = I_+(x) \cdot F^{-1}\{G(\tilde{\nu})\} \Leftrightarrow I_+(x) = I(x) \cdot \frac{1}{F^{-1}\{G(\tilde{\nu})\}} \quad (9.1-9.2)$$

Aus dem optimierten Interferogramm $I_+(x)$ kann dann wiederum durch Fouriertransformation das bereinigte Spektrum $A_+(\tilde{\nu})$ erhalten werden. Durch Auswahl einer geeigneten Bandenformfunktion $G(\tilde{\nu})$ lassen sich hauptsächlich instrumentell verursachte Verbreiterungseffekte nachträglich aus den aufgenommenen Spektren entfernen [118].

Eine weitere Möglichkeit, Positionen von Subbanden ausfindig zu machen, ist die Erzeugung von zweiten Ableitungen der Spektren [119].

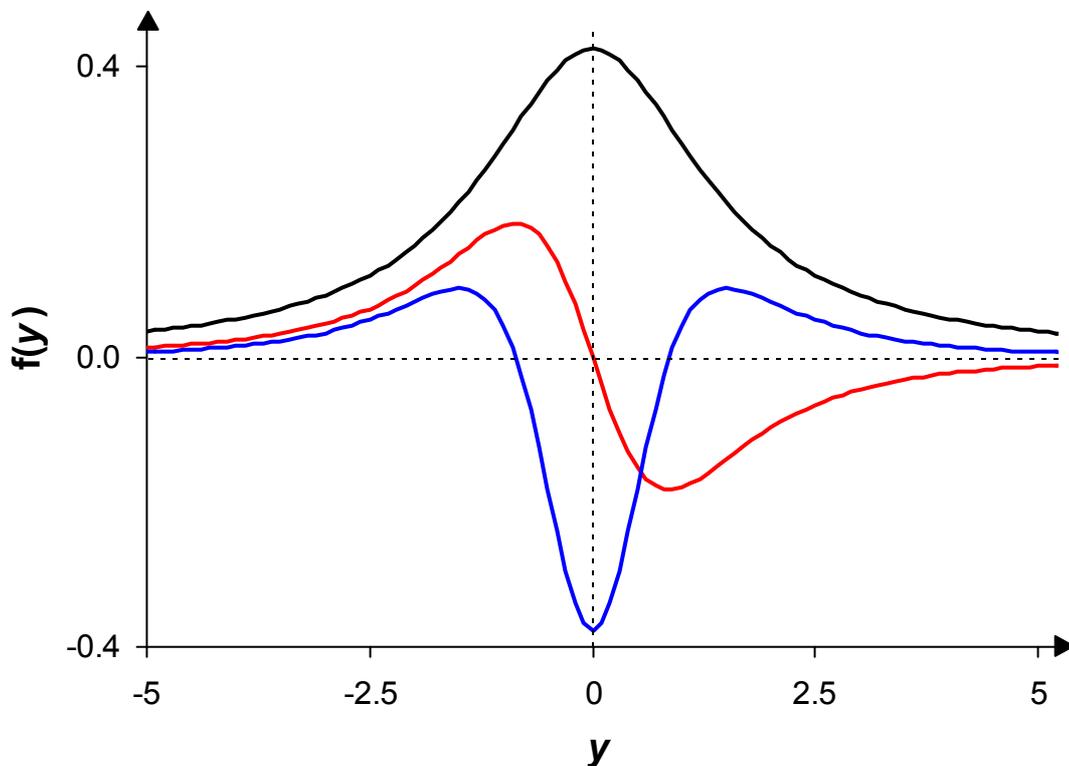


Abbildung 13. Darstellung der Lorentzfunktion $f(y) = 3\pi^{-1} (y^2 + 2.25)^{-1}$ (schwarz) sowie der ersten (rot) und zweiten (blau) Ableitung dieser Funktion.

An den Bandenpositionen im Originalspektrum sollten in dessen zweiter Ableitung Minima auftauchen, wie dies exemplarisch für eine Lorentzfunktion in **Abbildung 13** (Seite 27) dargestellt ist. Dabei wird auch deutlich, dass der Peak der zweiten Ableitung schärfer ist als derjenige der Ursprungsfunktion. Ähnlich wie bei der FSD wird eine Verbesserung der Bandenschärfe auf Kosten des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses erreicht.

2.2.6 Kurvenanpassung zur Quantifizierung der Sekundärstruktur

Die Anteile verschiedener Sekundärstrukturen an der Amid I-Bande (bzw. Amid I'-Bande) können durch Kurvenanpassung ermittelt werden. Dabei werden die Subbanden der einzelnen Sekundärstrukturelemente so gewichtet, dass deren Summe auf Basis der geringsten quadratischen Abweichung das Gesamtspektrum ergibt (vgl. Gleichung 10). Beispielsweise kann die Anpassung an durch die FSD in ihrer Bandenauflösung verbesserte Spektren $A_+(\tilde{\nu})$ erfolgen. Die Prozedur der Selbstentfaltung muss in diesem Fall sehr vorsichtig geschehen, damit hieraus keine Veränderungen der Flächenanteile der verschiedenen Banden resultieren [120]. Solide Ergebnisse können allerdings auch durch direkte Anpassung an die nicht nachbehandelten Spektren $A(\tilde{\nu})$ erhalten werden. In diesem Fall werden FSD und abgeleitete Spektren nur dazu verwendet, die Positionen der Maxima der Subbanden $\tilde{\nu}_{0i}$ für den Anpassungsvorgang zu ermitteln. Diese sollten aus den beiden Methoden zur Verbesserung der Bandenauflösung (vgl. Abschnitt 2.2.5, Seite 26 ff.) übereinstimmend erhalten werden und während des Anpassungsvorgangs nicht mehr als 2 cm^{-1} von ihrer Startposition abweichen. Zur Approximierung des Spektrums eignet sich beispielsweise eine Kombination aus Gauß- und Lorentzfunktionen [121]:

$$A(\tilde{\nu}) = \sum_{i=1}^n \left\{ A_{0i}(1 - X_i) \left[1 + 4 \cdot \frac{(\tilde{\nu} - \tilde{\nu}_{0i})^2}{\sigma_i^2} \right]^{-1} + A_{0i} X_i \exp \left[-4 \cdot (\ln 2) \frac{(\tilde{\nu} - \tilde{\nu}_{0i})^2}{\sigma_i^2} \right] \right\} \quad (10)$$

A_{0i} sind in Gleichung (10) die Extinktionen der n Bandenmaxima, die während des Anpassungsvorgangs auf positive Werte beschränkt werden. X_i ist der relative Anteil der Gaußkomponente an der jeweiligen Bande mit $0 \leq X_i \leq 1$. Die Halbwertsbreite σ_i einer jeden Bande sollte einen Wert von 25 cm^{-1} nicht überschreiten; aufgrund der natürlichen Breite des Spektrums sollten allerdings auch keine zu schmalen Banden zugelassen werden. Im Idealfall repräsentiert die Fläche unter einer Bande relativ zur Fläche der gesamten Amid I-Bande den Anteil des zugehörigen Sekundärstrukturelements an der Gesamtstruktur des Proteins.

Weil sich die Extinktionskoeffizienten der einzelnen Strukturelemente unterscheiden, können jedoch keine absolut gültigen Zahlen für die Sekundärstrukturanteile erhalten werden. Dennoch ist der aussagekräftige Nachweis von Strukturveränderungen möglich.

2.2.7 Grenzflächensensitive IR-Spektroskopie mittels ATR-Technik

Um unter Verwendung der IR-Spektroskopie Aussagen speziell über die Situation in der Nähe einer Grenzfläche zu treffen, wird die abgeschwächte Totalreflexion (Attenuated Total Reflection (ATR)) ausgenutzt [122-125]. Nach dem Brechungsgesetz von Snellius tritt Totalreflexion anstelle eines Übertritts elektromagnetischer Strahlung von einem optisch dichteren Medium (Brechungsindex n_1) in ein optisch dünneres Medium (Brechungsindex $n_2 < n_1$) dann auf, wenn der Einfallswinkel θ zur Normalen der Grenzfläche zwischen den beiden Medien einen nach Gleichung (11) bestimmten kritischen Winkel θ_c überschreitet.

$$\theta_c = \sin^{-1}\left(\frac{n_2}{n_1}\right) \quad (11)$$

Bei der ATR-FTIR-Spektroskopie wird das Infrarotlicht demnach in ein internes Reflexionselement (IRE) mit einer hohen optischen Dichte eingeleitet (vgl. **Abbildung 14**). Beispielsweise kann ein solches IRE aus Germanium ($n_1 = 4.0$ [126], $\theta_c \approx 25^\circ$ mit $n_2 = 1.71$ (für Amid I nach [125])) oder Silizium ($n_1 = 3.4$ [126], $\theta_c \approx 30^\circ$ mit $n_2 = 1.71$ [125]) bestehen.

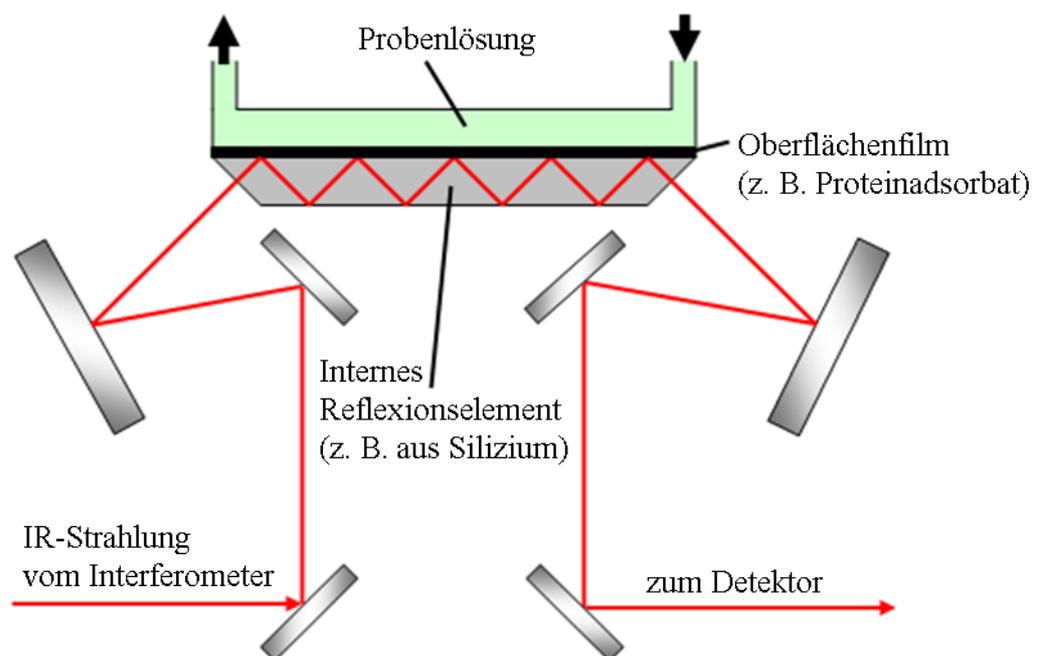


Abbildung 14. Schematische Darstellung einer ATR-Messanordnung zur Untersuchung der IR-Absorption an einer wässrig-festen Grenzfläche.

Jedes Mal, wenn das Licht in dem Reflexionselement auf die Grenzfläche zu einem optisch dünneren Medium (z. B. Probenlösung) trifft, findet eine Totalreflexion statt. Durch die Überlagerung der einfallenden und ausfallenden Welle entsteht eine stehende Welle, welche exponentiell in dem optisch dünneren Medium nach Zusammenhang (12) abfällt:

$$E_z = E_0 \cdot \exp\left(-\frac{z}{d_z}\right) \quad (12)$$

Dabei ist z die Entfernung von der Grenzfläche und d_z der Abstand von der Grenzfläche, bei dem die Amplitude der elektrischen Feldstärke E_z auf das e^{-1} -fache der Amplitude im optisch dichteren Medium E_0 abgefallen ist. Für diese Eindringtiefe gilt weiterhin Gleichung (13):

$$d_z = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2}} \quad (13)$$

In der Nähe der Grenzfläche befindliche Oszillatoren (z. B. Proteine in einem Adsorbat) werden durch diese evaneszente Welle angeregt, was zu einer Abschwächung des totalreflektierten Strahls führt. Aufgrund der abgeschwächten Frequenzen in der aus der anderen Seite des IRE austretenden Infrarotstrahlung kann ein Absorptionsspektrum erhalten werden, zu dem nur grenzflächennahe Chromophore beitragen. Ansonsten sind die erhaltenen Spektren jedoch mit aus Transmissionsmessungen erhaltenen Ergebnissen vergleichbar, wenn Grenzflächeneffekte wie die Wellenlängenabhängigkeit der Eindringtiefe korrigiert werden. Der Gesamtaufbau für die ATR-FTIR-Spektroskopie kann beispielsweise erhalten werden, indem in **Abbildung 12** (Seite 26) die Probenkammer durch die in **Abbildung 14** (Seite 29) dargestellten Elemente ersetzt wird.

Nach Gleichung (12) kann für ein IRE aus Silizium ($n_1 = 3.4$ [126]) bei einer Wellenlänge λ im Bereich der Amid-I-Bande ($\tilde{\nu} = 1650 \text{ cm}^{-1}$) eine Eindringtiefe von $d_z \approx 0.57 \text{ }\mu\text{m}$ berechnet werden, wenn $\theta = 45^\circ$ und $n_2 = 1.71$ (Wert nach [125] für die Amid I-Bande) zugrunde gelegt werden. Die Reichweite der evaneszenten Welle in die Probenlösung ist nach dieser Überschlagsrechnung also (wesentlich) größer als die übliche Dicke eines Proteinadsorbats. Weil allerdings die Konzentration der Chromophore im Adsorbat im Vergleich zur Probenlösung sehr hoch ist, fließen gelöste Proteine dennoch kaum ins Messsignal ein.

Hieraus ergibt sich auch ein wesentlicher Vorteil der ATR-FTIR-Spektroskopie gegenüber Transmissionsmessungen: Aufgrund der Anreicherung der Chromophore an der Grenzfläche ist nur eine geringe Konzentration in den verwendeten Probenlösungen erforderlich. Prinzipiell ist auch eine Quantifizierung nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (Gleichung (2), Seite 20) eher durchführbar als bei Transmissionsmessungen. Bei letzteren erweist sich eine hinreichend genaue Reproduktion der Durchstrahldicke d als problematisch, weil nur sehr geringe Durchstrahldicken Absorbanzwerte in einem sinnvollen Bereich liefern. Kleine Luftblasen und Unebenheiten im Strahlengang können die quantitative Aussagekraft daher deutlich einschränken. Außerdem muss die Reflexion von IR-Licht an Teilen der Transmissionsmesszelle berücksichtigt werden. Allerdings ist auch eine Quantifizierung des Messsignals der ATR-FTIR-Spektroskopie durch den zum Lambert-Beerschen Gesetz völlig analogen Ausdruck (14) daran gebunden, dass wichtige Informationen, wie beispielsweise die Dicke und der Brechungsindex des untersuchten Oberflächenfilms, bekannt sind, um die effektive Eindringtiefe d_e z. B. mit Hilfe der Hypothesen für dünne oder dicke Filme berechnen zu können [125].

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d_{\text{eff}} \quad \text{mit} \quad d_{\text{eff}} = N \cdot d_e \quad (14)$$

In Gleichung (14) ist N die Anzahl der Reflexionen an der zu untersuchenden Grenzfläche des internen Reflexionselements und d_{eff} die effektive Durchstrahldicke.

Das Hauptaugenmerk liegt in dieser Arbeit auf der Analyse der Sekundärstruktur, welche sich im Wesentlichen aus der Form der Spektren (vgl. Abschnitte 2.2.3 - 2.2.6, Seite 24 ff.) adsorbierter Proteine ergibt, so dass die für eine quantitative Auswertung des Messsignals nach Zusammenhang (14) erforderlichen Größen (s. o.) nicht bestimmt wurden. Die gezeigten Adsorptionskinetiken liefern aus diesem Grunde einen qualitativen Eindruck des Adsorptionsgrades der untersuchten Proteine.

2.3 TIRF-Spektroskopie mit Proteinen

2.3.1 Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie [107, 109]

Anders als bei der reinen Absorptionsspektroskopie (vgl. Kapitel 2.2.1, Seite 20 ff.) sind für die Fluoreszenzspektroskopie Vorgänge ausschlaggebend, die erst als Konsequenz einer vorangegangenen Absorption stattfinden können. Einen Überblick über die möglichen Folgen einer elektronischen Anregung, welche durch UV- bzw. sichtbares Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 200\text{-}800\text{ nm}$ erfolgen kann, bietet das Jablonski-Diagramm (**Abbildung 15**).

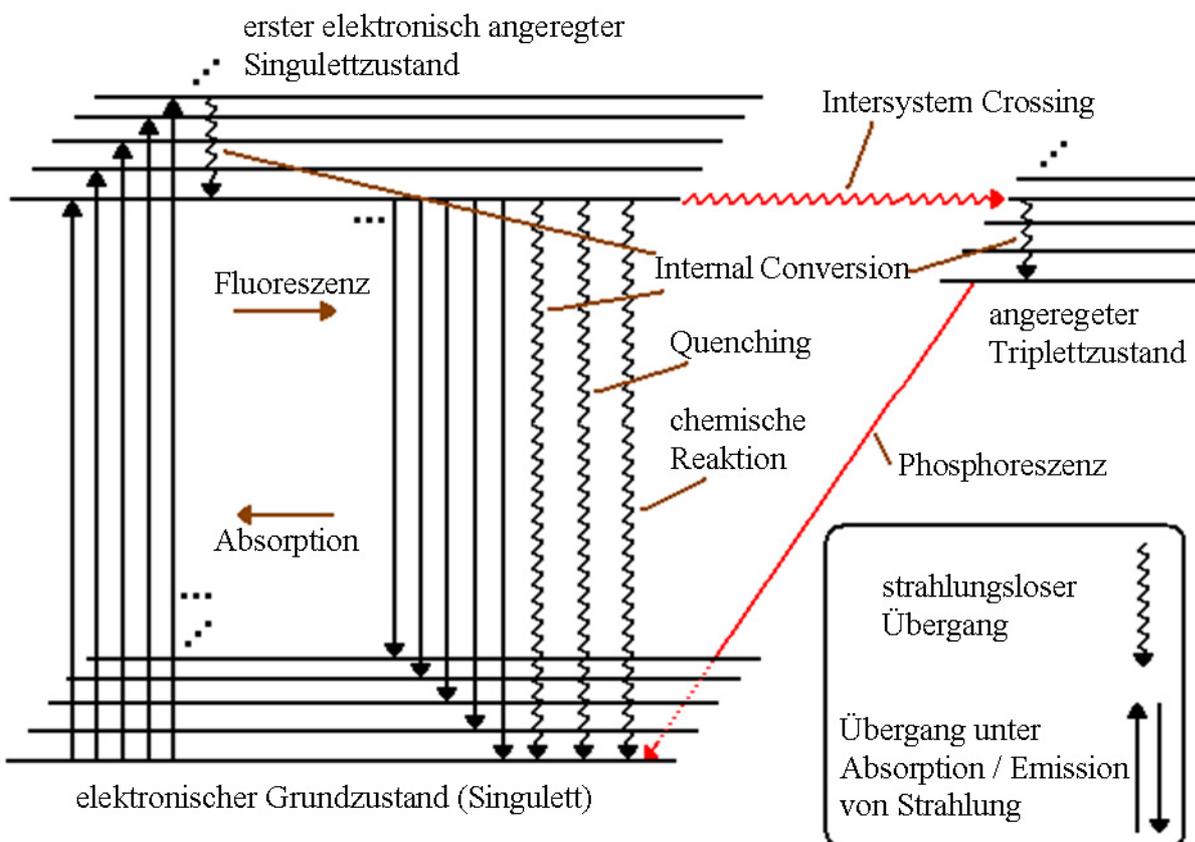


Abbildung 15. Darstellung möglicher Folgeereignisse nach elektronischer Anregung eines Fluorophors (Jablonski-Diagramm nach [109]).

Alle Vorgänge der Desaktivierung eines elektronisch angeregten Zustands unter Emission von Strahlung werden unter dem Begriff Lumineszenz zusammengefasst. Bei der Phosphoreszenz erfolgt die Freisetzung von Strahlung aufgrund eines Übergangs von einem Triplettzustand in einen Singulettzustand, während bei der Fluoreszenz die Spinmultiplizität beider Zustände identisch ist. Sowohl Absorption als auch Emission von Strahlung gehen bei elektronischen Übergängen häufig mit einer Änderung des Schwingungszustands (in **Abbildung 15** durch

die nahe beieinander liegenden Linien angedeutet) einher. Zum groben Verständnis ist es in diesem Zusammenhang hilfreich, sich einen elektronischen Übergang im Modell des harmonischen / anharmonischen Oszillators (vgl. Abschnitt 2.2.2, Seite 22 ff.) als einen sehr schnellen Austausch der Feder vorzustellen. Folglich kann eine neue Ruhelage r_0 resultieren, so dass ein anderer Energiebetrag bei unveränderter Position r in der Schwingung gespeichert ist⁴.

Die elektronische Anregung findet auf einer extrem kurzen Zeitskala von 10^{-15} Sekunden statt. Die danach in Schwingungen gespeicherte Energie wird schnell, d. h. innerhalb von 10^{-11} Sekunden, durch Stöße mit umgebenden Molekülen abgegeben (Internal Conversion). Der Ausgangszustand für weitere mögliche Vorgänge ist demzufolge der Schwingungsgrundzustand des ersten elektronisch angeregten Niveaus. Als Konsequenz zeichnet sich die nach ca. 10^{-8} Sekunden erfolgende Fluoreszenzemission durch ein im Vergleich zur Absorption rotverschobenes Spektrum aus, auch weil sie ebenfalls zu Schwingungsanregungen führen kann (s. o.). Die in beiden Spektren zu erwartende Schwingungsfeinstruktur kann zumindest in Lösungen nicht aufgelöst werden und trägt so neben anderen Faktoren zu einer Verbreiterung der zu beobachtenden Banden bei.

Die Fluoreszenz steht in Abhängigkeit vom untersuchten System in Konkurrenz zu verschiedenen auf einer ähnlichen Zeitskala stattfindenden strahlungslosen Desaktivierungsvorgängen, wie beispielsweise erneut Stößen⁵ mit der Umgebung oder chemischen Reaktionen. Die resultierende Erniedrigung der Fluoreszenzintensität kann auf der einen Seite unerwünscht sein; andererseits können daraus bei geeigneter Versuchsausführung und Auswertung wiederum Informationen über die zugrunde liegenden Prozesse erhalten werden. Dies unterstreicht die Vielfältigkeit fluoreszenzspektroskopischer Methoden, deren großer Vorteil dabei in ihrer hohen Empfindlichkeit besteht. Ein wichtiger Aspekt hierfür ist neben den unterschiedlichen Wellenlängen des Anregungs- und Emissionslichts die Möglichkeit, das Emissionslicht in einer anderen Raumrichtung zu detektieren als das Anregungslicht (vgl. z. B. **Abbildung 17**, Seite 35). Allerdings ist Fluoreszenz kein universelles Phänomen, so dass Experimente an das Vorhandensein von Elektronensystemen mit bestimmten Eigenschaften (Fluorophore) gekoppelt sind. Unter Umständen muss ein Fluorophor also erst auf geeignete Weise in das interessierende System eingeführt werden.

⁴ Die quantenmechanische Betrachtung liefert für die gleichzeitige Anregung von Schwingungen größere Überlappungen der Wellenfunktionen des elektronischen Grund- und angeregten Zustands entlang der senkrechten Übergangsrichtung (Franck-Condon-Prinzip), so dass solche Übergänge wahrscheinlicher sind.

⁵ Aufgrund des größeren zu überwindenden Energieunterschieds geschieht die Rückkehr in den elektronischen Grundzustand durch Stöße deutlich langsamer als die Rückkehr in den Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustands.

2.3.2 Fluoreszenzspektroskopie mit Proteinen

Fluoreszenzspektroskopische Methoden finden breite Anwendung bei der Bestimmung von Proteineigenschaften. Beispielsweise sind in Abhängigkeit von den experimentellen Bedingungen Daten über die globale und interne Dynamik von Proteinen ebenso zugänglich wie Informationen über deren Struktur [127]. Auf letzteren Aspekt konzentrieren sich die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen. Hierzu kann die intrinsische Fluoreszenz von Proteinen ausgenutzt werden, welche durch die Seitenketten der Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan (vgl. **Abbildung 16**) bestimmt wird.

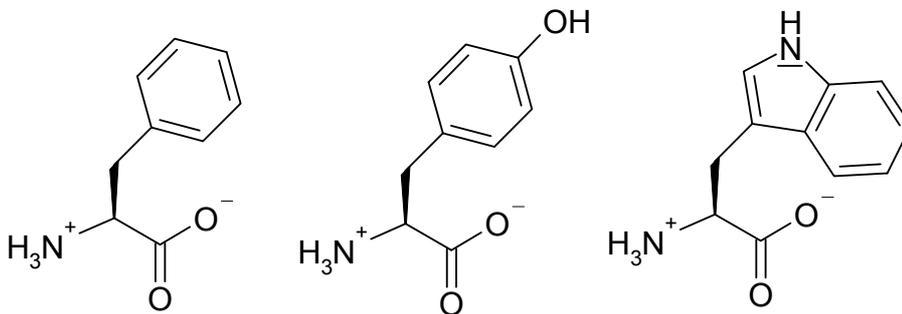


Abbildung 16. Aminosäuren, deren Seitenketten intrinsische Fluorophore in Proteinen darstellen (links Phenylalanin, mittig Tyrosin, rechts Tryptophan).

Den mit Abstand wichtigsten Beitrag liefern dabei die Tryptophanseitenketten. Diese weisen mit $\lambda_{\max} = 280 \text{ nm}$ das langwelligste Absorptionsmaximum auf. Um Tyrosinseitenketten nicht ebenfalls anzuregen, kann aber auch mit längeren Wellenlängen (z. B. $\lambda = 295 \text{ nm}$) gearbeitet werden [127]. Allerdings ist in diesem Fall ein stärkerer Einfluss von Streustrahlung auf die Emissionsspektren zu verzeichnen.

Wichtig für eine Untersuchung der Tertiärstruktur von Proteinen ist die starke Abhängigkeit des Tryptophan-Emissionsspektrums von der Umgebung des Fluorophors. Das Intensitätsmaximum der Emissionsbande liegt in hydrophober Umgebung bei einer Wellenlänge von ca. 330 nm, während in wässriger Umgebung ein Wert von 350 nm beobachtet wird. Dieser hauptsächlich auf Lösungsmittelrelaxation beruhende Effekt kann ausgenutzt werden, um Aussagen über den Faltungszustand eines Proteins zu treffen: Die selbst vergleichsweise hydrophoben Tryptophanseitenketten befinden sich häufig im Inneren eines Proteins, wenn dieses im gefalteten Zustand vorliegt. Eine Denaturierung des Proteins führt dann zu einer vermehrten Lösungsmittelexposition dieser Fluorophore und wird folglich durch eine Rotverschiebung des Emissionsspektrums angezeigt [11].

2.3.3 Grenzflächensensitive Fluoreszenzspektroskopie mittels TIRF

Um Aussagen bezüglich des Faltungszustands adsorbierter Proteine treffen zu können, wird eine grenzflächensensitive Fluoreszenzmessmethodik benötigt. Hierzu bietet sich die TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence)-Spektroskopie an, welche nach ihrer ersten Beschreibung [128-129] seit langer Zeit Einzug in die Untersuchung von Proteinen gehalten hat (z. B. [130]).

Das Funktionsprinzip ist in mehrerlei Hinsicht mit der ATR-Technik im Zusammenhang mit der FTIR-Spektroskopie (Kapitel 2.2.7, Seite 29 ff.) vergleichbar. So wird auch bei der TIRF-Spektroskopie die Totalreflexion des Anregungslichts in einem optisch dichteren Medium an der Grenzfläche zu einem optisch dünneren Medium ausgenutzt (Gleichung (11) auf Seite 29 gilt entsprechend). Die jenseits der Grenzfläche zwischen den Medien unterschiedlicher optischer Dichte exponentiell abfallende Welle des Anregungslichts regt ausschließlich oberflächennahe Fluorophore an. Wie exemplarisch in **Abbildung 17** gezeigt ist, kann ein Teil des resultierenden in alle Raumrichtungen abgestrahlten Emissionslichts durch ein Linsensystem erfasst und zum Detektor weitergeleitet werden.

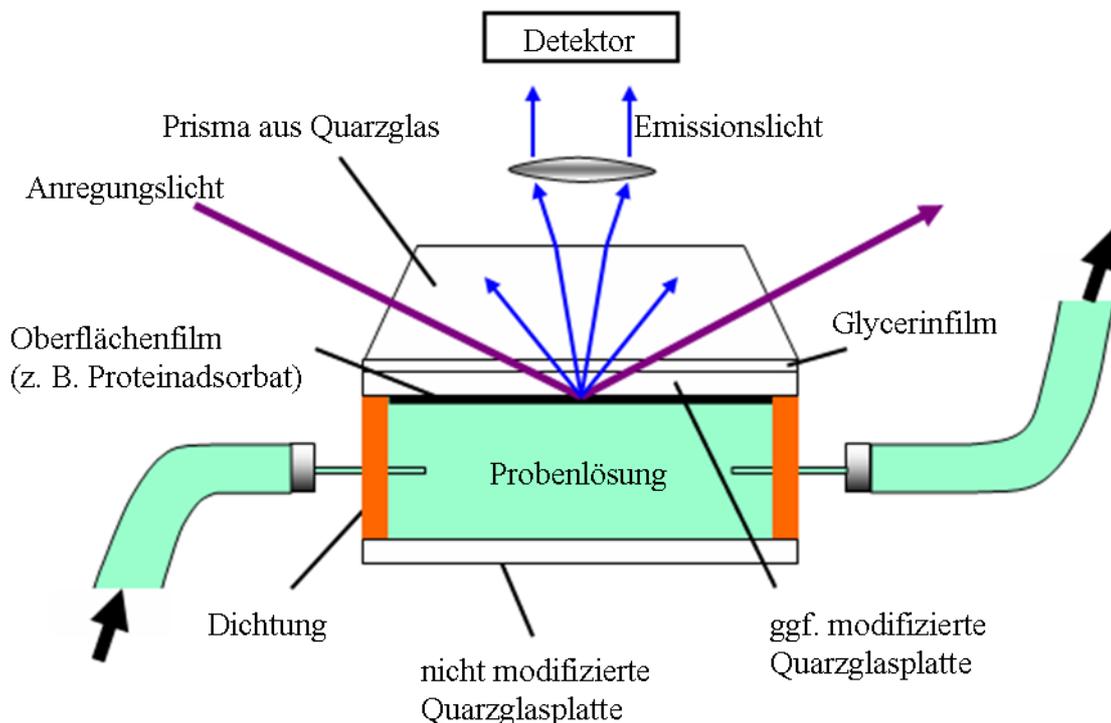


Abbildung 17. Schematische Darstellung einer möglichen TIRF-Messanordnung zur Untersuchung der Fluoreszenzemission an einer wässrig-festen Grenzfläche.

Eine im Vergleich zur ATR-FTIR-Spektroskopie neue Anforderung an das Material des optisch dichteren Mediums besteht in der Durchlässigkeit gegenüber UV-Licht, welches zur

Anregung intrinsischer Proteinfluoreszenz benötigt wird. Aus diesem Grunde wird häufig ein Prisma aus Quarzglas verwendet. Aus praktischen Gründen⁶ wird in der in **Abbildung 17** (Seite 35) schematisch dargestellten Ausführung die Adsorption nicht direkt an der Oberfläche des Prismas untersucht, sondern an einer Quarzglasplatte, die über eine Flüssigkeit mit ähnlichem Brechungsindex optisch an das Prisma gekoppelt ist. Aufgrund des im Vergleich zu Germanium oder Silizium wesentlich niedrigeren Brechungsindex von Quarzglas ($n_1 = 1.489$ bei $\lambda = 295$ nm und $\vartheta = 18$ °C [126]) ist eine Einstrahlung des Anregungslichts bei deutlich größeren Winkeln zur Grenzflächennormalen erforderlich (mit $n_2 = 1.360$ [11] folgt nach Zusammenhang (11) auf Seite 29 $\theta_c \approx 66^\circ$). Mit einem typischen Einstrahlwinkel von $\theta = 70^\circ$ folgt nach Gleichung (13) auf Seite 30 eine Eindringtiefe d_z von 143 nm [11]. Dieser Wert ist deutlich geringer als bei typischen ATR-FTIR-spektroskopischen Experimenten (vgl. Kapitel 2.2.7, Seite 30). Bei ausreichend verdünnten Probenlösungen sollte also auch hier im Wesentlichen nur adsorbiertes Material zum Signal beitragen. Wie schon bei der ATR-FTIR-Spektroskopie können mit der TIRF-Spektroskopie erhaltene Daten zu einem aussagekräftigen Vergleich mit in Lösung erhaltenen Resultaten herangezogen werden. Auch bei den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen der Proteinadsorption wurde auf eine Quantifizierung der Oberflächenbelegung verzichtet, weil die in der Lage der Emissionsbande von Tryptophan enthaltene Strukturinformation im Mittelpunkt des Interesses steht.

⁶ Eine ggf. erstrebenswerte Oberflächenmodifikation ist bei einer Platte leichter durchzuführen, außerdem würde die ständig wiederholte Anwendung aggressiver Reinigungsprozeduren auf das Prisma schnell eine hohe Rauigkeit von dessen Oberfläche zur Folge haben.

2.4 Enzymkinetik

2.4.1 Eigenschaften von Enzymen

Der natürliche Zweck von Enzymen besteht in der Katalyse der meisten lebenswichtigen physiologischen Reaktionen, so dass diese unter den dem Biosystem zuträglichen Bedingungen stattfinden können. In der Regel zeigen sie eine ausgeprägte Spezifität gegenüber einem bestimmten Substrat und ermöglichen selektiv eine bestimmte Reaktion. Mit Lysozym (Abschnitt 2.1.1, Seite 12 f.) und Meerrettichperoxidase (Kapitel 2.1.4, Seite 16 ff.) sind auch zwei Vertreter dieser Art von Proteinen Gegenstand dieser Arbeit. Der Effekt von Biokatalysatoren beruht auf der Bereitstellung eines alternativen Reaktionsweges, auf dem die zu überwindende Energiebarriere deutlich abgesenkt ist. Der mögliche Einfluss eines Enzyms auf die Energetik einer Reaktion ist in **Abbildung 18** schematisch dargestellt. Entsprechend werden die betroffenen Reaktionen um einen Faktor im Bereich von 10^6 bis 10^{14} beschleunigt.

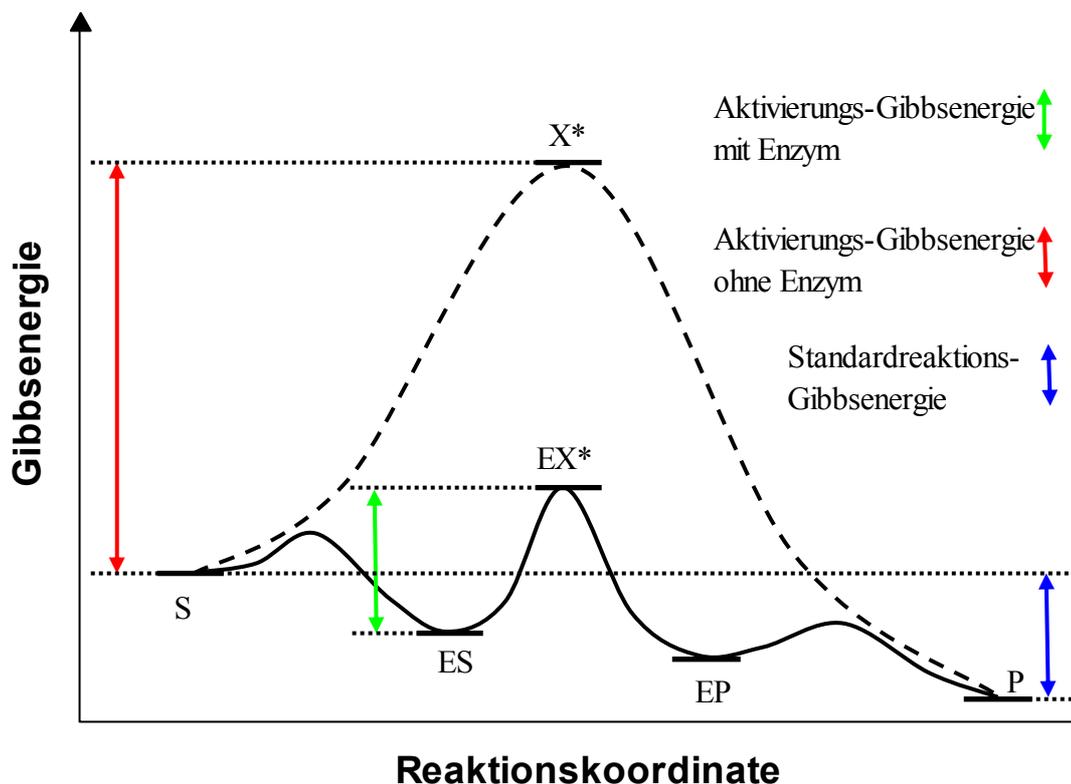


Abbildung 18. Reaktionsenergieschema für die Reaktion von einem Substrat (S) zu einem Produkt (P) ohne Katalysator über einen Übergangszustand X^* (gestrichelte Linie) oder mit Enzym über die Zwischenstufen eines Enzym-Substrat-Komplexes (ES) und eines Enzym-Produkt-Komplexes (EP) und einen energetisch deutlich niedriger liegenden Übergangszustand EX^* (durchgezogene Linie).

Die Lage des Gleichgewichts bleibt hiervon jedoch unberührt, so dass im Falle einer Gleichgewichtsreaktion auch die Geschwindigkeit der Rückreaktion gesteigert wird. Insofern ermöglichen Enzyme im Wesentlichen eine (dramatisch) schnellere Einstellung des thermodynamisch vorgegebenen Gleichgewichts [109].

2.4.2 Michaelis-Menten-Kinetik [109]

Basis der zu Beginn des 20. Jahrhunderts zur Beschreibung der Reaktionsgeschwindigkeit enzymkatalysierter Reaktionen entwickelten Michaelis-Menten-Kinetik (verfeinert durch Briggs und Haldane) ist eine Vereinfachung des in **Abbildung 18** (Seite 37) zugrunde gelegten Reaktionsablaufs (vgl. **Abbildung 19**). Demnach besteht ein Gleichgewicht zwischen dem Enzym-Substrat-Komplex (ES) und den freien Komponenten Enzym (E) und Substrat (S). Die Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion sind dabei k_1 respektive k_{-1} . Während die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes also einen reversiblen Prozess darstellen soll, werden die Bildung des Produkts und der Zerfall des Enzym-Produkt-Komplexes (EP, vgl. **Abbildung 18**, Seite 37) in einem irreversiblen Schritt mit der Geschwindigkeitskonstante k_2 zusammengefasst. Dies ist zumindest für den Reaktionsbeginn, bei dem kaum Produkt vorliegt oder in biologischen Systemen, in denen entstehendes Produkt sofort wieder in anderen Reaktionen verbraucht wird, eine sinnvolle Annahme.



Abbildung 19. Allgemeine Reaktionsgleichung für die Michaelis-Menten-Kinetik.

Unter der Annahme von Quasistationarität (zeitliche Konstanz der Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes c_{ES}) lassen sich die Prozesse, welche zur Bildung und zum Abbau des Enzym-Substrat-Komplexes führen, bilanzieren (Gleichung (15)). Es wird von Elementarreaktionen ausgegangen, so dass die stöchiometrischen Koeffizienten nach **Abbildung 19** den Reaktionsteilordnungen der Reaktanden entsprechen.

$$\frac{dc_{\text{ES}}}{dt} = 0 = k_1 \cdot c_{\text{E}} \cdot c_{\text{S}} - k_{-1} \cdot c_{\text{ES}} - k_2 \cdot c_{\text{ES}} \Leftrightarrow c_{\text{ES}} = \frac{k_1 \cdot c_{\text{E}} \cdot c_{\text{S}}}{k_{-1} + k_2} \quad (15)$$

Dabei ist c_{E} die Konzentration von freiem Enzym und c_{S} die Konzentration an ungebundenem Substrat. Weil die Bildung des Produkts den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion darstellt, gilt für die Reaktionsgeschwindigkeit v_{R} entsprechend:

$$v_R = k_2 c_{ES} = k_2 \frac{k_1 \cdot c_E \cdot c_S}{k_{-1} + k_2} = \frac{k_2 \cdot c_{E, \text{ges}} \cdot c_S}{K_M + c_S} \quad (16.1)$$

$$\text{mit } K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \text{ und } c_{E, \text{ges}} = c_E + c_{ES} \quad (16.2-16.3)$$

In den Zusammenhängen (16.1) und (16.3) ist $c_{E, \text{ges}}$ die Gesamtkonzentration an Enzym, welche eher bekannt ist als die beiden mit ihr nach Gleichung (16.3) assoziierten Größen. Für große Substratkonzentrationen c_S geht die Reaktionsgeschwindigkeit gegen einen Grenzwert, die Maximalgeschwindigkeit $v_{R, \text{max}}$. Nach Beziehung (16.1) muss hierfür gelten:

$$v_{R, \text{max}} = k_2 \cdot c_{E, \text{ges}} \quad (17)$$

Das Verhalten eines Enzyms, welches der Michaelis-Menten-Kinetik gehorcht, ist in **Abbildung 20** noch einmal grafisch verdeutlicht. Hieraus ist ebenfalls zu entnehmen, dass die Michaeliskonstante K_M der für die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erforderlichen Substratkonzentration entspricht. Eine geringe Michaelis-Konstante ist im Allgemeinen ein Hinweis auf eine hohe Bindungsaffinität zwischen Enzym und Substrat.

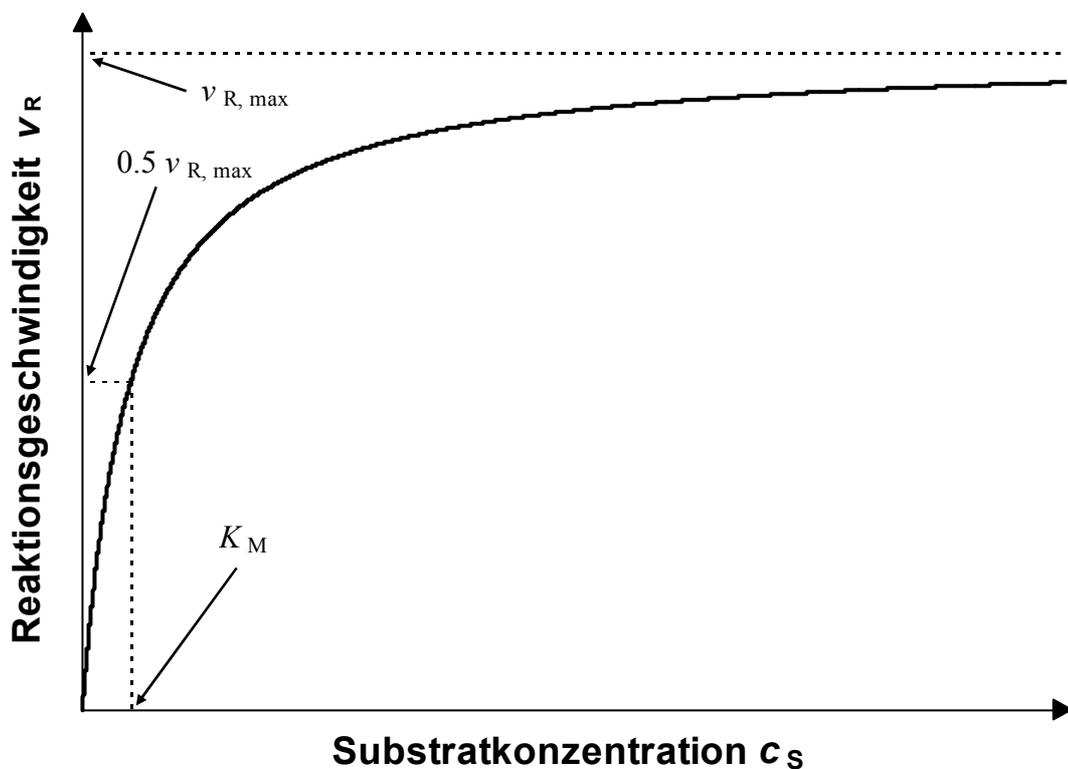


Abbildung 20. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit v_R von der Substratkonzentration c_S für eine enzymatisch katalysierte Reaktion nach Gleichung (16.1).

Dies wird insbesondere für $k_2 \ll k_{-1}$ deutlich, weil in diesem Fall K_M nach Formel (16.2) auf Seite 39 der Gleichgewichtskonstanten für die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes entspricht. Das beschriebene Sättigungsverhalten kommt durch die vollständige Auslastung aller verfügbaren Enzymmoleküle mit Substratmolekülen zustande. Für einen weiteren Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit wäre pro Zeiteinheit die Umsetzung weiterer Substratmoleküle zum Reaktionsprodukt erforderlich; hierfür steht allerdings kein Enzym mehr zur Verfügung.

Eine Bestimmung der enzymspezifischen Größe K_M für die betrachtete Reaktion (vgl. **Abbildung 9**, Seite 17) ist aufgrund der experimentellen Rahmenbedingungen⁷ nicht Gegenstand der Untersuchungen. Allerdings stecken in den unter der Voraussetzung hoher Substratkonzentrationen erhaltenen Reaktionsgeschwindigkeiten nach Gleichung (17) auf Seite 39 Informationen grundsätzlich sowohl über die Aktivität der Enzyme (k_2) als auch über deren Anzahl.

2.5 Monomolekulare Filme

In Wasser schwerlösliche amphiphile Substanzen (wie langkettige Fettsäuren oder Phospholipide) können an der Luft-Wasser-Grenzfläche monomolekulare Filme ausbilden. Dies kann zur Erzeugung von (Multi-)Schichten solcher Substanzen auf anderen Oberflächen ausgenutzt werden [131-133].

2.5.1 Grenzflächenkonzentration, Oberflächenspannung und Spreitungsdruck [107]

Die Anreicherung (oder Verarmung) einer (oft in Wasser) gelösten Substanz an einer Grenzfläche (meist Wasser / Luft) kann über die Gibbsche Adsorptionsgleichung (18) thermodynamisch beschrieben werden. Dabei ist R die allgemeine Gaskonstante und T die absolute Temperatur.

$$\Gamma = -\frac{1}{RT} \frac{d\sigma}{d \ln a} \quad (18)$$

Die Grenzflächenexzesskonzentration Γ , welche im Falle einer Anreicherung positive Werte und im Falle einer Verarmung an der Grenzfläche negative Werte annimmt, hängt also davon ab, wie sich eine Zugabe (Änderung der Aktivität a) der gelösten Substanz auf die

⁷ Eine geringe Anzahl parallel durchführbarer Experimente erschwert eine hinreichende Variation der Substratkonzentration.

Oberflächenspannung σ auswirkt. Im Allgemeinen handelt es sich bei der Oberflächenspannung um ein Maß für die Energie, welche benötigt wird, um die Oberfläche A der Phasengrenze um einen bestimmten Betrag zu vergrößern. Unter isothermen und isobaren Bedingungen ist sie durch Zusammenhang (19) dargestellt:

$$\sigma = \left(\frac{\partial G}{\partial A} \right)_{p,T} \quad (19)$$

Grundsätzlich sind alle Substanzen bestrebt, ihre Oberfläche zu verkleinern ($\sigma > 0$). Wie stark diese Tendenz ausgeprägt ist, hängt im Wesentlichen von der Art der Wechselwirkungen im Phaseninneren ab. Je günstiger diese sind, umso energetisch ungünstiger ist der Aufenthalt von Teilchen an der Phasengrenze, weil dort günstige Wechselwirkungen nicht mehr in alle Raumrichtungen stattfinden können. So besitzt reines Wasser aufgrund von Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken im Phaseninneren einen hohen Wert für die Oberflächenspannung (72.75 mN m^{-1} bei $\vartheta = 20 \text{ °C}$ [126]), während z. B. für Octan, bei dem im Phaseninneren hauptsächlich vergleichsweise schwache Dispersionswechselwirkungen vorherrschen, ein viel geringerer Wert (21.14 mN m^{-1} bei $\vartheta = 25 \text{ °C}$ [126]) festgestellt werden kann. Gelöste Substanzen, welche die günstigen Wechselwirkungen im Phaseninneren verstärken (z. B. Salze wie NaCl in Wasser durch Ion-Dipol-Wechselwirkungen), erhöhen die Oberflächenspannung und weisen negative Werte für Γ auf. Sind die Wechselwirkungen, die zwischen der gelösten Substanz und dem Lösungsmittel stattfinden können, ungünstiger als die Wechselwirkungen der Lösungsmittelmoleküle untereinander, reichert sich die gelöste Substanz an der Grenzfläche an (Γ ist positiv). Dies kann soweit führen, dass diese aus dem Phaseninneren ausgeschlossen wird. So ist bei langkettigen Fettsäuren eine Hydratisierung der Kohlenwasserstoffketten thermodynamisch derartig ungünstig (hydrophober Effekt, vgl. Kapitel 1, Seite 3), dass die Moleküle fast ausschließlich an der Grenzfläche Wasser/Luft vorzufinden sind. Dort orientieren sie sich mit ihrer hydrophilen Carbonsäurefunktionalität zum Wasser hin und bilden unter geeigneten Bedingungen einen monomolekularen Film. Die an der Grenzfläche befindlichen Moleküle üben dabei einen zweidimensionalen Druck aus, welcher der Tendenz zur Verkleinerung der Oberfläche entgegenwirkt. Dieser wird als Spreitungsdruck Π bezeichnet:

$$\Pi = \sigma_0 - \sigma \quad (20)$$

In Gleichung (20) ist σ_0 die Oberflächenspannung des reinen Lösungsmittels.

2.5.2 Langmuir-Trog [134]

Ein Langmuir-Trog (vgl. **Abbildung 21**) ist sowohl zur Charakterisierung von monomolekularen Filmen als auch zu präparativen Zwecken geeignet. Es handelt sich hierbei im Wesentlichen um ein oft aus Teflon bestehendes Becken, welches mit einer Subphase (fast immer Wasser) befüllt wird. Nach Auftragen einer filmbildenden Substanz (in **Abbildung 21** rechts von der Barriere) auf die Wasseroberfläche kann der Spreitungsdruck über die zur Verfügung stehende Flüssigkeitsoberfläche anhand der Barriere (in **Abbildung 21** grün) reguliert werden. Der Flüssigkeitspegel verändert sich beim Bewegen der Barriere nicht, weil die Subphasen auf beiden Seiten unter der Barriere hindurch im Austausch stehen.

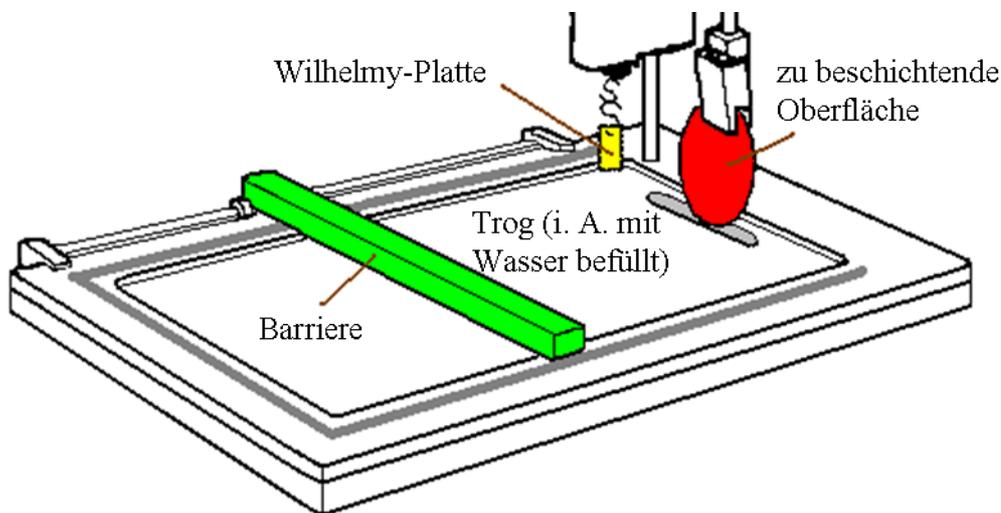


Abbildung 21. Schematische Darstellung einer möglichen Ausführung eines Langmuir-Troges.

Der Spreitungsdruck kann mit Hilfe eines Wilhelmy-Plättchens (in **Abbildung 21** gelb) gemessen werden, welches beispielsweise aus Filterpapier (hydrophil) bestehen kann. Dieses wird so über der Flüssigkeitsoberfläche befestigt, dass es am unteren Rand senkrecht in die Flüssigkeit eintaucht. Die Konsequenz ist Kapillaraszension. Für die Steighöhe h einer Flüssigkeit in einer Kapillare mit dem Radius R_K gilt mit φ als Kontaktwinkel zwischen Kapillarmaterial und Flüssigkeit (g = Erdbeschleunigung, ρ = Dichte der Flüssigkeit) [107]:

$$\rho g h = \frac{2\sigma \cos \varphi}{R_K} \Leftrightarrow h = \frac{2\sigma \cos \varphi}{R_K \rho g} \quad (21)$$

Die Flüssigkeit steigt also so lange an, bis der Kapillardruck durch den zunehmenden hydrostatischen Druck ausgeglichen wird. Aufgrund der feinen Porengröße im Filterpapier

und der geringen Höhe des Papiers wird dieses vollständig mit der Wasser-Subphase getränkt. So gesehen erstreckt sich nun jedoch die Oberfläche der Subphase auch auf das Filterpapier. Die der Subphase als Konsequenz ihrer Oberflächenspannung vorgegebene Tendenz, ihre Oberfläche zu verkleinern, äußert sich folglich in Form einer ins Innere der Subphase gerichteten Kraft F auf das Filterpapier. Mit U als Umfang der Platte gilt [134]:

$$\sigma = \frac{F}{U \cdot \cos \varphi} \quad (22)$$

Um Absolutwerte der Oberflächenspannung nach Formel (22) zu erhalten, sollten Korrekturen bezüglich des Eigengewichts der Wilhelmy-Platte und ihres Auftriebs in der Flüssigkeit durchgeführt werden. Bei der Messung von Oberflächenspannungsdifferenzen wie dem Spreitungsdruck heben sich die additiven Terme durch Auftrieb und Eigengewicht jedoch heraus.

Ein Langmuir-Trog wird häufig dazu benutzt, eine Abhängigkeit zwischen zur Verfügung stehender Oberfläche und Spreitungsdruck zu ermitteln. Ein Beispiel einer entsprechenden Isotherme ist für eine langkettige Fettsäure in **Abbildung 22** dargestellt.

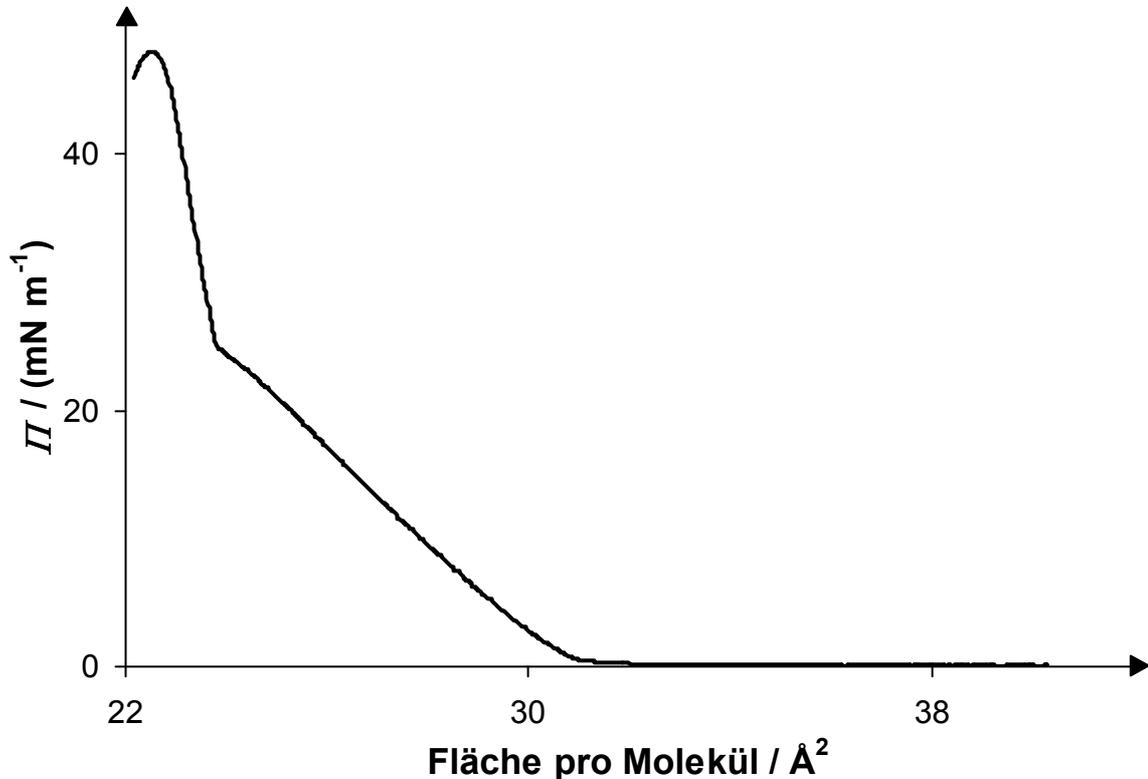


Abbildung 22. Unter Verwendung eines Langmuir-Trogs erhaltene Π/A -Isotherme für eine langkettige ungesättigte Fettsäure.

Auf diese Weise lässt sich ein Phasenverhalten der Fettsäuremoleküle an der Oberfläche ausmachen, das in einiger Hinsicht dem Verhalten der entsprechenden Phasen im dreidimensionalen Raum ähnlich ist. So hat beispielsweise im Grenzfall großer zur Verfügung stehender Flächen A ein „zweidimensionales Gasgesetz“ Gültigkeit [107]:

$$II \cdot A = n \cdot R \cdot T \quad (23)$$

Dabei ist n die Stoffmenge der an der Oberfläche vorhandenen Substanz. Hingegen reagiert das System bei geringen Oberflächen (**Abbildung 22** links, Seite 43) mit einem starken Anstieg des Spreitungsdrucks auf eine geringfügige Abnahme der zur Verfügung stehenden Oberfläche. Ein solches Verhalten entspricht dem einer kondensierten Phase. Denn auch um bei dreidimensionalen Feststoffen oder Flüssigkeiten das Volumen geringfügig zu verringern, müssen hohe Druckdifferenzen überwunden werden.

Für Präparationen empfiehlt es sich hingegen, den Spreitungsdruck konstant zu halten, um eine konstante Oberflächenkonzentration im zu übertragenden Film sicherzustellen. Ein möglicher Ablauf für die Übertragung von Fettsäuren (oder Salzen von Fettsäuren) auf Glas wäre beispielsweise, die zu beschichtende Oberfläche (in **Abbildung 21** auf Seite 42 rot dargestellt) zunächst in die Subphase abzusenken und schließlich nach Erzeugung des Oberflächenfilms auf der Subphase langsam wieder herauszuziehen [131-132]. Änderungen im Spreitungsdruck durch die Übertragung der amphiphilen Moleküle auf die eingetauchte Oberfläche können über das Wilhelmy-Plättchen festgestellt und durch simultane Bewegung der Barriere aufgewogen werden.

2.5.3 Präparation von PAA-Bürsten

Die mit einem Langmuir-Trog zur Verfügung stehenden präparativen Möglichkeiten können auch zur Erzeugung von Poly(acrylsäure)-Bürsten (vgl. Kapitel 1, Seite 4 ff.) auf planaren Oberflächen eingesetzt werden [135]. Hierzu wird ein unverzweigtes amphiphiles Blockcopolymer mit einem großen Poly(acrylsäure)-Block und einem kleinen Poly(styrol)-Block am Kettenende als amphiphiles filmbildendes Agens verwendet. Dieses wird auf eine mit Poly(styrol) vorbeschichtete Oberfläche analog zu den Fettsäuren übertragen. Hierbei kann zwischen unterschiedlichen Ausführungen gewählt werden, die Gegenstand des nachfolgenden experimentellen Kapitels sind.

3 Experimentelles

3.1 Chemikalien und Geräte

3.1.1 Chemikalien

Tabelle 4. Verwendete Chemikalien.

Bezeichnung	Reinheit	Firma
α -Lactalbumin aus Rindermilch, Typ III	$\geq 85\%$, calciumarm	Sigma-Aldrich
Amplex Red [®] / Wasserstoffperoxid / Peroxidase Assay Kit - 500 Assays	s. Hersteller	Invitrogen
Ammoniumhydroxidlösung in Wasser, 28.0% - 30.0%	ACS-Reagenz	Sigma-Aldrich
Ammoniumsulfat	$\geq 99\%$	Sigma-Aldrich
Chloroform	ACS-Reagenz ($\geq 99.8\%$)	Sigma-Aldrich
Deuteriumoxid	99.9% Deuterierungsgrad	Fluka
Deuteriumchlorid in D ₂ O, 35%	99% Deuterierungsgrad	Sigma-Aldrich
1,4-Dioxan	99.9%	Sigma-Aldrich
Glycerin	$\geq 99.5\%$	Sigma-Aldrich
Guanidiniumhydrochlorid	$\geq 99\%$	Sigma-Aldrich
Harnstoff	99.7%	Qbiogene
Hellmanex [®] II	entfällt	Hellma
Insulin aus Rinderbauchspeicheldrüse	29 USP-Units mg ⁻¹	Sigma-Aldrich
Lysozym aus Hühnereiweiß	$\geq 95\%$	Roche
MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure)	99.5%	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	$\geq 98\%$	Sigma-Aldrich
Natriumdihydrogenphosphat	99%	Sigma-Aldrich
Natriumhydrogenphosphat	99.0%	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	$\geq 99\%$	Merck
Natriumiodid	$\geq 99.0\%$	Sigma-Aldrich
Natriumthiocyanat	98%	Sigma-Aldrich
Poly(styrol), $M_n = 44000 \text{ g mol}^{-1}$ (M_n = Zahlenmittel der Molmasse)	nicht spezifiziert	Sigma-Aldrich
Poly(acrylsäure)-Poly(styrol)-diblock-Copolymer ($M_n = 3300 \text{ g mol}^{-1}$ Poly(styrol), $M_n = 20000 \text{ g mol}^{-1}$ Poly(acryl)säure)	Polydispersität 1.09	Polymer Source Inc.
Ribonuclease A aus Rinderbauchspeicheldrüse	$\geq 90\%$	Sigma-Aldrich
Rinderserumalbumin	$\geq 96\%$, fast fettsäurefrei	Sigma-Aldrich
Salzsäure, 37%	$\geq 99.9\%$	Sigma-Aldrich
Toluol	ACS-Reagenz ($\geq 99.5\%$)	Sigma-Aldrich
Viton [®]	entfällt	DuPont
Wasserstoffperoxidlösung in Wasser, 29.0% - 32.0%	ACS-Reagenz ($\geq 99.9\%$)	Sigma-Aldrich

3.1.2 Geräte

Tabelle 5. Verwendete Geräte.

Art des Geräts	Firma	Bezeichnung
Mikrovolumenspritze (50 µL)	SGE	004050
Küvette aus Quarzglas (3.5 mL)	Hellma	101 QS
Langmuir-Trog	Nima	611D
Feinwaage	Sartorius	Analytical Balance ME414S
pH-Meter	Eutech Instruments	Cyberscan 510 pH
Mikrotiterplattenlesegerät	Tecan	Infinite M200
Thermostat (Wasserkreislauf)	Julabo	Julabo F32 / Julabo HL
Multifrequenzphasenfluorometer	ISS	K2
Adsorptionstrockner	Zander	KEN 15
Spincoater	Chemat Technology	KW-4A
Membranvakuumpumpe	Vacuubrand	MZ2C/2.4
FTIR-Spektrometer	Thermo Electron	Nicolet 5700
FTIR-Spektrometer	Thermo Electron	Nicolet 6700
Thermostat (Wasserkreislauf)	Huber	Polystat CC2
Wasseraufreinigungssystem	Vivendi Water Systems	Purelab Classic
Thermostat (Wasserkreislauf)	Lauda	RCS 6
Peristaltikpumpe	Eppendorf	Schlauchpumpe 5260
pH-Elektrode	WTW	SenTix [®] Mic-B
Trockenschrank	Heraeus	T 6200

Hinzu kommen Selbst- und Nachbauten (z. B. Messzellen) sowie individuelle Anfertigungen (z. B. Quarzglasplatten). Auf die Auflistung einzelner Bestandteile von Spektrometern (z. B. Lampen) wird abgesehen von bedeutsamen Ausnahmen (s. im Folgenden) verzichtet. Alle in dieser Arbeit angegebenen pH-Werte (auch in D₂O-haltiger Lösung) beziehen sich auf den Ablesewert am pH-Meter (vgl. **Tabelle 5**).

3.1.3 Puffersysteme

Es wurden drei Puffersysteme verwendet. Puffer A war eine Lösung von 10 mM 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) in entionisiertem Wasser (beispielsweise 1.00 L entionisiertes Wasser und 2.092 g MOPS), deren pH-Wert mit NaOH-Lösung in entionisiertem Wasser auf pH = 7 eingestellt wurde. Puffer B war eine Lösung von 10 mM MOPS in D₂O (z. B. 50 mL D₂O und 104.6 mg MOPS). Der pH-Wert wurde durch mit D₂O verdünnte 40%ige NaOD-Lösung auf 7 eingestellt. Puffer C wurde auf die gleiche Weise hergestellt wie Puffer A, sein pH-Wert wurde allerdings auf 7.4 eingestellt. Puffer A wurde für jedes TIRF-Spektroskopie-Experiment, Puffer B für alle ATR-FTIR-spektroskopischen Untersuchungen bei pH = 7 und Puffer C für jedwede Enzymkinetikmessung verwendet.

3.2 Operationen zur Messvorbereitung

3.2.1 Reinigung von Quarzglasplatten für die TIRF-Spektroskopie

Zunächst wurden die für die TIRF-Spektroskopie zu verwendenden Platten aus Quarzglas ($15 \cdot 47 \cdot 1 \text{ mm}^3$ oder $39.5 \cdot 29.5 \cdot 1 \text{ mm}^3$ je nach verwendeter Apparatur) abhängig von den vorliegenden Verunreinigungen vorgereinigt. Beispielsweise wurden alte Poly(acrylsäure)-Bürsten oder Poly(styrol)-Schichten mit Toluol oder Salzablagerungen durch Spülen mit Wasser größtenteils entfernt. Die vorbehandelten Platten wurden daraufhin in einer Reinigungslösung 15 - 30 Minuten lang auf 60 - 80 °C erhitzt. Die Reinigungslösung setzte sich dabei aus einem Volumenteil Ammoniumhydroxidlösung in Wasser (28.0% - 30.0%), einem Volumenteil Wasserstoffperoxidlösung in Wasser (29.0% - 32.0%) sowie vier Volumenanteilen entionisiertem Wasser zusammen (vgl. auch [136]). Nach dem Abkühlen auf Umgebungstemperatur wurde zuerst exzessiv mit fließendem Leitungswasser und nachfolgend mit entionisiertem Wasser gespült. Schließlich wurde der Großteil des anhaftenden Wassers durch Schleudern entfernt und die Platten bis zur weiteren Verwendung im Trockenschrank bei 110 °C aufbewahrt.

3.2.2 Reinigung von internen Reflexionselementen aus Silizium für die ATR-FTIR-Spektroskopie

Die für die ATR-FTIR-Spektroskopie verwendeten internen Reflexionselemente (IRE) bestanden aus einem Siliziumeinkristall und waren Prismen ($h = 10 \text{ mm}$) mit trapezförmiger Grundfläche ($l_1 = 79 \text{ mm}$, $l_2 = 72 \text{ mm}$, $h_a = 4 \text{ mm}$). Deren Reinigung erfolgte analog zu der in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Prozedur. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass während der nasschemischen Reinigung die Probenseite und die ihr gegenüberliegende Seite der Reflexionselemente nicht mit der Gefäßwand des Reinigungsgefäßes in Kontakt standen, um ein Zerkratzen sowie eine Oxidation dieser Flächen zu vermeiden.

