

**Aggregation von Insulin in
Polyelektrolytmultischichten
und
Hochdruckuntersuchungen an
adsorbierten Proteinen**

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

eingereicht an der
Fakultät Chemie
der
Technischen Universität Dortmund

von
Juny Koo
(geboren in Ahlen, Westf.)

Dortmund, Oktober 2012

Erstgutachter: Prof. Dr. C. Czeslik

Zweitgutachter: Prof. Dr. H. Rehage

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.2012

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Claus Czeslik für die Möglichkeit, eine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen, herzlich bedanken. Begleitet wurde diese Arbeit von einer exzellenten und sehr geduldigen Betreuung sowie einer interessanten Promotionsthematik.

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.

Herrn Dr. Christian Reichhart, Herrn Alexander Werkmüller und Frau Shobhna Kapoor danke ich für die praktische Einweisung und die stets vorhandene Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanke ich mich für das angenehme Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft.

Besonders bedanke ich mich bei meiner Familie, die mich bedingungslos und in allen Situationen unterstützt.

| | |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Publikationsliste | IX |
| Abkürzungsverzeichnis | X |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Proteinstruktur, -entfaltung und -aggregation | 1 |
| 1.2 Proteinadsorption | 3 |
| 1.3 Polyelektrolyt- und Proteinmultischichten | 6 |
| 1.4 Effekte von hohen hydrostatischen Drücken auf biomolekulare Systeme | 8 |
| 1.4.1 Volumeneigenschaften von gelösten und adsorbierten Proteinen | 8 |
| 1.4.2 Druckeffekte auf molekulare Packungsdichten in Lipiddoppelschichten | 12 |
| 2. Materialien und Methoden | 14 |
| 2.1 Untersuchte Proteine | 14 |
| 2.1.1 Insulin | 14 |
| 2.1.2 Lysozym | 16 |
| 2.1.3 Staphylokokken Nuclease | 17 |
| 2.2 Fluorophore | 18 |
| 2.2.1 Alexa Fluor 488 | 18 |
| 2.2.2 Thioflavin T | 19 |
| 2.2.3 Tryptophan und N-Acetyl-L-tryptophanamid (NATA) | 20 |
| 2.2.4 Laurdan | 22 |
| 2.3 Polyelektrolyte | 23 |
| 2.3.1 Poly(natrium 4-styrolsulfonat) | 23 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.3.2 | Poly(diallyldimethylammoniumchlorid) | 23 |
| 2.3.3 | Hyaluronsäure | 24 |
| 2.4 | Nanopartikel | 25 |
| 2.4.1 | Ludox AM und Ludox AS | 25 |
| 2.5 | Messmethoden | 25 |
| 2.5.1 | Röntgenreflektometrie | 25 |
| 2.5.2 | Grundlagen der Spektroskopie | 35 |
| 2.5.3 | ATR-FTIR-Spektroskopie | 38 |
| 2.5.3.1 | Grundlagen der IR-Spektroskopie | 38 |
| 2.5.3.2 | IR-Spektroskopie an Proteinen | 40 |
| 2.5.3.3 | Funktionsweise eines FTIR-Spektrometers | 41 |
| 2.5.3.4 | <i>Fourier-Self-Deconvolution</i> (FSD) und zweite Ableitung | 43 |
| 2.5.3.5 | Schematischer Aufbau von ATR-FTIR-Messapparaturen | 44 |
| 2.5.4 | Hochdruck TIRF-Spektroskopie | 45 |
| 2.5.5 | TIRF-Mikroskopie | 51 |
| 2.5.6 | Konfokale Fluoreszenzmikroskopie | 53 |
| 3. | Experimentelles | 55 |
| 3.1 | Chemikalien und Geräte | 55 |
| 3.1.1 | Chemikalien | 55 |
| 3.1.2 | Geräte | 56 |
| 3.1.3 | Puffersysteme | 56 |
| 3.2 | Operationen zur Messvorbereitung | 56 |
| 3.2.1 | Fluoreszenzmarkierung von Proteinen mit Alexa Fluor 488 | 56 |
| 3.2.2 | Herstellung von Insulinkeimen | 58 |
| 3.2.3 | Reinigung der Substrate zur Untersuchung von Polyelektrolyt- Insulinmultischichten | 59 |
| 3.2.3.1 | Reinigung von Silicium-Wafern für Röntgenreflektometrie | 59 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 3.2.3.2 | Reinigung von internen Reflexionselementen aus Silicium für ATR-FTIR-Spektroskopie | 59 |
| 3.2.3.3 | Reinigung von Quarzplatten und -prismen für TIRF-Spektroskopie | 59 |
| 3.2.4 | Probenpräparation zur Untersuchung von Polyelektrolyt-Insulinmultischichten | 60 |
| 3.2.4.1 | Aufbau von Polyelektrolyt-Insulinmultischichten (Röntgenreflektometrie) | 60 |
| 3.2.4.2 | Temperaturstabilität von Polyelektrolyt-Insulinmultischichten (Röntgenreflektometrie) | 62 |
| 3.2.4.3 | Präparation von Polyelektrolyt-Insulinmultischichten (TIRF-Spektroskopie) | 62 |
| 3.2.4.4 | Temperatureffekt auf die Struktur von Insulin in Multischichten (TIRF-Spektroskopie) | 63 |
| 3.2.4.5 | Effekt von Insulinkeimen auf die Struktur von Insulin in Multischichten (TIRF-Spektroskopie) | 63 |
| 3.2.4.6 | Aufbau von Polyelektrolyt-Insulinmultischichten <i>in situ</i> (TIRF-Spektroskopie) | 64 |
| 3.2.4.7 | Statische Fluoreszenzanisotropie von Insulin in Multischichten (TIRF-Spektroskopie) | 65 |
| 3.2.4.8 | Zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie von Insulin in Multischichten (TIRF-Spektroskopie) | 65 |
| 3.2.4.9 | Schwingungsspektrum der Polyelektrolyte im Bereich der Amid-I'-Bande (ATR-FTIR-Spektroskopie) | 66 |
| 3.2.4.10 | Untersuchung der zeitlichen Änderung der Amid-I'-Bande einer Polyelektrolyt-Insulinmultischicht bei konstanter Temperatur von 25°C (ATR-FTIR-Spektroskopie) | 66 |
| 3.2.4.11 | Temperaturstabilität von Polyelektrolyt-Insulinmultischichten (TIRF-Spektroskopie) | 66 |
| 3.2.4.12 | Aufbau von Polyelektrolyt-Insulinschichten auf internen Reflexionselementen aus Silicium (ATR-FTIR-Spektroskopie) | 67 |
| 3.2.4.13 | Temperatureffekt auf die Struktur von Insulin in Multischichten (ATR-FTIR-Spektroskopie) | 67 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 3.2.4.14 | Amid-I'-Bande von Insulinkeimen (ATR-FTIR-Spektroskopie) | 68 |
| 3.2.4.15 | Effekt von Insulinkeimen auf die Struktur von Insulin in oder auf Multischichten (ATR-FTIR-Spektroskopie) | 68 |
| 3.2.4.16 | Visualisierung von Polyelektrolyt-Insulinmultischichten auf Deckgläsern (TIRF-Mikroskopie) | 69 |
| 3.2.4.17 | Insulinkeiminduzierte Aggregation von Insulin in Multischichten (TIRF-Mikroskopie) | 69 |
| 3.2.4.18 | Insulinkeiminduzierte Aggregation von Insulin in Multischichten (konfokale Mikroskopie) | 70 |
| 3.2.5 | Reinigung der Apparatur und Probenbehälter für Hochdruckmessungen | 70 |
| 3.2.5.1 | Reinigung von Quarzküvetten für die Hochdruck- Fluoreszenzspektroskopie und von Quarzplatten und -prismen für die Hochdruck-TIRF-Spektroskopie | 70 |
| 3.2.5.2 | Reinigung der Hochdruckzellen für Fluoreszenz- bzw. TIRF-Spektroskopie | 71 |
| 3.2.6 | Probenpräparation zur Untersuchung der Volumeneigenschaften von gelösten bzw. adsorbierten Proteinen mithilfe der Hochdruck- Fluoreszenzspektroskopie | 71 |
| 3.2.6.1 | Intrinsischer Druckeffekt auf N-Acetyl-L-tryptophanamid | 71 |
| 3.2.6.2 | Bestimmung des Adsorptionsgrades von SNase bzw. Lysozym auf Ludox AM / AS | 72 |
| 3.2.6.3 | Volumeneigenschaften von SNase im gelösten Zustand | 72 |
| 3.2.6.4 | Volumeneigenschaften von SNase im adsorbierten Zustand | 73 |
| 3.2.6.5 | Einfluss des pH-Werts auf die Volumeneigenschaften von SNase im gelösten bzw. adsorbierten Zustand | 74 |
| 3.2.6.6 | Präparation zur Untersuchung der Volumeneigenschaften von Lysozym im gelösten Zustand | 74 |
| 3.2.6.7 | Präparation zur Untersuchung der Volumeneigenschaften von Lysozym im adsorbierten Zustand | 74 |
| 3.2.6.8 | Präparation zur Untersuchung der Auswirkung des pH-Werts auf die Volumeneigenschaften von Lysozym im gelösten bzw. adsorbierten Zustand | 75 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 3.2.7 | Präparation zur Untersuchung des Adsorptionsgrades von Lysozym mit Hilfe der Hochdruck-TIRF-Spektroskopie | 75 |
| 3.2.7.1 | Präparation zur Untersuchung des Phasenverhaltens von DOPC bzw. einer Mischung aus DOPC, DPPC und Cholesterin | 75 |
| 3.2.7.2 | Präparation zur Untersuchung des intrinsischen Druckeffekts auf Alexa Fluor 488 | 76 |
| 3.2.7.2 | Präparation zur Untersuchung des Adsorptionsgrades von Lysozym unter hohen Drücken | 77 |
| 3.2.7.4 | Präparation zur Untersuchung des Adsorptionsgrades und des Adsorptionsvolumens von Lysozym unter hohen Drücken | 77 |
| 3.2.7.5 | Präparation zur Untersuchung des pH-Effektes auf den Adsorptionsgrad und das Adsorptionsvolumen von Lysozym unter hohen Drücken | 78 |
| 3.2.7.6 | Präparation zur Untersuchung der Auswirkung einer hydrophoben Grenzfläche auf den Adsorptionsgrad und das Adsorptionsvolumen von Lysozym unter hohen Drücken | 78 |
| 3.3 | Ablauf der Experimente zur Untersuchung der Polyelektrolyt-Insulinmultischichten | 79 |
| 3.3.1 | Ablauf der Röntgenreflektometrieexperimente | 79 |
| 3.3.2 | Ablauf der ATR-FTIR-Spektroskopie-Experimente | 79 |
| 3.3.3 | Ablauf der TIRF-Mikroskopie-Experimente | 80 |
| 3.3.4 | Ablauf der konfokalen Mikroskopie-Experimente | 80 |
| 3.4 | Ablauf der Experimente zur Untersuchung der Volumeneigenschaften gelöster und adsorbierter Proteine | 81 |
| 3.4.1 | Ablauf der Hochdruck-Fluoreszenzspektroskopie-Experimente | 81 |
| 3.4.2 | Ablauf der Hochdruck-TIRF-Spektroskopie-Experimente | 82 |

| | |
|---|------------|
| 4. Ergebnisse und Diskussion | 83 |
| 4.1 Aggregationsverhalten von Insulin in Polyelektrolyt-Insulinmultischichten | 83 |
| 4.1.1 Aufbau der Multischichten charakterisiert mit Hilfe der Röntgenreflektometrie | 83 |
| 4.1.2 Struktur und Dynamik von Insulin in Multischichten charakterisiert mit Hilfe der TIRF-Spektroskopie | 90 |
| 4.1.2.1 Aufbau einer Polyelektrolyt-Insulinmultischicht <i>in situ</i> | 90 |
| 4.1.2.2 Temperatur- und keiminduzierte Aggregation von Insulin in Multischichten | 93 |
| 4.1.2.3 Untersuchung der Dynamik von Insulin in Multischichten mit Hilfe der statischen TIRF-Anisotropie | 99 |
| 4.1.2.4 Untersuchung der Dynamik von Insulin in Multischichten mit Hilfe der zeitaufgelösten TIRF-Anisotropie | 101 |
| 4.1.2.5 Stabilität der Multischichten charakterisiert mit Hilfe der TIRF-Spektroskopie | 103 |
| 4.1.3 ATR-FTIR-Messungen zur Sekundärstrukturanalyse von Polyelektrolyt-Insulinmultischichten | 104 |
| 4.1.3.1 Beitrag der IR-Absorption von PDDA, PSS und HA zur Amid-I'-Bande | 104 |
| 4.1.3.2 Untersuchung der Amid-I'-Bande von Polyelektrolyt-Insulinmultischichten ohne Keimzugabe bei konstanter Temperatur | 108 |
| 4.1.3.3 Untersuchung der Amid-I'-Bande von Polyelektrolyt-Insulinmultischicht bei einer Temperatur von 70 °C | 109 |
| 4.1.3.4 Untersuchung der zeitlichen Änderung der Amid-I'-Bande von adsorbierten Insulinkeimen | 117 |
| 4.1.3.5 Untersuchung der Amid-I'-Bande von Polyelektrolyt-Insulinmultischicht nach der Zugabe von Insulinkeimen | 119 |
| 4.1.4 Fluoreszenz-Mikroskopie zur Visualisierung von Polyelektrolyt-Insulinmultischichten | 124 |

| | | |
|--------------|--|------------|
| 4.1.4.1 | Aufbau und Struktur von Polyelektrolyt- Insulinmultischichten | 124 |
| 4.1.4.2 | Struktur von Polyelektrolyt-Insulinmultischichten nach der Zugabe von Insulinkeimen | 126 |
| 4.1.5 | Konfokale Fluoreszenzmikroskopie zur Visualisierung von Polyelektrolyt-Insulinmultischichten | 128 |
| 4.1.6 | Schlussfolgerung der Experimente mit Polyelektrolyt- Insulinmultischichten | 132 |
| 4.2 | Druckabhängige Proteinentfaltung-Fluoreszenzspektroskopie | 133 |
| 4.2.1 | Messungen mit N-Acetyl-L-tryptophanamid (NATA) | 133 |
| 4.2.2 | Messung des Adsorptionsgrads von SNase bzw. Lysozym auf Ludox AM bzw. Ludox AS | 135 |
| 4.2.3 | Volumenänderung von SNase in Lösung | 137 |
| 4.2.4 | Volumenänderung von SNase im adsorbierten Zustand | 142 |
| 4.2.5 | Effekt des pH-Wertes auf die druckabhängige Entfaltung von adsorbierter SNase | 151 |
| 4.2.6 | Volumenänderung von Lysozym in Lösung | 155 |
| 4.2.7 | Volumenänderung von Lysozym im adsorbierten Zustand | 157 |
| 4.2.8 | Effekt des pH-Wertes auf die druckabhängige Entfaltung von adsorbiertem Lysozym | 162 |
| 4.2.9 | Schlussfolgerung aus dem Experimenten mit Polyelektrolyt-Insulinmultischichten | 164 |
| 4.3 | Hochdruck-TIRF-Spektroskopie zur Bestimmung des Adsorptionsgrades und des Adsorptionsvolumens eines Proteins | 165 |
| 4.3.1 | Testmessungen mit der Hochdruck-TIRF-Zelle anhand des druckabhängigen Phasenverhaltens von DOPC | 165 |
| 4.3.2 | Testmessungen mit der Hochdruck-TIRF-Zelle anhand des druckabhängigen Phasenverhaltens von DOPC/DPPC/Cholesterin (1:2:1) | 167 |
| 4.3.3 | Druckeffekt auf Alexa Fluor 488 in Lösung | 168 |
| 4.3.4 | Untersuchung des Druckeffekts auf adsorbiertes Lysozym | 170 |

| | | |
|--------------|--|------------|
| 4.3.5 | Druckabhängiger Adsorptionsgrad von Lysozym | 172 |
| 4.3.6 | Adsorptionsvolumen und druckabhängiger Adsorptionsgrad von Lysozym in Gegenwart von Harnstoff oder Glycerin | 173 |
| 4.3.7 | Adsorptionsvolumen und druckabhängiger Adsorptionsgrad von Lysozym an einer hydrophoben Grenzfläche | 176 |
| 4.3.8 | Effekt des pH-Wertes auf den druckabhängigen Adsorptionsgrad von Lysozym | 178 |
| 4.3.9 | Qualitative Bestimmung des Markierungsgrades von Lysozym mit Alexa Fluor 488 | 180 |
| 5. | Zusammenfassung | 182 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 185 |
| 7. | Anhang | 191 |

Publikationsliste

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sind folgende Publikationen entstanden:

- Koo, J.; Czeslik, C. "Probing Aggregation and Fibril Formation of Insulin in Polyelectrolyte Multilayers." *Colloid Surface B* **2012**, *94*, 80.
- Koo, J.; Czeslik, C. "High Pressure Sample Cell for Total Internal Reflection Fluorescence Spectroscopy at Pressures up to 2500 Bar." *Rev.Sci. Instrum.* **2012**, *83*, 085109.
- Koo, J.; Czeslik, C. "Volume changes of proteins adsorbed on silica particles." *Soft Matter* **2012**, *8*, 11670-11676

Im Rahmen der Bachelorarbeit ist folgende Publikation entstanden:

- Koo, J.; Gutberlet T.; Czeslik C. "Control of Protein Interfacial Affinity by Nonionic Cosolvents." *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 6292.

Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Bedeutung | Deutsche Übersetzung |
|----------------------|--|---------------------------------------|
| ATR | Attenuated Total Reflection | Abgeschwächte Totalreflexion |
| Bistris | Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan | |
| BSA | Bovine Serum Albumin | Rinderserumalbumin |
| CFM | Confocal Fluorescence Microscopy | Konfokale Fluoreszenzmikroskopie |
| DNA | Deoxyribonucleic acid | Desoxyribonucleinsäure |
| DOPC | 1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin | |
| DPPC | 1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin | |
| ELISA | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay | |
| FSD | Fourier-Self-Deconvolution | Fourier-Selbstentfaltung |
| FTIR | Fourier-Transform Infrarot | |
| GP | generalized polarisation | |
| HA | Hyaluronic acid | Hyaluronsäure |
| hCG | humanes Choriongonadotropin | |
| Hsp | Heat Shock Protein | Hitzeschockprotein |
| Ins | Insulin | |
| Ins _{Alexa} | mit Alexa Fluor 488 markiertes Insulin | |
| Laurdan | 6-Lauroyl-2-dimethylaminonaphthalin | |
| Lys | Lysozym | |
| Lys _{Alexa} | mit Alexa Fluor 488 markiertes Lysozym | |
| NATA | N-Acetyl-L-tryptophanamid | |
| NMA | N-Methylacetamid | |
| PAA | Poly acrylic acid | Polyacrylsäure |
| PDDA | Poly(diallyldimethylammoniumchlorid) | |
| PEG | Polyethylenglycol | |
| PEM | Polyelektrolyt-Multischicht | |
| PEO | Polyethylenoxid | |
| PSS | Poly(natrium 4-styrolsulfonat) | |
| RCSB | Research collaboratory for structural bioinformatics | |
| RNA | Ribonucleic acid | Ribonucleinsäure |
| SAM | Self Assembled Monolayer | selbst zusammengesetzte Monoschichten |
| SNase | Staphylokokken nuclease | |
| ThT | Thioflavin T | |
| TIRF | Total Internal Reflection Fluorescence | Interne Totalreflexion-Fluoreszenz |
| Trp | Tryptophan | |
| UV | ultraviolett | |
| XRR | x-ray reflectometry | Röntgenreflektometrie |

1. Einleitung

1.1 Proteinstruktur, -entfaltung und -aggregation

Proteine weisen eine Reihe unterschiedlichster Funktionen in lebenden Organismen auf und sind somit in jedem Lebewesen auf der Erde vorhanden. Neben dem zielgerichteten Transport von Stoffen, der strukturgebenden Funktion und der Erkennung von Signalstoffen dienen Proteine auch als Enzyme, die essentielle chemische Reaktionen in biologischen Zellen katalysieren. In der Regel geht ihre Zusammensetzung aus der Verknüpfung von 20 unterschiedlichen natürlich vorkommenden α -Aminocarbonsäuren hervor. Die native dreidimensionale Struktur von Proteinen wird durch die Primärstruktur, also die Aminosäuresequenz, determiniert. Die Primärstruktur eines jeden Proteins wird im Erbgut, der DNA codiert. Durch eine bestimmte Konformation von Primärstrukturen resultieren typische in unterschiedlichen Proteinen häufig vorkommende Sekundärstrukturelemente wie z.B. α -Helices oder β -Faltblätter, welche durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden. Aus der räumlichen Anordnung der Sekundärstrukturelemente resultiert eine übergeordnete sog. Tertiärstruktur, die durch Wasserstoffbrücken, dem hydrophoben Effekt, Disulfidbrücken von Cysteinseitenketten und elektrostatische Wechselwirkungen stabilisiert wird. Liegt eine Zusammenlagerung von Proteinuntereinheiten vor, die eine Tertiärstruktur aufweisen, so resultiert die sog. Quartärstruktur, welche ebenfalls durch Wasserstoffbrücken, van der Waals- und elektrostatische Wechselwirkungen stabilisiert wird. Unter Umständen werden Metallionen, welche katalytische Funktionen aufweisen, von Proteinuntereinheiten eingeschlossen. Als prominentes Beispiel gilt das Hämoglobin, bei dem ein Eisenion von zwei α -Hämoglobinsträngen und zwei β -Hämoglobinsträngen umschlossen und dazu befähigt wird, Sauerstoff im Blut zu transportieren. Trotz der großen Anzahl an möglichen dreidimensionalen Strukturen besitzen native Proteine, welche in einem Energieminimum liegen, eine definierte Konformation (Levinthal-Paradoxon).¹ Die Faltung bis zur nativen Struktur der Proteine verläuft nicht immer spontan, sondern wird in der Regel in intakten Zellen von sog. Chaperonen begleitet, da fehlgefaltete Proteine ihre biologische Funktion nicht ausführen können.² Liegen fehlgefaltete Proteine vor, so werden diese in weiteren Schritten letztlich im Proteasom zersetzt und die Aminosäuren zur erneuten Proteinbiosynthese wieder freigesetzt. Bei hohen Konzentrationen fehlgefalteter Proteinmoleküle kann eine Rückfaltung in den nativen Zustand nicht immer erfolgen, da starke intermolekulare Wechselwirkungen vorliegen können. Folglich

resultiert eine Ausbildung irreversibler Aggregate. Werden solche Aggregate *in vivo* gebildet, so können schwerwiegende gesundheitliche Probleme auftreten, da sie einen potentiell pathogenen Charakter mit sich bringen. Ein Überblick über die Proteinfaltungs- und -aggregationsprozesse sind in Abbildung 1.1 dargestellt.

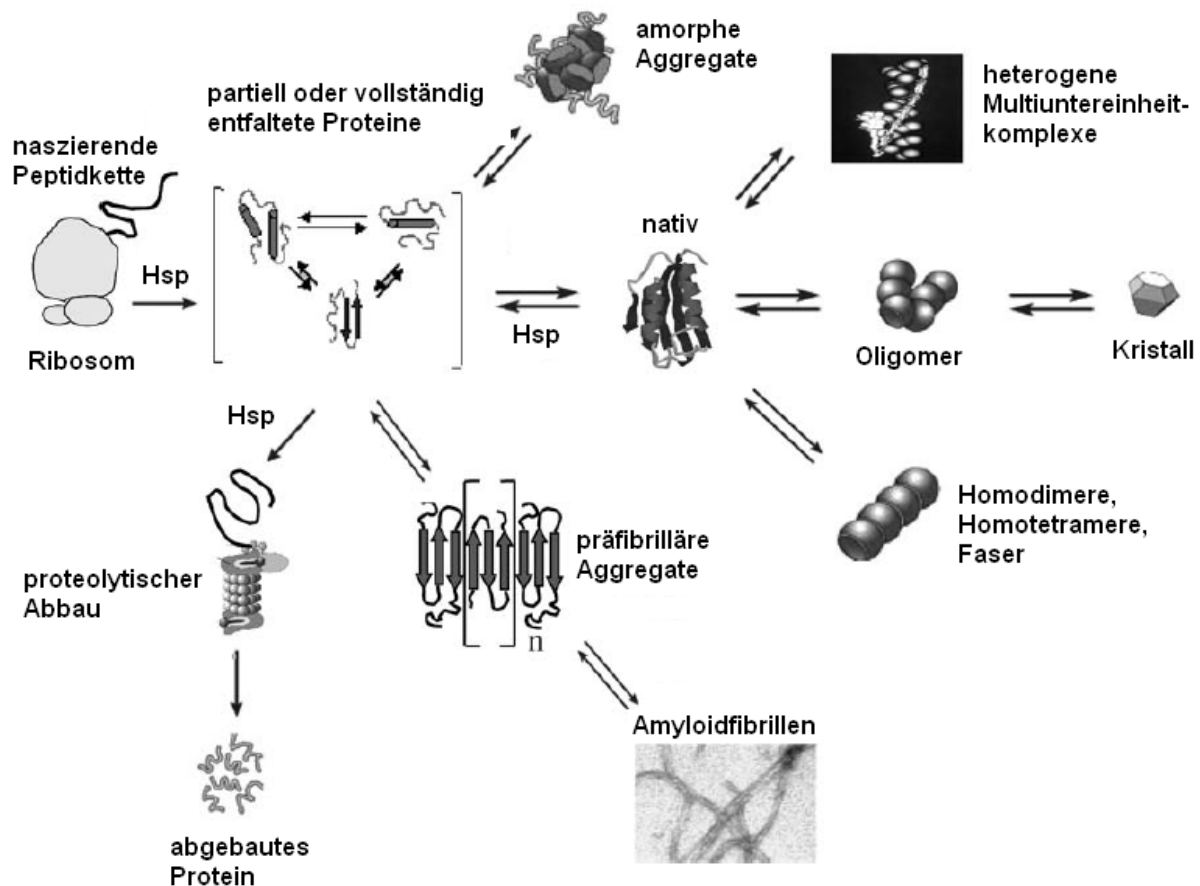


Abbildung 1.1. Überblick über Proteinfaltungs- und -aggregationsprozesse. Modifiziert nach Referenz 3.

Aufgrund ihrer Struktur wurde im Jahre 1854 von Rudolf Virchow der Begriff „Amyloid“ (=„stärkeähnlich“) für fibrilläre Proteinaggregate eingeführt. Amyloide sind in der Lage degenerative Krankheiten (Amyloidosen) durch ihre Ablagerung in verschiedenen Organen zu verursachen.^{4,5} Neben Typ-II-Diabetes stehen amyloide Fibrillen in Verdacht, mit der Creutzfeldt-Jacob- und der Alzheimerkrankheit in Verbindung zu stehen.^{6,7} Die Struktur von Amyloiden geht aus der sog. *cross-β*-Konformation hervor, bei der eine regelmäßige Anordnung von Proteinmolekülen in β -Strangkonformation senkrecht zur Fibrillachse vorliegt (siehe Abbildung 1.2). Fibrillen gehen aus der lateralen Zusammenlagerung mehrerer Filamente hervor und weisen einen Durchmesser von 3-15 nm und eine Länge von mehreren 100 nm auf.⁸

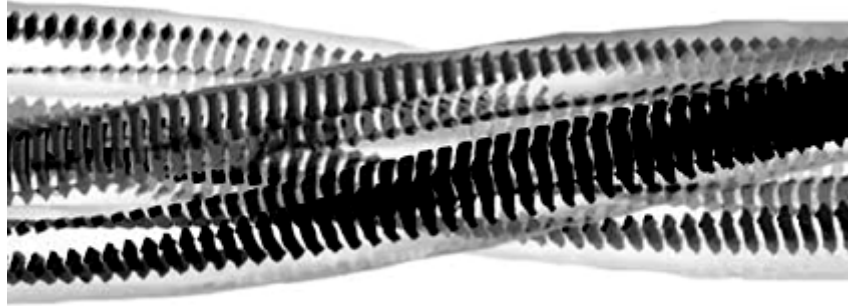


Abbildung 1.2. Schematische Darstellung der strukturellen Anordnung von β -Strängen in Insulinfibrillen nach Referenz 3 modifiziert.