3.2.3 Reinigung von Siliziumwafern für Enzymkinetikkmessungen

Die Reinigung von zugeschnittenen Siliziumwafern für Enzymkinetikkmessungen ($80 \cdot 50 \cdot 0.7 \text{ mm}^3$) erfolgte ebenfalls analog zur Reinigung von Quarzglasplatten für die TIRF-Spektroskopie (Abschnitt 3.2.1), wobei auch hier die glatte Seite des Wafers nicht mit der Gefäßwand des Reinigungsbehälters in Kontakt stand.

3.2.4 Beschichtung von Quarzglasplatten für die TIRF-Spektroskopie mit Poly(styrol)

Die Beschichtung von Quarzglasplatten für die TIRF-Spektroskopie mit Poly(styrol) erfolgte mit Hilfe eines Spincoaters (KW-4A der Firma Chemat Technology). Eine saubere und trockene Platte wurde hierzu nach dem Abkühlen mittig auf dem Ansaugstutzen des Spincoaters platziert und durch Unterdruck fixiert. Es wurden 300 μL (bei Platten mit den Maßen $15 \cdot 47 \cdot 1 \text{ mm}^3$) bzw. 650 μL (bei Platten mit den Maßen $39.5 \cdot 29.5 \cdot 1 \text{ mm}^3$) Toluol auf die Oberfläche pipettiert. Es folgte eine zehn Sekunden andauernde Rotationsphase bei 3000 Umdrehungen pro Minute. Im Anschluss hieran wurden 300 μL bzw. 650 μL einer Lösung mit einer Massenkonzentration von 6 mg mL^{-1} von Poly(styrol) ($M_n \approx 50 \text{ kg mol}^{-1}$) in Toluol auf die Oberfläche gegeben und nach einer Einwirkzeit von mehreren Sekunden für 60 Sekunden erneut bei 3000 Umdrehungen pro Minute im Spincoater belassen. Die so beschichteten Platten wurden für mindestens 48 h bei $110 \text{ }^\circ\text{C}$ im Trockenschrank gelagert, bevor sie weiter verwendet wurden. Durch eine solche Behandlung wird eine Poly(styrol)-Schicht mit einer Dicke von 250 - 300 \AA erhalten [137].

3.2.5 Beschichtung von internen Reflexionselementen aus Silizium für die ATR-FTIR-Spektroskopie mit Poly(styrol)

Die Beschichtung von internen Reflexionselementen aus Silizium für die ATR-FTIR-Spektroskopie mit Poly(styrol) wurde analog zu der für die Quarzglasplatten für die TIRF-Spektroskopie angewandten Arbeitsvorschrift (Abschnitt 3.2.4) durchgeführt. Allerdings wurde hierfür ein spezieller zylinderförmiger Aufsatz für den Spincoater eingesetzt, auf dem eine quaderförmige Vertiefung ($8 \cdot 1 \cdot 0.2 \text{ cm}^3$) zum Fixieren des Reflexionselements ausgespart ist. Die Beschichtung erfolgte auf der größten Fläche des Elements. Von Toluol bzw. der Poly(styrol)-Lösung in Toluol wurde an den entsprechenden Stellen des Verfahrens ein Volumen von 400 μL verwendet.

3.2.6 Beschichtung von Siliziumwafern für Enzymkinetikmessungen mit Poly(styrol)

Siliziumwafer für die Enzymkinetikmessungen wurden ebenfalls ähnlich wie Quarzglasplatten für die TIRF-Spektroskopie mit Poly(styrol) beschichtet (Kapitel 3.2.4). Hierzu wurde der gleiche Spincoateraufsatz wie bei den internen Reflexionselementen verwendet (Abschnitt 3.2.5). Dabei schließt der vergleichsweise großflächige Wafer die Vertiefung im Aufsatz für eine Fixierung durch Unterdruck hinreichend luftdicht ab. Die eingesetzten Volumina an Toluol bzw. Poly(styrol)-Lösung betragen jeweils 2000 μL .

3.2.7 Vorbereitung des Langmuir-Troges für die Präparation von planaren PAA-Bürsten ausgehend von Poly(styrol)-beschichteten Oberflächen

Zur Vorbereitung der Präparation von PAA-Bürsten wurde der bereits mit Chloroform gereinigte Langmuir-Trog 611D der Firma Nima mit so viel Wasser befüllt, dass der Flüssigkeitspegel die Abgrenzungen des Troges um 1 - 2 mm überragte. Der pH-Wert der Subphase wurde dabei mit verdünnter Salzsäure auf ungefähr vier eingestellt, um später hinzukommende Poly(acrylsäure)-Ketten zu neutralisieren und so deren gegenseitige elektrostatische Abstoßung im Oberflächenfilm zu vermeiden. Anschließend wurde mit Hilfe einer Barriere die Oberfläche der Flüssigkeit auf ca. 120 cm² eingestellt und es wurden ungefähr 50 µL einer Lösung des Diblockcopolymers (bestehend aus $M_n = 3300 \text{ g mol}^{-1}$ Poly(styrol) und $M_n = 20000 \text{ g mol}^{-1}$ Poly(acryl)säure) mit einer Konzentration von 1 mg mL⁻¹ in 1,4-Dioxan / Toluol (2:3) mit Hilfe einer Mikroliterspritze von SGE auf die Oberfläche tropfenweise aufgetragen. Nachfolgendes gründliches Absaugen des entstandenen Oberflächenfilms unter Verwendung einer Teflundüse stellte sicher, dass ggf. vorhandene andere grenzflächenaktive Stoffe zusammen mit diesem Film entfernt wurden. Insofern konnte auf diese Weise eine Verunreinigung durch solche Stoffe weitestgehend ausgeschlossen werden.

3.2.8 Präparation einer planaren PAA-Bürste auf mit Poly(styrol) vorbeschichteten Quarzglasplatten für die TIRF-Spektroskopie mit Hilfe der Langmuir-Blodgett-Technik

Zur Präparation von planaren PAA-Bürsten auf Poly(styrol)-beschichteten Quarzglasplatten für die TIRF-Spektroskopie mittels Langmuir-Blodgett-Technik wurde zunächst der Langmuir-Trog nach Arbeitsvorschrift 3.2.7 vorbereitet. Außerdem wurden die mit Poly(styrol) beschichteten Quarzglasplatten (vgl. Kapitel 3.2.4, Seite 48) auf Umgebungstemperatur abgekühlt und mit ihren unbeschichteten Seiten zusammen geklemmt. Daraufhin wurden die Platten so weit vertikal in die Flüssigkeit eingetaucht, dass die Klemme die Flüssigkeit gerade nicht berührte. Nun wurde soviel Copolymerlösung (vgl. Abschnitt 3.2.7) mittels Mikroliterspritze auf die Flüssigkeitsoberfläche dosiert, dass sich ein Spreitungsdruck von $(15 \pm 1) \text{ mN m}^{-1}$ einstellte. Abweichungen wurden durch Anpassen der Flüssigkeitsoberfläche korrigiert. Bei einer Oberfläche von ca. 120 cm² wurden ungefähr 40 µL der Copolymerlösung (1 mg mL⁻¹) zur Erzeugung des angegebenen Spreitungsdrucks benötigt, was einer Oberflächenbelegung von ca. 0.1 nm⁻² entspricht.

Schließlich wurden die Plättchen mit einer Geschwindigkeit von ca. 5 mm min^{-1} aus der Flüssigkeit herausgezogen. Ein deutliches Absinken des Spreitungsdrucks durch die Adsorption von Copolymer an der Poly(styrol)-Oberfläche wurde währenddessen durch simultanes Verkleinern der Flüssigkeitsoberfläche verhindert. Zur Verankerung der Poly(styrol)-Enden des Copolymers in der Poly(styrol)-Schicht wurden die Platten für ca. zwölf Minuten bei $110 \text{ }^\circ\text{C}$ im Trockenschrank erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur konnten die so erhaltenen PAA-Bürsten vor ihrer Verwendung bis zu einem halben Monat bei Umgebungstemperatur staubfrei gelagert werden.

3.2.9 Präparation einer planaren PAA-Bürste auf mit Poly(styrol) vorbeschichteten internen Reflexionselementen aus Silizium für die ATR-FTIR-Spektroskopie mit Hilfe der Langmuir-Schäfer-Technik

Auch für die Präparation von planaren PAA-Bürsten auf Poly(styrol)-beschichteten internen Reflexionselementen aus Silizium für die ATR-FTIR-Spektroskopie unter Verwendung der Langmuir-Schäfer-Technik wurde der Langmuir-Trog nach Vorschrift 3.2.7 (Seite 49) vorbereitet. Anschließend wurde jedoch sofort ein Spreitungsdruck von $(15 \pm 1) \text{ mN m}^{-1}$ durch Auftropfen der Copolymerlösung eingestellt, was einer Oberflächenbelegung von ca. 0.1 nm^{-2} entspricht (vgl. Kapitel 3.2.8, Seite 49). Der nach Vorschrift 3.2.5 (Seite 48) mit Poly(styrol) beschichtete Kristall wurde nach Abkühlen auf Umgebungstemperatur in einer Halterung mit zwei Teflonbacken über der Flüssigkeitsoberfläche befestigt. Die beschichtete Seite des Reflexionselements wies hierbei in Richtung der Flüssigkeitsoberfläche, hatte dabei jedoch eine geringe Neigung in Bezug auf die Oberfläche, um einen langsamen Rückzug der Flüssigkeitsfront während der Präparation zu ermöglichen. Das nachfolgende Absenken des Kristalls führte zu einer vollständigen Benetzung der beschichteten Seite mit Flüssigkeit. Nun wurde das Reflexionselement mit der geringst möglichen Geschwindigkeit (ca. 1 mm min^{-1}) bis zum vollständigen Rückzug des Flüssigkeitsmeniskus angehoben. Dabei verblieb das Copolymer an der Poly(styrol)-Oberfläche, so dass während dieses Vorgangs ebenfalls der Spreitungsdruck durch Verkleinerung der Flüssigkeitsoberfläche konstant gehalten werden musste. Auch die auf diese Weise mit einer PAA-Bürste beschichteten Kristalle wurden für ca. zwölf Minuten bei $110 \text{ }^\circ\text{C}$ zur Fixierung in den Trockenschrank gegeben und anschließend für maximal einen halben Monat bei Umgebungstemperatur gelagert. Die beiden in den Kapiteln 3.2.8 und 3.2.9 beschriebenen unterschiedlichen Präparationsansätze auf Basis von [135] sind in **Abbildung 23** (Seite 51) grafisch veranschaulicht.

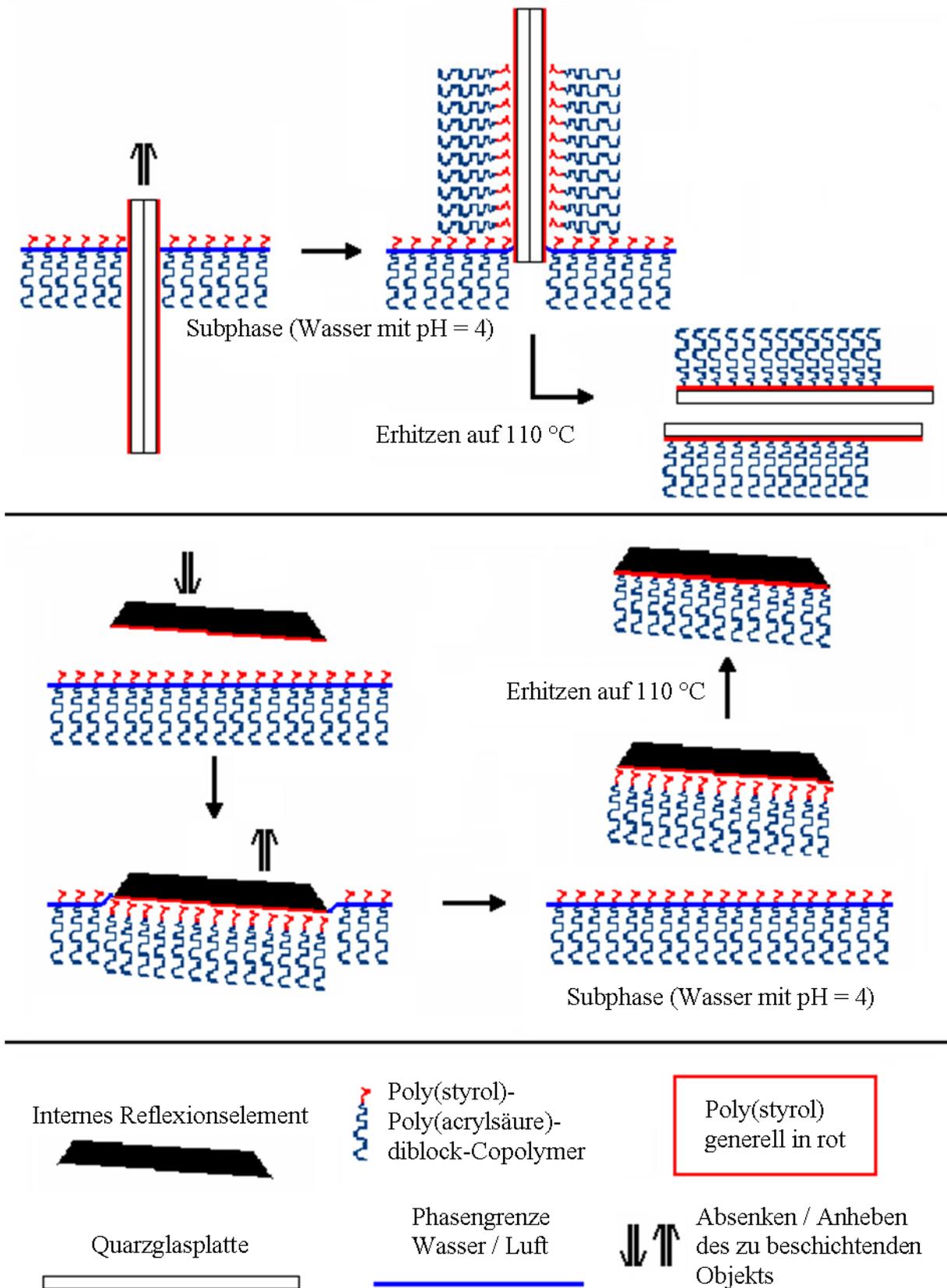


Abbildung 23. Schematische Darstellung der Präparation von Poly(acrylsäure)-Bürsten auf planaren Oberflächen nach der Langmuir-Blodgett-Technik (oben) und der Langmuir-Schäfer-Technik (mittig) (Legende unten).

3.2.10 Präparation einer planaren PAA-Bürste auf mit Poly(styrol) vorbeschichteten Siliziumwafern für Enzymkinetikkmessungen mit Hilfe der Langmuir-Blodgett-Technik

Die Präparation von planaren PAA-Bürsten ausgehend von Poly(styrol)-beschichteten Siliziumwafern für Enzymkinetikkmessungen erfolgte analog zur Präparation auf mit Poly(styrol) beschichteten Quarzglasplatten (Vorschrift 3.2.8, Seite 49 f.). Aufgrund der größeren Oberfläche der Wafer im Vergleich zu den Quarzglasplatten war allerdings ein größeres Volumen an Copolymerlösung erforderlich, um auch eine größere Flüssigkeitsoberfläche bei gleicher Oberflächenbelegung ($(15 \pm 1) \text{ mN m}^{-1}$, 0.1 nm^{-2}) zu erhalten. Beispielsweise wurden ca. 60 μL Copolymerlösung auf die Oberfläche gegeben, um bei einer Fläche von ca. 180 cm^2 den angegebenen Spreitungsdruck zu erhalten. Außerdem betrug aufgrund ansonsten häufig während der Präparation auftretender Risse im Oberflächenfilm die Geschwindigkeit beim Herausziehen aus der Flüssigkeit nur 2 mm min^{-1} anstatt 5 mm min^{-1} . Folge dieser Unterschiede war eine deutlich längere Präparationszeit für die Präparation der PAA-Bürsten auf Siliziumwafern (ca. 40 Minuten für das Herausziehen der Wafer aus der Subphase).

3.2.11 Einbau von (modifizierten) Quarzglasplatten in eine TIRF-Versuchsanordnung

Vor dem Einbau der (modifizierten) Quarzglasplatten in eine TIRF-Versuchsanordnung wurden alle Schläuche, Verbindungsstücke, Dichtungen sowie das jeweilige Quarzglasprisma mit trapezförmiger Grundfläche mit Spülmittellösung in Wasser, Leitungswasser, Ethanol und entionisiertem Wasser oder mit 3% Hellmanex[®] II-Lösung in entionisiertem Wasser, Leitungswasser und entionisiertem Wasser gereinigt und anschließend getrocknet.

Für die Durchführung von TIRF-Experimenten standen für diese Arbeit zwei unterschiedliche Apparaturen zur Verfügung. Bei der ersten Apparatur handelt es sich um einen Selbstbau [20]. Die Halterung für die TIRF-Optik bestand dabei aus einem Metallquader mit den Maßen $35 \cdot 47 \cdot 30 \text{ mm}^3$. Aus diesem Quader war ein ebenfalls quaderförmiges Stück mit den Maßen $15 \cdot 47 \cdot 20 \text{ mm}^3$ von einer der größten Quaderflächen her ausgespart (vgl. **Abbildung 24** links oben, Seite 53). In diese Vertiefung wurde zunächst ein schwarzes Stück Filz eingelegt, um Lichtstreuung zu reduzieren. Als nächstes folgten eine saubere Quarzglasplatte ($15 \cdot 47 \cdot 1 \text{ mm}^3$) und eine Gummidichtung. Hierauf wurde die (ggf. modifizierte) Quarzglasplatte (ebenfalls $15 \cdot 47 \cdot 1 \text{ mm}^3$) aufgebracht, so dass die zu untersuchende Seite in Richtung der anderen Quarzglasplatte wies (vgl. **Abbildung 17**, Seite 35)). Die

unmodifizierte Seite wurde daraufhin mit Ethanol und einem fusselfreien Zellstofftuch gesäubert und über einen kleinen Tropfen Glycerin optisch an ein Quarzglasprisma ($h = 15 \text{ mm}$) mit trapezförmiger Grundfläche gekoppelt ($l_1 = 47 \text{ mm}$, $l_2 = 36 \text{ mm}$, $h_a = 15 \text{ mm}$, vgl. **Abbildung 24** rechts oben).

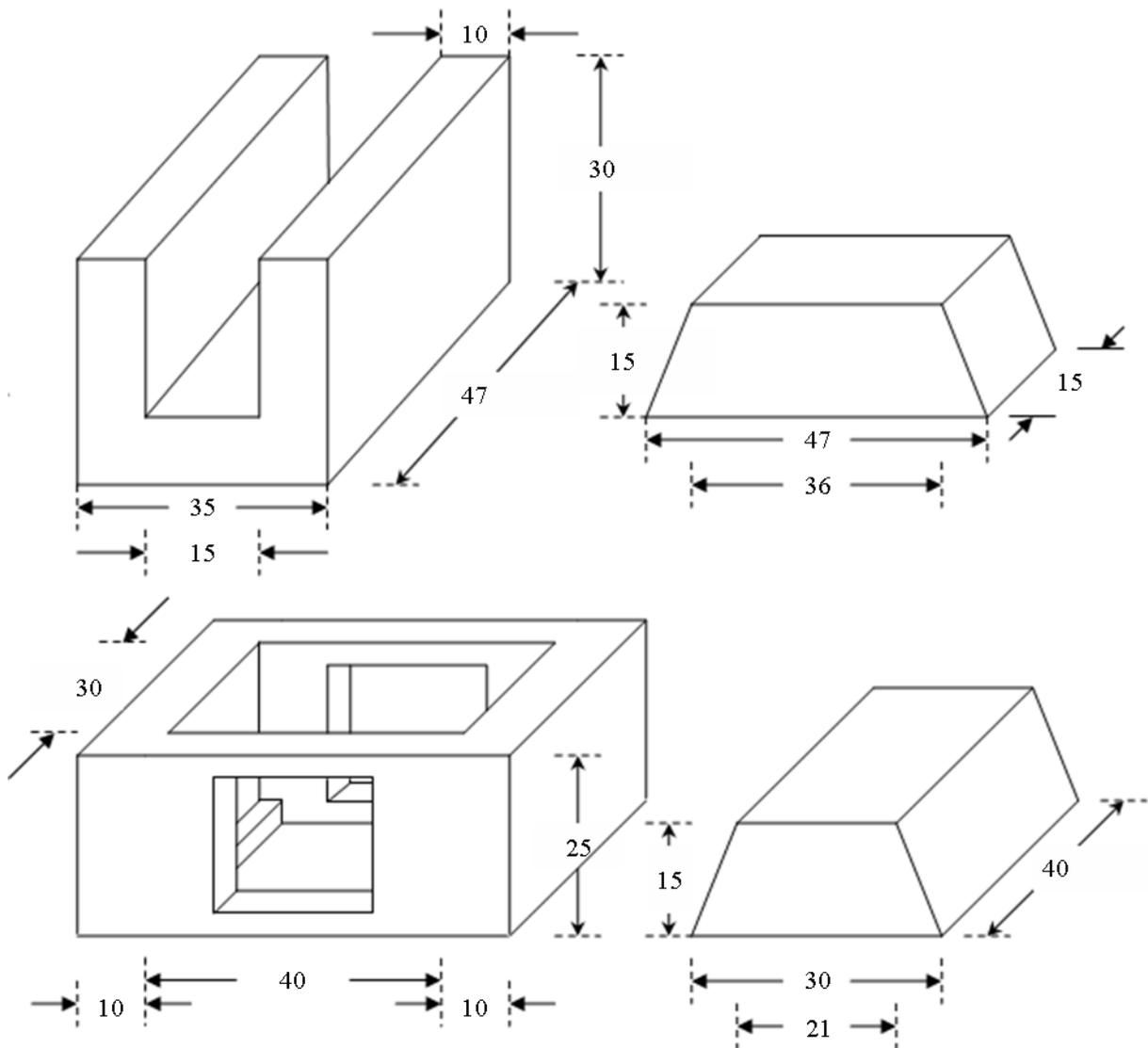


Abbildung 24. Grob maßstabsgetreue Darstellung der Halterungen (links) und Quarzglasprismen (rechts) für die erste TIRF-Apparatur (oben, [20]) und die zweite TIRF-Apparatur (unten, ISS), Längenangaben in Millimeter.

Die Probenzelle wurde zugeschraubt und auf einem selbstgebauten Sockel in das Multifrequenz-Phasenfluorometer K2 der Firma ISS eingebaut. Die Temperierung erfolgte über Wasserdurchfluss im Metallrahmen unter Verwendung eines entsprechenden Thermostaten (Polystat CC2 von Huber oder RCS 6 von Lauda). Ein Flüssigkeitsreservoir mit Referenz- oder Probenlösung, welches sich außerhalb des Spektrometers befand, wurde über zwei Schläuche mit Kanülen an einem Ende mit der Probenzelle verbunden, wobei der

Flüssigkeitstransport durch eine Peristaltikpumpe (Schlauchpumpe 5260 von Eppendorf) sichergestellt wurde.

Bei der zweiten Apparatur handelte es sich um ein Fabrikat der Firma ISS. Zuerst wurde das Quarzglasprisma ($h = 40$ mm) mit trapezförmiger Grundfläche ($l_1 = 30$ mm, $l_2 = 21$ mm, $h_a = 15$ mm, vgl. **Abbildung 24** rechts unten, Seite 53) mit der größten Fläche nach oben in die in **Abbildung 24** links unten (Seite 53) schematisch gezeigte Halterung eingelegt. Anschließend wurde die ggf. modifizierte Quarzglasplatte ($39.5 \cdot 29.5 \cdot 1$ mm³) mit ihrer unbeschichteten Seite durch einen kleinen Tropfen Glycerin optisch an das Prisma gekoppelt. Nachfolgend wurde eine Dichtung eingefügt. Gegenüber der zu untersuchenden Oberfläche diente ein Metallblock zur Begrenzung der Probenkammer, über den auch die Temperierung mittels Wasserdurchfluss erfolgte. Hierzu wurden die gleichen Thermostaten verwendet wie bei der ersten Apparatur (gleiches Kapitel, Seite 53) beschrieben. Schließlich wurde die Messzelle zugeschraubt und auf dem Sockel der Firma ISS ebenfalls in das Multifrequenz-Phasenfluorometer K2 von ISS eingebaut. Die Zugabe bzw. der Austausch von Proben- bzw. Referenzlösungen erfolgte durch Spritzen. Die Steuerung des Spektrometers erfolgte über die von ISS mitgelieferte Software Vinci.

3.2.12 Einbau von (modifizierten) internen Reflexionselementen aus Silizium in das ATR-FTIR-Spektrometer

Das (ggf. auf seiner größten Seitenfläche modifizierte) interne Reflexionselement aus Silizium wurde für ATR-Messungen in einer Messzelle in das FTIR-Spektrometer Nicolet 6700 der Thermo Electron Corporation eingebaut. Die Messzelle wurde nach einer entsprechenden Vorlage der Firma Piketech aus Edelstahl neu gebaut, weil die Originalmesszelle selbst unter milden Bedingungen zur Korrosion neigte. Die Ansicht der Messzelle von unten, d. h. von der Seite des Spektrometers her, ist schematisch in **Abbildung 25** (Seite 55) oben zu sehen. Ein Schnitt entlang der gestrichelten Linie liefert die in der Mitte von **Abbildung 25** (Seite 55) gezeigte Seitenansicht, wobei die Zelle auch hier so herum angeordnet ist, wie es für den Einbau des Reflexionselements nötig ist. Während der Messung sind in Bezug auf den mittleren Teil von **Abbildung 25** (Seite 55) oben und unten vertauscht. Vor jeder Verwendung wurden die Messzelle und deren Deckel zunächst mit einer Bürste in Gegenwart von Spülmittellösung an den Stellen, die mit Probenlösung in Kontakt stehen, mechanisch gereinigt. Nachfolgend wurde exzessiv mit Leitungswasser und hiernach mit entionisiertem Wasser gespült. Abschließend wurde mit Druckluft getrocknet. Bei der

Säuberung des Deckels wurde zusätzlich ein Pfeifenreiniger verwendet. In die saubere Messzelle wurde nun zunächst ein Dichtungsring aus Viton[®] eingelegt und darauf das (ggf. modifizierte) interne Reflexionselement gebettet. So wie in **Abbildung 25** unten orientiert konnte es direkt in die wie in **Abbildung 25** (Mitte) orientierte Messzelle eingelegt werden. Dabei wurde der Kristall so ausgerichtet, dass dessen Enden gleich weit von dem jeweiligen Spiegel entfernt waren. Durch Festschrauben einer auf der Seite des Kristalls verspiegelten Platte wurde das Reflexionselement fixiert.

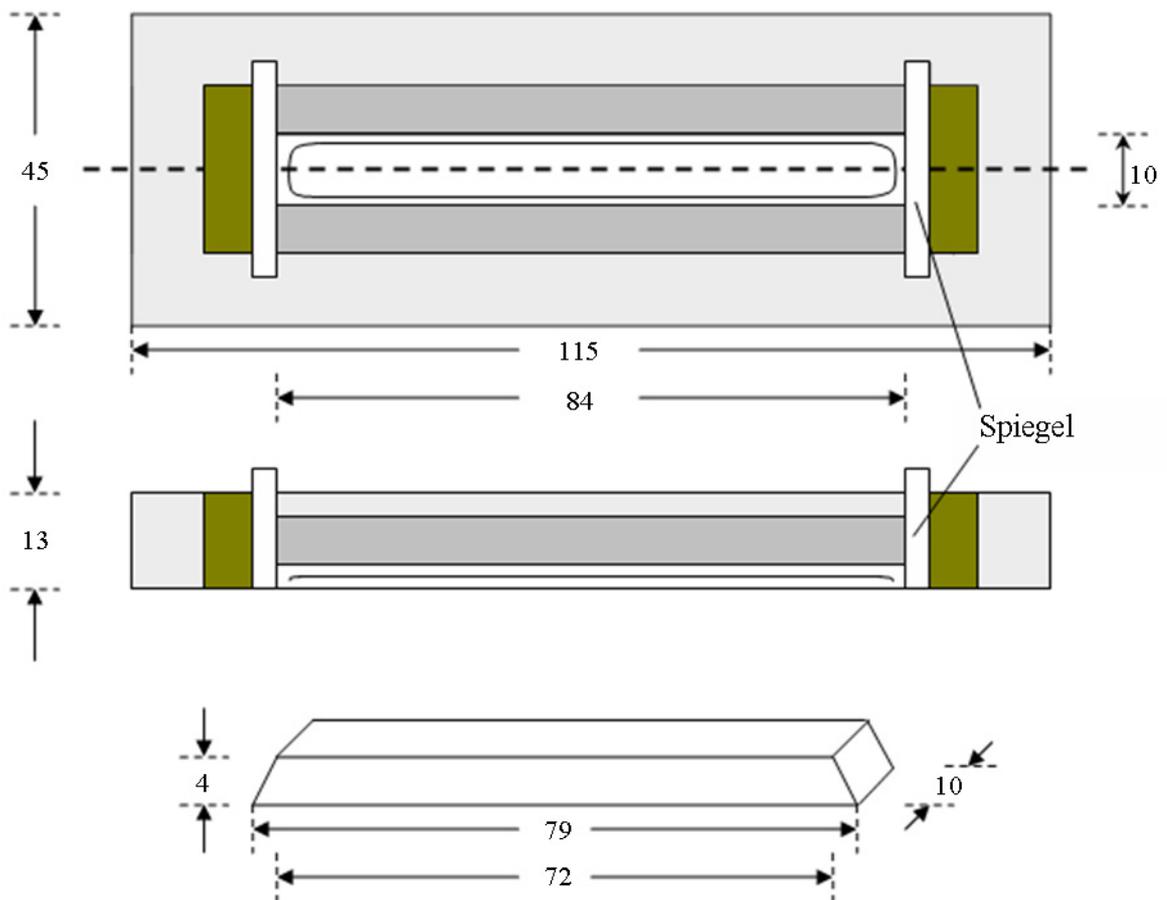


Abbildung 25. Grob maßstabsgetreue Darstellung der ATR-Zelle (oben: Ansicht von unten von der späteren Position des Spektrometers her; mittig: Seitenansicht des Längsschnitts anhand der gestrichelten Linie) und des internen Reflexionselements aus Silizium (unten).

Der ebenfalls mit einem Dichtungsring aus Viton[®] ausgestattete Zellendeckel wurde auf die Unterseite (ausgehend von **Abbildung 25**, Mitte) der Messzelle geschraubt und diese auf der ATR-Messbank des FTIR-Spektrometers platziert (prinzipieller Aufbau vgl. **Abbildung 14**, Seite 29). Das Gerät war mit einem sehr empfindlichen, durch Flüssigstickstoff gekühlten MCT-A-Detektor (Mercury Cadmium Tellur) ausgestattet. Im Raum, in dem die IR-Strahlführung erfolgte, sorgte ein Adsorptionstrockner der Firma Zander dafür, dass das

Messsignal nur in geringem Maße von Wasserdampfrauschen beeinträchtigt wurde. Die Temperierung erfolgte über Wasserdurchfluss im Deckel der Messzelle (Thermostat Julabo F32 mit der Steuerungskonsole Julabo HL mit externem Temperaturfühler (Thermoelement)) und der Flüssigkeitstransport diskontinuierlich unter Verwendung von Einwegspritzen. Die Steuerung des Spektrometers erfolgte über die von Nicolet mitgelieferte Software Omnic.

3.2.13 Einbau von (modifizierten) Siliziumwafern in eine selbstgebaute Mikrotiterplatte für Enzymkinetikkmessungen

Um Enzymkinetikkmessungen an PAA-Bürsten oder einer Siliziumoberfläche durchführen zu können, mussten die (ggf. modifizierten) Siliziumwafer zunächst in eine selbstgebaute Mikrotiterplatte (vgl. **Abbildung 26**) eingebaut werden.

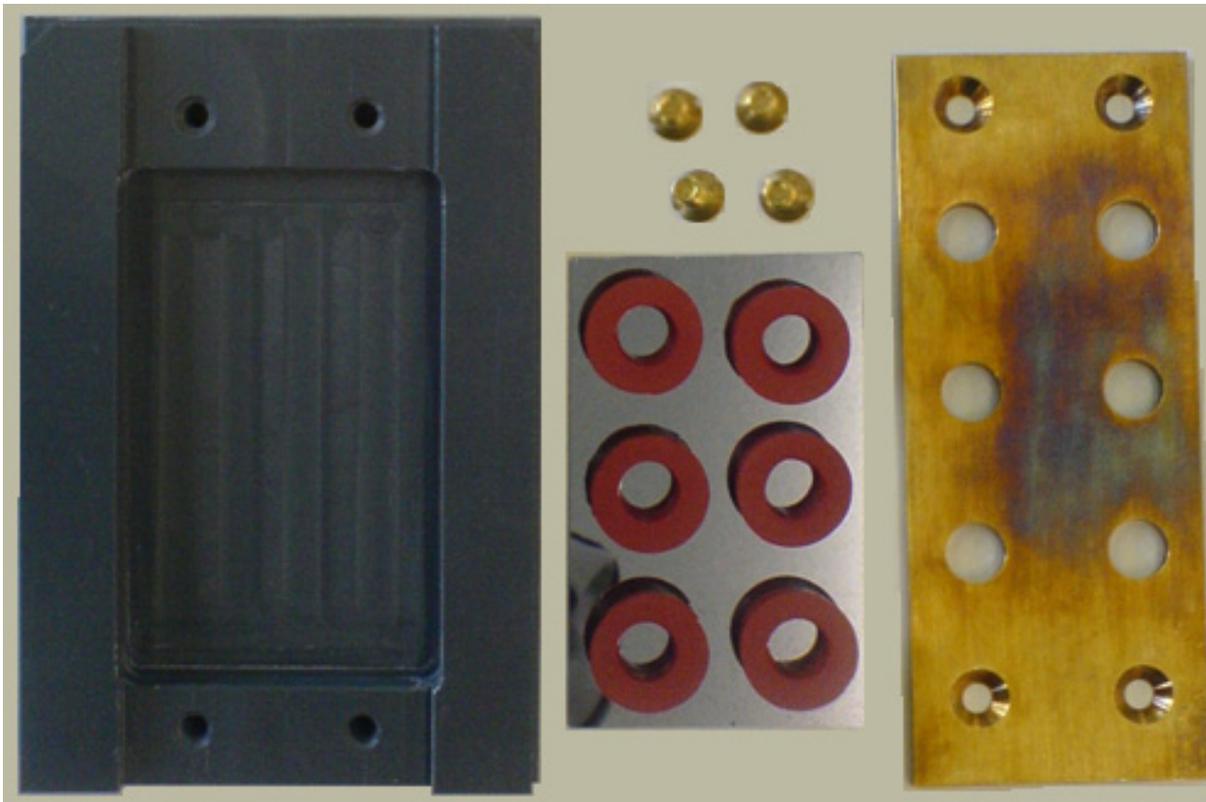


Abbildung 26. Bestandteile der selbstgebauten Mikrotiterplatte für Enzymkinetikkmessungen: Rahmen (links), Wafer mit Dichtungsringen aus Silikongummi (mittig) und Messingplatte (rechts).

Die Außenmaße dieser Platte entsprachen nach dem Zusammenbau genau denen einer Mikrotiterplatte der Firma Corning mit 96 Vertiefungen. Die selbstgebaute Platte hatte allerdings nur sechs Vertiefungen, welche sich bei einer Corning-Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen an den Positionen C3, C6, C9, F3, F6 und F9 befänden. Der Vorteil dieser Konstruktion war, dass der Boden der Vertiefungen ausgetauscht werden konnte.

Vor dem Zusammenbauen der Messzelle wurden die verwendeten Dichtungsringe aus Silikongummi, der Rahmen aus Poly(vinylchlorid) und die Messingplatte (vgl. **Abbildung 26**, Seite 56) zunächst mit Spülmittellösung und dann mit Leitungswasser und entionisiertem Wasser gereinigt und anschließend getrocknet. Hiernach wurde der Wafer zusammen mit den Silikongummidichtungen in den Rahmen eingelegt und die Messingplatte festgeschraubt. Als Deckel für die Mikrotiterplatte diente der Kunststoffdeckel der entsprechenden Corning-Mikrotiterplatte. Zum Auslesen der Fluoreszenzintensität wurde das Mikrotiterplattenlesegerät Infinite M200 der Firma Tecan verwendet. Dessen Steuerung erfolgte über Tecans mitgelieferte Software i-control.

3.3 Ablauf der TIRF-Spektroskopie-Experimente

Die Untersuchung der Adsorption von Proteinen (Hühnerlysozym, Rinderserumalbumin) an verschiedenen Grenzflächen (Siliziumoberfläche, Poly(styrol)-Oberfläche und PAA-Bürste) in Gegenwart verschiedener Cosolventien (z.B. Harnstoff) mittels TIRF-Spektroskopie erfolgte über die Tryptophanreste der Proteine. In all diesen Experimenten wurde deshalb bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm angeregt und die Emissionsspektren in einem Bereich von $\lambda = 305$ nm bis $\lambda = 450$ nm aufgenommen. Das Anregungslicht wurde entweder mittels Monochromator aus dem weißen Licht einer Xenonbogenlampe von ISS erhalten oder mit einer UV-Laserdiode (ebenfalls von ISS) erzeugt. Die Unterscheidung verschiedener Wellenlängen im Emissionslicht stellte ein Monochromator vor dem Detektor sicher. Der Abstand der Datenpunkte bei der Aufnahme der Emissionsspektren betrug $\Delta\lambda = 1$ nm, wobei pro Datenpunkt zehn Messergebnisse für die Fluoreszenzintensität gemittelt wurden. Die Aufnahme eines Spektrums nahm auf diese Weise ungefähr vier Minuten Zeit in Anspruch.

3.3.1 Untersuchung der Adsorption von Lysozym und BSA an einer PAA-Bürste in An- und Abwesenheit von Harnstoff mittels TIRF-Spektroskopie bei neutralem / physiologischem pH-Wert

Für die Untersuchung des Einflusses von Harnstoff auf an einer PAA-Bürste adsorbiertes Lysozym oder BSA in neutralem / physiologischem Medium unter Verwendung der TIRF-Spektroskopie wurde zunächst eine nach Arbeitsvorschrift 3.2.1 (Seite 47) gereinigte Quarzglasplatte mit den Maßen $15 \cdot 47 \cdot 1$ mm³ nach Kapitel 3.2.4 (Seite 48) mit Poly(styrol) beschichtet und unter Anwendung von Abschnitt 3.2.8 (Seite 49 f.) als PAA-Bürste

funktionalisiert. Die so erhaltene PAA-Bürste wurde unter Verwendung der ersten TIRF-Apparatur (vgl. Kapitel 3.2.11, Seite 52 ff.) in das Fluoreszenzspektrometer K2 von ISS eingebaut. Im Rahmen der Experimente mit Harnstoff erfolgte die Generierung des Anregungslichts mit Hilfe einer Xenonbogenlampe unter Einsatz eines Monochromators. Der Austausch von Flüssigkeit erfolgte über eine Peristaltikpumpe (Schlauchpumpe 5260 von Eppendorf) bei einer Geschwindigkeit von 5 mL min^{-1} . Grundsätzlich wurde ein Reservoir mit einem Volumen von 15 mL vor der Probenkammer verwendet. Musste die Flüssigkeit in der Probenkammer ausgetauscht werden, so wurden zunächst ca. zwei Minuten lang ca. zehn Milliliter der neuen Lösung von einem solchem 15 mL-Reservoir aus durch die Anordnung gepumpt. Am anderen Ende wurde die Flüssigkeit aufgefangen und verworfen. Die im Reservoir verbliebene Lösung wurde dann noch weitere drei Minuten im Kreis gepumpt. Beispielsweise bei Lösungen mit zu unterschiedlicher Dichte musste nach Ablauf der zwei Minuten ein frisches Reservoir eingesetzt werden und erneut Flüssigkeit verworfen werden. In diesem Fall wurde die restliche Flüssigkeit nur noch ca. eine Minute im Kreis gepumpt, so dass für die Austauschvorgänge in jedem Fall ca. fünf Minuten benötigt wurden. Das erste Einbringen von Flüssigkeit in die trockene Messzelle erfolgte mit erniedrigter Geschwindigkeit (2 mL min^{-1}), um der Bildung von Luftblasen effizienter entgegenwirken zu können. Nach jedem Pumpvorgang wurde aus Temperierungsgründen mindestens ca. fünf Minuten gewartet, bevor mit der Aufnahme eines Spektrums begonnen wurde. Wenn nicht anders beschrieben, lagen zwischen zwei Aufnahmen mit verschiedenen Zusammensetzungen in der Lösung über der PAA-Bürste also ungefähr 15 Minuten (Pumpen, Warten, Spektrum aufnehmen).

Tabelle 6. Messparameter in Abhängigkeit von dem untersuchten Protein.

Protein	$c(\text{Proteinlösung})$ in Puffer A	$c(\text{Harnstofflösung})$ in Puffer A	Temperatur
Lysozym	0.2 mg mL^{-1}	9.5 M , $\text{pH} \approx 7.5^8$	$30 \text{ }^\circ\text{C}$
BSA	2 mg mL^{-1}	8.0 M , $\text{pH} \approx 7.5^8$	$20 \text{ }^\circ\text{C}$

Zu Beginn einer Messreihe wurde also zunächst die jeweilige Harnstofflösung (vgl. **Tabelle 6**) in Puffer A in die Messzelle eingebracht. Nach Abschluss des Pumpvorgangs wurde ein Spektrum aufgenommen, welches bei der späteren Auswertung von allen Spektren, bei deren Aufnahme Harnstoff in Lösung vorhanden war, abgezogen wurde. Nachfolgend wurde die Harnstofflösung durch Puffer A ($\text{pH} = 7$, vgl. Abschnitt 3.1.3, Seite 46) verdrängt

⁸ Große Mengen des leicht basischen Harnstoffs führten zu einem moderaten Anstieg des pH-Werts, was im Nachhinein quantifiziert wurde. In **Tabelle 6** findet sich der entsprechend korrigierte Wert.

und ein weiteres Spektrum erhalten. Dieses wurde von allen weiteren Spektren abgezogen, welche in Abwesenheit von Harnstoff in der Messzelle erhalten wurden. Als nächstes wurde die Proteinlösung (vgl. **Tabelle 6**, Seite 58) in Puffer A durch die Anordnung gepumpt und wiederum ein Spektrum erhalten. Nachfolgend wurde die Proteinlösung wiederum gegen Puffer A ausgetauscht, so dass zu dem entsprechenden Spektrum nur noch an der PAA-Bürste adsorbierte Proteinmoleküle beitragen konnten. Ein anschließend in Gegenwart der Harnstofflösung (vgl. **Tabelle 6**, Seite 58) aufgenommenes Spektrum sollte nun den Einfluss einer hohen Harnstoffkonzentration auf das vorhandene Proteinadsorbat zeigen. Hiernach wurden z. T. mehrere Spektren in Abhängigkeit von der Zeit aufgenommen, wobei zwischen deren Aufnahme nicht erneut gepumpt wurde. Erkenntnisse über die Reversibilität des Einflusses des Harnstoffes sollte nun die Aufnahme eines Spektrums liefern, welches nach erneutem Austausch der Harnstofflösung (vgl. **Tabelle 6**, Seite 58) gegen Puffer A erhalten wurde. Abschließend wurde ein Spektrum in Gegenwart von 0.5 M NaCl-Lösung in Puffer A aufgenommen, um den Einfluss erhöhter Ionenstärke auf Proteinadsorbate an PAA-Bürsten zu verifizieren und somit zu prüfen, ob es sich bei der Oberfläche tatsächlich um eine PAA-Bürste gehandelt hat.

3.3.2 Untersuchung der Adsorption von Lysozym und BSA an einer Quarzglas- und Poly(styrol)-Oberfläche in An- und Abwesenheit von Hofmeistersalzen mittels TIRF-Spektroskopie bei pH = 7

Für die TIRF-spektroskopische Untersuchung des Einflusses von ionischen Cosolventien auf Proteinadsorbate von Lysozym und BSA bei neutralem pH-Wert wurden im Rahmen dieser Arbeit Voruntersuchungen durchgeführt. Diese beschränkten sich hauptsächlich auf die Untersuchung der Proteinadsorbate in Abwesenheit von Cosolventien.

Abhängig davon, ob in dem jeweils durchgeführten Experiment Erkenntnisse über die Adsorption von Lysozym und BSA an einer Quarzglas- oder Poly(styrol)-Oberfläche gewonnen werden sollten, wurde zunächst eine nach Arbeitsvorschrift 3.2.1 (Seite 47) gereinigte Quarzglasplatte ($39.5 \cdot 29.5 \cdot 1 \text{ mm}^3$) entweder so belassen oder unter Anwendung von Kapitel 3.2.4 (Seite 48) mit Poly(styrol) beschichtet. Die jeweilige Platte wurde dann mit der zweiten TIRF-Apparatur (vgl. Kapitel 3.2.11, Seite 52 ff.) in das Fluoreszenzspektrometer eingebaut. Das Anregungslicht wurde in diesem Zusammenhang durch eine UV-Laserdiode von ISS erzeugt (vgl. auch Abschnitt 3.3, Seite 57). Der Austausch von Flüssigkeit erfolgte manuell über Spritzen. Der Ablauf der ersten Experimente sah dabei immer vor, dass zunächst

die Messzelle mit Puffer A (pH = 7, vgl. Abschnitt 3.1.3, Seite 46) bzw. der Lösung des entsprechenden Cosolvens in Puffer A (ebenfalls pH = 7) befüllt wurde. Danach wurden so lange Spektren aufgenommen, bis sich das erhaltene Spektrum nicht mehr wesentlich von dem zuvor erhaltenen unterschied. In den meisten Fällen wurden hierzu drei Spektren aufgenommen, wobei das letzte dieser Spektren von allen nachfolgenden Spektren subtrahiert wurde (Aufnahme des Messhintergrunds). Anschließend wurde die Flüssigkeit in der Messzelle durch eine Lösung von BSA oder Lysozym der Konzentration 0.1 mg mL^{-1} in Puffer A bzw. in der Lösung des entsprechenden Cosolvens in Puffer A ersetzt. Ca. fünf Minuten nach dem Austausch wurde ein erstes Spektrum aufgenommen und anschließend weitere drei bis fünf Spektren im Abstand von jeweils zehn Minuten.

Tabelle 7 gibt einen Überblick über die mit dieser Vorgehensweise untersuchten Systeme. Die Temperatur in der Messzelle betrug während all dieser Messungen $\vartheta = 20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tabelle 7. TIRF-spektroskopische Voruntersuchungen der Adsorption von Proteinen in Gegenwart von Cosolventien in Anwesenheit des Proteins in Lösung.

Oberfläche	Silizium		Poly(styrol)
Lösung Protein	Puffer A, pH = 7	2 M NaSCN in Puffer A, pH = 7	Puffer A, pH = 7
Lysozym	gemessen	-	gemessen
BSA	gemessen	gemessen	gemessen

Um den Einfluss der Tatsache, dass bei den oben aufgeführten Versuchen das Protein während der Spektrenaufnahme in Lösung vorhanden war, zu überprüfen, wurde zusätzlich ein Experiment mit Rinderserumalbumin an Quarzglas durchgeführt, bei dem die zuvor beschriebene Prozedur bis zu der Stelle angewandt wurde, an der die Pufferlösung in der Zelle durch BSA-Lösung der Konzentration 0.1 mg mL^{-1} ausgetauscht wurde. Hiernach wurde abweichend nur ein Spektrum nach fünf Minuten aufgenommen und anschließend die Proteinlösung wieder durch Pufferlösung ohne Protein ausgetauscht. Nun wurden mehrere Spektren im Abstand von zehn Minuten aufgenommen.

3.4 Ablauf der ATR-FTIR-Spektroskopie-Experimente

Für die Untersuchung von an einer PAA-Bürste adsorbiertem Rinderserumalbumin und α -Lactalbumin (Kapitel 3.4.1, Seite 62 f.), von Lysozym, BSA und Ribonuclease A in An- und Abwesenheit von hochkonzentriertem Harnstoff an einer PAA-Bürste (Kapitel 3.4.2, Seite 64 f.), von Insulin in saurem Milieu in An- und Abwesenheit von Glycerin und Kochsalz an der PAA-Bürste (Passus 3.4.3, Seite 66) sowie von Lysozym und Rinderserumalbumin an einer Silizium- und Poly(styrol)-Oberfläche in An- und Abwesenheit verschiedener ionischer Cosolventien (Kapitel 3.4.4, Seite 67 f.) wurden ATR-FTIR-Spektren in einem Wellenzahlbereich von 4000 cm^{-1} bis 1500 cm^{-1} aufgenommen. Die Auflösung betrug hierbei 2 cm^{-1} (Datenpunktabstand 0.964 cm^{-1}). Die Aufnahme eines Spektrums dauerte 1.28 Minuten, wobei das Spektrum als Mittelwert der Fouriertransformationen von 128 hintereinander aufgenommenen Interferogrammen erhalten wurde. Die Geschwindigkeit des beweglichen Spiegels des Interferometers betrug dabei 2.5317 cm s^{-1} . Abbrucheffekte wurden bei allen Spektren durch Happ-Genzel-Apodisierung vermieden; außerdem erfolgte ebenfalls automatisch über die Software (Nicolet Omnic) eine Mertz-Phasenkorrektur sowie eine ATR-Korrektur zur Berücksichtigung der Wellenlängenabhängigkeit der Eindringtiefe des Infrarotlichts in die Probe.

Nach Einbau der ATR-Zelle (vgl. auch Abschnitt 3.2.12, Seite 54 ff.) wurde vor Beginn einer jeden Messung der Strahlengang des Infrarotlichts mit Hilfe eines Lasers über eine interne Kalibrierungsfunktion der Software (Nicolet Omnic) justiert, um eine optimale Intensität zu erhalten. Außerdem wurde ein Untergrundspektrum des trockenen Kristalls in der Messzelle aufgenommen. Dadurch konnten grobe Verunreinigungen ausgeschlossen werden; außerdem konnte so ein Hinweis auf die ggf. vorhandene Beschichtung des Kristalls sowie ein weiterer Eindruck von der zu erwartenden Signalintensität erhalten werden.

Noch vor Beginn einer jeden Messserie wurde ca. ein Milliliter Flüssigkeit (im Allgemeinen Puffer) in die Messzelle injiziert. Bei allen nachfolgenden Austauschvorgängen der Flüssigkeit über dem Reflexionselement wurden ebenfalls unter Verwendung von Spritzen 1.5 mL - 2.0 mL der neuen Flüssigkeit in eine der Öffnungen der Zelle (vgl. **Abbildung 14**, Seite 29) hineingedrückt. Die entsprechend gleichzeitig aus der anderen Öffnung austretende Flüssigkeit wurde in einer leeren Spritze aufgefangen und verworfen. Der Austausch von Flüssigkeit erfolgte immer kurz vor der Aufnahme des nächsten Spektrums der jeweiligen Messserie.

Sofern im Einzelnen nicht anders beschrieben, wurde im Rahmen der jeweiligen Messserie alle zwei Minuten ein Spektrum aufgenommen. Die erhaltenen Spektren wurden ausgewertet, indem zunächst ein Hintergrundspektrum, welches zu Beginn einer jeden Messserie aufgenommen wurde, von allen anderen Spektren der jeweiligen Serie abgezogen wurde. Es folgte die Subtraktion eines skalierten Wasserdampfspektrums. Die Skalierung wurde hierbei automatisch so gewählt, dass die Fläche unter dem resultierenden Spektrum minimal wurde. Nach Ausschneiden eines relevanten Bereichs wurde eine Basislinienkorrektur im Wellenzahlbereich der Amid I'-Bande von 1700 cm^{-1} bis 1600 cm^{-1} (Insulin, BSA, α -Lactalbumin) oder 1700 cm^{-1} bis 1595 cm^{-1} (Lysozym, Ribonuclease A) durchgeführt. Die Auftragung der durch Integration der basislinienkorrigierten Spektren erhaltenen Fläche der Amid I'-Bande gegen die Zeit wurde in vielen Fällen dazu verwendet, eine Adsorptionskinetik darzustellen. Um qualitativ die Form der Spektren miteinander vergleichen zu können oder um eine quantitative Sekundärstrukturanalyse durchzuführen, wurden Spektren flächennormiert, d. h. die Fläche unter der interessierenden Bande wurde auf einen Wert von 1 cm^{-1} festgesetzt. Die weitere Vorgehensweise zur Ermittlung von Sekundärstrukturanteilen aus im Bereich der Amid I'-Bande flächennormierten IR-Spektren ist in Kapitel 3.4.5 (Seite 68) beschrieben.

3.4.1 Untersuchung der Struktur von BSA und α -Lactalbumin an einer planaren PAA-Bürste unter pH-neutralen Bedingungen mittels ATR-FTIR-Spektroskopie

Um ein Experiment zur Untersuchung der Struktur von an einer PAA-Bürste adsorbiertem BSA und α -Lactalbumin bei $\text{pH} = 7$ durchführen zu können, wurde ein nach Arbeitsvorschrift 3.2.2 (Seite 47) gereinigtes internes Reflexionselement aus Silizium unter Anwendung der Kapitel 3.2.5 und 3.2.9 (Seite 48 bzw. Seite 50 f.) zunächst mit Poly(styrol) beschichtet und die Oberfläche danach in eine planare PAA-Bürste überführt. Das modifizierte IRE wurde schließlich nach Vorschrift 3.2.12 (Seite 54 ff.) in das FTIR-Spektrometer eingebaut. Die Temperatur bei allen in diesem Kapitel beschriebenen Experimenten betrug $\vartheta = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Für BSA wurde die Adsorptions- und Desorptionskinetik an einer planaren PAA-Bürste über insgesamt 180 Minuten verfolgt, wobei alle zwei Minuten ein Spektrum aufgenommen wurde. Zu Beginn der Messserie (0 Minuten) befand sich nur Puffer B über der PAA-Bürste. Nachfolgend wurden folgende Veränderungen vorgenommen (**Tabelle 8**, Seite 63):

Tabelle 8. Zeitlicher Ablauf des Adsorptionsexperiments von BSA an einer PAA-Bürste bei pH = 7 und $\vartheta = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Zeit / min	Ereignis: Ersetzen der Lösung über der PAA-Bürste durch...
10	... 0.2 mg mL ⁻¹ BSA in Puffer B
40	... 0.6 mg mL ⁻¹ BSA in Puffer B
70	... Puffer B
150	... 500 mM NaCl in Puffer B

Die Erhöhung der Proteinkonzentration nach 40 Minuten wurde durchgeführt, um mehr Proteinmoleküle an der Bürste zu adsorbieren und auf diese Weise rauschärmere Spektren zu erhalten. Die Auswertung aller erhaltenen Spektren erfolgte wie zu Beginn von Kapitel 3.4 (Seite 62) beschrieben. Für die Analyse der Sekundärstruktur (Kapitel 3.4.5, Seite 68) wurden allerdings nur Spektren herangezogen, welche in dem Bereich zwischen 70 und 150 Minuten in Abwesenheit des Proteins in Lösung erhalten wurden. Dadurch konnte trotz der hohen Proteinkonzentration sicher ausgeschlossen werden, dass in der Lösung vorhandene Proteinmoleküle wesentlich zum Messsignal beitrugen. Die Messungen in Gegenwart von Kochsalz sollte die ordnungsgemäße Präparation der Bürste anhand der (partiellen) Desorption des Proteins verifizieren.

Bei α -Lactalbumin war eine noch höhere Proteinkonzentration als bei Rinderserumalbumin erforderlich, wie **Tabelle 9** zu entnehmen ist. Zusätzlich zu Kochsalz wurde die ordnungsgemäße Präparation der Bürste durch Austauschen mit Lysozymlösung überprüft; sind die hiernach erhaltenen Spektren für Lysozym an einer planaren PAA-Bürste charakteristisch, ist dies ebenfalls ein Hinweis auf den ordnungsgemäßen Zustand der Bürste. Hier wurden für die weitere Verwendung zur Sekundärstrukturanalyse (Kapitel 3.4.5, Seite 68) nur Spektren im Bereich zwischen 100 und 124 Minuten verwendet.

Tabelle 9. Zeitlicher Ablauf des Adsorptionsexperiments von α -Lactalbumin an einer PAA-Bürste bei pH = 7 und $\vartheta = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Zeit / min	Ereignis: Ersetzen der Lösung über der PAA-Bürste durch...
10	... 0.2 mg mL ⁻¹ α -Lactalbumin in Puffer B
18	... 2.0 mg mL ⁻¹ α -Lactalbumin in Puffer B
84	... Puffer A
108	... 500 mM NaCl in Puffer B
134	... 0.2 mg mL ⁻¹ Lysozym in Puffer B

Die jeweiligen Reproduktionsmessungen verliefen nach einem ähnlichen Zeitschema.

3.4.2 Untersuchung der Struktur von Lysozym, BSA und RNase A an einer PAA-Bürste in An- und Abwesenheit von Harnstoff mittels ATR-FTIR-Spektroskopie bei neutralem / physiologischem pH-Wert

Für die Untersuchung der Struktur von an einer PAA-Bürste adsorbiertem Protein (Lysozym, BSA und RNase A) in Gegenwart von hochkonzentriertem Harnstoff unter Verwendung der ATR-FTIR-Spektroskopie wurden zunächst nach Kapitel 3.2.2 (Seite 47) gereinigte und anschließend nach den Abschnitten 3.2.5 und 3.2.9 (Seite 48 bzw. Seite 50 f.) als PAA-Bürste funktionalisierte interne Reflexionselemente verwendet. Der Einbau in das Spektrometer erfolgte nach Arbeitsanweisung 3.2.12 (Seite 54 ff.).

Tabelle 10. Genereller Ablauf der Proteinadsorptionsexperimente an der PAA-Bürste in An- und Abwesenheit von hochkonzentriertem Harnstoff.

Zeit / min	Ereignis: Ersetzen der Lösung über der PAA-Bürste durch...
20, 26, 32	... Lösung von Harnstoff in Puffer B (vgl. Tabelle 11), pH \approx 7.5
60, 62, 66, 70, 80	... Puffer B, pH = 7
90	... Lösung des Proteins in Puffer B (vgl. Tabelle 11), pH = 7
110	... Puffer B, pH = 7
130, 136, 142	... Lösung von Harnstoff in Puffer B (vgl. Tabelle 11), pH \approx 7.5
160, 162, 166, 170, 180	... Puffer B, pH = 7
190	... 500 mM NaCl in Puffer B, pH = 7

In **Tabelle 10** ist allgemein die Vorgehensweise bei den Messungen mit Harnstoff beschrieben, die in der linken Spalte angegebenen genauen Zeiten sind ein Beispiel, die Länge einiger Abschnitte kann je nach durchgeführter Messung etwas variieren. Alle Messserien begannen mit Puffer B über der PAA-Bürste (0 Minuten).

Je nach untersuchtem Protein unterschieden sich einige Parameter bei den jeweiligen Messungen. Diese Parameter sind in **Tabelle 11** spezifiziert:

Tabelle 11. Messparameter in Abhängigkeit von dem untersuchten Protein.

Protein	$c(\text{Proteinlösung})$ in Puffer B	$c(\text{Harnstofflösung})$ in Puffer B	Temperatur
Lysozym	0.2 mg mL ⁻¹	9.5 M, pH \approx 7.5 ⁹	30 °C
BSA	2 mg mL ⁻¹	8.0 M, pH \approx 7.5 ⁹	20 °C
RNase A	0.2 mg mL ⁻¹	9.0 M, pH \approx 7.5 ⁹	20 °C

⁹ Auch bei den ATR-FTIR-Messungen führten große Mengen des leicht basischen Harnstoffs zu einem moderaten Anstieg des pH-Werts, was in **Tabelle 11** berücksichtigt ist.

Das mehrfache Austauschen der Lösungen über der Bürste gegen Harnstofflösung bzw. später gegen Puffer (vgl. **Tabelle 10**, Seite 64) sollte sicherstellen, dass die in einigen Fällen nötige sehr hohe Harnstoffkonzentration zur Denaturierung des Proteins auch tatsächlich erreicht wurde. Auch die Verdrängung des Harnstoffs musste möglichst vollständig geschehen, da Harnstoff im Bereich der Amid I'-Bande stark absorbiert. Die Länge der Zeitabschnitte mit Anwesenheit von Harnstoff wurde vor und nach der Zugabe des Proteins bewusst gleich gewählt, um die in Gegenwart von Harnstoff erhaltenen Spektren einer individuellen Untergrundkorrektur unterziehen zu können. Anhand des in **Tabelle 10** (Seite 64) beschriebenen Beispiels bedeutet dies, dass das nach 20 Minuten erhaltene Spektrum von dem nach 130 Minuten erhaltenen abgezogen wurde, das nach 22 Minuten von dem nach 132 Minuten und so weiter. Diese Korrektur des Harnstoffuntergrunds wurde nur für die Messungen mit BSA und Lysozym durchgeführt, so dass für RNase A nur die Spektren vor der Zugabe und nach dem Wegspülen des Harnstoffs aussagekräftig sind.

Bei den Messungen mit Lysozym wurde aufgrund des hohen Adsorptionsgrades zusätzlich zur Betrachtung der Amid I'-Bande (vgl. Kapitel 3.4, Seite 62) exemplarisch auch der Bereich der Valenzschwingungen der Kohlenwasserstoffe (vorwiegend Methylenstreckschwingungen) ausgewertet. Diese Schwingungen werden nicht durch Harnstoffmoden überlagert. Bei der Auswertung wurde nach Ausschneiden um den relevanten Bereich herum eine Basislinienkorrektur im Wellenzahlbereich von 3010 cm^{-1} bis 2850 cm^{-1} durchgeführt. Außerdem wurden die Spektren auf 1 cm^{-1} flächennormiert, um Änderungen in der Form deutlich zu machen.

Bei den zu diesen Experimenten gehörenden Abbildungen im Ergebnisteil (Kapitel 4.4.1., Seite 124 ff. sowie Kapitel 4.4.2, Seite 129 ff.) ist die Zeitskala nicht die gleiche wie in **Tabelle 10** (Seite 64) gezeigt, weil die Spektrenaufnahme an der Grenzfläche in Abwesenheit von Protein nur der Korrektur der später erhaltenen Spektren diene und das eigentliche Experiment erst mit dem Austausch durch die jeweilige Proteinlösung begann. Die Messungen mit RNase A wurden nicht reproduziert, da sie im Wesentlichen als Bestätigung der mit Lysozym (ebenfalls bei $\text{pH} = 7$ positiv geladen) gewonnenen Ergebnisse dienen.

3.4.3 Untersuchung der Struktur von Insulin an einer PAA-Bürste bei pH = 2 in Gegenwart von 2 M Glycerin- sowie 500 mM NaCl-Lösung unter Verwendung der ATR-FTIR-Spektroskopie

Die Struktur von Rinderinsulin wurde an einem nach Vorschrift 3.2.9 (Seite 50 f.) als PAA-Bürste modifizierten Reflexionselement unter sauren Bedingungen (pH = 2) in Abhängigkeit von der Anwesenheit von 2 M Glycerinlösung oder 500 mM Kochsalzlösung untersucht. Dieses wurde zuvor unter Anwendung der Kapitel 3.2.2 und 3.2.5 (Seite 47 bzw. Seite 48) gereinigt und mit Poly(styrol) beschichtet. Der Einbau in das FTIR-Spektrometer erfolgte entsprechend Abschnitt 3.2.12 (Seite 54 ff.). Ohne Zusatz und mit 2 M Glycerin begann die jeweilige Messserie mit 10 mM DCl in D₂O bzw. 2 M Glycerin in 10 mM DCl in D₂O. Zehn Minuten nach Beginn der Messserie wurde die Lösung durch eine entsprechende Insulinlösung (ohne bzw. mit 2 M Glycerin, pH = 2 in D₂O) der Konzentration 0.1 mg mL⁻¹ ausgetauscht. Die gesamte Messserie dauerte jeweils 60 Minuten. Die Temperatur betrug während dieser Messungen $\vartheta = 23.5$ °C.

Die Messung des Effekts von 500 mM Kochsalzlösung auf das Proteinadsorbat war eine Langzeitmessung bei $\vartheta = 20$ °C. Die Messserie begann mit 10 mM DCl in D₂O über der PAA-Bürste, nachfolgend wurde wie in **Tabelle 12** beschrieben vorgegangen:

Tabelle 12. Ablauf des Experiments mit Insulin an der PAA-Bürste bei pH = 2 an der PAA-Bürste in Abhängigkeit von der Kochsalzkonzentration bei $\vartheta = 20$ °C.

Zeit / min	Ereignis: Ersetzen der Lösung über der PAA-Bürste durch...
6, 16	... Insulinlösung (0.1 mg mL ⁻¹), 10 mM DCl in D ₂ O
38, 50	... Insulinlösung (0.1 mg mL ⁻¹), 0.5 M NaCl in 10 mM DCl in D ₂ O

Das letzte Spektrum der Messserie wurde nach 2020 Minuten (33 h 40 min) erhalten.

Alle Spektren wurden wie in Kapitel 3.4 (Seite 62) beschrieben ausgewertet und repräsentative Spektren von Insulin in Gegenwart und Abwesenheit von 2 M Glycerin wurden einer Sekundärstrukturanalyse (vgl. Abschnitt 3.4.5, Seite 68) unterzogen. Der Langzeitteil der Messung mit 500 mM Kochsalz wurde nicht reproduziert, weil er eine Reproduktion bereits zuvor veröffentlichter Ergebnisse der TIRF-Spektroskopie an der PAA-Bürste darstellt [138].

3.4.4 Untersuchung der Adsorption von Lysozym und BSA an einer Silizium- und Poly(styrol)-Oberfläche in An- und Abwesenheit verschiedener ionischer Cosolventien bei neutralem pH-Wert

Wurde die Adsorption von Lysozym und Rinderserumalbumin in Abhängigkeit von dem Vorhandensein verschiedener Cosolventien an einer Poly(styrol)-Oberfläche untersucht, so wurde das unter Anwendung von Vorschrift 3.2.2 (Seite 47) gereinigte IRE zunächst wie in Kapitel 3.2.5 (Seite 48) beschrieben mit Poly(styrol) beschichtet und nach Anweisung 3.2.12 (Seite 54 ff.) in das Spektrometer eingebaut. Im Falle der Messungen an einer Siliziumoberfläche wurde das gereinigte IRE ohne weitere Vorbehandlung eingebaut. Die Messserien wurden alle bei $\vartheta = 20\text{ °C}$ durchgeführt und dauerten 60 Minuten. Sie begannen mit Puffer B (pH = 7) bzw. der Lösung des entsprechenden Cosolvens in Puffer B (ebenfalls pH = 7) über dem IRE. Zehn Minuten nach Serienbeginn wurde die Lösung über der Bürste durch Proteinlösung ($c = 0.1\text{ mg mL}^{-1}$) ausgetauscht. Falls die Lösung zu Beginn der Messung Cosolvens enthielt, so war auch in der entsprechenden Proteinlösung dieses Cosolvens in der gleichen Konzentration vorhanden. Die Adsorption von Rinderserumalbumin an Silizium und Poly(styrol) wurde in Gegenwart der in **Tabelle 13** spezifizierten Cosolventien untersucht:

Tabelle 13. Durchgeführte Untersuchungen zur Adsorption von Rinderserumalbumin in Gegenwart von Cosolventien bei pH = 7 und $\vartheta = 20\text{ °C}$.

Oberfläche	Silizium	Poly(styrol)
verwendete Cosolventien	keines (Referenz), NaCl (0.66 und 2 M), NaSCN (0.66 M und 2 M) (NH ₄) ₂ SO ₄ (2 M), NaI (2 M), Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ (2 M)	keines (Referenz), NaCl (0.66 M und 2 M), NaSCN (0.66 M und 2 M), (NH ₄) ₂ SO ₄ (2 M)

Für Hühnerlysozym sind die verwendeten Cosolventien in **Tabelle 14** dargestellt:

Tabelle 14. Durchgeführte Untersuchungen zur Adsorption von Lysozym in Gegenwart von Cosolventien bei pH = 7 und $\vartheta = 20\text{ °C}$.

Oberfläche	Silizium	Poly(styrol)
Verwendete Cosolventien	keines (Referenz), NaCl (2 M), NaSCN (0.66 M und 2 M)	keines (Referenz), NaCl (0.66 M und 2 M), NaSCN (0.66 M und 2 M), (NH ₄) ₂ SO ₄ (0.66 M und 2 M)

Aufgrund der großen Ähnlichkeit zwischen den Ergebnissen bei niedrigeren Ionenstärken und höheren Ionenstärken wurden die Messungen bei geringeren Ionenstärken zum Teil nicht reproduziert. Von den ausgewerteten Spektren (vgl. Kapitel 3.4, Seite 62) wurden die charakteristischsten für die Sekundärstrukturanalyse (vgl. Kapitel 3.4.5) ausgewählt.

3.4.5 Ermittlung von Sekundärstrukturanteilen aus der Amid I'-Bande flächennormierter Proteinspektren

Die Sekundärstrukturanalyse auf Basis der flächennormierten Amid I'-Bande erfolgte unter Verwendung der Software Grams AI der Thermo Electron Corporation. Auf die Spektren wurde zunächst eine FSD (Fourier Self-Deconvolution) angewandt. Die verwendeten Parameter bewegten sich im Bereich eines γ -Faktors von 25 bei 80% Glättung. Außerdem wurde die zweite Ableitung der Spektren im Allgemeinen durch eine Funktion sechsten Grades mit 31 oder 51 Datenpunkten approximiert. Die Position der Bandenmaxima wurde anhand von Übereinstimmungen der Positionen der Maxima der selbstentfalteten Spektren und der Minima in den zweiten Ableitungen der Spektren festgelegt. Alle Anpassungen wurden mit fünf oder sechs Bandenmaxima durchgeführt. Vor Durchführung der Iteration wurde die Höhe der eingefügten Banden so festgelegt, dass das Maximum der Bande das Spektrum ungefähr berührte. Beim eigentlichen Anpassungsprozess wurde dann nach einer Fehlerabschätzung versucht, die Banden durch gemischte Gauss-Lorentz-Funktionen (vgl. Kapitel 2.2.6, Gleichung (10), Seite 28) mit frei variablen Anteilen der beiden Funktionstypen so darzustellen, dass die Summe aller Banden möglichst genau dem zugrunde gelegten Spektrum entsprach. Während der Anpassungsprozedur wurde eine Mindesthalbwidthbreite σ_{\min} von 12 cm^{-1} vorgegeben, weil nur nicht selbstentfaltete Spektren für den Fit verwendet wurden. Außerdem durften die Banden ausschließlich positive Werte für deren Höhe annehmen und die Positionen der Bandenmaxima wurden auf $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$ um den durch FSD und zweite Ableitung ermittelten Wert beschränkt, wie dies in der Literatur empfohlen wird [121]. Einem ersten Anpassungstestlauf folgte die zwanzigfache Durchführung von 1000 Anpassungsdurchläufen. Nach Abschluss dieser Prozedur konnten anhand von **Tabelle 3** (Seite 25) die erhaltenen Banden verschiedenen Sekundärstruktur-elementen zugeordnet werden. Bestenfalls repräsentiert das Verhältnis aus Fläche unter einer bestimmten Bande und der Gesamtfläche den Anteil des jeweiligen Sekundärstrukturelements im Protein (vgl. Kapitel 2.2.6, Seite 28 f.).

3.5 Ablauf der Messungen zur Enzymkinetik von HRP

Zur quantitativen Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Meerrettichperoxidase (HRP) wurde das Amplex Red/Wasserstoffperoxid/Peroxidase-Assay Kit der Firma Invitrogen verwendet. Die in dem Assay Kit mitgelieferte Meerrettichperoxidase hatte ein Molekulargewicht von ca. 40 kg mol^{-1} und eine spezifische Aktivität von 252 U mg^{-1} . Dabei ist 1 U definiert als die Menge an Enzym, welche die Umsetzung von Pyrogallol zu 1 mg Purpurogallin in 20 Sekunden bei $\text{pH} = 6$ und $\vartheta = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ katalysiert. In dieser Arbeit erfolgte der Nachweis der Aktivität der Meerrettichperoxidase über die Bildung des Fluoreszenzfarbstoffs Resorufin, welcher von dem Enzym aus Wasserstoffperoxid und Amplex Red gebildet wird (vgl. Kapitel 2.1.4, **Abbildung 9**, Seite 17). Die Anregung von Resorufin erfolgte bei einer Wellenlänge von $(530 \pm 13) \text{ nm}$. Die Emission wurde bei einer Wellenlänge von $(590 \pm 17) \text{ nm}$ detektiert. Aufgrund des lichtundurchlässigen Mikrotiterplatten-Selbstbaus (vgl. Abschnitt 3.2.13 bzw. **Abbildung 26**, Seite 56) wurde das Anregungslicht von oben in die Vertiefungen eingestrahlt und das Emissionslicht auch wieder von oben detektiert. Weil die Software (i-control von Tecan) von einer Corning-Platte mit 96 Vertiefungen ausging, konnte nur ein rechteckiger Ausschnitt an Vertiefungen gewählt werden, so dass bei jeder Messung auch alle (größtenteils nicht vorhandenen) Vertiefungen zwischen C3 und F9 ausgelesen werden mussten. Dies führte zu folgenden zeitlichen Verzögerungen zwischen den Stellen, an denen sich tatsächlich Vertiefungen befanden (**Tabelle 15**):

Tabelle 15. Durch Geometrie der Versuchsapparatur und die Software bedingte Verzögerungen zwischen dem Auslesen der vorhandenen Vertiefungen im Bezug zum Beginn der Messung.

Vertiefung	C3	C6	C9	F3	F6	F9
Verzögerung / s	1	3	5	21	19	16

Aus den Daten in **Tabelle 15** wird ersichtlich, dass der Abstand zwischen zwei Messungen mindestens 25 Sekunden betragen muss. Daher wurde bei allen Messserien, die im Allgemeinen 25 Minuten dauerten, die Messwiederholfrequenz zu 2 min^{-1} gewählt.

Bei allen Messungen wurde zunächst das Protein (HRP) inkubiert, hiernach eine Amplex Red und Wasserstoffperoxid enthaltende Lösung, die im Folgenden als Reagenzlösung bezeichnet wird, hinzupipettiert und schließlich die Messserie gestartet.

Die Reagenzlösung (100 μM Amplex Red-Lösung mit 2.0 mM H_2O_2) wurde unmittelbar vor jeder Messung frisch hergestellt. Dazu wurde eine verdünnte H_2O_2 -Stammlösung mit einer Konzentration von 20 mM hergestellt, indem 98 μL Puffer C (pH = 7.4, vgl. Kapitel 3.1.3, Seite 46) vorgelegt und 2.06 μL einer 3.3%igen wässrigen H_2O_2 -Stammlösung zugegeben wurden. Von dieser Lösung wurden 50 μL in 445 μL vorgelegten Puffer C (pH = 7.4) überführt und schließlich 5 μL der zuvor aufgetauten Amplex Red-Stammlösung (10 mM in DMSO) hinzupipettiert. Da Amplex Red an der Luft nicht lange stabil ist, wurden Pipettiervorgänge mit der Amplex Red-Stammlösung stets unter semi-inerten Bedingungen (Stickstoffstrom) durchgeführt. Anschließend wurde diese Reagenzlösung immer in der gleichen Reihenfolge zu den in den Vertiefungen vorbereiteten Proben gegeben, und zwar nach folgendem Zeitschema (**Tabelle 16**):

Tabelle 16. Zeitliche Verzögerung ($t(\text{finale Zugabe}) - t(\text{Zugabe})$) zwischen den verschiedenen Vertiefungen aufgrund der Pipettierreihenfolge.

Vertiefung	C3	C6	C9	F3	F6	F9
Verzögerung / s	20	60	100	0	40	80

Dies bedeutet, dass die Reagenzlösung in die Vertiefungen in der Reihenfolge C9, F9, C6, F6, C3 und schließlich F3 im Abstand von jeweils 20 Sekunden gegeben wurde.

In den Diagrammen im Ergebnisteil (vgl. Kapitel 4.2, Seite 91 ff.) ist der Zeitpunkt der Zugabe der Reagenzlösung zu der jeweiligen Vertiefung als Startpunkt ($t = 0$ s) definiert. Der Zeitpunkt der ersten Messung ergibt sich auf dieser Skala aus der Summe der in den **Tabellen 15** und **16** für jede Vertiefung spezifizierten Verzögerungen zuzüglich der Verzögerung zwischen der letzten Zugabe der Reagenzlösung und dem Beginn der Messserie. Letztere betrug bei jeder Messserie 30 s oder 35 s. Sei diese Verzögerung einmal mit 30 s vorausgesetzt, ergibt sich beispielsweise für die Vertiefung C6, dass der erste Messwert für die Fluoreszenzemission 93 s (3 s + 60 s + 30 s) nach der Zugabe der Reagenzlösung erhalten wurde.

Das Protein wurde in Aliquots mit einer Konzentration von 1 U mL^{-1} in Puffer C (pH = 7.4) tiefgefroren. Im Vorfeld einer Messung wurde eines dieser Aliquots aufgetaut. Durch eine Verdünnungsreihe wurden je nach Experiment Proteinlösungen mit Konzentrationen von 2 mU mL^{-1} , von 20 mU mL^{-1} oder 200 mU mL^{-1} in Puffer C bereitgestellt.

Vor Zugabe der Reagenzlösung befanden sich bei jedem Versuch in jeder Vertiefung 75 μL Flüssigkeit. Die Zugabe von weiteren 75 μL Reagenzlösung führte während der Messvorgänge in allen Vertiefungen zu einem Gesamtvolumen von ca. 150 μL . Hierbei waren

durch von ggf. vorangegangenen Spülvorgängen verbliebene Flüssigkeitsreste (Puffer C) geringfügige Abweichungen nach oben möglich.

Die Auswertung bestand im Wesentlichen in der Bestimmung der Anfangssteigung der zeitabhängig festgestellten Werte für die Fluoreszenzintensität. Hierzu wurden im Allgemeinen die ersten vier Messpunkte ausgewählt, die sich nicht als Ausreißer darstellten. Die Temperatur betrug bei allen Enzymkinetikmessungen $\vartheta = 25\text{ °C}$. Es wurde grundsätzlich mit Doppelbestimmung gearbeitet.

Es sei darauf hingewiesen, dass die Konzentrationen der Meerrettichperoxidase durch Zugabe der Reagenzlösung auf die Hälfte verringert wurden, sofern das Protein noch in Lösung vorlag. Während der Adsorption des Proteins war aber die höhere Konzentration maßgeblich, so dass oft trotzdem von der höheren Konzentration die Rede ist. Sofern nicht spezifiziert, verstehen sich alle in diesem Kapitel (3.5) angegebene Lösungen als Lösungen in Puffer C.

3.5.1 Vergleich der enzymatischen Aktivität von Meerrettichperoxidase an einer PAA-Bürste und an einer Siliziumoberfläche bei pH = 7.4

Abhängig davon, ob im jeweiligen Experiment die enzymatische Aktivität von Meerrettichperoxidase bei pH = 7.4 an einer Siliziumoberfläche oder einer planaren PAA-Bürste untersucht werden sollte, wurde entweder ein nach Kapitel 3.2.3 (Seite 47) gereinigter Siliziumwafer ($80 \cdot 50 \cdot 0.7\text{ mm}^3$) oder ein gereinigter, zunächst nach Vorschrift 3.2.6 (Seite 48) mit Poly(styrol) beschichteter und schließlich als PAA-Bürste funktionalisierter Siliziumwafer (vgl. Abschnitt 3.2.10, Seite 52) in die selbstgebaute Mikrotiterplatte (vgl. Kapitel 3.2.13, Seite 56 f.) eingebaut.

Bei beiden verwendeten Oberflächen bestand die Untersuchung aus zwei Teilmessserien, wobei bei der ersten Messserie im Unterschied zur zweiten in Gegenwart des Proteins in Lösung gemessen wurde. Vor Beginn der ersten Messserie wurde nach dem in **Tabelle 17** (Seite 72) gezeigten Schema einpipettiert. Dabei wurde die vergleichsweise konzentrierte Proteinlösung in den Vertiefungen C3 und C6 eine Stunde in den Vertiefungen belassen, um sicherzugehen, dass keine größeren Veränderungen mehr im Proteinadsorbat stattfanden. Die in F3 und F6 kurz vor Zugabe der Reagenzlösung (vgl. Abschnitt 3.5, Seite 70) eingefüllte Proteinlösung diente als positive Vergleichsprobe, der in C9 und F9 eingefüllte Puffer als negative Vergleichsprobe.

Tabelle 17. Pipettierschema für die erste Teilmessserie zum Vergleich der enzymatischen Aktivitäten von HRP an einer PAA-Bürste und einer Siliziumoberfläche.

Vertiefung C3: 75 μL 20 mU mL^{-1} HRP Inkubationszeit 1 h	Vertiefung C6: 75 μL 20 mU mL^{-1} HRP Inkubationszeit 1 h	Vertiefung C9: 75 μL Puffer C
Vertiefung F3: 75 μL 2 mU mL^{-1} HRP Zugabe kurz vor Messbeginn	Vertiefung F6: 75 μL 2 mU mL^{-1} HRP Zugabe kurz vor Messbeginn	Vertiefung F9: 75 μL Puffer C

Nach Abschluss dieser ersten Teilmessserie wurden alle Vertiefungen intensiv mit Puffer C gespült und folgende Lösungen in die Vertiefungen kurz vor Zugabe der Reagenzlösung und Beginn der zweiten Teilmessserie eingefüllt (**Tabelle 18**):

Tabelle 18. Pipettierschema für die zweite Teilmessserie zum Vergleich der enzymatischen Aktivitäten von HRP an einer PAA-Bürste und einer Siliziumoberfläche.

Vertiefung C3: 75 μL Puffer C	Vertiefung C6: 75 μL Puffer C	Vertiefung C9: 75 μL Puffer C
Vertiefung F3: 75 μL 2 mU mL^{-1} HRP	Vertiefung F6: 75 μL 2 mU mL^{-1} HRP	Vertiefung F9: 75 μL Puffer C

Im Rahmen der zweiten Teilmessserie erhaltene Fluoreszenzintensitäten waren in den Vertiefungen C3 und C6 jetzt nur noch auf das an der jeweiligen Grenzfläche adsorbierte Protein zurückzuführen, wobei F3, F6, C9 und F9 wiederum als Vergleich (positive und negative Kontrolle) dienten.

3.5.2 Vergleich der enzymatischen Aktivität von Meerrettichperoxidase an einer PAA-Bürste und in Lösung über deren Desorption mit 300 mM Kochsalzlösung bei physiologischem pH-Wert

Um sichere Aussagen über die Verhältnisse an der Grenzfläche treffen zu können, musste zunächst der Einfluss von 300 mM Kochsalz auf die Reaktion in Lösung bei $\text{pH} = 7.4$ untersucht werden. Dazu wurde ein gereinigter Siliziumwafer (Vorschrift 3.2.3, Seite 47) nach Kapitel 3.2.13 (Seite 56 f.) in die selbstgebaute Mikrotiterplatte eingebaut. Als erstes wurde der Einfluss von Kochsalz bei niedriger Proteinkonzentration (1 mU mL^{-1} resultierend nach Zugabe der Reagenzlösung) untersucht, hierzu wurde kurz vor Zugabe der Reagenzlösung folgendermaßen pipettiert (**Tabelle 19**, Seite 73):

Tabelle 19. Pipettierschema zur Kontrolle des Einflusses von 300 mM NaCl auf die Aktivität von HRP bei niedriger Proteinkonzentration in Lösung.

Vertiefung C3: 75 μL 2 mU mL^{-1} HRP	Vertiefung C6: 75 μL 2 mU mL^{-1} HRP	Vertiefung C9: 75 μL Puffer C
Vertiefung F3: 75 μL 2 mU mL^{-1} HRP mit 600 mM NaCl	Vertiefung F6: 75 μL 2 mU mL^{-1} HRP mit 600 mM NaCl	Vertiefung F9: 75 μL Puffer C

Durch die spätere Zugabe der Reagenzlösung (vgl. Abschnitt 3.5, Seite 70) vor Beginn der Messserie wurde die Kochsalzkonzentration in den Vertiefungen F3 und F6 dann auf 300 mM abgesenkt. Der Puffer in C9 und F9 diene als Negativkontrolle. Um sicherstellen zu können, dass aufgrund der hohen Kochsalzkonzentration nicht bereits im Eppendorfgefäß eine Änderung mit dem Protein geschieht, wurde die Messserie auch noch einmal mit einem alternativen Pipettierschema reproduziert (**Tabelle 20**):

Tabelle 20. Alternatives Pipettierschema zur Kontrolle des Einflusses von 300 mM NaCl auf die Aktivität von HRP bei niedriger Proteinkonzentration in Lösung.

Vertiefung C3: 75 μL 2 mU mL^{-1} HRP	Vertiefung C6: 75 μL 2 mU mL^{-1} HRP	Vertiefung C9: 75 μL Puffer C
Vertiefung F3: 75 μL 2 mU mL^{-1} HRP + 13 μL 4.125 M NaCl	Vertiefung F6: 75 μL 2 mU mL^{-1} HRP + 13 μL 4.125 M NaCl	Vertiefung F9: 75 μL Puffer C

Dies führte nach Zugabe der Reagenzlösung ebenfalls zu einer Kochsalzkonzentration von ungefähr 0.3 M. Auf diese Weise konnte allerdings immer noch nicht ausgeschlossen werden, dass der zu beobachtende Einfluss durch die vor der Zugabe der Reagenzlösung vorliegende 0.6 M Konzentration des Kochsalzes hervorgerufen wird. Deswegen wurde die nach der Zugabe der Reagenzlösung begonnene Messserie nach knapp zehn Minuten unterbrochen und den Vertiefungen C3 und C6 nachträglich 13 μL 4.125 M NaCl in Puffer C hinzugefügt. Schließlich wurde die Messserie ohne erneute Zugabe von Reagenzlösung fortgesetzt.

Die Untersuchung des Einflusses von 300 mM Kochsalz auf die Aktivität von HRP bei höherer Proteinkonzentration in Lösung (10 mU mL^{-1} resultierend nach Zugabe der Proteinlösung) wurde analog zu denen bei niedriger Konzentration durchgeführt, mit dem Unterschied, dass 20 mU mL^{-1} -Lösungen von HRP in Puffer C anstatt der in den **Tabellen 19** und **20** spezifizierten 2 mU mL^{-1} -Lösungen verwendet wurden. Weiterhin wurden beim alternativen Pipettierschema in **Tabelle 20** 13.4 μL einer 4.0 M NaCl-Lösung in Puffer C zu den Vertiefungen F3 und F6 hinzugefügt (anstatt 13 μL einer 4.125 M Lösung). Auf die

Unterbrechung der Messserie zur nachträglichen Erhöhung der Kochsalzkonzentration in den Vertiefungen C3 und C6 wurde darüber hinaus verzichtet.

Das Ergebnis dieser Voruntersuchungen (vgl. Kapitel 4.2.2, Seite 95 ff.) hatte zur Folge, dass für das eigentliche Desorptionsexperiment mit 300 mM Kochsalzlösung zum Vergleich der enzymatischen Aktivität von Meerrettichperoxidase an der PAA-Bürste und in Lösung im Vorfeld eine möglichst hohe Proteinkonzentration verwendet wurde. Hierfür wurde zunächst ein gereinigter (vgl. Vorschrift 3.2.3, Seite 47) Siliziumwafer (Maße $80 \cdot 50 \cdot 0.7 \text{ mm}^3$) mit Poly(styrol) beschichtet (vgl. Abschnitt 3.2.6, Seite 48). Daraufhin wurde eine planare PAA-Bürste auf dessen Oberfläche unter Anwendung von Arbeitsvorschrift 3.2.10 (Seite 52) präpariert und der Wafer in die selbstgebaute Mikrotiterplatte (vgl. Abschnitt 3.2.13, Seite 56 f.) eingebaut. Das Desorptionsexperiment bestand aus zwei Teilmessserien. Vor Beginn der ersten Messserie wurden in den Vertiefungen C3, C6, F3 sowie F6 75 μL einer 200 mU mL^{-1} HRP-Lösung in Puffer C für eine Stunde inkubiert. Hiernach wurden alle Vertiefungen exzessiv mit Puffer C gespült und nach dem in **Tabelle 21** gezeigten Schema Flüssigkeit in die Vertiefungen gegeben:

Tabelle 21. Pipettierschema für die erste Teilmessserie zur Untersuchung des Einflusses der HRP-Desorption von der PAA-Bürste durch Kochsalz auf die enzymatische Aktivität des Proteins.

Vertiefung C3: 75 μL Puffer C	Vertiefung C6: 75 μL Puffer C	Vertiefung C9: 75 μL 2 mU mL^{-1} HRP
Vertiefung F3: 75 μL 600 mM NaCl	Vertiefung F6: 75 μL 600 mM NaCl	Vertiefung F9: 75 μL Puffer C

Es folgte die Zugabe der Reagenzlösung, wodurch eine Kochsalzkonzentration von 300 mM in den Vertiefungen F3 und F6 resultierte; anschließend wurde die Messserie gestartet. Durch den Zusatz von 600 mM NaCl-Lösung in den Vertiefungen F3 und F6 sollte sichergestellt werden, dass ein Teil des vorher adsorbierten Proteins hier in Lösung vorlag (vgl. z. B. [20]). Aufgrund der geringen Anzahl an Vertiefungen musste auf eine Doppelbestimmung der positiven (C9) und negativen (F9) Vergleichsprobe verzichtet werden. Nach Abschluss der Messserie wurde die Lösung aus allen Vertiefungen möglichst vollständig ohne Beschädigung der Bürstenoberfläche abpipettiert und nachfolgend erneut ausgiebig mit Puffer C (pH = 7.4) gespült. Kurz vor erneuter Zugabe von Reagenzlösung und Beginn der zweiten Teilmessserie wurden dann folgende Flüssigkeitsmengen einpipettiert (**Tabelle 22**, Seite 75):

Tabelle 22. Pipettierschema für die zweite Teilmessserie zur Untersuchung des Einflusses der HRP-Desorption von der PAA-Bürste durch Kochsalz auf die enzymatische Aktivität des Proteins.

Vertiefung C3: 75 μL Puffer C	Vertiefung C6: 75 μL Puffer C	Vertiefung C9: 75 μL 2 mU mL^{-1} HRP
Vertiefung F3: 75 μL Puffer C	Vertiefung F6: 75 μL Puffer C	Vertiefung F9: 75 μL Puffer C

Das zweite Teilexperiment diente zur Überprüfung, ob und in welchem Ausmaß im ersten Teilexperiment eine Desorption der Meerrettichperoxidase durch 300 mM Kochsalz erreicht wurde. Das in die Lösung übergetretene Protein sollte zwischen den beiden Messserien durch das Abpipettieren und Spülen entfernt worden sein.

3.5.3 Vergleich der enzymatischen Aktivität von Meerrettichperoxidase an einer PAA-Bürste und in Lösung durch Abblockexperimente mit Rinderserumalbumin bei physiologischem pH-Wert

Ein anderer Weg zum Vergleich der enzymatischen Aktivität von Meerrettichperoxidase in Lösung und an der PAA-Bürste bei $\text{pH} = 7.4$ führt über Rinderserumalbumin. Dieses kann unspezifische Proteinadsorption an Oberflächen unterdrücken, indem es selbst die Oberfläche blockiert [89]. Für die mit Rinderserumalbumin durchgeführten Messserien wurden ebenfalls gereinigte Siliziumwafer (Kapitel 3.2.3, Seite 47) mit den Maßen $80 \cdot 50 \cdot 0.7 \text{ mm}^3$ mit Poly(styrol) beschichtet (Abschnitt 3.2.6, Seite 48), als PAA-Bürste funktionalisiert (Vorschrift 3.2.10, Seite 52) und in den in Kapitel 3.2.13 (Seite 56 f.) beschriebenen Mikrotiterplatten-Selbstbau eingebaut. Zudem bestanden die Experimente mit BSA wiederum aus zwei Teilmessserien. Im Vorfeld der ersten Teilmessserie wurden in den Vertiefungen F3 und F6 165 μL 0.1 mg mL^{-1} Rinderserumalbumin in Puffer C ($\text{pH} = 7.4$) für eine Stunde inkubiert, um die Oberfläche in diesen Vertiefungen zu blocken. Alle Vertiefungen wurden exzessiv mit Puffer gespült. Dabei wurde darauf geachtet, dass nicht versehentlich kurzzeitig verdünnte BSA-Lösung in die anderen Vertiefungen gelangte. Anschließend wurden in die Vertiefungen die in **Tabelle 23** (Seite 76) spezifizierten Flüssigkeiten gegeben, wobei die Lösungen in C3, C6, F3 und F6 vor Zugabe der Reagenzlösung (vgl. Abschnitt 3.5, Seite 70) und Beginn der ersten Teilmessserie eine Stunde inkubiert wurden. Auch bei den Experimenten mit Rinderserumalbumin als Blocker war eine Doppeltbestimmung der positiven Referenz (C9) und der negativen Referenz (F9) aufgrund der geringen Anzahl der zur Verfügung stehenden Vertiefungen nicht möglich.

Tabelle 23. Pipettierschema für die erste Teilmessserie zum Vergleich der enzymatischen Aktivität von HRP in Lösung und an der PAA-Bürste unter Verwendung einer BSA-geblockten Oberfläche.

Vertiefung C3: 75 μL 20 mU mL^{-1} HRP Inkubationszeit 1 h	Vertiefung C6: 75 μL 20 mU mL^{-1} HRP Inkubationszeit 1 h	Vertiefung C9: 75 μL 2 mU mL^{-1} HRP Zugabe kurz vor Messbeginn
Vertiefung F3 (mit BSA geblockt): 75 μL 20 mU mL^{-1} HRP Inkubationszeit 1 h	Vertiefung F6 (mit BSA geblockt): 75 μL 20 mU mL^{-1} HRP Inkubationszeit 1 h	Vertiefung F9: 75 μL Puffer C

Während also in den Vertiefungen C3 und C6 ein Teil des Proteins an der Oberfläche adsorbieren konnte, sollte sich das Protein in den Vertiefungen F3 und F6 aufgrund der geblockten Oberfläche vollständig in Lösung befinden. Auf diese Weise ließ sich auf mögliche Aktivitätsänderungen durch Adsorption des Proteins an der PAA-Bürste rückschließen. Nach Ende der ersten Teilmessserie wurden die Lösungen aus allen Vertiefungen entfernt und diese intensiv mit Puffer C ($\text{pH} = 7.4$) gespült. Daraufhin wurden folgende Flüssigkeiten in die verschiedenen Vertiefungen eingefüllt (**Tabelle 24**):

Tabelle 24. Pipettierschema für die erste Teilmessserie zum Vergleich der enzymatischen Aktivität von HRP in Lösung und an der PAA-Bürste unter Verwendung einer BSA-geblockten Oberfläche.

Vertiefung C3: 75 μL Puffer C	Vertiefung C6: 75 μL Puffer C	Vertiefung C9: 75 μL 2 mU mL^{-1} HRP
Vertiefung F3: 75 μL Puffer C	Vertiefung F6: 75 μL Puffer C	Vertiefung F9: 75 μL Puffer C

Es folgte die Zugabe der Reagenzlösung in alle Vertiefungen und die zweite Teilmessserie wurde gestartet. Deren Sinn lag einerseits darin, zu überprüfen, ob die Oberfläche in den Vertiefungen F3 und F6 tatsächlich vollständig geblockt wurde, andererseits konnten Informationen über die nach dem Wegspülen des Überstands verbliebene Aktivität an der PAA-Bürste in den nicht geblockten Vertiefungen C3 und C6 erhalten werden. Im Unterschied zu der beschriebenen Originalmessung wurde bei den Reproduktionsmessungen darauf verzichtet, intensiv mit Puffer C ($\text{pH} = 7.4$) zu spülen. Dies bedeutet, dass nach möglichst gründlichem Entfernen des Überstands sofort nach **Tabelle 24** einpipettiert wurde.

3.6 Vergleichende Messungen mit Proteinen in Lösung

Zu einigen der oben beschriebenen Messungen, die hauptsächlich an der Grenzfläche durchgeführt wurden, waren zur Erhöhung der Aussagekraft ergänzende Messungen mit vergleichbaren Systemen in Lösung erforderlich. Die durchgeführten Experimente waren dabei entweder Fluoreszenzmessungen in einer Quarzglasküvette (Abschnitt 3.6.1) oder IR-Transmissionsmessungen (Kapitel 3.6.2, Seite 79 f.).

3.6.1 Untersuchung des Verhaltens gelöster Proteine durch Fluoreszenzmessungen in einer Quarzglasküvette

Ergänzend zu den in Kapitel 3.3.1 (Seite 57 ff.) beschriebenen Messungen mit Lysozym und BSA in Gegenwart von hochkonzentriertem Harnstoff an der PAA-Bürste bei neutralem bzw. physiologischem pH-Wert wurde entsprechend auch in Lösung das Verhalten des Proteins in Gegenwart des hochkonzentrierten Harnstoffs untersucht.

Eine ausreichende Menge der jeweiligen Probenlösung (im Allgemeinen ca. 3.5 mL) wurde zur spektroskopischen Untersuchung in eine Küvette aus Quarzglas (101 QS von Hellma) gegeben. Diese Küvette wurde zusammen mit einer Referenzküvette (Wasser) in die dafür vorgesehene Halterung des Fluoreszenzspektrometers K2 der Firma ISS eingesetzt. Die Referenzküvette diente zur Bestimmung der Temperatur über ein externes Temperaturmessgerät (Qtemp 500 von VWR), die Temperierung erfolgte über einen Wasserkreislauf, der durch einen an die Küvettenhalterung angeschlossenen Thermostaten aufrecht erhalten wurde (Polystat CC2 von Huber oder RCS 6 von Lauda). Ähnlich wie bei den vergleichbaren TIRF-Experimenten wurden bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ die Tryptophanseitenketten der Proteine angeregt und deren Emissionsspektren in einem Bereich von $\lambda = 305 \text{ nm}$ bis $\lambda = 450 \text{ nm}$ aufgenommen. Mit dem Anregungs- und Emissionslicht wurde auf gleiche Weise verfahren wie in Kapitel 3.3 (Seite 57) beschrieben und auch der Datenpunktabstand und die Anzahl der gemittelten Messergebnisse pro Datenpunkt waren gleich, so dass auch bei den Messungen in Lösung die Aufnahme eines Spektrums ca. vier Minuten dauerte. Für Lysozym wurden die in **Tabelle 25** (Seite 78) spezifizierten Lösungen untersucht. Die dritte Lösung wurde erhalten, indem nach der Messung mit der zweiten Lösung diese im Verhältnis 1:9 mit Puffer A (pH = 7) verdünnt wurde.

Tabelle 25. Im Zusammenhang mit den Harnstoffuntersuchungen fluoreszenzspektroskopisch untersuchte Lösungen mit Lysozym.

Lösungsnummer	Bedingungen
1	Lysozym (0.2 mg mL^{-1}) in Puffer A bei $\vartheta = 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und $\vartheta = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7$
2	Lysozym (0.2 mg mL^{-1}) in Puffer A mit 9.5 M Harnstoff bei $\vartheta = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} \approx 7.5$
3	Lysozym (0.02 mg mL^{-1}) in Puffer A mit 0.95 M Harnstoff bei $\vartheta = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7$ (Verdünnung von Lösung 2)

Zur Kontrolle wurde vor Beginn der eigentlichen Messungen auch noch eine Hintergrundmessung mit Puffer durchgeführt. Aufgrund der sehr starken Signalintensität durch das Protein wurde bei Lysozym allerdings auf eine Hintergrundkorrektur (d.h. Abziehen eines entsprechenden Hintergrundspektrums) verzichtet. Die Reproduktion der Messungen mit der zweiten und dritten Lösung erfolgte bei halber Proteinkonzentration (0.1 mg mL^{-1} bzw. 0.01 mg mL^{-1}).

Für Rinderserumalbumin wurden analoge Experimente durchgeführt, allerdings wurden ähnlich wie bei den vergleichbaren Versuchen an der PAA-Bürste höhere Proteinkonzentrationen verwendet; in diesem Fall, weil BSA über eine geringere Anzahl an Tryptophanresten verfügt als Lysozym. Außerdem konnte bei Verdünnung der Lösung die Harnstoffkonzentration weiter absenkt werden (vgl. **Tabelle 26**).

Tabelle 26. Im Zusammenhang mit den Harnstoffuntersuchungen fluoreszenzspektroskopisch untersuchte Lösungen mit Rinderserumalbumin.

Lösungsnummer	Bedingungen
1	BSA (0.2 mg mL^{-1}) in Puffer A bei $\vartheta = 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7$
2	BSA (1.0 mg mL^{-1}) in Puffer A mit 8.0 M Harnstoff bei $\vartheta = 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} \approx 7.5$
3	BSA (ca. 0.01 mg mL^{-1}) in Puffer A mit ca. 0.08 M Harnstoff bei $\vartheta = 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7$ (Verdünnung von Lösung 2)

Anders als bei Lysozym wurden Hintergrundspektren des Messpuffers (Puffer A, $\text{pH} = 7$) und von 8.0 M Harnstofflösung in Puffer A sowohl aufgenommen als auch von den jeweils zugehörigen Spektren abgezogen. Lösung 3 (**Tabelle 26**) wurde durch 1:100 Verdünnung von Lösung 2 mit Puffer A erhalten.

Weiterhin wurde ergänzend zu den in Kapitel 3.5.2 (Seite 72 ff.) beschriebenen Enzymkinetikexperimenten die Aktivität von Meerrettichperoxidase in Lösung in Abhängigkeit von der Salzkonzentration noch einmal in größerem Maßstab in einer Quarzglasküvette untersucht. Hierzu wurden $1000 \text{ } \mu\text{L}$ einer 2 mU mL^{-1} Lösung von Meerrettichperoxidase in

Puffer C (pH = 7.4) mit 1000 μL der Reagenzlösung (100 μM Amplex Red-Lösung mit 2.0 mM H_2O_2 , vgl. Abschnitt 3.5, Seite 70) zusammenpipettiert und die Fluoreszenzintensität bei $\lambda = 590$ nm in Abhängigkeit von der Zeit festgestellt. Es wurde bei $\lambda_{\text{exc}} = 530$ nm angeregt, der Abstand zwischen zwei Messpunkten betrug fünf Sekunden. Nach 300 s, 700 s und 1000 s wurde die Küvette aus dem Spektrometer entfernt, um 78.0 μL , 84.2 μL bzw. 91.3 μL einer 4 M Kochsalzlösung in Puffer C hinzuzufügen. Dies führte nach ausgiebigem Schütteln zu Kochsalzkonzentrationen von 150 mM, 300 mM und schließlich bei der letzten Zugabe von 450 mM. Die zeitabhängige Messung wurde jeweils 100 Sekunden nach Entnahme der Küvette fortgesetzt. Die Küvettenhalterung wurde auf $\vartheta = 25$ °C temperiert. Die übrigen experimentellen Rahmenbedingungen (verwendete Geräte usw.) waren die gleichen wie oben bei den Ergänzungsexperimenten zu Kapitel 3.3.1 (Seite 57 ff.) beschrieben.

3.6.2 Untersuchung des Verhaltens gelöster Proteine mittels FTIR-Transmissionsspektroskopie

Für die Aufnahme von FTIR-Transmissionsspektren stand ein Nicolet 5700 FTIR-Spektrometer der Thermo Electron Corporation zur Verfügung, welches über einen mit Flüssigstickstoff zu kühlenden MCT-B-Detektor verfügte. Für die Probenpräparation wurde eine Abstandsscheibe aus Mylar (Dicke 0.05 mm) auf ein rundes Fenster (Durchmesser 25 mm, Dicke 4 mm) aus Calciumfluorid gebettet. In die Mitte des Fensters wurden nun ca. 15 μL der zu untersuchenden Lösung pipettiert. Hiernach wurde die Flüssigkeit durch ein weiteres Fenster eingeschlossen, wobei darauf geachtet wurde, dass zwischen den beiden Fenstern keine Luftblasen zurückblieben. Nachfolgend wurde die Probe zusammen mit den Fenstern in eine Stahlhalterung eingebaut, die mittels Wasserdurchfluss (Thermostat Julabo F32 (Steuerungskonsole Julabo HL) temperiert wurde. Die Temperatur wurde dabei über ein externes Thermoelement geregelt. Ein Spektrum wurde aus 256 Interferogrammen erhalten, die Auflösung betrug 2 cm^{-1} . Ein Adsorptionstrockner der Firma Zander stellte sicher, dass in Bereichen der Strahlführung nur geringe Mengen an Wasserdampf vorkamen. Die Auswertung der Spektren erfolgte wie in Kapitel 3.4 (Seite 62) beschrieben, wobei Hintergrundspektren verwendet wurden, die zuvor in separaten Messungen ohne Protein erhalten wurden. Repräsentative Spektren wurden einer Sekundärstrukturanalyse unterzogen, wie sie in Kapitel 3.4.5 (Seite 68) beschrieben wird. Folgende Lösungen wurden als

Ergänzung zu den in Kapitel 3.4.1 (Seite 62 f.) und Abschnitt 3.4.3 (Seite 66) beschriebenen Experimenten untersucht (**Tabelle 27**):

Tabelle 27. Durchgeführte FTIR-Transmissionsexperimente.

Protein	$c(\text{Protein})$	sonstige Parameter	Temperatur
BSA	10 mg mL^{-1}	in Puffer B, pH = 7	20 °C
α -Lactalbumin	10 mg mL^{-1}	in Puffer B, pH = 7	20 °C
Insulin	2 mg mL^{-1}	in DCl / D ₂ O, pH = 2	23.5 °C
Insulin	2 mg mL^{-1}	in 2 M Glycerin in DCl / D ₂ O, pH = 2	23.5 °C

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Struktur von Proteinen an planaren PAA-Bürsten unter pH-neutralen Bedingungen

Die Struktur von Proteinen an planaren Poly(acrylsäure)-Bürsten kann mit Hilfe der ATR-FTIR-Spektroskopie (vgl. Kapitel 2.2, Seite 20 ff.) untersucht werden. Grundlage ist die Analyse der Amid I'-Bande, welche hauptsächlich auf die Carbonylstreckschwingungen der Peptidbindungen zurückzuführen ist (vgl. **Tabelle 2**, Seite 24). Die Form dieser Bande hängt davon ab, wie die Carbonylgruppen im Vergleich zu benachbarten Chromophoren angeordnet sind. Die entsprechend in der Gestalt der Spektren vorhandene Information über die Sekundärstruktur des Proteins kann durch Bandenanalyse von flächennormierten Spektren quantifiziert werden. Hierzu müssen sämtliche Messungen in D₂O als Lösungsmittel durchgeführt werden, weil sich die Amid I-Bande und die H₂O-Deformationsschwingung überlappen.

In den folgenden Unterabschnitten sind die Ergebnisse für die Struktur der Proteine Rinderserumalbumin (vgl. Abschnitt 2.1.3, Seite 15 f.) und α -Lactalbumin (vgl. Passus 2.1.2, Seite 13 f.) an einer planaren Poly(acrylsäure)-Bürste bei neutralem pH-Wert im Vergleich mit den gelösten Proteinen dargestellt. Anschließend werden diese Ergebnisse den Resultaten für die Proteine Hühnerlysozym und Rinderinsulin gegenübergestellt.

4.1.1 Sekundärstrukturänderungen von Rinderserumalbumin an einer planaren PAA-Bürste im Vergleich zu gelöstem Protein bei neutralem pH-Wert

Der Untersuchung der Sekundärstruktur von Rinderserumalbumin (BSA) an einer planaren Poly(acrylsäure)-Bürste unter pH-neutralen Bedingungen liegen die in Kapitel 3.4.1 (Seite 62 f.) dargestellten experimentellen Details zugrunde. Allgemeine experimentelle Details zur ATR-FTIR-Spektroskopie sind in Passus 3.4 (Seite 61 f.) beschrieben. Die Vorgehensweise bei der Adsorption des Proteins kann anhand der in **Abbildung 27** (Seite 82) dargestellten Kinetik nachvollzogen werden. Ausgehend von der neutralen D₂O-haltigen Pufferlösung (pH = 7) über dem mit einer PAA-Bürste beschichteten Reflexionselement bei $\vartheta = 20$ °C (Messhintergrund) führt der Austausch der Flüssigkeit durch eine BSA-Lösung mit einer Konzentration von 0.2 mg mL⁻¹ zu einem deutlichen Anstieg der Fläche unter den im Bereich der Amid I'-Bande basislinienkorrigierten (1700 - 1600 cm⁻¹) IR-Spektren. Dies ist

auf eine Adsorption des Proteins an der PAA-Bürste zurückzuführen. Eine Verdreifachung der Proteinkonzentration in der Lösung auf 0.6 mg mL^{-1} 40 Minuten nach Beginn der Messserie hat eine deutliche Erhöhung der adsorbierten Proteinmenge zur Folge. Ein höheres Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist die erwünschte Konsequenz.

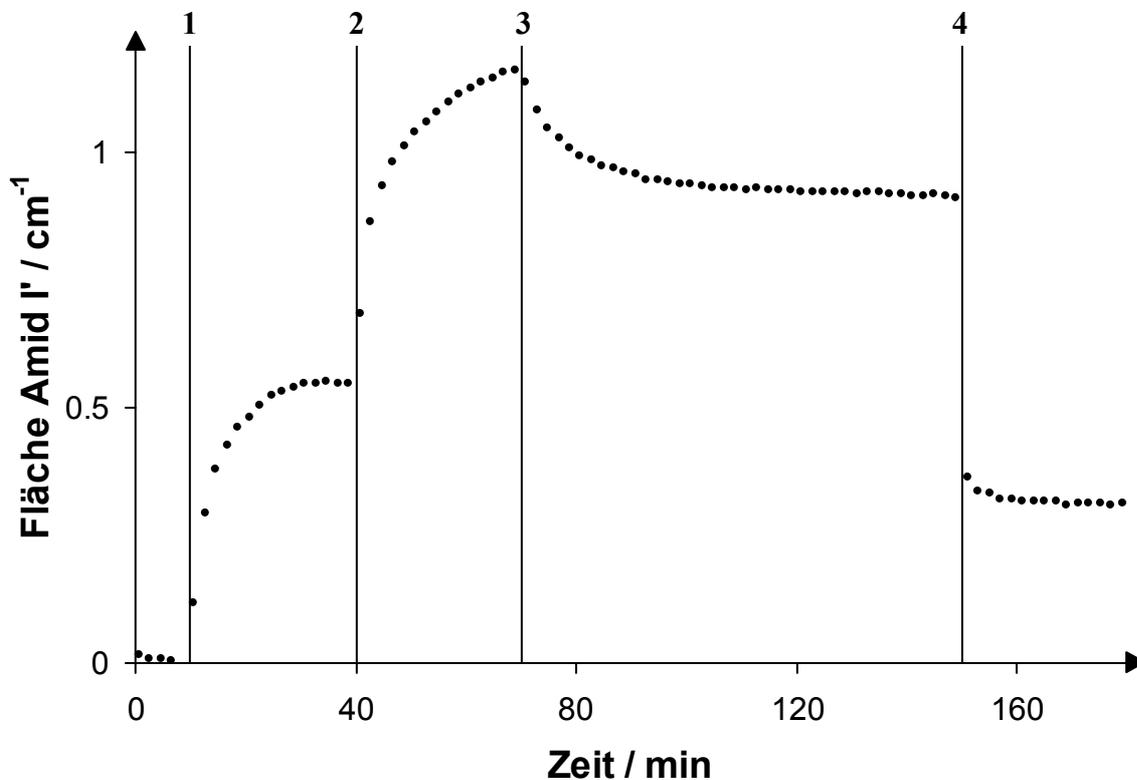


Abbildung 27. Adsorptionskinetik (Zeitabhängigkeit der Fläche unter der Amid I'-Bande) von BSA an einer planaren PAA-Bürste bei $\text{pH} = 7$ und $\vartheta = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ (Austausch (vertikale Linien) der Lösung über der PAA-Bürste (zu Beginn Puffer B) durch **1**: 0.2 mg mL^{-1} BSA in Puffer B, **2**: 0.6 mg mL^{-1} BSA in Puffer B, **3**: Puffer B, **4**: 500 mM NaCl in Puffer B).

Allerdings kann für in Gegenwart einer relativ konzentrierten Proteinlösung erhaltene Spektren ein Beitrag gelöster Proteine zu den erhaltenen Spektren nicht völlig ausgeschlossen werden¹⁰. Für eine Analyse der Sekundärstruktur der Proteine im Adsorbat ist aus diesem Grunde die Verwendung von Spektren sinnvoll, welche in Abwesenheit des Proteins in Lösung erhalten wurden. Die durch den hierfür notwendigen Austausch der Proteinlösung durch Puffer B nach 70 Minuten induzierte partielle Desorption des Proteins ist von geringem Ausmaß, so dass für die Analyse der Sekundärstruktur von BSA immer noch rauscharme Spektren zur Verfügung stehen. Durch Einbringen von Kochsalz in das System wird die

¹⁰ Die Messergebnisse in **Abbildung 27** (Seite 82) deuten allerdings auch auf keinen signifikanten Beitrag gelöster Proteine bei der verwendeten Proteinkonzentration hin, weil in diesem Fall ein eher sprunghafter Abfall der integrierten Extinktion nach 70 Minuten zu erwarten wäre. Die angesprochene Vorgehensweise dient daher lediglich der Absicherung.

ordnungsgemäße Funktionsweise der PAA-Bürste verifiziert. Erwartungsgemäß kommt es (z. B. nach [20]) zu einer deutlichen Verringerung der adsorbierten Proteinmenge 150 Minuten nach Serienbeginn (vgl. auch Abschnitt 1, Seite 4 f.).

Zusammen mit den Spektren adsorbierter Proteine sind in **Abbildung 28** Ergebnisse von IR-Transmissionsmessungen (vgl. Kapitel 3.6.2, Seite 79 f.) mit BSA bei einer Konzentration von 10 mg mL^{-1} in Lösung unter ansonsten gleichen Bedingungen ($\text{pH} = 7$, Puffer B, $\vartheta = 20 \text{ }^\circ\text{C}$) dargestellt. Dabei handelt es sich um im Bereich der Amid I'-Bande zusätzlich flächennormierte Spektren, so dass ein Vergleich der Form einen aussagekräftigen Eindruck vermittelt.

Schon die qualitative Betrachtung der Spektren erweckt den Eindruck, dass es keine ausgeprägten Unterschiede in der Sekundärstruktur zwischen an der PAA-Bürste adsorbiertem Rinderserumalbumin und dem gelösten Protein gibt, weil sich die zugehörigen Amid I'-Banden kaum unterscheiden.

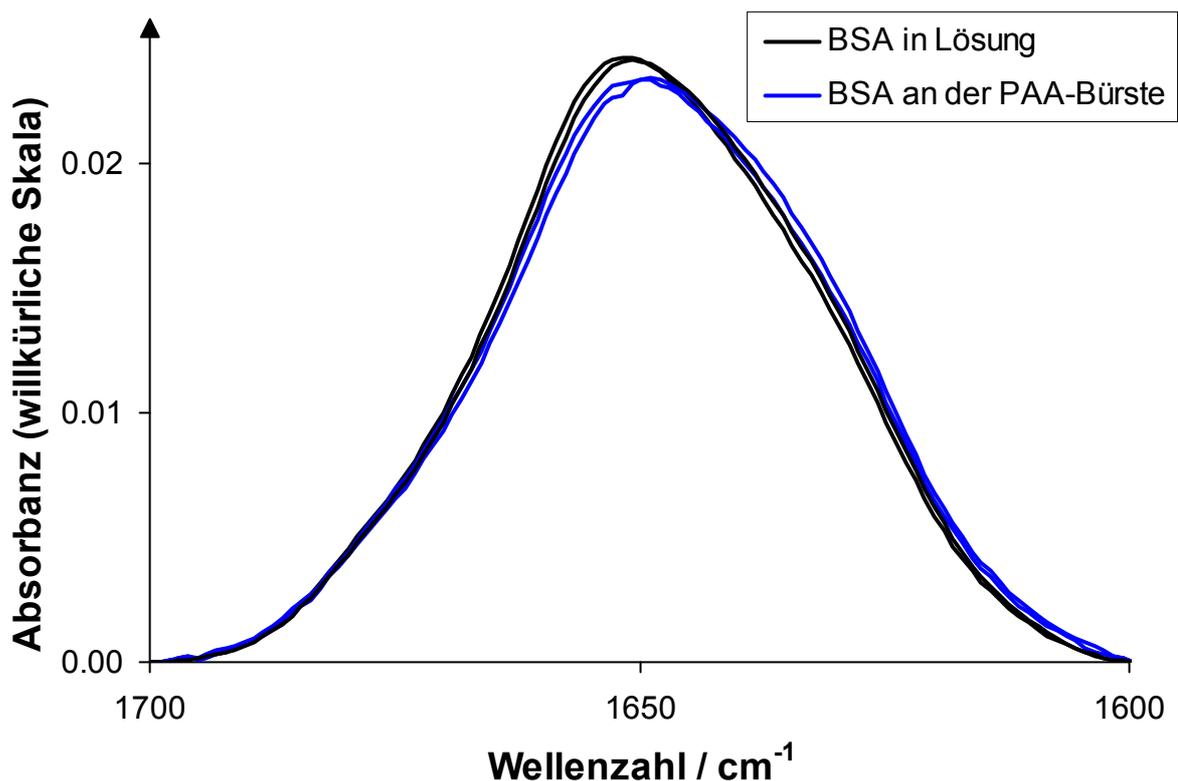


Abbildung 28. Im Bereich von $1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ flächennormierte FTIR-Spektren von BSA bei $\text{pH} = 7$ (in D_2O) und $\vartheta = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ in Lösung (schwarz) und an einer planaren PAA-Bürste (blau) mit reproduzierten Messergebnissen (doppelte Linien).

Mit Hilfe der Bandenanpassung kann der Einfluss einer PAA-Bürste auf die Struktur des Proteins quantifiziert werden. Die Anpassung von fünf Gauss-Lorentz-Subbanden (vgl. Kapitel 2.2.6 und 3.4.5, Seiten 28 f. bzw. 68), deren Positionen mit Hilfe der FSD und

zweiten Ableitungsspektren im Vorfeld ermittelt wurden (s. Abschnitte 2.2.5 sowie 3.4.5, Seiten 26 ff. bzw. 68), an ein an der PAA-Bürste erhaltenes flächennormiertes BSA-IR-Spektrum ist in **Abbildung 29** (Seite 85) exemplarisch grafisch veranschaulicht. Nach Abschluss des Anpassungsvorgangs (**Abbildung 29** unten, Seite 85) sollte der Anteil der Fläche der Bande 1 an der Gesamtfläche unter dem Spektrum ein Maß für den Anteil von Schleifenstrukturen an der gesamten Sekundärstruktur des Rinderserumalbumins darstellen, der Flächenanteil der Bande 2 sollte entsprechend **Tabelle 3** (Seite 25) den Anteil von α -Helices repräsentieren und so weiter. Auf diese Weise können zwar keine genauen Rückschlüsse auf die absolute Zusammensetzung der Sekundärstruktur des untersuchten Proteins gezogen werden, weil sich die Extinktionskoeffizienten (bzw. Übergangsdipolmomente) der Amidchromophore in verschiedenen Sekundärstrukturelementen unterscheiden [109] und auch Seitenketten Beiträge zur Intensität in diesem Bereich liefern können [110]; jedoch können Änderungen in der Sekundärstruktur aussagekräftig quantifiziert werden.

Die Ergebnisse für die Sekundärstrukturanteile für BSA in Lösung und an der PAA-Bürste bei $\text{pH} = 7$ und $\vartheta = 20\text{ }^\circ\text{C}$ sind in **Tabelle 28** wiedergegeben. Die angegebene Spanne kommt dabei durch den Unterschied zwischen Original- und Reproduktionsmessung zustande und ist somit ein geeigneter Fehlerindikator.

Tabelle 28. Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse durch Bandenanpassung für Infrarot-Spektren von gelöstem und an einer PAA-Bürste adsorbiertem Rinderserumalbumin bei $\text{pH} = 7$ (in D_2O) und $\vartheta = 20\text{ }^\circ\text{C}$.

Banden-Nr.	1	2	3	4	5
$\tilde{\nu}_0 / \text{cm}^{-1}$	1677 ± 2	1654 ± 2	1640 ± 2	1629 ± 2	1610 ± 2
Zuordnung	Schleifen	α -Helix	ungeordnet	β -Faltblatt	Basislinie
Flächen% BSA (in Lösung)	6 - 8	61 - 65	3 - 7	24 - 25	1
Flächen% BSA (adsorbiert)	6 - 8	63 - 64	5 - 8	20 - 23	2

Aus den tabellierten Werten geht ein leichter Rückgang des Anteils an β -Faltblattstrukturen aufgrund der Adsorption an der PAA-Bürste hervor; eine gravierende Abweichung von der in Lösung vorzufindenden Sekundärstruktur kann für an einer PAA-Bürste adsorbiertes Rinderserumalbumin allerdings klar ausgeschlossen werden. Dies bestätigt den anhand von **Abbildung 28** (Seite 83) zu gewinnenden qualitativen Eindruck.

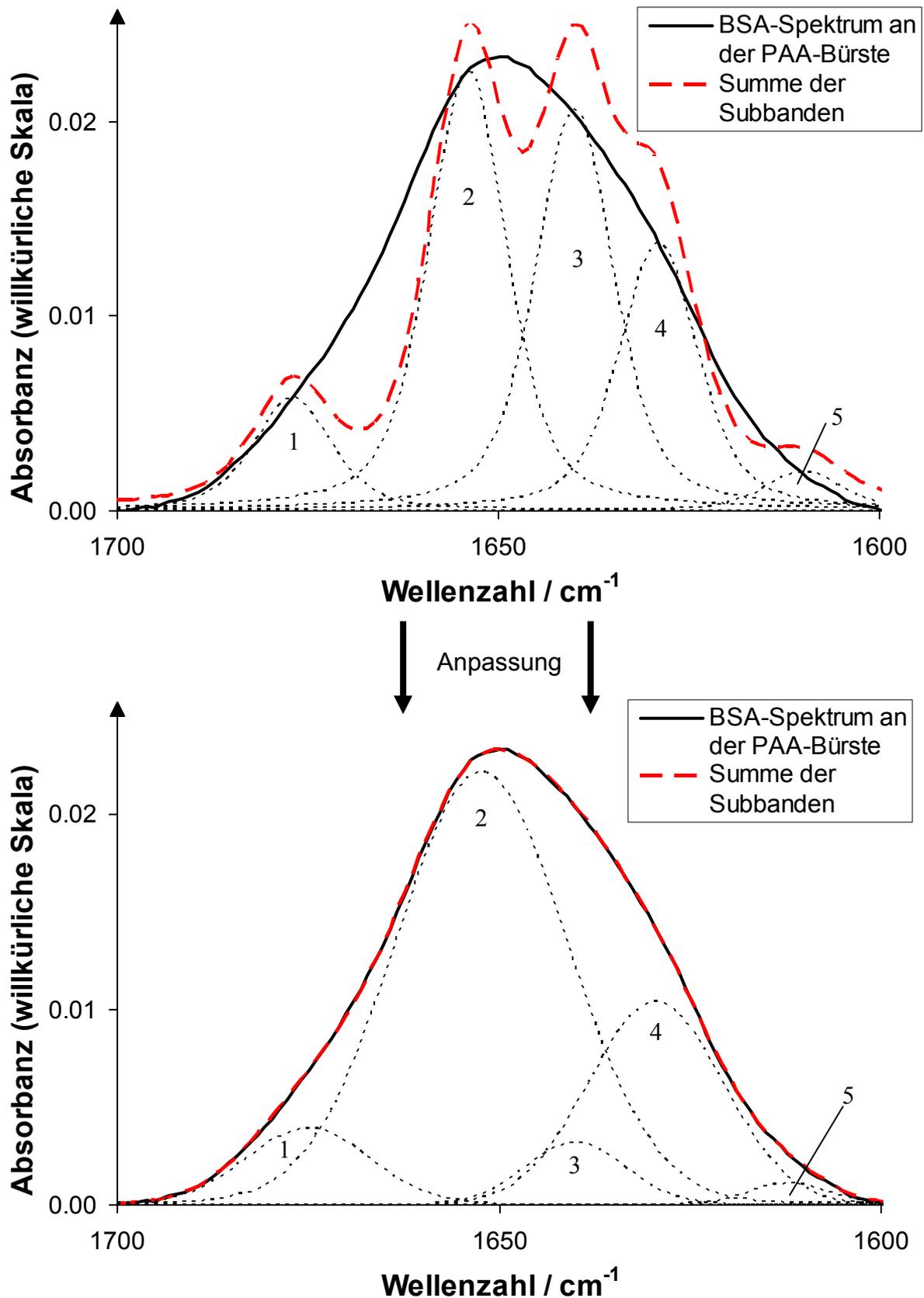


Abbildung 29. Veranschaulichung der Bandenanpassung anhand eines flächennormierten BSA-FTIR-Spektrums an der PAA-Bürste (pH = 7, $\vartheta = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Ergebnis des Anpassungsvorgangs (unten) ausgehend von einer Startkonfiguration (oben) mit fünf (1-5) Subbanden (vgl. **Tabelle 28**, Seite 84).

4.1.2 Sekundärstrukturänderungen von α -Lactalbumin an einer planaren PAA-Bürste im Vergleich zu gelöstem Protein unter pH-neutralen Bedingungen

Die Experimente zum Vergleich der Sekundärstruktur von gelöstem und an einer planaren PAA-Bürste adsorbiertem α -Lactalbumin sind von ihrer Durchführung her ähnlich wie bei Rinderserumalbumin (vgl. Kapitel 4.1.1, Seite 81 ff. bzw. Abschnitt 3.4.1, Seite 62 f., allgemeine Vorschrift in Passus 3.4, Seite 61 f.). Die Adsorptionskinetik ist in **Abbildung 30** dargestellt. Der Austausch der Pufferlösung über der Bürste gegen eine α -Lactalbuminlösung mit einer Konzentration von 0.2 mg mL^{-1} führt allerdings nur zu einem geringfügigen Anstieg der Fläche unter der Amid I'-Bande der erhaltenen Spektren (Basislinienkorrektur wie bei BSA von 1700 cm^{-1} bis 1600 cm^{-1}). Offenbar adsorbiert also nur sehr wenig α -Lactalbuminlösung bei $\text{pH} = 7$ und $\vartheta = 20 \text{ }^\circ\text{C}$. Eine drastische Erhöhung der Konzentration von α -Lactalbumin auf 2.0 mg mL^{-1} resultiert zwar in einer zusätzlichen Adsorption von Protein, allerdings sind die erhaltenen Werte für die integrierte Extinktion immer noch deutlich niedriger als beim Rinderserumalbumin.

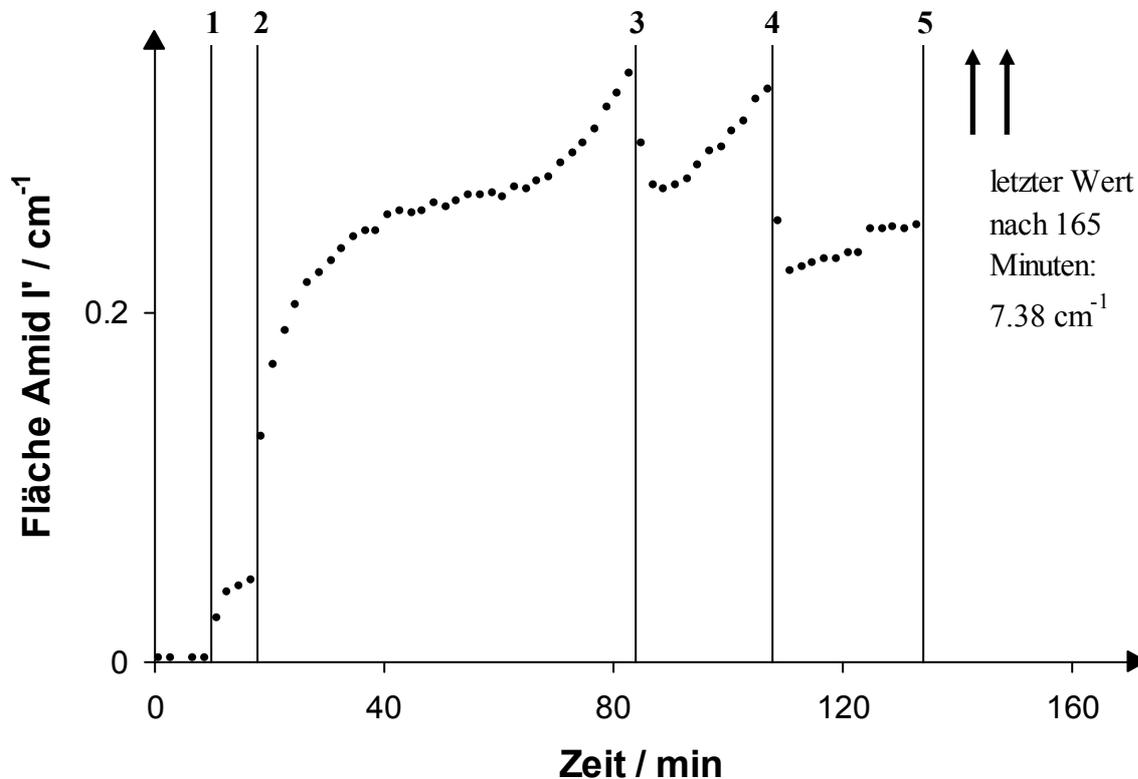


Abbildung 30. Adsorptionskinetik (Zeitabhängigkeit der Fläche unter der Amid I'-Bande) von α -Lactalbumin an einer planaren PAA-Bürste bei $\text{pH} = 7$ und $\vartheta = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ (Austausch (vertikale Linien) der Lösung (zu Beginn Puffer B) über der PAA-Bürste durch 1: 0.2 mg mL^{-1} α -Lactalbumin in Puffer B, 2: 2.0 mg mL^{-1} α -Lactalbumin in Puffer B, 3: Puffer B, 4: 0.5 M NaCl in Puffer B, 5: 0.2 mg mL^{-1} Hühnerlysozym in Puffer B).

Die Messkurve macht z. B. anhand des Anstiegs des Messsignals kurz vor Austausch der Lösungen (1, 4 in **Abbildung 30**, Seite 86)) deutlich, dass aufgrund der geringen Intensität auch Verschiebungen im Messuntergrund zum Signal beitragen. Zwar ist deren Ausmaß bei den Reproduktionsmessungen nicht ganz so stark ausgeprägt, allerdings ist der Einfluss nicht zu vernachlässigen. Da auch die salzinduzierte Desorption des Proteins wesentlich weniger ausgeprägt ist (bei den Reproduktionsmessungen der in **Abbildung 30** (Seite 86) dargestellten Kinetik fällt der Effekt z. T. noch schwächer aus), eignet sich der Austausch der Lösung über der Bürste durch 500 mM NaCl-Lösung in Puffer B im Falle der Messungen mit α -Lactalbumin nur eingeschränkt zur Verifikation des ordnungsgemäßen Zustands der PAA-Bürste. Daher wird dieser durch Austausch mit einer 0.2 mg mL^{-1} Lysozymlösung in Puffer B überprüft. Es werden übliche Werte für die integrierte Extinktion (am Ende ungefähr 7 cm^{-1}) von Lysozym an einer planaren PAA-Bürste bei $\vartheta = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ erhalten und die Spektren haben eine ähnliche Form wie bei anderen Messungen mit Lysozym.

In **Abbildung 31** sind flächennormierte Spektren von gelöstem α -Lactalbumin bei einer Konzentration von 10 mg mL^{-1} aus Transmissionsmessungen und von an der PAA-Bürste adsorbiertem Protein aus ATR-FTIR-Spektroskopie-Experimenten gezeigt.

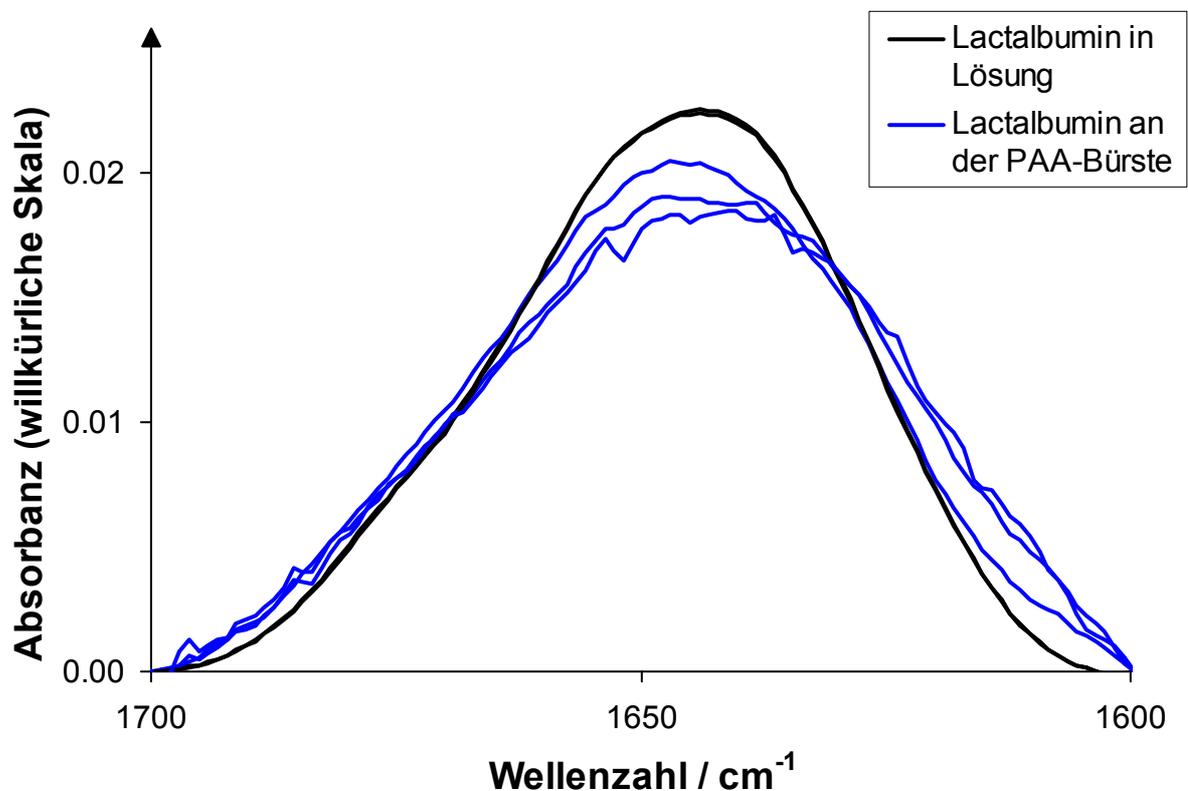


Abbildung 31. Im Bereich von $1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ flächennormierte FTIR-Spektren von α -Lactalbumin bei $\text{pH} = 7$ (in D_2O) und $\vartheta = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ in Lösung (schwarz) und an einer planaren PAA-Bürste (blau) mit reproduzierten Messergebnissen (doppelte bzw. dreifache Linien).

Diese Spektren an der Grenzfläche stammen in jedem Fall aus dem Abschnitt der Adsorptionskinetik vor der Salzzugabe, in dem kein Protein in Lösung vorhanden ist.

Bei α -Lactalbumin lassen sich anhand von **Abbildung 31** (Seite 87) ausgeprägtere Unterschiede zwischen gelöstem und adsorbiertem Protein ausmachen. Das spiegeln auch die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse in **Tabelle 29** wider:

Tabelle 29. Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse durch Bandenanpassung für Infrarot-Spektren von gelöstem und an einer PAA-Bürste adsorbiertem α -Lactalbumin bei pH = 7 (in D₂O) und $\vartheta = 20$ °C.

Banden-Nr.	1.1	1.2	2	3	4	5
$\tilde{\nu}_0 / \text{cm}^{-1}$	1676 \pm 2	1666 \pm 2	1653 \pm 2	1639 \pm 2	1628 \pm 2	1610 \pm 2
Zuordnung	Schleifen		α -Helix	ungeordn.	Faltblatt	Basislinie
Flächen% α -Lactalbumin (in Lösung)	12	9	28 - 29	27	23 - 24	0
Flächen% α -Lactalbumin (adsorbiert)	15 - 16	6 - 8	24 - 28	21 - 24	24 - 29	2 - 3

Im Zuge der Adsorption von α -Lactalbumin an einer planaren PAA-Bürste ist eine Zunahme des Anteils von β -Faltblattstrukturen auf Kosten des Anteils ungeordneter Strukturen festzustellen. Eine mögliche Erklärung wäre eine Proteinaggregation geringen Ausmaßes in der Bürste. Diese ist jedoch schwierig mit dem niedrigen Adsorptionsgrad in Einklang zu bringen. Die festgestellten Unterschiede können zumindest in Teilen auf das niedrige Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufgrund des geringen Adsorptionsgrades des α -Lactalbumins zurückgeführt werden, weil systematische Veränderungen des Messuntergrunds an der PAA-Bürste unter diesen Voraussetzungen ins Gewicht fallen. Grundsätzlich ist α -Lactalbumin bei ähnlichem isoelektrischen Punkt einer Entfaltung gegenüber sogar stabiler als Rinderserumalbumin (vgl. **Tabelle 1**, Seite 12 [70, 74]), bei dem im Wesentlichen keine Änderungen in der Sekundärstruktur festzustellen sind.