Fibrilläre Aggregate sind in Wasser schwerlöslich und weisen generell eine hohe Beständigkeit gegenüber der Temperatur, dem Druck und Proteasen auf. *In vitro* lassen sich unter bestimmten Bedingungen fibrilläre Proteinstrukturen erzeugen, welche aus sequentiell nicht homologen Proteinen bestehen. Auch Homopolypeptide neigen unter geeigneten Bedingungen dazu Fibrillen auszubilden.⁹⁻¹¹

1.2 Proteinadsorption

Die Adsorption von Proteinen an festen Grenzflächen spielt, ob erwünscht oder unerwünscht, eine wichtige Rolle sowohl in wissenschaftlichen als auch in alltäglichen Bereichen.¹² In biologischen Zellen wechselwirken viele Proteine mit biologischen Lipidmembranen, welche ihre natürliche Umgebung darstellen. Zum Beispiel erfolgen die beiden wohl wichtigsten biologischen Energieumwandlungsprozesse an Membranen, welche bestimmte Enzyme und Proteine in einer gewissen Anordnung beinhalten: die Fotosynthese zur Umwandlung von Licht- in chemische Energie und die oxidative Phosphorylierung zur Synthese von Adenosintriphosphat.¹² Blut beinhaltet viele Proteine, wie z.B. Fibrinogen, welches eine wichtige Rolle in der Blutgerinnung übernimmt. Kommt Blut mit künstlichen Oberflächen, speziell glasähnlichen Oberflächen, in Kontakt, so kann eine Thrombusbildung beobachtet werden, die auf eine Proteinadsorption mit anschließender Adhäsion von Blutplättchen zurückzuführen ist. Im Falle einer Verletzung stellt der Blutgerinnungsprozess einen nützlichen

Effekt dar, wohingegen im Falle von künstlichen Implantaten und medizinischen Geräten eine nachteilige Reduzierung der Biokompatibilität vorliegt.¹³

Proteinadsorption spielt auch im Bereich der Biotechnologie und der medizinischen Diagnostik eine wichtige Rolle (siehe Abbildung 1.3).¹⁴ Schwangerschaftstests basieren auf der Detektion des Hormons Humanes Choriongonadotropin (hCG) im Urin. In diesem Festphasenimmunoassay wird ein sandwichartiger Komplex aus zwei Antikörpermolekülen Immunglobulin G und dem Antigen hCG gebildet. Eines der beiden Immunglobuline G ist an der festen Phase immobilisiert und bindet hCG. Das zweite Immunglobulin G ist mit einem Enzym markiert, welches die Katalyse einer Farbreaktion zur optischen Detektion durchführt (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA). Zu den immobilisierten Antikörpern wird zusätzlich Rinderserumalbumin (BSA) auf der festen Phase adsorbiert, um freie Bindungsplätze zu blockieren, so dass keine unspezifischen Bindungen erfolgen. Im Falle der Proteomik werden Biochips verwendet, welche in vergleichbarer Weise wie Festphasenimmunoassays funktionieren, oder aber es werden verschiedene Arten von Proteinen auf unterschiedlich chemisch modifizierten Grenzflächen adsorbiert und analysiert.¹⁵

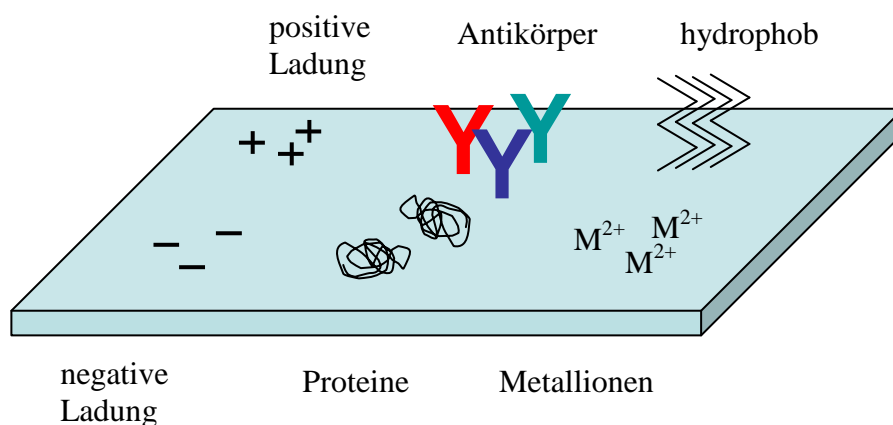


Abbildung 1.3. Biochips als Beispiel für die Proteinadsorption an wässrig-festen Grenzflächen.

Unerwünscht hingegen ist die Adsorption von Proteinen z.B. auf Kontaktlinsen. Das in der Tränenflüssigkeit enthaltene Enzym Lysozym scheidet sich auf der Kontaktlinsenoberfläche ab und bildet einen Biofilm, welcher in der Lage ist, immunologische Reaktionen und Entzündungen am Auge hervorzurufen. Dementsprechend ist eine regelmäßige Reinigung, d.h. eine Proteinentfernung, der Kontaktlinsen notwendig.¹⁶ Weiterhin resultiert aus der proteinadsorptionsvermittelten Anhaftung von Meeresorganismen an Schiffsrümpfen aufgrund

eines erhöhten Strömungswiderstandes und einer erhöhten Masse ein stark erhöhter Treibstoffverbrauch.¹⁷

Die spontane Adsorption von Proteinen erfolgt meist immer dann, wenn eine wässrige Proteinlösung mit einer festen Grenzfläche in Kontakt steht.¹⁸⁻²⁰ Diese hohe Grenzflächenaktivität von Proteinmolekülen ist eine intrinsische Eigenschaft, die jedoch nicht von einem gemeinsamen strukturellen Merkmal herrührt, da Proteine wie bereits beschrieben, aus 20 unterschiedlichen Aminosäuren aufgebaute komplexe Moleküle darstellen.²¹ Neben van der Waals Wechselwirkungen zwischen den Atomen des Proteins und denjenigen der Substratgrenzfläche treten weiterhin auch elektrostatische Wechselwirkungen der positiv bzw. negativ geladenen Proteinseitenketten und der jeweiligen Grenzfläche auf. Auch die Hydrophobizität der Seitenketten variiert stark, so dass Proteine amphiphil vorliegen. Aus diesem Grund neigen Proteine zur Anlagerung an Grenzflächen zweier Phasen mit unterschiedlicher Polarität. Proteine weisen einen relativ hohen Grad an konformeller Flexibilität auf. Im gefalteten Zustand sind Proteine nur geringfügig stabiler als im denaturierten Zustand. Die Freie Standard-Entfaltungs-Gibbsenergie liegt im Allgemeinen im Bereich von 20-60 kJ mol⁻¹, so dass bei einer Änderung der Umgebung leicht eine Konformationsänderung erfolgen kann. Demnach kann eine grenzflächeninduzierte Konformationsänderung zu einem optimierten und stabileren Kontakt zwischen Protein und Substrat führen. Diese sich über eine gewisse Zeit einstellende Relaxation verursacht eine makroskopische Irreversibilität des Proteinadsorptionsprozesses.²²⁻²⁴

Der Adsorptionsgrad von Proteinen an festen oder flüssigen Grenzflächen ist sowohl von der Proteinstruktur als auch von den chemischen und physikalischen Eigenschaften der Grenzflächen abhängig. Die Adsorption von Proteinen wurde auf nahezu allen Arten von Oberflächen, wie Silicium, Polymeren, Metallen, Salzen und Luft, hin untersucht. Die Polarität einer Grenzfläche wird maßgeblich von ihrem chemischen Aufbau bestimmt. Allgemein kann gesagt werden, dass mit steigender Hydrophobizität eines Proteins ein höherer Adsorptionsgrad, eine verstärkte Konformationsänderung sowie eine makroskopische Irreversibilität resultiert. Dies lässt sich dadurch zeigen, dass bei einer Verdünnung der Proteinlösung keine Desorption erfolgt. Für die Untersuchung der Auswirkung der chemischen Grenzflächenbeschaffenheit stellen *self-assembled monolayers* (SAMs) ein nützliches Werkzeug dar.²⁵ SAMs bestehen in der Regel aus an Goldoberflächen kovalent gebundenen langkettigen Alkanthiolen. Durch die Einführung von funktionellen Gruppen lassen sich definierte Grenzflächen mit spezifischen Eigenschaften darstellen. Polymerbürsten stellen eine weitere interessante Art der Grenzflächenmodifikation dar. Polymerbürsten werden durch die kovalente Bindung eines

Endes von Polymerketten an ein festes Substrat hergestellt.^{26,27} Im Falle von Polyethylenoxid (PEO)-Bürsten liegt eine sehr hohe Proteinresistenz aufgrund eines osmotisch-entropischen Prozesses vor. Hierbei erfolgt bei Annäherung eines Proteinmoleküls an die Polymerbürste eine Kompression, welche zu einer Verkleinerung der Konformationsentropie der Polymerketten und einem Anstieg des lokalen osmotischen Drucks führt. Das Proteinmolekül wird aufgrund der Rückgewinnung der Konformationsentropie und der Diffusion von Wasser in die komprimierte Bürste von der modifizierten Grenzfläche abgestoßen.^{28,29} Polyacrylsäure (PAA)-Bürsten weisen eine Besonderheit auf, da je nach Ionenstärke der Adsorptionsgrad der Proteinmoleküle variiert werden kann.^{16,30}

1.3 Polyelektrolyt- und Proteinmultischichten

Eine andere Möglichkeit der Modifikation und Optimierung von Grenzflächen zur Immobilisierung von Proteinen stellt der Aufbau von Polyelektrolytmultischichten (PEMs) dar.^{31,32} Multischichten werden durch die konsekutive Abscheidung von Polykationen und Polyanionen aufgebaut. Aufgrund der Flexibilität von Polyelektrolyten resultiert eine mildere Umgebung für adsorbierte Proteine. In einer Reihe von Studien wurde gezeigt, dass die native Konformation von Proteinen, welche auf PEMs adsorbiert bzw. in PEMs eingebettet sind, größtenteils erhalten bleibt. Zusätzlich wird eine Protein-Protein-Aggregation verhindert, und es liegt weiterhin eine hohe Enzymaktivität vor.³³⁻³⁶ Die Anwendung von PEMs sowohl als Benetzungsmaterialien als auch im Bereich des Wirkstofftransports wurde bereits in zahlreichen Studien detailliert untersucht. Sie liefern aufgrund ihrer vielfältigen Zusammensetzung und leichten Präparation einen großen Beitrag zu diesem Forschungsgebiet.^{31,37} Im Allgemeinen werden Polyelektrolyte schichtweise auf einer festen Substratgrenzfläche, z.B. durch das Eintauchen in wässrige Polyanion- bzw. Polykationlösungen, abgeschieden. PEMs können sowohl auf planaren Grenzflächen als auch auf kolloidalen Partikeln aufgebaut werden. Werden Proteinmoleküle als eine Komponente in PEMs verwendet, so kann ihre biologische Aktivität z.B. in Biosensoren oder enzymatischen Applikationen induziert werden.^{33,35,38,39} Auch der Aufbau von reinen Proteinmultischichten ohne die Anwendung zusätzlicher Polymere kann durchgeführt werden.⁴⁰ Mit Hilfe der *layer-by-layer-deposition*-Methode können durch Abscheidung entgegengesetzt geladener Polyelektrolyte auch Mikrokapseln hergestellt werden, welche sowohl zum Wirkstofftransport

1.3 Polyelektrolyt- und Proteinmultischichten

als auch zur Durchführung von chemischen Reaktionen fähig sind.⁴¹⁻⁴³ Im Falle von Biosensoren und Trennungsmembranen sollten Multischichten eine gewisse Langlebigkeit und Haltbarkeit aufweisen. Als Wirkstofftransportsysteme sollten biokompatible und biologisch abbaubare Eigenschaften vorliegen, um medizinischen Anforderungen zu genügen. Im Bereich der Biotechnologie werden häufig Hydrogele bestehend aus Polyethylenglycol (PEG) aufgrund dessen hoher Biokompatibilität angewandt.⁴⁴ Biologisch abbaubare Polymere sind z.B. Polylactide, Chitosan und das Polypeptid Gelatine.⁴⁵ Zur Herstellung von PEMs aus biologisch abbaubaren und biokompatiblen Komponenten werden häufig die Polypeptide Polylysine und Polyglutamat und das Polysaccharid Hyaluronsäure (HA) verwendet.^{46,47}

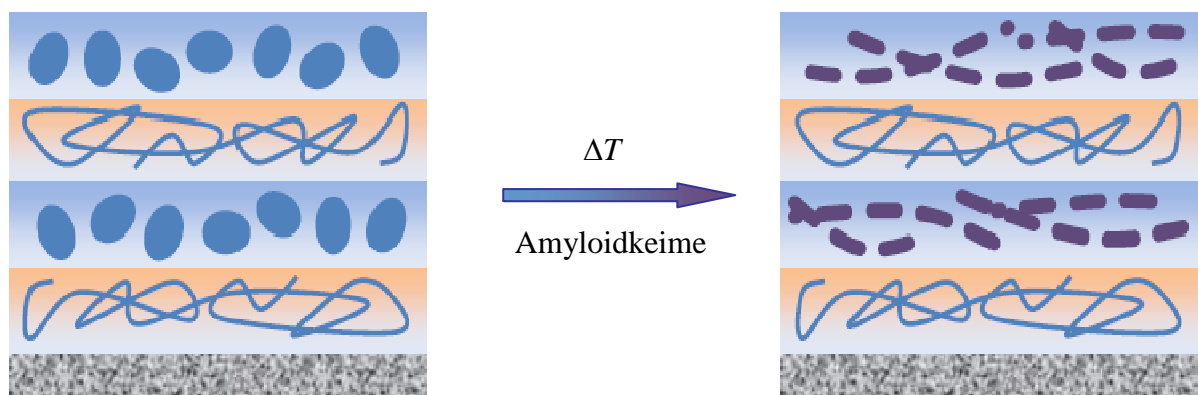


Abbildung 1.4. In einer Polyelektrolytmultischicht eingelagertes Insulin bildet bei Erhöhung der Temperatur oder in Anwesenheit von Amyloidkeimen Aggregate aus.

Ein Hauptbestandteil dieser Arbeit handelt von der Herstellung neuartiger Ultradünnschichten, welche ein zweidimensionales Netzwerk aus amyloidogenem Insulin als Strukturelement beinhalten (siehe Abbildung 1.4). Dieses Netzwerk besteht aus Proteinmolekülen, welche sehr stark über nicht kovalente Bindungen miteinander wechselwirken. Durch die Anwendung von Hyaluronsäure als Baustein jener Multischichten soll eine hohe Biokompatibilität gewährleistet sein, um solch fibrilläre Netzwerke als Wirkstofftransportsysteme zu befähigen. In neueren Studien wurde gezeigt, dass eher präfibrilläre Aggregate (Oligomere) amyloidogener Peptide die toxische Spezies darstellen anstatt ausgereifter Amyloidfibrillen.^{7,48} Einige amyloidogene Proteinstrukturen weisen hilfreiche Funktionen in lebenden Organismen auf (sog. funktionelle Amyloide).^{6,49} In Hinblick auf diese Eigenschaften wurde der Aufbau von PEMs als zweidimensionales Templat für die Proteinaggregation untersucht. Dieser Ansatz unterscheidet sich von denjenigen Strategien, bei denen vorassemblierte amyloide Fibrillen direkt auf einer Grenzfläche immobilisiert wurden.⁵⁰ Die Ausbildung von fibrillären Proteinstrukturen wird

unter bestimmten Bedingungen (pH-Wert, Salzkonzentration, Temperatur, Amyloidkeime) induziert.

1.4 Effekt von hohen hydrostatischen Drücken auf biomolekulare Systeme

1.4.1 Volumeneigenschaften von gelösten und adsorbierten Proteinen

Ein weiterer Hauptteil dieser Arbeit befasst sich mit der Auswirkung von hohen hydrostatischen Drücken auf die Volumeneigenschaften von adsorbierten Proteinen. Die Adsorption von Proteinen wurde bislang sehr umfangreich hinsichtlich des pH-Wertes, der Grenzflächenchemie und der Temperatur untersucht. Wird die Temperatur T einer Probe geändert, so können Biomoleküle hinsichtlich ihrer Phasenübergänge oder Konformationsänderungen, die mit der Enthalpieänderung ΔH verknüpft sind, untersucht werden. Bei einem konstantem Druck ist die temperaturabhängige Änderung der Gleichgewichtskonstante K mit der Enthalpieänderung ΔH über

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial T}\right)_p = \frac{\Delta H}{RT^2} \quad (1)$$

verknüpft.⁵¹ Dabei ist R die universelle Gaskonstante. Analog erfolgt bei einer druckabhängigen Änderung der Gleichgewichtskonstante K von Biomolekülen eine Volumenänderung ΔV :

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial p}\right)_T = -\frac{\Delta V}{RT} \quad (2)$$

Im Vergleich zu einer Temperaturerhöhung, welche sowohl zu einer Erhöhung der thermischen Energie als auch zu einer Verringerung der Dichte führt, wird bei einer Druckänderung nur die Dichte beeinflusst. Mit Ausnahme von sehr hohen Drücken im Bereich von 10^9 - 10^{10} Pa können chemische Bindungen durch die Anwendung von Druck nicht gebrochen werden.⁵² Eine Proteinentfaltung erfolgt bei einigen 10^8 Pa, wobei Phasenumwandlungen von Modelllipidmembranen im Bereich von einigen 10^7 Pa auftreten.^{53,54} Weiterhin sind Hochdruckuntersuchungen von biotechnologischem Interesse, da Lebensmittel mit Hilfe von

hohen Drücken konserviert werden können, aber auch von physiologischem Interesse, da die Tiefsee einen Lebensraum für Organismen unter extremen Bedingungen bei Drücken bis zu 10^8 Pa darstellt. Es gibt einige bioanalytische Methoden, die für Hochdruckmessungen erweitert wurden, wie z.B. Fluoreszenzspektroskopie, FTIR-Spektroskopie und NMR.⁵⁵⁻⁵⁹ Weiterhin wurde eine Reihe von Hochdruckzellen für die Röntgenkleinwinkel- bzw. Neutronenkleinwinkelstreuung entwickelt.⁶⁰ Auch die TIRF-Spektroskopie wurde schon unter Druck angewandt, jedoch nur bis zu einem Druck von 250 bar.⁶¹ Obwohl die Volumenänderung von verschiedenen molekularen Zuständen von grundlegendem Interesse ist, stellt ihre Bestimmung aufgrund der Schwierigkeit des experimentellen Aufbaus eine technische Herausforderung dar.⁵³

Wird Druck auf ein molekulares System ausgeübt, so resultiert eine Stabilisierung derjenigen molekularen Zustände, die kleinere Volumina aufweisen. Auf diese Weise können nativ gefaltete Proteine durch die Anwendung hoher hydrostatischer Drücke entfaltet werden, da der entfaltete Zustand eines Proteins durch ein kleineres Volumen charakterisiert wird (zumindest bei Raumtemperatur).^{62,53} Unter der Annahme eines Zweizustandsprozesses kann die Freie Standard-Entfaltung-Gibbsenergie ΔG° eines Proteins bei einem Druck p beschrieben werden durch

$$\Delta G^\circ(p) = \Delta G^\circ(p_0) + \Delta V_u \cdot (p - p_0) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \Delta V}{\partial p} \right)_{T, p_0} \cdot (p - p_0)^2 \quad (3)$$

hierbei stellt p_0 den Referenzdruck (1 bar) und ΔV_u das Entfaltungsvolumen bei p_0 dar. Oft wird nur ein linearer Zusammenhang für $\Delta G^\circ(p)$ gefunden, da ΔV eine sehr geringe Druckabhängigkeit aufweist ($(\partial \Delta V / \partial p)_{T, p_0} \approx 0$ und $\Delta V \approx \Delta V_u$).^{52,55,59,63,64} Da die Volumenänderung eines Proteins $\Delta V_u < 0$ ist, erfolgt mit steigendem Druck eine Erniedrigung von $\Delta G^\circ(p)$. Nimmt $\Delta G^\circ(p)$ einen negativen Wert an, so resultiert eine Konformationsänderung und somit eine Druckdenaturierung. Dieses negative Entfaltungsvolumen nimmt einen relativ kleinen Wert an (weniger als 1% des molekularen Volumens) und setzt sich aus verschiedenen Beiträgen mit unterschiedlichen Vorzeichen zusammen. Diese Beiträge sind Elektrostriktion, die Exponierung von hydrophoben Seitenketten und Eliminierung von Kavitäten und Defektvolumina.^{53,65-68} Im Zuge der Druckdenaturierung eines Proteins resultiert die Elektrostriktion aus zusätzlich exponierten polaren und geladenen Proteinseitenketten zum Lösungsmittel. Daraus folgt ein negativer Term für die Volumenänderung bei einer

Druckentfaltung, jedoch liefert dieser Effekt einen sehr geringen Beitrag zum Gesamtentfaltungsvolumen, da die meisten geladenen Aminosäureseitenketten bereits an der Oberfläche eines Proteins lokalisiert sind.⁶⁹ Werden hydrophobe Seitenketten aus dem Proteininnern dem Lösungsmittel exponiert, so erfolgt aufgrund ihrer Hydratisierung ebenfalls eine Volumenänderung, wobei bislang keine exakte Aussage über ihr Vorzeichen und ihren Betrag getroffen werden kann.⁶⁸ Den größten Beitrag zur Volumenänderung liefert vermutlich die Eliminierung von lösungsmittelfreien Defektvolumina im Innern der Proteinstruktur.^{66-68,70}

In dieser Arbeit wurden hohe hydrostatische Drücke angewandt, um Volumenänderungen von an wässrig festen Grenzflächen adsorbierten Proteinen zu untersuchen. Liegen Unterschiede in den Volumenänderungen $\Delta V_{u,sol}$ für gelöste bzw. $\Delta V_{u,ads}$ für adsorbierte Proteine vor, so resultieren sie aus dem Adsorptionsprozess. Bei bekannten Werten von $\Delta V_{u,sol}$ und $\Delta V_{u,ads}$ lässt sich die Volumenänderung ΔV_{ads} beim Adsorptionsprozess eines Proteins, welche einen neuen aufschlussreichen Parameter darstellt, abschätzen. Die Bestimmung dieses Adsorptionsvolumens erfolgt unter Annahme, dass es sich bei der Proteinentfaltung im adsorbierten Zustand ebenfalls um einen Zweizustandsprozess handelt. Eine weitere Annahme ist, dass die molaren Volumina von adsorbierten bzw. gelösten Proteinen nach einer Druckdenaturierung gleich groß sind, das bedeutet, dass das Adsorptionsvolumen entfalteter Proteine vernachlässigt werden kann. In Abbildung 1.5 sind unterschiedliche Volumenänderungen im gelösten und im adsorbierten Zustand dargestellt.

Zusätzlich lässt sich durch die Anpassung der Gleichung (3) an experimentelle Daten die Freie Standard-Entfaltungs-Gibbsenergie $\Delta G^\circ(p_0)$, also die Konformationsstabilität eines Proteins bei $p_0 = 1$ bar, bestimmen. Eine Verringerung von $\Delta G^\circ(p_0)$ durch Adsorption weist auf eine starke Wechselwirkung zwischen Protein und Grenzfläche und somit auf eine begrenzte Biokompatibilität der betrachteten Substratgrenzfläche hin.

Proteine mit einer relativ großen Freien Standard-Entfaltungs-Gibbsenergie weisen relativ hohe mittlere Entfaltungsdrücke auf, welche im Bereich um 10 kbar liegen können. Für Messungen in einem kleineren Druckbereich (z.B. bis zu 3000 bar) kann der Einfluss von gewissen Cosolventien (Lösungszusätze) auf den Entfaltungsdruck ausgenutzt werden. In Gegenwart bestimmter Denaturantien wird der Entfaltungsdruck eines Proteins zu einem kleineren Wert hin verschoben, ohne seine Volumeneigenschaften zu beeinflussen.

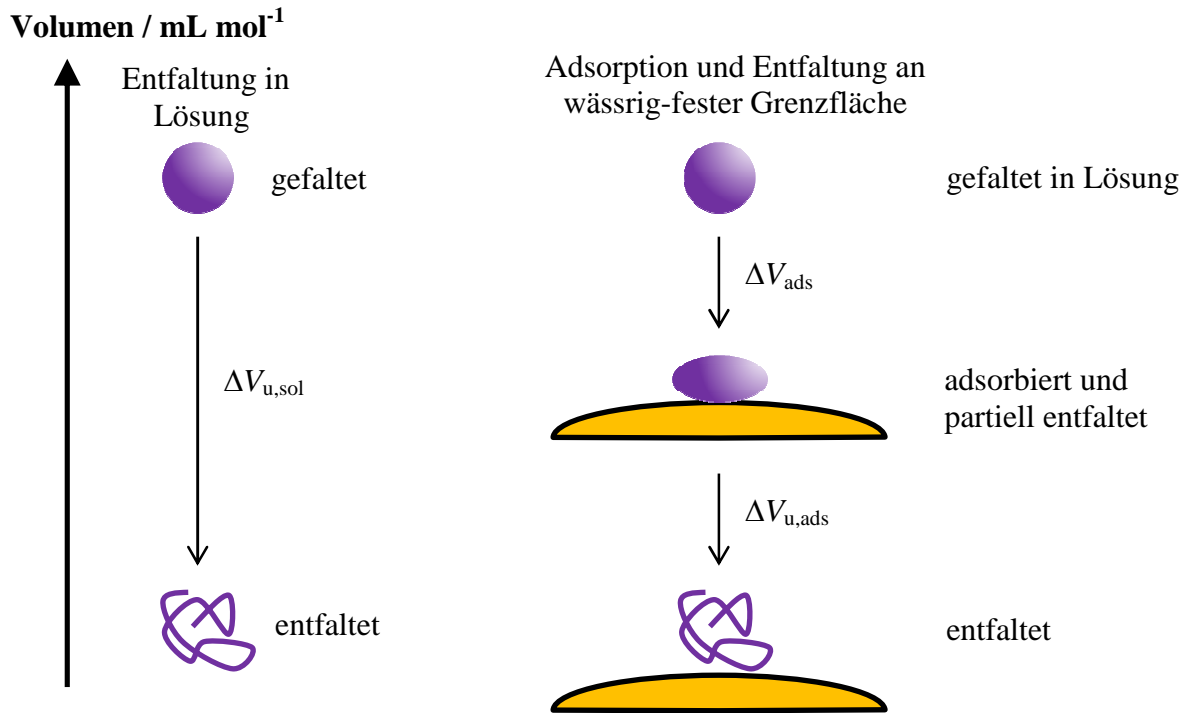


Abbildung 1.5. Volumendiagramm von Proteinen im gelösten (links) bzw. im adsorbierten (rechts) Zustand. Durch die Proteinentfaltung mittels hoher hydrostatischer Drücke lassen sich die Entfaltungsvolumina $\Delta V_{u,sol}$ für den gelösten und $\Delta V_{u,ads}$ für den adsorbierten Zustand experimentell bestimmen. Aus der Differenz dieser beiden Volumenänderungen kann das Adsorptionsvolumen ΔV_{ads} unter verschiedenen Annahmen abgeschätzt werden.

Allgemein wird die konformelle Stabilität eines Proteins durch die Zugabe von Cosolventien stark beeinflusst. Denaturantien, wie z.B. Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid neigen dazu, die Freie Standard-Entfaltungs-Gibbsenergie eines Proteins herabzusetzen und die entfaltete Struktur zu stabilisieren. Andere Cosolventien, wie z.B. Glycerin und Saccharose, stabilisieren den gefalteten Zustand eines Proteins, so dass sie bei einer Isolierung von nativen Proteinen zugesetzt werden. Bei einer Präzipitation gefalteter Proteine werden hohe Konzentration ionischer Cosolventien wie Ammoniumsulfat verwendet. Die Wirkung ionischer Cosolventien wird in der sog. Hofmeister-Serie systematisch eingeteilt (siehe Abbildung 1.6). Dabei werden denaturierende Cosolventien als chaotrop (strukturbrechend) (siehe Abbildung 1.6, linke Seite) und strukturerhaltende Cosolventien als kosmotrop (strukturgebend) (siehe Abbildung 1.6, rechte Seite) bezeichnet.