Möglicherweise können auch die von den α -Lactalbumin-Molekülen gebundenen Calciumionen von den PAA-Ketten komplexiert werden. Dies würde zu einer deutlich reduzierten strukturellen Stabilität des Proteins führen (vgl. Passus 2.1.2, Seite 14 bzw. [68]) und wäre somit eine Erklärung für strukturelle Änderungen. Eine nicht überprüfte Voraussetzung hierfür ist jedoch eine ausreichend starke Komplexierung der Calciumionen; außerdem müssen diese für die PAA-Ketten auch zugänglich sein.

Drastische Änderungen in der Sekundärstruktur von an der PAA-Bürste adsorbiertem α -Lactalbumin können anhand dieser Ergebnisse in jedem Fall ausgeschlossen werden.

4.1.3 Sekundärstrukturänderungen von Hühnerlysozym und Rinderinsulin durch Proteinadsorption an einer PAA-Bürste bei neutralem pH-Wert im Vergleich mit für Rinderserumalbumin und α -Lactalbumin erhaltenen Ergebnissen

In **Tabelle 30** (Seite 90) sind die Resultate der Sekundärstrukturanalyse von an einer PAA-Bürste adsorbiertem und gelöstem Protein bei $\text{pH} = 7$ und $\vartheta = 20\text{ }^\circ\text{C}$ für Rinderserumalbumin (Abschnitt 4.1.1, Seite 81 ff.) und α -Lactalbumin (Kapitel 4.1.2, Seite 86 ff.) zusammen mit im Rahmen der Diplomarbeit des Autors entstandenen Ergebnissen für die Proteine Hühnerlysozym und Rinderinsulin aufgeführt [138]. Durch den Vergleich der Resultate für mehrere Modellproteine mit unterschiedlicher Nettoladung, Größe und thermodynamischer Stabilität sollen die in den vorangegangenen Kapiteln dargestellten Ergebnisse in einen repräsentativeren Zusammenhang gerückt werden.

Der Vergleich zwischen den hinsichtlich ihrer Sekundärstruktur (vgl. Abschnitte 2.1.1 und 2.1.2, Seite 12 f. bzw. Seite 13 f.) sehr ähnlichen Proteinen Hühnerlysozym und α -Lactalbumin bekräftigt zwar noch einmal die eingeschränkte Aussagekraft der aus der Sekundärstrukturanalyse von IR-Spektren erhaltenen absoluten Werte; die hieraus zu ziehenden Rückschlüsse über Änderungen der Sekundärstruktur bleiben hiervon jedoch unberührt. Ähnlich wie bei Rinderserumalbumin unterscheidet sich die Sekundärstruktur von an einer planaren PAA-Bürste adsorbiertem Rinderinsulin und Hühnerlysozym nur geringfügig von der Struktur des gelösten Proteins. Moderate Abweichungen beim α -Lactalbumin sind wahrscheinlich einer systematischen Verfälschung des Messuntergrunds oder einem Spezialeffekt durch die Komplexierung von stabilisierenden Ionen geschuldet (vgl. Kapitel 4.1.2, Seite 88); sie widersprechen daher nicht der in Bezug auf die anderen Proteine festzustellenden Tendenz einer weitestgehenden Bewahrung der nativen Proteinstruktur bei Adsorption eines Proteins an einer planaren PAA-Bürste.

Damit erfüllt eine planare PAA-Bürste eine wichtige Grundvoraussetzung für die Wahrung der biologischen Funktion von Proteinen. Die in **Tabelle 30** (Seite 90) zusammengefassten Ergebnisse deuten auf eine mögliche Einsetzbarkeit einer planaren Poly(acrylsäure)-Bürste als biokompatible Oberflächenmodifikation mit besonderen Eigenschaften hin (vgl. Abschnitt 1, Seite 4 ff.).

Tabelle 30. Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse durch Bandenanpassung für Infrarot-Spektren von gelöstem und an einer PAA-Bürste adsorbiertem Hühnerlysozym und Rinderinsulin im Vergleich zu Rinderserumalbumin und α -Lactalbumin bei pH = 7 (in D₂O) und $\vartheta = 20$ °C.

Banden-Nr.	1.1	1.2	2	3	4	5
Zuordnung	Schleifen		α -Helix	ungeordn.	Faltblatt	Basislinie
$\tilde{\nu}_0 / \text{cm}^{-1}$ Lysozym	1684 \pm 2	1671 \pm 2	1654 \pm 2	1638 \pm 2	1629 \pm 2	1607 \pm 2
Flächen% Lysozym (in Lösung)	2 - 4	11 - 13	43 - 47	25 - 27	12 - 16	1
Flächen% Lysozym (adsorbiert)	1	12	44 - 46	26 - 27	14 - 15	1
$\tilde{\nu}_0 / \text{cm}^{-1}$ Insulin	1681 \pm 2	1667 \pm 2	1653 \pm 2	1641 \pm 2	1629 \pm 2	1610 \pm 2
Flächen% Insulin (in Lösung)	8	15 - 16	29 - 30	24	23	0 - 1
Flächen% Insulin (adsorbiert)	8	15 - 16	27 - 29	23 - 25	21 - 23	2 - 4
$\tilde{\nu}_0 / \text{cm}^{-1}$ BSA	1677 \pm 2		1654 \pm 2	1640 \pm 2	1629 \pm 2	1610 \pm 2
Flächen% BSA (in Lösung)	6 - 8		61 - 65	3 - 7	24 - 25	1
Flächen% BSA (adsorbiert)	6 - 8		63 - 64	5 - 8	20 - 23	2
$\tilde{\nu}_0 / \text{cm}^{-1}$ α -Lactalbumin	1676 \pm 2	1666 \pm 2	1653 \pm 2	1639 \pm 2	1628 \pm 2	1610 \pm 2
Flächen% α -Lactalbumin (in Lösung)	12	9	28 - 29	27	23 - 24	0
Flächen% α -Lactalbumin (adsorbiert)	15 - 16	6 - 8	24 - 28	21 - 24	24 - 29	2 - 3

4.2 Enzymatische Aktivität von Meerrettichperoxidase an einer planaren PAA-Bürste

Dass die Sekundärstruktur von Proteinen an einer PAA-Bürste im Vergleich zu gelösten Proteinen unverändert bleibt (vgl. Kapitel 4.1, ab Seite 81), ist eine notwendige Voraussetzung zur Bewahrung ihrer natürlichen Funktion. Eine Möglichkeit, diese weitergehend zu überprüfen, ist die Quantifizierung der molekularen Aktivität eines Enzyms. Hierfür wird in den folgenden Unterabschnitten das kommerziell erhältliche System Meerrettichperoxidase / Wasserstoffperoxid / Amplex Red[®] verwendet. Ist aktive Meerrettichperoxidase vorhanden, wird farbloses Amplex Red[®] unter Verbrauch von Wasserstoffperoxid letztlich in einer 1:1-Stöchiometrie zu fluoreszierendem Resorufin oxidiert (vgl. **Abbildung 9**, Abschnitt 2.1.4, Seite 17). Entsprechend kann die Geschwindigkeit der Bildung dieses Produkts fluoreszenzspektroskopisch ermittelt werden. Durch geschickten Vergleich verschiedener Messabläufe kann auf diese Weise die enzymatische Aktivität der Meerrettichperoxidase an einer PAA-Bürste mit der Aktivität des Proteins in Lösung oder an anderen Oberflächen verglichen werden. Die allgemeine Vorgehensweise ist dabei in Kapitel 3.5 (Seite 69 ff.) beschrieben.

4.2.1 Vergleich der enzymatischen Aktivität von an einer planaren PAA-Bürste und an einer Siliziumoberfläche adsorbierter Meerrettichperoxidase bei pH = 7.4

Der Vergleich der enzymatischen Aktivität zwischen an einer PAA-Bürste und an einer Siliziumoberfläche adsorbiertem Protein wird durch die Verwendung eines Siliziumwafers oder eines als PAA-Bürste funktionalisierten Wafers als Boden im Mikrotiterplattenselbstbau (**Abbildung 26**, Seite 56) ermöglicht. Eine detaillierte Darstellung der Durchführung findet sich in Kapitel 3.5.1 (Seite 71 f.). Vor der ersten Messung mit der jeweiligen Oberfläche erfolgt eine Inkubation einer Lösung von Meerrettichperoxidase in Puffer C (pH = 7.4) mit einer Konzentration von 20 mU mL⁻¹ für ca. eine Stunde. Eine längere Inkubationsdauer sollte danach nicht mehr zu wesentlichen Veränderungen des Adsorptionsgrades führen. Die nachfolgende Zugabe der Reagenzlösung (100 µM Amplex Red-Lösung mit 2.0 mM H₂O₂ in Puffer C, pH = 7.4) führt zu einer Halbierung der Konzentration des in Lösung verbliebenen Proteins. Bei allen Messreihen werden in anderen Vertiefungen simultan Kontrollexperimente mit einer definierten Proteinkonzentration (2 mU mL⁻¹ verdünnt auf 1 mU mL⁻¹ durch Zugabe der Reagenzlösung, Positivkontrolle) und ohne Protein (Negativkontrolle) durchgeführt. Anhand der Positivkontrolle kann sichergestellt werden, dass die verwendeten Lösungen in

einem ordnungsgemäßen Zustand sind. In diesem Fall sollten die hier beobachteten Steigungen in der Fluoreszenzintensität in einem erwarteten Bereich liegen. Die Negativkontrolle ohne Protein (nur Puffer und Reagenzlösung) dient der Berücksichtigung der Hintergrundfluoreszenz. Für eine PAA-Bürste ist die zeitliche Entwicklung der Fluoreszenzintensität nach Zugabe der Reagenzlösung unter Berücksichtigung von Reproduktionsmessungen in **Abbildung 32** dargestellt.

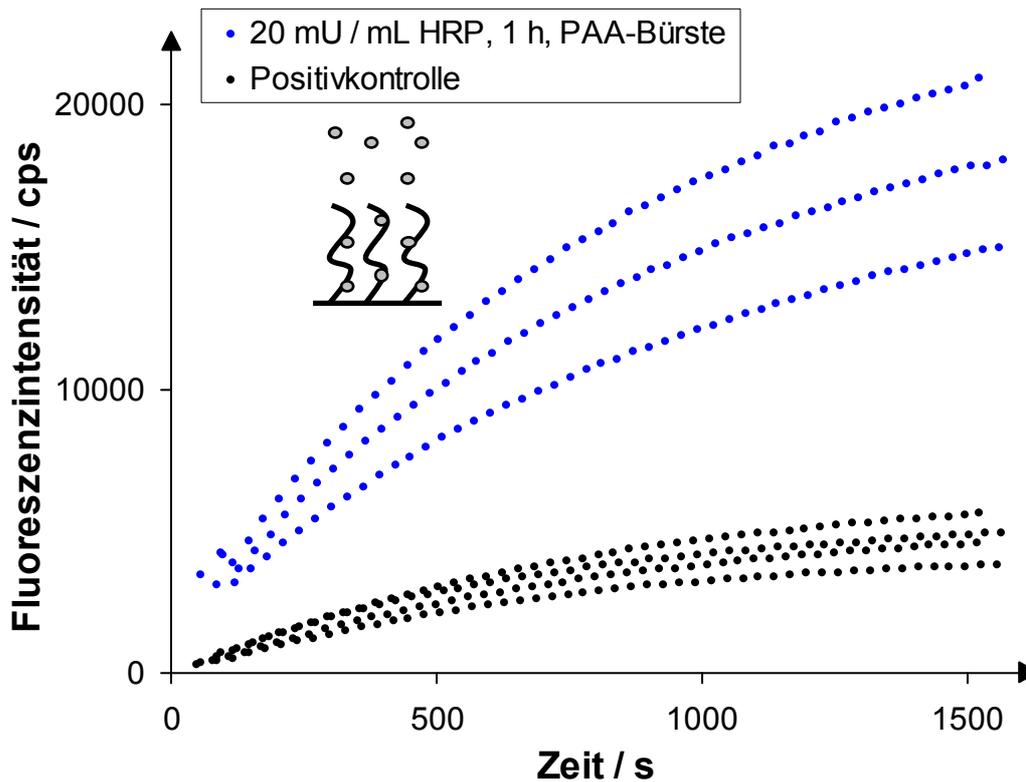


Abbildung 32. Zeitabhängigkeit der Fluoreszenzintensität von Resorufin bei $\text{pH} = 7.4$ und $\vartheta = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ nach einstündiger Inkubation von 20 mU mL^{-1} HRP über einer PAA-Bürste und anschließender Zugabe der Reagenzlösung (blau); Kontrollmessungen in schwarz (2 mU mL^{-1} HRP kurz vor Zugabe der Reagenzlösung eingefüllt).

Für sich betrachtet sind die in **Abbildung 32** dargestellten Ergebnisse nicht dazu geeignet, Aussagen über die Situation spezifisch an der PAA-Bürste zu treffen, weil das Protein sowohl an der PAA-Bürste als auch in Lösung vorliegt. Es ergeben sich dennoch wichtige Rückschlüsse. Zum einen können mit den präparierten PAA-Bürsten offensichtlich reproduzierbare Ergebnisse in Enzymkinetikkmessungen erhalten werden. Zum anderen sind Kavitäten, in die kurz vor der Zugabe der Reagenzlösung 2 mU mL^{-1} HRP eingebracht wurden, als Standard geeignet. Es fällt allerdings auf, dass bei einigen Messungen zu Beginn der Serie unerwartet hohe Messwerte festgestellt werden. Diese vermutlich instrumentell bedingten Ausreißer werden bei der Bestimmung der Anfangssteigung (vgl. Seite 94) nicht

berücksichtigt. Für die analoge Inkubation von 20 mU mL^{-1} HRP über einer Siliziumoberfläche werden ähnliche Resultate erhalten (vgl. **Abbildung 33**):

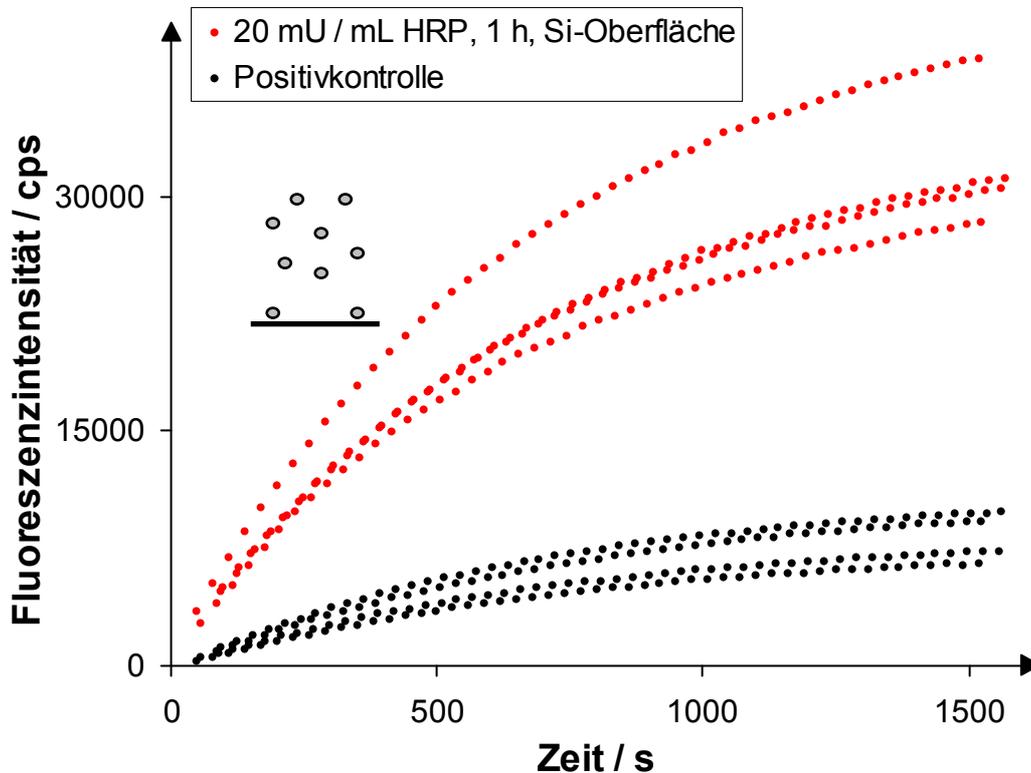


Abbildung 33. Zeitabhängigkeit der Fluoreszenzintensität bei $\text{pH} = 7.4$ und $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ nach einstündiger Inkubation von 20 mU mL^{-1} HRP über einer Siliziumoberfläche und anschließender Zugabe der Reagenzlösung (rot); Kontrollmessungen in schwarz (2 mU mL^{-1} HRP kurz vor Zugabe der Reagenzlösung eingefüllt).

Bei einem Vergleich der Ergebnisse für eine PAA-Bürste und eine Siliziumoberfläche fällt auf, dass im Falle der Siliziumoberfläche größere Anfangssteigungen und Endwerte der Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Dies lässt sich dadurch erklären, dass an der Siliziumoberfläche kaum Proteine adsorbieren. Demzufolge liegen fast alle Proteinmoleküle in Lösung vor. Dagegen kommt es an einer PAA-Bürste zur Adsorption eines signifikanten Teils der HRP-Moleküle, was anscheinend eine gewisse Verminderung der Aktivität der betroffenen Moleküle zur Folge hat. Insofern resultiert eine geringere Gesamtaktivität. Diese qualitative Einsicht wird für vergleichbare Proteinkonzentrationen durch die in Kapitel 4.2.3 präsentierten Messergebnisse bestätigt und quantifiziert werden. Folgeexperimente zu den oben dargestellten Messergebnissen (**Abbildung 34**, Seite 94, die Positivkontrolle ist in allen folgenden Abbildungen nicht dargestellt), bei denen vor einer erneuten Zugabe von Reagenzlösung jegliches verbliebenes gelöstes Protein durch exzessives Spülen mit Messpuffer entfernt wurde, zeigen jedoch deutlich, dass an einer PAA-Bürste adsorbierte

Meerrettichperoxidase eine signifikante enzymatische Aktivität besitzt. Im Falle der Siliziumoberfläche wird nach dem Wegspülen eine wesentlich geringe Aktivität festgestellt.

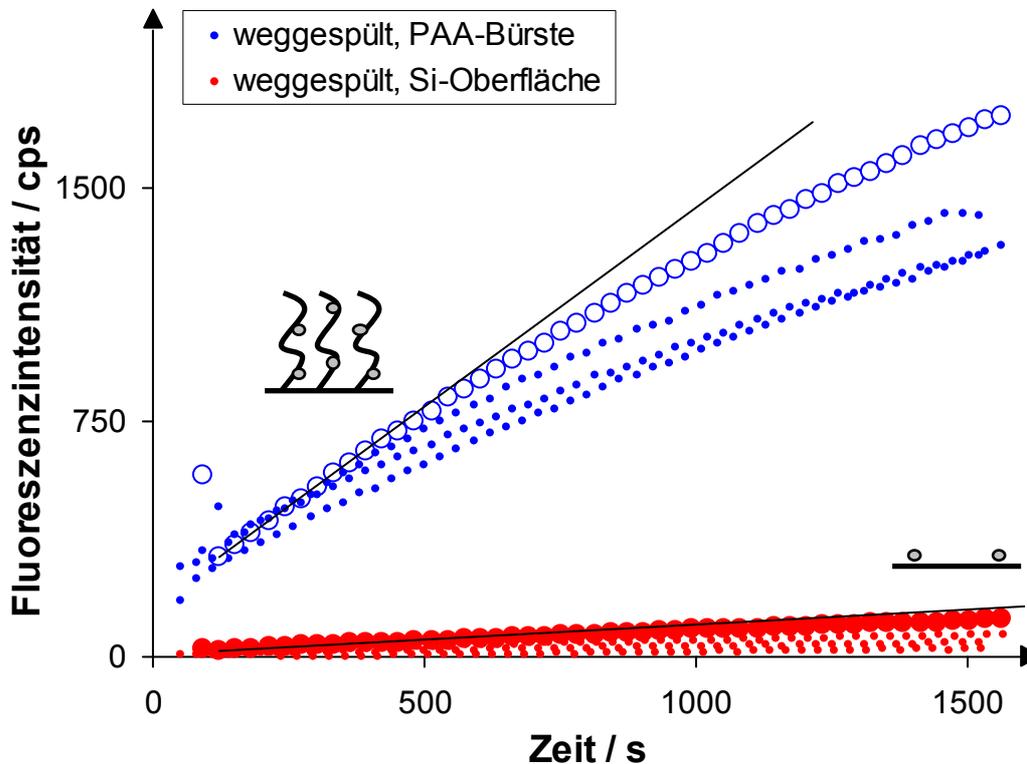


Abbildung 34. Zeitabhängigkeit der Fluoreszenzintensität von Resorufin bei $\text{pH} = 7.4$ und $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ nach einstündiger Inkubation von 20 mU mL^{-1} HRP über einer Siliziumoberfläche (rot) und einer PAA-Bürste (blau) und anschließendem Wegspülen der Proteinlösung vor Zugabe der Reagenzlösung. Verdeutlichung der Bestimmung der Anfangssteigung anhand herausgehobener Messreihen (schwarze Linien und offene große blaue Symbole an der PAA-Bürste oder ausgefüllte große rote Symbole an der Siliziumoberfläche).

Die Quantifizierung der enzymatischen Aktivität zum Vergleich zwischen an einer PAA-Bürste und einer Siliziumoberfläche adsorbiertem Protein erfolgt über die Bestimmung der zeitlichen Änderung des Fluoreszenzsignals zu Beginn der Messserie, weil hier hohe Substratkonzentrationen gewährleistet sind. Dies ist in **Abbildung 34** anhand der hervorgehobenen Messreihen grafisch verdeutlicht. Unter dieser Voraussetzung kann sinngemäß Gleichung (17) nach Kapitel 2.4.2 (Seite 39) zugrunde gelegt werden:

$$v_{R, \max} = k_2 \cdot c_{E, \text{ges}} \quad (17).$$

Die zu beobachtende Reaktionsgeschwindigkeit bei hohen Substratkonzentrationen hängt demnach sowohl von einer Größe ab, in welche die (molekulare) Aktivität der Proteine mit einfließt (k_2) als auch von einem Parameter, welcher die Menge des vorhandenen Proteins

widerspiegelt ($c_{E, ges}$). Die Werte für die Anfangssteigungen von an einer PAA-Bürste und einer Siliziumoberfläche bei pH = 7.4 adsorbierter Meerrettichperoxidase enthält **Tabelle 31**.

Tabelle 31. Vergleich der enzymatischen Aktivitäten von an einer PAA-Bürste und an einer Silizium-Oberfläche adsorbierter Meerrettichperoxidase anhand der Anfangssteigungen (in $cps s^{-1}$) der Fluoreszenzintensität bei $\vartheta = 25\text{ °C}$ und pH = 7.4 (Inkubation einer 20 mU mL^{-1} -Proteinlösung für eine Stunde, Wegspülen der Proteinlösung vor Zugabe der Reagenzlösung).

Grenzfläche	Originalmessung		Reproduktionsmessung	
	Vertiefung 1	Vertiefung 2	Vertiefung 1	Vertiefung 2
Silizium / Wasser	0.057	0.093	0.032	0.078
	Mittelwert: 0.07 ± 0.03			
PAA-Bürste / Wasser	0.94	1.27	1.27	0.86
	Mittelwert: 1.1 ± 0.2			

Die enzymatische Aktivität ist demnach unter vergleichbaren Bedingungen an einer Siliziumoberfläche um mehr als eine Größenordnung geringer als an einer PAA-Bürste.

Wie bei der Diskussion von Gleichung (17) (Seite 94) bereits angerissen wurde, kann der Unterschied zwischen den Grenzflächen auf zwei Ursachen zurückgeführt werden: Zum einen dürfte das einzelne HRP-Molekül an einer PAA-Bürste (deutlich) aktiver sein als ein einzelnes HRP-Molekül an einer Siliziumoberfläche. Offensichtlich wird sowohl die Struktur als auch die Dynamik adsorbierter Proteinmoleküle in einer PAA-Bürste durch deren fluid-ähnlichen Charakter zu einem ausreichenden Teil bewahrt.

Zum anderen sollte der Adsorptionsgrad an der PAA-Bürste wesentlich höher sein als an einer Siliziumoberfläche. Über die Anteile der beiden Einflüsse können anhand der bisher gezeigten Messergebnisse keine Aussagen getroffen werden. Eine Quantifizierung erfolgt für die Situation an der PAA-Bürste durch einen Vergleich mit gelöstem Protein in den nachfolgenden Teilabschnitten.

Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei den Messungen an der Siliziumoberfläche ein Teil des Messsignals auf an den Silikongummidichtungen adsorbiertes Protein zurückzuführen ist. Dagegen sollte dieser Anteil in Gegenwart einer PAA-Bürste vernachlässigt werden können.

4.2.2 Vergleich der enzymatischen Aktivität von HRP in Lösung und an der PAA-Bürste bei pH = 7.4 durch Proteindesorption mit 300 mM NaCl-Lösung

In den in diesem Abschnitt beschriebenen Experimenten wird die salzinduzierte Desorption von an einer PAA-Bürste adsorbierten Proteinen ausgenutzt (vgl. Abschnitt 1, Seite 4 f. bzw. [20]). Die allgemeine Vorgehensweise bei Enzymkinetikmessungen kann in detaillierter Form

Kapitel 3.5 (Seite 69 ff.) entnommen werden; die für diesen Passus speziellen Vorschriften finden sich in Abschnitt 3.5.2 (Seite 72 ff.). Bevor der Effekt von 300 mM Kochsalzlösung auf die Situation an der PAA-Bürste untersucht werden kann, ist es zunächst notwendig, dessen Einfluss auf die von HRP katalysierte Bildung von Resorufin aus Amplex Red® in Lösung zu kennen. Hierzu sind Messungen über der Siliziumoberfläche geeignet, weil an dieser Oberfläche kaum Protein adsorbiert (vgl. Kapitel 4.2.1, Seite 91 ff.). Bei niedrigen Proteinkonzentrationen in Lösung (2 mU mL^{-1}) kann der Salzeinfluss auf die Aktivität in Lösung aus **Abbildung 35** entnommen werden.

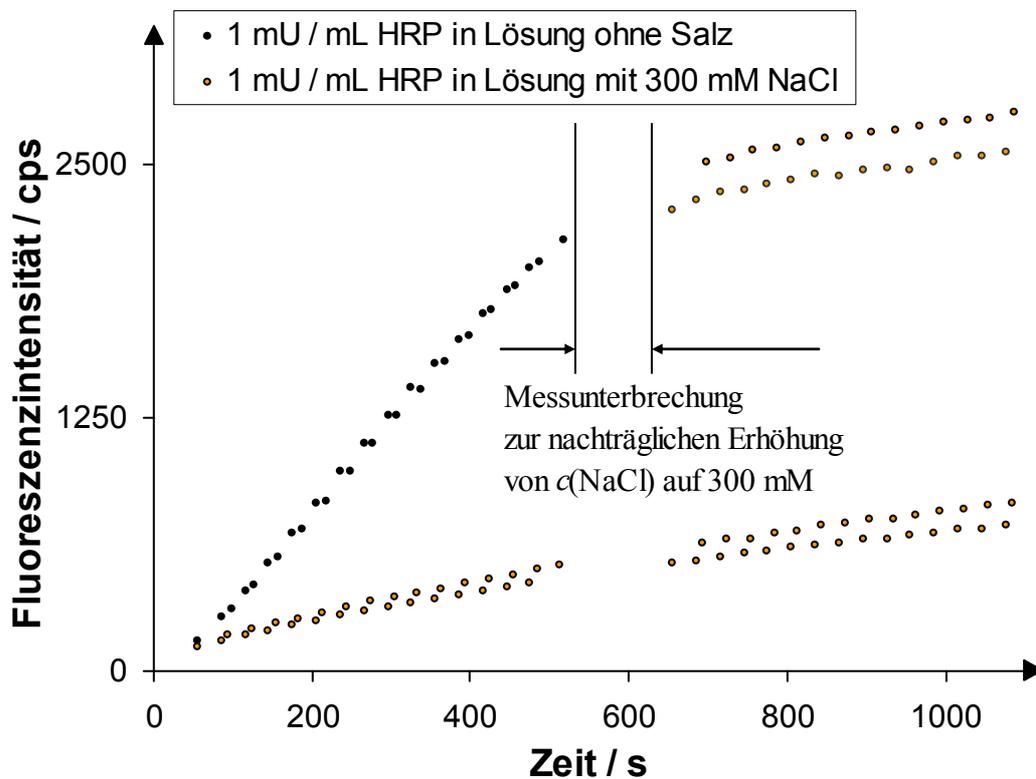


Abbildung 35. Zeitabhängigkeit der Fluoreszenzintensität von Resorufin bei $\text{pH} = 7.4$ und $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ nach Zugabe der Reagenzlösung über einer Siliziumoberfläche zu (schwarz) gelöster Meerrettichperoxidase (2 mU mL^{-1}) und zu (untere Messreihen) gelöster Meerrettichperoxidase (2 mU mL^{-1}) in Gegenwart von 600 mM NaCl (Verdünnung durch Zugabe der Reagenzlösung auf 300 mM NaCl).

Offenbar führt bei diesen niedrigen Proteinkonzentrationen eine Erhöhung der Kochsalzkonzentration auf 300 mM zu einer drastischen Reduzierung der festzustellenden Anfangssteigung. Die enzymatische Aktivität erreicht in Gegenwart von 300 mM NaCl nur noch ca. 20% des Wertes ohne Kochsalz. Durch verschiedenartige Pipettierschemata bei Original- und Reproduktionsmessung (vgl. **Tabellen 19** und **20** (Seite 73)) ist sichergestellt, dass dieser Effekt nicht z. B. auf vorheriger Adsorption in dem zuvor verwendeten

Eppendorfgefäß zurückzuführen ist. Auch liegt der Einfluss nicht in der vor der Zugabe der Reagenzlösung doppelt so hohen Kochsalzkonzentration von 600 mM begründet, weil auch eine nachträgliche Erhöhung der Kochsalzkonzentration auf 300 mM (vgl. obere Messreihen in **Abbildung 35**, Seite 96) zu einem ähnlichen Effekt führt. Um die Unabhängigkeit dieses Effekts von den Oberflächen in dem verwendeten System (Siliziumoberfläche, Silikongummidichtungen) und vom Maßstab (ca. 150 μL) aufzuzeigen, eignet sich ein Vergleich mit in größerem Maßstab (2.0 mL) in einer Quarzglasküvette erhaltenen Ergebnissen (vgl. Kapitel 3.6.1, Seite 78 f.). Diese sind in **Abbildung 36** dargestellt.

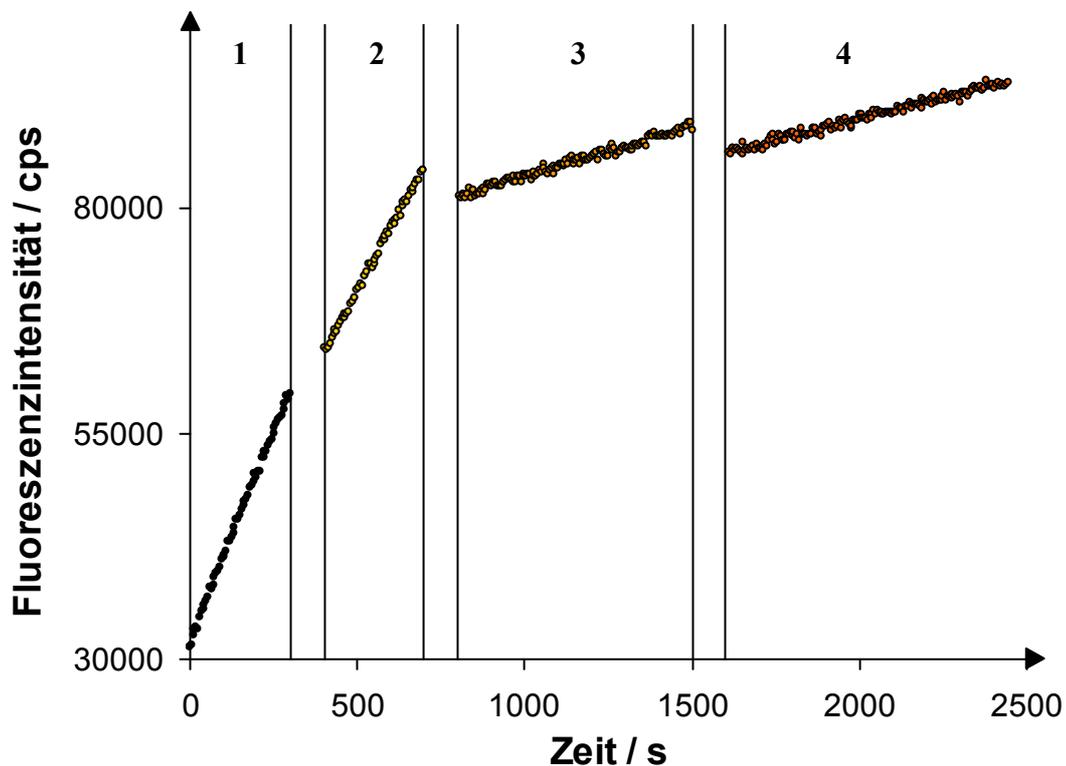


Abbildung 36. Zeitabhängigkeit der Fluoreszenzintensität von Resorufin in einer Quarzglasküvette bei $\text{pH} = 7.4$ und $\vartheta = 25^\circ\text{C}$ nach Zugabe der Reagenzlösung zu einer 2 mU mL^{-1} HRP-Lösung (**1**, schwarze Symbole). Danach sukzessive Erhöhung der Kochsalzkonzentration auf 150 mM (**2**, orange-gelb gefüllte Symbole), auf 300 mM (**3**, orange gefüllte Symbole) und schließlich auf 450 mM (**4**, orange-rot gefüllte Symbole). Zeitskala hier mit willkürlichem Nullpunkt.

Eine Erhöhung der Kochsalzkonzentration auf 300 mM bewirkt auch beim Experiment in der Quarzglasküvette (vgl. **Abbildung 36**) eine deutliche Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit. Beim Übergang von einer Lösung mit 150 mM Kochsalz zu einer Lösung mit 300 mM Kochsalz fällt die Steigung auf ca. 20% des vorherigen Wertes ab.

Der Einfluss von 300 mM Kochsalz auf die HRP-katalysierte Bildung von Resorufin bei niedrigen Proteinkonzentrationen in Lösung (1 mU mL^{-1}) macht deutlich, dass unter diesen

Bedingungen keine zuverlässigen Ergebnisse bezüglich der Proteindesorption von der PAA-Bürste erhalten werden können.

Bei höheren Proteinkonzentrationen (10 mU mL^{-1}) werden dagegen die in **Abbildung 37** dargestellten Resultate erhalten. Offenbar hat bei diesen hohen Konzentrationen das Kochsalz nur noch einen geringen Einfluss auf die beobachtete Aktivität.

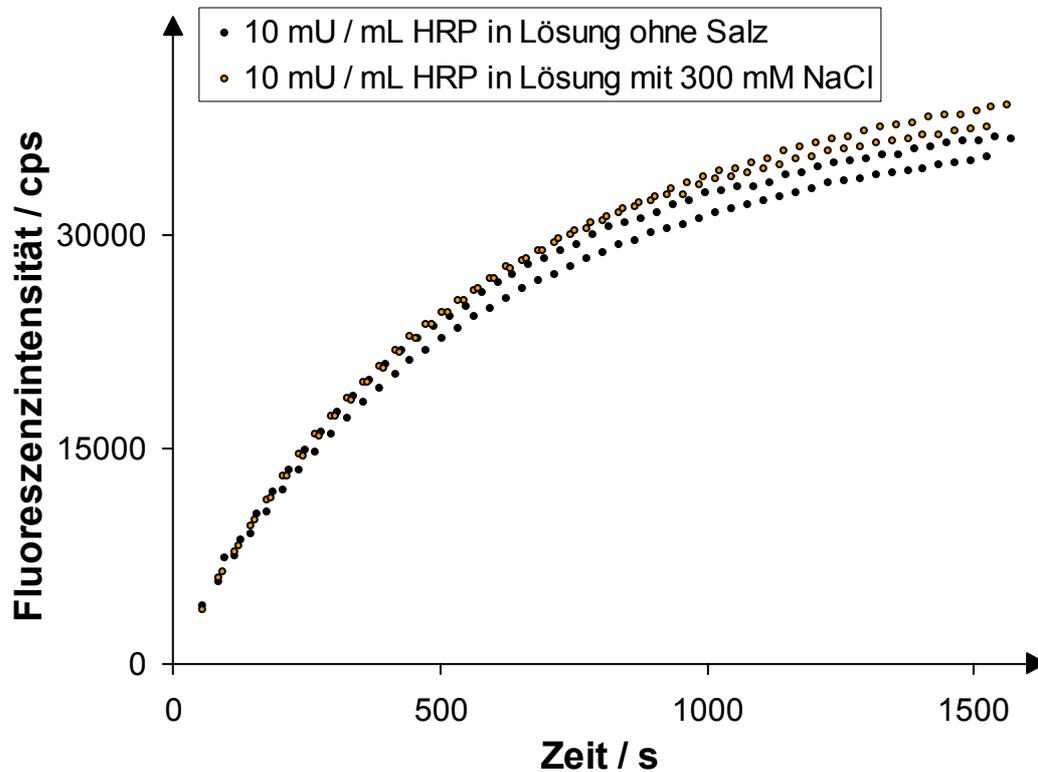


Abbildung 37. Zeitabhängigkeit der Fluoreszenzintensität von Resorufin bei $\text{pH} = 7.4$ und $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ nach Zugabe der Reagenzlösung zu über einer Siliziumoberfläche gelöster Meerrettichperoxidase (20 mU mL^{-1}) ohne NaCl (schwarze Symbole) und mit 300 mM NaCl (orange gefüllte Symbole).

Die Auswertung der Anfangssteigungen ist in **Tabelle 32** zusammengefasst. Analog zu den Messungen bei niedriger Konzentration liegen der Original- und Reproduktionsmessung unterschiedliche Pipettierschemata (vgl. **Tabellen 19** und **20** (Seite 73)) zugrunde.

Tabelle 32. Vergleich der enzymatischen Aktivitäten von gelöster (10 mU mL^{-1}) Meerrettichperoxidase anhand der Anfangssteigungen (in cps s^{-1}) der Fluoreszenzintensität bei $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ und $\text{pH} = 7.4$ in Gegenwart und Abwesenheit von 300 mM NaCl .

300 mM NaCl	Originalmessung		Reproduktionsmessung		Mittelwert
	Vertiefung 1	Vertiefung 2	Vertiefung 1	Vertiefung 2	
ohne	50.8	53.3	47.8	47.5	49.9
mit	57.7	53.6	50.4	57.1	54.7
Verhältnis mit / ohne	1.07		1.13		1.10 ± 0.03

Bei der hohen Proteinkonzentration hat die Anwesenheit von Kochsalz mit einer Konzentration von 300 mM also höchstens eine leichte Steigerung (ca. 10%) der Reaktionsgeschwindigkeit zur Folge. Die Änderung kann unter Umständen auch als vernachlässigbar eingestuft werden, weil sie sich in der Größenordnung des experimentellen Fehlers befindet.

Der Vergleich zwischen niedrigen und höheren Proteinkonzentrationen macht deutlich, dass zuverlässig interpretierbare Ergebnisse in Gegenwart von Kochsalz ($c = 300 \text{ mM}$) nur zu erhalten sind, wenn eine ausreichende Proteinmenge in Lösung vorliegt, weil unter diesen Voraussetzungen das Salz nur einen geringen Einfluss auf die in Lösung stattfindende Reaktion hat. Um dies im Zusammenhang mit den Desorptionsexperimenten sicherzustellen, müssen große Mengen Protein vor einer Desorption mit Salzlösung an einer PAA-Bürste gebunden sein. Die der Interpretation der Ergebnisse zugrunde liegende Annahme einer annähernden Substratsättigung ist in diesem Fall allerdings schlechter erfüllt als für Messungen bei niedrigeren Proteinkonzentrationen. Dennoch sollten anhand der Anfangssteigungen sinnvolle Ergebnisse zu erhalten sein.

Erster Schritt des Desorptionsexperiments ist also die Adsorption der Meerrettichperoxidase an einer PAA-Bürste aus einer hoch konzentrierten Lösung (200 mU mL^{-1}) heraus. Einer Inkubationszeit von einer Stunde folgt das exzessive Wegspülen von nicht adsorbiertem Protein mit Puffer C. In einen Teil der Vertiefungen wird nun Messpuffer, in den anderen Teil Puffer mit einer Kochsalzkonzentration von 600 mM eingefüllt. In den salzhaltigen Vertiefungen sollte es dadurch zu einer (partiellen) Desorption des Proteins kommen. Insofern liegen dort adsorbiertes und gelöstes Protein nebeneinander vor, während in den salzfreien Vertiefungen das gesamte Protein an der PAA-Bürste adsorbiert bleiben sollte.

Die Ergebnisse für die Zeitabhängigkeit der Fluoreszenzintensität nach dem Hinzufügen der Reagenzlösung¹¹ zu allen Vertiefungen sind in **Abbildung 38** (Seite 100) grafisch veranschaulicht. Daraus lässt sich der qualitative Eindruck gewinnen, dass in Gegenwart von Kochsalz im Mittel eine moderat höhere enzymatische Aktivität als in Abwesenheit von Salz festzustellen ist.

¹¹ In den salzhaltigen Vertiefungen resultiert hierdurch wiederum eine Verringerung der Kochsalzkonzentration auf 300 mM.

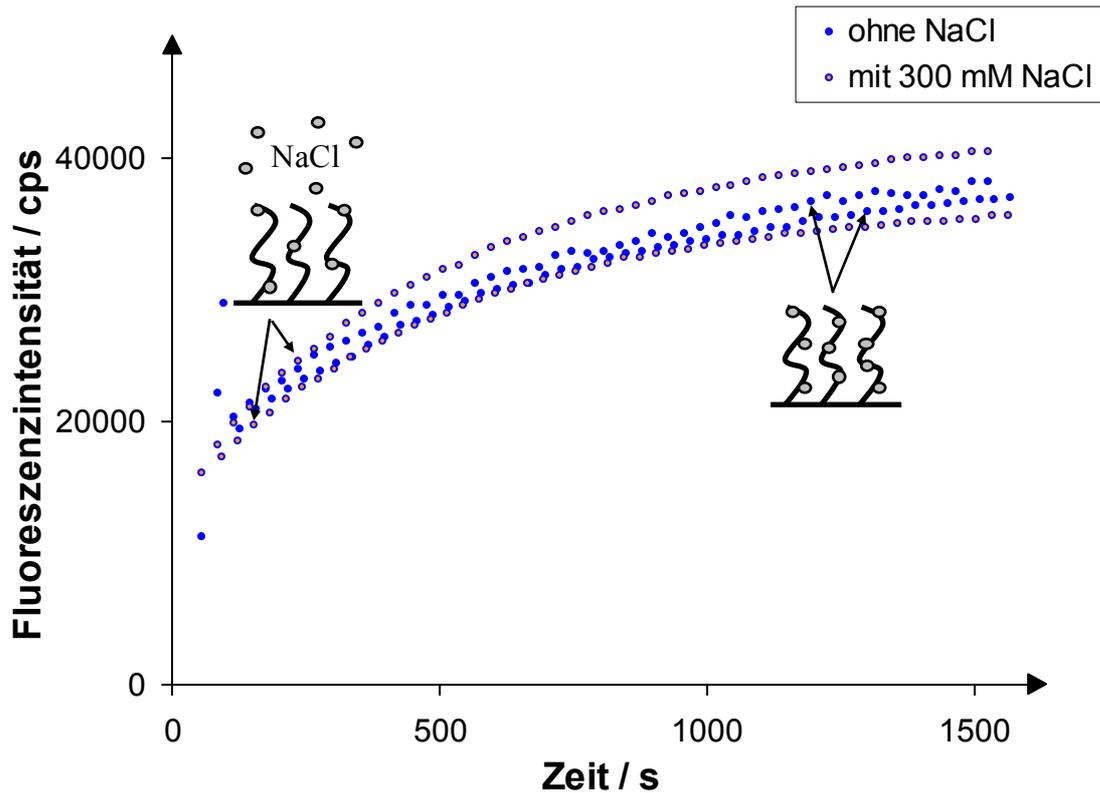


Abbildung 38. Zeitabhängigkeit der Fluoreszenzintensität von Resorufin bei $\text{pH} = 7.4$ und $\vartheta = 25\text{ °C}$ nach einstündiger Inkubation von 200 mU mL^{-1} HRP über einer PAA-Bürste und anschließendem Wegspülen der Proteinlösung. Vor Zugabe der Reagenzlösung Zusatz von salzfreiem (vollständig blaue Symbole) bzw. salzhaltigem ($c(\text{NaCl}) = 600\text{ mM}$, orange gefüllte Symbole) Puffer, (HRP-Desorptionsexperiment erster Teil).

Die Ergebnisse für die Anfangssteigungen für drei voneinander unabhängige Messserien sind in **Tabelle 33** dargestellt. Im Mittel kommt es durch die Desorption von der PAA-Bürste also zu einer Aktivitätssteigerung von ca. 26%. Allerdings muss noch geprüft werden, ob und in welchem Ausmaß die HRP-Moleküle von der PAA-Bürste tatsächlich desorbiert sind.

Tabelle 33. Enzymatische Aktivitäten (Anfangssteigungen in cps s^{-1}) an einer PAA-Bürste nach einstündiger Inkubation einer 200 mU mL^{-1} HRP-Lösung; nachfolgend Wegspülen der Proteinlösung vor Zufügen von Puffer ohne und mit NaCl (600 mM), anschließend Zugabe der Reagenzlösung bei $\vartheta = 25\text{ °C}$ und $\text{pH} = 7.4$ (HRP-Desorptionsexperiment erster Teil).

Messung Nr.	Vertiefung Nr.	ohne NaCl	mit 300 mM NaCl	Verhältnis mit / ohne NaCl
D 1.1	1 / 3	31.2	42.7	1.21
	2 / 4	33.4	35.2	
D 2.1	1 / 3	24.2	32.2	1.22
	2 / 4	27.6	30.8	
D 3.1	1 / 3	15.6	20.2	1.36
	2 / 4	10.9	15.9	
Mittelwert:				1.26 ± 0.10

Hierzu werden im Anschluss an das vorangegangene Experiment die überstehenden Lösungen entfernt und alle Vertiefungen erneut exzessiv mit Puffer gespült (vgl. Abschnitt 3.5.2 (Seite 74) bzw. **Tabelle 22** (Seite 75)). Dadurch wird ggf. desorbiertes Protein entfernt. Hat eine salzinduzierte Desorption stattgefunden, sollte entsprechend nach Einfüllen von Messpuffer und Reagenzlösung in alle Vertiefungen in den zuvor salzhaltigen Vertiefungen eine geringere enzymatische Aktivität festzustellen sein als in den zuvor salzfreien; **Abbildung 39** ermöglicht eine Beurteilung der tatsächlichen Situation.

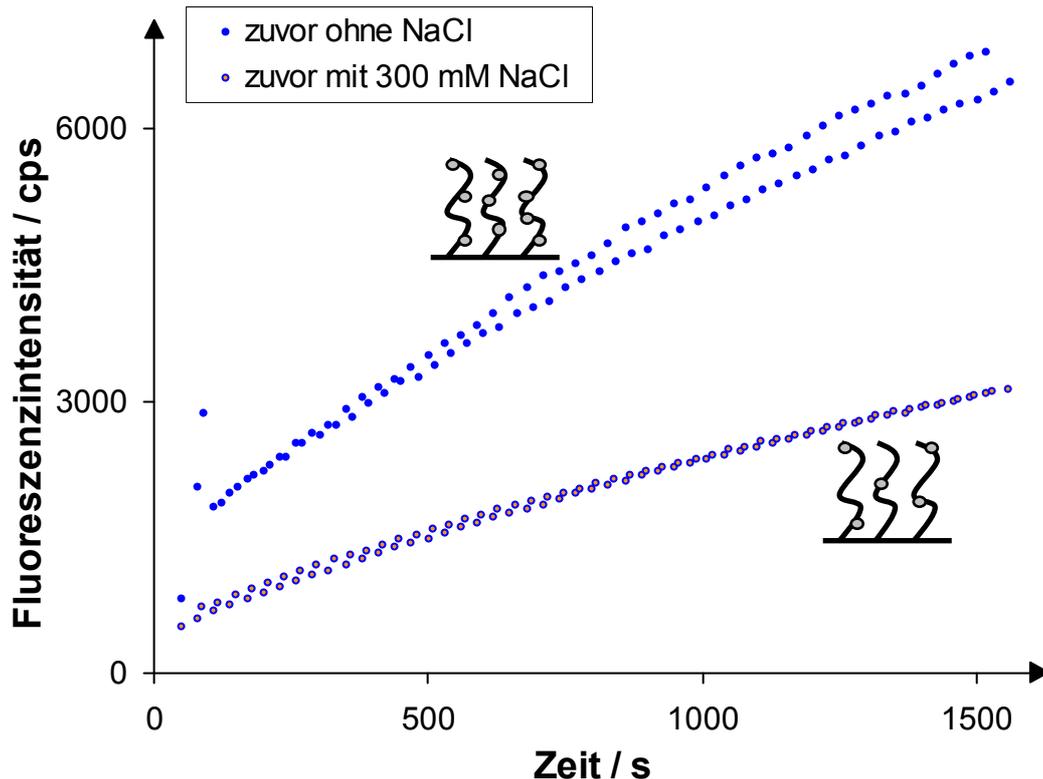


Abbildung 39. Zeitabhängigkeit der Fluoreszenzintensität von Resorufin bei $\text{pH} = 7.4$ und $\vartheta = 25^\circ\text{C}$ an einer planaren PAA-Bürste. Zweiter Teil des HRP-Desorptionsexperiments; ausgehend von der Situation nach dem ersten Teil (vgl. **Abbildung 38**, Seite 100) überstehende Lösung abpipettiert und weggespült, vor erneutem Messbeginn salzfreien Puffer und Reagenzlösung sowohl in zuvor salzhaltige (orange gefüllte Symbole) als auch in zuvor salzfreie Vertiefungen (vollständig blaue Symbole) eingefüllt.

Offenbar führt unter den gewählten Bedingungen die Zugabe von 300 mM Kochsalz tatsächlich zu einer Desorption der Meerrettichperoxidase von der planaren PAA-Bürste. Im Mittel der unabhängig voneinander durchgeführten Experimente (vgl. **Tabelle 34**, Seite 102) beträgt die durch die Anfangssteigung repräsentierte enzymatische Aktivität in den zuvor salzhaltigen relativ zu den die ganze Zeit über salzfreien Vertiefungen im Mittel nur noch ca. 50%.

Tabelle 34. Enzymatische Aktivitäten (Anfangssteigungen in cps s^{-1}) an einer PAA-Bürste bei $\vartheta = 25\text{ °C}$ und $\text{pH} = 7.4$. Zweiter Teil des HRP-Desorptionsexperiments; ausgehend von der Situation nach dem ersten Teil (vgl. **Tabelle 33**, Seite 100) überstehende Lösung abpipettiert und intensiv gespült, vor erneutem Messbeginn salzfreien Puffer und Reagenzlösung sowohl in zuvor salzhaltige als auch in zuvor salzfreie Vertiefungen einpipettiert.

Messung Nr.	Vertiefung Nr.	zuvor ohne NaCl	zuvor mit 300 mM NaCl	Verhältnis zuvor mit / ohne NaCl
D 1.2	1 / 3	4.5	2.3	0.51
	2 / 4	4.5	2.3	
D 2.2	1 / 3	6.3	2.6	0.39
	2 / 4	9.8	3.7	
D 3.2	1 / 3	5.1	3.0	0.60
	2 / 4	4.4	2.7	
Mittelwert:				0.50 ± 0.10

Der Vergleich der in den beiden Teilen des Desorptionsexperiments erhaltenen Steigungen (**Tabelle 33**, Seite 100 und **Tabelle 34**) zeigt einen deutlichen Rückgang der festzustellenden Gesamtaktivität im zweiten Telexperiment. Dies kann durch die in der Literatur bekannte Desaktivierung des Enzyms durch Reaktion mit seinem eigenen Substrat (Wasserstoffperoxid) erklärt werden [139]. Experimente sind entsprechend nur dann miteinander vergleichbar, wenn dieser zeitabhängige Verlust an Aktivität berücksichtigt wird. Im Zusammenhang mit dem Desorptionsexperiment ist dies durch den ausschließlichen Vergleich von Experimenten mit gleich langer Expositionsdauer bezüglich der H_2O_2 -haltigen Reagenzlösung gewährleistet. Insofern können die erhaltenen Daten für eine weitergehende quantitative Auswertung herangezogen werden:

Dem ersten Teil des Desorptionsexperiments (vgl. **Tabelle 33**, Seite 100) kann entnommen werden, dass das Verhältnis der Gesamtaktivitäten an / über einer PAA-Bürste in Gegenwart (GA_{Salz}) und Abwesenheit ($GA_{\text{ohne Salz}}$) von 300 mM NaCl im Mittel 1.26 beträgt:

$$\frac{GA_{\text{Salz}}}{GA_{\text{ohne Salz}}} = 1.26 \quad (24)$$

Wie schon in Kapitel 4.2.1 (Seite 94) diskutiert wurde, kann die zu beobachtende Gesamtaktivität als ein Produkt aus einer Größe, welche die Menge des Proteins widerspiegelt, und einem Faktor, in dem sich die molekulare Aktivität der Proteinmoleküle wiederfindet, beschrieben werden. Die insgesamt vorhandene Proteinmenge sollte dabei in Ab- und Anwesenheit von Kochsalz identisch sein und sich demzufolge aus Zusammenhang (24) herauskürzen. Da in Abwesenheit von Salz alle Proteinmoleküle adsorbiert sind, verbleibt von dem Ausdruck für $GA_{\text{ohne Salz}}$ nur noch die molekulare Aktivität

a_{ads} der adsorbierten Proteinmoleküle. Für GA_{Salz} muss hingegen berücksichtigt werden, dass ein Anteil f_{ads} der Proteine an der Bürste adsorbiert ist (mit der Aktivität a_{ads}), während der verbleibende Anteil f_{Lsg} gelöst mit einer anderen Aktivität a_{Lsg} vorliegt. Aus den Ergebnissen des zweiten Teils des Desorptionsexperiments (**Tabelle 34**, Seite 102) ist zu entnehmen, dass im Mittel gilt: $f_{\text{ads}} = f_{\text{Lsg}} = 0.50$. Hiermit ergibt sich durch Einsetzen in Gleichung (24):

$$\frac{f_{\text{ads}} a_{\text{ads}} + f_{\text{Lsg}} a_{\text{Lsg}}}{a_{\text{ads}}} = 1.26 \Leftrightarrow \frac{a_{\text{Lsg}}}{a_{\text{ads}}} = 1.52 \quad (25)$$

Es folgt also, dass bei der Adsorption ausgehend von einer Lösung mit hoher Enzymkonzentration (200 mU mL^{-1} HRP) die molekulare Aktivität der gelösten Proteine um ca. 50% größer ist als die adsorbierter Proteine ($a_{\text{Lsg}} / a_{\text{ads}} = 1.5 \pm 0.2$). Zu diesem Anstieg in der Aktivität mag in geringem Ausmaß der Salzeinfluss auf die HRP-katalysierte Bildung von Resorufin aus Amplex Red[®] beitragen (vgl. **Tabelle 32**, Seite 98).

Umgekehrt gesehen bleiben bei der Adsorption von HRP an einer planaren PAA-Bürste ca. 66% der molekularen Aktivität des gelösten Proteins erhalten.

4.2.3 Vergleich der enzymatischen Aktivität von HRP in Lösung und an der PAA-Bürste bei pH = 7.4 durch Abblockexperimente mit Rinderserumalbumin

Das gezielte Abblocken der Oberfläche der PAA-Bürste mit Rinderserumalbumin, welches in biotechnologischer Hinsicht ebenfalls zu diesem Zweck eingesetzt wird (vgl. Kapitel 2.1.3, Seite 16, [89]), ist eine alternative Möglichkeit, die Unterschiede zwischen der molekularen Aktivität von adsorbierter und gelöster Meerrettichperoxidase zu untersuchen. Im Speziellen ist die detaillierte experimentelle Vorgehensweise Gegenstand von Abschnitt 3.5.3 (Seite 75 f.); die allgemeine Vorgehensweise bei Enzymkinetikmessungen ist in Passus 3.5 (Seite 69 ff.) thematisiert. Erster Schritt des wiederum aus zwei Teilmessungen bestehenden Experiments ist die Inkubation von 0.1 mg mL^{-1} BSA-Lösung (in Puffer C, pH = 7.4) in zwei Vertiefungen. Innerhalb von 60 Minuten adsorbieren dadurch ca. 1.5 mg m^{-2} Rinderserumalbumin an der PAA-Bürste [24, 137]. Damit ist die Oberfläche blockiert und es sollte im weiteren Ablauf des Experiments dort keine Meerrettichperoxidase mehr adsorbieren können. Zwei weitere Vertiefungen bleiben unbehandelt. Nach dem exzessiven Wegspülen der BSA-Lösung wird sowohl in die unbehandelten als auch in die oberflächenpassivierten Vertiefungen HRP-Lösung mit einer Konzentration von 20 mU mL^{-1} eingebracht und ebenfalls für eine Stunde inkubiert. Nach Zugabe der Reagenzlösung können z. B. die in **Abbildung 40** (Seite 104) gezeigten Fluoreszenzintensitäten festgestellt werden:

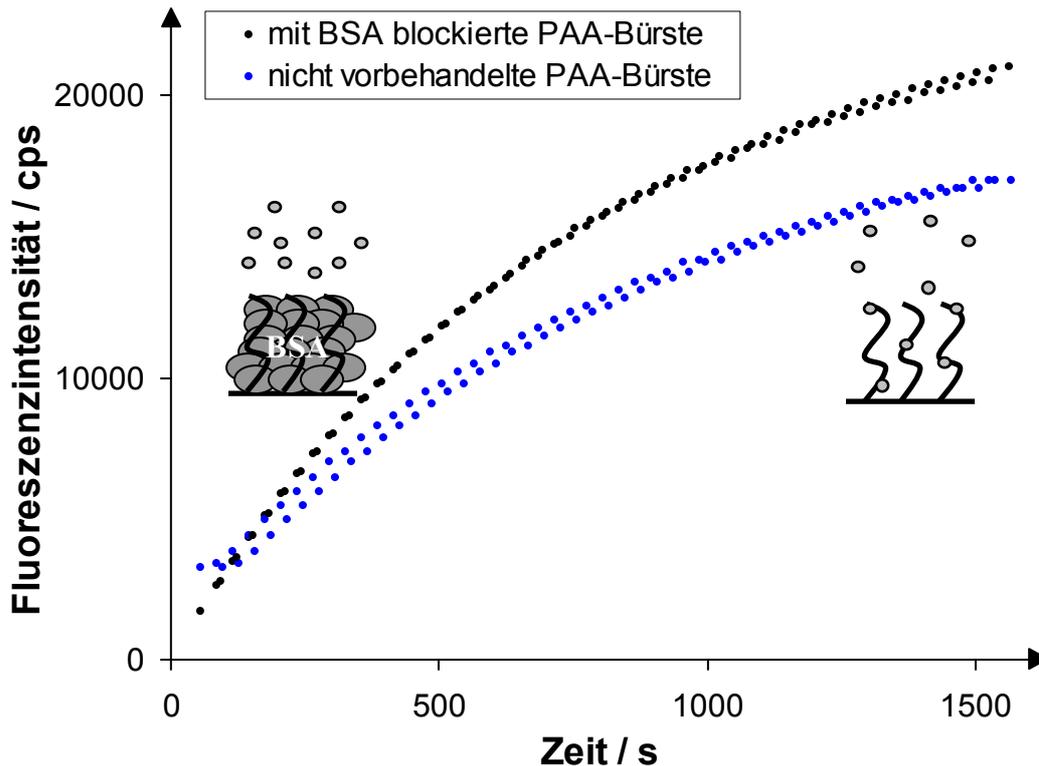


Abbildung 40. Zeitabhängigkeit der Fluoreszenzintensität von Resorufin bei $\text{pH} = 7.4$ und $\vartheta = 25^\circ\text{C}$ über einer mit BSA blockierten PAA-Bürste (schwarz) und über / an einer unbehandelten PAA-Bürste (blau) nach jeweils einstündiger Inkubation von 20 mU mL^{-1} HRP und anschließender Zugabe der Reagenzlösung (Blockexperiment Teil 1).

Die Messergebnisse lassen eine erhöhte Gesamtaktivität in den Vertiefungen, in denen zuvor die planare PAA-Bürste mit BSA gesättigt wurde, erkennen. Dies wird ebenfalls anhand der Anfangssteigungen für mehrere voneinander unabhängige Experimente deutlich (**Tabelle 35**). In den Vertiefungen mit den unbehandelten PAA-Bürsten beträgt der Wert für die Anfangssteigung nur ca. 61% des über den blockierten PAA-Bürsten festzustellenden Wertes.

Tabelle 35. Enzymatische Aktivitäten (Anfangssteigungen in cps s^{-1}) an einer PAA-Bürste und an einer mit BSA geblockten PAA-Bürste nach einstündiger Inkubation einer 20 mU mL^{-1} HRP-Lösung und nachfolgender Zugabe der Reagenzlösung bei $\vartheta = 25^\circ\text{C}$ und $\text{pH} = 7.4$ (Blockexperiment erster Teil).

Messung Nr.	Vertiefung Nr.	PAA-Bürste	PAA-Bürste (mit BSA geblockt)	Verhältnis nicht geblockt / geblockt
B 1.1	1 / 3	17.6	26.6	0.66
	2 / 4	16.9	25.8	
B 2.1	1 / 3	22.5	34.1	0.61
	2 / 4	17.9	31.6	
B 3.1	1 / 3	30.7	56.9	0.56
	2 / 4	36.9	63.5	
Mittelwert:				0.61 \pm 0.05

Unter der Voraussetzung, dass keine Meerrettichperoxidase in den mit BSA blockierten Vertiefungen an Grenzflächen adsorbiert, wird durch diese Ergebnisse ebenfalls ein Vergleich zwischen der molekularen Aktivität von HRP in Lösung und an der PAA-Bürste ermöglicht. Denn in diesem Fall liegt in den blockierten Vertiefungen das gesamte Protein in Lösung vor. Dies lässt sich durch ein Folgeexperiment bestätigen, bei dem ausgehend von der Situation nach dem ersten Teil des Blockexperiments (vgl. **Abbildung 40** bzw. **Tabelle 35**, Seite 104) die Lösungen über den Oberflächen entfernt werden und eine erneute Bestimmung der enzymatischen Aktivität nach Zugabe von Puffer C (pH = 7.4) und Reagenzlösung erfolgt (**Abbildung 41**).

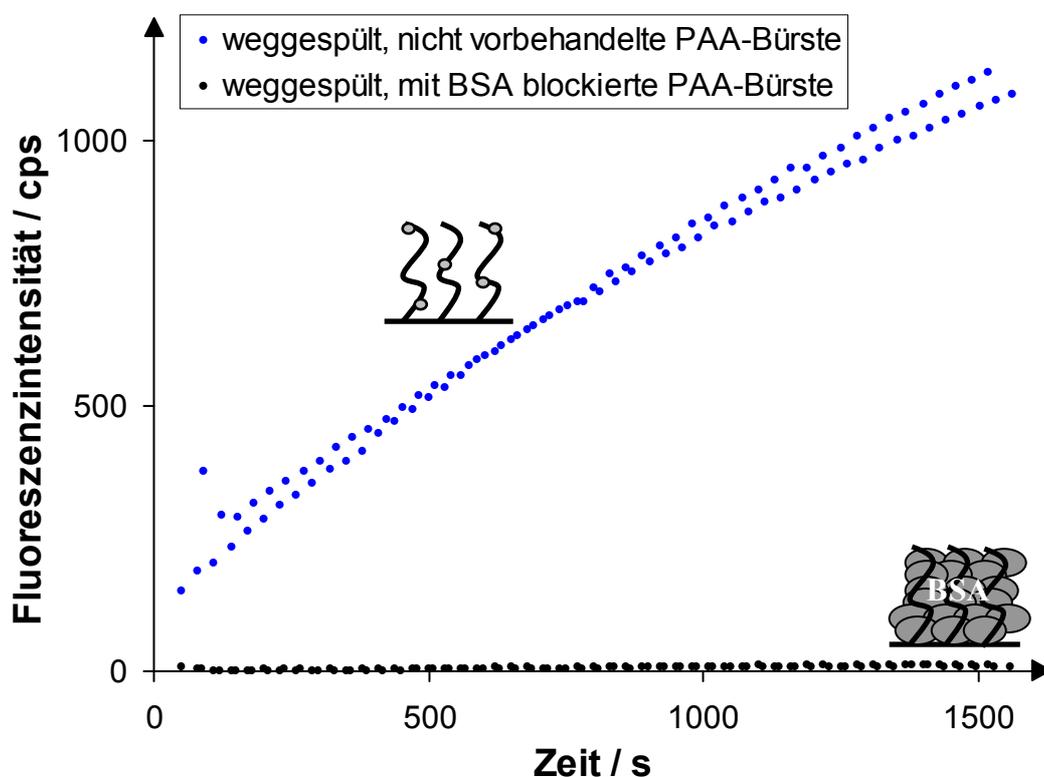


Abbildung 41. Zeitabhängigkeit der Fluoreszenzintensität von Resorufin bei pH = 7.4 und $\vartheta = 25\text{ °C}$ an (schwarz) einer mit BSA blockierten PAA-Bürste und (blau) einer unbehandelten PAA-Bürste. Zweiter Teil des Blockexperiments; ausgehend von der Situation nach dem ersten Teil: Austausch der überstehenden Lösungen durch Puffer und nachfolgende Zugabe der Reagenzlösung.

Offensichtlich kann in den mit BSA blockierten Vertiefungen nach dem Wegspülen der Proteinlösung keine Aktivität festgestellt werden, so dass vor dem Wegspülen tatsächlich sämtliche Meerrettichperoxidase in gelöster Form vorlag. An der unbehandelten PAA-Bürste ist hingegen nach dem Entfernen des Überstands immer noch eine deutliche Aktivität feststellbar.

Tabelle 36. Enzymatische Aktivitäten (Anfangssteigungen in cps s^{-1}) an einer PAA-Bürste und an einer mit BSA geblockten PAA-Bürste bei $\vartheta = 25\text{ °C}$ und $\text{pH} = 7.4$. Zweiter Teil des Desorptionsexperiments; ausgehend von der Situation nach dem ersten Teil: Austausch der überstehenden Lösungen durch Puffer und nachfolgende Zugabe der Reagenzlösung.

Messung Nr.	Vertiefung Nr.	PAA-Bürste	PAA-Bürste (mit BSA geblockt)
¹² B 1.2	1 / 3	0.74	0.00
	2 / 4	0.76	0.00
¹³ B 2.2	1 / 3	--	0.02
	2 / 4	--	0.03
¹³ B 3.2	1 / 3	--	0.02
	2 / 4	--	0.02

Dies zeigt auch die quantitative Auswertung anhand der Anfangssteigungen (**Tabelle 36**). Mit Hilfe der Ergebnisse in **Tabelle 35** (Seite 104) lässt sich daher ein zu Gleichung (24) (Seite 102) analoger Zusammenhang zwischen der Gesamtaktivität $GA_{\text{Bürste}}$ von HRP an/über der PAA-Bürste und der Gesamtaktivität $GA_{\text{Bürste blockiert}}$ über der mit Rinderserumalbumin blockierten PAA-Bürste aufstellen:

$$\frac{GA_{\text{Bürste}}}{GA_{\text{Bürste blockiert}}} = 0.61 \quad (26)$$

Auch hier kann von gleichen Proteingesamtmengen ausgegangen werden (vgl. Seite 102), so dass diese sich aus dem Zusammenhang herauskürzen. Vom Term für die blockierte PAA-Bürste verbleibt demnach nur die molekulare Aktivität a_{Lsg} der gelösten Meerrettichperoxidase, während an der unbehandelten PAA-Bürste sowohl adsorbiertes Protein (Aktivität a_{ads} , Anteil f_{ads}) als auch gelöstes Protein (Aktivität a_{Lsg} , Anteil f_{Lsg}) vorzufinden sind. Für die Bilanz ergibt sich entsprechend:

$$\frac{f_{\text{ads}} a_{\text{ads}} + f_{\text{Lsg}} a_{\text{Lsg}}}{a_{\text{Lsg}}} = 0.61 \Leftrightarrow \frac{a_{\text{ads}}}{a_{\text{Lsg}}} = 1 - \frac{0.39}{f_{\text{ads}}} \quad (27)$$

¹² Die Messung mit der nicht blockierten PAA-Bürste liefert etwas geringere Steigungen verglichen mit den Werten in **Tabelle 31** (Seite 95). Die Steigung der Positivkontrolle ist aber ebenfalls geringer, so dass die tabellierten Ergebnisse durch Messung B 1.2 untermauert werden.