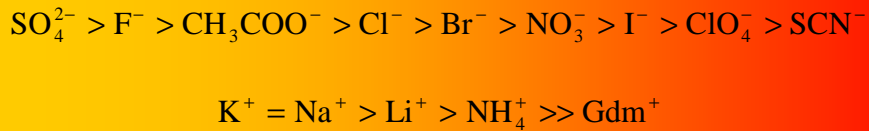


Abbildung 1.6. Hofmeister-Serie aus Referenz 71-73.

In der Hofmeister-Serie werden ionische Cosolventien nach ihrem Vermögen eingeteilt, wie effektiv sie Proteine aus ihrer wässrigen Lösung aussalzen oder wie stark sie die native Proteinkonformation stabilisieren. Aus molekularer Sicht wird in einigen Studien angenommen, dass die Stellung eines Ions in der Hofmeister-Serie von seiner Tendenz, sich an der Luft-Wasser-Grenzfläche bzw. an der wässrigen Grenzfläche von Kohlenwasserstoffen anzureichern, abhängt.^{71,74,75} Im Vergleich zu Proteinen im nativen Zustand steht bei entfaltenen Proteinen eine größere hydrophobe Oberfläche zur Anlagerung von Cosolventien zur Verfügung. Dadurch wird das Entfaltungsgleichgewicht in Richtung des denaturierten Zustands bei erhöhten Konzentrationen chaotroper Substanzen verschoben. Die Stabilisierung der nativen Proteinstruktur durch ein kosmotropes Cosolvens resultiert aus seinem Ausschluss von der Protein-Wasser-Grenzfläche. Das bedeutet, dass eine verstärkte Hydratisierung der Proteinoberfläche erfolgt und das Cosolvens bevorzugt in der Bulk-Phase vorliegt. Dieses Phänomen kann auch folgendermaßen erklärt werden: Cosolventien, die wesentlich größer als Wassermoleküle sind, können nur einen entsprechend großen Abstand zur Proteinoberfläche einnehmen. Bei einer Proteinfaltung liegt ein größeres sterisches Ausschlussvolumen vor, in dem sich solche großen Cosolvensmoleküle nicht aufhalten können. Weiterhin können Wechselwirkungen zwischen Wasser und den Cosolvensmolekülen größer sein als diejenigen zwischen Cosolvens und Proteinen.^{21,76,77} Häufig werden für Hochdruckexperimente chaotrope Substanzen wie Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid zu einer Proteinlösung aufgrund eines aus technischen Gründen eingeschränkten Druckbereichs zugegeben.

1.4.2 Druckeffekte auf molekulare Packungsdichten in Lipiddoppelschichten

Phospholipidmoleküle aggregieren spontan in Wasser und bilden lamellare Doppelschichten aus, in welche hydrophobe Ketten der Lipidmoleküle in die Richtung der mittleren Ebene der Doppelschicht ausgerichtet sind und die polaren Kopfgruppen der Lipidmoleküle mit dem umgebenden Wasser in Kontakt stehen.⁷⁸ In Lösung ordnen sich diese lamellaren

Doppelschichten zu multilamellaren Vesikeln zusammen. Phospholipiddoppelschichten dienen als Biomembranen. Mit steigender Temperatur kann ein Gel-Fluid-Phasenübergang beobachtet werden, bei der alle Lipidketten ihre *all-trans*-Konformation verlieren und eine konformelle Unordnung annehmen. Die fluide oder auch flüssigkristalline L_{α} -Phase ähnelt der Struktur und Dynamik von natürlich vorkommenden Biomembranen am ehesten. Dementsprechend ist die Phasenübergangstemperatur (Schmelztemperatur) vom Gel-Fluid-Übergang ein wichtiger Parameter einer Phospholipiddoppelschicht. Unterschiedliche Phospholipidmoleküle weisen verschiedene Schmelztemperaturen auf, da sie stark von intermolekularen Wechselwirkungen und demnach von der Packungsdichte der Lipidketten abhängen. Gesättigte Lipidketten liegen effizient gepackt in der Gelphase vor, wohingegen ungesättigte Ketten mit *cis*-Doppelbindungen keine starken Wechselwirkungen aufgrund ihrer geometrischen Anordnung aufweisen. Zum Beispiel besitzt 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC) mit seinen gesättigten Ketten eine Schmelztemperatur von 41 °C, wohingegen 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC) mit seinen *cis*-ungesättigten Ketten in der fluiden Phase bereits bei einer Temperatur von über -22 °C liegt.

Das druckabhängige Phasenverhalten von Phospholipiden wurde in vielen Arbeiten detailliert untersucht.^{60,79-81} Im Allgemeinen steigt die Schmelztemperatur von Phospholipiddoppelschichten mit steigendem Druck aufgrund einer höheren Packungsdichte der Lipidketten und der damit stärkeren intermolekularen Wechselwirkungen an. Zum Beispiel steigt die Schmelztemperatur von DOPC um ca. +10 °C pro 1000 bar an.⁶⁰ Da Lipidmoleküle im Allgemeinen nicht fluoreszent sind, wird ihre Struktur und Dynamik durch Einlagerung von verschiedenen extrinsischen Fluorophoren wie z.B. Laurdan untersucht (siehe Punkt 2.2.4).^{82,83}

2. Materialien und Methoden

2.1 Untersuchte Proteine

2.1.1 Insulin

Insulin weist ein Molekulargewicht von 5.7 kDa auf und besteht aus zwei Ketten. Die aus 21 Aminosäuren bestehende kürzere A-Kette weist neben ungeordneten Strukturen zwei α -helikale Abschnitte auf. Die längere B-Kette besteht aus 30 Aminosäuren und weist neben einem α -helikalen Abschnitt eine Sequenz auf, welche intermolekulare β -Faltblätter mit weiteren Insulinmolekülen ausbilden kann.^{21,84,85} Beide Ketten sind über zwei Disulfidbrücken kovalent miteinander verknüpft. Eine zusätzliche Stabilisierung resultiert aus einer internen Disulfidbrücke innerhalb der A-Kette. Mit einer Größe von etwa $4 \text{ nm} \times 2 \text{ nm} \times 1 \text{ nm}$ weist Insulin eine ellipsoide Form auf.⁸⁶ Der isoelektrische Punkt liegt bei pH 5.3.⁸⁷ Bei pH 3 liegen im Mittel drei positive Ladungen pro Insulinmolekül vor. Die Freie Standard-Entfaltungsgibbsenergie liegt im Bereich von 19 kJ mol^{-1} .⁸⁸ Die Struktur eines Dimers von Rinderinsulin ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

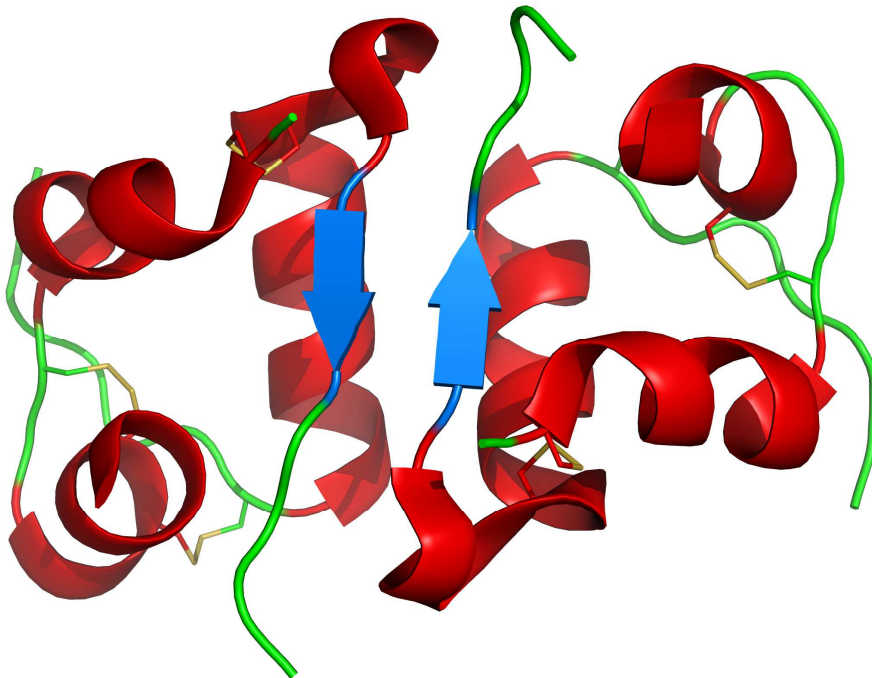


Abbildung 2.1. Bändermodell eines Dimers von Rinderinsulin (erstellt in PyMol 0.99rc6 auf Basis des Datensatzes 2A3G der RCSB Proteindatenbank).^{89,90,91}

Das in den β -Zellen der Langerhansschen Inseln im Pankreas synthetisierte Peptidhormon stellt zusammen mit Adrenalin und Glukagon einen überlebenswichtigen Regulator für den Brennstoffmetabolismus in allen Wirbeltieren dar.⁹² Insulin regt anabole Prozesse in Muskulatur, Leber und Fettgewebe an und steigert somit die Biosynthese von Glykogen, Fettsäuren und Proteinen. Liegt ein hoher Blutzuckerspiegel vor, so bewirkt Insulin eine Absenkung der Zuckerkonzentration zugunsten einer Nährstoffspeicherung in Form von Glykogen. Gleichzeitig wird der Glucose- und Fettabbau sowie die Gluconeogenese gehemmt. Eine Störung des Blutinsulinspiegels bewirkt *Diabetes mellitus*, der häufigsten Stoffwechselerkrankung der Welt. Ist die Insulinkonzentration im Blut zu gering, so wird die Glucoseaufnahme in die Zellen beeinträchtigt. Zusätzlich liegt eine sehr hohe Glykogenkonzentration im Vergleich zur Insulinkonzentration vor, was zu einer starken Erhöhung des Blutglucosespiegels führt. Bei sehr hohen Konzentrationen wird Glucose mit dem Harn ausgeschieden. Eine solche Überzuckerung hat anschließend über eine Reihe von Stoffwechselprozessen eine Absenkung des Blut-pH-Wertes und eine Dehydratisierung zufolge, was letztlich zu einem Koma führen kann. Ein solcher insulinabhängiger Diabetes wird Typ-I-Diabetes genannt. Im Falle eines normalen oder erhöhten Blutinsulinspiegels weisen Körperzellen von Betroffenen des Typ-II-Diabetes eine Unempfindlichkeit gegenüber diesem Peptidhormon auf. Dieser nichtinsulinabhängige Diabetes tritt häufig im erhöhten Lebensalter auf.

Insulin weist unter verschiedenen Bedingungen unterschiedliche Morphologien auf. Bei neutralem pH-Wert liegt Insulin verstärkt in Form von Hexameren vor, welche durch die Absenkung des pH-Wertes in Dimere und Monomere aufgespalten werden können.⁹³ In einer Reihe von Studien wurde gezeigt, dass unterschiedliche Aggregationspfade vorliegen, welche in verschiedenen Amyloidfibrillmorphologien enden.⁹⁴⁻⁹⁶ Aufgrund seiner Fähigkeit lange fibrilläre Strukturen auszubilden, wird Insulin häufig als Modellprotein zur Untersuchung der Amyloidbildung herangezogen. Obwohl Insulin *in vivo* keine amyloiden Fibrillen ausbildet, kann *in vitro* durch Erniedrigung des pH-Wertes, Erhöhung der Temperatur, Zusatz organischer Substanzen oder die Anwesenheit von hydrophoben Grenzflächen durch die verstärkte Ausbildung intermolekularer β -Faltblätter dieser Prozess ausgelöst werden.⁹⁷⁻¹⁰⁰ Die Ausbildung von Amyloidfibrillen kann aber auch durch die Zugabe von Amyloidkeimen zu einer Lösung, welche nativ gefaltetes Insulin enthält, bei Raumtemperatur induziert werden.⁹⁴ Für die Herstellung, Lagerung und Handhabung von Insulin stellt die Fibrillenbildung ein ernsthaftes Problem dar.

2.1.2 Lysozym

Das aus 129 Aminosäuren aufgebaute Enzym Lysozym besteht aus einer einzigen Polypeptidkette und weist ein molekulares Gewicht von 14.6 kDa auf.⁹² Zur Stabilisierung seiner Struktur besitzt das Protein vier intramolekulare Disulfidbrücken. Mit seiner ellipsoiden Form (4.5 nm × 3 nm × 3 nm) stellt Lysozym ein kompaktes Molekül dar, dessen Kern fast ausschließlich unpolar ist. Neben vier α -Helices und zwei 3_{10} -Helices, liegen 2 antiparallele β -Faltblätter im Protein vor. Der isoelektrische Punkt liegt bei einem relativ hohen pH-Wert von 11 vor.¹⁰¹ Bei neutralem pH-Wert liegt eine Nettoladung von +8 pro Lysozymmolekül vor. Aufgrund seiner relativ hohen Freien Standard-Entfaltungs-Gibbsenergie von 20-60 kJ mol⁻¹ liegt die Entfaltungstemperatur bei ca. 70 °C und der Entfaltungsdruck bei ca. 7 kbar. Das Bändermodell von Lysozym ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

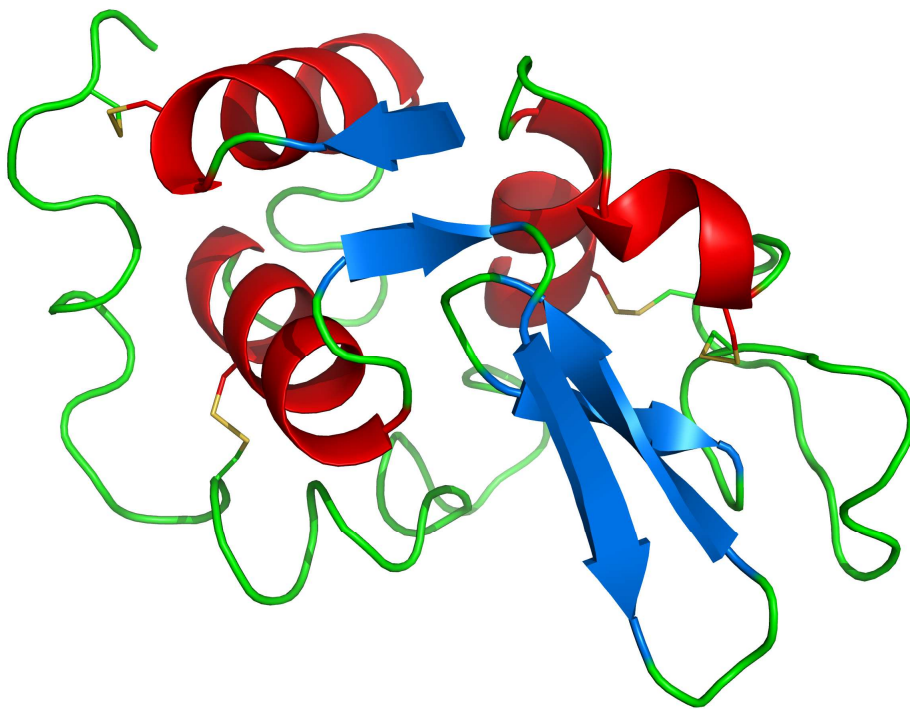


Abbildung 2.2. Bändermodell von Lysozym aus Hühnereiweiß (erstellt in PyMol 0.99rc6 auf Basis des Datensatzes 2LYZ der RCSB Proteindatenbank).^{90,91,102}

Lysozym ist ein in vielen Organismen vorkommendes Enzym, welches als natürliches Antibiotikum dient. Mit seiner Fähigkeit zur Spaltung einer 1,4-glykosidischen Bindung zwischen N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure ist es in der Lage Bakterienzellwände zu lysieren, so dass aufgrund eines zu hohen osmotischen Drucks Bakterien zum Platzen gebracht werden. Mit Lysozym wurde im Jahre 1965 das erste hochaufgelöste Bild der

Elektronendichteverteilung eines Enzymmoleküls erhalten. Lysozym ist im Allgemeinen ein sehr gut untersuchtes Enzym. Da in Hühnereiweiß Lysozym in großen Mengen vorhanden ist und relativ leicht isoliert werden kann, stellt es somit auch ein günstiges Modellprotein dar.⁹²

2.1.3 Staphylokokken Nuclease

Staphylokokken Nuclease (SNase) besteht aus 149 Aminosäuren und weist eine molare Masse von 16,9 kDa auf.¹⁰³ Der Sekundärstrukturanteil der α -Helices liegt bei 18 % und der β -Faltblätter bei 26 %. Der isoelektrische Punkt der SNase liegt bei pH 9,62, so dass bei neutralem pH-Wert eine Anzahl von durchschnittlich 8,9 positiven Ladungen pro Proteinmolekül vorliegt. Die größte Aktivität des Proteins tritt bei einem pH-Wert von 9,2 auf.¹⁰³ Die Abwesenheit von Disulfidbrücken erklärt die relativ geringe Entfaltungstemperatur von 52 °C bei pH 7 und den relativ geringen Entfaltungsdruck von 2 kbar bei pH 5,5. Die freie Standard-Entfaltung-Gibbsenergie liegt im Bereich von 10-20 kJ mol⁻¹. Die Struktur von SNase ist in Abbildung 2.3 dargestellt.

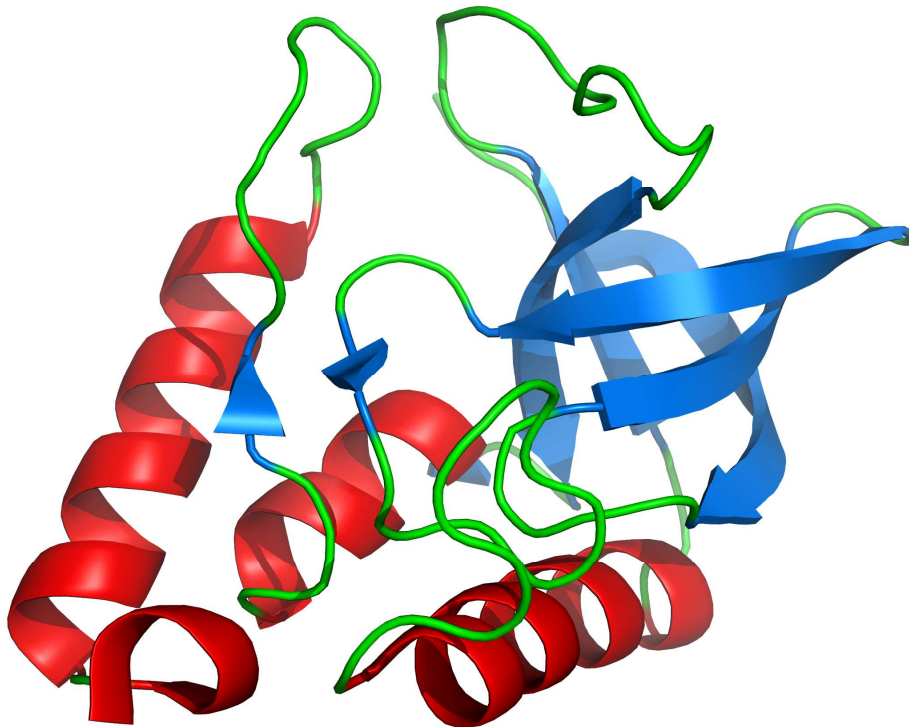


Abbildung 2.3. Bändermodell von Staphylokokken Nuclease (erstellt in PyMol 0.99rc6 auf Basis des Datensatzes 1EY0 der RCSB Proteindatenbank).^{90,91,104}

SNase ist eine extrazelluläre Exo- und Endo-5'-Phosphodiesterase aus dem Organismus *Staphylococcus aureus* und dient zur Spaltung von DNA und RNA.¹⁰⁵ Sie ist an der Verbreitung von bakteriellen Zellen im Wirtsorganismus beteiligt.¹⁰⁶ In der Biotechnologie wird SNase sowohl für die Sequenzierung von RNA als auch in verschiedenen Bereichen, in denen die Anwesenheit von Nukleinsäuren unerwünscht ist, angewandt. Die Anwendung der SNase erfolgt z.B. bei Reduzierung der Viskosität von Zelllysaten, bei der Proteinaufreinigung und der Entwicklung von *in-vitro*-Translationssystemen.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ Zur Untersuchung der Volumeneigenschaften von Proteinen eignet sich SNase als Modellprotein. Im gelösten Zustand wurde die druckinduzierte Proteinfaltung bereits sehr detailliert untersucht. Aufgrund seiner positiven Nettoladung bei neutralem pH kann das Protein über elektrostatische Wechselwirkungen an negativ geladene Grenzflächen adsorbieren.¹¹⁰ Als intrinsische Fluoreszenzsonde kann der Tryptophanrest (Trp) in SNase zur Untersuchung von Entfaltungsprozessen verwendet werden. Da die Lage der Trp-Fluoreszenzbande stark von seiner Umgebung und somit von seinem Solvatationsgrad abhängt, kann eine Proteinfaltung leicht fluoreszenzspektroskopisch detektiert werden.

2.2 Fluorophore

2.2.1 Alexa Fluor 488

Alexa Fluor 488 ist ein Fluoresceinderivat und wird sehr häufig als extrinsischer Fluorophor verwendet, welcher über einen Tetrafluorphenylester selektiv an eine primäre neutrale Aminogruppe eines Proteins zu einem stabilen aliphatischen Amid kovalent gebunden werden kann. Die Strukturformel ist in Abbildung 2.4 dargestellt. Die Proteinkonjugate weisen eine relativ hohe Emissionsintensität auch bei niedrigen oder hohen pH-Werten aufgrund ihres hohen Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{494\text{nm}} = 71000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ auf. Freies Alexa Fluor 488 weist eine relativ hohe Quantenausbeute von bis zu $Q_{\text{Alexa488}} = 0.92$ im Vergleich zu Fluorescein auf, welche bei $Q_{\text{Fluorescein}} = 0.1 - 0.4$ liegt.^{111,112}

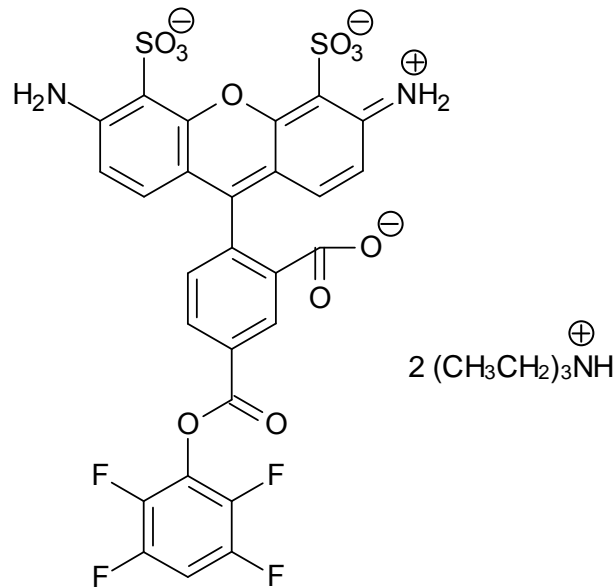


Abbildung 2.4. Strukturformel von Alexa Fluor 488-Tetrafluorphenylester.

Aufgrund der vorhandenen Ladungen ist Alexa Fluor 488 wasserlöslich und verringert die Tendenz von unerwünschten Aggregationen von Konjugaten.¹¹³ Der Fluorophor weist ein relativ hohes Signal-Rausch-Verhältnis auf. Das Absorptionsmaximum liegt bei 494 nm, wobei das Emissionsmaximum bei 519 nm liegt.¹¹² Über seine gesamte Absorptionsbande liegt nahezu eine konstant hohe Grenzanisotropie von $r_0 = 0.376$ vor.¹¹⁴ Damit ist Alexa Fluor 488 sehr gut geeignet, um Anisotropien von Proteinaggregationsprozessen zu untersuchen.

2.2.2 Thioflavin T

Thioflavin T (ThT) wird in der medizinischen Diagnostik z.B. zur Charakterisierung pathologischer Amyloidablagerungen,^{115,116} zur Quantifizierung von *in vitro* gebildeter fibrillärer Strukturen und zur Analyse von Kinetiken von Fibrillierungsprozessen verwendet.^{117,118} ThT ist ein amyloidspezifischer Marker und besteht aus einem Benzamid-Ring, welcher kovalent an ein Benzothiazol-Ringsystem gebunden ist (siehe Abbildung 2.5). Das Anregungsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 450$ nm, die Emissionswellenlänge liegt bei $\lambda_{\text{em}} = 482$ nm. Die Intensität der Fluoreszenz ist in Anwesenheit fibrillärer Strukturen um 2 bis 3 Größenordnungen höher als im Vergleich zum freien Fluorophor.¹¹⁸

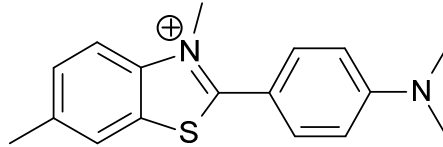


Abbildung 2.5. Strukturformel von Thioflavin T.

Liegt das Molekül planar vor, so ist das delokalisierte π -Elektronensystem über die gesamte Verbindung verteilt. Die über die Einfachbindung verknüpften Ringsysteme können jedoch je nach Umgebung unterschiedlich stark relativ zueinander rotieren, so dass eine Verkleinerung der delokalisierten π -Elektronensysteme vorliegen kann. Folglich resultiert eine starke Verkleinerung der Quantenausbeute des freien Fluorophors bei 482 nm. Liegen fibrilläre Strukturen vor, so ist ThT in der Lage in diese zu interkalieren, wodurch eine Verringerung der Rotation der beiden Ringsysteme relativ zueinander hervorgeht. Folglich resultiert eine stark erhöhte Quantenausbeute, welche auf einer eingeschränkten Rotationsrelaxation des Fluorophors im angeregten Zustand basiert.¹¹⁹ In Gegenwart von nativen, teilweise oder vollständig entfalteten Proteinen ist nahezu kein Anstieg der Fluoreszenzintensität von ThT zu beobachten.¹²⁰ Der exakte Bindungsmechanismus ist bis jetzt unaufgeklärt, jedoch spielen hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und die Ausbildung von Ionenpaaren zwischen dem Thiazol-Ring und den negativen Ladungen von Fibrillen eine wichtige Rolle.^{116,119,121,122} Neben Amyloidfibrillen ist ThT in der Lage in Gegenwart von Elastinfibrillen, Polysacchariden und DNA eine empfindliche Fluoreszenzänderung aufzuweisen.^{115,116}

2.2.3 Tryptophan und N-Acetyl-L-tryptophanamid

Tryptophan ist eine der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren und dient als ein in vielen Proteinen vorkommender intrinsischer Fluorophor, welcher zur Untersuchung sowohl von Strukturen als auch von Kinetiken von Proteinen verwendet werden kann. Im Rahmen von Hochdruckmessungen an Proteinen wurde die Fluoreszenzspektroskopie von G. Weber eingeführt, bei der intrinsische Tryptophanreste als Sonden zur Aufnahme von Fluoreszenzspektren, Fluoreszenzintensitäten, Fluoreszenzpolarisation und Lebenszeiten verwendet wurden¹²³⁻¹²⁶. Im Vergleich zu Tyrosin oder Phenylalanin besitzt Tryptophan eine hohe Quantenausbeute. Bei Hochdruckfluoreszenzexperimenten dient die Lage des spektralen

Maximums von Tryptophan als Maß für den Denaturierungsgrad, da durch die Konformationsänderung eines Proteins der Fluorophor dem Lösungsmittel exponiert und somit die Polarität seiner Umgebung verändert wird. Dies führt einerseits zu einer Rotverschiebung des spektralen Maximums, zudem erfolgt unter Druck eine Änderung der Quantenausbeute (siehe Abbildung 2.6). Bei den meisten Fluorophoren sinkt mit steigendem Druck die Quantenausbeute, im Falle von Tryptophan erfolgt jedoch ein Anstieg. Dies ist mit unterschiedlichen Ionisierungszuständen zu erklären. Bei einem pH-Wert von 3 beispielsweise liegt Tryptophan in der protonierten Form NH_3^+ -Trp-COOH, bei einem neutralen pH-Wert von 7.3 in der Form NH_3^+ -Trp-COO⁻ und bei pH 9 in der negativ geladenen Form NH_2 -Trp-COO⁻.