¹³ Die in den Experimenten B 2.2 und B 2.3 für die nicht blockierte PAA-Bürste erhaltenen Steigungen sind nicht repräsentativ (zu niedrig), weil hier die überstehenden Lösungen nicht wie in den Kapiteln 3.5.3 (Seite 76) bzw. 3.5.1 (Seite 72) beschrieben vollständig weggespült, sondern nur abpipettiert wurden. Konsequenz des zurückgebliebenen Rests an H_2O_2 -haltiger Lösung ist eine fortschreitende Desaktivierung des adsorbierten Enzyms. Hinzu kommt die Möglichkeit einer kurzzeitigen Austrocknung der Bürstenoberfläche. Dies sollte keinen Einfluss auf die Messergebnisse für die geblockte PAA-Bürste haben (hier ist kaum / kein Protein adsorbiert), so dass diese Ergebnisse dennoch als Reproduktion des Beweises für die vollständige Blockade der PAA-Bürste durch BSA angesehen werden können. Die im Vergleich zu Messung B 1.2 (unwesentlich) höhere Aktivität in den blockierten Vertiefungen geht auf die in dem Flüssigkeitsrest gelösten Proteine zurück.

In Zusammenhang (27) (Seite 106) kommt noch der Anteil des adsorbierten Proteins an der PAA-Bürste als weitere Unbekannte vor. Für eine eindeutige Lösung wird also eine weitere Gleichung benötigt. Diese ergibt sich aus der verbleibenden Aktivität nach dem Wegspülen von HRP über einer PAA-Bürste (Inkubationskonzentration 20 mU mL^{-1}) relativ zur davor bestimmten Aktivität. Das Ergebnis stammt aus der Mittelung aller Messungen, die eine Messung mit 20 mU mL^{-1} HRP in Lösung über der PAA-Bürste und eine Messung nach dem Wegspülen der Proteinlösung beinhalten (z. B. die Messungen an der PAA-Bürste in Abschnitt 4.2.1 (Seite 91 ff.) oder das Blockexperiment in Kapitel 4.2.3 (Seite 103 ff.)). Der verwendete Wert ist bezüglich des zeitlichen Verlusts an enzymatischer Aktivität (z. B. durch H_2O_2 -Desaktivierung (vgl. Abschnitt 4.2.2, Seite 102) [139]) korrigiert. Die Korrektur beruht auf wiederholten Messungen der Aktivität des an der PAA-Bürste adsorbierten Proteins in Abwesenheit von HRP in Lösung (Daten nicht gezeigt). Es folgt:

$$\frac{GA_{\text{Bürste gespült}}}{GA_{\text{Bürste}}} = 0.077 \quad (28)$$

Bereinigt von dem zeitabhängigen Verlust an enzymatischer Aktivität ergibt sich also nach dem Wegspülen der proteinhaltigen Lösung über der PAA-Bürste ein Absinken der Gesamtaktivität $GA_{\text{Bürste gespült}}$ auf ca. 8% (0.08 ± 0.04) der Gesamtaktivität $GA_{\text{Bürste}}$ vor dem Spülvorgang. Erneut setzt sich die Gesamtaktivität aus einem Term für die vorhandene Proteinmenge und der molekularen Aktivität der Proteinmoleküle zusammen. In diesem Fall sind die vorhandenen Proteinmengen nicht gleich, sondern nach dem Wegspülen liegen nur noch adsorbierte Proteine vor. Das Verhältnis der vorhandenen Proteinmenge ist also $f_{\text{ads}} / (f_{\text{ads}} + f_{\text{Lsg}}) = f_{\text{ads}}$. Die molekulare Aktivität nach dem Wegspülen ist nur durch die Aktivität a_{ads} von adsorbiertem Protein bestimmt, während für die Bürste in Gegenwart des Proteins in Lösung erneut die Verteilung des Proteins zwischen Bürste und Lösung berücksichtigt werden muss. Hiermit folgt aus Zusammenhang (28):

$$\frac{f_{\text{ads}} a_{\text{ads}}}{f_{\text{ads}} a_{\text{ads}} + f_{\text{Lsg}} a_{\text{Lsg}}} = 0.077 \Leftrightarrow \frac{a_{\text{ads}}}{a_{\text{Lsg}}} = \frac{1}{12} \left(\frac{1}{f_{\text{ads}}} - 1 \right) \quad (29)$$

Die Kombination der Gleichungen (27) (Seite 106) und (29) ergibt für f_{ads} einen Wert von 0.437 ($44\% \pm 3\%$) und für das Verhältnis $a_{\text{ads}} / a_{\text{Lsg}}$ der Aktivitäten an einer planaren PAA-Bürste und in Lösung einen Wert von 0.11 ($11\% \pm 5\%$).

Die mit den Abblockexperimenten mit Rinderserumalbumin ermittelte molekulare Aktivität a_{ads} an der PAA-Bürste relativ zur molekularen Aktivität in Lösung a_{Lsg} ist wesentlich

geringer als der aus den Desorptionsexperimenten unter Verwendung von 300 mM NaCl-Lösung erhaltene Wert ($a_{\text{ads}} / a_{\text{Lsg}} \approx 0.66$).

Hierfür können verschiedene Ursachen in Betracht gezogen werden. Möglicherweise können die bei der Adsorption der Proteine an einer planaren PAA-Bürste festzustellenden Aktivitätseinbußen bei einer Desorption der Meerrettichperoxidase nur teilweise wieder rückgängig gemacht werden. Außerdem kann der Unterschied in den geringeren Proteinkonzentrationen bei den Abblockexperimenten mit Rinderserumalbumin im Vergleich zu den Desorptionsexperimenten begründet liegen. Werden z. B. $V_{\text{ink}} = 75 \mu\text{L}$ einer HRP-Lösung der Massenkonzentration von $c_m = 8 \cdot 10^{-5} \text{ mg mL}^{-1}$ (entspricht 20 mU mL^{-1} , vgl. Kapitel 3.5, Seite 69) in einer Vertiefung mit einer planaren PAA-Bürste als Grundfläche ($A_{\text{Bürste}} = 6 \cdot 10^{-5} \text{ m}^2$) inkubiert, so gilt für die pro Flächeneinheit adsorbierte Proteinmasse m_A :

$$m_A = \frac{V_{\text{ink}} \cdot c_m}{A_{\text{Bürste}}} \cdot f_{\text{ads}} = 0.04 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2} \quad (30)$$

Für eine planare PAA-Bürste können adsorbierte Proteinmassen von bis zu 10 mg m^{-2} beobachtet werden. Die PAA-Bürste ist unter den Bedingungen dieses Experiments also bei weitem nicht vollständig belegt. In Folge dessen kommt es zu starken Wechselwirkungen zwischen der Polymerbürste und dem Protein, weil eine maximale Zahl von PAA-Ketten für Interaktionen zur Verfügung steht. Dagegen können Protein-Protein-Wechselwirkungen in der Bürste unter diesen Bedingungen vernachlässigt werden. Mögliche Konsequenz ist eine deutliche Verringerung der enzymatischen Aktivität der adsorbierten Proteinmoleküle. Außerdem ist wahrscheinlich, dass diese stark gebundenen Proteinmoleküle mit niedriger Aktivität auch nicht in Anwesenheit von Salz desorbieren. Mit steigender Anzahl an adsorbierten Proteinmolekülen kommt es zu einer zunehmenden Schwächung der anziehenden Interaktionen zwischen der PAA-Bürste und dem Protein, weil weniger Ketten pro Proteinmolekül zur Verfügung stehen und (repulsive) Protein-Protein-Wechselwirkungen eine zunehmende Rolle spielen. Hierin kann eine höhere molekulare Aktivität bei größerem Adsorptionsgrad begründet liegen.

Im Fall von Meerrettichperoxidase führt ein Absinken des pH-Werts unter einen Betrag von sieben zu einer reduzierten Aktivität [139]. Insofern dürfte einerseits der verringerte pH-Wert in einer PAA-Bürste im Vergleich zur Umgebung [15, 21] einen wichtigen Einfluss auf die erhaltenen Ergebnisse haben. Andererseits sagen Modellberechnungen auch eine innerhalb einer PAA-Bürste erhöhte Ionenstärke in der Größenordnung von 100 mM voraus [19], welche nach **Tabelle 32** (Seite 98) zu einer leichten Erhöhung der Aktivität führen kann.

Für eine Quantifizierung dieser Einflüsse auf die Proteinaktivität an einer PAA-Bürste wären präzise Daten über den lokalen pH-Wert und die lokale Ionenstärke erforderlich.

Abschließend ist ein Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit anderen in der Literatur veröffentlichten Studien über die Proteinaktivität an Grenzflächen von Interesse. In diesem Zusammenhang existieren nur wenige quantitative Studien, weil hierfür der Bezug der erhaltenen Aktivitätsdaten auf die adsorbierte Proteinmenge erforderlich ist.

Beispielsweise wurde die Michaelis-Menten-Kinetik (vgl. Kapitel 2.4.2, Seite 38 ff.) auf an kolloidalen PAA-Bürstenpartikeln adsorbierte Glucoamylase und β -Glucosidase angewendet [34]. Während sich die Wechselzahl für die β -Glucosidase an der PAA-Bürste in einem ähnlichen Bereich wie in Lösung bewegt, sinkt sie bei Adsorption von Glucoamylase auf ca. ein siebtel ab. Insofern spielt die Art des Proteins für die beobachteten Aktivitäten anscheinend eine wichtige Rolle. Für die enzymatische Aktivität von Lysozym an der Oberfläche von kolloidalen Kieselgelpartikeln wird eine Abhängigkeit von der Partikelgröße deutlich [140]. Für größere Partikel werden stärkere Wechselwirkungen zwischen Partikeloberfläche und Protein festgestellt, wobei eine minimale Aktivität von 20% - 40% im Vergleich zu ungebundenem Protein resultiert. Dieser Verlust der Aktivität geht mit einer Verringerung des α -Helix-Anteils an der Sekundärstruktur des Proteins einher.

Bei Adsorption der Proteine Cutinase und α -Chymotrypsin an der Oberfläche von hydrophoben Teflonpartikeln wird ein drastischer Rückgang der enzymatischen Aktivität verzeichnet, während höhere Aktivitäten an hydrophilen Kieselgelpartikeln verbleiben [141]. Auch hier ist ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Anteil der Proteine mit nativer Struktur und der enzymatischen Aktivität festzustellen.

Da sowohl planare als auch sphärische (Kolloidpartikel) PAA-Bürsten die Sekundärstruktur adsorbierter Proteinmoleküle weitestgehend erhalten (vgl. Kapitel 4.1, Seite 81 ff., [138] bzw. [33]), scheinen Beeinträchtigungen in der enzymatischen Aktivität der Proteine vorwiegend auf eine geringere Zugänglichkeit der Moleküle zurückzugehen. Als hierfür ursächlich kann sterische Hinderung durch die Anwesenheit der PAA-Ketten und anderer Proteinmoleküle angesehen werden. Dies steht mit der Vorstellung im Einklang, dass im Unterschied zu anderen Oberflächen Proteine *in* einem durch die PAA-Bürste vorgegebenen dreidimensionalen Raum gefangen sind, anstatt sich *auf* der Oberfläche anzulagern.

Insgesamt bestätigen die kombinierten Ergebnisse der Strukturanalyse (Abschnitt 4.1, Seite 81 ff., [138]) und der Enzymkinetikmessungen (Kapitel 4.2, Seite 91 ff., [142]) die mögliche Einsetzbarkeit einer PAA-Bürste als biokompatible Oberflächenbeschichtung, deren Proteinaffinität über die Ionenstärke der Lösung gesteuert werden kann.

4.3 Struktur und Adsorption von Insulin an einer planaren PAA-Bürste unter sauren Bedingungen und in Anwesenheit von Cosolventien

In der Reihe der in Kapitel 4.1 (Seite 81 ff.) hinsichtlich ihrer Sekundärstruktur bei pH-neutralen Bedingungen in adsorbiertem Zustand an einer planaren Poly(acrylsäure)-Bürste bereits charakterisierten Proteine nimmt Insulin eine besondere Stellung ein. Diese geht auf die amyloidogenen Eigenschaften dieses Hormons zurück (vgl. Abschnitt 2.1.5, Seite 18 f.). Beispielsweise führt längeres Erhitzen einer sauren Insulinlösung (pH = 2) auf Temperaturen von ca. 60 °C zur Ausbildung von Proteinaggregaten [101-103], welche aus einer großen Anzahl an Insulinmolekülen bestehen können. Aufgrund einer stärkeähnlichen Überstruktur werden diese Assoziate auch als Amyloide bezeichnet; darin ist die native Sekundärstruktur des Insulins fast völlig zugunsten von intermolekularen β -Faltblättern umgebildet. Insofern sollte die bereits zuvor eingesetzte ATR-FTIR-Spektroskopie einen eindeutigen Hinweis auf das Vorhandensein solcher Aggregate liefern können.

Sofern die Ausbildung von solchen in biologischen Systemen im Allgemeinen mit unvorteilhaften Einflüssen (z. B. Krankheiten) in Verbindung zu bringenden Strukturen an einer planaren Poly(acrylsäure)-Bürste nicht gefördert wird, wäre dies ein neuer Aspekt der Biokompatibilität dieser Grenzflächenmodifikation.

Zum ersten Mal (abgesehen von NaCl) im Rahmen dieser Arbeit werden im nachfolgenden Unterkapitel auch Resultate bezüglich des Einflusses eines Cosolvens auf ein Proteinadsorbat, in diesem Fall der des nichtionischen kosmotropen Glycerins, auf die Eigenschaften von adsorbierten Proteinmolekülen dargestellt.

Im ersten Teilabschnitt 4.3.1 (Seite 111 ff.) werden Ergebnisse für die Sekundärstrukturanalyse auf Basis der IR-Spektren von unter sauren Bedingungen an einer planaren PAA-Bürste in An- und Abwesenheit von Kochsalz und Glycerin adsorbiertem Protein im Vergleich zu gelöstem Protein dargestellt. In die Diskussion fließen dabei in besonderem Maße bereits früher im Rahmen der Diplomarbeit des Autors gewonnene Daten bezüglich der Aggregation von Insulin unter sauren Bedingungen an einer planaren PAA-Bürste ein [138]. Im nachfolgenden Abschnitt 4.3.2 (Seite 116 ff.) werden die Resultate durch Vergleich mit Reflektometrieexperimenten unter Ausnutzung von Neutronenstrahlung in einen aussagekräftigeren Zusammenhang gerückt, wobei ein Hauptaugenmerk auf dem Einfluss des Glycerins liegt [143].

4.3.1 Einfluss von 500 mM NaCl und 2 M Glycerin auf die Sekundärstruktur von an einer PAA-Bürste adsorbiertem Insulin unter sauren Bedingungen

Den gezeigten Ergebnissen bezüglich des Einflusses von 500 mM NaCl und 2 M Glycerin auf ein Insulinadsorbat an einer planaren Poly(acrylsäure)-Bürste liegt die in Kapitel 3.4.3 (Seite 66) beschriebene Durchführung zugrunde; die allgemeine Vorgehensweise bei ATR-FTIR-Experimenten ist in Abschnitt 3.4 (Seite 61 f.) beschrieben.

Die Vorgehensweise bei der Adsorption des Insulins kann anhand des in **Abbildung 42** gezeigten Ausschnitts der Kinetik nachvollzogen werden. Zu Beginn der Messserie wird mit 10 mM DCl in D₂O in Abwesenheit von Protein der Messuntergrund erhalten. Der Austausch der Lösung über der PAA-Bürste durch 0.1 mg mL⁻¹ Insulinlösung mit einem pH-Wert von 2 in D₂O führt zu einem relativ geringen Anstieg der Fläche unter den im Bereich von 1700 cm⁻¹ bis 1600 cm⁻¹ basislinienkorrigierten Spektren. Unter Vergleich mit **Abbildung 46** (Seite 119) deuten die ATR-FTIR-Messungen auf einen in saurem Milieu geringeren Adsorptionsgrad im Vergleich zu pH-neutralen Bedingungen hin [138]. Diese Aussage wird im Vergleich mit anderen Messmethoden noch relativiert werden (Passus 4.3.2, Seite 118 ff.).

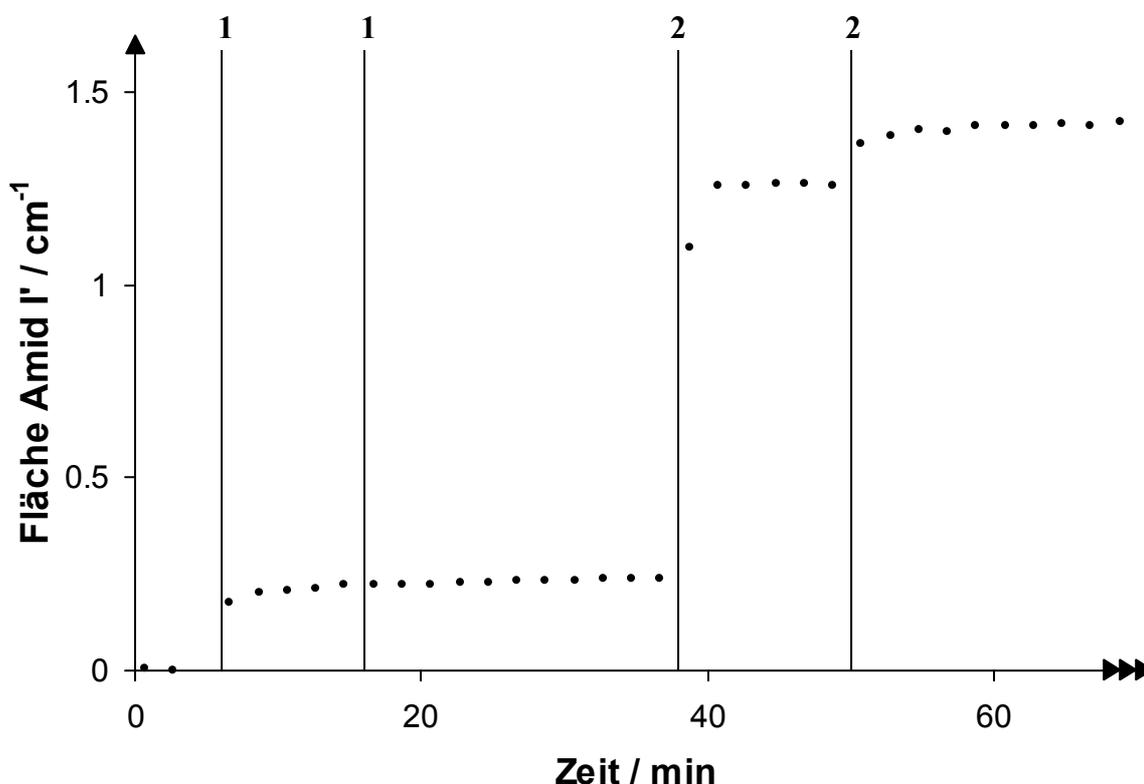


Abbildung 42. Ausschnitt aus der Adsorptionskinetik von Rinderinsulin an einer planaren PAA-Bürste bei $\text{pH} = 2$ und $\theta = 23.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Austausch (vertikale Linien) der Lösung über der PAA-Bürste (zu Beginn 10 mM DCl in D₂O) durch 1: 0.1 mg mL⁻¹ Insulin in 10 mM DCl in D₂O, 2: 0.1 mg mL⁻¹ Insulin in 10 mM DCl in D₂O mit 0.5 M NaCl).

Grundsätzlich ist jedoch klar, dass sich die Eigenschaften einer planaren PAA-Bürste unter sauren und pH-neutralen Bedingungen deutlich unterscheiden müssen. Aufgrund der vollständigen Protonierung und der daraus resultierenden weitgehenden Elektroneutralität der PAA-Bürste in saurem Milieu können elektrostatische Wechselwirkungen und die Gegenionenverdampfung (vgl. Kapitel 1, Seite 4 f.) als zentrale Triebkräfte der Proteinadsorption nicht länger maßgeblich sein. Im Gegenzug können Ion-Dipol-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und Van der Waals-Wechselwirkungen für die Proteinadsorption wichtiger werden.

Durch diese Unterschiede wird der Effekt einer Erhöhung der Ionenstärke sogar ins Gegenteil umgekehrt: So führt eine Erhöhung der Kochsalzkonzentration in Gegenwart des Proteins auf 500 mM nicht wie an einer geladenen PAA-Bürste zu einer Desorption des Proteins (z. B. [20], für Insulin auch [138] oder auch **Abbildung 46**, Seite 119), sondern es kann ein drastisch erhöhter Adsorptionsgrad festgestellt werden (vgl. **Abbildung 42**, Seite 111 und **Abbildung 43**). Im Mittel wiederholter Messungen ergibt sich eine Erhöhung um einen Faktor von ca. (6 ± 1) .

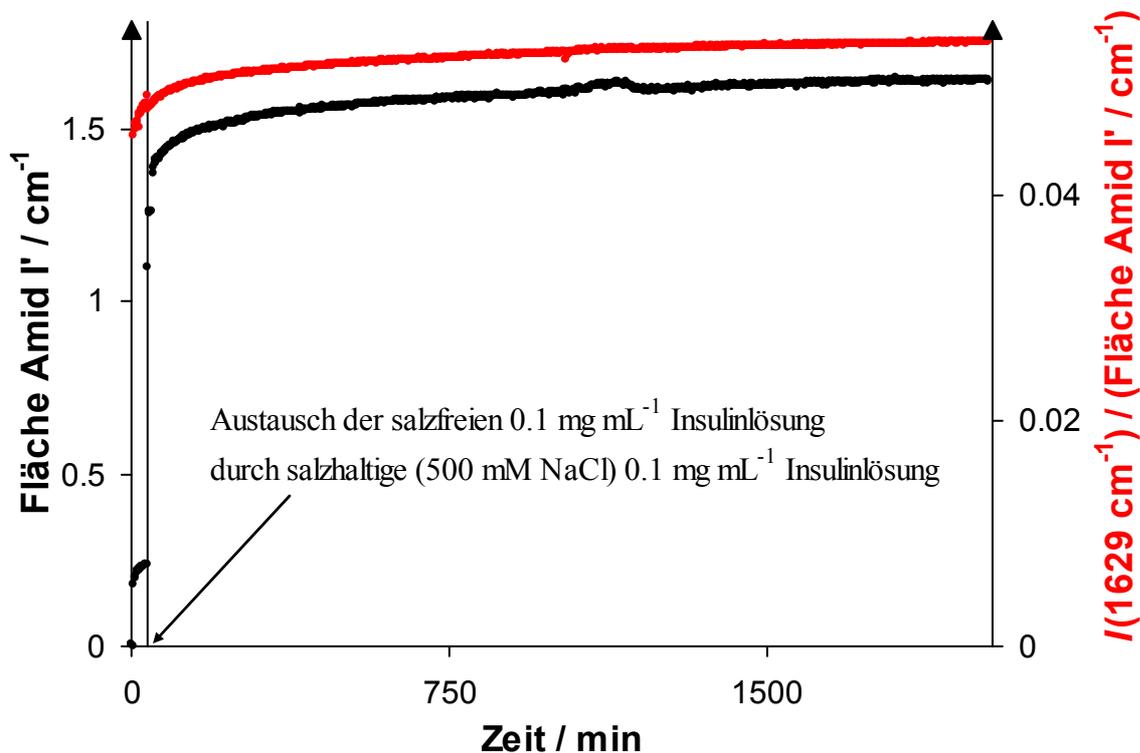


Abbildung 43. Adsorptionskinetik von Rinderinsulin an einer planaren PAA-Bürste bei $\text{pH} = 2$ und $\vartheta = 23.5 \text{ }^\circ\text{C}$; die Gesamtfläche der Amid I'-Bande (schwarze Datenpunkte, linke Achse) aufgetragen im Vergleich mit der Intensität I bei 1629 cm^{-1} relativ zur Fläche der Amid I'-Bande (rote Datenpunkte, rechte Achse, Indikator für Veränderungen des Anteils von β -Faltblättern an der Sekundärstruktur des Proteins).

Diese lässt sich durch die Abschwächung der repulsiven elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den unter diesen Bedingungen positiv geladenen Insulinmolekülen bei einer Erhöhung der Ionenstärke erklären (Abnahme der Debyelänge r_D [107]).

Anhand der aufgenommenen ATR-FTIR-Spektren kann auch die Frage beantwortet werden, ob der Anstieg in der Menge des an der planaren PAA-Bürste adsorbierten Proteins auch mit einer fibrillären Aggregation des Insulins einhergeht. In diesem Fall wäre ein drastischer Anstieg des Anteils an β -Faltblattstrukturen an der gesamten Sekundärstruktur des Proteins zu verzeichnen. Als Indikator hierfür kann der Anstieg einer Bande in der Nähe von 1629 cm^{-1} (vgl. **Tabelle 3**, Seite 25) relativ zur Gesamtfläche der Amid I'-Bande angesehen werden.

Insofern wird anhand der in **Abbildung 43** (Seite 112) gezeigten Daten deutlich, dass es weder direkt durch die Zugabe von Salz noch während der stundenlangen Einwirkzeit des Salzes zu einer fibrillären Aggregation des Proteins kommt.

Dies wird auch anhand der Betrachtung von flächennormierten Spektren unter den verschiedenen Bedingungen (**Abbildung 44** (Seite 114)) und durch Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse (**Tabelle 37**) deutlich.

Um einen Eindruck des Effekts einer (weitgehenden) fibrillären Aggregation auf die Amid I'-Bande bzw. die Sekundärstruktur zu vermitteln, ist in **Abbildung 44** (Seite 114) zusätzlich ein Spektrum von in Lösung aggregiertem Insulin (nach [101] in Lösung bei erhöhten Temperaturen bei $\text{pH} = 2$ erhalten) dargestellt. Das Ergebnis der Sekundärstrukturanalyse für dieses Spektrum ist in **Tabelle 37** ebenfalls mit aufgeführt.

Tabelle 37. Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse durch Bandenanpassung für Infrarotspektren von Rinderinsulin bei $\text{pH} = 2$ (in D_2O) und $\vartheta = 23.5\text{ }^\circ\text{C}$ (außer aggregiertes Protein) an einer planaren PAA-Bürste in Gegenwart und Abwesenheit von 500 mM NaCl im Vergleich zu gelöstem und fibrillär aggregiertem Protein.

Banden-Nr.	1.1	1.2	2	3	4	5
$\tilde{\nu}_0 / \text{cm}^{-1}$	1681 ± 2	1667 ± 2	1653 ± 2	1641 ± 2	1629 ± 2	1610 ± 2
Zuordnung	Schleifen		α -Helix	ungeordn.	Faltblatt	Basislinie
Flächen% adsorbiert	3 - 6	18 - 22	29 - 30	21	23 - 24	1 - 3
Flächen% adsorbiert (mit 500 mM NaCl)	6	19 - 22	28 - 29	20 - 22	22 - 23	2
Flächen% gelöst nativ	8	18 - 19	29 - 31	22	20 - 22	2
Flächen% Amyloid-fibrillen	1	9	13	1	70	6

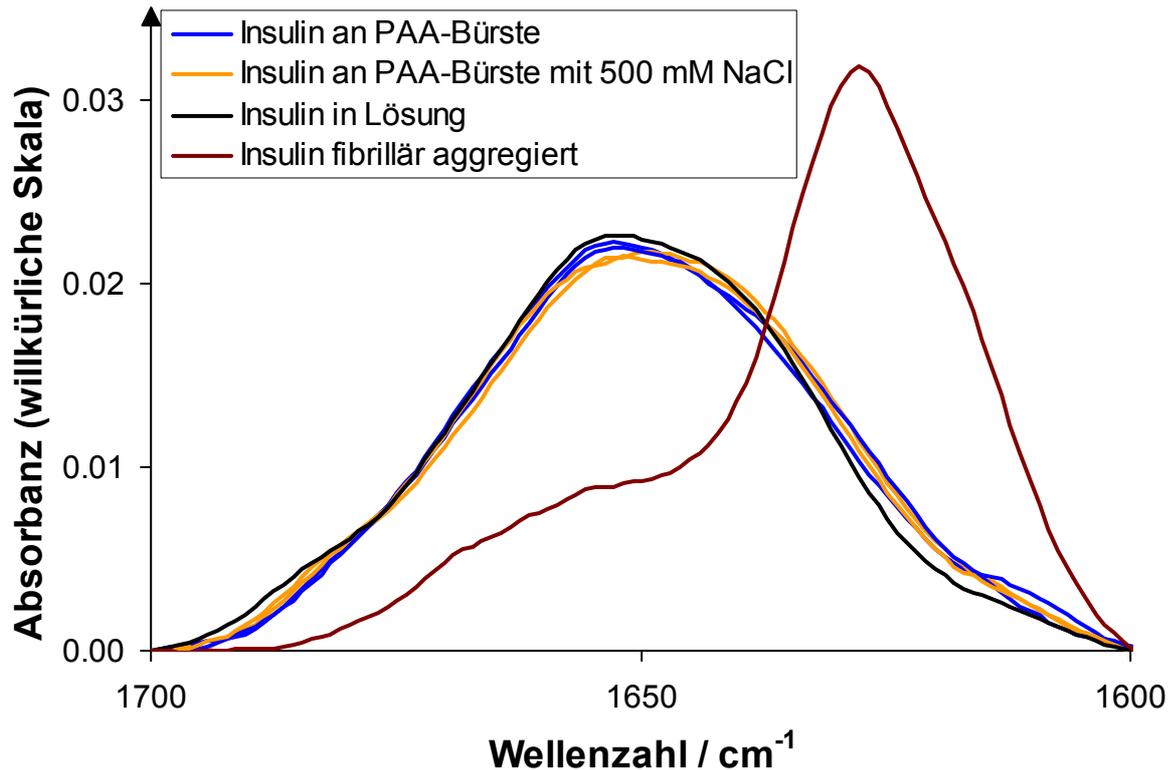


Abbildung 44. Im Bereich von $1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ flächennormierte FTIR-Spektren von an einer planaren PAA-Bürste adsorbiertem Rinderinsulin bei $\text{pH} = 2$ (in D_2O) und $\vartheta = 23.5 \text{ }^\circ\text{C}$ in Gegenwart (orange) und Abwesenheit (blau) von 500 mM NaCl unter Berücksichtigung von reproduzierten Ergebnissen (doppelte Linien) im Vergleich zu ohne Kochsalz gelöstem Insulin (schwarz) und fibrillär aggregiertem Protein (braun).

Die Ergebnisse zeigen, dass unter den untersuchten Bedingungen kaum Veränderungen in der Sekundärstruktur von Insulin auftreten, insbesondere unter Berücksichtigung des Vergleichs mit amyloidem Protein. So ist kein nennenswerter Anstieg des Anteils von β -Faltblattstrukturen bei Adsorption an einer planaren PAA-Bürste unter sauren Bedingungen im Vergleich zur Lösung festzustellen (vgl. **Tabelle 37**, Seite 113). Dieses Ergebnis weicht geringfügig von früher erhaltenen Ergebnissen mit Insulin an einer planaren PAA-Bürste unter sauren Bedingungen [138] ab. Dort wurde ein leichter Anstieg des β -Faltblattanteils um 10 - 13% festgestellt. Mögliche Ursachen sind eine andere Insulincharge und / oder kleinere Unterschiede in den experimentellen Bedingungen im Vergleich zu den vorherigen Messungen, wie z. B. in der Temperatur, dem pH-Wert, der Packungsdichte der PAA-Ketten an der Bürstenoberfläche oder der Inkubationsdauer. Ein massiver Anstieg des Anteils von β -Faltblattstrukturen, welcher auf die Bildung von Amyloidfibrillen hindeuten würde, kann aber sowohl anhand der in **Tabelle 37** (Seite 113) dargestellten Ergebnisse als auch anhand der Daten aus [138] (bei stationärer Lösung) klar ausgeschlossen werden.

Dieser Eindruck wird auch durch die Ergebnisse von Adsorptionsexperimenten mit Insulin an einer planaren PAA-Bürste in saurem Milieu in Gegenwart von 2 M Glycerin bestätigt. Die entsprechenden Spektren stammen dabei aus dem Plateaubereich von einstündigen Adsorptionsexperimenten (vgl. Abschnitt 3.4.3, Seite 66). Die Aufnahme aller Vergleichsspektren in Lösung erfolgte gemäß Kapitel 3.6.2 (Seite 79 f.). Der mögliche Erkenntnisgewinn aufgrund eines Einsatzes von Glycerin im Zusammenhang mit der Aggregation von Insulin an einer Oberfläche wird im folgenden Abschnitt 4.3.2 (Seite 116 ff.) im Zusammenhang mit Neutronenreflektivitätsuntersuchungen diskutiert.

Die in **Abbildung 45** dargestellten Spektren von Insulin an einer planaren PAA-Bürste in Gegenwart von 2 M Glycerin zeichnen sich durch ein leicht zu höheren Wellenzahlen verschobenes Maximum im Vergleich zu den in Abwesenheit von Glycerin erhaltenen Spektren aus. Anhand der Sekundärstrukturanalyse (**Tabelle 38**, Seite 116) wird ein niedrigerer Anteil von β -Faltblättern im Proteinadsorbat in Gegenwart von Glycerin deutlich. Dies mag auf eine Verschiebung des bei niedrigen pH-Werten wichtigen Dimer-Monomer-Gleichgewichts zugunsten des Monomers im Adsorbat hindeuten, weil die Dimere über intermolekulare β -Faltblätter zusammengehalten werden (vgl. **Abbildung 10**, Seite 18, [97])

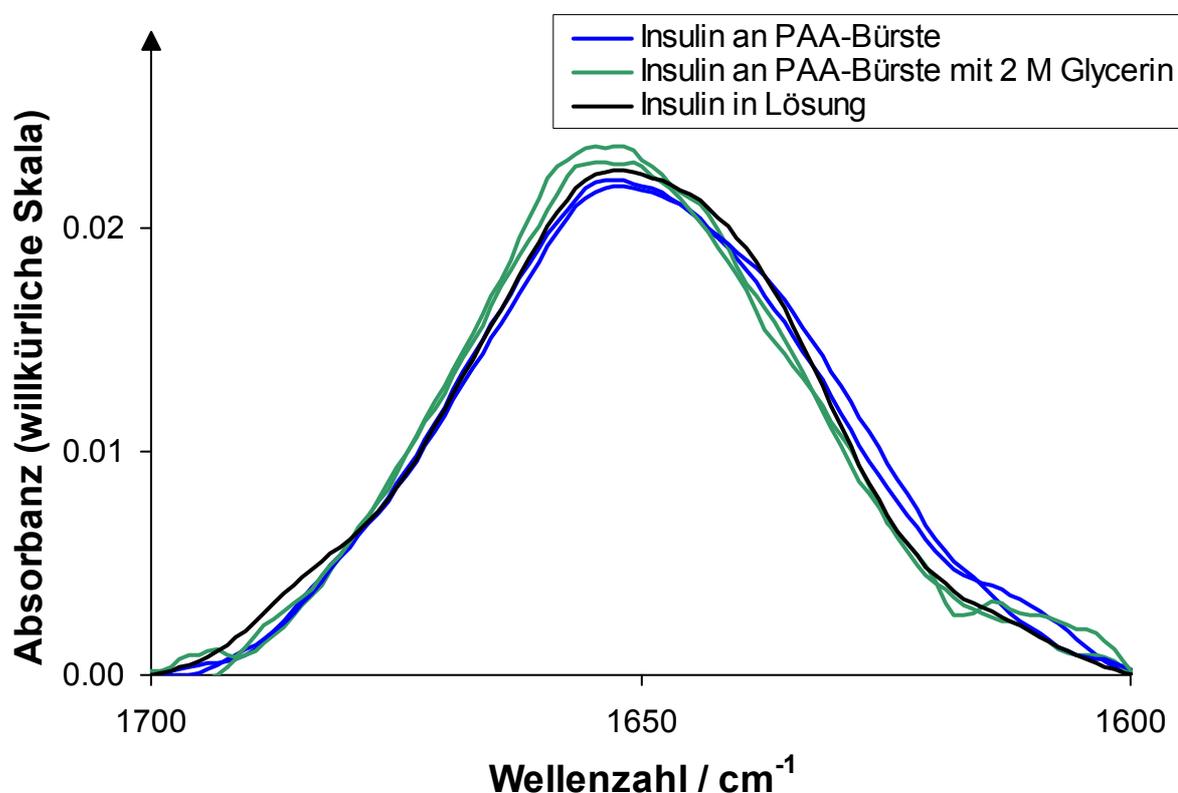


Abbildung 45. Im Bereich von 1700 - 1600 cm^{-1} flächennormierte FTIR-Spektren von an einer planaren PAA-Bürste adsorbiertem Rinderinsulin bei pH = 2 (in D_2O) und $\vartheta = 23.5^\circ\text{C}$ in Gegenwart (grün) und Abwesenheit (blau) von 2 M Glycerin unter Berücksichtigung von reproduzierten Ergebnissen (doppelte Linien) im Vergleich zu gelöstem Insulin (schwarz).

Tabelle 38. Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse durch Bandenanpassung für Infrarot-Spektren von Rinderinsulin bei $\text{pH} = 2$ (in D_2O) und $\vartheta = 23.5^\circ\text{C}$ an einer planaren PAA-Bürste in Gegenwart und Abwesenheit von 2 M Glycerin im Vergleich zu gelöstem Protein.

Banden-Nr.	1.1	1.2	2	3	4	5
$\tilde{\nu}_0 / \text{cm}^{-1}$	1681 ± 2	1667 ± 2	1653 ± 2	1641 ± 2	1629 ± 2	1610 ± 2
Zuordnung	Schleifen		α -Helix	ungeordn.	Faltblatt	Basislinie
Flächen% adsorbiert	3 - 6	18 - 22	29 - 30	21	23 - 24	1 - 3
Flächen% adsorbiert (mit 2 M Glycerin)	5 - 7	22 - 23	31 - 34	20	15	3 - 4
Flächen% gelöst	8	18 - 19	29 - 31	22	20 - 22	2
Flächen% gelöst (mit 2 M Glycerin)	9	19	30 - 31	21	20	1

Hier zeichnet sich eine Übereinstimmung mit Literaturdaten bezüglich des Einflusses von Ethanol auf das Assoziationsgleichgewicht von Insulin bei niedrigem pH-Wert ab [144-145]: Ethanol verschiebt ebenfalls das Dimer-Monomer-Gleichgewicht auf die Seite des Monomers und führt zum Aufbruch von β -Faltblattstrukturen.

Außerdem ist anhand der Resultate gesichert, dass auch die Anwesenheit von Glycerin eine fibrilläre Aggregation an der PAA-Bürste nicht fördert.

Auf die Struktur des gelösten Proteins scheint die Anwesenheit von Glycerin in dieser Konzentration hingegen keinen nennenswerten Einfluss zu haben (vgl. **Tabelle 38**), weswegen auf eine separate Darstellung des Spektrums von gelöstem Protein in Gegenwart von 2 M Glycerin in **Abbildung 45** (Seite 115) verzichtet wurde.

4.3.2 Vergleich mit Ergebnissen der Neutronenreflektometrie unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses von Glycerin

Die besondere Stärke der Neutronenreflektometrie liegt in der Möglichkeit, zuverlässige Informationen über das Streulängendichteprofil an der Grenzfläche und somit letztlich unter anderem über die Schichtdicke von Proteinadsorbaten zu erhalten. Hierzu werden aufgrund von physikalisch sinnvollen Annahmen erzeugte mathematische Modelle an die gemessenen Streukurven angepasst und auf diese Weise die gewünschten Parameter erhalten. Der Quantifizierung der Proteinadsorption von Rinderinsulin an einer PAA-Bürste liegen Schichtenmodelle zugrunde.

Es werden folgende Ergebnisse für die adsorbierte Proteinmasse bei unterschiedlichen Bedingungen mit einem experimentellen Fehler von ca. 20% erhalten (**Tabelle 39** [143]):

Tabelle 39. Mittels Neutronenreflektometrie bestimmte Werte für die pro Flächeneinheit adsorbierte Proteinmasse m_A in mg m^{-2} bei $\vartheta = 23.5\text{ °C}$ unter verschiedenen Bedingungen an einer planaren PAA-Bürste [143].

Bedingungen	ohne Kochsalz	mit 500 mM NaCl
pH \approx 7	1.1	0.3
pH \approx 2	4.0	20
2 M Glycerin, pH \approx 2	2.0	3.9

So wird erneut zweifelsfrei festgestellt, dass unter pH-neutralen Bedingungen eine Erhöhung der Ionenstärke zu einer Proteindesorption führt. Dieser Effekt wird in Kapitel 1 (Seite 4 f.) sowie in einer Reihe von Publikationen ausführlich diskutiert [15, 146-147].

Auch der mittels Neutronenreflektometrie festgestellte Anstieg des Adsorptionsgrades durch Erhöhung der Kochsalzkonzentration auf 500 mM stimmt mit den Ergebnissen der ATR-FTIR-Spektroskopie (Abschnitt 4.3.1 (Seite 111 ff.)) überein. In diesem Zusammenhang wird zusätzlich gezeigt, dass das Proteinadsorbat sogar deutlich über die Reichweite der PAA-Ketten hinaus vorzufinden ist.

Während mittels ATR-FTIR-Spektroskopie eine fibrilläre Aggregation im Zuge des massiven Anstiegs des Adsorptionsgrades bei der Zugabe von Salz schon allein aufgrund der Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse ausgeschlossen werden kann, wird im Zuge der Neutronenmessungen eine Aussage hierüber durch den Vergleich mit in Gegenwart von 2 M Glycerin adsorbiertem Protein ermöglicht.

So ist zum einen bekannt, dass Glycerin nicht in der Lage ist, Amyloidfibrillen aufzulösen [144]. Dagegen kann eine Beschleunigung der für eine fibrilläre Aggregation notwendigen Änderungen in der Konformation des Peptids β -Amyloid (Hauptbestandteil der im Zusammenhang mit der Alzheimer-Krankheit auftretenden Amyloidablagerungen) in Gegenwart von 1.2 M Glycerin nachgewiesen werden [148].

Auf der anderen Seite reduziert Glycerin die Tendenz von Proteinen, z. B. an der Silizium-Wasser-Grenzfläche zu adsorbieren [62]. Dies lässt sich gut anhand der kosmotropen Eigenschaften dieses Cosolvens verstehen: Da Glycerin günstigere Wechselwirkungen mit Wasser als mit der Protein-Wasser-Grenzfläche eingeht, wird es von der Proteinoberfläche ausgeschlossen. Entsprechend wird die Proteinoberfläche bevorzugt hydratisiert (vgl. Kapitel 1, Seite 6 ff., z. B. [35, 51]). Eine Verringerung des Adsorptionsgrades ist in diesem Zusammenhang plausibel, weil sowohl die oftmals mit der Adsorption von Proteinen einhergehende Dehydratisierung der Proteinoberfläche als auch die in vielen Fällen

festzustellende Änderung in der Proteinstruktur durch die Anwesenheit des kosmotropen Agens erschwert werden sollte [11, 62].

Aufgrund dieser Eigenschaften sollte es möglich sein, Glycerin als Sonde für die Unterscheidung zwischen fibrillären und amorphen Aggregaten einzusetzen. Bei fibrillären Aggregaten ist nicht zu erwarten, dass Glycerin deren Bildung inhibiert. Im Falle einer amorphen Aggregation¹⁴ sollte dagegen ein deutlicher Rückgang im Adsorptionsgrad festzustellen sein. Da der Zusatz von 2 M Glycerin unter sauren Bedingungen sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Kochsalz zu einem deutlichen Rückgang des Adsorptionsgrades führt (vgl. **Tabelle 39**, Seite 117), deuten also auch die Messungen mit Neutronenstrahlung darauf hin, dass an einer planaren PAA-Bürste auch in Gegenwart einer (stationären) sauren Insulinlösung unabhängig von der Anwesenheit von Kochsalz keine fibrilläre Aggregation stattfindet.

Eine Diskrepanz zwischen den Resultaten der ATR-FTIR-Spektroskopie und der Neutronenreflektometrie tritt nur beim Vergleich der adsorbierten Proteinmenge an einer planaren PAA-Bürste bei pH = 2 und pH = 7 auf. Die Neutronenreflektometrie liefert als Ergebnis einen bei pH = 7 niedrigeren Adsorptionsgrad als bei pH = 2, während die mittels ATR-FTIR-Spektroskopie gewonnenen Adsorptionskinetiken auf einen höheren Adsorptionsgrad von Rinderinsulin an einer planaren PAA-Bürste unter neutralen Bedingungen hinweisen (vgl. **Abbildung 42**, Seite 111 mit **Abbildung 46**, Seite 119 bzw. siehe [138]). Eine mögliche Ursache für einen Teil des beobachteten Unterschieds ist die Schwerlöslichkeit von Insulin in Lösungen mit neutralem pH-Wert. Im Rahmen der Diplomarbeit des Autors wurde bereits beschrieben, dass dies zu bemerkenswerten Effekten auf die Adsorptionskinetik von Rinderinsulin führen kann. So durchläuft bei mittels ATR-FTIR-Spektroskopie gewonnenen Adsorptionskinetiken die Fläche unter der Amid I'-Bande nach Zugabe von Insulinlösung (0.1 mg mL⁻¹) mit physiologischem pH-Wert ein Maximum und fällt danach mit Tendenz zu einem vergleichsweise niedrigen Wert ab (vgl. **Abbildung 46**, Seite 119). Durch einen Austausch mit frischer Insulinlösung kommt es zu einem erneuten Anstieg der Fläche unter der Amid I'-Bande. Wird zu Beginn eines solchen Adsorptionsexperiments die Lösung durch mehrfachen Austausch mit neuer Insulinlösung aufgefrischt, so geht die Fläche unter der Amid I'-Bande zumindest für einen Zeitraum von vier Stunden gegen einen Plateauwert, wie dies generell im Zusammenhang mit einer derartigen Adsorptionskinetik zu erwarten wäre (Daten nicht gezeigt).

¹⁴ Unter einer amorphen Aggregation wird in diesem Zusammenhang im Kern eine „gewöhnliche“ Adsorption mit besonders hohem Adsorptionsgrad verstanden.

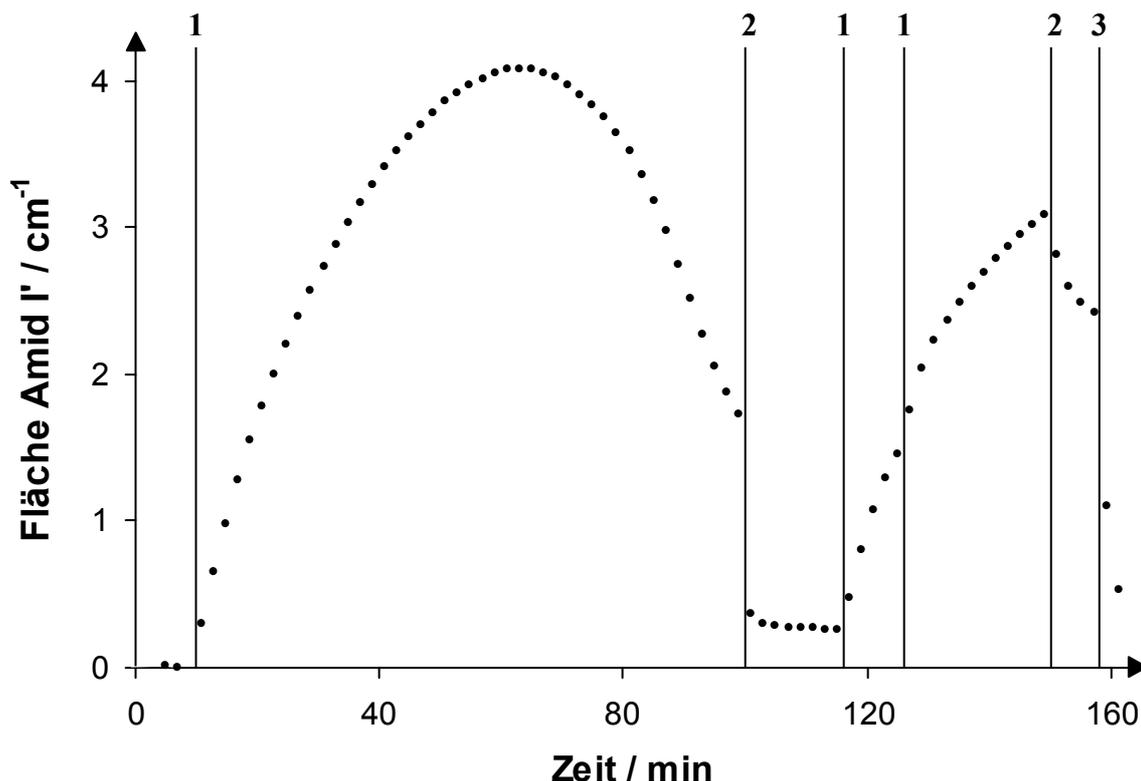


Abbildung 46. Adsorptionskinetik (entnommen aus der Diplomarbeit des Autors) von Rinderinsulin an einer planaren PAA-Bürste bei $\text{pH} = 7.4$ und $\vartheta = 20^\circ\text{C}$ (Austausch (vertikale Linien) der Lösung über der PAA-Bürste (zu Beginn 10 mM MOPS in D_2O , $\text{pH} = 7.4$) durch 1: 0.1 mg mL^{-1} Insulin in 10 mM MOPS-Puffer in D_2O , $\text{pH} = 7.4$, 2: 10 mM MOPS in D_2O , $\text{pH} = 7.4$, 3: 200 mM NaCl in 10 mM MOPS in D_2O , $\text{pH} = 7.4$).

Insofern scheint aufgrund in ihren Details ungeklärter Vorgänge die Lösung nach einer bestimmten Expositionszeit über der zu untersuchenden Oberfläche deutlich an Insulin zu verarmen. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Oberflächen als die zu untersuchende PAA-Bürste, die ebenfalls mit der Probenlösung in Kontakt stehen (z. B. die Gummidichtungen oder die Wand der Messzelle) hierbei eine Rolle spielen.

Ein in diesem Kontext wichtiger Unterschied zwischen der Neutronenreflektometrie und den durchgeführten ATR-FTIR-spektroskopischen Experimenten ist der Zeitraum, der für die Gewinnung aussagekräftiger Ergebnisse benötigt wird. Für die Generierung eines interpretierbaren IR-Spektrums wird ca. eine Minute benötigt, während den Ergebnissen der Neutronenreflektometrie Messungen mit einer Dauer von einigen Stunden zugrunde liegen. Da bei den Messungen mit Neutronenstrahlung vor Messbeginn auch noch mindestens eine Stunde in Gegenwart der Insulinlösung equilibriert wurde [143], ist wahrscheinlich, dass unter der Voraussetzung vergleichbarer Einflüsse durch die Oberflächen in der Messzelle der größte Anteil der Messung bei einem deutlich geringeren als dem maximal mit einer

Insulinlösung dieser Konzentration zu erreichenden Adsorptionsgrad durchgeführt wurde. Dies macht sicherlich einen Teil der Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der Neutronenstreuung [143] und der ATR-FTIR-Spektroskopie [138] bezüglich des Adsorptionsgrades von Insulin im Vergleich zwischen neutraler und saurer Umgebung aus.

Für einen prinzipiell höheren (möglichen) Adsorptionsgrad unter pH-neutralen Bedingungen spräche auch ein Kollaps der PAA-Bürste unter sauren Bedingungen, d. h. eine starke Verringerung der Dicke der Bürste, wie er für kolloidale PAA-Bürstenpartikel festgestellt wird [149]. Mögliche Erklärungen wären ein verringerter osmotischer Druck und eine verminderte elektrostatische Abstoßung der Carboxylationen in der Bürste aufgrund der unter sauren Bedingungen weitgehend fehlenden Ionen. Wenn ein solcher Kollaps auch bei planaren PAA-Bürsten aufträte, wäre der für eine Einlagerung von Proteinen zur Verfügung stehende dreidimensionale Raum ebenfalls deutlich verringert.

Allerdings gibt es einen bedeutsamen Unterschied zwischen planaren und auf der Oberfläche von Kolloidpartikeln angebrachten PAA-Bürsten: Bei sphärischen Kolloidpartikeln nimmt der Kettenabstand nach außen hin ab, während er auf einer planaren Oberfläche keine Abhängigkeit vom Abstand zeigt. Insofern kann eine Abschätzung hilfreich sein, inwieweit in einer planaren PAA-Bürste eine an der Oberfläche angebrachte Polymerkette überhaupt die Gelegenheit hat, in eine weniger gestreckte Konformation überzugehen. Hierzu ist es sinnvoll, den mittleren quadratischen End-zu-End-Abstand L_E eines zufällig angeordneten Polymerknäuels mit dem Abstand L_P zweier Polymerketten zu vergleichen.

Auf Basis einer „random walk“-Statistik [107] gilt:

$$L_E = \sqrt{N \cdot l^2} \quad (31)$$

In Gleichung (31) ist N die Anzahl der Wiederholungseinheiten, in diesem Fall also die Anzahl der Monomere der verwendeten PAA-Kette. l ist die Distanz der Untereinheiten (Schrittweite). Im Falle der PAA-Kette entspricht dies dem Abstand zweier Monomere. Die Voraussetzungen für die Berechnung dieses Abstandes sind **Abbildung 47** (Seite 121) zu entnehmen. Hieraus ergibt sich aufgrund von trigonometrischen Überlegungen mit dem Tetraederwinkel $\alpha = 109.5^\circ$ und der Länge der C-C-Einfachbindung $l_{c-c} = 0.1531$ nm (aus [126] für die Situation $(C\#)_2CH-CH_2(C\#)$) nach Gleichung (32):

$$l = 2 \cdot \sin \frac{\alpha}{2} \cdot l_{c-c} = 0.25 \text{ nm} \quad (32)$$

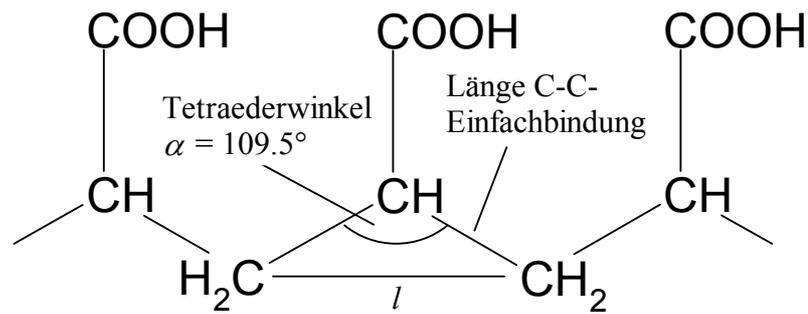


Abbildung 47. Darstellung eines Ausschnitts aus einer Poly(acrylsäure)-Kette zur Verdeutlichung der Berechnung des Abstands zweier Monomere nach Gleichung (32).

Unter Berücksichtigung von Formel (32) ($l = 0,25 \text{ nm}$) ergibt sich nach Zusammenhang (31) ein Wert von $L_E = 4,78 \text{ nm}$ für den mittleren End-zu-End-Abstand von ungebundenen PAA-Ketten mit einer Länge von $N = 278$ Monomeren.

Der Abstand der Ketten auf der Oberfläche L_P lässt sich beispielsweise unter der Annahme einer hexagonalen Packung der Ketten auf der Oberfläche bei bekannter Oberflächenbelegung σ_{Kette} berechnen. Nach **Abbildung 48** teilen sich jeweils ein Sechstel der PAA-Ketten 2 und 4 und jeweils ein Drittel der PAA-Ketten 1 und 3 die orange umrandete Fläche.

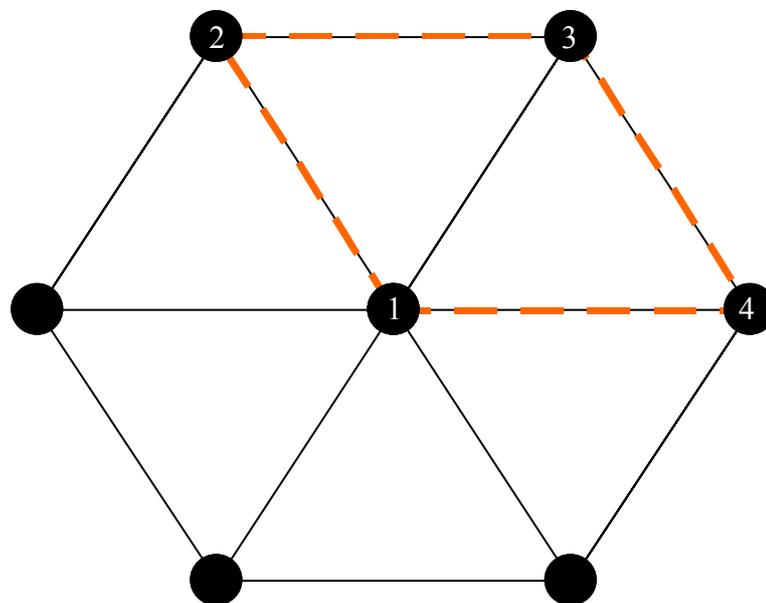


Abbildung 48. Darstellung einer zweidimensional hexagonalen Packung; orange umrandet diejenige Fläche, die für eine PAA-Kette (schwarze Kreise) zur Verfügung steht.

Insgesamt ist dies also die Fläche, die für eine PAA-Kette zur Verfügung steht. Diese entspricht der Fläche von zwei gleichseitigen Dreiecken mit der Fläche A_Δ , deren Kantenlänge dem Abstand zwischen zwei Ketten L_P entspricht. Entsprechend gilt Zusammenhang (33) (Seite 122):

$$2 \cdot A_{\Delta} = 2 \cdot \frac{1}{4} \cdot \sqrt{3} \cdot L_p^2 = \frac{1}{\sigma_{\text{Kette}}} \Leftrightarrow L_p = \sqrt{\frac{2}{\sqrt{3} \cdot \sigma_{\text{Kette}}}} \quad (33)$$

Mit einem Wert von $\sigma_{\text{Kette}} = 0.1 \text{ nm}^{-2}$ ergibt sich für den Abstand zweier PAA-Ketten auf der Oberfläche ein Wert von $L_p = 3.40 \text{ nm}$.

Als Konsequenz dieser Berechnungen ($L_p = 3.40 \text{ nm} < 4.78 \text{ nm} = L_E$) sollten sich benachbarte Polymere in einer PAA-Bürste mit $\sigma_{\text{Kette}} = 0.1 \text{ nm}^{-2}$ gegenseitig in ihrer Konformation beeinflussen. Dieser Eindruck verstärkt sich noch durch Berücksichtigung der Tatsache, dass es sich bei einer PAA-Kette nicht um ein ideales statistisches Knäuel handelt. So treten in einer PAA-Kette Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel Wasser und anderen Teilen der Kette auf. Hierdurch ergibt sich eine modifizierte Form von Gleichung (31) [150]:

$$L_E = \sqrt{C_{\infty} N \cdot l^2} \quad (34)$$

Der neu hinzugekommene Faktor C_{∞} bewegt sich für typische lineare Polymere im Bereich von ungefähr 4 -10 (siehe Auflistung in [150]). Insgesamt bleibt zu diskutieren, wie stark in einer planaren PAA-Bürste mit einer Oberflächenbelegung von $\sigma_{\text{Kette}} = 0.1 \text{ nm}^{-2}$ ein Kollaps möglich ist. Prinzipiell könnte es nach dieser Rechnung auch an einer planaren PAA-Bürste durchaus noch Spielraum für einen Übergang der PAA-Ketten in eine stärker knäuelartige Konformation geben.

Allerdings lassen die auf Basis der Neutronenreflektivitätsmessungen erhaltenen Streulängendichteprofile der PAA-Bürste unter neutralen und sauren Bedingungen keinen Rückschluss auf eine deutlich verringerte Dicke der PAA-Bürste unter sauren im Vergleich zu neutralen Bedingungen zu. Insofern kann eine Reduktion des Adsorptionsgrades unter sauren Bedingungen schwierig mit einer deutlich geringeren Dicke der PAA-Bürste erklärt werden. Zudem weisen auch die in [138] dargestellten Ergebnisse der TIRF-Messungen von mit dem Alexa[®] 488-Fluorophor markiertem Insulin auf einen höheren Adsorptionsgrad bei $\text{pH} = 2$ im Vergleich zu $\text{pH} = 7$ hin, weil die bei reduziertem pH-Wert erhaltenen Spektren aufgrund höherer Fluoreszenzemissionsintensitäten erkennbar rauschärmer sind. Ein durch die Ergebnisse der ATR-FTIR-Spektroskopie angedeuteter verringerter Adsorptionsgrad von Insulin an einer planaren PAA-Bürste bei $\text{pH} = 2$ muss daher in Zweifel gezogen werden, zumal eine Quantifizierung der adsorbierten Proteinmengen durch den Vergleich der unter den verschiedenen Bedingungen erhaltenen Adsorptionskinetiken eine eingeschränkte Aussagekraft besitzt (siehe auch Abschnitt 2.2.7, Seite 31). Gleichwohl wird der Adsorptionsgrad von Insulin unter neutralen Bedingungen durch die Neutronenreflektometrie (vgl. **Tabelle 39** (Seite 117)) wahrscheinlich unterschätzt (vgl. Seite 118 ff.).

Insgesamt wird anhand der in diesem Kapitel diskutierten Ergebnisse der Einsetzbarkeit einer planaren PAA-Bürste als biokompatible Materialbeschichtung ein neuer Aspekt hinzugefügt. So zeigen die Ergebnisse der ATR-FTIR-Spektroskopie und der Neutronenreflektometrie unabhängig voneinander, dass das amyloidogene Protein Insulin unter sauren Bedingungen an einer planaren PAA-Bürste nicht zur Ausbildung fibrillärer Aggregate neigt. Dies steht auch mit Messungen im Rahmen der Diplomarbeit des Autors im Einklang, bei denen gezeigt wurde, dass bei erhöhten Temperaturen ($\vartheta = 60\text{ °C}$) unter sauren Bedingungen ($\text{pH} \approx 2$) keine fibrilläre Aggregation von an einer planaren PAA-Bürste adsorbiertem Rinderinsulin auftritt, obwohl eine solche unter diesen Bedingungen in Lösung stattfinden würde [138].

4.4 Denaturierung von Lysozym und Rinderserumalbumin an einer planaren PAA-Bürste durch Harnstoff

Die in den vorangegangenen Kapiteln dargestellten Ergebnisse ermöglichen auf vielfältige Weise Vergleiche zwischen an einer planaren PAA-Bürste adsorbierten und gelösten Proteinen. Werden in Kapitel 4.1 (Seite 81 ff.) Aussagen über die Sekundärstruktur verschiedener Proteine getroffen, so steht in Abschnitt 4.2 (Seite 91 ff.) die enzymatische Aktivität von Meerrettichperoxidase im Mittelpunkt des Interesses. In Passus 4.3 (Seite 110 ff.) werden zur Bewertung der Möglichkeit einer fibrillären Aggregation von Insulin an einer planaren PAA-Bürste unter anderem die Eigenschaften des kosmotropen Cosolvens Glycerin ausgenutzt.

Auch in diesem Kapitel spielt der unspezifische Effekt gelöster Substanzen auf die Eigenschaften von Proteinen eine wichtige Rolle: Eine gezielte Denaturierung der Proteine Hühnerlysozym (Abschnitt 2.1.1, Seite 12 f.) und Rinderserumalbumin (Passus 2.1.3, Seite 15 f.) durch hohe Konzentrationen an chaotropem Harnstoff (vgl. Kapitel 1, Seite 6 ff. bzw. [36]) soll den auf Basis dieser Arbeit zu gewinnenden Gesamteindruck von den besonderen Eigenschaften einer planaren PAA-Bürste hinsichtlich der Proteinadsorption vervollständigen. Hierzu werden die Proteine in Lösung und an der planaren PAA-Bürste denaturiert und deren Eigenschaften im entfalteten Zustand und nach Wiederherstellung von nicht-denaturierenden Bedingungen verglichen. Hierbei sind in besonderem Maße Unterschiede zwischen der PAA-Bürste und der Lösung bezüglich der Reversibilität der Denaturierung von Interesse. In diesem Zusammenhang werden Aussagen über die Sekundärstruktur der adsorbierten Proteine durch Einsatz der ATR-FTIR-Spektroskopie (Passus 2.2, Seite 20 ff.) ermöglicht, während die TIRF-Spektroskopie (Abschnitt 2.3,

Seite 32 ff.) Angaben zur Tertiärstruktur der adsorbierten Proteine zulässt. Zum Vergleich werden die Ergebnisse von Fluoreszenzmessungen mit gelöstem Protein herangezogen.

4.4.1 Ergebnisse der ATR-FTIR-Spektroskopie für Lysozym an einer planaren PAA-Bürste in An- und Abwesenheit von 9.5 M Harnstoff bei neutralem pH-Wert

Anhand der in **Abbildung 49** dargestellten Adsorptionskinetik kann die Vorgehensweise bei der Untersuchung von Lysozym mittels ATR-FTIR-Spektroskopie an einer planaren PAA-Bürste in Ab- und Anwesenheit von 9.5 M Harnstoff verstanden werden.

Um auch in Gegenwart von 9.5 M Harnstoff im Bereich der Amid I'-Bande zuverlässige Spektren zu erhalten, ist die Aufnahme eines Messuntergrunds in Gegenwart von Harnstoff in Abwesenheit des Proteins erforderlich. Dies liegt in der starken Absorption von Harnstoff im Wellenzahlenbereich der Amid I'-Bande begründet. Der entsprechende Vorlauf ist in **Abbildung 49** nicht mit dargestellt und kann im experimentellen Teil (Kapitel 3.4.2, Seite 64 f.) nachvollzogen werden.

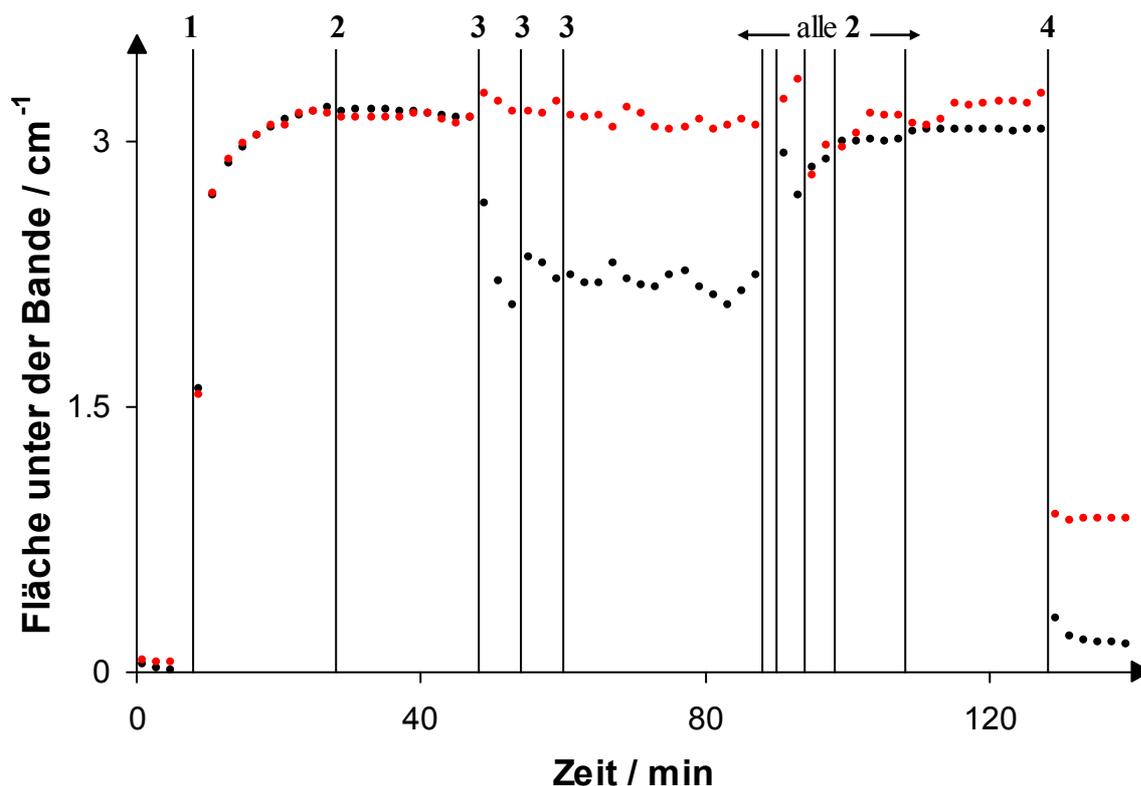


Abbildung 49. Adsorptionskinetik von Hühnerlysozym an einer planaren PAA-Bürste (Fläche der Amid I'-Bande in schwarz, Fläche unter den Banden im Bereich von 3010 cm^{-1} bis 2850 cm^{-1} (CH_2 -Streckschwingungen) skaliert mit einem Faktor 5.66 in rot) bei $\text{pH} = 7$ und $\vartheta = 30\text{ }^\circ\text{C}$ (Austausch (vertikale Linien) der Lösung über der PAA-Bürste (zu Beginn Puffer B) durch **1**: 0.2 mg mL^{-1} Lysozym in Puffer B, **2**: Puffer B, **3**: 9.5 M Harnstoff in Puffer B ($\text{pH} = 7.5$) **4**: 500 mM NaCl in Puffer B).