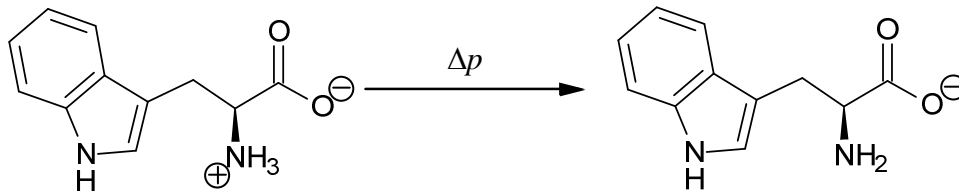


Abbildung 2.6. Struktur von Tryptophan bei Atmosphärendruck (links) und bei erhöhten Drücken (rechts).

Die Quantenausbeute dieser drei Spezies weisen unterschiedliche Werte auf und liegen bei jeweils 0.085, 0.2 und 0.51.¹²⁷ Bei Anwendung hoher hydrostatischer Drücke kann eine Ionisation in Molekülen erfolgen. Bei einem pH-Wert von 7.3 liegt Trp zunächst in der zwitterionischen Form vor. Bei Anwendung von hohen Drücken erfolgt eine Ionisierung zur negativ geladenen Form mit einer deutlich höheren Quantenausbeute.

N-Acetyl-L-tryptophanamid (NATA) ist ein Derivat des Tryptophans, welches zur Bestimmung des intrinsischen Druckeffekts auf Trp-Fluoreszenzspektren verwendet wird. Aufgrund seiner peptidähnlicheren Struktur (siehe Abbildung 2.7) tritt der oben erwähnte Anstieg der Quantenausbeute bei steigendem Druck nicht auf.

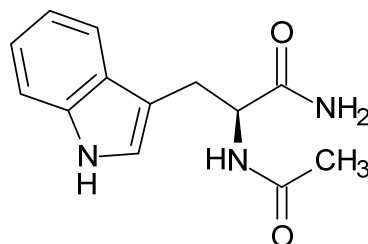


Abbildung 2.7. Struktur von N-Acetyl-L-tryptophanamid (NATA).

Die Quantenausbeute sinkt, wie das auch bei Proteinfaltungsexperimenten unter hohen Drücken häufig der Fall ist. Dieses Verhalten ist auf den sich nicht ändernden Ionisierungszustand von NATA bei hohen Drücken zurückzuführen.

2.2.4 Laurdan

Laurdan (6-Lauroyl-2-dimethylaminonaphthalin) sowie andere Prodan-Derivate wurden ursprünglich zur Untersuchung von dipolaren Relaxationsphänomenen synthetisiert. Aufgrund der 2-Dimethylamino- sowie der 6-Carbonyl-Gruppe besitzt der fluoreszierende Naphthalinrest ein Dipolmoment, welches durch die Anregung mit Licht entsprechender Wellenlänge größer wird und eine Umorientierung der Lösungsmitteldipole hervorruft (siehe Abbildung 2.8).

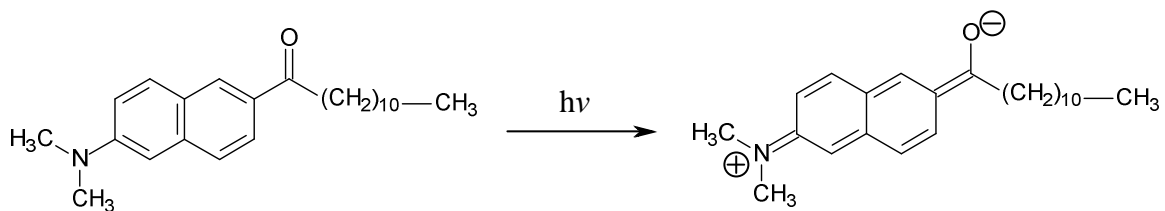


Abbildung 2.8. Struktur von Laurdan.

Die Energie, welche bei Umorientierung der Lösungsmitteldipole frei wird, senkt die Energie des angeregten Zustandes des Fluorophors ab, was sich in einer Rotverschiebung des Fluoreszenzspektrums äußert. Aufgrund dieser Eigenschaften kann Laurdan durch das Binden längerer Alkyl- oder Fettsäureketten als empfindliche Sonde zur Untersuchung von Phasenübergängen von Membranen angewandt werden.⁸² Zur Auswertung von Phasenübergängen kann der *generalized polarisation* (GP)-Wert verwendet werden, welcher definiert ist als:

$$GP = \frac{I_B - I_R}{I_B + I_R} \quad (4)$$

Dabei sind I_B und I_R die Intensität jeweils bei einer kleineren (B) und einer größeren (R) Wellenlänge. Die Lage des Emissionsmaximums von Laurdan in einer Phospholipid-doppelschicht hängt vom ihrem Phasenzustand ab, wobei in der Gelphase die maximale Intensität bei 440 nm und in der flüssigkristallinen Phase bei 490 nm liegt. In der Gelphase tritt

keine temperaturabhängige Rotverschiebung des Emissionsmaximums auf. Oberhalb des Hauptphasenübergangs erfolgt jedoch eine kontinuierliche Rotverschiebung bis zu einer Wellenlänge von 490 nm.

2.3 Polyelektrolyte

2.3.1 Poly(natrium 4-styrolsulfonat)

Eine Reihe von Untersuchungen an Polyelektrolytmultischichten erfolgte durch die Verwendung von Poly(natrium 4-styrolsulfonat) (PSS). In Abbildung 2.9 ist die Struktur von PSS dargestellt.

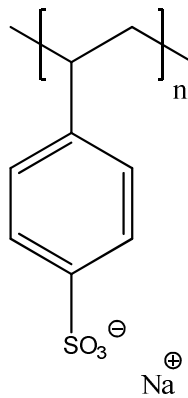


Abbildung 2.9. Struktur von Poly(natrium 4-styrolsulfonat) (PSS).

PSS ist ein Polyanion, welches aufgrund seiner Sulfonatgruppe eine starke Säure mit einem pK_a-Wert von 1 darstellt.¹²⁸ Auch bei hohen pH-Werten liegt PSS dementsprechend negativ geladen vor.

2.3.2 Poly(diallyldimethylammoniumchlorid)

Poly(diallyldimethylammoniumchlorid) (PDDA) ist ein Polyelektrolyt, welcher aufgrund seiner quarternären Ammoniumgruppe eine positive Ladung aufweist und somit ein Polykation darstellt. Zahlreiche Studien an Polyelektrolytmultischichten wurden mithilfe von PDDA durchgeführt, dessen Struktur in Abbildung 2.10 dargestellt ist.

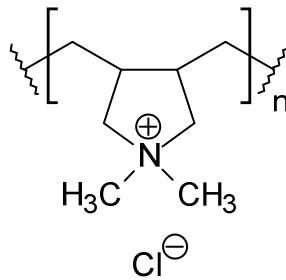


Abbildung 2.10. Struktur von Poly(diallyldimethylammoniumchlorid) (PDDA).

2.3.3 Hyaluronsäure

Hyaluronsäure (HA) ist ein Mucopolysaccharid und ist in allen lebenden Organismen vorhanden.¹²⁹ Bei allen Säugetieren tritt HA in erster Linie in der extrazellulären Matrix auf. HA besteht aus einer linearen Verknüpfung der sich wiederholenden Disaccharidstruktur Glykosaminoglykan [(1→3)-β-dGlcNAc-(1→4)-β-d-GlcA-] (siehe Abbildung 2.11).

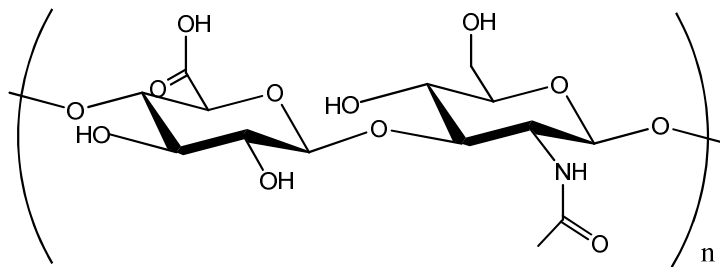


Abbildung 2.11. Struktur von Hyaluronsäure (HA)

Solche Ketten können aus einigen Tausenden von aneinandergereihten Zuckermolekülen bestehen. HA besitzt die Fähigkeit sehr große Mengen Wasser an sich zu binden, wodurch die Viskosität einer Lösung stark vergrößert wird. Ihre biologische Funktion besteht zum Teil aus der Aufrechterhaltung der Elastoviskosität von flüssigem Bindegewebe wie z.B. in Gelenken oder in der Glaskörperflüssigkeit im Auge sowie der Kontrolle von Gewebhydratation und dem Wassertransport.¹³⁰⁻¹³³ Hyaluronsäure ist eines der hydrophilsten Biomoleküle, die in der Natur auftreten,¹³⁴ und sie wurde hinsichtlich des Wirkstofftransports für ophthalmische, nasale, pulmonale, parenterale und topische Applikationsformen detailliert untersucht.¹³⁵ Aufgrund der negativen Ladungen bei neutralem pH-Wert kann HA als Polyanion zum Aufbau von Polyelektrolytmultischichten eingesetzt werden und weist darin eine relativ flexible

Struktur auf. Wird HA in Multischichten eingelagert, so kann es zu einem exponentiellen Anstieg der Schichtdicke mit steigender Anzahl der Schichten kommen, da HA eine relativ geringe Ladungsdichte aufweist und somit eine Diffusion von Polyelektrolytmolekülen aus tieferliegenden Schichten an die Oberfläche ermöglicht.¹³⁶

2.4 Nanopartikel

2.4.1 Ludox AM und Ludox AS

Die Ludox-AS-Dispersion besitzt eine Dichte von 1.3 mg/mL mit 40 Gew.-% Silicapartikeln, welche einen Radius von ca. 11nm aufweisen. Sie besitzen eine spezifische Oberfläche von 135 m²/g. Die Ludox AM-Dispersion besitzt eine Dichte von 1.2 g/mL mit 30 Gew.-% Silicapartikel, welche einen Radius von ca. 6 nm aufweisen. Die spezifische Oberfläche beträgt 220 m²/g. Diese Partikel beinhalten 0.2 Gew.-% Al₂O₃ (siehe Abbildung 2.12).¹³⁷

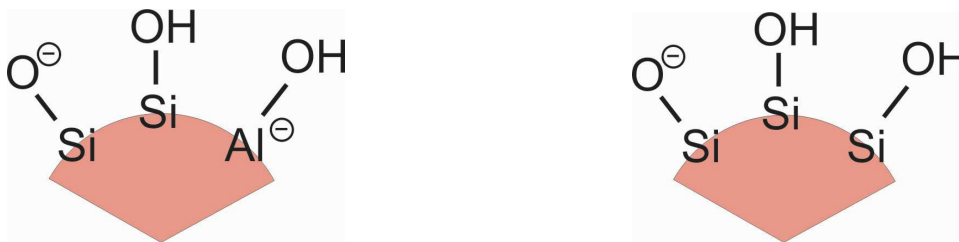


Abbildung 2.12. Silicapartikel Ludox AM (links) und Ludox AS (rechts)

Durch das Ersetzen von Si durch Al resultiert eine stärkere negative Ladung. Die ζ -Potentiale betragen -21.7 mV für Ludox AS und -6.8 mV für Ludox AM bei einem pH-Wert von 4.8.¹³⁸

2.5 Messmethoden

2.5.1 Röntgenreflektometrie^{12,139-141}

Mit Hilfe der Röntgenreflektometrie (XRR) ist es möglich, die Schichtdicke, die Rauigkeit und das Elektronendichteprofil eines Proteinadsorbats an einer festen Grenzfläche zu ermitteln. Hierbei wird die Reflektivität der zu untersuchenden Grenzfläche als Funktion des

Einfallswinkels der Röntgenstrahlung gemessen (siehe Abbildung 2.13). An die aus der Messung hervorgehende Reflektivitätskurve wird eine berechnete Kurve angepasst und die oben erwähnten Parameter dabei variiert. Die Berechnung einer Kurve basiert auf einem Schichtenmodell durch Anwendung der optischen Matrixmethode oder des Parratt-Algorithmus, welche weiter unten erklärt werden.^{142,143}

In einem Röntgendiffraktometer wird Strahlung mit Hilfe einer Röntgenröhre erzeugt, welche eine Glühkathode und eine Anode enthält. Von der als Elektronenquelle dienenden Glühkathode werden mittels einer angelegten Hochspannung Elektronen zum Anodenmaterial hin beschleunigt. Als Anodenmaterial dient z.B. Kupfer oder Molybdän. Dabei treffen die beschleunigten Elektronen auf die Elektronen der innersten Schalen des Anodenmaterials, und es erfolgt eine Anregung auf eine unbesetzte Schale, oder die Elektronen werden aus der Elektronenhülle herausgeschlagen, so dass folglich eine Ionisierung eintritt. Die aus den inneren Schalen (z.B. die K-Schale) der Elektronenhülle herausgeschlagenen Elektronen werden durch Elektronen höherer Energieniveaus (z.B. L-Schale) unter Aussendung von charakteristischen Röntgenstrahlen ersetzt. Im Falle von Kupfer liegt z.B. eine Cu-K_α-Strahlung mit einer Wellenlänge von 1.54 Å und für Molybdän eine Mo-K_α-Strahlung mit einer Wellenlänge von 0.71 Å vor, wenn ein Elektron aus der L-Schale eines Atoms zur K-Schale übergeht.¹⁴⁴ Neben den Linienspektren von Röntgenstrahlen mit charakteristischen Wellenlängen erscheint eine zusätzliche Röntgenbremsstrahlung, die ein kontinuierliches Spektrum aufweist. Diese wird durch die Ablenkung der beschleunigten Elektronen an den Elektronen des Anodenmaterials oder den Atomkernen verursacht.

Das Messprinzip der Röntgenreflektometrie besteht darin, dass monochromatische Röntgenstrahlung in relativ kleinen Einfallswinkeln auf die zu untersuchende feste Grenzfläche eingestrahlt, reflektiert und anschließend detektiert wird (siehe Abbildung 2.13). Gemessen wird die Intensität der reflektierten Röntgenstrahlung abhängig vom Einfallswinkel θ .¹² Die Positionen sowohl der Röntgenquelle als auch des Detektors werden jeweils in gleichen Winkeln relativ zur Grenzfläche mit Hilfe eines Zwei-Achsen-Goniometers verändert.

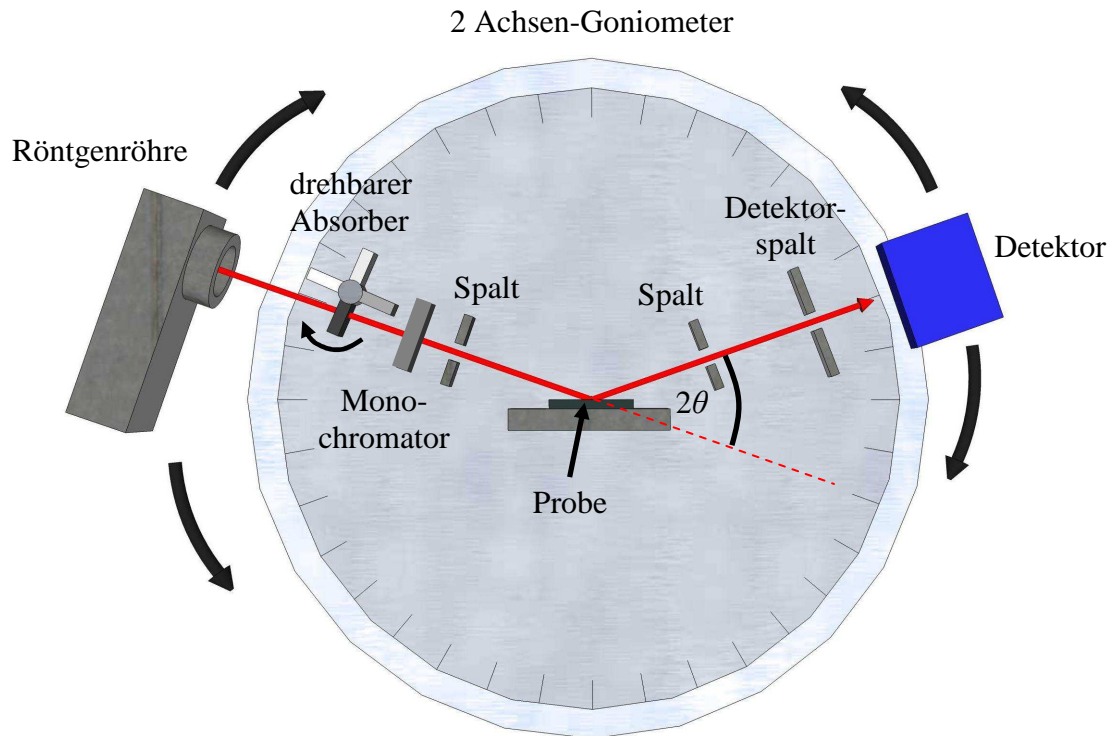


Abbildung 2.13. Schematischer Aufbau eines Röntgendiffraktometers.

Für die einfallende und gebrochene Strahlung gilt das Snelliussche Brechungsgesetz:

$$n_{m-1} \cos \theta_{m-1} = n_m \cos \theta_m \quad (5)$$

Hierbei stellt n_{m-1} den Brechungsindex des Mediums $m-1$, n_m den Brechungsindex des benachbarten Mediums, θ_{m-1} den Winkel des einfallenden Strahls und θ_m den des gebrochenen Röntgenstrahls dar. Anders als bei sichtbarem Licht erfolgt bei kleinen Winkeln $\theta_{m-1} \leq \theta_c$, wobei θ_c den kritischen Winkel darstellt, eine Totalreflexion, wenn Röntgenstrahlung auf eine Festkörperoberfläche trifft. Im Falle von sichtbarem Licht wird die Dielektrizitätskonstante ϵ bzw. der Brechungsindex n eines Festkörpers durch die elektronische Polarisierung bestimmt. Die hohe Frequenz der Röntgenstrahlung führt zu einem Brechungsindex $n < 1$. Da der Brechungsindex von Luft mit $n = 1$ das optisch dichtere Medium darstellt, erfolgt eine externe Totalreflexion unterhalb des kritischen Winkels θ_c , wobei $\theta_c > 1^\circ$ ist. Die Phasengeschwindigkeit von Röntgenstrahlung ist in Festkörpern somit schneller als die Vakuumlichtgeschwindigkeit.¹⁴⁵

Die komplexen Brechungsindizes n der zu untersuchenden Schichten werden durch folgenden Ausdruck beschrieben:¹⁴⁰

$$n = 1 - \delta + i\beta = 1 - \frac{\lambda^2}{2\pi} \rho_e r_e - i \frac{\lambda}{4\pi} \mu \quad (6)$$

Hierbei sind δ die Dispersion, β die Absorption, λ die Wellenlänge der einfallenden Röntgenstrahlung, $r_e = 2.818 \cdot 10^{-15}$ m der klassische Elektronenradius, ρ_e die Elektronendichte und μ der lineare Absorptionskoeffizient der Röntgenstrahlen. Wie im sichtbaren Spektralbereich tritt auch bei Röntgenstrahlung normale Dispersion auf.¹³⁹ Liegt ein Adsorbat auf einer Grenzfläche vor, so wird bei Winkeln $\theta_{m-1} > \theta_c$ ein Teil der einfallenden Strahlung mit dem Wellenvektor \vec{k}_{m-1} und der elektrischen Feldstärke E_{m-1}^0 an der Adsorbatoberfläche mit \vec{k}_{m-1}' und E_{m-1}^R reflektiert und ein Teil der Strahlung mit \vec{k}_m und E_m^R gebrochen (siehe Abbildung 2.14). Die z-Komponente der Wellenvektoren \vec{k}_{m-1} und \vec{k}_{m-1}' steht senkrecht zur betrachteten Grenzfläche. Der Betrag der Wellenvektordifferenz beträgt:

$$Q_{m-1} = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta_{m-1} \quad (7)$$

Hier bei stellt Q_{m-1} den Streuvektorbetrag dar. An der Adsorbat/Adsorptiv-Grenzfläche wird die gebrochene Strahlung erneut teilweise reflektiert und teilweise gebrochen. Somit bestimmen die z-Komponenten zweier benachbarter Schichten den Reflexionskoeffizienten $r_{m-1,m}$ gemäß folgender Beziehung:

$$r_{m-1,m} = \frac{Q_{m-1} - Q_m}{Q_{m-1} + Q_m} \exp\left(-\frac{1}{2} Q_{m-1} Q_m \sigma_{m-1,m}^2\right) \quad (8)$$

Hierbei dient die Exponentialfunktion zur Beschreibung der Rauigkeit $\sigma_{m-1,m}$ der Grenzfläche zwischen der Schicht $m-1$ und der benachbarten Schicht m .

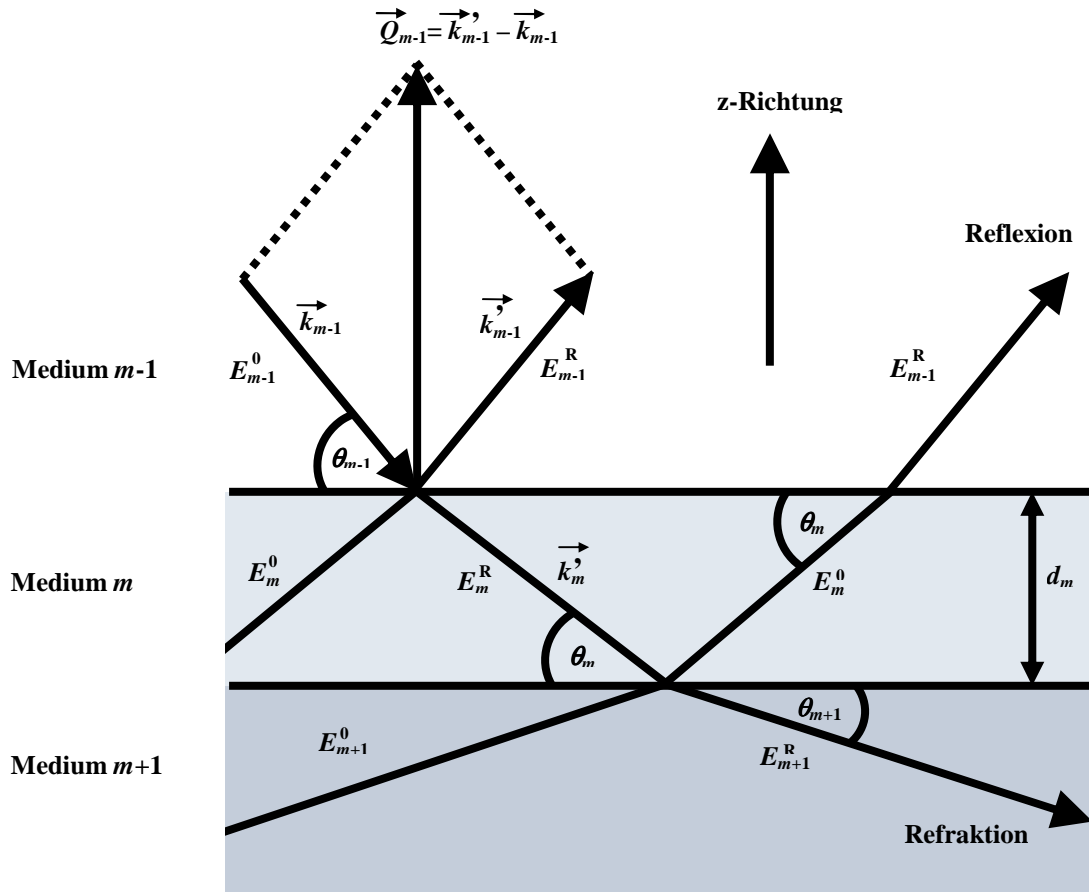


Abbildung 2.14. Brechung und Reflexion von Röntgenstrahlen mit unterschiedlichen Amplituden E an verschiedenen Grenzflächen.

Reale Oberflächen weisen niemals eine ideale Glätte auf, sondern besitzen zwei Arten von Rauigkeiten. Einerseits können Oberflächenwelligkeiten im Bereich von mehreren Hundert Nanometern liegen, wobei eine Abweichung der Glätte in Bezug auf die mittlere Position der Grenzfläche in einem großen Ausdehnungsbereich vorliegt. Andererseits können Abweichungen der Glätte von der mittleren Position der Grenzfläche im Bereich von wenigen Atomen liegen und somit eine mikroskopische Rauigkeit verursachen (siehe Abbildung 2.15).¹⁴¹

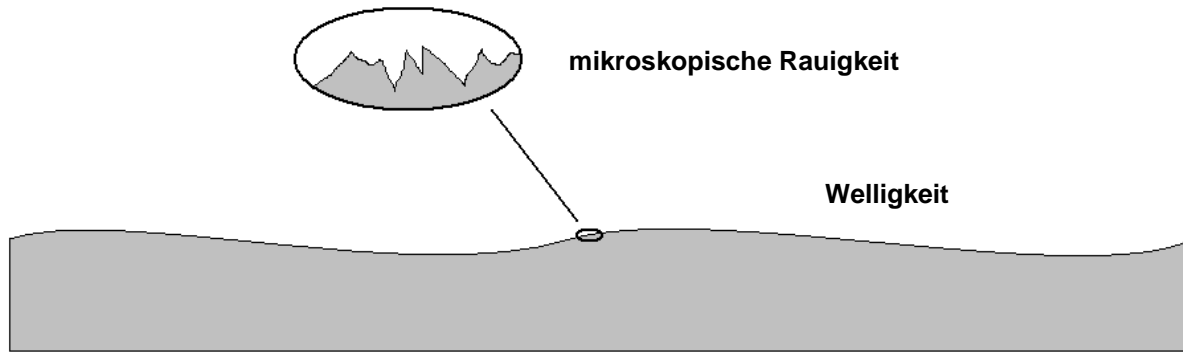


Abbildung 2.15. Schematische Darstellung von Oberflächenwelligkeit und mikroskopischer Rauigkeit.

Geringe Oberflächenwelligkeiten führen zu einer Winkelverbreiterung der reflektierten Strahlung, was in einer Verringerung der Winkelauflösung im Vergleich zu ideal glatten Oberflächen resultiert. Große Oberflächenwelligkeiten hingegen führen zu einer Deformation der Reflektivitätskurve. Die mikroskopische Rauigkeit führt zu einer allgemeinen Intensitätsabnahme der reflektierten Strahlung. Ideal glatte Teiloberflächen einer Schicht bilden ein Ensemble von Teilorientierung um die mittlere Orientierung in Form einer Gaußschen Normalverteilung.¹⁴¹

Abhängig vom Brechungsindex n_{m-1} , dem Streuvektorbetrag Q_{m-1} und der Schichtdicke d_{m-1} erfolgt aufgrund einer Phasenverschiebung φ_{m-1} eine konstruktive bzw. destruktive Interferenz der an den unterschiedlichen Grenzflächen reflektierten Röntgenstrahlen. Diese Phasenverschiebung lässt sich beschreiben durch

$$\varphi_{m-1} = \frac{1}{2} n_{m-1} Q_{m-1} d_{m-1}. \quad (9)$$

Diese Interferenzen führen zu den sog. Kiessig-Oszillationen, welche durch eine periodische Abfolge von Minima in den Intensitäten charakterisiert werden. Je nach Schichtdicke des Adsorbats verändern sich die Abstände der Intensitätsminima.¹²

Für eine einzelne zu untersuchende Schicht kann folgende Matrix aufgestellt werden:

$$M_m = \begin{pmatrix} \exp(i\varphi_{m-1}) & r_{m-1,m} \exp(i\varphi_{m-1}) \\ r_{m-1,m} \exp(-i\varphi_{m-1}) & \exp(-i\varphi_{m-1}) \end{pmatrix} \quad (10)$$

Die Reflektivität mehrerer Schichten kann durch die Berechnung einer Matrizenmultiplikation gemäß folgender Beziehung erhalten werden:

$$M_1 M_2 M_3 \dots M_n = \begin{pmatrix} M_{11} & M_{12} \\ M_{21} & M_{22} \end{pmatrix} \quad (11)$$

und

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

wobei $Q = Q_0$ sich auf den Einfallswinkel der Röntgenstrahlung an der Luft/Adsorbat-Grenzfläche bezieht (siehe Abbildung 2.14). Die Reflektivität $R(Q)$ kann demnach als Funktion der Elektronendichte ρ_e , der Rauigkeit der Grenzflächen $\sigma_{m-1,m}$ und der Schichtdicke d_{m-1} berechnet werden.¹²

In der folgenden Abbildung 2.16 ist beispielhaft die Reflektivität $R(Q)$ der Proteinmultischicht PDDA-PSS-(Insulin-PSS)₂ als Funktion des Streuvektorbetrages Q aufgetragen. Die Kiessig-Oszillationen sind bei einer Schichtdicke von 113 Å deutlich zu erkennen.

Die Anpassung einer berechneten Kurve an die gemessenen Daten kann auch über den sog. Parratt-Algorithmus erfolgen. Sind an einer betrachteten Grenzfläche die Amplituden aller einfallenden, gebrochenen und reflektierten Röntgenstrahlen bekannt, so lassen sich für die darauffolgende Grenzfläche ebenfalls die Amplituden der reflektierten und gebrochenen Röntgenstrahlen berechnen. Trifft eine einfallende Welle E_{m-1}^0 mit dem Amplitudenfaktor a_{m-1} auf eine Grenzfläche, so erfolgt eine teilweise Reflexion und teilweise Brechung an der Grenzfläche der Medien $m-1$ und m . Nach der Reflexion von zuvor gebrochenen Strahlen an der Grenzfläche $m/m+1$ erfolgt ein Austritt der Welle E_m^0 aus der Schicht m mit dem Amplitudenfaktor a_m .

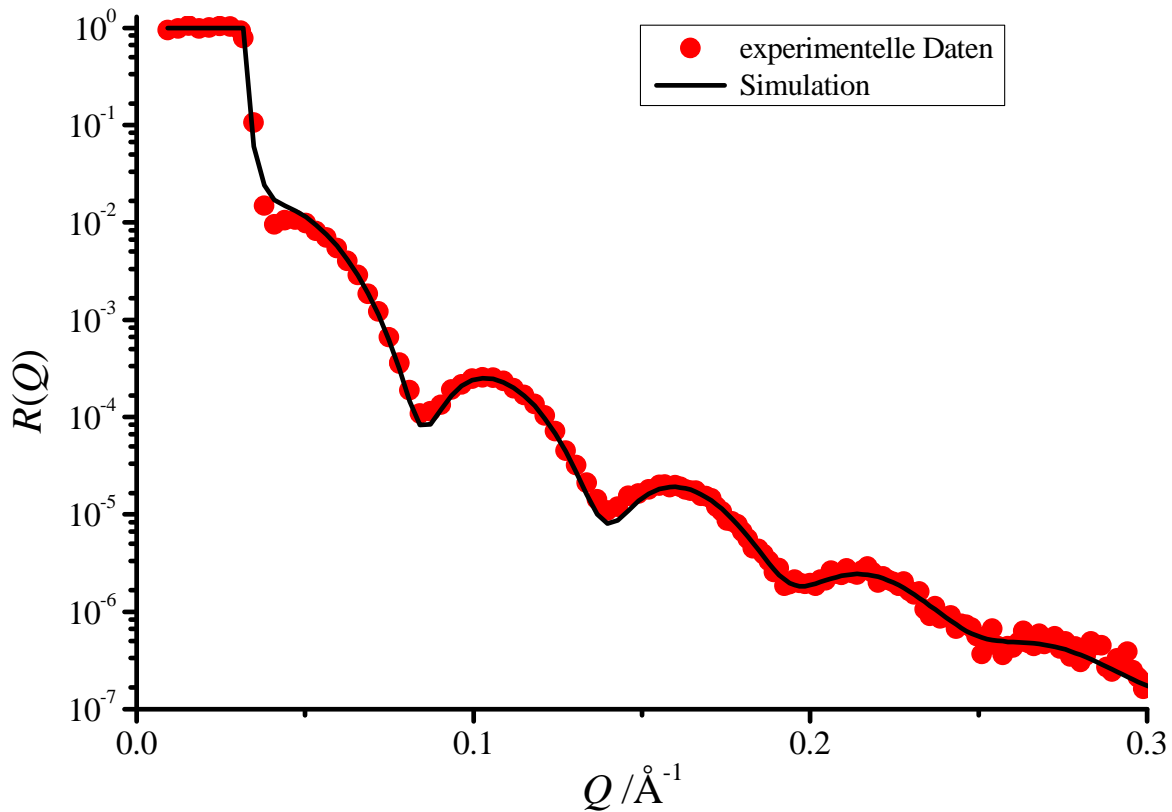


Abbildung 2.16. Reflektivitätskurve der Polyelektrolytmultischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₂ auf Silicium. Konstruktive bzw. destruktive Interferenzen der reflektierten Röntgenstrahlung führen zu Kiessig-Oszillationen. Mit Hilfe einer Kurvenanpassung lassen sich Schichtdicke, Elektronendichteprofil und Rauigkeit der PEM bestimmen.

Es resultiert die Interferenz der aus der Schicht m austretenden Welle mit der an der Grenzfläche $m-1/m$ reflektierten Welle. Die Amplitude der Welle in Schicht m kann wie folgt angegeben werden

$$a_m = \exp\left(-ik_{m-1}\sqrt{\sin^2\theta - 2\delta_m - 2i\beta_m}z\right) \quad (13)$$

mit $k_{m-1} = \frac{2\pi}{\lambda}$ und der Tiefenkoordinate z .¹⁴⁰ Vereinfachend wurde von Parratt für z ein konstanter Wert von einer halben Schichtdicke $d_m/2$ angenommen. Mit

$$f_m = \sqrt{\sin^2\theta - 2\delta_m - 2i\beta_m} \quad (14)$$

resultiert für den Amplitudenfaktor

$$a_m = \exp\left(-i \frac{\pi}{\lambda} f_m d_m\right). \quad (15)$$

Für den Fall, dass der elektrische Feldvektor E senkrecht zur Einfallsebene der Strahlung steht, resultiert eine Stetigkeit der Tangentialkomponente von E an der Grenzfläche aus der die Basisgleichung

$$a_{m-1} E_{m-1}^0 + \frac{E_{m-1}^R}{a_{m-1}} = \frac{E_m^0}{a_m} + a_m E_m^R \quad (16)$$

hervorgeht.¹³⁹

Eine andere Basisgleichung (17) geht aus der Stetigkeit der Tangentialkomponente des magnetischen Feldvektors H an der Grenzfläche hervor und wird beschrieben durch

$$\left(a_{m-1} E_{m-1}^0 - \frac{E_{m-1}^R}{a_{m-1}}\right) f_{m-1} \bar{k}_1 = \left(\frac{E_m^0}{a_m} + a_m E_m^R\right) f_m \bar{k}_1 \quad (17)$$

wobei \bar{k}_1 den Wellenvektor der Röntgenstrahlung im Luft oder Vakuum darstellt.

Aus den beiden Basisgleichungen (16) und (17) ergibt sich zur Berechnung des Reflexionsgrades E^R/E^0 folgende Rekursionsformel:¹³⁹

$$a_{m-1} \frac{E_{m-1}^R}{E_{m-1}^0} = a_{m-1} \frac{\frac{f_{m-1} - f_m}{f_{m-1} + f_m} + a_m \frac{E_m^R}{E_m^0}}{1 + a_m \frac{E_m^R}{E_m^0} \frac{f_{m-1} - f_m}{f_{m-1} + f_m}} \quad (18)$$

Voraussetzungen für den Parratt-Rekursionsalgorithmus sind Eingangsdaten wie die Anzahl der Schichten, die Schichtdicken aber auch die Streulängendichten. Unter der Annahme einer unendlich großen Schichtdicke des Substrats lassen sich nun für einen vorgegebenen Winkel der Amplitudenfaktor a_m und ein Wert für f_m zu jeder Schicht berechnen.

Die Rekursion beginnt mit einem vorgegebenen Winkel am Substrat und wird an den darauffolgenden Adsorbatgrenzflächen eines Multischichtsystems fortgeführt. Da die Schichtdicke für das Substrat als unendlich groß angesehen wird, gilt

$$a_m \frac{E_m^R}{E_m^0} = 0 \quad (19)$$

Durch Einsetzen in Gleichung (18) resultiert

$$a_{m-1} \frac{E_{m-1}^R}{E_{m-1}^0} = a_{m-1} \frac{f_{m-1} - f_m}{f_{m-1} + f_m}. \quad (20)$$

Durch wiederholtes Einsetzen in Gleichung (18) und der sukzessiven Verringerung der Laufzahl m erreicht man schließlich das Außenmedium Luft ($m = 1$) mit einem Brechungsindex von $n = 1$, da $\delta = \beta = 0$. Die Schichtdicke d_1 von Luft nimmt einen Wert von Null an, so dass $a_1 = 1$ resultiert. Die Rekursion endet mit

$$\frac{E_1^R}{E_1^0} = \frac{\frac{f_1 - f_2}{f_1 + f_2} + a_2 \frac{E_2^R}{E_2^0}}{1 + a_2 \frac{E_2^R}{E_2^0} \frac{f_1 - f_2}{f_1 + f_2}}. \quad (21)$$

Weiterhin gilt

$$R(Q) = \frac{I_R}{I_0} = \left| \frac{E_1^R}{E_1^0} \right|^2. \quad (22)$$

Aus der Wiederholung der Rekursionsschritte für alle Winkel des Messbereichs ergibt sich eine vollständige Reflektivitätskurve für die Schichtdicken d_m und die Streulängendichten ρ_m .

2.5.2 Grundlagen der Spektroskopie¹⁴⁶

Molekülspektroskopische Methoden, wie z.B. UV-Vis-, IR-, Raman- oder Fluoreszenzspektroskopie basieren alle auf der Wechselwirkung zwischen elektromagnetischer Strahlung und Materie. Dabei kann eine Reihe von Informationen über die untersuchte Materie, wie z.B. Konzentrationen, elektrische und magnetische Eigenschaften oder Bindungsstärken erhalten werden. Elektromagnetische Strahlung besteht aus einem periodisch oszillierenden elektrischen Feld, welches sich in eine bestimmte Richtung ausbreitet. Senkrecht zum elektrischen Feld verläuft ein oszillierendes magnetisches Feld mit der gleichen Frequenz. Mit einer konstanten Geschwindigkeit von $c_0 = 2.998 \cdot 10^8$ m/s im Vakuum ist die Energie E von Strahlung abhängig von seiner Wellenlänge und wird definiert durch

$$E = h \frac{c_0}{\lambda} = hc_0 \tilde{\nu} = h\nu. \quad (23)$$

Dabei ist h das Plancksche Wirkungsquantum ($h = 6.626 \cdot 10^{-34}$ Js), ν die Frequenz, λ die Wellenlänge und $\tilde{\nu}$ die Wellenzahl der Strahlung. In der UV/Vis- bzw. der Fluoreszenzspektroskopie wird häufig die Wellenlänge λ aufgetragen, in der IR- oder Raman-Spektroskopie hingegen wird die Wellenzahl $\tilde{\nu}$. Die Gesamtenergie E_{ges} von Molekülen setzt sich allgemein aus intramolekularen potentiellen, translatorischen, rotatorischen, vibronischen und elektronischen Anteilen zusammen. Für die Spektroskopie sind die ersten beiden Beiträge nicht relevant, da keine Änderung des elektrischen Dipolmoments hervorgerufen wird. Es gilt daher

$$E_{\text{ges}} = E_{\text{rot}} + E_{\text{vib}} + E_{\text{elec}}. \quad (24)$$

Wie es auch bei Strahlungsenergie der Fall ist, liegt die Energie von Molekülen gequantelt vor und existiert demnach nur in diskreten Niveaus. Innerhalb von elektronischen Zuständen eines Moleküls liegen viele unterschiedliche Schwingungsniveaus vor. Die Anregung von Schwingungszuständen benötigt eine deutlich geringere Energie als diejenige, die zur Anregung von elektronischen Zuständen aufgebracht werden muss. Innerhalb von Schwingungsniveaus liegen Rotationsniveaus. Wechselwirkungen zwischen elektromagnetischer Strahlung und Materie treten sowohl in Form von Absorption als auch in Form von Streuung auf. Ist die

Energie eines Photons zu gering, um ein Molekül in einen angeregten Zustand zu überführen, kann eine elastische Streuung erfolgen, d.h. seine Energie ändert sich nicht. Ist die Wellenlänge der gestreuten Strahlung in Bezug auf den Moleküldurchmesser groß, so liegt die sogenannte Rayleigh-Streuung vor. Bei einer inelastischen Streuung wird ein Teil der Energie des einfallenden Photons vom Molekül aufgenommen, so dass die Energie $h\nu'$ des gestreuten Photons geringer ist. Es gilt

$$h\nu' = h\nu - \Delta E, \quad (25)$$

dabei ist ΔE die von dem Molekül aufgenommene Energie. Auch der umgekehrte Fall, die Übertragung von Energie vom Molekül auf das Photon ist möglich. Die inelastische Streuung wird als Raman-Streuung bezeichnet. Ist die Energie des eingestrahlt Photons so groß wie die Ionisierungsenergie eines Moleküls, so tritt der sogenannte Photoeffekt auf, bei dem ein Elektron emittiert wird. Bei der sogenannten Compton-Streuung hingegen ist die Energie des eingestrahlt Photons größer als die Ionisierungsenergie eines Moleküls. Neben einem Elektron wird zusätzlich auch ein Photon emittiert.

Erfolgt eine Absorption von Licht durch Materie, wie z.B. durch Biomoleküle, so können Rückschlüsse auf bestimmte Eigenschaften, wie die Struktur oder die Konzentration, gezogen werden. Bei der Absorption von Strahlung resultiert ein Übergang aus einem niedrigen in ein höheres Energieniveau, wobei die Energiedifferenz ΔE des Übergangs derjenigen Energie $h\nu$ des eingestrahlt Photons entspricht. Elektronische Übergänge von Molekülen erfolgen durch Strahlung im ultravioletten bis sichtbaren Wellenlängenbereich von $\lambda = 200 - 800$ nm, wohingegen Übergänge von Schwingungsniveaus im infraroten Wellenlängenbereich von $\lambda = 1-100$ μm hervorgehen. Anregung von Molekülrotationen erfolgen bei $\lambda = 10^{-3}-1$ cm. Der Absorptionsprozess hängt von mehreren Faktoren ab. Zum einen gilt, dass Energieniveaus eines Moleküls sich quantenmechanisch aus der Lösung der Schrödinger-Gleichung ergeben. Zum anderen gilt, dass, abgesehen von der Raman-Spektroskopie, für jeden Übergang die Bohrsche Frequenzbedingung

$$h\nu = \Delta E \quad (26)$$

erfüllt sein muss, damit eine Absorption erfolgen kann. Weiterhin muss gelten, dass je nach Besetzung der Energieniveaus unterschiedliche Intensitäten für Spektrallinien resultieren. Die Besetzung der Energieniveaus erfolgt nach der Boltzmann-Verteilung. Die Besetzungszahl des i -ten Zustandes relativ zur Gesamtzahl an Molekülen ist definiert durch

$$\frac{N_i}{N} = \frac{g_i e^{-E_i/k_B T}}{\sum_i g_i e^{-E_i/k_B T}}. \quad (27)$$

Dabei stellt T die absolute Temperatur, k_B die Boltzmann-Konstante und g_i den Entartungsgrad des i -ten Energieniveaus E_i dar. Eine Anregung von Molekülen kann nur aus Zuständen heraus erfolgen, die besetzt sind. Quantenmechanische Auswahlregeln geben vor, ob eine Absorption überhaupt erfolgen kann und somit ein Übergang erlaubt ist. Das Übergangsdipolmoment $\vec{\mu}_{ag}$ muss vom Grundzustand g zum angeregten Zustand a von null verschieden sein. Es gilt:

$$\vec{\mu}_{ag} = \int \psi_a^* \hat{\mu}_{el} \psi_g dV \neq 0. \quad (28)$$

Dabei ist $\hat{\mu}_{el}$ der elektrische Dipolmomentoperator des Moleküls, ψ_g die Wellenfunktion des Grundzustands und ψ_a^* die konjugiert komplexe Wellenfunktion des angeregten Zustands. Integriert wird über das Volumenelement dV . Das bedeutet, dass ein Übergang auch nur dann erfolgen kann, wenn ein elektrisches Übergangsdipolmoment vorliegt. Aus Fermis Goldener Regel geht hervor, dass die Intensität eines Übergangs sowohl dem Quadrat der Amplitude des elektrischen Feldes E_0 sowie dem Quadrat des Übergangsdipolmoments $\vec{\mu}_{ag}$ proportional ist:

$$I \propto |\vec{\mu}_{ag}|^2 \cdot E_0^2 \quad (29)$$

Die Konzentration einer absorbierenden Substanz lässt sich durch das Lambert-Beersche Gesetz

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (30)$$

bestimmen, wenn die Konzentration des Analyts relativ gering ist. Bei höheren Konzentrationen können intermolekulare Wechselwirkungen auftreten, die zu Änderungen der Absorptionseigenschaften führen. Dabei ist A die Extinktion, I_0 die Intensität des eingestrahnten Lichts, I die Intensität des nach dem Probendurchtritt verbleibenden Lichts, ε der dekadische Extinktionskoeffizient, d die Durchstrahlstärke und c die Konzentration der Probe.

2.5.3 ATR-FTIR-Spektroskopie

2.5.3.1 Grundlagen der IR-Spektroskopie¹⁴⁶

Die IR-Spektroskopie umfasst im elektromagnetischen Spektrum im Wesentlichen den Wellenlängenbereich zwischen etwa 1 und 1000 μm . Das Schwingungsspektrum wird in drei Teilbereiche eingeteilt. Im nahen Infrarot (NIR), welcher im Bereich von $\lambda = 780 \text{ nm} - 3 \mu\text{m}$ liegt, treten hauptsächlich Oberschwingungen auf. Im *mittleren Infrarot* (MIR), welches im Bereich von $\lambda = 3 - 50 \mu\text{m}$ liegt, treten Grundschiebungen auf. Bei Wellenlängen von $\lambda = 50 - 1000 \mu\text{m}$ liegen im fernen *Infrarot* (FIR) Gerüstschwingungen vor. Die Schwingungsbewegung eines zweiatomigen Moleküls kann zum Beispiel mit Hilfe des quantenmechanischen Modells, dem harmonischen Oszillators, beschrieben werden. Aus der Schrödinger-Gleichung resultieren Energieeigenwerte für ein solches zweiatomiges System. Die Energieeigenwerte E_{harm} der Schwingung sind definiert als

$$E_{\text{harm}} = h\nu_h \left(\nu + \frac{1}{2} \right) \quad (31)$$

mit der Schwingungsquantenzahl $\nu = 0, 1, 2, \dots$ und der Eigenfrequenz $\nu_h = (1/2\pi)\sqrt{k/\mu}$ der Schwingung. μ ist dabei die reduzierte Masse des Moleküls und k stellt die Kraftkonstante als ein Maß für die Stärke der chemischen Bindung dar. Für die Nullpunktsenergie gilt $\nu = 0$. Die Voraussetzung für infrarotaktive Molekülschwingungen ist die Änderung des elektrischen Dipolmoments während des Schwingungsvorgangs um eine Gleichgewichtslage $\xi = \xi_0 = 0$:

$$\left(\frac{\partial \bar{\mu}_{el}}{\partial \xi} \right)_0 \neq 0 \quad (32)$$

Homonukleare zweiatomige Moleküle weisen demnach kein Schwingungsabsorptionsspektrum auf. Da die Energieniveaus E_{harm} äquidistant sind und nur Übergänge zwischen benachbarten Niveaus erlaubt sind, kann nach diesem Modell nur eine einzige Strahlungsfrequenz absorbiert werden. Der anharmonische Oszillator, welcher durch das sogenannte Morse-Potential beschrieben wird, weist zum einen nicht äquidistante Energieniveaus auf und zum anderen wird die Möglichkeit der Dissoziation berücksichtigt. Die Energieniveaus sind definiert durch

$$E_{\text{anharmon}} = h\nu_a \left(v + \frac{1}{2} \right) - h\nu_a x \left(v + \frac{1}{2} \right)^2, \quad (33)$$

dabei sind ν_a die Schwingungsfrequenz, x eine dimensionslose Anharmonizitätskonstante und $v = 0, 1, 2, \dots, v_{\text{max}}$ die Schwingungsquantenzahl. Der abstoßende Potentialast des anharmonischen Oszillators verläuft steiler als derjenige des harmonischen Oszillators und beschreibt die Pauli-Repulsion, nach der sich Atome nicht beliebig nahe kommen können (siehe Abbildung 2.17). Große Werte für ν_a resultieren in einer zunehmenden Auslenkung der Atome aus der Gleichgewichtslage und eine kleinere Wellenzahl. Bei v_{max} erfolgt eine Dissoziation des Moleküls. Da spektrale Übergänge mit $\Delta v = \pm 1, \pm 2, \dots$ erfolgen können, sind zusätzlich auch Oberschwingungen möglich.

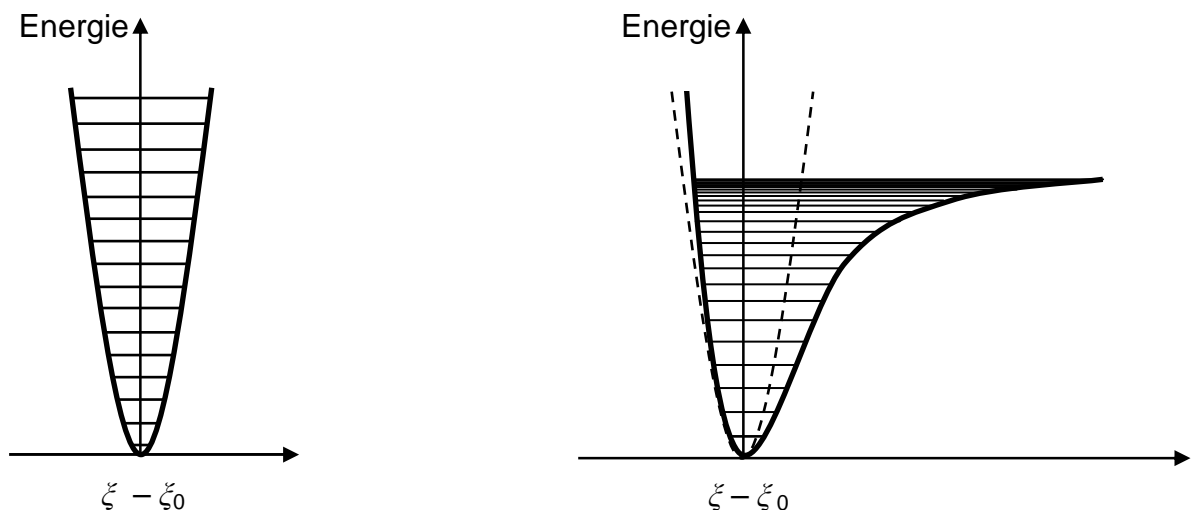


Abbildung 2.17. Harmonischer (links) und anharmonischer Oszillator (rechts). Beim anharmonischen Oszillator weist der Potentialverlauf als Funktion der Auslenkung $\xi - \xi_0$ aus der Ruhelage ξ_0 einen steileren Potentialast und eine Dissoziation auf im Vergleich zum harmonischen Oszillator (rechts, gestrichelt). Die diskreten Schwingungsniveaus sind als horizontale Linien dargestellt.

Mehratomige Moleküle weisen ein kompliziertes Schwingungsverhalten auf. Aus diesem Grund wurden Normalschwingungen eingeführt, die jeweils eine gekoppelte synchrone Bewegung von Atomen oder Atomgruppen darstellen, ohne dass gleichzeitig eine andere Normalschwingung angeregt wird. Durch eine Linearkombination der Normalschwingungen kann die Gesamtschwingungsbewegung eines Moleküls bestimmt werden. Die Anzahl der

Normalschwingungen eines linearen Moleküls ergibt sich zu $3N-5$, die eines nichtlinearen Moleküls zu $3N-6$.

2.5.3.2 IR-Spektroskopie an Proteinen¹⁴⁷

Die Bewegungsmuster in Makromolekülen wie z.B. Proteinen sind sehr komplex und die große Anzahl der Normalschwingungen lässt eine sinnvolle Analyse einzelner Schwingungsmodi als unmöglich erscheinen. Jedoch ist es möglich, bestimmte Gruppen in Proteinmolekülen charakteristischen Gruppenfrequenzen zuzuordnen. Die in Proteinen beobachteten Schwingungen sind im Wesentlichen auf Schwingungen des Peptidrückgrats zurückzuführen. Die Schwingungen des Peptidrückgrats lässt sich durch die Modellverbindung N-Methylacetamid (NMA) beschreiben (siehe Abbildung 2.18):¹⁴⁸

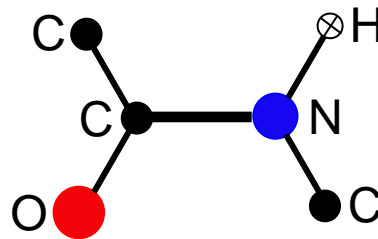


Abbildung 2.18. N-Methylacetamid zur Beschreibung des Peptidrückgrats.

Für das NMA-Molekül ergeben sich nach der Normalkoordinatenanalyse neun Schwingungsbanden, unter anderem die Amid-I-Bande ($\tilde{\nu} = 1650 \text{ cm}^{-1}$) sowie die Amid-II-Bande ($\tilde{\nu} = 1550 \text{ cm}^{-1}$). Die Wellenzahlenbereiche und die Hauptbeiträge der Amid-Gruppenschwingungen von NMA sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Die Amid-I-Bande setzt sich aus den Carbonylschwingungen des Peptidrückgrats (83%), sowie CCN-Deformationsschwingungen und CN-Streckschwingungen zusammen. Diese Bande wird bei der Analyse von Sekundärstrukturen herangezogen, da die Stärke von Wasserstoffbrückenbindungen in Proteinen ihre Lage signifikant beeinflusst. Da in Sekundärstrukturelementen, wie z.B. α -Helices, β -Faltblätter, die H-Brückenbindungen unterschiedlich stark sind, korreliert die Lage der Amid-I-Bande mit der vorliegenden Sekundärstruktur. Die Amid-II-Bande setzt sich aus der NH-Biegeschwingung und der CN-Streckschwingung (zwischen 1580 und 1510 cm^{-1}) zusammen.