Nach Zugabe der Proteinlösung kommt es aufgrund der Adsorption des Proteins entsprechend zu einem starken Anstieg der Amid I'-Bande und damit der Fläche unter den im Bereich von 1700 cm^{-1} bis 1595 cm^{-1} basislinienkorrigierten Spektren. Aufgrund der hohen thermodynamischen Stabilität der nativen Proteinkonformation von Lysozym ist es erforderlich, zusätzlich zur Zugabe von 9.5 M Harnstoff die Temperatur auf $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu erhöhen, um eine Denaturierung des Proteins zu gewährleisten. Dadurch resultiert aber offenbar auch ein verringerter Adsorptionsgrad; die Werte für die Fläche unter der Amid I'-Bande sind nur etwa halb so groß wie die in Experimenten mit niedrigeren Temperaturen gefundenen Werte (vgl. z. B. **Abbildung 30**, Seite 86). In der Literatur sind bereits Daten zum Temperatureinfluss auf die Eigenschaften einer nach der in dieser Arbeit beschriebenen Methodik präparierten planaren PAA-Bürste verfügbar, der Effekt ist allerdings noch nicht abschließend verstanden [137]. So scheint die PAA-Bürste bei ca. $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ deutlich anzuschwellen und wesentlich mehr unter neutralen Bedingungen nettonegativ geladenes Rinderserumalbumin zu adsorbieren. Eine Desorption des Proteins durch Zugabe von Kochsalz ist dann nicht mehr möglich, woraus auf eine andere Triebkraft der Adsorption geschlossen werden kann. Allerdings kann im Zusammenhang mit den hier dargestellten Ergebnissen für Messungen bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ davon ausgegangen werden, dass die planare PAA-Bürste ihre wesentlichen Eigenschaften behält, weil das Lysozym am Ende der Kinetik mit Salz desorbiert werden kann (vgl. **Abbildung 49** rechts, Seite 124).

Der Austausch mit 9.5 M Harnstofflösung führt offenbar zu einem Rückgang der Fläche unter der Amid I'-Bande. Als Ursachen sind eine unvollständige Korrektur des Harnstoffhintergrunds oder eine mögliche Kopplung zwischen Peptid- und Harnstoffchromophoren denkbar. Weiterhin könnte die Entfaltung des Proteins mit einer Veränderung des mittleren Extinktionskoeffizienten einhergehen, weil sich die Extinktionskoeffizienten in den einzelnen Sekundärstrukturelementen unterscheiden und sich deren Anteile durch die Entfaltung verändern. Eine Desorption des Proteins kann hingegen ausgeschlossen werden, weil nach dem gründlichen Entfernen der Harnstofflösung die Bandenintensität vollständig wiederhergestellt wird. In **Abbildung 50** (Seite 126) sind die im Bereich der Amid I'-Bande flächennormierten Spektren von Lysozym vor der Harnstoffzugabe, in Anwesenheit von 9.5 M Harnstoff und nach dem Wegspülen der Harnstofflösung dargestellt. Augenscheinlich unterscheiden sich die Spektren vor der Zugabe und nach dem Wegspülen der Harnstofflösung kaum. Insofern ist die Entfaltung von Lysozym an der PAA-Bürste mit Hilfe von 9.5 M Harnstoff bei einer Temperatur von $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ hinsichtlich der Sekundärstruktur des Proteins ein völlig reversibler Prozess.

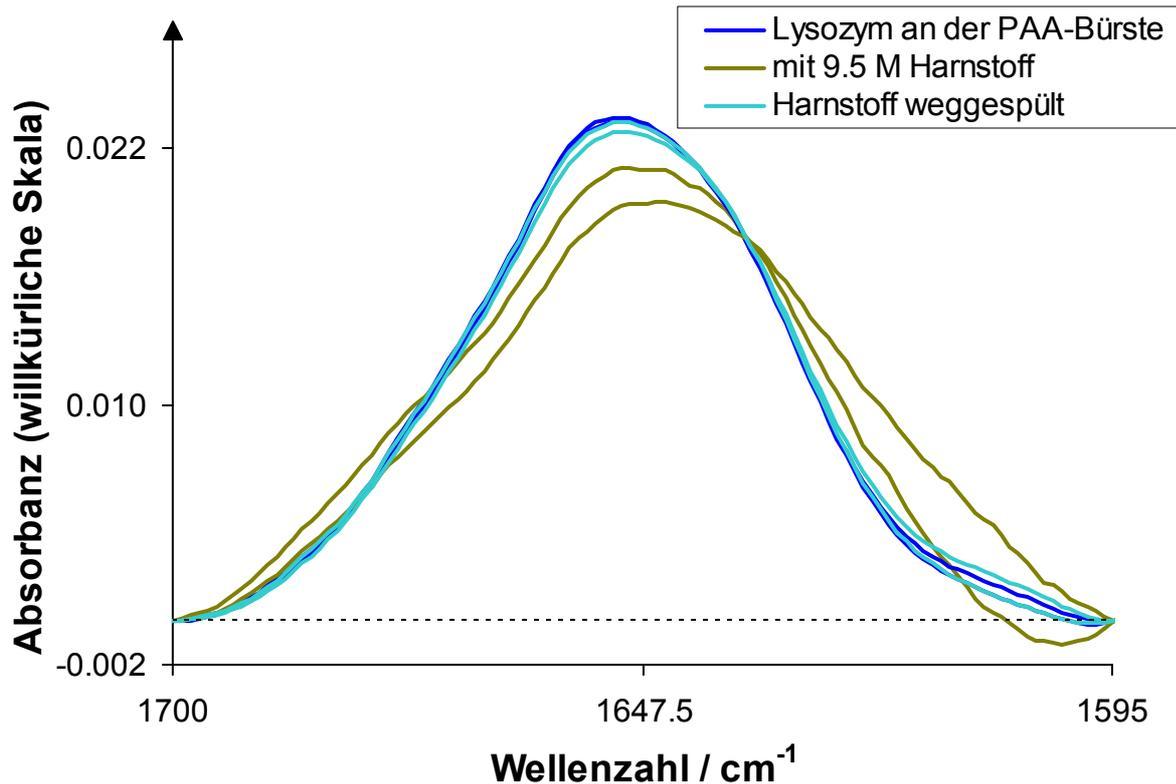


Abbildung 50. Im Bereich von 1700 - 1595 cm^{-1} flächennormierte ATR-FTIR-Spektren von Lysozym bei $\text{pH} = 7$ und $\vartheta = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ an einer planaren PAA-Bürste vor der Zugabe von Harnstoff (dunkelblau), in Anwesenheit von 9.5 M Harnstoff (dunkelgelb, $\text{pH} = 7.5$) sowie nach dem Wegspülen der Harnstofflösung (hellblau) unter Berücksichtigung reproduzierter Messungen (doppelte Linien).

Dies bestätigen auch die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse in **Tabelle 40**. Dabei ist auch die Reproduzierbarkeit sehr gut, was sich darin äußert, dass die entsprechenden Spektren zwischen Original- und Reproduktionsmessung in **Abbildung 50** kaum zu unterscheiden sind.

Tabelle 40. Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse durch Bandenanpassung für ATR-FTIR-Spektren von bei $\text{pH} = 7$ und $\vartheta = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ an einer PAA-Bürste adsorbiertem Hühnerlysozym vor dem Zusatz und nach dem Wegspülen von 9.5 M Harnstofflösung.

Banden-Nr.	1.1	1.2	2	3	4	5
$\tilde{\nu}_0 / \text{cm}^{-1}$	1684 ± 2	1671 ± 2	1654 ± 2	1638 ± 2	1639 ± 2	1607 ± 2
Zuordnung	Schleifen		α -Helix	ungeordn.	Faltblatt	Basislinie
Flächen% Lysozym vor Harnstoffzus.	2	12 - 13	45 - 46	26 - 27	13	1
Flächen% Lysozym nach Wegspülen	1 - 3	12	44 - 46	25 - 27	12 - 17	0 - 1

Bei den Spektren in Gegenwart von Harnstoff fallen Abweichungen zwischen Original- und Reproduktionsmessung auf (vgl. **Abbildung 50**, Seite 126). Wahrscheinlich ist dies auf den unvollständigen Abzug des Harnstoffhintergrunds zurückzuführen.

Dennoch ist das Maximum des Spektrums in Gegenwart von Harnstoff im Mittel doch deutlich zu kleineren Wellenzahlen hin verschoben; dies könnte auf eine Zunahme des Anteils von ungeordneten Strukturen im Zuge einer Proteinfaltung hindeuten. In Gegenwart von Harnstoff ist eine Sekundärstrukturanalyse aufgrund der Artefakte aus dem Harnstoffuntergrund nicht sinnvoll möglich.

Interessant ist aufgrund des hohen Adsorptionsgrades bei diesen Messungen auch eine Analyse des Spektrums im Bereich der CH_2 -Streckschwingungen. Dieser wird nicht von Schwingungen des Harnstoffs überlagert, so dass diese Banden in Gegenwart von Harnstoff ein zuverlässiges Maß für die adsorbierte Proteinmenge darstellen (vgl. rote Kurve in **Abbildung 49**, Seite 124). Die entsprechenden Ausschnitte der Spektren vor der Harnstoffzugabe, in Gegenwart von 9.5 M Harnstofflösung und nach dem Wegspülen der Harnstofflösung sind in **Abbildung 51** gezeigt.

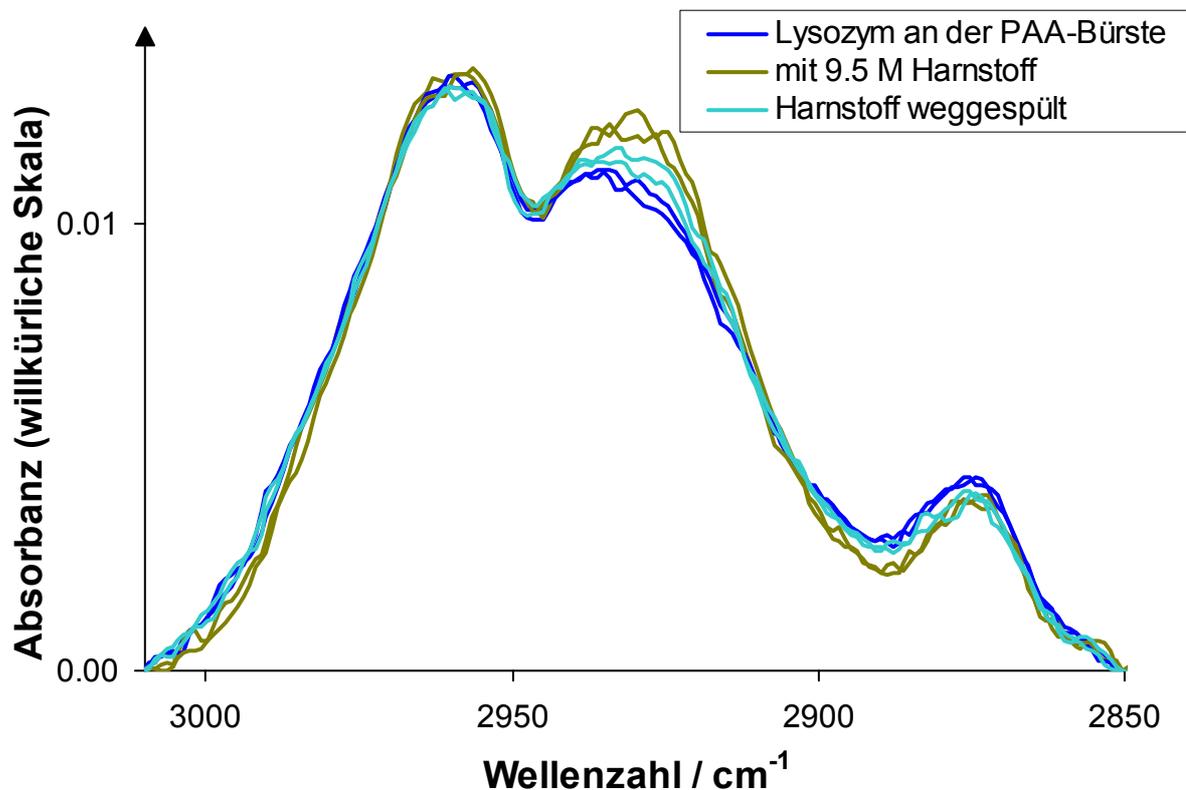


Abbildung 51. Im Bereich von $3010 - 2850 \text{ cm}^{-1}$ flächennormierte ATR-FTIR-Spektren von Lysozym bei $\text{pH} = 7$ und $\vartheta = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ an einer planaren PAA-Bürste vor der Zugabe von Harnstoff (dunkelblau), in Anwesenheit von 9.5 M Harnstoff (dunkelgelb, $\text{pH} = 7.5$) sowie nach dem Wegspülen der Harnstofflösung (hellblau) unter Berücksichtigung reproduzierter Messungen (doppelte Linien).

Anscheinend wird der spektrale Bereich der CH_2 -Streckschwingungen nur wenig durch die Anwesenheit der Harnstofflösung verändert (dunkelgelbe Spektren in **Abbildung 51**, Seite 127). Die am stärksten ausgeprägten Änderungen finden sich im Bereich der mittleren der drei aufgelösten Hauptbanden. Hier ist ein Anstieg in der Intensität des Maximums der Bande in Gegenwart von Harnstoff festzustellen, der durch das Wegspülen der Harnstofflösung zum größten Teil rückgängig gemacht wird.

Zur Bekräftigung der für Lysozym erhaltenen Ergebnisse sind in **Abbildung 52** die im Bereich der Amid I'-Bande flächennormierten Spektren von Ribonuclease A an einer PAA-Bürste vor Zugabe und nach dem Wegspülen von 9.0 M Harnstofflösung bei 20 °C gezeigt¹⁵. Es liegt eine der in **Abbildung 49** (Seite 124) ähnliche Adsorptionskinetik zugrunde. Ein Spektrum in Gegenwart von 9.0 M Harnstoff kann leider nicht gezeigt werden, weil bei dieser Messserie auf eine Korrektur des Harnstoffuntergrunds verzichtet wurde. Bei der ebenfalls unter pH-neutralen Bedingungen nettopositiv geladenen Ribonuclease A ist wie bei Lysozym eine fast vollständige Rückbildung zur Struktur vor der Denaturierung festzustellen.

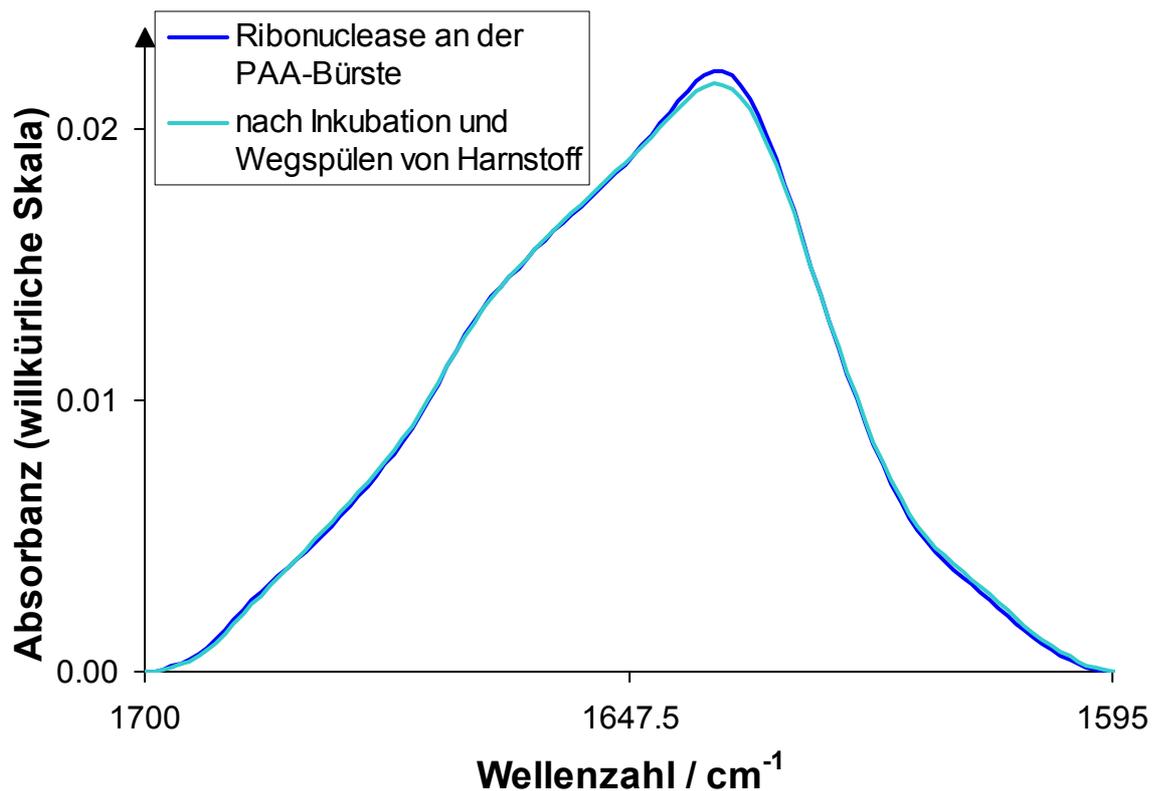


Abbildung 52. Im Bereich von 1700 - 1595 cm^{-1} flächennormierte ATR-FTIR-Spektren von Ribonuclease A bei $\text{pH} = 7$ und $\vartheta = 20$ °C an einer planaren PAA-Bürste vor der Zugabe von Harnstoff (dunkelblau) sowie nach dem Wegspülen der Harnstofflösung (hellblau).

¹⁵ Für Ribonuclease A sollte aufgrund seiner geringeren thermodynamischen Stabilität gegenüber Entfaltung (vgl. **Tabelle 1**, Seite 12) eine niedrigere Temperatur und leicht geringere Harnstoffkonzentration zur Denaturierung ausreichen. Allerdings wird die Entfaltung nicht wie bei BSA und Lysozym noch durch TIRF-Messungen bestätigt.

4.4.2 Ergebnisse der ATR-FTIR-Spektroskopie für BSA an einer planaren PAA-Bürste in An- und Abwesenheit von 8.0 M Harnstoff bei neutralem pH-Wert

Die experimentellen Details für die Untersuchung von an einer planaren PAA-Bürste adsorbiertem BSA in Abhängigkeit von der Anwesenheit von 8 M Harnstoff bei $\text{pH} \approx 7$ mittels ATR-FTIR-Spektroskopie sind in Kapitel 3.4.2 (Seite 64 f.) dargestellt. Die allgemeine Prozedur bei ATR-FTIR-Experimenten ist Gegenstand von Abschnitt 3.4 (Seite 61 f.). Die in **Abbildung 53** dargestellte Kinetik verdeutlicht die Vorgehensweise bei der Adsorption des Proteins und dem Einbringen und Wegspülen der Harnstofflösung. Analog zu den Messungen mit Lysozym (vgl. Passus 4.4.1, Seite 124 ff.) wird eine Korrektur des Harnstoffuntergrunds durch vorherige Messungen an der PAA-Bürste in Gegenwart von 8.0 M Harnstoff in Abwesenheit von Protein durchgeführt (nicht gezeigt).

Um eine ausreichende Adsorption von BSA an der PAA-Bürste zu gewährleisten, ist eine hohe Konzentration (2 mg mL^{-1}) der verwendeten Proteinlösung erforderlich. Anders als bei Lysozym (vgl. **Abbildung 49**, Seite 124) führt das fortlaufende Austauschen der Lösung über der PAA-Bürste durch proteinfreie Lösungen zu einer sukzessiven Desorption von BSA.

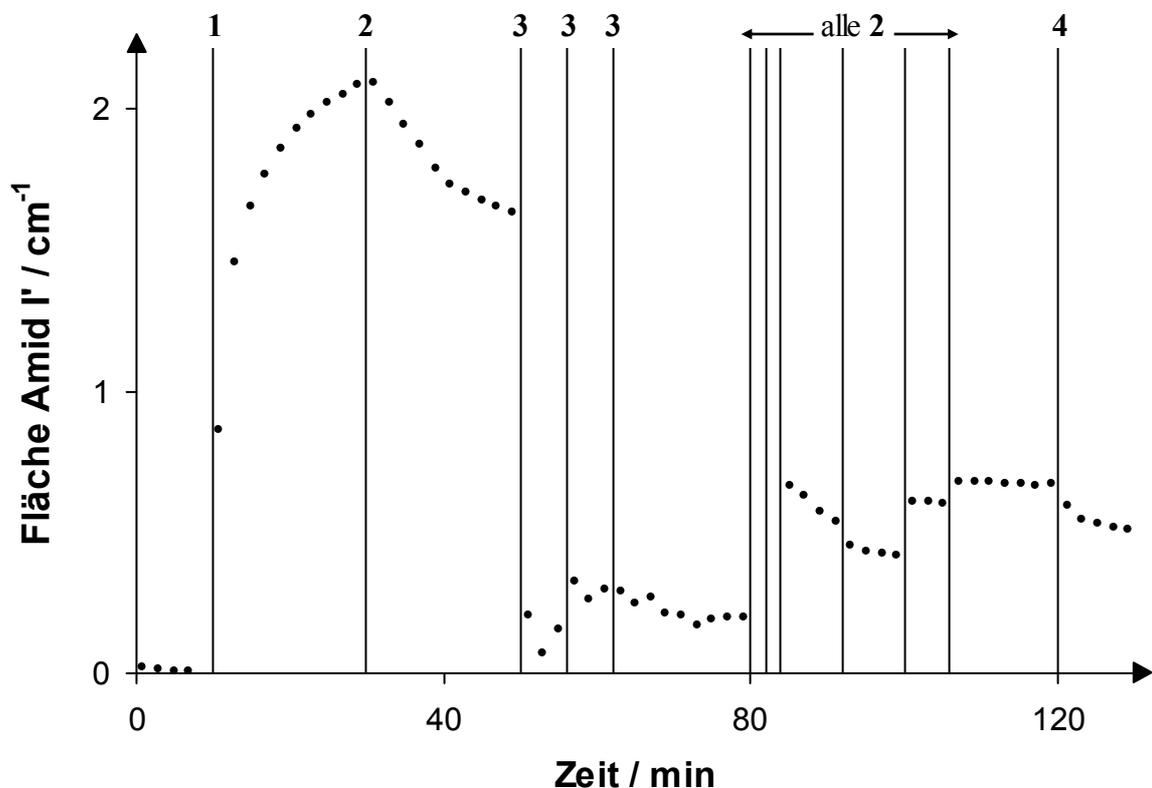


Abbildung 53. Adsorptionskinetik von Rinderserumalbumin an einer planaren PAA-Bürste bei $\text{pH} = 7$ und $\vartheta = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ (Austausch (vertikale Linien) der Lösung über der PAA-Bürste (zu Beginn Puffer B) durch 1: 2.0 mg mL^{-1} BSA in Puffer B, 2: Puffer B, 3: 8.0 M Harnstoff in Puffer B ($\text{pH} = 7.5$) 4: 500 mM NaCl in Puffer B).

Offenbar kommt es nach Zugabe von Salzlösung am Ende der Kinetik (vgl. **Abbildung 53**, Seite 129) nur noch zu einer geringfügigen zusätzlichen Desorption des Proteins, weil ein großer Teil des reversibel gebundenen Proteins bereits durch die vorangegangenen Austauschvorgänge entfernt wurde.

Die resultierenden niedrigen Intensitäten im Bereich der Amid I'-Bande lassen außerdem darauf schließen, dass eine Auswertung des Bereichs der CH₂-Streckschwingungen (für Lysozym in **Abbildung 49** (Seite 124) in rot dargestellt) nicht sinnvoll ist, weil diese schon bei Lysozym eine um eine halbe Größenordnung geringere Intensität aufweisen.

Aufgrund der geringeren thermodynamischen Stabilität des Rinderserumalbumins im Vergleich zu Lysozym ist für die Denaturierung des Proteins nur eine Harnstofflösung mit einer Konzentration von 8.0 M erforderlich und eine Erhöhung der Temperatur ist ebenfalls nicht notwendig.

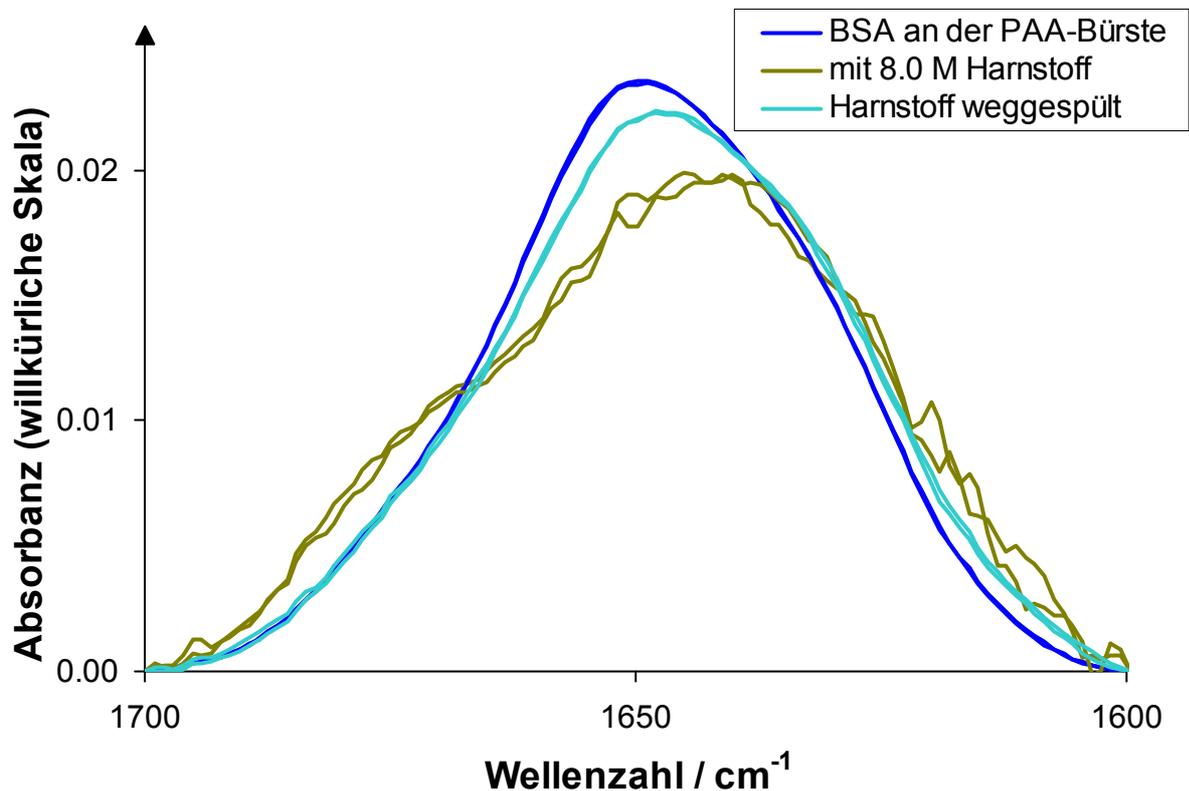


Abbildung 54. Im Bereich von 1700 - 1600 cm⁻¹ flächennormierte ATR-FTIR-Spektren von Rinderserumalbumin bei pH = 7 und $\vartheta = 20$ °C an einer planaren PAA-Bürste vor der Zugabe von Harnstoff (dunkelblau), in Anwesenheit von 8.0 M Harnstoff (dunkelgelb, pH = 7.5) sowie nach dem Wegspülen der Harnstofflösung (hellblau) unter Berücksichtigung reproduzierter Messungen (doppelte Linien).

Auch sind die beobachteten Bandenintensitäten der Amid I'-Bande von BSA in Gegenwart von Harnstoff wieder deutlich gegenüber denen in Abwesenheit von Harnstoff erniedrigt. Dies erschließt sich am sinnvollsten durch einen Vergleich der Fläche unter der Bande im Zeitraum zwischen 50 und 80 Minuten mit der Fläche im Zeitraum im Bereich von 110 bis 120 Minuten (**Abbildung 53**, Seite 129). Auch hier kommen als Ursache wiederum Artefakte aufgrund der Untergrundkorrektur, mögliche Kopplungen der Peptidchromophore mit Harnstoffchromophoren und die Entfaltung des Proteins infrage.

Die im Bereich der Amid I'-Bande flächennormierten Spektren von Rinderserumalbumin vor der Zugabe von Harnstoff, in Anwesenheit der 8.0 M Harnstofflösung und nach deren Wegspülen sind in **Abbildung 54** (Seite 130) dargestellt. Anders als bei Lysozym scheint nach der durch die Harnstofflösung hervorgerufenen Entfaltung des Proteins die ursprüngliche Sekundärstruktur nur teilweise wiederhergestellt zu werden. Dies zeigen auch die in **Tabelle 41** gezeigten Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse.

Tabelle 41. Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse durch Bandenanpassung für ATR-FTIR-Spektren von bei pH = 7 und $\vartheta = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ an einer PAA-Bürste adsorbiertem Rinderserumalbumin vor dem Zusatz und nach dem Wegspülen von 8.0 M Harnstofflösung.

Banden-Nr.	1	2	3	4	5
$\tilde{\nu}_0 / \text{cm}^{-1}$	1677 ± 2	1654 ± 2	1640 ± 2	1629 ± 2	1610 ± 2
Zuordnung	Schleifen	α -Helix	ungeordnet	β -Faltblatt	Basislinie
Flächen% BSA vor Harnstoffzus.	8	61 - 63	4 - 5	25 - 26	0 - 1
Flächen% BSA nach Wegspülen	7 - 8	56 - 58	6	27 - 30	1

So verbleibt nach dem Wegspülen des konzentrierten Harnstoffs ein verringerter Anteil an α -Helices. Gleichzeitig ist eine leichte Erhöhung des Anteils an β -Faltblättern festzustellen¹⁶. Ggf. besteht auch eine kausale Beziehung zur fortschreitenden Desorption des Proteins im Laufe der Messung. Nach dem Wegspülen der Harnstofflösung trägt demnach nur noch stark gebundenes BSA zu den erhaltenen Spektren bei. Die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse für BSA an der PAA-Bürste vor der Erhöhung der Harnstoffkonzentration stimmen gut mit den in Kapitel 4.1.1 (Seite 81 ff.) dargestellten Resultaten überein und sind damit zuverlässig. Tendenziell gleicht die hier ermittelte Struktur sogar noch mehr der in Lösung gefundenen (**Tabelle 28**, Seite 84).

¹⁶ Die Diskussion der Eigenschaften des für die Anpassung an BSA-Spektren verwendeten Parametersatzes erfolgt ausführlicher in Kapitel 4.5.1 (Seite 149 ff.).

Die Aussagekraft der ATR-FTIR-Messungen mit Hühnerlysozym und BSA in Abhängigkeit von der Anwesenheit von hochkonzentriertem Harnstoff an einer planaren PAA-Bürste ergibt sich im Wesentlichen aus dem Vergleich mit den zugehörigen Ergebnissen der TIRF-Spektroskopie (Kapitel 4.4.3 f., Seite 132 ff.). Denn ein Vergleich mit IR-Transmissionsspektren von gelöstem Protein in Gegenwart von Harnstoff ist nicht möglich, weil in Lösung die für die Aussagekraft der Spektren vorteilhafte Anreicherung des jeweiligen Proteins an der Grenzfläche nicht gegeben ist. Auch aufgrund der geringeren Empfindlichkeit des Detektors (MCT-B) des für Transmissionsmessungen verwendeten Spektrometers ist eine Korrektur des Harnstoffuntergrunds nicht mit einer ausreichenden Genauigkeit möglich. Weiterhin ist ein „Wegspülen“ des Harnstoffs aus der Lösung nicht realisierbar. Zwar könnten durch Verdünnung der Lösung nicht-denaturierende Bedingungen wiederhergestellt werden; allerdings würden das Harnstoff- und das Proteinsignal dadurch gleichermaßen verringert und das Problem mit der Korrektur des Harnstoffhintergrunds bliebe bestehen.

Diese Schwierigkeit kann durch die Fluoreszenzspektroskopie überwunden werden, weil die Harnstofflösung nur einen geringen Fluoreszenzuntergrund besitzt. Daher kann ein aussagekräftiger Vergleich zwischen gelöstem und adsorbiertem Protein erfolgen. Zudem kann aus den zugehörigen Messergebnissen zweifelsfrei ermittelt werden, ob Lysozym bei $\vartheta = 30\text{ °C}$ in Gegenwart von 9.5 M Harnstoff zumindest teilweise denaturiert. Dies kann aufgrund möglicher Hintergrund-Artefakte nicht mit letzter Sicherheit allein anhand der Amid I'-Bande in Gegenwart von Harnstoff (**Abbildung 50**, Seite 126) verifiziert werden.

Insgesamt sind die Resultate der in diesen beiden Unterkapiteln dargestellten ATR-FTIR-Messungen als zuverlässig einzustufen, zumal die Ergebnisse für die Sekundärstrukturanalyse vor Zugabe (und im Fall von Lysozym auch nach dem Wegspülen) von Harnstofflösung (**Tabelle 40**, Seite 126 und **Tabelle 41**, Seite 131) sehr gut mit den in [138] publizierten Ergebnissen für die an der PAA-Bürste bei $\vartheta = 20\text{ °C}$ unter pH-neutralen Bedingungen adsorbierten Proteine übereinstimmen. Die Daten für Lysozym werden außerdem durch die Ergebnisse der ebenfalls positiv geladenen Ribonuclease A untermauert.

4.4.3 Fluoreszenzspektroskopische Ergebnisse für Lysozym an einer planaren PAA-Bürste in An- und Abwesenheit von 9.5 M Harnstoff bei neutralem pH-Wert

Im Zuge der grenzflächensensitiven TIRF-Spektroskopie (vgl. Kapitel 2.3.3, Seite 35 f.) wird in diesem Abschnitt die intrinsische Fluoreszenz der Proteine Hühnerlysozym und Rinderserumalbumin ausgenutzt. Hierfür sind im Wesentlichen die enthaltenen Tryptophanseitenketten verantwortlich (vgl. Abschnitt 2.3.2, Seite 34, [127]). Die genaue

Position der Emissionsbande ist ein Indikator dafür, in welcher Umgebung sich die Fluorophore befinden. In hydrophiler Umgebung verschiebt sich das Maximum der Emissionsbande zu höheren Wellenlängen, so dass eine derartige Verschiebung auf eine Entfaltung des Proteins hindeutet [11]. In diesem Fall werden die Tryptophanseitenketten besser hydratisiert, weil sie nicht mehr im vergleichsweise hydrophoben Inneren des Proteins vorzufinden sind.

Den in diesem Kapitel dargestellten Ergebnissen der TIRF-Spektroskopie liegen die in Kapitel 3.3.1 (Seite 57 ff.) beschriebenen experimentellen Details zugrunde, die generelle Vorgehensweise bei TIRF-Messungen ist Gegenstand von Abschnitt 3.3 (Seite 57).

Die Vorbereitung für jede Messung beinhaltet die Aufnahme von Hintergrundfluoreszenzspektren in Gegenwart von Messpuffer (pH = 7) über der planaren PAA-Bürste. Auch wird die TIRF-Messzelle einmal mit der Harnstofflösung der entsprechenden Konzentration (im Falle von Lysozym 9.5 M) befüllt, um zusätzlich ein Untergrundspektrum mit Harnstoff in Abwesenheit von Protein zu erhalten. Der Beitrag der Lichtstreuung ist in den in **Abbildung 55** gezeigten Beispielspektren bei niedrigen Wellenlängen deutlich zu erkennen.

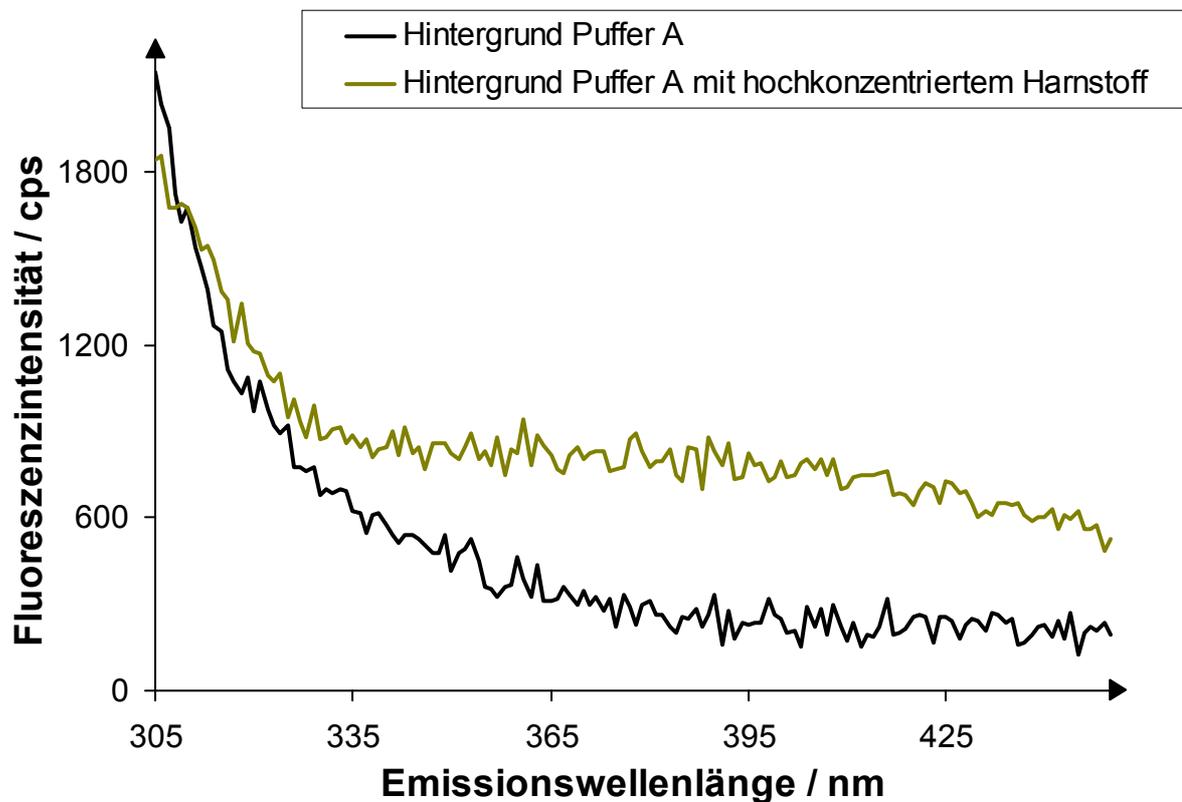


Abbildung 55. Beispiele für in einer TIRF-Messzelle aufgenommene Hintergrundspektren ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$, ohne Protein) mit Puffer A (pH = 7, schwarz) bzw. mit hochkonzentriertem Harnstoff in Puffer A (dunkelgelb) über einer auf einer Quarzglasoberfläche präparierten planaren PAA-Bürste.

Ansonsten scheint die Harnstofflösung eine etwas größere Hintergrundfluoreszenz als die Pufferlösung zu besitzen. Im Unterschied zu den ATR-FTIR-Messungen ist eine Korrektur jedoch unproblematisch. Spektren wie die in **Abbildung 55** (Seite 133) dargestellten werden von allen nachfolgend erhaltenen Proteinspektren abgezogen. Der nächste Schritt ist dann die Adsorption des Proteins an der planaren PAA-Bürste. Hierzu wird 0.2 mg mL^{-1} Lysozymlösung in Puffer A ($\text{pH} = 7$) in die TIRF-Zelle eingebracht und anschließend ein erstes Spektrum aufgenommen. Um einen Beitrag gelösten Proteins zum Messsignal ausschließen zu können, wird nachfolgend die proteinhaltige Lösung über der PAA-Bürste durch proteinfreien Puffer A ausgetauscht. Wie den in **Abbildung 56** dargestellten intensitätsnormierten Spektren entnommen werden kann, führt dieser Vorgang erwartungsgemäß zu keiner Verschiebung der Wellenlänge des Bandenmaximums. Unmittelbar nach Austausch der Lösung über der PAA-Bürste durch 9.5 M Harnstofflösung kann hingegen bereits eine deutliche Rotverschiebung der durch Anregung bei $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ verursachten Fluoreszenzemissionsbande beobachtet werden.

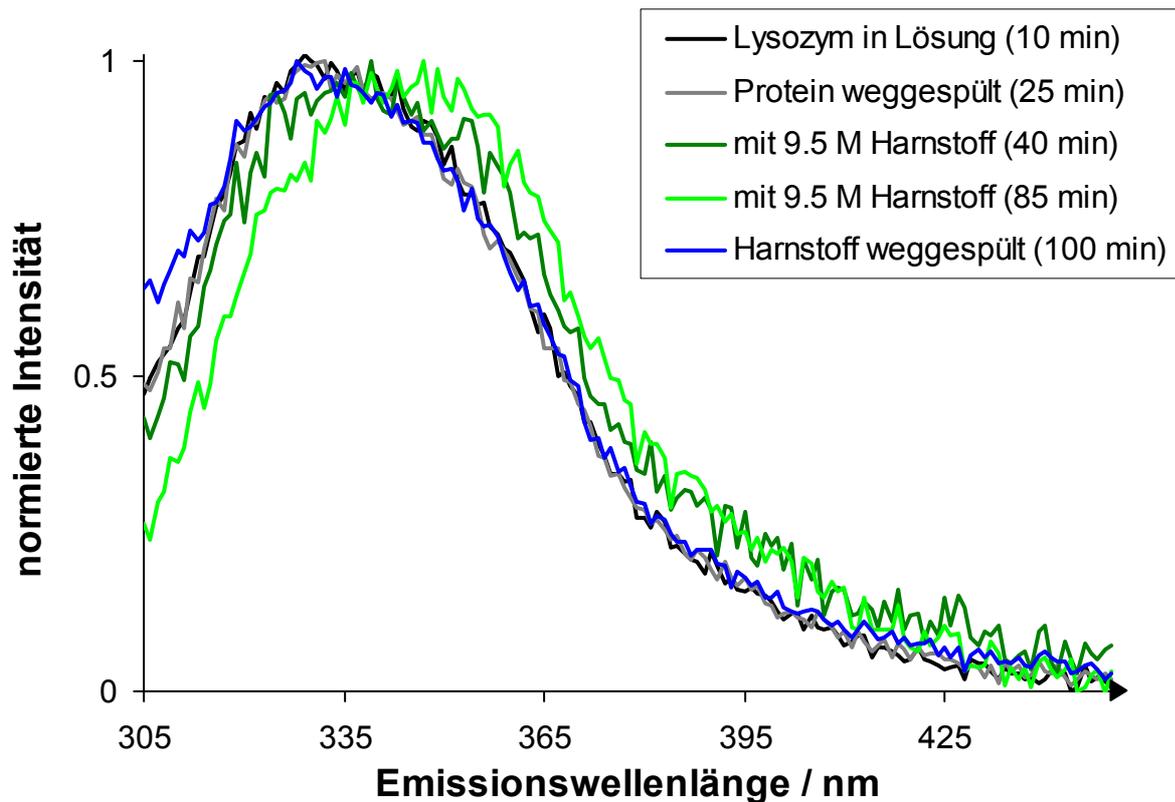


Abbildung 56. Intensitätsnormierte TIRF-Spektren ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$) von an einer planaren PAA-Bürste adsorbiertem Hühnerlysozym vor Zugabe (schwarz, grau), in Anwesenheit (Grüntöne, $\text{pH} = 7.5$) und nach dem Wegspülen (blau) von 9.5 M Harnstofflösung bei $\text{pH} = 7$ und $\vartheta = 30 \text{ }^\circ\text{C}$; in Klammern die seit dem Einbringen der 0.2 mg mL^{-1} Lysozymlösung in Puffer A vergangene Zeit.

Dies ist ein deutlicher Hinweis auf eine Denaturierung des Hühnerlysozyms in Gegenwart von 9.5 M Harnstoff bei $\text{pH} = 7.5$ und $\vartheta = 30\text{ °C}$. Längere Wartezeiten führen schließlich zu einer weitergehenden Rotverschiebung der Fluoreszenzbande. Diese kann im Sinne einer fortschreitenden Entfaltung im Verlauf der Zeit verstanden werden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in **Abbildung 56** (Seite 134) nur das erste und das letzte der in Gegenwart von 9.5 M Harnstoff erhaltenen Spektren gezeigt. Auch auf eine Darstellung der reproduzierten Messergebnisse wird deswegen verzichtet.

Nach dem Austausch der Harnstofflösung durch Puffer A gegen Ende der Messserie wird ein Fluoreszenzemissionsspektrum erhalten, welches im Wesentlichen identisch mit den vor der Zugabe des Harnstoffs gemessenen ist (in **Abbildung 56** (Seite 134) in blau). Die Messdaten lassen also auf eine vollständige Reversibilität der durch die Zugabe des Harnstoffs erreichten Denaturierung des an der planaren PAA-Bürste adsorbierten Lysozyms schließen.

Diese Schlussfolgerung wird ebenfalls durch die Ergebnisse der ATR-FTIR-Spektroskopie in Abschnitt 4.4.1 (Seite 124 ff.) zugelassen, so dass zwei voneinander unabhängige Methoden das gleiche Resultat liefern.

Zum Abschluss der Messserie bringt das Hinzufügen von 500 mM Kochsalzlösung einmal mehr die Erkenntnis, dass die PAA-Bürste in einem ordnungsgemäßen Zustand ist. Die Desorption des Lysozyms wird in diesem Zusammenhang durch eine deutlich verringerte Intensität der Emissionsbande angezeigt (Spektrum in **Abbildung 56** (Seite 134) aufgrund der Intensitätsnormierung nicht gezeigt).

Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang der Vergleich mit Messungen von Lysozym unter vergleichbaren Bedingungen in Lösung, welcher mittels IR-Spektroskopie nicht ermöglicht wurde (vgl. Abschnitt 4.4.2, Seite 132). Den entsprechenden Untersuchungen liegt die in Kapitel 3.6.1 (Seite 77 f.) beschriebene Durchführung zugrunde. Im Wesentlichen werden die zu untersuchenden Lösungen in einer Quarzglasküvette zunächst auf $\vartheta = 30\text{ °C}$ temperiert und schließlich die Fluoreszenzemissionsbanden nach Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda_{\text{exc}} = 280\text{ nm}$ aufgezeichnet. Die Berücksichtigung von Hintergrundspektren ist hierbei nicht erforderlich, weil die Intensität der Fluoreszenzbande bei gelöstem Hühnerlysozym der untersuchten Konzentration sehr hoch ist. Eine der nach dem Wegspülen der Harnstofflösung an der planaren PAA-Bürste entsprechende Situation in Lösung wird durch Verdünnen der 9.5 M Harnstofflösung auf 1 / 10 erreicht. Die Spektren von gelöstem Protein sind in **Abbildung 57** (Seite 136) dargestellt.

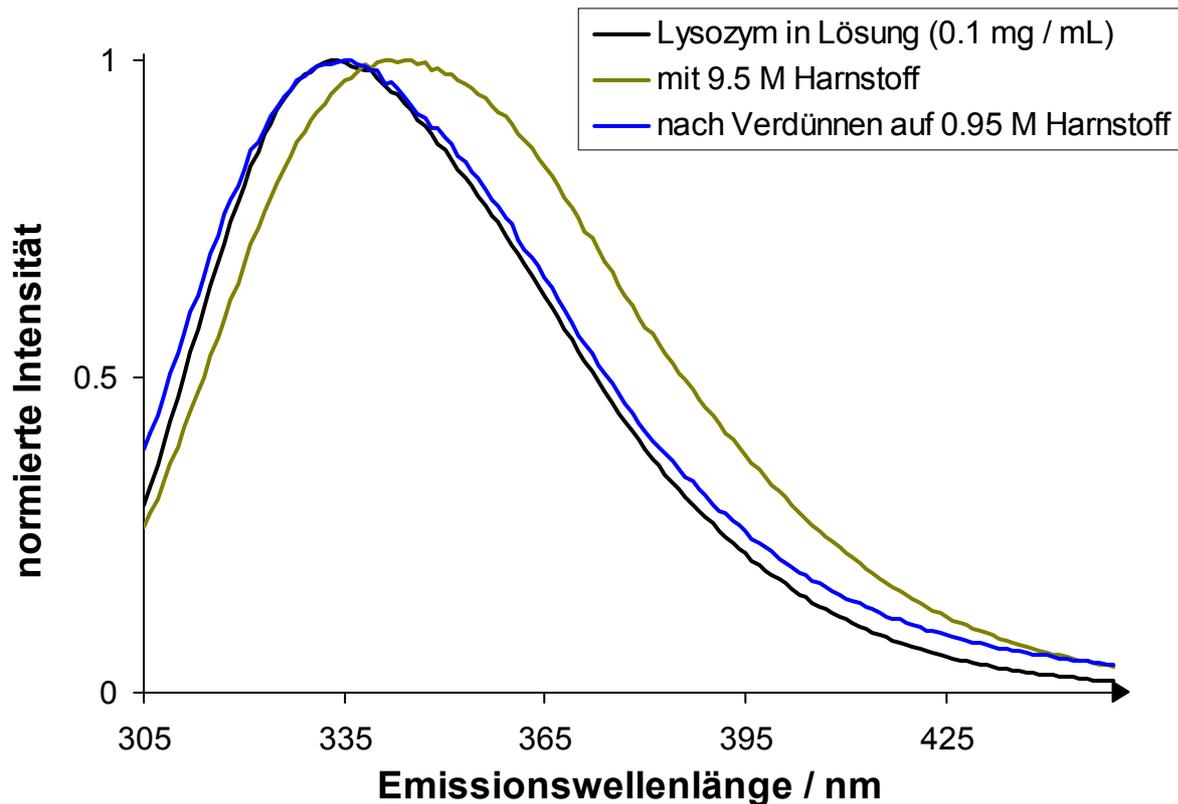


Abbildung 57. Intensitätsnormierte Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$) von Lösung 1 (0.1 mg mL^{-1} Lysozym in Puffer A, $\text{pH} = 7$, schwarz), Lösung 2 (0.1 mg mL^{-1} Lysozym mit 9.5 M Harnstoff in Puffer A, $\text{pH} = 7.5$, dunkelgelb) sowie Lösung 3 (nachfolgend mit Puffer A auf $1/10$ verdünnte Lösung 2, blau) jeweils bei $\vartheta = 30 \text{ }^\circ\text{C}$.

In Gegenwart von 9.5 M Harnstoff ist bei gelöstem Protein wie schon zuvor bei adsorbiertem Protein eine deutliche Rotverschiebung der Fluoreszenzbande im Vergleich zur harnstofffreien Lösung zu erkennen (vgl. **Abbildung 57**). Erneut kann dies durch die Denaturierung des Lysozyms in Gegenwart von 9.5 M Harnstoff erklärt werden. Nach dem Verdünnen der Proteinlösung mit hochkonzentriertem Harnstoff findet sich das Maximum der Emissionsbande an gleicher Position wie beim Emissionsspektrum des Lysozyms in der von vorne herein harnstofffreien Lösung.

Demnach ist also auch in Lösung die Denaturierung von Hühnerlysozym durch 9.5 M Harnstoff bei $\vartheta = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ vollständig reversibel. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen an der planaren PAA-Bürste ergibt sich hieraus der zentrale Rückschluss, dass sich hinsichtlich der Denaturierung mit hochkonzentriertem Harnstoff Hühnerlysozym an einer planaren PAA-Bürste genauso verhält wie in Lösung. Insbesondere wenn sich im folgenden Kapitel 4.4.4 (Seite 137 ff.) ein ähnliches Bild ergibt, ist dies ein neuer Aspekt der Biokompatibilität einer planaren PAA-Bürste.

4.4.4 Fluoreszenzspektroskopische Ergebnisse für BSA an einer planaren PAA-Bürste in An- und Abwesenheit von 8.0 M Harnstoff unter pH-neutralen Bedingungen

Grundsätzlich basieren die TIRF-spektroskopischen Untersuchungen von Rinderserumalbumin an einer planaren PAA-Bürste und in Lösung in Abhängigkeit von der Anwesenheit von hochkonzentriertem Harnstoff auf einer zu der für Lysozym beschriebenen analogen Vorgehensweise (vgl. Kapitel 4.4.3, Seite 132 ff.). Entsprechend kann eine detaillierte Durchführung ebenfalls in den Abschnitten 3.3.1 (Seite 57 ff.) bzw. 3.3 (Seite 57, TIRF-Spektroskopie allgemein) nachgelesen werden. Dennoch sind einige Unterschiede zwischen BSA und Lysozym zu berücksichtigen. Ein Vorteil von BSA gegenüber Lysozym ist auf der einen Seite seine vergleichsweise geringere Stabilität der nativen Konformation. Insofern sind mildere Bedingungen für die Denaturierung ausreichend (8.0 M statt 9.5 M Harnstoff bei $\vartheta = 20\text{ °C}$ anstatt $\vartheta = 30\text{ °C}$). Auf der anderen Seite verfügt BSA insbesondere unter Berücksichtigung seiner Größe (vgl. **Tabelle 1**, Seite 12) über sehr wenige Tryptophanreste im Vergleich zu Lysozym. Zudem sollte nach den zuvor dargestellten Adsorptionskinetiken für Rinderserumalbumin und Lysozym (**Abbildung 49**, Seite 124 und **Abbildung 53**, Seite 129) der Adsorptionsgrad von BSA an einer planaren PAA-Bürste deutlich niedriger sein als der von Lysozym. Dies wird auch durch die Oberflächenplasmonenresonanz von auf Goldchips angebrachten PAA-Bürsten bestätigt [147]. Um die resultierenden Probleme mit der Intensität des Messsignals zu verringern, wird zur Adsorption des Proteins eine recht hochkonzentrierte Proteinlösung mit einer Konzentration von 2.0 mg mL^{-1} in die TIRF-Zelle eingebracht (nach Durchführung der Untergrundmessungen, vgl. Kapitel 4.4.3, Seite 133 f.). In Anwesenheit der Proteinlösung wird ein deutlich höheres Singal-zu-Rausch-Verhältnis festgestellt als nach dem Wegspülen des gelösten Proteins (vgl. **Abbildung 58**, Seite 138). Dies kann auf einen Beitrag gelösten Proteins zum Messsignal (vgl. Anhang, Seite XV) und einen großen Anteil von reversibel (gegenüber Verdünnung) an der PAA-Bürste gebundenem Protein zurückgeführt werden. Auf Letzteren weist auch die mittels ATR-FTIR-Spektroskopie erhaltene Adsorptionskinetik hin (**Abbildung 53**, Seite 129). Das Wegspülen der Proteinlösung führt zudem zu einer Blauverschiebung des Spektrums. Anscheinend besteht also ein Unterschied zwischen schwach und stärker an der PAA-Bürste gebundenem Rinderserumalbumin. Eine wesentliche Änderung in der Struktur des Proteins an der planaren PAA-Bürste kann allerdings ausgeschlossen werden, wie die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse auf Basis ATR-FTIR-spektroskopischer Untersuchungen zeigen (Kapitel 4.4.2, Seite 129 ff. bzw. **Tabelle 28**, Seite 84). Eine Blauverschiebung deutet aber generell auf eine zunehmende Hydrophobizität in der

Umgebung der / des Tryptophanreste(s) hin. Ein spekulativer Erklärungsansatz wäre der Einfluss einer Komplexierung positiv geladener Bereiche auf der Proteinoberfläche durch die PAA-Ketten. Möglicherweise kommt es hierdurch bei stärker gebundenem Protein zu einem Ausschluss von Wasser aus der Umgebung eines Tryptophanrests.

Der nachfolgende Austausch der Lösung über der PAA-Bürste durch 8.0 M Harnstofflösung führt zu einer deutlichen Rotverschiebung der Fluoreszenzemission des an der PAA-Bürste adsorbierten Proteins, wodurch dessen Denaturierung angezeigt wird (vgl. **Abbildung 58**).

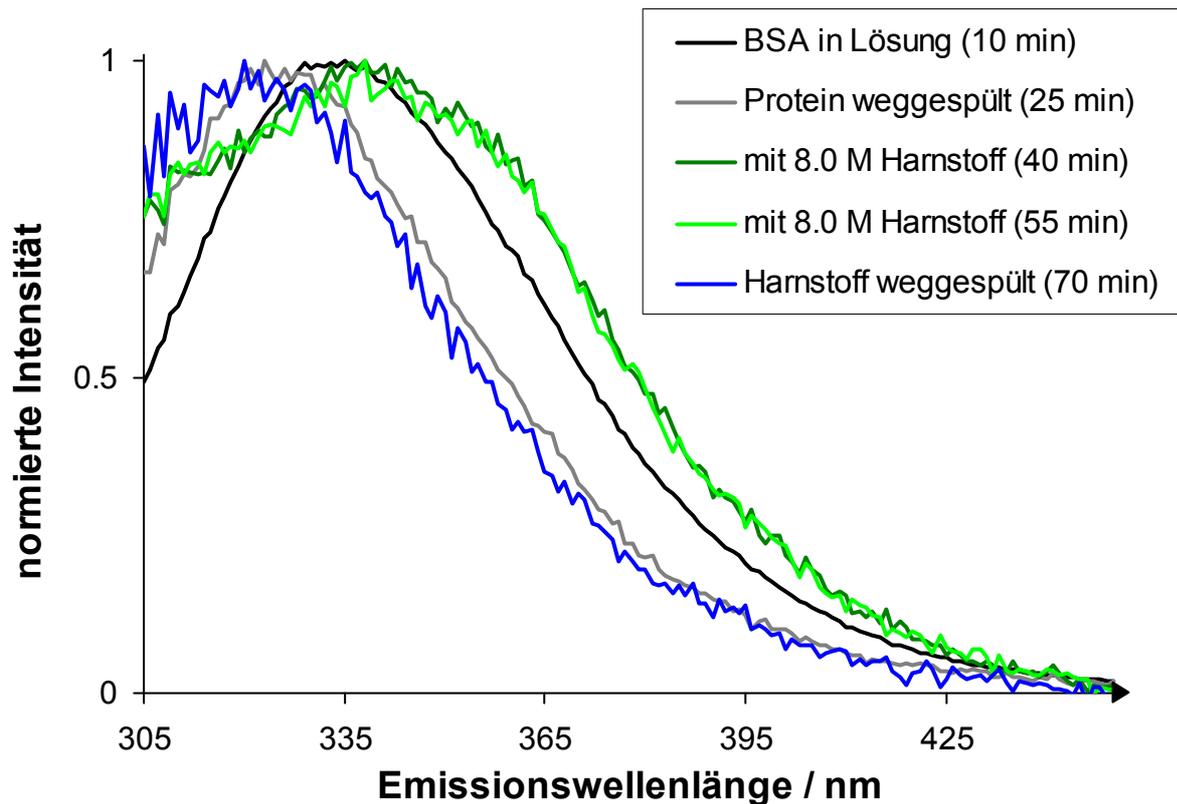


Abbildung 58. Intensitätsnormierte TIRF-Spektren ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$) von an einer planaren PAA-Bürste adsorbiertem Rinderserumalbumin vor Zugabe (schwarz, grau), in Anwesenheit (Grüntöne, $\text{pH} = 7.5$) und nach dem Wegspülen (blau) von 8.0 M Harnstofflösung bei $\text{pH} = 7$ und $\vartheta = 20 \text{ }^\circ\text{C}$; in Klammern die seit dem Einbringen der 2.0 mg mL^{-1} BSA-Lösung in Puffer A vergangene Zeit.

Das Ausmaß dieser Verschiebung ist im Wesentlichen unabhängig von der Zeit, so dass schon nach der Aufnahme von zwei Spektren in Gegenwart von Harnstoff der Austausch der Lösung über der PAA-Bürste durch harnstofffreien Puffer A erfolgen kann. Dieser führt zu einer noch weitergehenden Blauverschiebung des Proteinspektrums im Vergleich zur Situation vor der Zugabe des Harnstoffs. Eine mögliche Erklärung ist die Unterbringung der Tryptophanseitenketten in einer im Vergleich zur Situation vor der Zugabe der Harnstofflösung hydrophoberen Umgebung. Diese Interpretation ist im Zusammenhang mit den Ergebnissen der ATR-FTIR-Spektroskopie (Kapitel 4.4.2, Seite 129 ff.) an der planaren

PAA-Bürste sinnvoll. Demnach ist die Denaturierung von BSA an einer planaren PAA-Bürste mittels Harnstoff nicht völlig reversibel; die native Struktur des Proteins wird nach dem Entfernen der Harnstofflösung nicht völlig zurückgebildet (vgl. **Abbildung 54**, Seite 130 und **Tabelle 41**, Seite 131). Zum Abschluss der Messserie wird durch das Einbringen von 500 mM Kochsalzlösung in Puffer A bestätigt, dass die verwendete PAA-Bürste bei den zuvor durchgeführten Messungen in einem ordnungsgemäßen Zustand gewesen ist (Spektrum nicht gezeigt).

Die Fluoreszenzspektren von Rinderserumalbumin in Lösung, welche weitgehend analog zu denen von Lysozym erhalten werden (vgl. Kapitel 4.4.3, Seite 135 f. bzw. Abschnitt 3.6.1, Seite 77 f.), weisen auf vergleichbare Unterschiede im Faltungszustand des Proteins zwischen der Situation ohne Harnstoff und nach dem Verdünnen (1 / 100) der harnstoffhaltigen Proteinlösung (1 mg mL⁻¹ BSA, 8.0 M Harnstoff) hin (vgl. **Abbildung 59**).

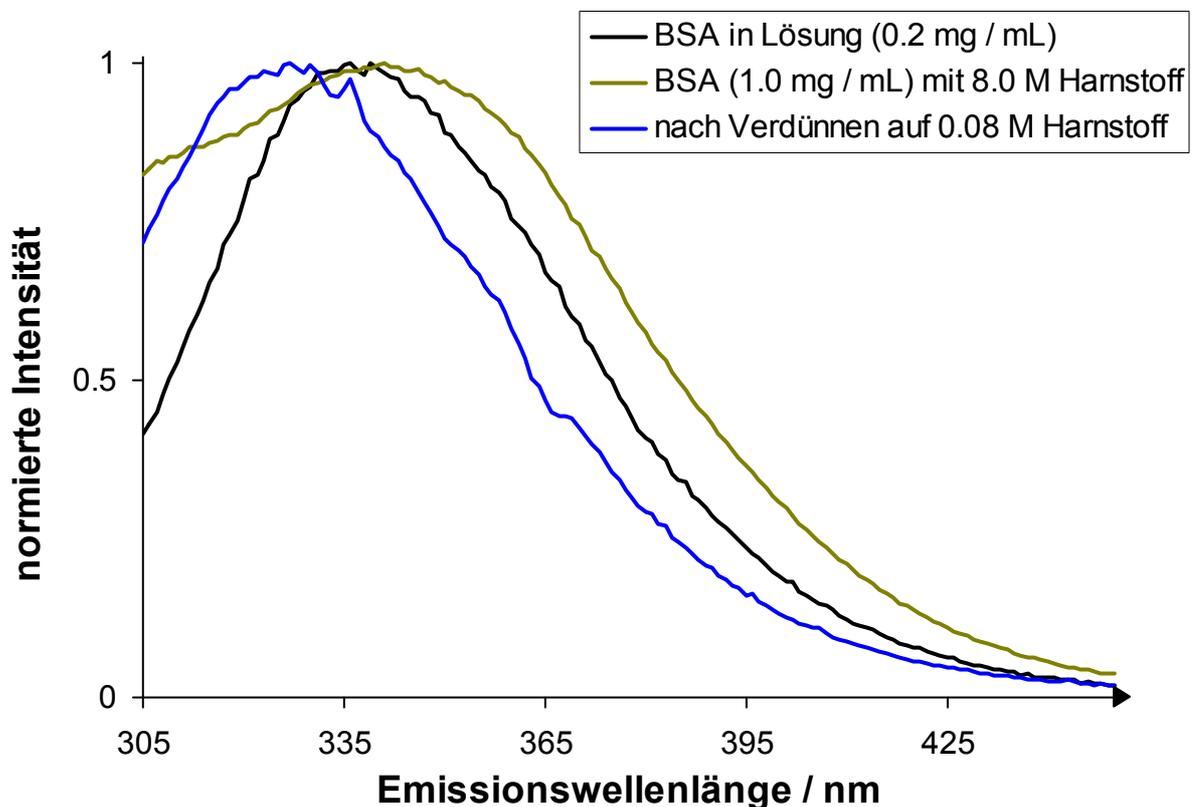


Abbildung 59. Intensitätsnormierte Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$) von Lösung 1 (0.2 mg mL⁻¹ BSA in Puffer A, pH = 7, schwarz), Lösung 2 (1.0 mg mL⁻¹ BSA mit 8.0 M Harnstoff in Puffer A, pH = 7.5, dunkelgelb) sowie Lösung 3 (nachfolgend mit Puffer A auf 1 / 100 verdünnte Lösung 2, blau) jeweils bei $\vartheta = 20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Im Unterschied zu den Experimenten mit Lysozym ist es aufgrund der geringeren Fluoreszenzintensität von BSA (weniger Tryptophanseitenketten) erforderlich, Untergrundspektren zu berücksichtigen (insbesondere bei der stark verdünnten Lösung). Außerdem wird

mit einer höheren Proteinkonzentration in der 8.0 M Harnstofflösung gearbeitet, um auch noch bei einem stärkeren Verdünnen der Harnstofflösung ein Fluoreszenzemissionsspektrum mit ausreichender Intensität zu erhalten. Dadurch kann sichergestellt werden, dass der verbleibende Harnstoff keinen Einfluss mehr auf die gelösten Proteinmoleküle hat¹⁷.

Erneut kann die erfolgreiche Denaturierung durch den hochkonzentrierten Harnstoff anhand der Rotverschiebung des Fluoreszenzemissionsspektrums des gelösten Rinderserumalbumins nachvollzogen werden.

Wie schon an der planaren PAA-Bürste (vgl. **Abbildung 58**, Seite 138) sind die Spektren von Rinderserumalbumin, die nach dem Verdünnen der Protein- / Harnstofflösung erhalten werden, gegenüber denen, die ohne Harnstoff erhalten werden, deutlich blauverschoben (vgl. **Abbildung 59**, Seite 139). Wahrscheinlich kann dies ebenfalls dadurch erklärt werden, dass sich nach der Denaturierung das Protein nicht mehr genau in seine ursprüngliche Konformation zurückfaltet und die Tryptophanseitenketten dadurch im Mittel in einer hydrophoberen Umgebung platziert werden.

Insofern lässt sich auch aus den für Rinderserumalbumin erhaltenen Ergebnissen eine große Ähnlichkeit im Vergleich zwischen an einer planaren PAA-Bürste adsorbiertem und gelöstem Protein bezüglich der Reversibilität der Entfaltung durch hochkonzentrierten Harnstoff ableiten.

Einzig und allein die Blauverschiebung des BSA-Spektrums, welche nur durch die Adsorption des Rinderserumalbumins an der planaren PAA-Bürste entsteht, lässt sich im Zusammenhang mit der gefundenen Wahrung der strukturellen Integrität des Proteins bei Adsorption an einer planaren PAA-Bürste schwierig erklären.