Tabelle 2.1. Amid-Gruppenschwingungen in Proteinen (s: Streckschwingung, d: Deformationschwingung, be: Biegeschwingung in der Ebene, ba: Biegeschwingung, t: Torsionschwingung)¹⁴⁹

| Bande | $\tilde{\nu}$ / cm^{-1} | Hauptbeiträge |
|----------|----------------------------------|-------------------------------------|
| Amid A | 3300 | N–H s |
| Amid B | 3100 | Oberton Amid II |
| Amid I | 1600-1690 | C=O s, C–N s, C–C–N d |
| Amid II | 1480-1575 | N–H be, C–H s, C=O be, C–C s, N–C s |
| Amid III | 1229-1301 | C–N s, N–H be, C–C s, C=O be |
| Amid IV | 625-767 | C=O be, C–C s, C–N–C d |
| Amid V | 640-800 | N–H ba, C–N t |
| Amid VI | 537-606 | C=O ba, C–N t |
| Amid VII | 200 | N–H ba, C–N t, C=O ba |

Wird D₂O als Lösungsmittel verwendet, so werden die Banden als Amid-I' bzw. Amid-II' bezeichnet. In Gegenwart von D₂O kommt es zu einem H/D-Austausch und die NH-Biegeschwingung verliert an Intensität zu Gunsten der ND-Biegeschwingung, die bei tieferen Wellenzahlen absorbiert. Die Amid-I-Bande bleibt von dem Austausch relativ unbeeinflusst. Proteine weisen also aufgrund ihrer Amid-Bindungen Schwingungsgruppen für unterschiedliche Sekundärstrukturen auf. In Tabelle 2.2 ist die Zuordnung der Wellenzahlen der Amid-I'-Bande zu verschiedenen Sekundärstrukturen dargestellt.

Tabelle 2.2. Sekundärstrukturen und zugehörige Wellenzahlen der Amid-I'-Bande¹⁴⁹⁻¹⁵¹

| Sekundärstruktur | $\tilde{\nu}$ Amid-I'-Schwingung / cm^{-1} |
|--|---|
| β -Faltblatt, exponierte β -Strangstrukturen | 1675 - 1695 |
| Schleifenstrukturen (β und γ -turn) | 1660 - 1690 |
| α -Helix | 1650 - 1658 |
| ungeordnete Strukturen | 1640 - 1650 |
| β -Faltblatt | 1625 - 1640 |
| exponierte β -Strangstrukturen | 1615 - 1628 |

2.5.3.3 Funktionsweise eines FTIR-Spektrometers¹⁵²

In der gewöhnlichen IR-Spektroskopie wird mit einem dispersiven Element jede Wellenlänge sequentiell ausgeblendet und vermessen.¹⁴⁷ In der Fourier-Transform-Infrarot (FTIR)-Spektroskopie wird der gesamte zu untersuchende Bereich gleichzeitig detektiert. Nach

Modulation aller Wellenlängen mit einer charakteristischen Frequenz erreichen diese den Detektor zur selben Zeit. Der entscheidende Bestandteil eines FTIR-Spektrometers, welcher diese Art der Detektion erst ermöglicht, ist das Michelson-Interferometer. Abbildung 2.19 zeigt den schematischen Aufbau. Das Interferometer setzt sich aus drei Hauptbestandteilen zusammen. Zum einen liegt ein halbdurchlässiger Strahlteiler vor, um den Strahl der Lichtquelle im rechten Winkel aufzuspalten. Zum anderen ist ein fester Spiegel vorhanden, der den Teilstrahl zum Strahlteiler hin zurückreflektiert. Weiterhin führt ein im 90° - Winkel zum festen Spiegel angeordneter beweglicher Spiegel zur Reflexion des anderen Teilstrahls. Ist der Abstand von beweglichem Spiegel und festem Spiegel zum Strahlenteiler gleich, so beträgt die optische Wegdifferenz Δx null.

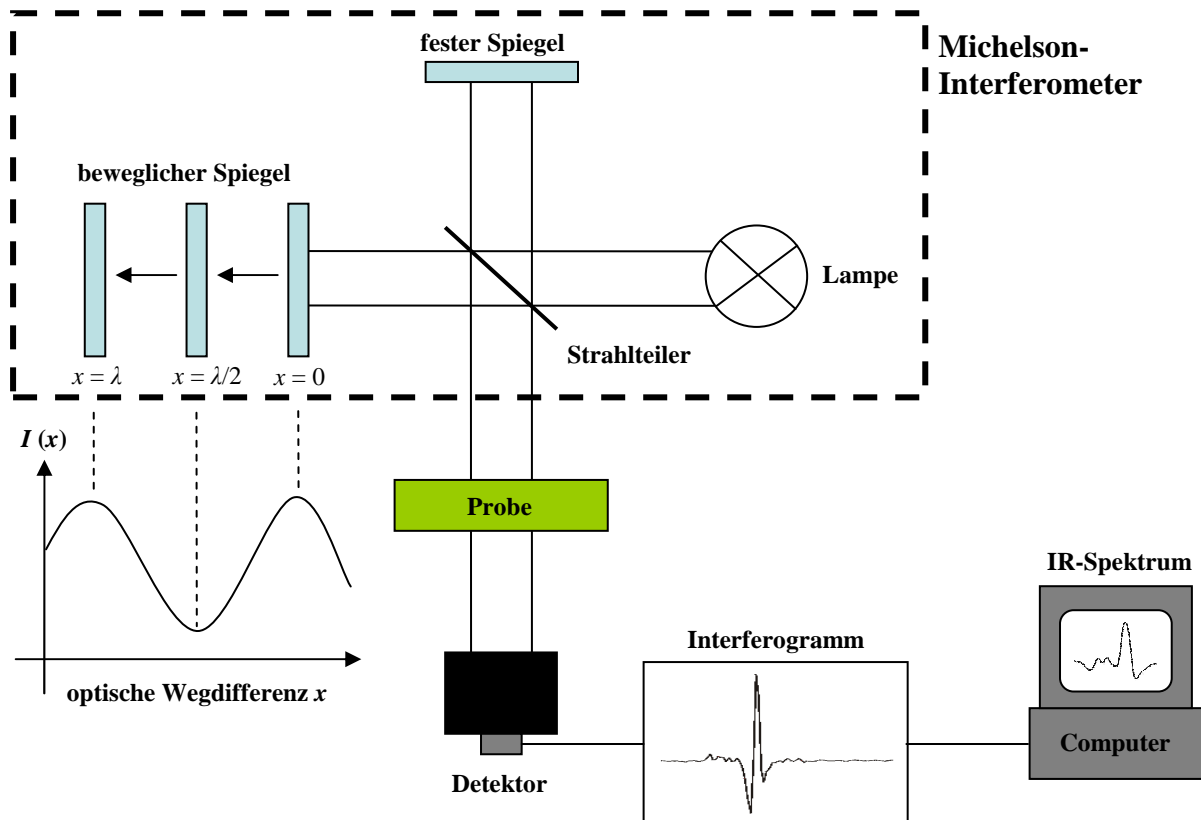


Abbildung 2.19. Schematische Darstellung eines FTIR-Spektrometers mit Michelson-Interferometer.

Dies hat zur Folge, dass beide Teilstrahlen am Strahlteiler konstruktiv interferieren und somit die Intensität des austretenden Strahls maximal wird. Ist $\Delta x \neq n\lambda$ mit $n = 0, 1, 2, \dots$ befinden sich die Teilstrahlen nicht in Phase, es kommt zu destruktiver Interferenz, die zu einer Intensitätsverminderung führt.

Man erhält einen cosinusförmigen Intensitätsverlauf welcher durch folgende Gleichung beschrieben wird:

$$I(x) = \int_0^{\infty} 2I_0(\tilde{\nu})R(\tilde{\nu})T(\tilde{\nu})[1 + \cos(2\pi\tilde{\nu}x)]d\tilde{\nu} \quad (34)$$

Hierbei sind R die Reflexion und T die Transmission. Für den Intensitätsverlauf ergibt sich folgende Interferogramm-Funktion $F(x)$:

$$F(x) = I(x) - I(\infty) = \int_0^{\infty} A(\tilde{\nu}) \cos(2\pi\tilde{\nu}x) d\tilde{\nu} \quad (35)$$

Das gemessene Interferogramm wird fouriertransformiert, was die spektralen Intensitäten $A(\tilde{\nu})$ liefert:

$$A(\tilde{\nu}) = 2 \int_{-\infty}^{+\infty} F(x) \cos(2\pi\tilde{\nu}x) dx \quad (36)$$

2.5.3.4 Fourier-Self-Deconvolution (FSD) und zweite Ableitung

Durch systematische Verfälschung des eigentlichen Proteinspektrums und durch das Rauschen können die Banden der einzelnen Sekundärstrukturelemente nicht spektral aufgelöst werden. Aus diesem Grund ist für ein zu untersuchendes Protein nur noch eine gemeinsame breite Bande sichtbar, welche sich als Summe aller Subbanden ergibt. Die aus der Datenbehandlung entstehenden Fehler werden durch die Filterfunktion $G(\tilde{\nu})$ ausgedrückt, welche eine Instrumentenfunktion beinhaltet. Das gemessene Spektrum $A(\tilde{\nu})$ wird durch eine mathematische Faltung (*) eines theoretischen Spektrums $A_v(\tilde{\nu})$ mit der Filterfunktion repräsentiert.¹⁵³

$$A(\tilde{\nu}) = G(\tilde{\nu}) * A_v(\tilde{\nu}) \quad (37)$$

Allgemein resultiert ein Spektrum aus der Fouriertransformation $F\{ \}$ eines Interferogramms.

$$A(\tilde{\nu}) = F\{F(x)\} \Leftrightarrow F(x) = F^{-1}\{A(\tilde{\nu})\} \quad (38)$$

Aus Gleichung (37) und (38) ergibt sich für die inverse Fouriertransformation $F^{-1}\{ \}$ folgender Zusammenhang:

$$F(x) = F^{-1}\{G(\tilde{\nu})\} \cdot F_v(x) \Leftrightarrow F_v(x) = F(x) \cdot \frac{1}{F^{-1}\{G(\tilde{\nu})\}} \quad (39)$$

Durch die Fouriertransformation des theoretischen Interferogramms $F_\nu(x)$ ergibt sich analog zu Gleichung (38) das entfaltete Spektrum $A_\nu(\tilde{\nu})$:

$$A_\nu(\tilde{\nu}) = F\{F_\nu(x)\} \quad (40)$$

Mit Hilfe der *Fourier-Self-Deconvolution* können mit Hilfe der Faltungsfunktion instrumentelle Fehler korrigiert werden, so dass die einzelnen Banden der Sekundärstrukturelemente aufgelöst werden können.

Neben der *Fourier-Self-Deconvolution* können durch Bildung der zweiten Ableitung der Amid-I-Bande die einzelnen Banden der Sekundärstrukturelemente aufgelöst werden. Die Bandposition ergibt sich als Lage der Minima dieses Ableitungsspektrum.¹⁵⁴

Die Anpassung von Banden verschiedener Sekundärstrukturelemente an ein gemessenes Spektrum $A(\tilde{\nu})$ erfolgt mittels FSD und der zweiten Ableitung. Hieraus werden die Startpositionen der Banden ermittelt. Liegen übereinstimmende Ergebnisse bezüglich der Bandenposition aus der FSD und der zweiten Ableitung vor, so können die Anteile der Sekundärstrukturelemente mit hoher Genauigkeit bestimmt werden. Die aus den beiden Methoden ermittelten Bandenpositionen sollten jedoch bei dem Anpassungsvorgang nicht mehr als 2 cm^{-1} variieren. Die Anpassungen der Subbanden erfolgt zum Beispiel anhand einer gemischten Gauß-Lorentzfunktion.¹⁵⁵ Nach der Anpassung können durch Integration der einzelnen Banden die relativen Anteile der Sekundärstrukturelemente bezüglich des Gesamtspektrums abgeschätzt werden.

2.5.3.5 Schematischer Aufbau von ATR-FTIR-Messapparaturen¹⁵²

Mit der Methode der *Attenuated Total Reflection* (ATR) kann die IR-Absorption von Proben an festen Grenzflächen untersucht werden. Anders als bei Proben in Lösungen wird nicht die Transmission gemessen, sondern es erfolgt eine mehrfache Totalreflexion eines Lichtstrahls in einem Kristall mit einem relativ hohen Brechungsindex. Bei den internen Reflexionselementen (IRE), handelt es sich z.B. um Silicium, Germanium oder Zinkselenid. Innerhalb eines Kristalls erfolgt bei einem Einfallswinkel θ_1 , welcher den kritischen Winkel θ_c überschreitet, eine Totalreflexion mit

$$\theta_c = \sin^{-1}\left(\frac{n_2}{n_1}\right). \quad (41)$$

Dabei ist n_1 der Brechungsindex des optisch dichteren internen Reflexionselements und n_2 der Brechungsindex des optisch dünneren Adsorbats. Z.B. liegt für Germanium ein Brechungsindex von 4.0 und für Silicium ein Wert von 3.4 vor. Der Lichtstrahl wird so abgelenkt, dass er in den trapezförmigen Kristall senkrecht eintritt, 20 bis 30mal totalreflektiert wird und anschließend nach dem Austreten zum Detektor gelangt (siehe Abbildung 2.20).¹⁵² Bei jeder Totalreflexion entsteht an der Grenzfläche eine evaneszente Welle, welche bis zu etwa $5\ \mu\text{m}$ weit in die Probe reicht und absorbiert werden kann (nähere Details zur Totalreflexion siehe Punkt 2.3.4). Folglich wird die IR-Strahlung abgeschwächt. Die Abschwächung des Lichtstrahls wird analog zu einem Transmissionsspektrum detektiert und weiterverarbeitet.

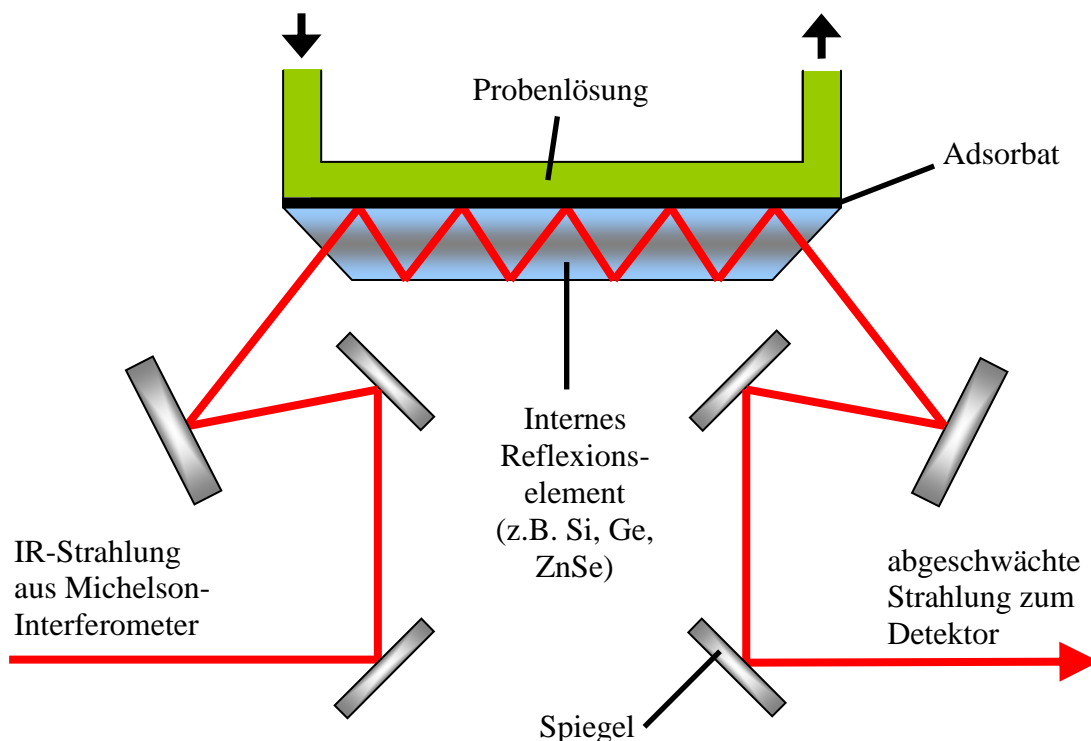


Abbildung 2.20. Schematischer Aufbau einer ATR-FTIR-Messanordnung zur Untersuchung von Adsorbaten.

2.5.4 Hochdruck-TIRF-Spektroskopie¹⁵⁶

Die *Total Internal Reflection Fluorescence* (TIRF)-Spektroskopie stellt eine häufig angewandte grenzflächensensitive Methode zur Charakterisierung der Struktur und Dynamik von Molekülen an einer flüssig-festen Grenzfläche dar.^{82,157} Während bei der konventionellen Fluoreszenzspektroskopie fluoreszierende Moleküle direkt mit UV- oder sichtbarem Licht

angeregt werden, wird bei der TIRF-Spektroskopie das Anregungslicht nicht in die Probenlösung geleitet, sondern in einem optischen Prisma, welches einen größeren Brechungsindex als die Probenlösung aufweist ($n_1 > n_2$), intern totalreflektiert. Eine Totalreflexion erfolgt immer dann, wenn der Einfallswinkel θ_1 des Anregungslichts den kritischen Winkels θ_c überschreitet (mit dem Winkel relativ zur Grenzfläche gilt $n_1 \cos \theta_c = n_2$). Erfolgt eine Totalreflexion, so entsteht eine evaneszente Welle, welche sich in die Richtung der Grenzflächennormalen ausbreitet. Die Amplitude des elektrischen Felds der evaneszenten Welle kann durch einen exponentiellen Abfall

$$E(z) = E_0 \exp(-z/d) \quad (42)$$

beschrieben werden. Dabei stellt z den Abstand zur Grenzfläche und d die Eindringtiefe der evaneszenten Welle dar, welche durch

$$d = \frac{\lambda}{2\pi \sqrt{n_1^2 \cos^2 \theta_1 - n_2^2}} \quad (43)$$

definiert ist. Hierbei ist λ die Anregungswellenlänge und θ_1 der Winkel des Anregungslichts relativ zur Grenzfläche. Beispielsweise hat bei $\lambda = 284$ nm, $n_1 = 1.496$, $n_2 = 1.353$ und $\theta_1 = 20^\circ$ der kritischen Winkel einen Wert von $\theta_c = 25^\circ$ und die Eindringtiefe einen Wert von $d = 118$ nm. Demnach eignet sich diese Methode um nur grenzflächennahe Fluorophore anzuregen. Diese räumliche Auflösung kann z.B. in Adsorptionsstudien genutzt werden, da die Intensität der an der Grenzfläche gebundenen Fluorophore deutlich größer ist als derjenigen in Lösung. Insbesondere eignet sich diese Methode zur Untersuchung von biologischen Systemen wie Proteinadsorbate und Lipidmembranen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Hochdruck-TIRF-Apparatur aufgebaut. Durch die Anwendung hoher hydrostatischer Drücke auf adsorbierte Biomoleküle lassen sich Adsorptionsvolumina sowie der Adsorptionsgrad bestimmen. Die Untersuchung von grenzflächennahen Biomolekülen unter Drücken von bis zu 2500 bar wurde mit einer Hochdruck-TIRF-Zelle durchgeführt (siehe Abbildung 2.21). Dieser hohe Druckbereich ist notwendig um Volumeneffekte biologischer Systeme untersuchen zu können. Die Hochdruck-TIRF-Zelle besteht aus einem äußeren Druckbehälter und einer Probenküvette. Letztere wurde im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelt. Durch diese Probenküvette ist die Probenlösung von

dem flüssigen Druckmedium komplett separiert, so dass zum einen nur eine relativ geringe Menge an Probenvolumen von 0.6 cm³ benötigt wird und zum anderen keine Verschmutzung der inneren Wände der Druckzelle erfolgt. Die zu untersuchende Grenzfläche, d.h. diejenige zwischen dem Prisma und der Probenlösung, weist eine Fläche von 1.5 cm² auf. Ein Druck von mindestens 2500 bar kann bei einer konstanten Temperatur im Bereich von 0-80 °C konstant gehalten werden.

Die äußere zylindrische Druckkammer besteht aus einer Nimonic 90 – Legierung, welche gehärtet und vergütet wurde. Nimonic 90 weist eine hohe 0.2% - Dehngrenze von $\sigma_{0.2} = 745 \text{ N mm}^{-2} = 7450 \text{ bar}$ bis zu einer Temperatur von 200 °C auf. Das bedeutet, dass bei einem Druck von 7450 bar eine permanente Verformung der Legierung von 0.2 % vorliegt. Nimonic 90 ist auch bei höheren Temperaturen korrosions- und oxidationsresistent. Der maximale Druck, der innerhalb einer zylindrischen Zelle herrschen kann, wird über den folgenden Ausdruck¹⁵⁸

$$p = \frac{u^2 - 1}{\sqrt{3}u^2} \sigma_{0.2} \quad (44)$$

abgeschätzt. Hierbei stellt $u = r_o/r_i$ das Verhältnis des Außen- zum Innenradius dar. Bei einer Wand mit unendlicher Dicke ($u \rightarrow \infty$) ergibt sich ein maximaler Grenzdruck von $p = \sigma_{0.2} / \sqrt{3} = 4301 \text{ bar}$ für die Zelle auf. Bei dem hier vorliegendem Verhältnis von $u = 60 \text{ mm}/10 \text{ mm} = 6$ ergibt sich ein Maximaldruck $p = 4181 \text{ bar}$ in der Nähe des maximalen Grenzdrucks. Innerhalb der Bohrung mit einem Radius von 10 mm wird die Küvette inklusive Prisma eingefügt. Der Außenradius von 60 mm limitiert das Gesamtgewicht des Metallgefäßes auf einen angemessenen Wert. Wird ein Sicherheitsfaktor von 1.5 angewandt, so liegt der berechnete Maximaldruck bei einem Wert von 2787 bar. Zur Bestimmung des Berstdrucks dieser Hochdruckzelle kann der Ausdruck von Faupel verwendet werden:¹⁵⁸

$$p_{\text{burst}} = \frac{2}{\sqrt{3}} \sigma_{0.2} \left(2 - \frac{\sigma_{0.2}}{\sigma_{\text{ult}}} \right) \ln u \quad (45)$$

Hierbei ist σ_{ult} die Zugfestigkeit. Für Nimonic 90 ergibt sich für eine Temperatur von unter 500 °C und einer Zugfestigkeit von $\sigma_{\text{ult}} \approx 11 \text{ kbar}$ ein Berstdruck von mehr als 20 kbar. Die

Abdichtung wird über O-Ringe aus Fluorkautschuk mit einer Härte von 90 Shore A gewährleistet. In axialer Position weist die obere Schraube eine zentrale Bohrung auf, welche einen Adapter umschließt, der mit einer Metallkapillare verbunden ist. Diese überträgt den mit einer Handspindelpresse generierten Druck auf das Zellinnere. Die untere Schraube dient zur Fixierung eines metallischen Blindfensters, welches zur Reinigung der Hochdruckzelle leicht entfernt werden kann. In radialer Position sind drei Schrauben mit einer jeweils zentralen konischen Bohrung innerhalb der Reflexions- und Detektionsebene angebracht.

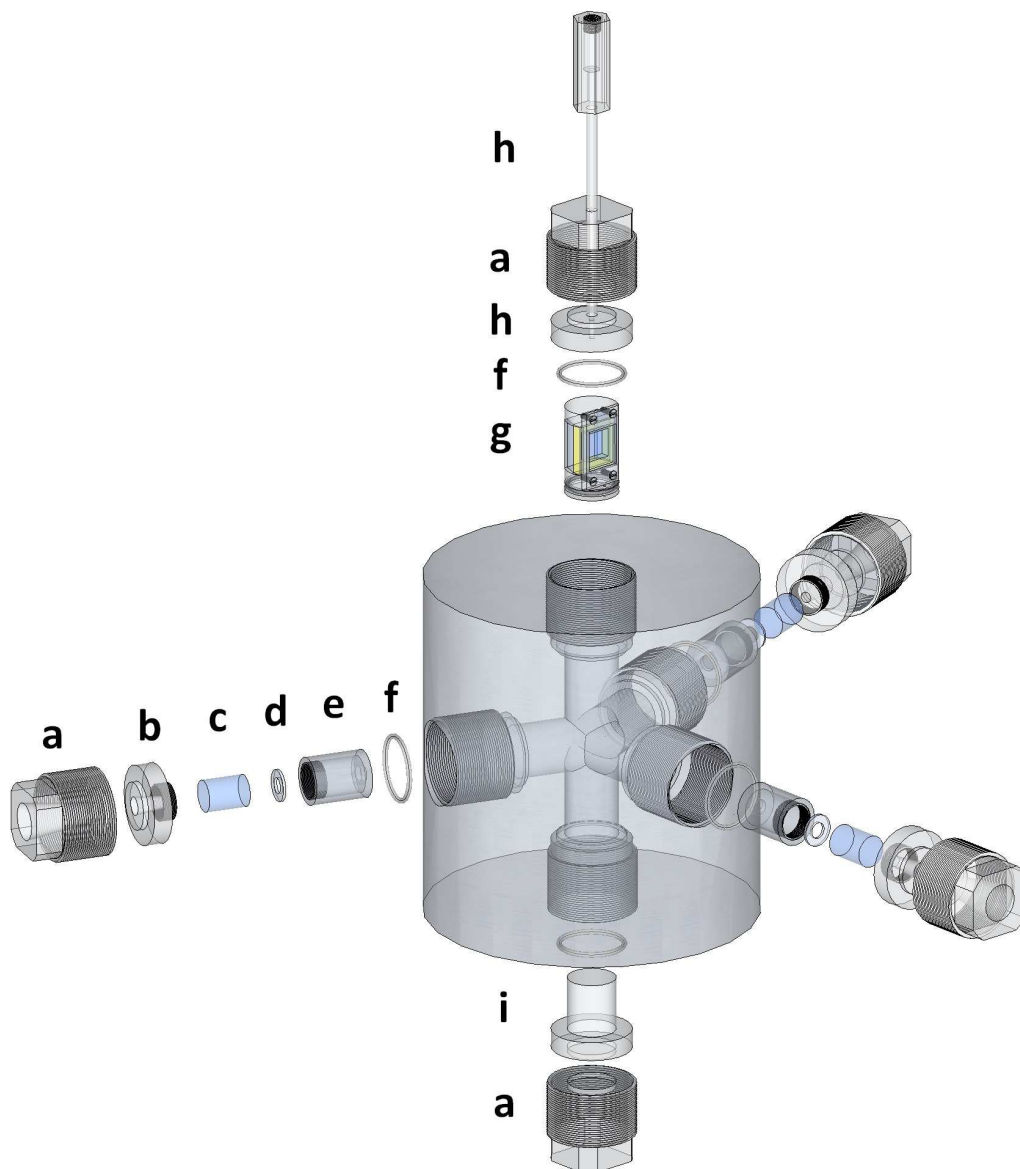


Abbildung 2.21. Explosionsdarstellung der Hochdruck-TIRF-Zelle. (a, Schraube; b, Metallauflage; c, Floatglas; d, Teflonring; e, Metallkappe; f, O-Ring; g, innere Probenküvette; h, Metallkapillare; i, Blindfenster).¹⁵⁶

Die Schrauben in radialer Position dienen jeweils zur Fixierung einer sandwichartigen Assemblierung bestehend aus einer Metallaufgabe, einer Indiumfolie, einem Floatglaszylinder, einer Teflonscheibe und einer Schraubekappe. Außer des Floatglases besitzen die zuvor genannten Komponenten alle eine zentrale Bohrung. Die Indiumfolie dient als Polster zwischen der Metallaufgabe und dem Floatglas. Das Floatglas kann durch Quarzglas ersetzt werden, wenn UV-Licht in einem Experiment benötigt wird. Floatglas hat jedoch den Vorteil, dass es nur einen geringen druckabhängigen Effekt auf den Grad der Polarisation des Lichts aufweist, was für Fluoreszenzanisotropiemessungen notwendig ist.¹⁵⁹ Das Floatglas wird mit Hilfe einer Teflonscheibe geschützt, bevor es mit der Schraubekappe fixiert wird. Wird Druck im Innern der Hochdruckzelle generiert, so werden die Floatglaszylinder gegen die Metallaufgaben gepresst, was zu einer Abdichtung der Zelle führt. Das erste Fenster dient als Einlass für das Anregungslicht, das zweite dient als Austritt des totalreflektierten Lichts und das dritte als Austritt des Fluoreszenzlichts, welches anschließend zum Detektor weitergeleitet wird.

Der Entwurf einer inneren Probenküvette (siehe Abbildung 2.22) hat zum einen den Vorteil, dass nur ein kleines Probenvolumen benötigt wird und zum anderen die Probenlösung von dem umgebenden Druckmedium separiert und der Innenraum der Hochdruckzelle nicht verschmutzt wird. Die innere Probenküvette wird sandwichartig aufgebaut und besteht aus einer Metallhalterung, einem Quarzprisma, einer Gummimanschette (Gasket), einer Quarzglasplatte und einem Metallrahmen. Die Metallhalterung passt mit einem Durchmesser von 20 mm exakt in die innere Bohrung des äußeren Druckbehälters.

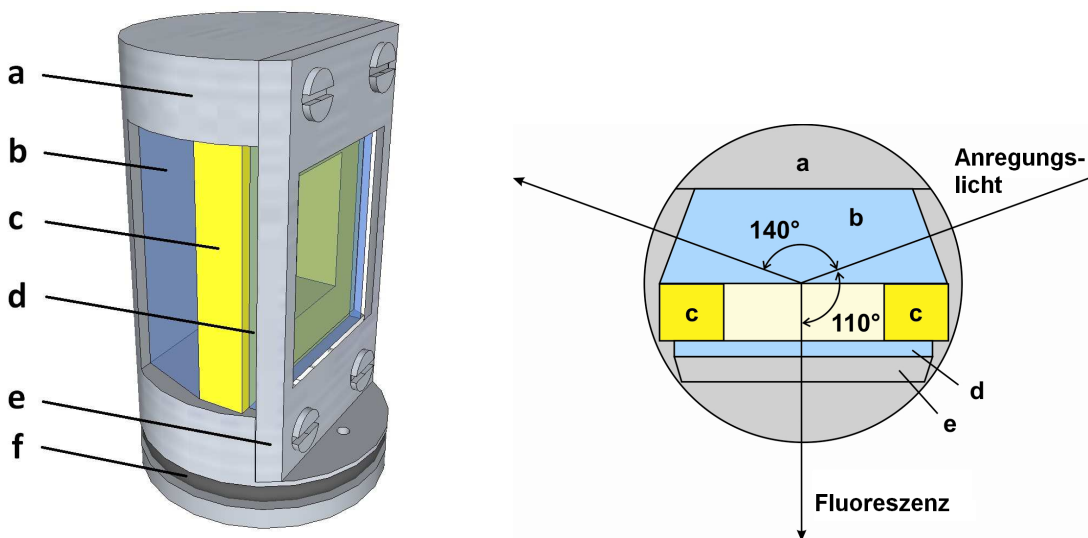


Abbildung 2.22. Perspektivische Darstellung (links) und Querschnitt (rechts) der inneren Probenküvette. (a, Metallhalterung; b, Quarzprisma; c, Gummimanschette; d, Quarzglasplatte; e, Metallrahmen; f, O-Ring). Die Probenlösung befindet sich innerhalb der Gummimanschette zwischen Quarzprisma und Quarzglasplatte. Nach Referenz 156.

Am unteren Ende der Metallhalterung sorgt ein O-Ring für eine größere Reibung zur inneren Wand des Druckbehälters. Diese ist notwendig, da sich die Ausrichtung der Probenküvette während einer längeren Fluoreszenzdruckmessung nicht ändern darf. Das verwendete Prisma ist ein Dove-Prisma und weist eine Dicke von 6 mm und jeweils um 70° geneigten Seitenflächen auf. Die Probenlösung befindet sich innerhalb der 4 mm dicken Gummimanschette und steht mit dem Quarzprisma in direktem Kontakt. Das Volumen der Probenkammer beträgt 0.6 cm^3 . Das Innere der Gummimanschette wird von dem Quarzprisma und dem gegenüberliegenden Quarzglasplättchen abgedichtet. Dieser sandwichartige Komplex aus dem Quarzprisma, der Gummimanschette und Quarzglasplatte wird über einen Metallrahmen mit Hilfe von vier Schrauben in der Metallhalterung fixiert. Aufgrund ihrer hohen Flexibilität erfolgt die Druckübertragung aus dem Druckmedium in die Probenlösung und auf die zu untersuchende Grenzfläche über die Gummimanschette. Ein weiterer Vorteil der Probenküvette ist, dass Proben innerhalb von Minuten ausgetauscht werden können, wenn eine identische zweite Probenküvette vorhanden ist. So kann eine zweite Probe präpariert und, falls nötig, für längere Zeit auch außerhalb der Hochdruckzelle äquilibriert werden. Eine häufige Säuberung des Innenraums der Hochdruckzelle ist somit nicht notwendig.

Zur Aufnahme von Hochdruck-TIRF-Daten wurde die Hochdruckzelle in einem konventionellen Fluoreszenzspektrometer (K2 Fluorometer der Firma ISS) eingebunden. Das Gerät arbeitet im *photon-counting mode* und verwendet eine Xe-Bogenlampe als Lichtquelle. Fluoreszenzlicht wird normalerweise senkrecht zum Anregungslicht detektiert. In der Hochdruck-TIRF-Zelle jedoch liegt ein Winkel von 110° zwischen dem Anregungsstrahl und dem Austritt des Emissionslichts vor. Um diese Abweichung zu korrigieren, wurde die Sammellinse des Fluoreszenzlichts von 90° zu 110° verschoben und zwei Spiegel (UV-erweiterte Aluminium-Planspiegel, erhalten von CVI Melles Griot) im Bereich vor dem Detektor angebracht. Die beiden Spiegel befinden sich zwischen der Fluoreszenz-Sammellinse und dem Emissionsmonochromator und leiten das Licht im Zickzack zum Detektor (siehe Abbildung 2.23).

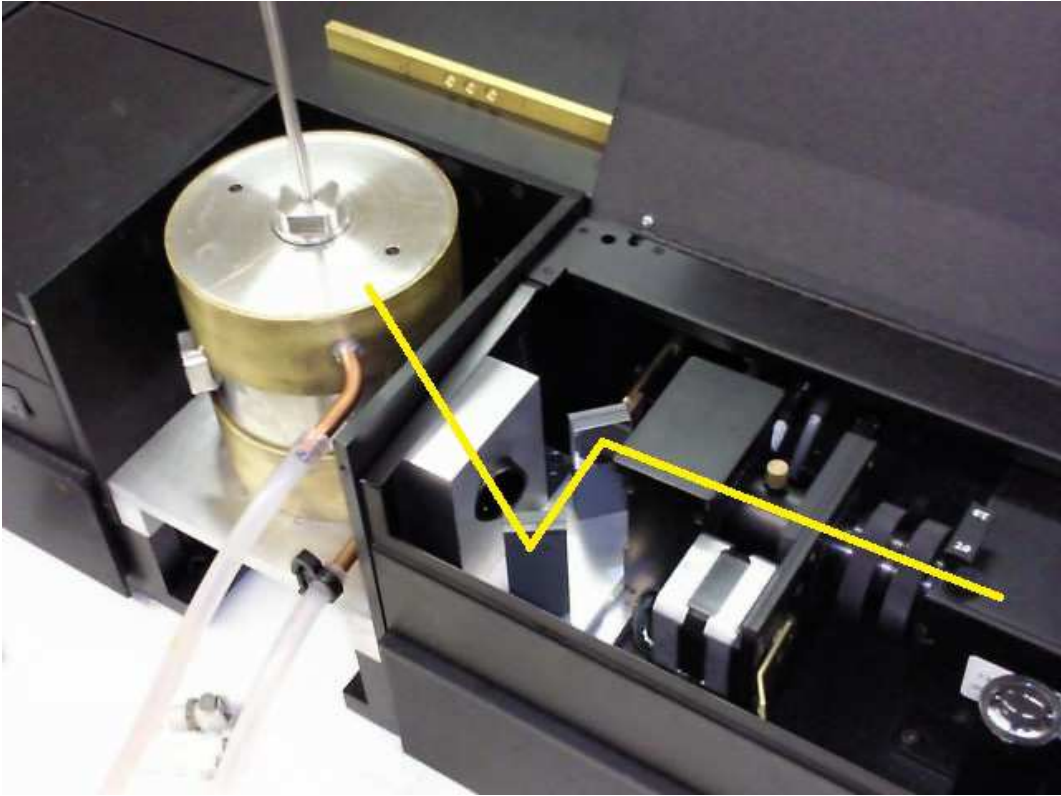


Abbildung 2.23. Die Hochdruck-TIRF-Zelle befindet sich im K2 Fluorometer der Firma ISS. Das Fluoreszenzlicht tritt über einen Winkel von 110° relativ zum Anregungsstrahl aus und wird über zwei Spiegel im Zickzack zum Detektor geleitet.

Die Hochdruck-TIRF-Zelle wird von einem mit Wasser temperierbaren Metallmantel umschlossen, welcher mit einem Wasserbad verbunden ist. Das Wasser läuft aus dem Wasserbad in die Kanäle des Metallmantels und wird anschließend wieder zurückgeführt. Auf diesem Weg kann die Zelle bei Temperaturen von $0-80^\circ\text{C}$ betrieben werden. Die Hochdruck-Metallkapillare ist mit einer Handspindelpresse, einem Manometer, drei Ventilen und einem Reservoir verbunden, welches das Druckmedium enthält. Durch geeignetes Öffnen und Schließen der Ventile lässt sich die Handspindelpresse mit Druckmedium befüllen, und anschließend können über die Metallkapillare hohe Drücke in der Hochdruckzelle generiert werden. Das gesamte Volumen des zusammengepressten Druckmediums beträgt ca. 20 cm^3 .

2.5.5 TIRF-Mikroskopie

Zur Visualisierung grenzflächennaher Fluorophormoleküle wird die TIRF-Mikroskopie angewandt. Wie auch bei der TIRF-Spektroskopie basiert diese Methode auf der Totalreflexion eines Lichtstrahls an einer Glas/Probe-Grenzfläche (siehe Punkt 2.5.4). Ein großer Vorteil der

Methode besteht darin, dass die von der Grenzfläche weiter entfernten Fluorophore nicht angeregt werden, so dass ein hohes Signal/Rausch - Verhältnis vorliegt. Das in dieser Arbeit verwendete TIRF-Mikroskop weist ein Objektiv auf, in welchem ein Laserstrahl so abgelenkt wird, dass er an der Grenzfläche Glas/Probe totalreflektiert und wieder in das Objektiv zurückgelenkt wird (siehe Abbildung 2.24).

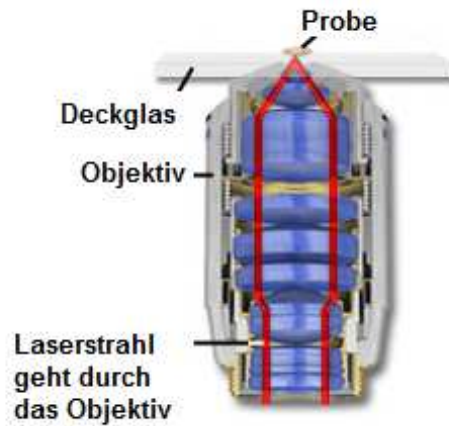


Abbildung 2.24. Schematischer Aufbau eines Objektivs für TIRF-Messungen. Modifiziert nach Referenz 160.

Findet eine Totalreflexion statt, so können durch die evaneszente Welle grenzflächennahe (≤ 100 nm) Fluorophore angeregt und im Mikroskop sichtbar gemacht werden (siehe Abbildung 2.25).¹⁶¹

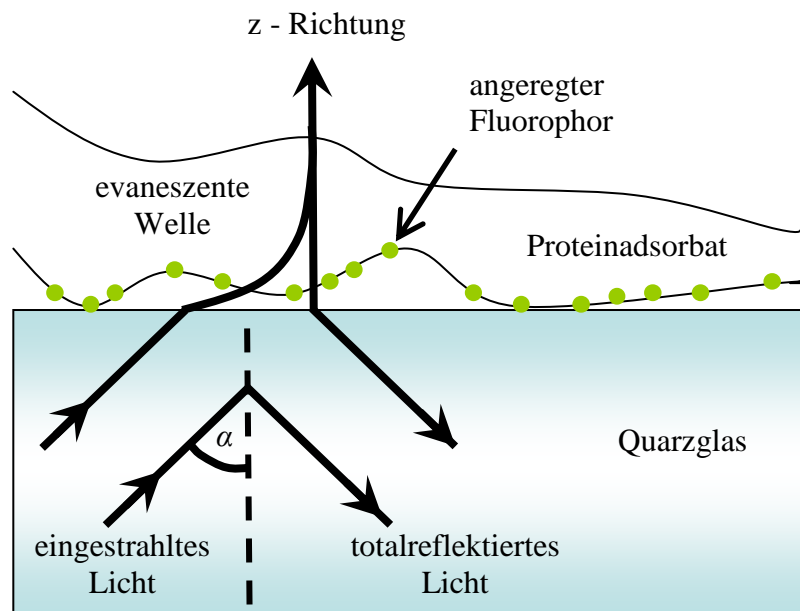


Abbildung. 2.25. Durch Totalreflexion eines Lichtstrahls entsteht eine evaneszente Welle, mit der grenzflächennahe Fluorophore angeregt werden können. n_1 und n_2 sind die Brechungsindizes der jeweiligen Substanzen.

Die Amplitude und die Eindringtiefe der evaneszenten Welle werden anhand der Gleichungen (42) und (43) beschrieben. Die Anregung der grenzflächennahen Probe durch die elektromagnetische Energie führt zu einer relativ geringen Hintergrundfluoreszenz.

Das laterale Auflösungsvermögen eines TIRF-Mikroskops unterscheidet sich nicht von einem herkömmlichen Mikroskop und wird durch die numerische Apertur bestimmt. Die numerische Apertur NA eines Objektivs ist das Produkt aus dem Brechungsindex n der Umgebung und dem Sinus des halben Öffnungswinkels α des Lichtkegels, welchen die Linse des Objektivs in der Probe bildet:¹⁵⁷

$$NA = n \cdot \sin \alpha \quad (46)$$

Die maximale Auflösung lässt sich auch als Mindestabstand d_{\min} zweier noch unterscheidbarer Strukturen beschreiben:¹⁵⁷

$$d_{\min} = \frac{\lambda}{2 \cdot NA} \quad (47)$$

Um die maximale Auflösung zu erhöhen, wird Immersionsöl mit einem relativ hohen Brechungsindex zwischen dem Objektiv und dem Deckglas zur optischen Kopplung verwendet.

2.5.6 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie¹⁵²

Anders als bei der konventionellen Mikroskopie ist die dreidimensionale Darstellung eines Objekts mithilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops möglich (siehe Abbildung 2.26). Die hohen Streulichtanteile sowie die Beiträge der Strahlung außerhalb der fokussierten Ebene in einem Präparat führen in einem konventionellen Mikroskop zu diffusen Bildern. In einem konfokalen Mikroskop (CFM) hingegen wird die Probe mit einer punktförmigen Lichtquelle bestrahlt. Dies geschieht durch einen Laserstrahl, der mit Hilfe eines dichroitischen Strahlteilers auf das Probenpräparat gelenkt wird. Das von der Probe ausgestrahlte Licht passiert das Objektiv und den Strahlteiler und gelangt auf eine zweite Lochblende.

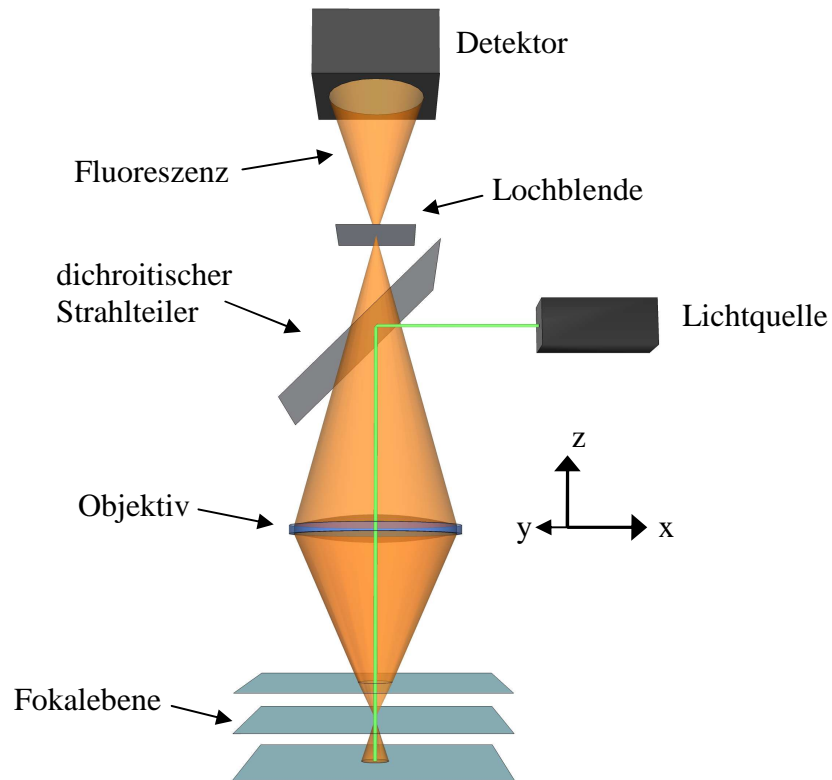


Abbildung 2.26. Schematischer Aufbau eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops.

Durch die spezielle Anordnung passiert nur das Emissionslicht, welches aus der Brennebene der Probe stammt, die Detektionslochblende und gelangt schließlich zum Detektor. Mit Hilfe eines piezoelektrischen Motors liegt ein in der xy-Ebene bewegliches Objektiv vor, was eine Untersuchung Punkt für Punkt und Zeile für Zeile auf dem Präparat ermöglicht, um einen gewünschten Bereich zu rastern. Diese abgerasterten Bereiche können mittels Computer zu dreidimensionalen Aufnahmen zusammengesetzt werden. Werden mehrere Detektoren verwendet, so ist es mithilfe von Sperrfiltern möglich das vom Brennpunkt ausgesandte Licht nach Wellenlängen getrennt aufzunehmen.

3. Experimentelles

3.1 Chemikalien und Geräte

3.1.1 Chemikalien

| Bezeichnung | Reinheit | Bezugsquelle |
|--|-------------------------------|--|
| Alexa Fluor 488 | ≥ 97% | Invitrogen |
| Ammoniumhydroxidlösung in Wasser 28% - 30% | ACS Reagenz | Sigma-Aldrich |
| Bistris (Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan) | ≥ 99% | Fluka |
| Chloroform | ACS Reagenz (≥ 99.8%) | Sigma-Aldrich |
| Cholesterin | ≥ 99% | Sigma-Aldrich |
| Deuteriumchlorid in D ₂ O, 35% | 99% Deuterierungsgrad | Sigma-Aldrich |
| Deuteriumoxid | 99.9% Deuterierungsgrad | Fluka |
| Dioleoylphosphatidylcholin | 100% | Avanti |
| Dipalmitoylphosphatidylcholin | 100% | Avanti |
| Ethanol | ≥ 99.9% | Merck |
| Glycerin | ≥ 99.5% | Sigma-Aldrich |
| Harnstoff | 99.70% | Qbiogene |
| Hellmanex II | entfällt | Hellma |
| Hyaluronsäure | Proteinanteil ≤ 1% | Fluka |
| Insulin aus Rinderbauchspeicheldrüse | 29 USP-Units mg ⁻¹ | Sigma-Aldrich |
| Laurdan (6-Dodecanoyl-2-dimethylaminonaphthalin) | ≥ 85% | Invitrogen |
| Ludox AM-30 | 30 Gew.% in H ₂ O | Sigma-Aldrich |
| Ludox AS-40 | 40 Gew.% in H ₂ O | Sigma-Aldrich |
| Lysozym aus Hühnereiweiß | ≥ 95% | Roche |
| MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure) | 99.60% | Sigma-Aldrich |
| NATA (N-Acetyl-L-tryptophanamid) | s. Hersteller | Sigma-Aldrich |
| Natriumhydrogencarbonat | >99.7% | Merck |
| Natriumchlorid | ≥ 98% | Sigma-Aldrich |
| Natriumhydroxid | ≥ 99% | Sigma-Aldrich |
| Poly-(diallyldimethylammoniumchlorid) | 20 Gew.% in H ₂ O | Sigma-Aldrich |
| Poly-(natrium 4-styrolsulfonat) | keine Angabe | Sigma-Aldrich |
| Poly(styrol) | nicht spezifiziert | Sigma-Aldrich |
| Poly(styrol)-Nanopartikel (Sulfat-Latex) | 8% in H ₂ O (w/v) | Invitrogen |
| Salzsäure, 37% | ≥ 99.9% | Sigma-Aldrich |
| Staphylokokken Nuclease (Wildtyp) | > 99% | Centre de Biochimie Structurale, Montpellier, France |
| Thioflavin T | ~ 75% | Sigma-Aldrich |
| Toluol | ACS Reagenz (≥ 99.5%) | Sigma-Aldrich |
| Wasserstoffperoxid in Wasser 29% - 32% | ACS Reagenz (≥ 99.9%) | Sigma-Aldrich |

3.1.2 Geräte

| Messmethode | Firma | Bezeichnung |
|---------------------------------|------------------------|---------------------------|
| Röntgenreflektometer | Seifert | XRD 3000 TT |
| FTIR-Spektrometer | Thermo Electron | Nicolet 6700 |
| TIRF-Mikroskop | Zeiss | Axiovert 135TV |
| Multifrequenzphasenfluorometer | ISS | K2 |
| Konfokales Fluoreszenzmikroskop | PicoQuant | Microtime 200 |
| UV-Spektrometer | Perkin Elmer | Lambda 20 |
| Spincoater | Chemat Technology | KW-4A |
| Thermostat (Wasserkreislauf) | Julabo | F32 / HL |
| Thermostat (Wasserkreislauf) | Huber | Polystat CC2 |
| Wasseraufreinigungsanlage | Vivendi Water Systems | Purelab Classic |
| pH-Meter | Eutech Instruments | Analytical Balance |
| pH-Elektrode | WTW | SenTix Mic-B |
| Trockenschrank | Heraeus | T 6200 |
| Zentrifuge | Beckmann | Optima TL 100 |
| ATR-Probenkammer | Pike Technologies | --- |
| Feinwaage | Sartorius | Analytical Balance ME414S |
| Silicium Wafer | Siltronic | --- |
| Quarzprisma | Micros Präzisionsoptik | --- |
| Küvette aus Quarzglas (3.5 mL) | Hellma | 101 QS |

3.1.3 Puffersysteme

Zur Fluoreszenzmarkierung von Insulin bzw. Lysozym mit Alexa Fluor 488 wurde ein 100 mM NaHCO_3 - Puffer hergestellt (beispielsweise 8.401 g und 1 L H_2O) und anschließend ein pH-Wert von 8.3 mit NaOH eingestellt. Für Messungen der Hochdruck-Fluoreszenzspektroskopie und der Hochdruck-TIRF-Spektroskopie wurde ein 10 mM Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan (Bis-tris)-Puffer hergestellt und je nach Bedarf auf unterschiedliche pH-Werte mit NaOH- bzw. HCl-Lösungen eingestellt.

3.2 Operationen zur Messvorbereitung

3.2.1 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen mit Alexa Fluor 488

Die Markierung von Insulin bzw. Lysozym mit dem Tetrafluorphenylester von Alexa Fluor 488 erfolgt über eine nukleophile Substitution, in erster Linie mit der ϵ - NH_2 -Gruppe der

Lysinseitenketten von Proteinen. Andere primäre Amine wie die α -NH₂-Gruppen freier N-Termini sind ebenfalls in der Lage an Alexa Fluor 488 zu binden. Jedoch sind sie nur in ihrer neutralen Form reaktiv und weisen eine optimale Reaktivität bei einem leicht basischen pH-Wert von 8.2 - 8.5 auf.¹¹³ Im Falle von Lysozym wurde eine Lösung mit einer Konzentration von 10 mg/mL in 100 mM NaHCO₃-Puffer bei pH 8.3 hergestellt. Von dieser Lösung wurden 500 μ L ($3.4 \cdot 10^{-7}$ mol Lysozym) zu einem gebrauchsfertigen Aliquot pipettiert. Die Reaktionslösung wurde für eine Dauer von 2 Stunden mit einem Rührfisch bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung bei einer Temperatur von 10 °C über Nacht gerührt. Die Aufreinigung des markierten Proteins erfolgte mittels der Größenausschlusschromatographie, wobei eine mit Bio-Gel P30 beladene 30 cm lange und 7 cm breite Säule verwendet wurde. Vor der Aufreinigung wurde die Säule mehrmals mit 100 mM NaHCO₃-Puffer bei pH 8.3 äquilibriert, und anschließend wurde die Proteinlösung vorsichtig in die Säule pipettiert. Als Elutionsmittel wurde ebenfalls der 100 mM NaHCO₃-Puffer bei pH 8.3 verwendet. Die erste farbige Fraktion stellte das markierte Protein dar, die zweite farbige Fraktion waren die freien Fluorophormoleküle.

Im Falle von Insulin wurde zunächst eine Lösung mit einer Konzentration von 5 mg/mL in HCl bei pH 2 hergestellt. Diese Lösung wurde im 100 mM NaHCO₃-Puffer auf eine Konzentration von 2 mg/mL verdünnt und auf einen pH-Wert von 8.3 eingestellt. 500 μ L dieser verdünnten Lösung wurden zu einem gebrauchsfertigen Aliquot pipettiert und anschließend mithilfe eines Rührfisches für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung über Nacht bei 10 °C gerührt. Vor der Aufreinigung des Proteins wurde die oben erwähnte mit Bio-Gel P30 beladene Säule mit 100 mM NaHCO₃-Puffer bei pH 8.3 mehrmals äquilibriert. Nach der Zugabe der Reaktionslösung wurde die Säule ebenfalls mit dem gleichen Puffer eluiert. In der ersten farbigen Fraktion war das fluoreszenzmarkierte Protein vorhanden, in der zweiten farbigen Fraktion lagen die freien Fluorophore vor.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration und des Markierungsgrads f wurde die erste Fraktion UV-spektrometrisch untersucht. Die Konzentration eines mit Alexa Fluor 488 markierten Proteins lässt sich mithilfe der Gleichung (48) beschreiben, in welcher der Beitrag des extrinsischen Fluorophors zur Gesamtabsorption A berücksichtigt wird:¹¹³

$$c_{\text{Protein}} = \frac{A(\lambda_1) - f \cdot A(\lambda_2)}{d \cdot \epsilon_{\text{Protein}}(\lambda_1)} \quad (48)$$

λ_1 stellt hier die Wellenlänge des Absorptionsmaximums des unmarkierten Proteins, λ_2 die Wellenlänge des Absorptionsmaximums des extrinsischen Fluorophors und d die Schichtdicke der Küvette dar. f stellt den Anteil der Absorption $A(\lambda_2)$, der bei λ_1 beobachtet wird, dar. Bei einer Wellenlänge von $\lambda_1 = 280$ nm ist $\varepsilon_{\text{Lysozym}} = 38000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bzw. $\varepsilon_{\text{Insulin}} = 5530 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.^{99,162} Bei der Maximalabsorptionswellenlänge von Alexa Fluor 488 bei $\lambda_2 = 494$ nm beträgt der Anteil f der Absorption bei der Wellenlänge $\lambda_1 = 280$ nm 0.11.¹⁶³ Der Markierungsgrad l beschreibt die pro Stoffmenge an Proteinmolekülen gebundene Menge an extrinsischen Fluorophormolekülen und lässt sich durch den folgenden Zusammenhang definieren:¹¹³

$$l = \frac{A(\lambda_2)}{\varepsilon_{\text{Fluorophor}} \cdot c_{\text{Protein}} \cdot d} \quad (49)$$

Der molare Extinktionskoeffizient von Alexa Fluor 488 wird mit $\varepsilon_{\text{Alexa488}} = 71000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ als Richtwert angegeben.¹⁶⁵ Gemessen wurden die UV/Vis-Spektren von Lysozym bzw. Insulin im Bereich von 260 und 600 nm mit einer Schrittweite von $\Delta\lambda = 1$ nm bei einer Aufnahmegeschwindigkeit von 240 nm/min. Für Lysozym resultierte für mehrere Ansätze im Mittel eine Proteinkonzentration von $c_{\text{Lysozym}} \approx 0.3$ mg/mL mit einem Markierungsgrad von $l \approx 0.1$. Im Falle von Insulin resultierte für mehrere Fälle im Mittel eine Proteinkonzentration von $c_{\text{Insulin}} \approx 0.28$ mg/mL mit einem Markierungsgrad von $l \approx 0.1$. Die markierten Proteine wurden nach dem Aliquotieren in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -20 °C gelagert. Die fluoreszenzmarkierten Proteinlösungen wurden je nach Bedarf zu einer gewünschten Proteinkonzentration und zu einem gewünschten Markierungsgrad durch Verdünnung und dem Hinzufügen von unmarkierten Proteinmolekülen verwendet.