Insgesamt weist die Fluoreszenzspektroskopie in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der ATR-FTIR-Spektroskopie darauf hin, dass die Entfaltung von BSA durch Harnstoff im Unterschied zu der von Lysozym nicht völlig reversibel ist, und zwar unabhängig davon, ob das Protein an der PAA-Bürste gebunden ist oder in gelöstem Zustand vorliegt.

Insofern runden die Ergebnisse zur Denaturierung von Proteinen an planaren PAA-Bürsten die bisher präsentierten Studien zur Biokompatibilität einer planaren Poly(acrylsäure)-Bürste ab (vgl. Kapitel 4.1 - 4.3, Seite 81-123, [138, 142-143]).

¹⁷ Fluoreszenzemissionsspektren mit einer Verdünnung der Harnstofflösung auf 1 / 10 (nicht gezeigt) zeigen gegenüber denen mit einer Verdünnung auf 1 / 100 noch eine deutliche Rotverschiebung. Eine weitere Verdünnung auf 1 / 300 (ebenfalls nicht gezeigt) hat hingegen keinen weiteren Effekt mehr.

4.5 *Proteinadsorption in Gegenwart ionischer Cosolventien*

Im letzten Kapitel dieser Arbeit entfernt sich die Thematik von den Proteineigenschaften an einer speziellen Oberflächenbeschichtung, der planaren Poly(acrylsäure)-Bürste, zugunsten einer grundlegenderen Untersuchung des Einflusses von Cosolventien auf Proteinadsorbate.

Basis der Untersuchungen in diesem Kapitel ist eine zu erwartende Wechselbeziehung zwischen dem Vorhandensein von Cosolventien in Lösung und den Eigenschaften von Proteinen in einem Adsorbat.

Die Prognose einer solchen Beziehung beruht auf der einen Seite darauf, dass die Adsorption eines Proteins an einer Oberfläche mehr oder weniger schwerwiegende Auswirkungen auf dessen Struktur und Funktion haben kann (vgl. Kapitel 1, Seite 1 ff., z. B. [11]).

Auf der anderen Seite sind die Effekte von kosmotropen oder chaotropen Cosolventien auf die Stabilität der nativen Struktur gelöster Proteine seit langer Zeit Gegenstand intensiver Forschungen [40] und werden in der Laborpraxis beispielsweise bei der Isolierung von aktiven Enzymen ausgenutzt (vgl. Abschnitt 1, Seite 6 ff., z. B. [35-36]).

Tatsächlich konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass sowohl die Zugabe von kosmotropem Glycerin als auch von chaotropem Harnstoff zu einer Abnahme des Adsorptionsgrades von Ribonuclease A an einer Silizium-Wasser-Grenzfläche führt [62].

Im Zuge einer weitergehenden systematischen Untersuchung dieses noch relativ unerforschten Gebiets werden im Rahmen dieser Arbeit die Adsorbate der Proteine Rinderserumalbumin (Passus 4.5.1, Seite 142 ff.) und Hühnerlysozym (Abschnitt 4.5.1, Seite 152 ff.) an einer negativ geladenen Silizium- und hydrophoben Poly(styrol)-Oberfläche mittels ATR-FTIR-Spektroskopie (vgl. Kapitel 2.2, Seite 20 ff.) in Abhängigkeit von der Anwesenheit von kosmotropen und chaotropen Hofmeistersalzen (vgl. **Abbildung 3**, Seite 6) charakterisiert. Weiterhin werden die Ergebnisse erster Voruntersuchungen (Kapitel 4.5.3, Seite 155 ff.) dieser Systeme mittels TIRF-Spektroskopie vorgestellt.

Ziel einer Erforschung des gleichzeitigen Einflusses einer Oberfläche und eines Cosolvens auf die Eigenschaften eines Proteins kann letztlich sein, die oft unerwünschten Konsequenzen der Proteinadsorption (z. B. [1, 4-6]) oder die Adsorption selbst durch gelöste Zusätze zu unterdrücken. So wäre beispielsweise auf lange Sicht denkbar, die enzymatische Aktivität von adsorbierten Proteinen durch die Zugabe von Cosolventien zu erhöhen, indem unvorteilhafte Änderungen in der Proteinstruktur im Zuge einer Adsorption verhindert werden. Aber auch Schlussfolgerungen bezüglich des Adsorptionsmechanismus können von grundlegendem Interesse sein. Hierzu sind weitergehende Untersuchungen notwendig.

4.5.1 ATR-FTIR-spektroskopische Untersuchung der Adsorption von Rinderserumalbumin an einer Silizium- und Poly(styrol)-Oberfläche in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Hofmeistersalzen bei neutralem pH-Wert

Allen im Folgenden dargestellten Ergebnissen der ATR-FTIR-Spektroskopie bezüglich der Sekundärstruktur der Proteine Rinderserumalbumin und Hühnerlysozym (nachfolgendes Unterkapitel) in Adsorbaten an einer negativ geladenen Silizium- und hydrophoben Poly(styrol)-Oberfläche unter pH-neutralen Bedingungen liegt ein einheitliches experimentelles Schema zugrunde (vgl. Abschnitt 3.4.4, Seite 67 f. und Kapitel 3.4, Seite 61 f.). Alle Adsorptionskinetiken dauern dabei 60 Minuten. Zu Beginn einer Messserie befindet sich die Lösung (ggf. mit dem jeweiligen Cosolvens, Lösungsmittel D₂O, pH = 7) ohne Protein über der zu untersuchenden Oberfläche aus Silizium oder Poly(styrol). Im Allgemeinen wird das letzte Spektrum vor dem Austausch mit einer (ggf. ebenfalls Cosolvens enthaltenden) Proteinlösung der Konzentration 0.1 mg mL⁻¹ in D₂O (pH = 7) zehn Minuten nach Beginn der Messserie für die Hintergrundkorrektur verwendet. Nach dem Austausch mit der Proteinlösung wird die Adsorption für die restlichen 50 Minuten ohne weitere Eingriffe in das System beobachtet.

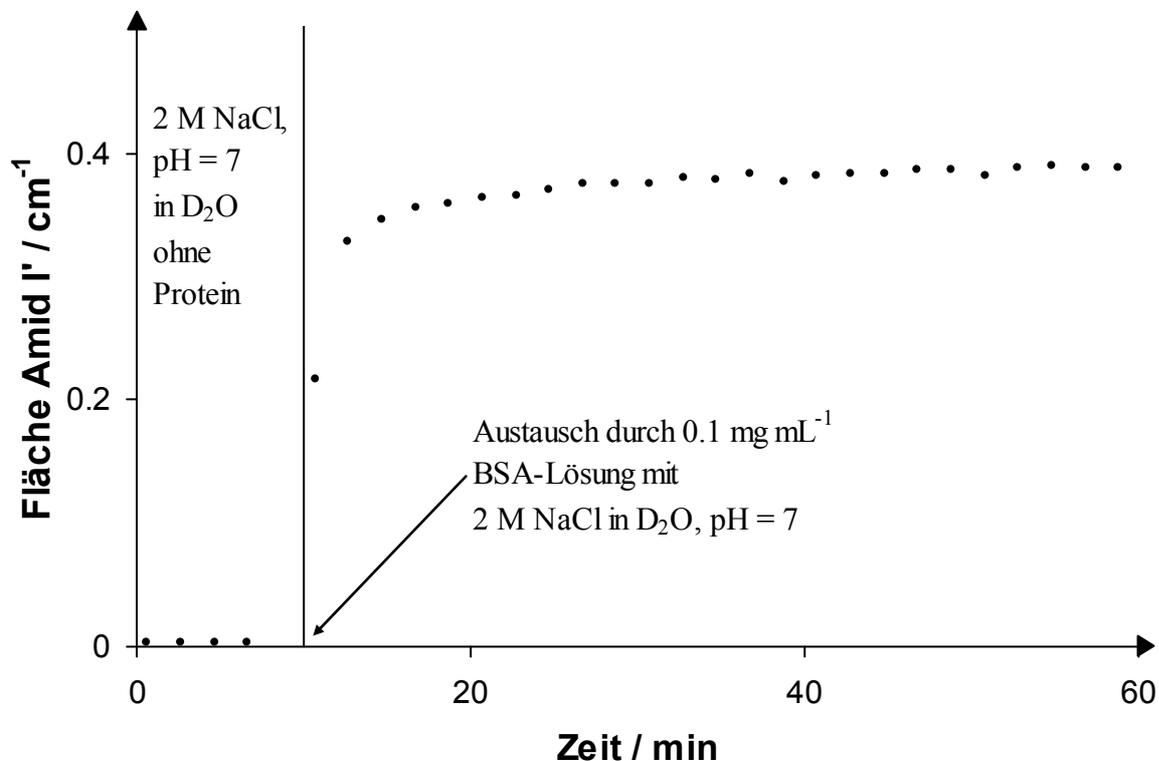


Abbildung 60. Adsorptionskinetik (Zeitabhängigkeit der Fläche unter der Amid I'-Bande) von BSA an einer Poly(styrol)-Oberfläche in Gegenwart von 2 M NaCl bei pH = 7 in D₂O und $\vartheta = 20$ °C.

In **Abbildung 60** (Seite 142) ist eine solche Adsorptionskinetik beispielhaft für die Adsorption von Rinderserumalbumin an einer Poly(styrol)-Oberfläche in Gegenwart von 2 M NaCl gezeigt. Die Daten zeigen im Vergleich zu den Messungen an einer planaren PAA-Bürste eine deutlich verringerte Fläche unter der Amid I'-Bande. Dies steht im Einklang mit dem Befund, dass eine planare PAA-Bürste im Vergleich zu anderen Oberflächen große Mengen an Proteinmolekülen unabhängig vom Vorzeichen ihrer Nettoladung binden kann [17-20]. Allerdings sind die erhaltenen Flächen unter der Amid I'-Bande im Zuge der Adsorptionskinetiken für zuverlässige Aussagen über den Adsorptionsgrad im Vergleich der Anwesenheit verschiedenen Cosolventien nicht ausreichend reproduzierbar. Hierüber können beispielsweise mittels Neutronenreflektometrie aussagekräftige Ergebnisse erhalten werden [63]. Insofern sind an dieser Stelle nur Informationen über die Sekundärstruktur der adsorbierten Proteine anhand der Form der Amid I'-Bande zugänglich (vgl. Abschnitt 3.4.5, Seite 68). Die hierfür verwendeten flächennormierten Spektren stammen im Allgemeinen aus dem späteren Teil der Kinetik, weil hier davon ausgegangen werden kann, dass das System bereits gut equilibriert ist.

Anfängliche Kontrolluntersuchungen zeigen weiterhin, dass die Anwesenheit des Proteins in Lösung im Rahmen der verwendeten Konzentration von 0.1 mg mL^{-1} keinen Einfluss auf die erhaltenen Spektren hat (nicht dargestellt), so dass bei den Kinetiken auf ein Wegspülen der Proteinlösung verzichtet werden kann.

Bevor der Einfluss von Cosolventien auf die Proteinadsorption untersucht werden kann, ist es zunächst einmal wichtig zu wissen, welchen Einfluss die untersuchten Oberflächen aus Silizium und Poly(styrol) in Abwesenheit eines Cosolvens auf die Struktur des adsorbierten Proteins haben. Die entsprechenden im Bereich der Amid I'-Bande flächennormierten Spektren von adsorbiertem und gelöstem Protein können **Abbildung 61** (Seite 144) entnommen werden. Offensichtlich führt sowohl die Adsorption von Rinderserumalbumin an einer Siliziumoberfläche als auch an einer Poly(styrol)-Oberfläche zu deutlichen Veränderungen in der Sekundärstrukturzusammensetzung des Proteins im Vergleich zu gelöstem Protein. Anhand der ATR-FTIR-Spektren des adsorbierten Rinderserumalbumins wird zunächst kein signifikanter Unterschied zwischen der Adsorption an einer negativ geladenen Siliziumoberfläche und einer hydrophoben Poly(styrol)-Oberfläche deutlich.

Die durch IR-Transmission (vgl. Kapitel 3.6.2, Seite 79 f.) gewonnenen Spektren von BSA in Lösung in Abwesenheit von Cosolvens (**Abbildung 61** (Seite 144) in schwarz) werden generell als Referenz für einen Vergleich mit ATR-FTIR-Spektren von an den verschiedenen Grenzflächen in Gegenwart von Hofmeistersalzen adsorbiertem BSA verwendet.

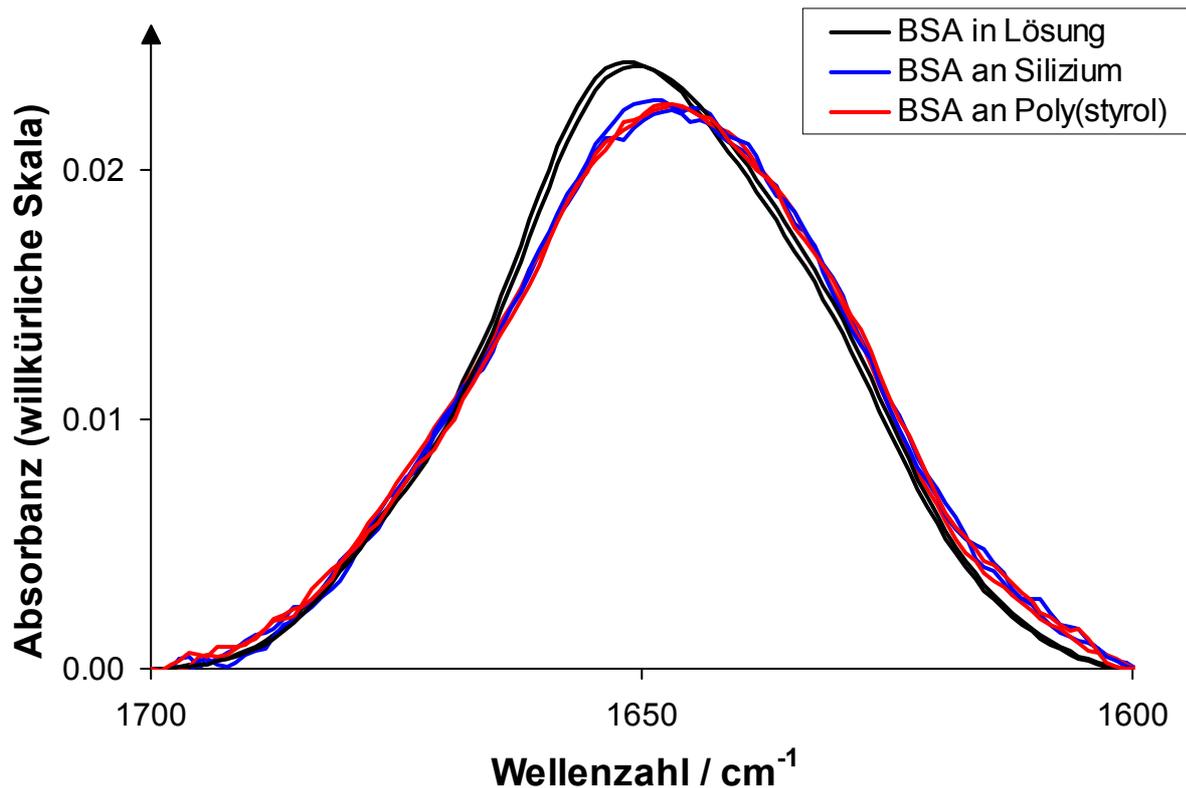


Abbildung 61. Im Bereich von 1700 - 1600 cm^{-1} flächennormierte FTIR-Spektren von BSA bei $\text{pH} = 7$ (in D_2O) und $\vartheta = 20^\circ\text{C}$ in Lösung (schwarz), an einer Siliziumoberfläche (blau) und an einer Poly(styrol)-Oberfläche (rot) mit reproduzierten Messergebnissen (doppelte Linien).

Ein solcher Vergleich ist unabhängig von einem möglichen Effekt der Hofmeistersalze auf die Struktur der Proteine in Lösung von Interesse. In der Regel sollten Cosolventien bei den verwendeten Konzentrationen (2 M und 0.66 M) ohnehin keine gravierende Auswirkung auf die Struktur des gelösten Proteins haben, wie es auch für Insulin in Gegenwart von 2 M Glycerin bei $\text{pH} = 2$ deutlich wird (s. **Tabelle 38**, Seite 116). Hierfür sind oft sehr hohe Konzentrationen des Lösungszusatzes erforderlich [36, 50-51], wie auch die Experimente zur Denaturierung von Proteinen mit Harnstoff (Kapitel 4.4, Seite 123 ff.) zeigen¹⁸.

In **Abbildung 62** (Seite 145) sind die im Bereich der Amid I'-Bande flächennormierten ATR-FTIR-Spektren von an Silizium adsorbiertem BSA in Gegenwart eines kosmotropen Salzes (Ammoniumsulfat), eines chaotropen Salzes (Natriumthiocyanat) sowie von Kochsalz dargestellt. Zum Vergleich sind die Spektren von BSA an Silizium ohne Cosolvens und von BSA in Lösung (s. o.) ebenfalls aufgetragen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die reproduzierten Spektren nicht mit dargestellt (vgl. hierzu Anhang, Seite XIII f.); diese fließen allerdings in die Ergebnisse der Bandenanpassung mit ein (vgl. Seite 149 ff.).

¹⁸ Eine sichere Feststellung erfordert weitergehende Untersuchungen. Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse sind jedoch auch ohne entsprechende Hintergrundinformation aussagekräftig.

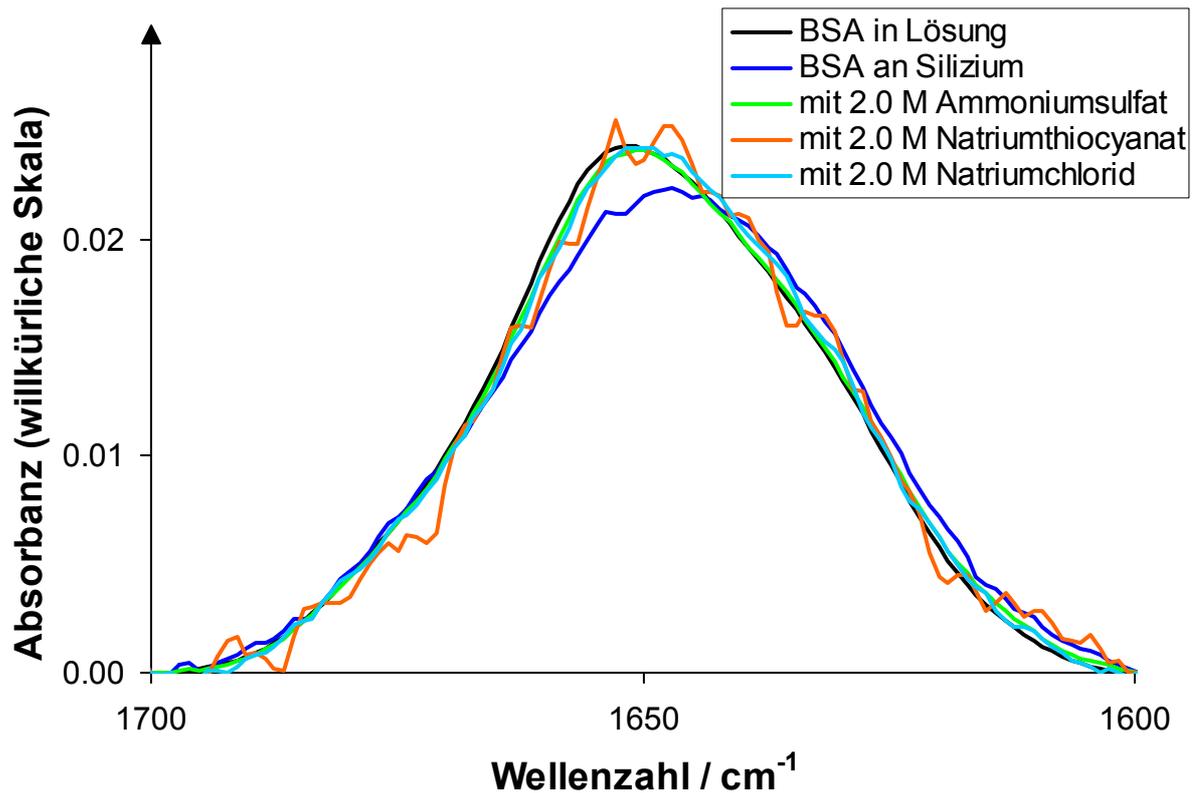


Abbildung 62. Im Bereich von 1700 - 1600 cm⁻¹ flächennormierte ATR-FTIR-Spektren von BSA an einer Siliziumoberfläche bei pH = 7 (in D₂O) und $\vartheta = 20$ °C in Gegenwart von kosmotropem (NH₄)₂SO₄ (grün), chaotropem Natriumthiocyanat (orange) sowie von Kochsalz (himmelblau). Zum Vergleich die Spektren von BSA in Abwesenheit von Cosolvens (blau) sowie in Lösung (schwarz).

Augenscheinlich führt die Anwesenheit von kosmotropem Ammoniumsulfat mit einer Konzentration von 2.0 M bei der Adsorption von BSA an einer Siliziumoberfläche zu einer Unterdrückung der zuvor in Abwesenheit von Cosolvens diskutierten Strukturänderungen. Dies kann an der großen Ähnlichkeit der Form des resultierenden Spektrums (in **Abbildung 62** in grün dargestellt) mit der Form des Spektrums von gelöstem Protein erkannt werden. Allerdings handelt es sich hierbei anscheinend um keinen Effekt, der auf die kosmotropen Eigenschaften dieses Salzes zurückgeführt werden kann. Denn auch in Gegenwart von Kochsalz (**Abbildung 62**, hellblau) der gleichen Konzentration ist ein ähnlicher Effekt zu beobachten. Ebenso zeigen die in Gegenwart von chaotropem Natriumthiocyanat erhaltenen Spektren eine solche Tendenz, wenngleich sie deutlich verrauschter sind (**Abbildung 62**, orange). Insofern scheint die Unterdrückung von Sekundärstrukturänderungen von BSA im Zuge der Adsorption an einer Siliziumoberfläche im Wesentlichen der Tatsache geschuldet zu sein, dass es sich bei allen hier eingesetzten Cosolventien um Salze handelt. Dabei macht es auch keinen Unterschied, ob die Salze mit

einer Konzentration von 0.66 M oder einer Konzentration 2 M eingesetzt werden, wie am Beispiel der Salze Natriumchlorid und Natriumthiocyanat in **Abbildung 63** deutlich wird. Da auch an der Poly(styrol)-Oberfläche und mit Lysozym kein Unterschied zwischen den Messungen bei hoher und niedriger Konzentration festzustellen ist, werden die Ergebnisse für die niedrigen Konzentrationen im Folgenden nicht mehr dargestellt.

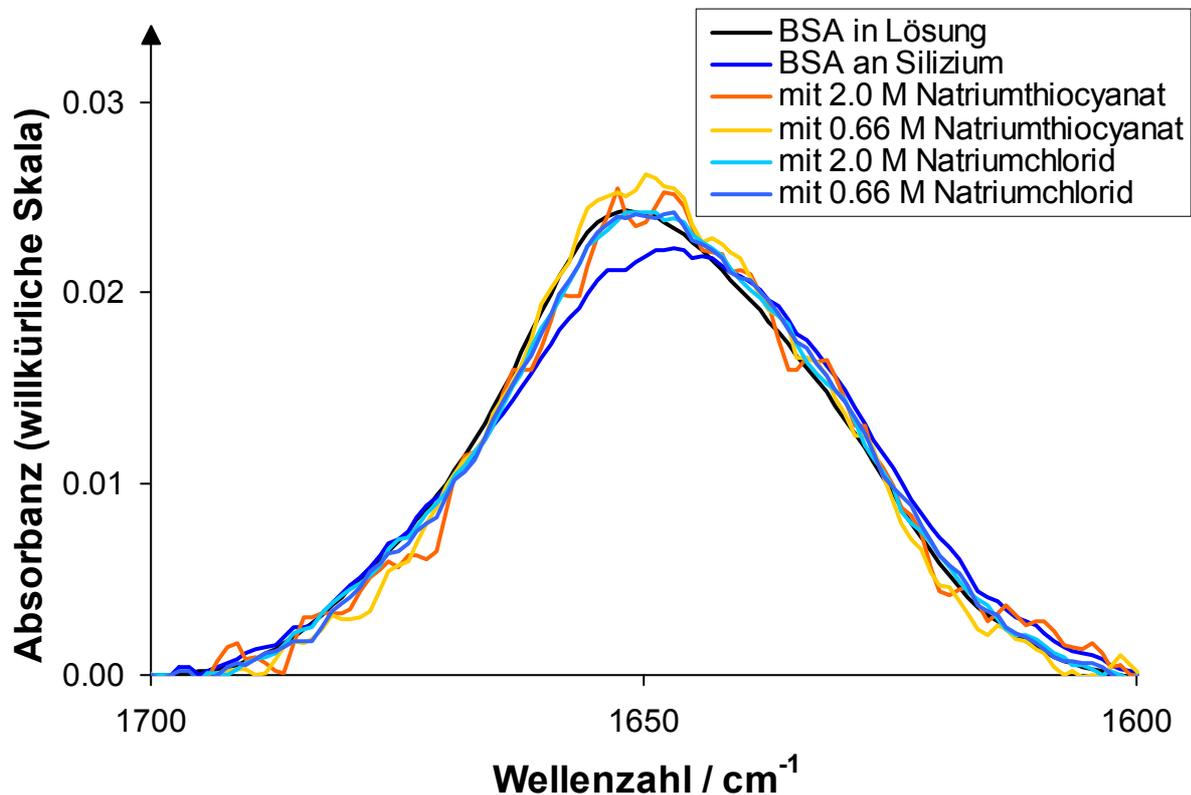


Abbildung 63. Im Bereich von 1700 - 1600 cm^{-1} flächennormierte ATR-FTIR-Spektren von BSA an einer Siliziumoberfläche bei $\text{pH} = 7$ (in D_2O) und $\vartheta = 20^\circ\text{C}$ in Gegenwart von Natriumthiocyanat (2.0 M orange, 0.66 M goldfarben) sowie von Kochsalz (2.0 M himmelblau, 0.66 M hellblau). Zum Vergleich die Spektren von BSA in Abwesenheit von Cosolvens (blau) sowie in Lösung (schwarz).

Adsorptionsexperimente von BSA an einer Siliziumoberfläche in Gegenwart eines weiteren kosmotropen Salzes ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$) sowie eines weiteren chaotropen Salzes (NaI) bestätigen diesen Eindruck (vgl. **Abbildung 64**, Seite 147). Auch diese Salze verhindern unabhängig von der Stellung der enthaltenen (An-)Ionen in der Hofmeisterreihe eine strukturelle Degeneration im Zuge der Adsorption von BSA an einer Siliziumoberfläche.

Für den starken Einfluss der Ionenstärke der Proteinlösung auf die Struktur von an der Siliziumoberfläche adsorbiertem BSA ist wahrscheinlich die Tatsache verantwortlich, dass die Siliziumoberfläche (negativ) geladen ist. Warum dies allerdings zu einer weitgehenden Wahrung der nativen Proteinkonformation bei der Adsorption von Rinderserumalbumin führt,

ist anhand der erhaltenen Ergebnisse schwierig zu beurteilen. Für eine Aufklärung sind demnach weitere Studien erforderlich.

Als sicher kann hingegen gelten, dass bezüglich der Struktur von adsorbiertem Rinderserumalbumin der Effekt einer erhöhten Ionenstärke gegenüber dem möglichen Einfluss der kosmotropen oder chaotropen Eigenschaften der eingesetzten Salze dominiert. Auf Basis dieser Resultate kann nicht sicher gesagt werden, ob ein Hofmeistereffekt vorliegt, weil dieser ggf. durch die Auswirkungen der erhöhten Ionenstärke überlagert wird.

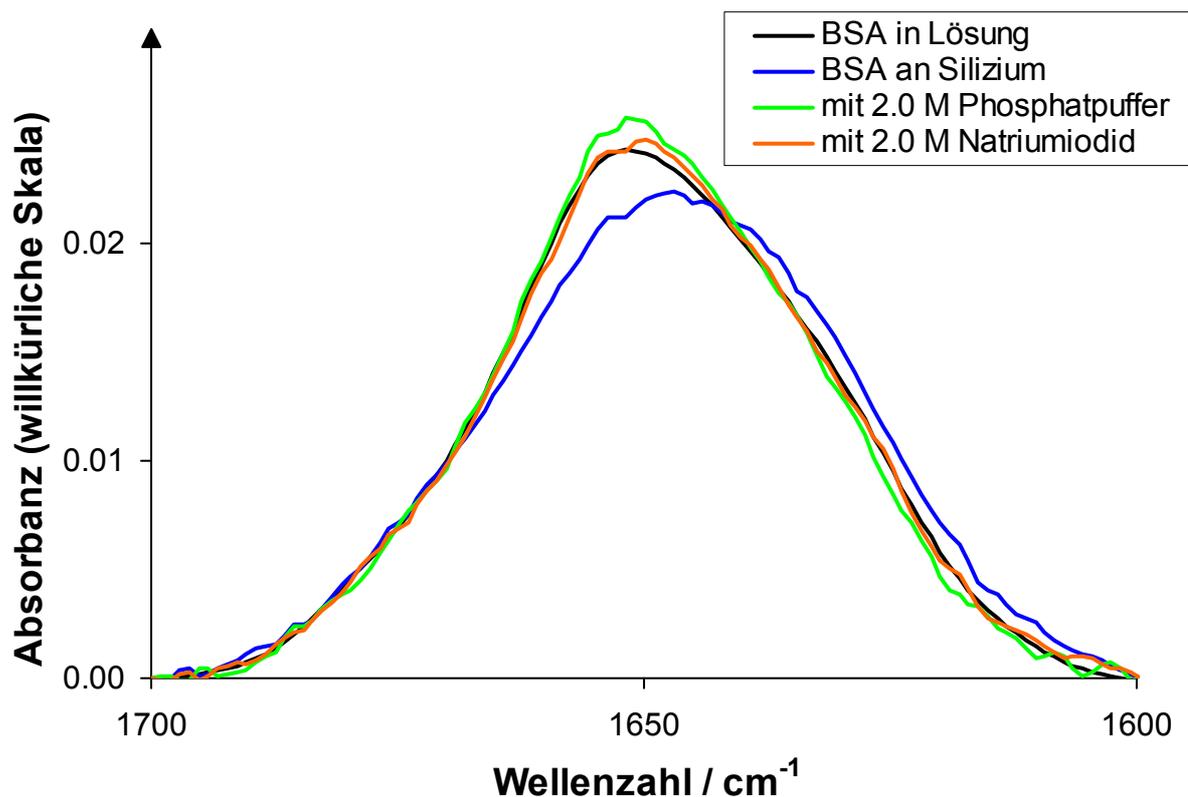


Abbildung 64. Im Bereich von 1700 - 1600 cm^{-1} flächennormierte ATR-FTIR-Spektren von BSA an einer Siliziumoberfläche bei $\text{pH} = 7$ (in D_2O) und $\vartheta = 20^\circ\text{C}$ in Gegenwart von ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$, grün) kosmotropem Phosphatpuffer sowie (orange) chaotropem Natriumiodid. Zum Vergleich die Spektren von BSA in Abwesenheit von Cosolvens (blau) sowie in Lösung (schwarz).

Für die Adsorption von BSA an einer hydrophoben Poly(styrol)-Oberfläche ist eine derartige Folgeerscheinung einer Erhöhung der Ionenstärke nicht zu beobachten (vgl. **Abbildung 65**, Seite 148). Dies kann im Zusammenhang mit dem Ladungszustand einer Poly(styrol)-Oberfläche verstanden werden, weil diese im Unterschied zu einer Siliziumoberfläche ungeladen ist.

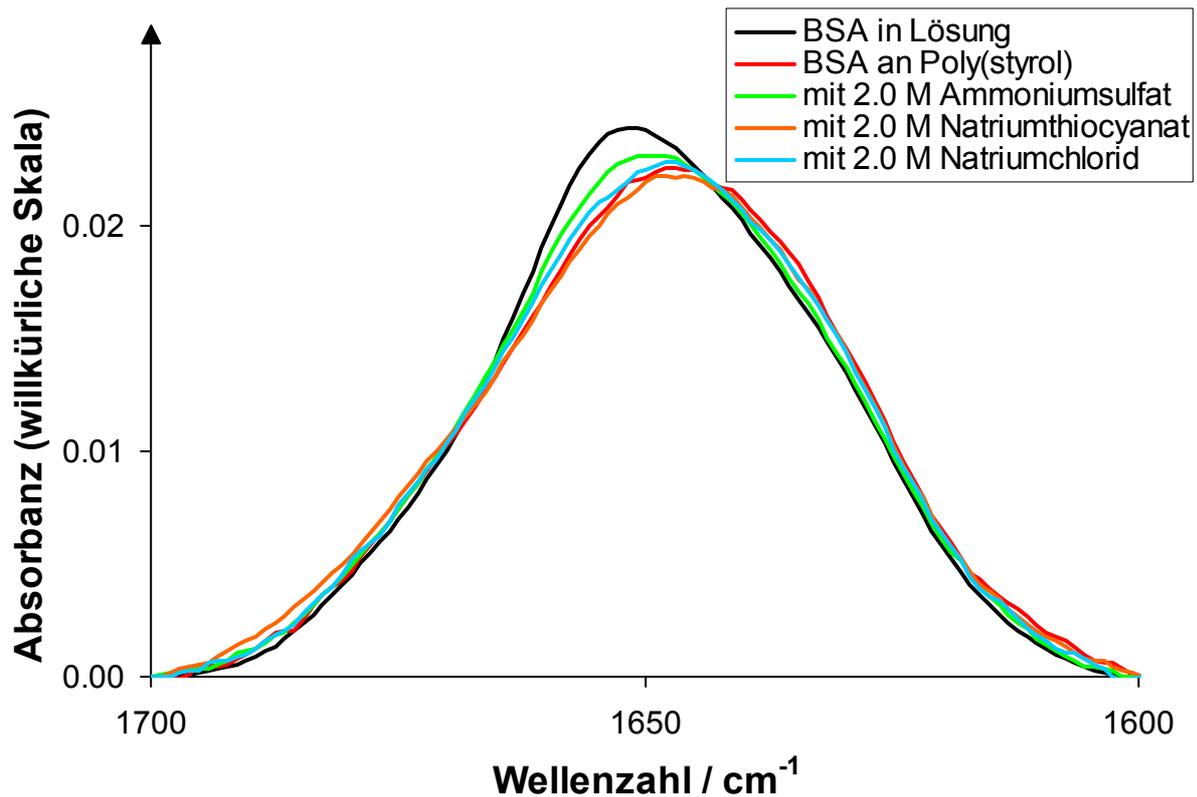


Abbildung 65. Im Bereich von 1700 - 1600 cm^{-1} flächennormierte ATR-FTIR-Spektren von BSA an einer Poly(styrol)-Oberfläche bei $\text{pH} = 7$ (in D_2O) und $\vartheta = 20^\circ\text{C}$ in Gegenwart von kosmotropem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (grün), chaotropem Natriumthiocyanat (orange) sowie von Kochsalz (himmelblau). Zum Vergleich die Spektren von BSA in Abwesenheit von Cosolvens (rot) sowie in Lösung (schwarz).

Tatsächlich scheint die Struktur von in Gegenwart von kosmotropem Ammoniumsulfat an einer Poly(styrol)-Oberfläche adsorbiertem Rinderserumalbumin tendenziell der von gelöstem (nativem) Protein ähnlicher zu sein als die Struktur von Rinderserumalbumin in einem in Abwesenheit von Cosolvens gebildeten Proteinadsorbat (vgl. in **Abbildung 65** grün vs. rot vs. schwarz). Die beiden anderen Salze (Natriumchlorid und chaotropes Natriumthiocyanat) beeinflussen die Struktur des an der Poly(styrol)-Oberfläche adsorbierten Rinderserumalbumins dagegen kaum.

Allerdings scheint anhand der in **Abbildung 65** dargestellten Spektren der Einfluss der Oberfläche auf die Struktur des Proteins ein deutlich stärkeres Gewicht zu haben als ein kosmotroper oder chaotroper Effekt der gelösten Substanz, wobei ein chaotroper Einfluss in diesem Fall prinzipiell in die gleiche Richtung geht wie der Effekt der Oberfläche. Da hydrophobe Wechselwirkungen eine entscheidende Triebkraft der Proteinadsorption darstellen (vgl. Kapitel 1, Seite 3 bzw. [11]) und diese bei Adsorption an einer hydrophoben Poly(styrol)-Oberfläche besonders bedeutsam sind, scheint der Zusatz von ionischen

Cosolventien mit einer Konzentration bis 2 M eine untergeordnete Auswirkung auf die Proteinstruktur im Adsorbat zu haben; die Beeinflussung der Struktur des adsorbierten Proteins durch die Zugabe dieser Cosolventien – wie in diesem Fall durch das kosmotrope Ammoniumsulfat – ist gleichwohl in signifikantem Ausmaß festzustellen.

Die Schlussfolgerungen aus der qualitativen Betrachtung der ATR-FTIR-Spektren von an einer Silizium- und Poly(styrol)-Oberfläche adsorbierten BSA im Vergleich zu gelöstem Protein werden durch die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse bestätigt.

Diese bringt im Rahmen dieser Untersuchungen allerdings einige Probleme mit sich. Es treten z. T. große Schwankungen im Vergleich zwischen Original- und Reproduktionsmessung auf. Insbesondere die Verteilung der Intensität zwischen den Banden für ungeordnete Strukturen und β -Faltblättern kann sich aufgrund minimaler Unterschiede zwischen Original- und Reproduktionsmessung (vgl. Anhang, Seite XIII f.) grundlegend ändern.

Auf eine Neubestimmung der Bandenpositionen für die Sekundärstrukturanalyse mittels FSD und zweiter Ableitung wurde dennoch verzichtet, da die Änderungen in den Spektren nicht so gravierend sind, dass wesentliche Modifikationen hinsichtlich der Bandenpositionen, welche nicht durch den ohnehin vorhandenen Spielraum von $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$ abgedeckt werden, erforderlich werden. Den hier dargestellten Ergebnissen der Bandenanalyse liegt entsprechend der gleiche Datensatz wie den zuvor präsentierten Ergebnissen mit Rinderserumalbumin (vgl. **Tabelle 28**, Seite 84 und **Tabelle 41**, Seite 131) zugrunde. Um Unsicherheiten im Fit zu verringern, sind die in den folgenden Tabellen dargestellten Ergebnisse stets aus der Anpassung mit zwei geringfügig unterschiedlichen Startkonfigurationen gemittelt¹⁹.

Trotz der beschriebenen Einschränkungen in der Zuverlässigkeit der Anpassungsvorgänge können durch die Sekundärstrukturanalyse signifikante Ergebnisse erhalten werden. So führt die Adsorption von BSA an einer Siliziumoberfläche in Abwesenheit von Cosolvens zu deutlichen Veränderungen in der Sekundärstrukturzusammensetzung des Proteins (vgl. **Tabelle 42**, Seite 150). Insbesondere kommt es zu einer signifikanten Abnahme des Anteils α -helicaler Strukturen. Dagegen findet sich in Gegenwart aller getesteten Salze ein mindestens genauso großer Anteil an α -Helices im Adsorbat wie bei gelöstem Protein. Insofern weisen auch die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse tendenziell auf eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen gelöstem und in Gegenwart von Salz an der Siliziumoberfläche adsorbiertem BSA hin. Dabei sind insbesondere unter Berücksichtigung

¹⁹ Die beiden verwendeten Anpassungsstartdatensätze unterscheiden sich in der Anfangshöhe der einzelnen Banden. Im einen Fall werden die Anfangshöhen so festgelegt, dass die Maxima der Banden das zu fittende Spektrum berühren. Im anderen Fall sind die Anfangshöhen so festgelegt, dass die Maxima der einzelnen Banden das Spektrum des gelösten Proteins berühren würden.

der Unsicherheiten bei den Anteilen von ungeordneten Strukturen und β -Faltblättern keine signifikanten Unterschiede zwischen kosmotropen und chaotropen Salzen bei Konzentrationen bis 2 M auszumachen.

Tabelle 42. Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse durch Bandenanpassung für ATR-FTIR-Spektren von an einer Siliziumoberfläche adsorbiertem Rinderserumalbumin in Gegenwart verschiedener ionischer Cosolventien (2 M) bei pH = 7 (in D₂O) und $\vartheta = 20$ °C; zum Vergleich die Ergebnisse für gelöstes Rinderserumalbumin.

Banden-Nr.	1	2	3	4	5
$\tilde{\nu}_0 / \text{cm}^{-1}$	1677 \pm 2	1654 \pm 2	1640 \pm 2	1629 \pm 2	1610 \pm 2
Zuordnung	Schleifen	α -Helix	ungeordnet	β -Faltblatt	Basislinie
Flächen% (SiO _x) ohne Cosolvens	7 - 8	54 - 59	10	22 - 27	1 - 2
Flächen% (SiO _x) mit (NH ₄) ₂ SO ₄	6 - 8	62 - 70	2 - 14	16 - 21	1
Flächen% (SiO _x) mit NaCl	7	62 - 63	3 - 8	22 - 26	1
Flächen% (SiO _x) mit NaSCN	2 - 7	64 - 71	12	12 - 16	1 - 3
Flächen% (SiO _x) mit Phosphat	7	61 - 66	9 - 13	17 - 19	0
Flächen% (SiO _x) mit NaI	6 - 8	65 - 66	10 - 11	16 - 17	1
Flächen% gelöstes BSA	6 - 8	61 - 65	3 - 7	24 - 25	1

Auch für an einer Poly(styrol)-Oberfläche adsorbiertes Rinderserumalbumin werden die qualitativen Eindrücke aufgrund der gezeigten Spektren durch die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse im Wesentlichen bestätigt (vgl. **Tabelle 43**, Seite 151). So führt die Adsorption des Rinderserumalbumins an einer Poly(styrol)-Oberfläche ähnlich wie im Falle einer Siliziumoberfläche zu deutlichen Änderungen in der Sekundärstruktur des Proteins. Wiederum ist der Anteil an α -Helices hauptsächlich zugunsten des Anteils ungeordneter Strukturen deutlich verringert. Auf Basis einer geringen Aussagekraft der Verteilung zwischen ungeordneten Strukturen und β -Faltblättern kann aus den Ergebnissen der Bandenanalyse auf eine vergleichbare Struktur von BSA an einer Silizium- und Poly(styrol)-Oberfläche geschlossen werden. Dies steht in guter Übereinstimmung mit dem Eindruck aufgrund der in **Abbildung 61** (Seite 144) dargestellten flächennormierten Spektren.

Tabelle 43. Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse durch Bandenanpassung für ATR-FTIR-Spektren von an einer Poly(styrol)-Oberfläche adsorbiertem Rinderserumalbumin in Gegenwart verschiedener ionischer Cosolventien (2 M) bei pH = 7 (in D₂O) und $\vartheta = 20$ °C; zum Vergleich die Ergebnisse für gelöstes Rinderserumalbumin.

Banden-Nr.	1	2	3	4	5
$\tilde{\nu}_0 / \text{cm}^{-1}$	1677 ± 2	1654 ± 2	1640 ± 2	1629 ± 2	1610 ± 2
Zuordnung	Schleifen	α -Helix	ungeordnet	β -Faltblatt	Basislinie
Flächen% (PS) ohne Cosolvens	8 - 9	54 - 59	12 - 18	16 - 20	1 - 3
Flächen% (PS) mit (NH ₄) ₂ SO ₄	6 - 9	63 - 67	6 - 7	18 - 21	1
Flächen% (PS) mit NaCl	9	53 - 61	10 - 13	19 - 23	1
Flächen% (PS) mit NaSCN	8 - 11	51 - 57	9 - 14	22 - 25	1 - 2
Flächen% gelöstes BSA	6 - 8	61 - 65	3 - 7	24 - 25	1

Aus **Abbildung 65** (Seite 148) kann geschlossen werden, dass in Anwesenheit von kosmotropem Ammoniumsulfat im Zuge der Adsorption von BSA an einer Poly(styrol)-Oberfläche dessen native Struktur zu einem größeren Teil erhalten bleibt als bei den anderen Salzen. Auch wenn durch die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse die entsprechende Zunahme des α -Helix-Anteils an der Proteinstruktur wahrscheinlich überschätzt wird (nach **Tabelle 43** wäre der Anteil dieses Strukturelements an der Poly(styrol)-Oberfläche sogar größer als bei gelöstem Protein), so ist die Tendenz dennoch die gleiche.

Natriumchlorid zeigt nach **Tabelle 43** keinen deutlichen Effekt auf die Struktur des an Poly(styrol) adsorbierten Rinderserumalbumins; der Anteil an α -Helices ist in Gegenwart dieses Salzes verringert und die native Proteinstruktur demnach weiterhin degeneriert. Dieser Eindruck kann auch anhand von **Abbildung 65** (Seite 148) gewonnen werden. In Gegenwart von Natriumthiocyanat ist die Sekundärstruktur des Rinderserumalbumins nach den tabellierten Analysenergebnissen am deutlichsten degeneriert. Dies kann als Hinweis auf die chaotropen Eigenschaften dieses Salzes interpretiert werden.

Insofern ergibt sich ein durchgängiger Trend von kosmotropen über „neutrale“ bis hin zu chaotropen Salzen. Die Verwendung weiterer kosmotroper und chaotroper Salze in zukünftigen Experimenten könnte der Absicherung der dargestellten Resultate dienen; deutlichere Effekte ließen sich dabei unter Umständen durch den Einsatz höherer Salzkonzentrationen erzielen.

4.5.2 ATR-FTIR-spektroskopische Untersuchung der Adsorption von Hühnerlysozym an einer Silizium- und Poly(styrol)-Oberfläche in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Hofmeistersalzen bei neutralem pH-Wert

Die Vorgehensweise bei der Adsorption von Hühnerlysozym an einer Silizium- und Poly(styrol)-Oberfläche zur Untersuchung der Proteinstruktur im Adsorbat in Abhängigkeit von der Anwesenheit von kosmotropen und chaotropen Salzen bei pH-neutralen Bedingungen ist analog zu der im Zusammenhang mit Rinderserumalbumin beschriebenen (vgl. Beispielkinetik in **Abbildung 60**, Seite 142, Kapitel 3.4.4, Seite 67 f. sowie Abschnitt 3.4, Seite 61 f.).

In **Abbildung 66** sind die im Wellenzahlbereich von $1700 - 1595 \text{ cm}^{-1}$ flächennormierten FTIR-Spektren von Lysozym in Abwesenheit von Cosolventien an einer Silizium- und Poly(styrol)-Oberfläche im Vergleich zu gelöstem Protein gezeigt. Anhand der Form der erhaltenen Spektren wird deutlich, dass ähnlich wie bei BSA die Adsorption an der Oberfläche sowohl an Silizium als auch an Poly(styrol) in Abwesenheit von Cosolventien zu deutlichen Abweichungen von der nativen Sekundärstruktur des gelösten Proteins führt.

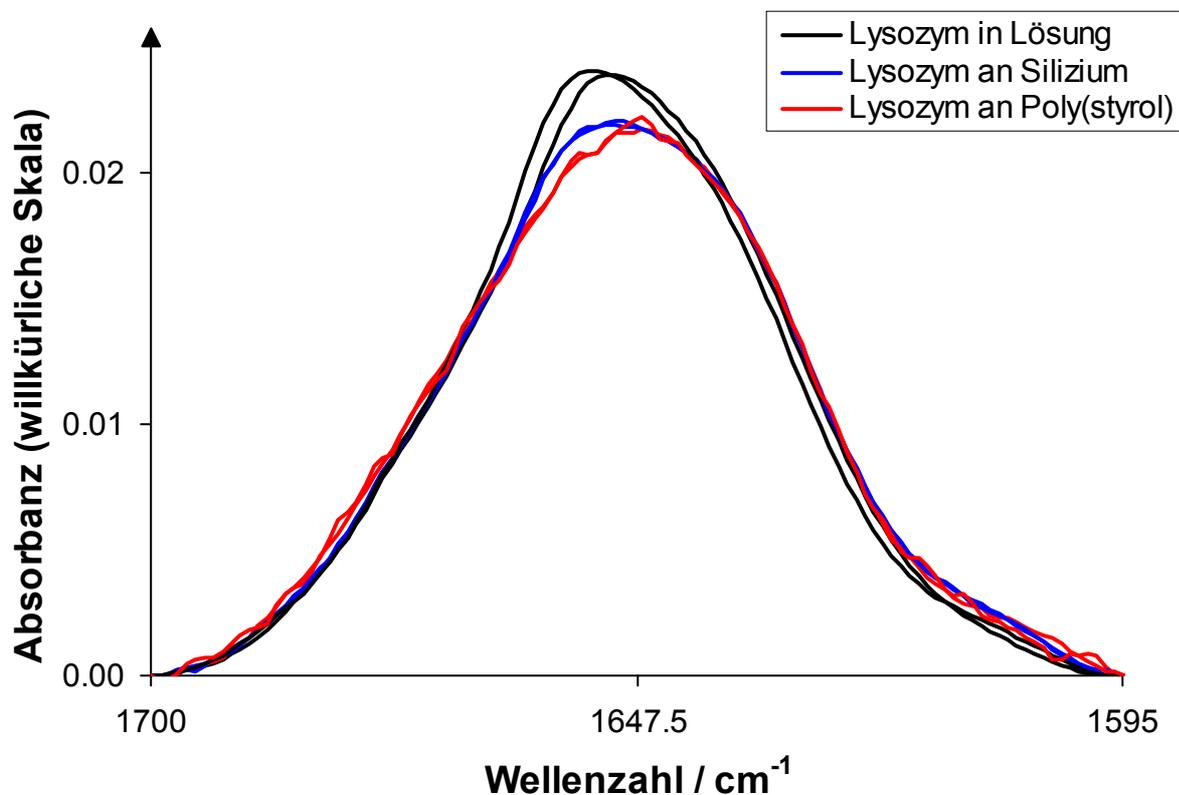


Abbildung 66. Im Bereich von $1700 - 1595 \text{ cm}^{-1}$ flächennormierte FTIR-Spektren von Hühnerlysozym bei $\text{pH} = 7$ (in D_2O) und $\vartheta = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ in Lösung (schwarz), an einer Siliziumoberfläche (blau) und an einer Poly(styrol)-Oberfläche (rot) mit reproduzierten Messergebnissen (doppelte Linien).

Im Unterschied zu BSA gibt es aber auch geringfügige Unterschiede zwischen einer Adsorption an Silizium (in **Abbildung 66** blau, Seite 152) und einer Adsorption an Poly(styrol) (in **Abbildung 66** rot, Seite 152). Prinzipiell scheint sich dabei die Sekundärstruktur von Lysozym an der Poly(styrol)-Oberfläche im Vergleich zum Adsorbat an einer Siliziumoberfläche noch deutlicher von der Struktur in Lösung zu unterscheiden.

Sind bei der Adsorption von Lysozym an einer Siliziumoberfläche Salze jedweder Art anwesend, so führt dies zu einer fast vollständigen Unterdrückung der Adsorption. Aufgrund der dadurch massiv verringerten Signalintensität ist eine sinnvolle Auswertung der erhaltenen Spektren nicht möglich. Eine Erklärung für diesen Effekt findet sich erneut in der Abnahme der Debyelänge r_D [107]. Demnach werden die attraktiven elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den bei $\text{pH} = 7$ stark positiv geladenen Lysozymmolekülen und der negativ geladenen Silizium-Wasser-Grenzfläche durch eine Erhöhung der Ionenstärke stark abgeschwächt.

Dementsprechend können nur Ergebnisse für die Adsorption von Hühnerlysozym an Poly(styrol) in Gegenwart verschiedener Cosolventien diskutiert werden (s. **Abbildung 67**)

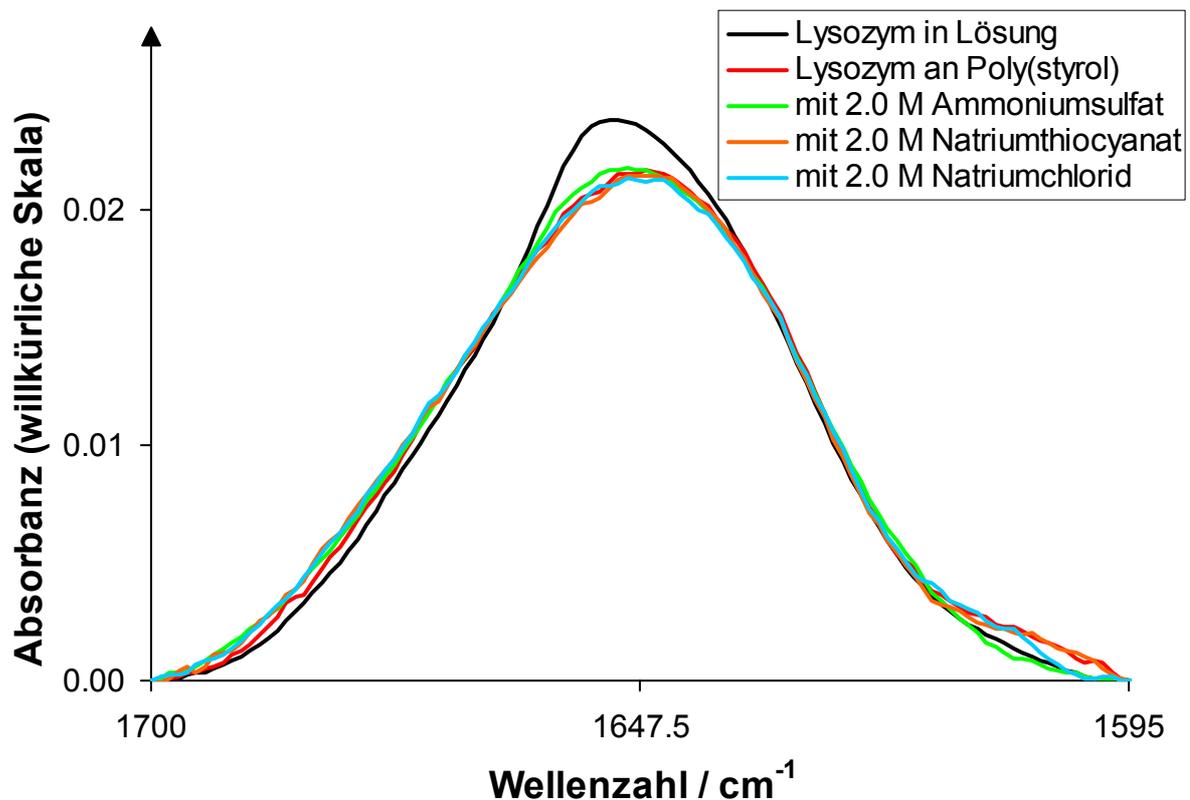


Abbildung 67. Im Bereich von $1700 - 1595 \text{ cm}^{-1}$ flächennormierte ATR-FTIR-Spektren von Hühnerlysozym an einer Poly(styrol)-Oberfläche bei $\text{pH} = 7$ (in D_2O) und $\vartheta = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ in Gegenwart von kosmotropem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (grün), chaotropem Natriumthiocyanat (orange) sowie von Kochsalz (hellblau). Zum Vergleich die Spektren von Lysozym in Abwesenheit von Cosolvens (rot) sowie in Lösung (schwarz).

Wie schon bei BSA führt die Adsorption von Lysozym an einer Poly(styrol)-Oberfläche zu einer Änderung in der Sekundärstruktur des Proteins. Anders als bei BSA machen sich die Unterschiede allerdings kaum durch eine Verschiebung der Wellenzahl des Bandmaximums bemerkbar (vgl. **Abbildung 67**, Seite 153 mit **Abbildung 65**, Seite 148). Auch scheinen die Hofmeistersalze mit einer Konzentration von 2 M im Falle von Lysozym kaum Einfluss auf die Struktur des adsorbierten Proteins zu haben. Anders als BSA zeigt Lysozym keine signifikant nachweisbare Tendenz, im Zuge einer Adsorption an einer Poly(styrol)-Oberfläche in Gegenwart von kosmotropem Ammoniumsulfat seine native Struktur zu einem größeren Anteil zu bewahren als ohne Cosolvens oder in Gegenwart der anderen Salze.

Dies zeigen auch die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse. Analog zu der im Zusammenhang mit BSA beschriebenen Anpassungsprozedur (vgl. Kapitel 4.5.1, Seite 149 ff.) wird hierfür ebenfalls auf den bereits verwendeten Datensatz für Lysozym zurückgegriffen (vgl. **Tabelle 30**, Seite 90 und **Tabelle 40**, Seite 126). Anders als bei BSA stellt sich dieser Datensatz trotz der Änderungen in den Spektren unter verschiedenen Bedingungen als sehr belastbar heraus (vgl. **Tabelle 44**). Demnach führt die Adsorption von Lysozym an einer Poly(styrol)-Oberfläche zu einem moderaten (aber signifikanten) Rückgang im Anteil α -helicaler Strukturen. Hiervon profitieren im Wesentlichen die Anteile an ungeordneten Strukturen und Schleifen.

Tabelle 44. Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse durch Bandenanpassung für ATR-FTIR-Spektren von an einer Poly(styrol)-Oberfläche adsorbiertem Hühnerlysozym in Gegenwart verschiedener ionischer Cosolventien (2 M) bei $\text{pH} = 7$ (in D_2O) und $\vartheta = 20$ °C; zum Vergleich die Ergebnisse für an einer Siliziumoberfläche adsorbiertes und gelöstes Lysozym.

Banden-Nr.	1.1	1.2	2	3	4	5
$\tilde{\nu}_0 / \text{cm}^{-1}$	1684 ± 2	1671 ± 2	1654 ± 2	1638 ± 2	1639 ± 2	1607 ± 2
Zuordnung	Schleifen		α -Helix	ungeordn.	Faltblatt	Basislinie
Flächen% (PS) Ohne Cosolv.	2 - 4	14	40 - 41	26 - 28	12 - 15	1 - 2
Flächen% (PS) mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3 - 5	13 - 14	41 - 42	23 - 24	16 - 17	0 - 2
Flächen% (PS) mit NaCl	5	12 - 14	41	22 - 23	16 - 17	2
Flächen% (PS) mit NaSCN	5	13 - 14	40 - 42	22 - 23	14 - 17	2
Flächen% an Silizium	3 - 4	11 - 13	40	24 - 27	17 - 19	1
Flächen% gelöst [138]	2 - 4	11 - 13	43 - 47	25 - 27	12 - 16	1

Die Anwesenheit der verschiedenen Salze mit einer Konzentration von bis zu 2 M führt unabhängig von der Stellung der enthaltenen Ionen in der Hofmeisterserie zu keiner signifikanten Änderung des α -Helix-Anteils. Allerdings führen alle Salze zu einer leichten Erhöhung des Anteils von β -Faltblättern zulasten des Kontingents an ungeordneten Strukturen. Ein solcher Effekt kann wiederum durch eine Abschirmung der elektrostatischen Abstoßung zwischen den positiv geladenen Lysozymmolekülen im Adsorbat erklärt werden [107]. Folglich sind in Gegenwart der Salze im Adsorbat mehr intermolekulare Kontakte über β -Faltblattstrukturen möglich.

Auch wenn die Anpassungsergebnisse für BSA (vgl. **Tabelle 43**, Seite 151) unsicherer sind als für Lysozym, scheint BSA im Zuge der Adsorption an einer Poly(styrol)-Oberfläche gravierenderen Änderungen in der Sekundärstruktur zu unterliegen als Lysozym. Die entsprechende Änderung des Anteils an α -Helices liegt für BSA bei 2 - 11% der Gesamtstruktur, während es im Falle von Lysozym 2 - 7% sind. Hierin spiegelt sich eventuell die größere thermodynamische Stabilität der nativen Struktur des Lysozyms wider (vgl. **Tabelle 1**, Seite 12, [67, 74]). Möglicherweise ist diese auch dafür verantwortlich, dass bei der Adsorption an Poly(styrol) die kosmotropen und chaotropen Eigenschaften der jeweiligen Salze mit einer Konzentration von bis zu 2 M nicht ins Gewicht fallen.

4.5.3 TIRF-spektroskopische Voruntersuchungen zum Einfluss der Anwesenheit von Hofmeistersalzen auf die Adsorption von Hühnerlysozym und BSA an einer Silizium- und Poly(styrol)-Oberfläche bei neutralem pH-Wert

Das letzte Kapitel dieser Arbeit befasst sich mit den Ergebnissen von Voruntersuchungen zur Ermittlung des Einflusses von Cosolventien auf die Tertiärstruktur von an einer Silizium- und Poly(styrol)-Oberfläche adsorbiertem Hühnerlysozym und Rinderserumalbumin. Wie schon bei den Messungen in Gegenwart von Harnstoff an einer planaren PAA-Bürste (z. B. Kapitel 4.4.3, Seite 132 ff.) soll die in der Fluoreszenzemissionsbande enthaltene Information (vgl. [11]) über den Faltungszustand des untersuchten Proteins durch Anregung des intrinsischen Fluorophors Tryptophan bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm ermittelt werden.

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse der Voruntersuchungen beschränken sich dabei im Wesentlichen auf die Adsorption von Proteinen an einer Quarzglasoberfläche (welche einer Siliziumoberfläche sehr ähnlich ist) in Abwesenheit von Cosolventien. Es liegen die in Kapitel 3.3.2 (Seite 59 f.) dargestellten experimentellen Details zugrunde; die allgemeine Vorgehensweise bei TIRF-Messungen ist in Passus 3.3 (Seite 57) beschrieben.

In **Abbildung 68** sind TIRF-Spektren von Lysozym an einer Quarzglasoberfläche und an einer Poly(styrol)-Oberfläche dargestellt. Diese sind aus drei (im Falle von Quarzglas) bzw. zwei (im Falle von Poly(styrol)) unabhängigen Messreihen gemittelt. Es ist eine deutliche Abhängigkeit des Spektrums von der vorhandenen Grenzfläche zu erkennen. Bei verdünnten Lösungen geht in der TIRF-Spektroskopie das Signal im Wesentlichen auf den Beitrag der adsorbierten Moleküle zurück (vgl. Anhang, Seite XV).

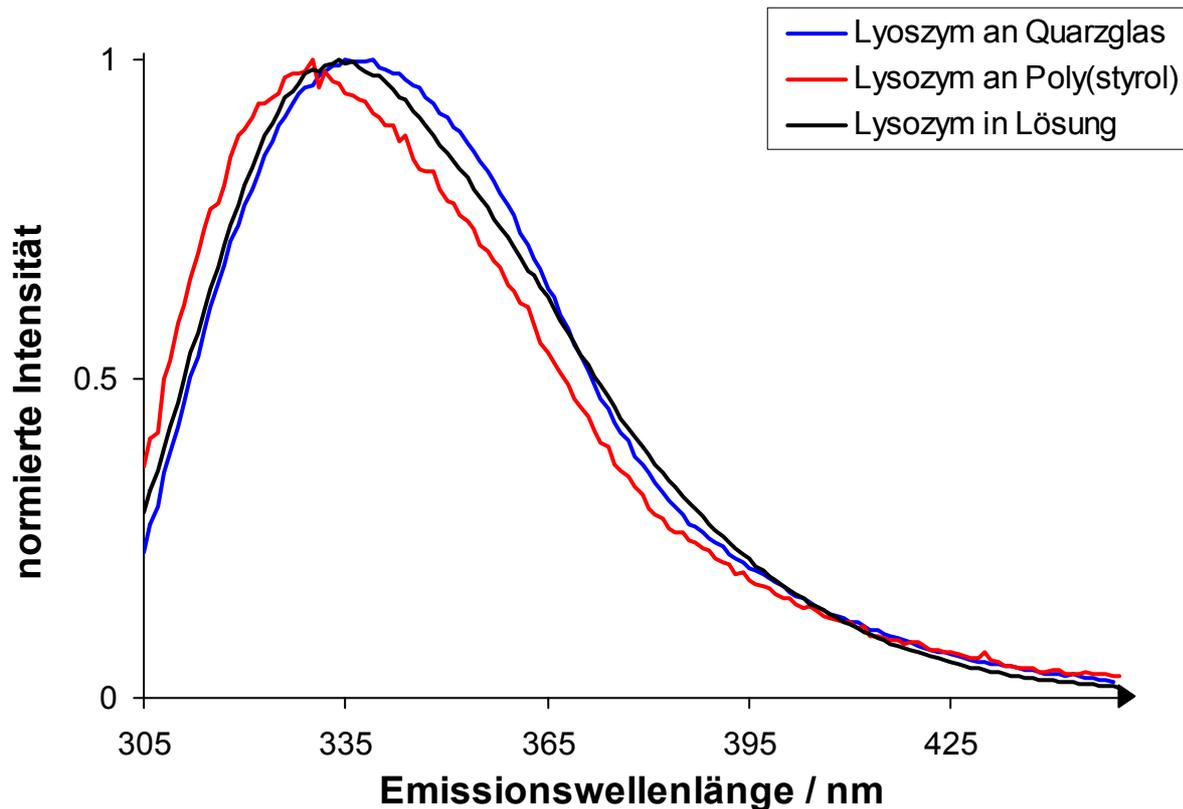


Abbildung 68. Aus mehreren Messreihen gemittelte intensitätsnormierte TIRF-Spektren ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$) von an einer Quarzglasoberfläche (blau) und an einer Poly(styrol)-Oberfläche (rot) adsorbiertem Hühnerlysozym in Gegenwart von 0.1 mg mL^{-1} Lysozymbilösung in Puffer A ($\text{pH} = 7$) bei $\vartheta = 20 \text{ }^\circ\text{C}$; zum Vergleich (schwarz) ein Emissionsspektrum von gelöstem Lysozym.

Offenbar führt eine Adsorption an Quarzglas zu einer dezenten Verschiebung des Maximums der Bande zu höheren Wellenlängen, während eine Adsorption an einer Poly(styrol)-Schicht eine deutliche Verschiebung hin zu kleineren Wellenlängen zur Folge hat. Wahrscheinlich ist die leichte Rotverschiebung auf eine partielle Entfaltung des Proteins zurückzuführen, wie sie mittels ATR-FTIR-Spektroskopie nachgewiesen wurde (Abschnitt 4.5.2, Seite 152 ff.). Eine solche sollte auch an einer Poly(styrol)-Oberfläche stattfinden, in diesem Fall scheinen die Tryptophanreste dadurch zumindest teilweise mit der Poly(styrol)-Oberfläche in Kontakt zu

treten. Dadurch befinden sie sich in einer hydrophoberen Umgebung, weswegen es zu einer Blauverschiebung der Bande kommt.

Ein ähnliches Bild ergibt sich auch anhand der TIRF-Spektren von adsorbiertem Rinderserumalbumin (**Abbildung 69**) in Gegenwart einer Lösung des Proteins in Puffer A (pH = 7) mit einer Konzentration von 0.1 mg mL^{-1} über der Oberfläche.

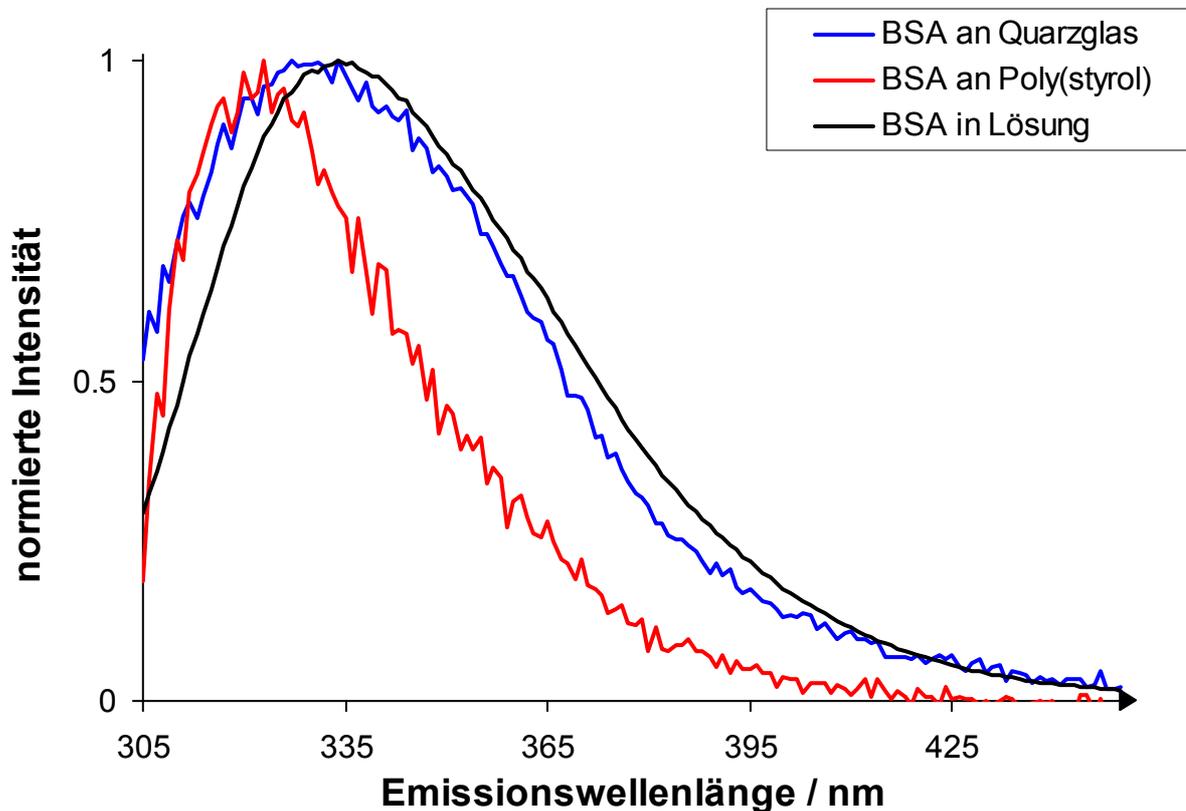


Abbildung 69. Aus mehreren Messreihen gemittelte intensitätsnormierte TIRF-Spektren ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$) von an einer Quarzglasoberfläche (blau) und an einer Poly(styrol)-Oberfläche (rot) adsorbiertem Rinderserumalbumin in Gegenwart von 0.1 mg mL^{-1} BSA-Lösung in Puffer A (pH = 7) bei $\vartheta = 20 \text{ }^\circ\text{C}$; zum Vergleich (schwarz) ein Emissionsspektrum von gelöstem Rinderserumalbumin.

Bei BSA führt die Adsorption an der Poly(styrol)-Oberfläche zu einer noch drastischeren Blauverschiebung der Emissionsbande als bei Lysozym. Möglicherweise wird ein größerer Anteil der vorhandenen Tryptophanreste im Zuge der Adsorption von BSA in direkten Kontakt mit der Grenzfläche gebracht. Im Unterschied zu Lysozym führt die Adsorption an der Glasoberfläche zu einer geringfügigen Verschiebung des Spektrums zu kürzeren Wellenlängen anstatt zu längeren. Unter Umständen führt die Komplexbildung an der geladenen Siliziumoberfläche zu einer geringfügigen Zunahme der Hydrophobizität in der Umgebung eines Tryptophanrests. Unter dieser Annahme lässt sich auch eine Ähnlichkeit dieses Effekts mit der Blauverschiebung im TIRF-Spektrum bei Adsorption an einer

(ebenfalls negativ geladenen) planaren PAA-Bürste diskutieren (vgl. Kapitel 4.4.4, Seite 137 f. bzw. **Abbildung 58**, Seite 138).

Um einen Eindruck von dem Effekt des noch in Lösung vorhandenen Proteins zu bekommen, ist ein Vergleich mit Messungen in Abwesenheit des Proteins in Lösung sinnvoll. Dieser ist am Beispiel der Adsorption von BSA an Quarzglas in **Abbildung 70** dargestellt.

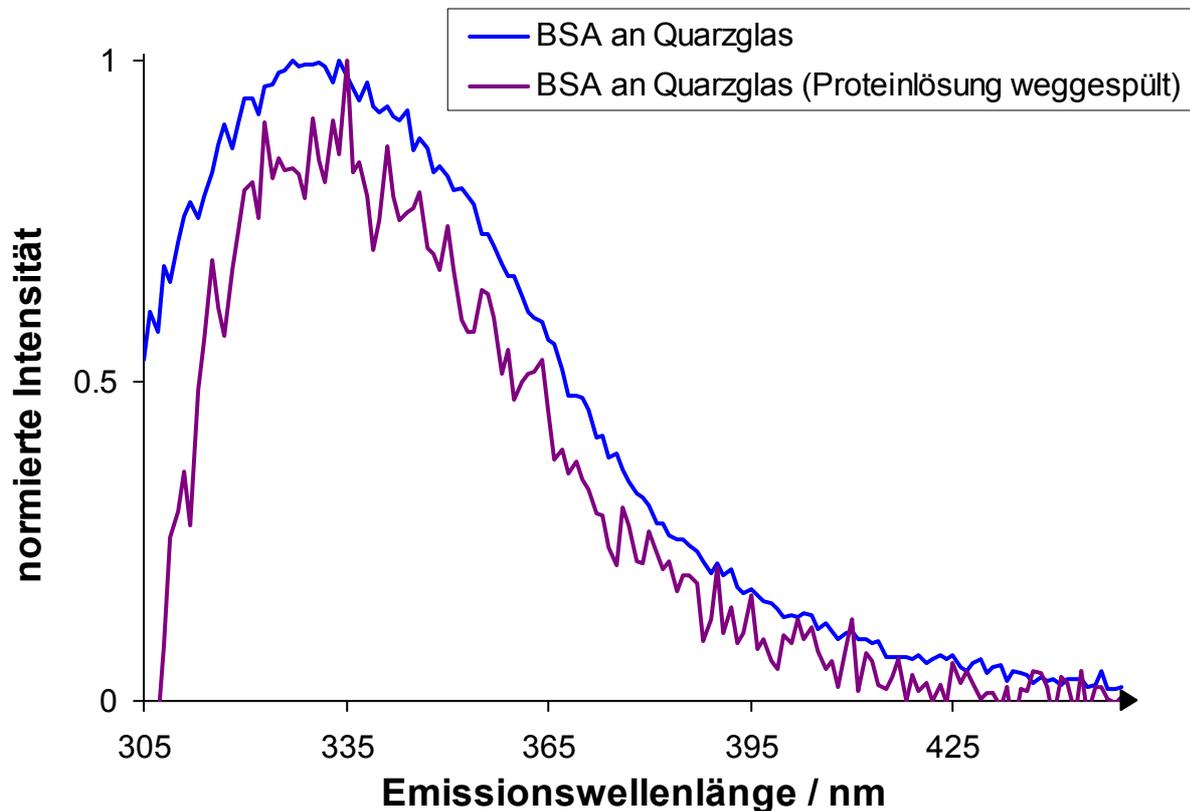


Abbildung 70. Gemittelte intensitätsnormierte TIRF-Spektren ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$) von einer Quarzglasoberfläche adsorbiertem Rinderserumalbumin in Gegenwart von 0.1 mg mL^{-1} BSA-Lösung in Puffer A (blau) und in Gegenwart von proteinfreiem Puffer A (violett) bei $\vartheta = 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Es fällt auf, dass das Spektrum in Abwesenheit des Proteins in Lösung deutlich verrauschter ist als in Gegenwart des Proteins. Hier muss vor allem eine partielle Desorption des Rinderserumalbumins nach dem Wegspülen der proteinhaltigen Lösung diskutiert werden. Es wird deutlich, dass zur zuverlässigen Auswertung von Spektren in Abwesenheit des Proteins in Lösung eine vergleichsweise große Anzahl von Spektren aufgenommen und gemittelt werden müsste. Dies wird durch Photobleaching an der Grenzfläche erschwert, so dass nach einer gewissen Anzahl an Messungen die untersuchte Quarzglasplatte ausgetauscht werden müsste.

Ein Salzzusatz während der Adsorption des Proteins bringt zusätzliche praktische Schwierigkeiten mit sich, wie die TIRF-Experimente in Gegenwart von 2 M NaSCN-Lösung zeigen. Die erhaltenen nicht intensitätsnormierten Spektren sind in **Abbildung 71** zu sehen.

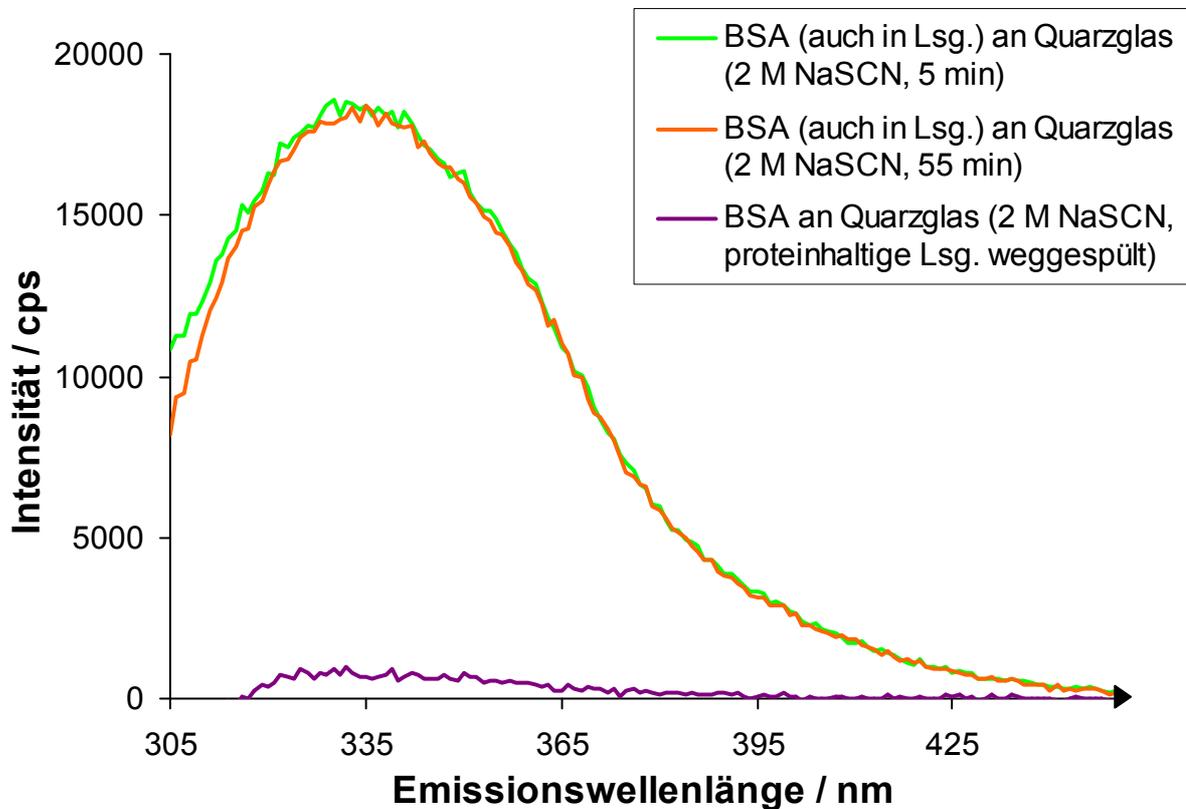


Abbildung 71. TIRF-Spektren ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$) von Rinderserumalbumin an / über einer Quarzglasoberfläche zunächst in Gegenwart (orange, grün) von 0.1 mg mL^{-1} BSA-Lösung mit 2 M NaSCN in Puffer A sowie nach dem Austausch (violett) der Lösung über der Oberfläche durch proteinfreie 2 M NaSCN-Lösung bei $\vartheta = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ und $\text{pH} = 7$.

Wird eine Lösung von BSA mit 0.1 mg mL^{-1} und 2 M NaSCN über der Quarzglasoberfläche inkubiert, so ist im Vergleich zu cosolvensfreier BSA-Lösung eine stark erhöhte Fluoreszenzintensität zu beobachten (ohne Salz findet sich das Intensitätsmaximum der Tryptophanfluoreszenz des Rinderserumalbumins bei ca. 3000 cps). Dabei kann die nach dem Wegspülen der proteinhaltigen Lösung verbleibende Fluoreszenzintensität gegenüber der zuvor festgestellten fast vernachlässigt werden (**Abbildung 71**).

Diese deutliche Steigerung der Signalintensität von BSA an der Quarzglasoberfläche in Gegenwart von 2 M NaSCN kann wahrscheinlich nicht durch einen erhöhten Adsorptionsgrad erklärt werden, zumal die im Rahmen der ATR-FTIR-Untersuchungen erhaltenen Spektren von an einer Siliziumoberfläche adsorbiertem BSA in Anwesenheit von NaSCN im Vergleich zur Situation ohne Cosolvens deutlich verrauschter sind (siehe **Abbildung 63**, Seite 146).

Eine Erklärung für das in Gegenwart von Natriumthiocyanat massiv angestiegene Messsignal kann der durch den Zusatz von 2 M NaSCN erhöhte Brechungsindex sein, welcher die optischen Verhältnisse an der Grenzfläche ändert.

Der entscheidende Unterschied zwischen der ATR-FTIR-Spektroskopie und der TIRF-Spektroskopie dürfte in diesem Zusammenhang darin bestehen, dass bei letzterer der Winkel, mit dem das Anregungslicht auf die Grenzfläche zur Lösung trifft (70°), nicht weit vom kritischen Winkel θ_c (vgl. Abschnitt 2.3.3, Seite 36 und Kapitel 2.2.7, Seite 29) entfernt ist. Insofern kann eine entsprechende Änderung im Brechungsindex der Lösung im Falle der TIRF-Spektroskopie signifikante Auswirkungen haben. So könnte der kritische Winkel soweit heraufgesetzt werden, dass keine (vollständige) Totalreflexion mehr stattfindet und der Lichtstrahl in die Lösung übertritt. Auch kann eine Fehljustage, aufgrund derer der Primärstrahl in die Probenlösung gelangt, nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Insofern müssen im Rahmen weiterführender TIRF-Experimente zur Bestimmung des Einflusses von Cosolventien auf Proteinadsorbate noch einige Probleme gelöst werden. Insgesamt stellt die in diesem Abschnitt 4.5 vorgenommene Charakterisierung von Proteinadsorbaten in Abhängigkeit von der Anwesenheit ionischer Cosolventien insbesondere aufgrund der Ergebnisse der ATR-FTIR-Spektroskopie neue Informationen über die Wechselbeziehung zwischen Hofmeistereffekten und dem Einfluss von Oberflächen auf Proteine bereit. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass einer Bestimmung dieser Wechselbeziehung für kosmotrope und chaotrope Salze an einer geladenen Oberfläche sowohl im Falle von BSA als auch im Falle von Lysozym der dominante Effekt einer erhöhten Ionenstärke im Wege steht. Dagegen kann an einer ungeladenen Poly(styrol)-Oberfläche ein signifikanter Effekt kosmotropen Ammoniumsulfats zumindest für das thermodynamisch weniger stabile Rinderserumalbumin nachgewiesen werden. In diesem Fall lässt sich ein durchgehender Effekt von kosmotropen hin zu chaotropen Salzen diskutieren, welcher in reflektometrischen Studien nicht in Erscheinung tritt [62-63]. Mit den Informationen über die Struktur der einzelnen Proteinmoleküle stellen die hier dargestellten Resultate daher eine sinnvolle Ergänzung zu den Daten bezüglich der übergeordneten²⁰ Struktur von Proteinadsorbaten in Gegenwart von Cosolventien dar. Gleichzeitig heben die Befunde den Sinn weiterer Nachforschungen hervor. Messungen mit zusätzlichen Salzen oder höheren Salzkonzentration auch unter Zuhilfenahme weiterer Methoden sind wahrscheinlich gut dazu geeignet, die hier gezeigten Ergebnisse abzusichern und zu erweitern.

²⁰ Damit sind beispielsweise Erkenntnisse über die Dicke des Adsorbats, die Packungsdichte der Proteine darin oder den Adsorptionsgrad gemeint.

5 Zusammenfassung

Wechselwirkungen von Proteinen mit Oberflächen können für den menschlichen Alltag sowohl Vorteile mit sich bringen als auch unerwünscht sein. Deren Zweckdienlichkeit herausstellende biotechnologische Anwendungen basieren häufig auf einer Ausnutzung spezifischer Interaktionen zwischen Protein und Oberfläche. Zahlreiche Beispiele hierfür finden sich in Nachweisverfahren für medizinische Zwecke. Dagegen geht eine unspezifische Proteinadsorption an Grenzflächen häufig mit praktischen Nachteilen einher, wie anhand der Rolle der Proteinadsorption bei der Abstoßung medizinischer Implantate oder der Notwendigkeit einer regelmäßigen Reinigung von Kontaktlinsen deutlich wird.

Ein Verständnis der Triebkräfte solcher Prozesse eröffnet Möglichkeiten zur gezielten Steuerung der unspezifischen Proteinadsorption und damit zur Unterdrückung unerwünschter Konsequenzen wie der Denaturierung und Desaktivierung von Proteinen.

In dieser Arbeit werden dabei zwei Ansätze genauer beleuchtet: Zuerst steht die Modifikation der Eigenschaften der Grenzfläche durch Beschichtung mit einer planaren Poly(acrylsäure)-Bürste im Fokus der Untersuchungen. Mit einer solchen Bürste funktionalisierte Grenzflächen zeigen trotz der negativ geladenen PAA-Ketten bei niedriger Ionenstärke der umgebenden pH-neutralen Lösung eine hohe Bindungsaffinität für ein breites Spektrum an Proteinen; bei höheren Ionenstärken wird die PAA-Bürste dagegen fast vollständig proteinresistent. Im Unterschied zu vielen anderen Grenzflächen ist die unspezifische Proteinadsorption an einer PAA-Bürste also ein größtenteils reversibler und steuerbarer Prozess.

Im Mittelpunkt dieser Forschungsarbeit steht eine mögliche Biokompatibilität einer planaren PAA-Bürste, welche sie beispielsweise als Beschichtung für Proteinlösung beinhaltende Gefäße interessant werden ließe.

Mit der ATR-FTIR-Spektroskopie und der TIRF-Spektroskopie stehen dabei zwei leistungsfähige grenzflächensensitive Methoden zur Verfügung, um die Sekundärstruktur und Tertiärstruktur adsorbierter Proteinmoleküle zu untersuchen. Die Aussagekraft der zu gewinnenden Schlussfolgerungen wird dabei durch den Vergleich der Ergebnisse zwischen diesen orthogonalen Messmethoden und den z. B. auf reflektometrischen Methoden basierenden Literaturdaten erhöht. Ebenfalls ist in diesem Zusammenhang ein Vergleich mit den für gelöstes Protein erhaltenen Daten aus IR-Transmissionsmessungen und fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen in Lösung von Bedeutung. Die Quantifizierung von enzymatischer Aktivität erfolgt ebenfalls über den Nachweis der Bildung eines fluoreszierenden Reaktionsprodukts.

Mittels ATR-FTIR-Spektroskopie kann sowohl durch die qualitative Betrachtung der Amid I'-Bande als auch anhand der Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse für das negativ geladene Protein Rinderserumalbumin eine weitgehende Wahrung der nativen Proteinkonformation im Zuge einer Adsorption an einer planaren PAA-Bürste festgestellt werden. Gewisse Abweichungen bei dem kleineren, ebenfalls negativ geladenen Protein α -Lactalbumin widersprechen dabei nicht dieser generellen Tendenz. Diese ergibt sich auch durch einen Vergleich mit bereits im Vorfeld erhaltenen Ergebnissen für nettopositiv geladenes Hühnerlysozym und ebenfalls negativ geladenes und amyloidogenes Rinderinsulin unter pH-neutralen Bedingungen.

In dieses Bild passen auch die Ergebnisse der Quantifizierung der enzymatischen Aktivität von adsorbierter Meerrettichperoxidase. Diese ist an einer PAA-Bürste um mehr als eine Zehnerpotenz größer als an einer Siliziumoberfläche. Eine Adsorption des Proteins an einer planaren PAA-Bürste führt zu einer Verringerung der molekularen Aktivität des Enzyms auf ca. 11%, während durch eine Desorption des Proteins mit Kochsalz bei höherer Proteinkonzentration diese um ca. 50% gesteigert wird. Diese Werte können durch eine nicht vollständige Kompensation des Aktivitätsverlusts aufgrund der Adsorption durch die Desorption und durch einen höheren Anteil irreversibel gebundener Proteinmoleküle bei niedrigeren HRP-Konzentrationen erklärt werden. Insbesondere unter Berücksichtigung der beschränkten Zugänglichkeit der HRP-Moleküle in der Bürste bleibt deren Aktivität insgesamt zu einem bemerkenswerten Anteil erhalten.

Unter sauren Bedingungen (pH = 2) hat eine PAA-Bürste aufgrund der Protonierung der Carbonsäurefunktionen andere Eigenschaften als in neutralem Milieu. Weil eine Gegenionenverdampfung nicht mehr möglich ist, führt beispielsweise eine Erhöhung der Ionenstärke in der Lösung nicht mehr zu einer Proteindesorption; im Gegenteil kann für Rindersinsulin unter sauren Bedingungen anhand der Ergebnisse der ATR-FTIR-Spektroskopie eine Erhöhung des Adsorptionsgrades um einen Faktor von ungefähr 6 durch die Zugabe von 500 mM Kochsalz festgestellt werden. Offenbar werden repulsive elektrostatische Wechselwirkungen der Proteine im Adsorbat abgeschwächt.

Dennoch fördert eine planare PAA-Bürste nicht die fibrilläre Aggregation des Insulins, welche beispielsweise mit Altersdiabetes in Verbindung gebracht wird. Dies zeigen Analysen der Sekundärstruktur für die Adsorbate in An- und Abwesenheit des Salzes. Auch die Ergebnisse der Neutronenreflektometrie weisen auf keine fibrilläre Aggregation hin, weil die Adsorption sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Kochsalz durch kosmotropes

Glycerin zurückgedrängt wird. Eine fibrilläre Aggregation sollte durch Glycerin gefördert werden.

Abschließend fügen Denaturierungsexperimente mit Harnstoff an einer planaren PAA-Bürste einen weiteren Aspekt hinzu. Die Entfaltung von an einer planaren PAA-Bürste adsorbiertem Hühnerlysozym durch hochkonzentrierten Harnstoff ist ein vollständig reversibler Prozess, wie die Ergebnisse der ATR-FTIR-Spektroskopie und TIRF-Spektroskopie übereinstimmend zeigen. Auch in Lösung sind die Veränderungen im Fluoreszenzspektrum des Proteins durch hochkonzentrierten Harnstoff durch Verdünnung vollständig rückgängig zu machen. Dagegen wird bei an der PAA-Bürste adsorbiertem Rinderserumalbumin die ursprüngliche Struktur nicht gänzlich wiederhergestellt. Anhand fluoreszenzspektroskopischer Untersuchung von gelöstem Protein ist ein solcher Effekt ebenfalls auszumachen.

Hinsichtlich der Reversibilität der Denaturierung durch Harnstoff kann also zwischen an einer planaren PAA-Bürste adsorbierten und gelösten Proteinen kein Unterschied festgestellt werden.

Alle diese Ergebnisse legen eine Anwendbarkeit einer planaren PAA-Bürste als biokompatible Materialbeschichtung nahe. Denn die Wahrung der Struktur ist eine notwendige Voraussetzung für die Funktionsfähigkeit von Proteinen. Letztere kann an einer planaren PAA-Bürste ebenfalls zu einem guten Teil erhalten bleiben, wie deren Quantifizierung am Beispiel von Meerrettichperoxidase deutlich macht. Eine fibrilläre Aggregation von Proteinen stellt einen für biologische Systeme sehr unvorteilhaften Effekt dar, welcher durch eine planare PAA-Bürste ebenfalls nicht gefördert wird. Und schließlich verhalten sich an der PAA-Bürste adsorbierte Proteine auch hinsichtlich der Reversibilität bezüglich einer Denaturierung mit Harnstoff so, als ob sie in Lösung vorlägen.

Der zweite hier betrachtete Ansatz zur Beeinflussung der Proteinadsorption an Grenzflächen ist die Zugabe von Cosolventien zur Proteinlösung. Lösliche Zusätze, welche entweder die native Struktur von Proteinen stabilisieren (kosmotrop) oder destabilisieren (chaotrop), sind seit Langem bekannt. Da auch die Proteinadsorption in vielen Fällen Einfluss auf die Proteinstruktur hat, sollte es eine Wechselbeziehung zwischen der Proteinadsorption und dem Vorhandensein kosmotroper oder chaotroper Verbindungen in Lösung geben.

Die Ergebnisse der ATR-FTIR-Spektroskopie für Adsorbate der Proteine Hühnerlysozym und Rinderserumalbumin an einer negativ geladenen Siliziumoberfläche und einer hydrophoben Poly(styrol)-Oberfläche in Abhängigkeit von der Anwesenheit verschiedener Hofmeistersalze machen zunächst einmal deutlich, dass die Sekundärstruktur im Zuge der Adsorption an diesen Oberflächen in Abwesenheit von Cosolvens deutlichen Änderungen unterliegt.

An einer Siliziumoberfläche scheinen die beobachteten Effekte auf die Sekundärstruktur der Proteine im Adsorbat von der Art des mit einer Konzentration von 2 M zugesetzten Salzes unabhängig zu sein: Die Erhöhung der Ionenstärke bewirkt für BSA eine deutlich nativere Proteinstruktur im Adsorbat, während bei Lysozym die Adsorption durch die Abschirmung attraktiver Wechselwirkungen nahezu vollständig unterdrückt wird. Beides kann vermutlich auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass die Siliziumoberfläche geladen ist.

Hingegen kann an Poly(styrol) für BSA ein Unterschied zwischen kosmotropen und chaotropen Salzen festgestellt werden: In Gegenwart von kosmotropem Ammoniumsulfat ist eine leichte Ausprägung hin zur Struktur des gelösten Proteins festzustellen, während die native Struktur in Anwesenheit von chaotropem Natriumthiocyanat tendenziell am deutlichsten degeneriert ist. Insgesamt ist dabei der Einfluss der Grenzfläche gegenüber dem Einfluss des Cosolvens dominant.

Für Lysozym ist wahrscheinlich aufgrund der hohen Stabilität seiner nativen Struktur auch an der Poly(styrol)-Oberfläche kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Salzen feststellbar.

Vom Standpunkt dieser Arbeit aus gesehen ist die Beschichtung der Grenzfläche im Vergleich zur Zugabe von Cosolventien insgesamt das probatere Mittel zur Steuerung unspezifischer Proteinadsorption, auch weil hierdurch die Situation in Lösung im Allgemeinen unbeeinflusst bleibt. Die Resultate bezüglich des Einflusses von Cosolventien auf Proteinadsorbate stellen dennoch eine sinnvolle Erweiterung des Kenntnisstands dar und machen gleichzeitig die Notwendigkeit weiterer Nachforschungen deutlich.

6 Literaturverzeichnis

- [1] „Proteinadsorption an festen Grenzflächen. Erwünscht und unerwünscht“;
C. Czeslik *Chem. unserer Zeit* **2006**, 40 (4), 238-245.
- [2] „Proteomics: Die post-genomische Revolution“;
S. Nock, P. Wagner *Chem. unserer Zeit* **2000**, 34 (6), 348-354.
- [3] F. Lottspeich, H. Zorbas (Hrsg.) *Bioanalytik*, Spektrum akademischer Verlag **1998**, Heidelberg.
- [4] „Proteinentfernung von Kontaktlinsen: Damit der Durchblick erhalten bleibt“;
C. Janiak *Chem. unserer Zeit* **2001**, 35 (6), 348-354.
- [5] “Metal-Mediated Cross-Linking in the Generation of a Marine-Mussel Adhesive”;
M. J. Sever, T. J. Weissner, J. Monahan, S. Srinivasan, J. J. Wilker *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43 (4), 448-450.
- [6] “Foreign Body Reaction to Biomaterials”;
J. M. Anderson, A. Rodriguez, D. T. Chang *Semin Immunol.* **2008**, 20 (2), 86-100.
- [7] P. C. Hiemenz, R. Rajagopalan *Principles of colloid and surface chemistry*, Marcel Dekker **1997**, New York.
- [8] “Electrostatic Contribution to the Energy and Entropy of Protein Adsorption”;
C. M. Roth, J. E. Sader, A. M. Lenhoff *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, 203 (1), 218-221.
- [9] “Driving Forces for Protein Adsorption at Solid Surfaces”;
W. Norde *Macromol. Symp.* **1996**, 103, 5-18.
- [10] “Adsorption of Model Proteins with wide Variation in Molecular Properties on Colloidal Particles”;
A. Kondo, K. Higashitani *J. Colloid Interface Sci.* **1992**, 150 (2), 344-351.
- [11] “Factors Ruling Protein Adsorption”;
C. Czeslik *Z. Phys. Chem.* **2004**, 218 (7), 771-801.
- [12] “Self-Assembled Organic Monolayers: Model Systems for Studying Adsorption of Proteins at Surfaces”;
K. L. Prime, G. M. Whitesides *Science* **1991**, 252 (5010), 1164-1167.
- [13] G. Decher (Hrsg.), J. B. Schlenoff (Hrsg.) *Multilayer Thin Films*, Wiley-VCH **2003**, Weinheim.
- [14] “Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites”;
G. Decher *Science* **1997**, 277 (5330), 1232-1237.

- [15] “Interaction of Proteins with Linear Polyelectrolytes and Spherical Polyelectrolyte Brushes in Aqueous Solution”;
A. Wittemann, M. Ballauff *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8* (45), 5269-5275.
- [16] “Polyelectrolyte Brushes”;
M. Ballauff, O. Borisov *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2006**, *11* (6), 316-323.
- [17] “Adsorption of Proteins on Spherical Polyelectrolyte Brushes in Aqueous Solution”;
A. Wittemann, B. Haupt, M. Ballauff *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, *5* (8), 1671-1677.
- [18] “Polyelectrolyte-Mediated Protein Adsorption: Fluorescent Protein Binding to Individual Polyelectrolyte Nanospheres”;
K. Anikin, C. Röcker, A. Wittemann, J. Wiedenmann, M. Ballauff, G. U. Nienhaus, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (12), 5418-5420.
- [19] “Mechanism of Protein Binding to Spherical Polyelectrolyte Brushes Studied *in situ* Using Two-Photon Excitation Fluorescence Fluctuation Spectroscopy”;
C. Czeslik, R. Jansen, M. Ballauff, A. Wittemann, C. A. Royer, E. Gratton, T. Hazlett *Phys. Rev. E* **2004**, *69* (2), 021401.
- [20] “Characterization of a Planar Poly(acrylic acid) Brush as a Materials Coating for Controlled Protein Immobilization”;
O. Hollmann, C. Czeslik *Langmuir* **2006**, *22* (7), 3300-3305.
- [21] “A Modified Box Model Including Charge Regulation for Protein Adsorption in a Spherical Polyelectrolyte Brush”;
P. M. Biesheuvel, A. Wittemann *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (9), 4209-4214.
- [22] “Self-consistent Field Theory of Protein Adsorption in a non-Gaussian Polyelectrolyte Brush”; P. M. Biesheuvel, F. A. M. Leermakers, M. A. Cohen Stuart *Phys. Rev. E* **2006**, *73* (1), 011802.
- [23] “Influence of Structural Details in Modeling Electrostatically Driven Protein Adsorption”; D. Asthagiri, A. M. Lenhoff *Langmuir* **1997**, *13* (25), 6761-6768.
- [24] “Protein Binding to Like-Charged Polyelectrolyte Brushes by Counterion Evaporation”;
C. Czeslik, G. Jackler, R. Steitz, H.-H. von Grünberg *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108* (35), 13395-13402.
- [25] “Structure and Dynamics of α -Lactalbumin Adsorbed at a Charged Brush Interface”;
O. Hollmann, R. Steitz, C. Czeslik *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10* (10), 1448-1456.
- [26] “Interaction of Proteins with Spherical Polyelectrolyte Brushes in Solution as Studied by Small-Angle X-Ray Scattering”; S. Rosenfeldt, A. Wittemann, M. Ballauff, E. Breininger, J. Bolze, N. Dingenouts *Phys. Rev. E* **2004**, *70* (6), 061403.

- [27] “Protein Structural Perturbation and Aggregation on Homogeneous Surfaces”;
A. Sethuraman, G. Belfort *Biophys. J.* **2005**, *88* (2), 1322-1333.
- [28] “Partial Denaturation of Silica-Adsorbed Bovine Serum Albumin Determined by Time-Resolved Evanescent Wave-Induced Fluorescence Spectroscopy”;
L. Lensun, T. A. Smith, M. L. Gee *Langmuir* **2002**, *18* (25), 9924-9931.
- [29] “Reversibility of Structural Rearrangements in Bovine Serum Albumin during Homomolecular Exchange from AgI Particles”;
T. Vermonden, C. E. Giacomelli, W. Norde *Langmuir* **2001**, *17* (12), 3734-3740.
- [30] “Adsorption-Induced Conformational Changes in the Serine Proteinase Savinase: A Tryptophan Fluorescence and Circular Dichroism Study”;
M. C. L. Maste, W. Norde, A. J. W. G. Visser *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *196* (2), 224-230.
- [31] “Structural Changes of Bovine Serum Albumin upon Adsorption to Modified Fluoropolymer Substrates Used for Neural Cell Attachment Studies”;
E. J. Bekos, J. P. Ranieri, P. Aebischer, J. A. Gardella, F. V. Bright *Langmuir* **1995**, *11* (3), 984-989.
- [32] “Conformational Changes in Adsorbed Proteins”;
A. Ball, R. A. L. Jones *Langmuir* **1995**, *11*, (9), 3542-3548.
- [33] “Secondary Structure Analysis of Proteins Embedded in Spherical Polyelectrolyte Brushes by FT-IR Spectroscopy”;
A. Wittemann, M. Ballauff, *Anal. Chem.* **2004**, *76* (10), 2813-2819.
- [34] “Activity of Enzymes Immobilized in Colloidal Spherical Polyelectrolyte Brushes”;
B. Haupt, T. Neumann, A. Wittemann, M. Ballauff *Biomacromolecules* **2005**, *6* (2), 948-955.
- [35] “The Control of Protein Stability and Association by Weak Interactions with Water: How Do Solvents Affect These Processes?”;
S. N. Timasheff *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1993**, *22*, 67-97.
- [36] T. E. Creighton *Proteins*, 2. Auflage, Freeman **1993**, New York
- [37] “Quantifying Accumulation or Exclusion of H⁺, HO⁻, and Hofmeister Salt Ions near Interfaces”;
L. M. Pegram, M. T. Record Jr. *Chem. Phys. Lett.* **2008**, *467* (1-3), 1-8.
- [38] “Ion Effects on the Solution Structure of Biological Macromolecules”;
P. H. von Hippel, T. Schleich *Acc. Chem. Res.* **1969**, *2* (9), 257-265.
- [39] “Neutral Salts: The Generality of Their Effects on the Stability of Macromolecular Conformations”;
P. H. von Hippel, K.-Y. Wong *Science* **1964**, *145* (3632), 577-580.

- [40] „Zur Lehre von der Wirkung der Salze“;
F. Hofmeister *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **1888**, *24*, 247-260.
- [41] “The Present State of Affairs with Hofmeister Effects”; W. Kunz, P. Lo Nostro,
B. W. Ninham *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2004**, *9* (1-2), 1-18.
- [42] “Chemistry of Hofmeister Anions and Osmolytes”;
Y. Zhang, P. S. Cremer *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2010**, *61*, 63-83.
- [43] “Thermodynamic Origin of Hofmeister Ion Effects”;
L. M. Pegram, M. T. Record Jr. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (31), 9428-9436.
- [44] “Hofmeister Salt Effects on Surface Tension Arise from Partitioning of Anions and
Cations between Bulk Water and the Air-Water Interface”;
L. M. Pegram, M. T. Record Jr. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (19), 5411-5417.
- [45] “The Link between Ion Specific Bubble Coalescence and Hofmeister Effects Is the
Partitioning of Ions within the Interface”;
C. L. Henry, V. S. J. Craig *Langmuir* **2010**, *26* (9), 6478-6483.
- [46] “Interfacial Water Structure Controls Protein Conformation”;
A. Dér, L. Kelemen, L. Fábrián, S. G. Taneva, E. Fodor, T. Páli, A. Cupane, M. G.
Cacace, J. J. Ramsden *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (19), 5344-5350.
- [47] R. A. Robinson, R. H. Stokes *Electrolyte Solutions*, Butterworths **1959**, London
- [48] “Negligible Effect of Ions on the Hydrogen-Bond Structure in Liquid Water”;
A. W. Omta, M. F. Kropman, S. Woutersen, H. J. Bakker *Science* **2003**, *301* (5631)
347-349.
- [49] “Influence of Ions on the Hydrogen-Bond Structure in Liquid Water”;
A. W. Omta, M. F. Kropman, S. Woutersen, H. J. Bakker *J. Chem. Phys.* **2003**,
119 (23), 12457-12461.
- [50] “The Stabilization of Proteins by Osmolytes”;
T. Arakawa, S. N. Timasheff *Biophys. J.* **1985**, *47* (3), 411-414.
- [51] “Mechanism of Protein Stabilization by Glycerol: Preferential Hydration in Glycerol-
Water Mixtures”; K. Gekko, S. N. Timasheff *Biochemistry* **1981**, *20* (16), 4667-4676.
- [52] “Proteins in Mixed Solvents: A Molecular-Level Perspective”;
B. M. Baynes, B. L. Trout *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107* (50), 14058-14067.
- [53] “Effect of Temperature, Pressure, and Cosolvents on Structural and Dynamic
Properties of the Hydration Shell of SNase: A Molecular Dynamics Computer
Simulation Study”;
N. Smolin, R. Winter *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (3), 997-1006.

- [54] “Electrostatic and van der Waals Contributions to Protein Adsorption: Comparison of Theory and Experiment”;
C. M. Roth, A. M. Lenhoff *Langmuir* **1995**, *11* (9), 3500-3509.
- [55] “The Adsorption of Human Plasma Albumin and Bovine Pancreas Ribonuclease at Negatively Charged Polystyrene Surfaces: I. Adsorption Isotherms. Effects of Charge, Ionic Strength, and Temperature”;
W. Norde, J. Lyklema *J. Colloid Interface Sci.* **1978**, *66* (2), 257-265.
- [56] “Inhibition of Protein Adsorption onto Silica by Polyvinylpyrrolidone”;
S. Robinson, P. A. Williams *Langmuir* **2002**, *18* (23), 8743-8748.
- [57] “Adsorption Kinetics, Conformation, and Mobility of the Growth Hormone and Lysozyme on Solid Surfaces, Studied with TIRF”;
J. Buijs, V. Hlady *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *190* (1), 171-181.
- [58] “Kosmotropes Form the Basis of Protein-Resistant Surfaces”;
R. S. Kane, P. Deschatelets, G. M. Whitesides *Langmuir* **2003**, *19* (6), 2388-2391.
- [59] “A Survey of Structure-Property Relationships of Surfaces that Resist the Adsorption of Protein”; E. Ostuni, R. G. Chapman, R. E. Holmlin, S. Takayama, G. M. Whitesides *Langmuir* **2001**, *17* (18), 5605-5620.
- [60] “Hydrophobic and Hofmeister Effects on the Adhesion of Spider Silk Proteins onto Solid Substrates: An AFM-based Single-Molecule Study”;
M. Geisler, T. Pirzer, C. Ackerschott, S. Lud, J. Garrido, T. Scheibel, T. Hugel *Langmuir* **2008**, *24* (4), 1350-1355.
- [61] “Stability of Proteins Confined in MCM-48 Mesoporous Molecular Sieves – The Effects of pH, Temperature and Co-solvents”;
S. Zhao, H. Gies, R. Winter *Z. Phys. Chem.* **2007**, *221* (1), 139-154.
- [62] “Control of Protein Interfacial Affinity by Nonionic Cosolvents”;
J. Koo, T. Gutberlet, C. Czeslik *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (20), 6292-6295.
- [63] “Analysis of Hofmeister Effects on the Density Profile of Protein Adsorbates: A Neutron Reflectivity Study”;
F. Evers, R. Steitz, M. Tolan, C. Czeslik *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113* (25), 8462-8465.
- [64] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter *Molekularbiologie der Zelle*, 4. Auflage, Wiley-VCH **2004**, Weinheim.
- [65] L. Stryer *Biochemie*, 5. Auflage, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft **1990**, Heidelberg.

- [66] "Interpretation of Protein Titration Curves. Application to Lysozyme";
C. Tanford, R. Roxby *Biochemistry* **1972**, *11* (11), 2192-2198.
- [67] "A Thermodynamic Approach to the Problem of Stabilization of Globular Protein Structure: A Calorimetric Study";
P. L. Privalov, N. N. Khechinashvili *J. Mol. Biol.* **1974**, *86* (3), 665-684.
- [68] " α -Lactalbumin: Structure and Function";
E. A. Permyakov, L. J. Berliner *FEBS Letters* **2000**, *473* (3), 269-274.
- [69] "Thermal Isoelectric Precipitation of α -Lactalbumin from a Whey Protein Concentrate: Influence of Protein-Calcium Complexation";
C. Bramaud, P. Aimar, G. Daufin *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *47* (2), 121-130.
- [70] "Adsorption of Lysozyme and α -Lactalbumin on Poly(styrenesulfonate) Lattices: 1. Adsorption and Desorption Behavior";
F. Galisteo, W. Norde *Colloids Surf. B* **1995**, *4* (6), 375-387.
- [71] "Silver Stain for Proteins in Polyacrylamide Gels: A Modified Procedure with Enhanced Uniform Sensitivity";
J. H. Morrissey *Anal. Biochem.* **1981**, *117* (2), 307-310.
- [72] "Serum Albumin";
M. A. Rothschild, M. Oratz, S. S. Schreiber *Hepatology* **1988**, *8* (2), 385-401.
- [73] "Structure of Serum Albumin";
D. C. Carter, J. X. Ho *Adv. Protein Chem.* **1994**, *45*, 153-203.
- [74] "A Combined Scanning Dilatometric and Differential Scanning Calorimetric Study of the Thermal Unfolding of Bovine Serum Albumin"; C. La Rosa, D. Milardi, S. Fasone, D. Grasso *Thermochim. Acta* **1994**, *235* (2), 231-237.
- [75] Herstellerangabe nach www.invitrogen.com
- [76] "Peroxidase Isozymes from Horseradish Roots. I. Isolation and Physical Properties";
L. M. Shannon, E. Kay, J. Y. Lew *J. Biol. Chem.* **1966**, *241* (9), 2166-2172.
- [77] "Determination of Isoelectric Points in Thin-Layer Isoelectric Focusing: The Importance of Attaining the Steady State and the role of CO₂ Interference";
H. Delincée, B. J. Radola *Anal. Biochem.* **1978**, *90* (2), 609-623.
- [78] "Isoelectric Focusing in Acrylamide Gels: Use of Amphoteric Dyes as Internal Markers for Determination of Isoelectric Points";
A. Conway-Jacobs, L. M. Lewin *Anal. Biochem.* **1971**, *43* (2), 394-400.
- [79] "Equilibrium Denaturation of Insulin and Proinsulin"; D. N. Brems, P. L. Brown, L. A. Heckenlaible, B. H. Frank *Biochemistry* **1990** (29), 39, 9289-9293.

- [80] “The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis”;
K. Weber, M. Osborn *J. Biol. Chem.* **1969**, *244* (16), 4406-4412.
- [81] “UCFS Chimera: An Extensible Molecular Modeling System”;
<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>
- [82] “Triclinic Lysozyme at 0.65 Å Resolution”; J. Wang, M. Dauter, R. Alkire,
A. Joachimiak, Z. Dauter *Acta Cryst.* **2007**, *63* (12), 1254-1268.
- [83] “A Resource for Studying Biological Macromolecules”; <http://www.pdb.org/>
- [84] “Structure of Hen Egg-White Lysozyme: A Three-Dimensional Fourier Synthesis at
2 Å Resolution”; C. C. F. Blake, D. F. König, G. A. Mair, A. C. T. North,
D. C. Phillips, V. R. Sarma *Nature* **1965**, *206* (4986), 757-761.
- [85] “Crystal Structures of Apo- and Holo-Bovine α -Lactalbumin at 2.2 Å Resolution
Reveal an Effect of Calcium on Inter-Lobe Interactions”;
E. D. Chrysina, K. Brew, K. R. Acharya *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (47), 37021-37029.
- [86] “ α -Lactalbumin Suppresses Interleukin-6 Release after Intestinal Ischemia /
Reperfusion via Nitric Oxide in Rats”;
M. Yamaguchi, M. Uchida *Inflammopharmacology* **2007**, *15* (1), 43-47.
- [87] “Albumin and Mammalian Cell Culture: Implications for Biotechnology
Applications”; G. L. Francis *Cytotechnology* **2010**, *62* (1), 1-16.
- [88] “Crystal Structure of Human Serum Albumin at 2.5 Å Resolution”;
S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, K. Kobayashi *Protein Eng.* **1999**,
12 (6), 439-446.
- [89] H. Waldmann, P. Janning *Chemical Biology: A Practical Course*, Wiley-VCH **2004**,
Weinheim.
- [90] ”Potential Applications of Peroxidases”;
M. Hamid, K.-ur-Rheman *Food Chem.* **2009**, *115* (4), 1177-1186.
- [91] “The Catalytic Pathway of Horseradish Peroxidase at High Resolution”;
G. I. Berglund, G. H. Carlsson, A. T. Smith, H. Szöke, A. Henriksen, J. Hajdu *Nature*
2002, *417* (6887), 463-468.
- [92] “Complexities in Horseradish Peroxidase-Catalyzed Oxidation of Dihydroxy-
phenoxazine Derivatives: Appropriate Ranges for pH Values and Hydrogen Peroxide
Concentrations in Quantitative Analysis”;
V. Towne, M. Will, B. Oswald, Q. Zhao *Anal. Biochem.* **2004**, *334* (2), 290-296.

- [93] “A Stable Nonfluorescent Derivative of Resorufin for the Fluorometric Determination of Trace Hydrogen Peroxide: Applications in Detecting the Activity of Phagocyte NADPH Oxidase and Other Oxidases”; M. Zhou, Z. J. Diwu, N. Panchuk-Voloshina, R. P. Haugland *Anal. Biochem.* **1997**, 253 (2), 162-168.
- [94] “Mechanistic Aspects of Horseradish Peroxidase Elucidated through Single-Molecule Studies”; H. H. Gorris, D. R. Walt *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131 (17), 6277-6282.
- [95] “A Highly Sensitive Fluorescent Micro-Assay of H₂O₂ Release from Activated Human Leukocytes Using a Dihydroxyphenoxazine Derivative”; J. G. Mohanty, J. S. Jaffe, E. S. Schulman, D. G. Raible *J. Immunol. Methods* **1997**, 202 (2), 133-141.
- [96] “A Critical Investigation of NADPH Oxidase Activity in Human Spermatozoa”; S. C. Richer, W. C. L. Ford *Mol. Hum. Reprod.* **2001**, 7 (3), 237-244.
- [97] “Insulin at pH 2: Structural Analysis of the Conditions Promoting Insulin Fibre Formation”; J. L. Whittingham, D. J. Scott, K. Chance, A. Wilson, J. Finch, J. Brange, G. G. Dodson *J. Mol. Biol.* **2002**, 318 (2), 479-490.
- [98] “The Structure of Insulin”; F. Sanger, L. F. Smith *Endeavour* **1957**, 16, 48-53.
- [99] “The Structure of 2 Zn Pig Insulin Crystals at 1.5 Å Resolution”; E. N. Baker, T. L. Blundell, J. F. Cutfield, S. M. Cutfield, E. J. Dodson, G. G. Dodson, D. M. C. Hodgkin, R. E. Hubbard, N. W. Isaacs, C. D. Reynolds, K. Sakabe, N. Sakabe, N. M. Vijayan *Philos. Trans. R. Lond. Soc. Biol.* **1988**, 319 (1195), 369-456.
- [100] “The Role of Assembly in Insulin’s Biosynthesis”; G. Dodson, D. Steiner *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, 8 (2), 189-194.
- [101] “Revealing Different Aggregation Pathways of Amyloidogenic Proteins by Ultrasound Velocimetry”; V. Smirnovas, R. Winter *Biophys. J.* **2008**, 94 (8), 3241-3246.
- [102] “Aggregation of Bovine Insulin Probed by DSC/PPC Calorimetry and FTIR Spectroscopy”; W. Dzwolak, R. Ravindra, J. Lendermann, R. Winter *Biochemistry* **2003**, 42 (38), 11347-11355.
- [103] “The Protofilament Structure of Insulin Amyloid Fibrils”; J. L. Jiménez, E. J. Nettleton, M. Bouchard, C. V. Robinson, C. M. Dobson, H. R. Saibil *PNAS* **2002**, 99 (14), 9196-9201.
- [104] “Partially Folded Intermediates in Insulin Fibrillation”; A. Ahmad, I. S. Millett, S. Doniach, V. N. Uversky, A. L. Fink *Biochemistry* **2003**, 42 (39), 11404-11416.
- [105] “Stimulation of Insulin Fibrillation by Urea-induced Intermediates”; A. Ahmad, I. S. Millett, S. Doniach, V. N. Uversky, A. L. Fink *J. Biol. Chem.* **2004**, 279 (15), 14999-15013.

- [106] “Kinetics of Insulin Aggregation in Aqueous Solutions upon Agitation in the Presence of Hydrophobic Surfaces”;
V. Sluzky, J. A. Tamada, A. M. Klivanov, R. Langer *PNAS* **1991**, *88* (21), 9377-9381.
- [107] C. Czeslik, H. Seemann, R. Winter *Basiswissen Physikalische Chemie*, 2. Auflage, Teubner Verlag **2007**, Wiesbaden.
- [108] “The 1986 CODATA Recommended Values of the Fundamental Physical Constants”;
E. R. Cohen, B. N. Taylor *J. Res. Natl. Bur. Stand.* **1987**, *92* (2), 85-95.
- [109] R. Winter, F. Noll *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, Teubner Verlag **1998**, Stuttgart.
- [110] “Infrared Spectroscopy of Proteins”;
A. Barth *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1767* (9), 1073-1101.
- [111] “Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures”;
J. Kong, S. Yu *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2007**, *39* (8), 549-559.
- [112] ”Structure of Synthetic Polypeptides”;
A. Elliott, E. J. Ambrose *Nature* **1950**, *165* (4206), 921-922.
- [113] “Vibrational Spectroscopy and Conformation of Peptides, Polypeptides, and Proteins”;
S. Krimm, J. Bandekar *Adv. Protein Chem.* **1986**, *38*, 181-364.
- [114] ”Amide Modes and Protein Conformation”;
J. Bandekar *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1220* (2), 123-143.
- [115] “Characteristic Infrared Bands of Monosubstituted Amides”;
T. Miyazawa, T. Shimanouchi, S. Mizushima *J. Chem. Phys.* **1956**, *24* (2), 408-418.
- [116] “Determination of Soluble and Membrane Protein Structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. III. Secondary Structures”;
E. Goormaghtigh, V. Cabiaux, J.-M. Ruysschaert *Subcell. Biochem.* **1994**, *23*, 405-450.
- [117] “What Vibrations tell about Proteins”;
A. Barth, C. Zscherp *Quart. Rev. Biophys.* **2002**, *35* (4), 369-430.
- [118] “Fourier Self-Deconvolution: A Method for Resolving Intrinsically Overlapped Bands”;
J. K. Kauppinen, D. J. Moffatt, H. H. Mantsch, D. G. Cameron *Appl. Spectrosc.* **1981**, *35* (3), 271-276.
- [119] “A Generalized Approach to Derivative Spectroscopy”;
D. G. Cameron, D. J. Moffatt *Appl. Spectrosc.* **1987**, *41* (4), 539-544.
- [120] “Examination of the Secondary Structure of Proteins by Deconvolved FTIR Spectra”;
D. M. Byler, H. Susi *Biopolymers* **1986**, *25* (3), 469-487.

- [121] “Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Analysis of Protein Deposits”; S. Seshadri, R. Khurana, A. L. Fink *Methods Enzymol.* **1999**, *309*, 559-576.
- [122] “Surface Chemistry from Spectral Analysis of Totally Internally Reflected Radiation”; N. J. Harrick *J. Phys. Chem.* **1960**, *64* (9), 1110-1114.
- [123] “Internal Reflection and ATR Spectroscopy”; M. Milosevic *Appl. Spectrosc. Rev.* **2004**, *39* (3), 365-384.
- [124] “Attenuated Total Reflection: A New Principle for the Production of Useful Infra-Red Reflection Spectra of Organic Compounds”; J. Fahrenfort *Spectrochim. Acta* **1961**, *17* (7), 698-709.
- [125] “Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopy of Proteins and Lipids in Biological Membranes”; E. Goormaghtigh, V. Raussens, J.-M. Ruyschaert *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1422* (2), 105-185.
- [126] D. R. Lide (Chefredakteur) *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 76. Auflage CRC Press **1995**, Boca Raton.
- [127] J. R. Lakowicz *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2. Auflage Kluwer **1999**, New York.
- [128] “Attenuated Total Reflection – Applications in the Ultraviolet-Visible Region”; T. Hirschfeld *Can. Spectrosc.* **1966**, *11* (4), 102-106.
- [129] “Total Internal Reflection Fluorescence”; D. Axelrod, T. P. Burghardt, N. L. Thompson *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **1984**, *13*, 247-268.
- [130] “Total Internal Reflection/Fluorescence Photobleaching Recovery Study of Serum Albumin Adsorption Dynamics”; T. P. Burghardt, D. Axelrod *Biophys. J.* **1981**, *33* (3), 455-467.
- [131] “Monomolecular Films of Fatty Acids on Glass”; K. B. Blodgett *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56* (2), 495.
- [132] “Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface”; K. B. Blodgett *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, *57* (6), 1007-1022.
- [133] “Mechanical Properties of Monomolecular Films”; I. Langmuir *J. Franklin Inst.* **1934**, *218* (2), 143-171.
- [134] W. A. Barlow, S. D. Forrester, C. H. Giles, R. A. Hann, D. Möbius, M. C. Petty, G. G. Roberts, R. M. Swart *Langmuir-Blodgett-Films* Plenum Press **1990**, New York.
- [135] “Weak Polyacid Brushes: Preparation by LB Deposition and Optically Detected Titrations”; E. P. K. Currie, A. B. Sieval, M. Avena, H. Zuilhof, E. J. R. Sudhölter, M. A. Cohen Stuart *Langmuir* **1999**, *15* (21), 7116-7118.

- [136] “The Evolution of Silicon Wafer Cleaning Technology”;
W. Kern *J. Electrochem. Soc.* **1990**, *137* (6), 1887-1892.
- [137] “Structure and Protein Binding Capacity of a Planar PAA Brush”;
O. Hollmann, T. Gutberlet, C. Czeslik *Langmuir* **2007**, *23* (3), 1347-1353.
- [138] “Native-Like Structure of Proteins at a Planar Poly(acrylic acid) Brush”;
C. Reichhart, C. Czeslik *Langmuir* **2009**, *25* (2), 1047-1053.
- [139] “Catalase-like Activity of Horseradish Peroxidase: Relationship to Enzyme Inactivation by H₂O₂”; J. Hernández-Ruiz, M. B. Arnao, A. N. P. Hiner, F. García-Cánovas, M. Acosta *Biochem. J.* **2001**, *354* (1), 107-114.
- [140] “Silica Nanoparticle Size Influences the Structure and Enzymatic Activity of Adsorbed Lysozyme”;
A. A. Vertegel, R. W. Siegel, J. S. Dordick *Langmuir* **2004**, *20* (16), 6800-6807.
- [141] “Structure, Stability, and Activity of Adsorbed Enzymes”; T. Zoungrana, G. H. Findenegg, W. Norde *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *190* (2), 437-448.
- [142] “A Quantitative Study of the Enzymatic Activity of Horseradish Peroxidase at a Planar Poly(acrylic acid) Brush”;
C. Reichhart, C. Czeslik *Colloids Surf. B* **2010**, *75* (2), 612-616.
- [143] “Probing Adsorption and Aggregation of Insulin at a Poly(acrylic acid) Brush”;
F. Evers, C. Reichhart, R. Steitz, M. Tolan, C. Czeslik *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12* (17), 4375-4382.
- [144] “Toward Understanding Insulin Fibrillation”; J. Brange, L. Andersen, E. D. Laursen, G. Meyn, E. Rasmussen *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86* (5), 517-525.
- [145] “Ethanol-Perturbed Amyloidogenic Self-Assembly of Insulin: Looking for Origins of Amyloid Strains”;
W. Dzwolak, S. Grudzielanek, V. Smirnovas, R. Ravindra, C. Nicolini, R. Jansen, A. Lokszejn, S. Porowski, R. Winter *Biochemistry* **2005**, *44* (25), 8948-8958.
- [146] “On the Mechanism of Uptake of Globular Proteins by Polyelectrolyte Brushes: A Two-Gradient Self-Consistent Field Analysis”;
F. A. M. Leermakers, M. Ballauff, O. V. Borisov *Langmuir* **2007**, *23* (7), 3937-3946.
- [147] “Kinetics of Protein Adsorption at a Poly(acrylic acid) Brush Studied by Surface Plasmon Resonance Spectroscopy”;
O. Hollmann, C. Reichhart, C. Czeslik *Z. Phys. Chem.* **2008**, *222* (1), 205-215.

- [148] “Manipulating the Amyloid- β Aggregation Pathway with Chemical Chaperones”;
D.-S. Yang, C. M. Yip, T. H. J. Huang, A. Chakrabarty, P. E. Fraser *J. Biol. Chem.*
1999, *274* (46), 32970-32974.
- [149] “Spatial Dimensions of Colloidal Polyelectrolyte Brushes As Determined by Dynamic
Light Scattering”; X. Guo, M. Ballauff *Langmuir* **2000**, *16* (23), 8719-8726.
- [150] “A Correlation between Critical End-to-End Distance for Entanglements and
Molecular Chain Diameter of Polymers”;
Y.-H. Zang, P. J. Carreau *J. Appl. Polym. Sci.* **1991**, *42* (7), 1965-1968.

7 Anhang

Nachfolgend sind die im Bereich von $1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ flächennormierten ATR-FTIR-Spektren von Rinderserumalbumin an einer Silizium- und Poly(styrol)-Oberfläche in Gegenwart verschiedener ionischer Cosolventien bei $\text{pH} = 7$ und $\vartheta = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ dargestellt. Durch den Vergleich zwischen Original- und Reproduktionsmessung ergänzend zu Kapitel 4.5.1 (Seite 142 ff.) kann ein Eindruck von der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewonnen werden. Die Konzentration des angegebenen Cosolvens beträgt 2.0 M .

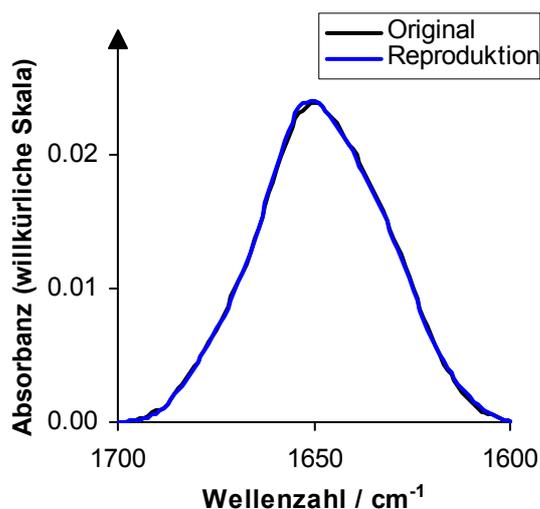


Abbildung A1. Silizium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

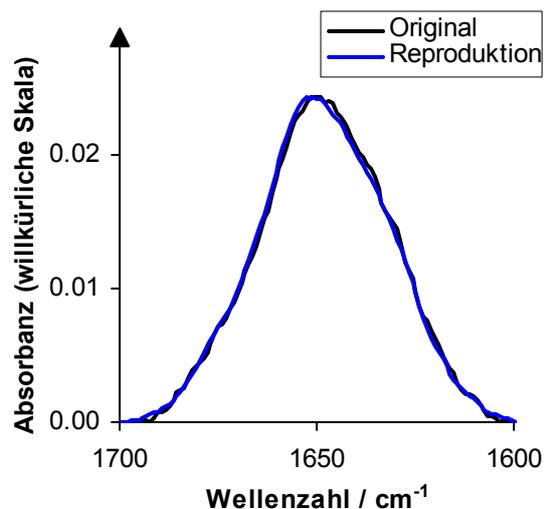


Abbildung A2. Silizium NaCl.

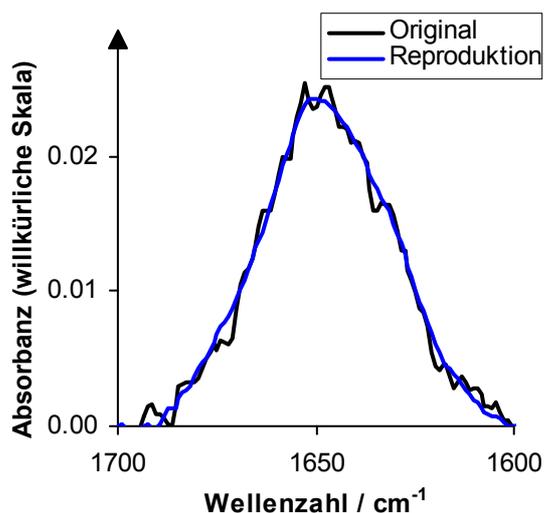


Abbildung A3. Silizium NaSCN.

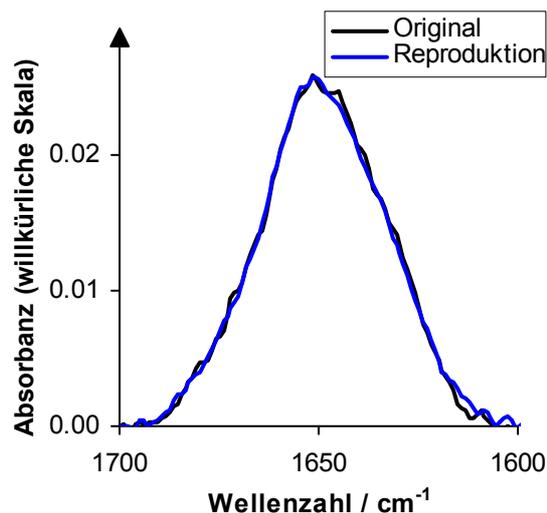


Abbildung A4. Silizium Phosphat.

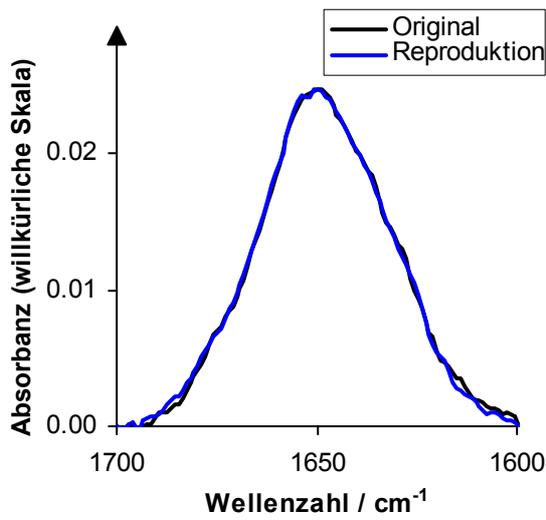


Abbildung A5. Silizium NaI.

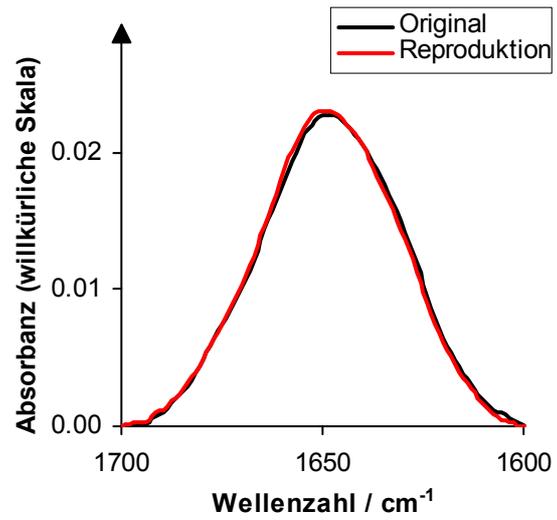
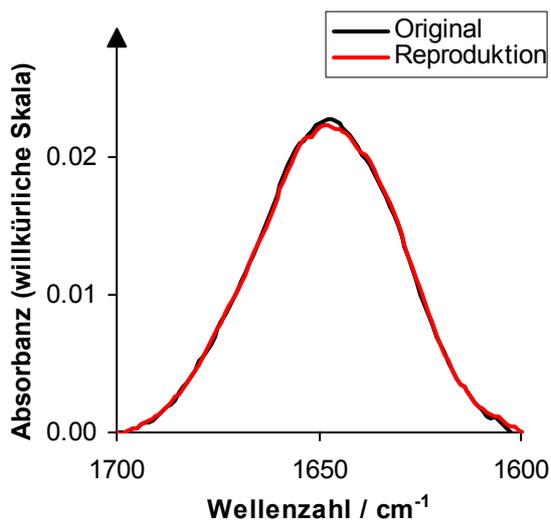
Abbildung A6. Poly(styrol) (NH₄)₂SO₄.

Abbildung A7. Poly(styrol) NaCl.

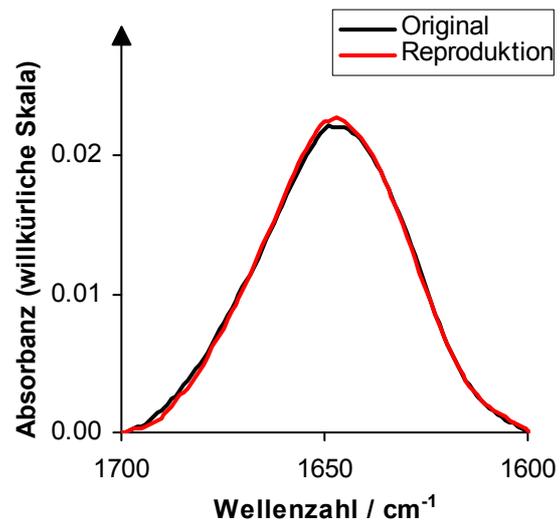


Abbildung A8. Poly(styrol) NaSCN.

An dieser Stelle werden Überschlagsrechnungen zur Abschätzung des Anteils von gelöstem Protein am TIRF-Messsignal in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration in der Lösung über der untersuchten Grenzfläche durchgeführt. Hierzu werden unabhängig vom Protein und der verwendeten Grenzfläche folgende vereinfachende Annahmen getroffen:

$$d_z = 0.5 \cdot \lambda_{\text{exc}} = 140 \text{ nm} \quad (\text{A1})$$

$$m_A(\text{Protein}) = 1.5 \text{ mg m}^{-2} \quad (\text{A2})$$

Unter Annahme einer hohen Inkubationskonzentration von $c(\text{Protein}) = 2 \text{ mg mL}^{-1}$ gilt für den Anteil des gelösten Proteins am Messsignal $R_{\text{gelöst}}$:

$$R_{\text{gelöst}} = \frac{d_z \cdot c(\text{Protein})}{d_z \cdot c(\text{Protein}) + m_A(\text{Protein})} = \frac{0.28 \text{ mg}}{0.28 \text{ mg} + 1.5 \text{ mg}} = 16\% \quad (\text{A3})$$

Unter Annahme einer niedrigen Inkubationskonzentration von $c(\text{Protein}) = 0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ gilt für den Anteil des gelösten Proteins am Messsignal $R_{\text{gelöst}}$:

$$R_{\text{gelöst}} = \frac{d_z \cdot c(\text{Protein})}{d_z \cdot c(\text{Protein}) + m_A(\text{Protein})} = \frac{0.014 \text{ mg}}{0.014 \text{ mg} + 1.5 \text{ mg}} = 0.9\% \quad (\text{A4})$$

Nach dieser Rechnung sollte der Beitrag des gelösten Proteins zum TIRF-Messsignal im Falle niedriger Proteinkonzentrationen in Lösung zu vernachlässigen sein.

Lebenslauf

Christian Reichhart

Physikalische Chemie I – Biophysikalische Chemie
Fakultät Chemie, Technische Universität Dortmund
Otto-Hahn-Strasse 6, 44227 Dortmund

Persönliche Angaben

Familienstand: ledig

Geburtsdatum: 2. Juni 1984

Geburtsort: Aachen

Staatsangehörigkeit: österreichisch

Ausbildung

Aug. 1994 - Jun. 2003

Heilig-Geist-Gymnasium in Würselen

Okt. 2003 - Nov. 2007

Studium der Chemie an der TU Dortmund

Okt. 2005

Vordiplom

Nov. 2007

Diplom

Thema der Diplomarbeit: „Adsorption, Konformation und Aggregation von Proteinen an Polyacrylsäurebürsten“

seit Jan. 2008

Doktorarbeit auf dem Arbeitsgebiet der Biophysikalischen Chemie in der Arbeitsgruppe von PD Dr. C. Czeslik an der TU Dortmund

Finanzierung

Jan. 2008 - Jun. 2008

Wissenschaftlicher Angestellter an der TU Dortmund

seit Jul. 2008

Promotionsstipendiat des Fonds der Chemischen Industrie