3.2.2 Herstellung von Insulinkeimen

Die Herstellung der Insulinkeime erfolgte durch das ein- bis zweistündige Erhitzen von Insulin in HCl bei pH 2.1 mit einer Proteinkonzentration von 5 mg/mL und einem NaCl-Zusatz von 0.1 M bei einer Temperatur von 60 °C. Nach dem Erhitzen wurden die entstandenen Fibrillen für 2 Stunden einem Ultraschallbad unterzogen und anschließend direkt für weitere Untersuchungen entsprechend verdünnt. Für ATR-FTIR-Messungen wurden Insulinkeime analog in D₂O hergestellt, wobei ein pD-Wert von 2.1 eingestellt wurde.

3.2.3 Reinigung der Substrate zur Untersuchung von Polyelektrolyt-Insulinmultischichten

3.2.3.1 Reinigung von Silicium-Wafern für Röntgenreflektometrie

Silicium (Si) - Wafer mit einer Abmessung von $2 \cdot 1.5 \text{ cm}^2$ wurden zunächst vorgereinigt und anschließend in einer Reinigungslösung für eine Dauer 15 - 30 Minuten bei einer Temperatur von $60 - 80 \text{ °C}$ erhitzt. Die Reinigungslösung besteht aus einem Volumenteil Ammoniumhydroxidlösung in Wasser (28 - 30 %), einem Volumenteil H_2O_2 in Wasser (29-32 %) sowie fünf Volumenteile H_2O . Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden Si-Wafer mit fließendem Leitungswasser und anschließend mit entionisiertem Wasser exzessiv abgespült. Die gereinigten Si-Wafer wurden in entionisiertem Wasser gelagert.

3.2.3.2 Reinigung von internen Reflexionselementen aus Silicium für ATR-FTIR-Spektroskopie

Die Reinigung der prismaförmigen internen Reflexionselemente, bestehend aus einem Siliciumeinkristall (mit den Maßen für die Tiefe von $t = 10 \text{ mm}$ und für die trapezförmige Grundfläche von $l_1 = 80 \text{ mm}$, $l_2 = 72 \text{ mm}$ und $h = 4 \text{ mm}$), wurde in gleicher Weise wie bei den Si - Wafern (siehe Punkt 3.2.3.1) durchgeführt. Während des Erhitzens wurde darauf geachtet, dass nur die Grundfläche der Prismen auf dem Gefäßboden aufliegen, so dass keine Kratzer auf der Probenseite hervorgehen konnten. Getrocknet wurden die gereinigten Reflexionselemente im Trockenschrank bei 110 °C .

3.2.3.3 Reinigung von Quarzplatten und -prismen für TIRF-Spektroskopie

Auch die Reinigung der Quarzplatten und des -prismas für die TIRF Spektroskopie erfolgte in gleicher Art und Weise wie in Punkt 3.2.3.1 beschrieben. Die Quarzplatten weisen eine Abmessung von $4 \cdot 3 \text{ cm}^2$ auf. Das Quarzprisma weist eine Tiefe von $t = 40 \text{ mm}$ und eine trapezförmige Grundfläche mit $l_1 = 30 \text{ mm}$, $l_2 = 21 \text{ mm}$ und $h_a = 15 \text{ mm}$ auf.

3.2.4 Probenpräparation zur Untersuchung von Polyelektrolyt-Insulinmultischichten

3.2.4.1 Aufbau von Polyelektrolyt-Insulinmultischichten (Röntgenreflektometrie)

Zur Untersuchung des Aufbaus von Multischichten, bestehend aus Polyelektrolyten und Insulin, wurden unterschiedliche Adsorptionsbedingungen überprüft. Zur Beschichtung von Si-Wafern mit Polyelektrolyt- bzw. Proteinmultischichten wurden die in den Tabellen 3.1 – 3.4 aufgeführten Lösungen verwendet. Um geeignete Bedingungen zum Aufbau einer stabilen Multischicht auch bei höheren Temperaturen zu finden, wurden mehrere Ansätze untersucht. Alle Multischichten wurden durch die sukzessive Adsorption (*layer-by-layer* Methode) der entsprechenden Polyelektrolyt- bzw. Insulinschichten für eine jeweilige Inkubationszeit von 15 min aufgebaut.

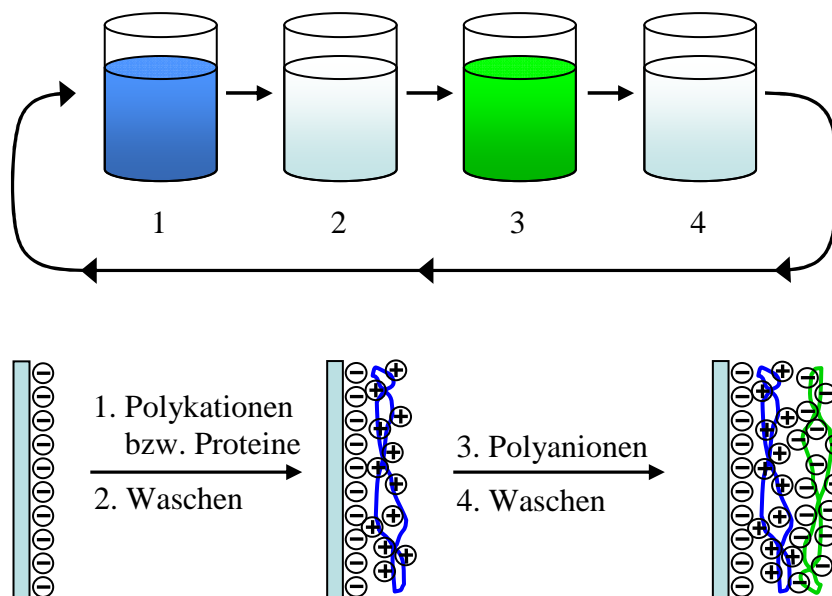


Abbildung 3.1. Aufbau einer Polyelektrolyt-Proteinmultischicht mit Hilfe der *layer-by-layer*-Methode. Zwischen der Abscheidung ungleichnamig geladener Polyelektrolyte bzw. Proteine werden Waschschrte durchgeführt.

Das geschah durch das komplette Eintauchen des Substrats in die entsprechende Lösung. Zwischen den einzelnen Adsorptionsschritten wurden mehrfach Waschschrte durchgeführt (siehe Abbildung 3.1), wobei nach den ersten beiden adsorbierten Schichten entionisiertes Wasser und bei darauffolgenden Schichten HCl bei pH 3 angewandt wurde, um die in der Lösung verbleibenden Polyelektrolyte bzw. Proteinmoleküle zu entfernen. Es wurde sukzessiv

eine Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₄ mit den in der Tabelle 3.1 aufgeführten Lösungen aufbaut, wobei der Aufbau der Multischicht mittels Röntgenreflektometrie verfolgt wurde. Dabei wurden Insulinschichten bei pH 2.1 in Abwesenheit von Natriumchlorid abgeschieden.

Tabelle 3.1. Lösungen zum Aufbau von Multischichten

| Lösungen: | Konzentrationen ; pH ; Zusatz |
|----------------------|--------------------------------------|
| PDDA | 1 mg/mL ; pH 5.9 ; 0.5M NaCl |
| PSS | 1 mg/mL ; pH 5.9 ; 0.5M NaCl |
| Insulin | 0.1 mg/mL ; pH 2.1 ; --- |
| Hyaluronsäure | 1 mg/mL ; pH 4 ; 0.5 M NaCl |

Um den Einfluss von NaCl auf den Aufbau einer Multischicht zu untersuchen, wurde zur Insulinlösung ein 0.1 M NaCl-Zusatz hinzugefügt und die Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₂ abgeschieden. Die Insulinlösung wurde zusätzlich auf einen pH-Wert von 3 eingestellt, um die Coulomb-Repulsion zwischen Insulinmolekülen zu verringern. Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Tabelle 3.2. Lösungen zum Aufbau von Multischichten; NaCl-Zugabe zur Insulinlösung und pH-Wertsenkung.

| Lösungen: | Konzentrationen ; pH ; Zusatz |
|------------------|--------------------------------------|
| PDDA | 1 mg/mL ; pH 5.9 ; 0.5M NaCl |
| PSS | 1 mg/mL ; pH 5.9 ; 0.5M NaCl |
| Insulin | 0.1 mg/mL ; pH 3 ; 0.1 M NaCl |
| PSS | 1 mg/mL ; pH 2.1 ; 0.5 M NaCl |

Weiterhin wurde der NaCl-Zusatz in der Insulinlösung auf 0.2 M erhöht, um zu untersuchen, ob ein größerer Anstieg der Multischicht resultiert. Es wurde, wie bereits zuvor, die Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₂ aufgebaut. Es wurden die in der Tabelle 3.3 aufgelisteten Lösungen verwendet.

Tabelle 3.3. Lösungen zum Aufbau von Multischichten; NaCl-Konzentrationserhöhung in der Insulinlösung.

| Lösungen: | Konzentrationen ; pH ; Zusatz |
|----------------------|--------------------------------------|
| PDDA | 1 mg/mL ; pH 5.9 ; 0.5M NaCl |
| PSS | 1 mg/mL ; pH 5.9 ; 0.5M NaCl |
| Insulin | 0.1 mg/mL ; pH 3 ; 0.2 M NaCl |
| PSS | 1 mg/mL ; pH 2.1 ; 0.5 M NaCl |
| Hyaluronsäure | 1 mg/mL ; pH 5 ; 0.5 M NaCl |

3.2.4.2 Temperaturstabilität von Polyelektrolyt-Insulinmultischichten (Röntgenreflektometrie)

Im Folgenden wurde die NaCl-Konzentration in der Insulinlösung auf 0.05 M reduziert und für die Hyaluronsäurelösung ein pH-Wert von 4.5 eingestellt (siehe Tabelle 3.4). Der sukzessive Aufbau der zwei Multischichten PDDA-PSS-(Ins-PSS)₄ bzw. PDDA-PSS-(Ins-HA)₄ auf jeweils einem Si-Wafern wurde verfolgt. Anschließend wurde die Temperaturstabilität untersucht, indem die präparierten Multischichten in HCl bei pH 3 auf eine Temperatur von 70 °C für eine Dauer von einer Stunde erhitzt wurden. Anschließend erfolgten die Messungen der Schichtdicken bei Raumtemperatur. Beide Multischichten lagen während den Messungen hydratisiert vor.

Tabelle 3.4. Lösungen zum Aufbau von Multischichten bestehend aus Insulin und PSS bzw. Hyaluronsäure

| Lösungen: | Konzentrationen ; pH ; Zusatz |
|----------------------|--------------------------------------|
| PDDA | 1 mg/mL; pH 5.9; 0.5M NaCl |
| PSS | 1 mg/mL; pH 5.9; 0.5M NaCl |
| Insulin | 0.1 mg/mL; pH 3; 0.05 M NaCl |
| PSS | 1 mg/mL; pH 2.1; 0.5 M NaCl |
| Hyaluronsäure | 1 mg/mL; pH 4.5; 0.5 M NaCl |

Um zu untersuchen, ob die beobachtete Abnahme (s.u.) der Schichtdicke aus der Zerstörung der Multischicht oder aus der Umstrukturierung der adsorbierten Moleküle hervorgeht, wurde die Stabilität der Multischichten bei erhöhten Temperaturen über einen längeren Zeitraum hin untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Multischichten PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ und PDDA-PSS-(Ins-HA)₄ auf Silicium adsorbiert und anschließend die Schichtdicke bei Raumtemperatur bestimmt. Im Anschluss wurden die jeweiligen Proben für insgesamt für 3 Stunden auf 70°C in HCl mit pH 2.1 erhitzt, wobei nach jeder Stunde die Schichtdicke bestimmt wurde. Die Messungen erfolgten in einer Probenkammer, so dass die Multischichten in hydratisierter Form vorlagen. Es wurden die Lösungen aus der Tabelle 3.4 verwendet.

3.2.4.3 Präparation von Polyelektrolyt-Insulinmultischichten (TIRF-Spektroskopie)

Die Beschichtung der Quarzplättchen erfolgte analog zur Beschichtung der Si-Wafer wie in Punkt 3.2.4.1 beschrieben. Verwendet wurden die Lösungen aus Tabelle 3.4. Die

Quarzplättchen wurden vollständig in die entsprechenden Lösungen eingetaucht. Zwischen den Adsorptionsschritten wurden die Quarzplatten in Wasser mit entsprechendem pH-Wert gründlich gewaschen.

3.2.4.4 Temperatureffekt auf die Struktur von Insulin in Multischichten (TIRF-Spektroskopie)

Die Aggregation des in Multischichten eingebetteten Insulins wurde hinsichtlich einer Temperaturerhöhung auf 70°C über einen Zeitraum mehrerer Stunden untersucht. Nach der Präparation einer jeweiligen Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ wurde die entsprechende Quarzglasplatte in die Probenkammer eingebaut (siehe Punkt 3.3.3) und eine Thioflavin T-Lösung mit einer Konzentration von 4 µg/mL, einem 0.1 M NaCl-Zusatz und einem pH-Wert von 2.1 in die Probenkammer mit Hilfe einer 1 mL Spritze gefüllt. Das Probenvolumen umfasst 200 µL. Es wurde die Fluoreszenz von Thioflavin T bei 482 nm gemessen. Die Anregung erfolgte bei 450 nm. Weitere Experimente wurden unter gleichen Bedingungen, jedoch höheren NaCl-Konzentrationen von 0.2, 0.3, 0.4 oder 0.5 M in gleicher Weise durchgeführt. Weiterhin wurde analog zur vorherigen Messungen die Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₃ aufgebaut, um die Aggregation des eingebetteten Insulins zu untersuchen, jedoch wurde die ThT-Konzentration auf 2.5 µg/L reduziert und nur Messungen bei 0.3 und 0.5 M NaCl-Zusatz durchgeführt. Die Temperaturerhöhung einer Probe erfolgte mittels eines intern vorgeheizten Wasserbads auf 70°C, welches jeweils nach einer Messdauer von 30 Minuten an die Probenkammer angeschlossen wurde.

3.2.4.5 Effekt von Insulinkeimen auf die Struktur von Insulin in Multischichten (TIRF-Spektroskopie)

Zur Untersuchung des Einflusses von Insulinkeimen (Herstellung, siehe Punkt 3.2.2) auf die Aggregation von Insulin in Multischichten wurden mehrere Ansätze gemessen. Wie zuvor wurde die Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₃ auf Quarzplättchen adsorbiert. Weiterhin erfolgte die Herstellung einer ThT-Lösung mit einer Konzentration von 2.5 µg/mL, einem NaCl-Zusatz von 0.1 M, einem pH von 2.1 und einem Insulinkeimzusatz von 0.2 mg/mL, die nach dem Zusammenbau der Messzelle in die Probenkammer mit Hilfe einer 1 mL Spritze gefüllt wurde.

Die Messung erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 25 °C. Diese Messung wurde einmal repliziert.

In einem weiteren Experiment wurde eine Multischicht bestehend aus PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃-Ins auf einem Quarzglasplättchen abgeschieden. Es wurde anschließend eine ThT-Lösung mit einer Konzentration von $c(\text{ThT}) = 2.5 \mu\text{g/mL}$, einem pH-Wert von 2.1 und einem 0.1 M NaCl-Zusatz in die Probenkammer eingefüllt und die Fluoreszenzintensität gemessen. Anschließend wurde nach einer Messdauer von 40 min die ThT-Lösung aus der Probenkammer mit Hilfe von Salzsäure mit einem pH-Wert von 2.1 mehrmals gespült und eine Insulinkeimlösung mit einer Konzentration von $c(\text{Insulinkeime}) = 0.1 \text{ mg/mL}$, einem pH-Wert von 2.1 und einem 0.1 M NaCl-Zusatz zur Probe gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 40 min wurde die Insulinkeimlösung mit Salzsäure (pH 2.1) gespült und erneut eine ThT-Lösung mit gleicher Konzentration zur Multischicht gegeben. Die Messung wurde bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt.

3.2.4.6 Aufbau von Insulin-Polyelektrolytmultischichten *in situ* (TIRF-Spektroskopie)

Weiterhin wurde der Aufbau von Insulinmultischichten *in situ* fluoreszenzspektroskopisch verfolgt, wobei nach jeder adsorbierten Insulinschicht Insulinkeime zum Adsorbat gegeben und nach einer bestimmten Inkubationszeit wieder aus der Probenzelle entfernt wurden. Zunächst wurde die Multischicht PDDA-PSS-Ins auf einem Quarzglasplättchen adsorbiert und das Plättchen in die Probenzelle eingebaut. Anschließend wurde in die Probenkammer eine ThT-Lösung ($c(\text{ThT}) = 2.5 \mu\text{g/mL}$, pH 2.1, 0.1 M NaCl) gegeben. Nach einer Messdauer von 10 min wurde ein Waschschriff mit 3 mL Salzsäure (pH 2.1) mittels einer Spritze durchgeführt und eine Insulinkeimlösung ($c(\text{Insulinkeime}) = 0.1 \text{ mg/mL}$, pH 2.1, 0.1 M NaCl) zur Multischicht gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 min folgten ein weiterer Waschschriff und anschließend die Zugabe der ThT-Lösung. Die Emission des ThTs wurde für eine Dauer von 10 min verfolgt und anschließend eine PSS-Lösung ($c(\text{PSS}) = 1 \text{ mg/mL}$, pH 2.1, 0.5 M NaCl) zur Multischicht gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde ein weiterer Waschschriff durchgeführt und im Anschluss eine Insulinlösung ($c(\text{Ins}) = 0.1 \text{ mg/mL}$, pH 3, 0.05 M NaCl) zur Multischicht gegeben. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt, so dass die Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₅ auf Quarz adsorbiert wurde. Um das Aggregationsverhalten von Insulin in solch einer Multischicht zu untersuchen, wurde die ThT-Fluoreszenzintensität über einen Zeitraum von 17 Stunden bei einer Temperatur von 25 °C verfolgt.

3.2.4.7 Statische Fluoreszenzanisotropie von Insulin in Multischichten

(TIRF-Spektroskopie)

Zur Untersuchung der Rotationsdynamik des in Multischichten eingelagerten Insulins wurde die statische Fluoreszenzanisotropie von an das Insulin gebundenem Alexa Fluor 488 gemessen. Zunächst wurde die Multischicht PDDA-PSS-(Ins_{Alexa}-PSS)₃ auf Quarzglas adsorbiert und anschließend die statische Anisotropie bei einer Wellenlänge 519 nm gemessen. Der Aufbau der Multischicht erfolgte ebenfalls wie in Punkt 3.2.4.1 in Tabelle 3.4 beschrieben. Das mit Alexa Fluor 488 fluoreszenzmarkierte Insulin wies ein Markierungsgrad l von 1:300 und eine Konzentration von $c(\text{Ins}_{\text{Alexa}}) = 0.1 \text{ mg/mL}$ mit einem 0.05 M NaCl-Zusatz bei pH = 3.0 auf. Nach dem Aufbau der Multischicht wurde die Probenkammer mit HCl bei pH 2.1 befüllt. Angeregt wurde die Probe bei 470 nm, so dass der Streulichtanteil in der Emission relativ gering war. Pro Temperatur wurden 30 Werte aufgezeichnet und anschließend gemittelt. Anisotropiedaten wurden im Temperaturbereich von 20 bis 70 °C in 5 °C-Schritten aufgenommen. Eine weitere Reproduktionsmessung wurde durchgeführt, wobei Anisotropien in 10 °C-Temperaturschritten aufgenommen wurden.

3.2.4.8 Zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie von Insulin in Multischichten

(TIRF-Spektroskopie)

Um Rotationskorrelationszeiten der eingebetteten Insulinmoleküle in einer Multischicht zu untersuchen, wurde auf einem Quarzglasplättchen, wie auch in Punkt 3.2.4.4, die Multischicht PDDA-PSS-(Ins_{Alexa}-PSS)₃ abgeschieden. Der Markierungsgrad des fluoreszenzmarkierten Insulins betrug 1:50 (Alexa Fluor 488:Insulinmolekül). In die Probenkammer wurde Salzsäure bei pH = 2.1 mit 0.1 M NaCl gegeben. Gemessen wurde sowohl die Modulation als auch die Phasenverschiebung bei Modulationsfrequenzen von 2 - 400 MHz in 20 MHz - Schritten. Als Referenz für die Lebenszeitmessung wurde das Streulicht bei 473 nm detektiert, welches eine Lebenszeit von 0 ns aufweist. Die Detektion der Emission erfolgte bei einer Wellenlänge von 514 nm. Die Messung des Streulichts und der Fluoreszenz erfolgte durch die Verwendung von Bandpass-Emissionsfiltern. Die Messungen erfolgten bei Temperaturen von 20 – 60 °C in 10 °C - Schritten.

In einem weiteren Versuch wurde anschließend der Markierungsgrad des fluoreszenzmarkierten Insulins auf 1:300 erhöht. Die Adsorption der Multischicht PDDA-PSS-(Ins_{Alexa}-PSS)₃ erfolgte analog zum vorherigen Experiment.

3.2.4.9 Schwingungsspektrum der Polyelektrolyte zur Amid-I'-Bande (ATR-FTIR-Spektroskopie)

Um den Beitrag der Polyelektrolyte an der Amid-I'-Bande zu untersuchen, wurde die Polyelektrolytmultischicht (PDDA-PSS)₄ auf Silicium abgeschieden, um die Absorptionsintensitäten sowie zeitliche Veränderung der Spektren bei 25 °C zu beobachten. Gemessen wurden die Spektren des Adsorbats in DCI bei pD 2.1 über eine Dauer von 10 Std. Anschließend wurden IR-Transmissionsmessungen von PDDA, PSS und Hyaluronsäure mit einer jeweiligen Konzentration von 50 mg/mL jeweils mit und ohne einem 0.5 M NaCl-Zusatz durchgeführt. Die D₂O-Untergrundspektren wurden von den gemessenen Absorptionsspektren subtrahiert.

3.2.4.10 Untersuchung der zeitlichen Änderung der Amid-I'-Bande einer Polyelektrolyt-Insulinmultischicht bei konstanter Temperatur von 25°C (ATR-FTIR-Spektroskopie)

Um eine eventuelle zeitliche Änderung der Struktur einer Multischicht in Abwesenheit von Insulinkeimen und bei niedrigen Temperaturen zu untersuchen, wurde PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ auf Silicium adsorbiert und Spektren bei einer Temperatur von 25 °C für eine Dauer von 10 Stunden aufgenommen.

3.2.4.11 Temperaturstabilität von Polyelektrolyt-Insulinmultischichten (TIRF-Spektroskopie)

Zur Untersuchung der Temperaturstabilität einer Multischicht wurde PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ auf ein Quarzglasplättchen adsorbiert und in die TIRF-Zelle eingebaut. Die Probekammer wurde mit einer ThT-Lösung befüllt ($c(\text{ThT}) = 4 \mu\text{g/L}$; 0.5 M NaCl; pH 2.1) und die Fluoreszenz des ThTs bei einer Wellenlänge von 482 nm detektiert. Zunächst wurde die Emission bei einer

Temperatur von 20°C, dann bei 70°C, anschließend nach Abkühlen bei 35°C und zuletzt wieder bei 20°C detektiert.

3.2.4.12 Aufbau von Polyelektrolyt-Insulinmultischichten auf internen Reflexionselementen aus Silicium (ATR-FTIR-Spektroskopie)

Zur Untersuchung der Sekundärstruktur von in einer Multischicht eingebettetem Insulin erfolgte eine Beschichtung auf einem Siliciumeinkristall. Es wurden die Polyelektrolyt- und Insulinlösungen aus Tabelle 3.5 verwendet. Der Aufbau der entsprechenden Multischicht wurde nur auf der größten Fläche (80 · 10 mm²) des Si-Kristalls durchgeführt, indem der Kristall mit relativ geringen Mengen der jeweiligen Polyelektrolyt- bzw. Insulinlösungen benetzt wurde.

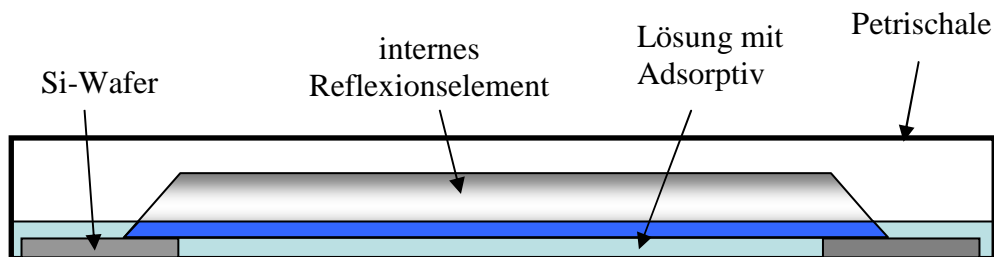


Abbildung 3.2: Einseitige Beschichtung eines internen Reflexionselements für die ATR-FTIR-Spektroskopie.

Die Adsorptionsschritte wurden in einer Petrischale durchgeführt, in der das Reflexionselement auf zwei Si-Wafern gelegt wurde, so dass die zu benetzende Fläche für die jeweiligen Lösungen leicht zugänglich war (siehe Abbildung 3.2). Die Adsorptions- und Waschschrte wurden analog wie in Punkt 3.2.4.1 beschrieben durchgeführt.

3.2.4.13 Temperatureffekt auf die Struktur von Insulin in Multischichten (ATR-FTIR-Spektroskopie)

Zur Untersuchung der Sekundärstrukturänderung des in Multischichten eingebetteten Insulins wurden ATR-FTIR-Messungen durchgeführt. Vor dem Aufbau einer Multischicht auf einem Si-Kristall wurde zunächst ein Untergrund mit D₂O bei pD 2.1 und 0.1 M NaCl bei einer Temperatur von 70°C gemessen. Anschließend wurde die Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃

auf dem internen Reflexionselement adsorbiert. Nach dem Aufbau der Multischicht wurde der Si-Kristall in die ATR-Probenhalterung eingebaut und D₂O mit 0.1 M NaCl und pD 2.1 (pD = gemessener pH-Wert + 0.4) in die Probenkammer eingefüllt. Die Dauer der Messungen betrug 17 Stunden, wobei eine konstante Temperatur von 70°C eingestellt wurde.

Im weiteren Versuch wurde die NaCl-Konzentration der DCI-Lösung von 0.1 auf 0.5 M erhöht. Es wurde erneut die Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ auf Si abgeschieden und die IR-Absorption der Probe bei 70 °C über eine Dauer von 17 Stunden verfolgt.

Eine temperaturinduzierte Aggregation wurde ebenfalls in der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₃ in Gegenwart von D₂O bei pD 2.1 und einem 0.5 M NaCl-Zusatz untersucht. Es erfolgte ebenfalls eine Messung bei einer Temperatur von 70°C für eine Dauer von 17 Stunden.

3.2.4.14 Amid-I'-Bande von Insulinkeimen (ATR-FTIR-Spektroskopie)

Um eine keiminduzierte Aggregation des eingebetteten Insulins zu untersuchen, wurde zunächst die Doppelschicht PDDA-PSS auf einem Si-Kristall adsorbiert. Im Anschluss wurde eine Insulinkeimlösung mit einer Konzentration von 0.1 mg/mL in DCI mit einem pD-Wert von 2.1 und einem 0.5 M NaCl-Zusatz in die Probenkammer gegeben, um die Spektren der reinen Insulinkeime zu erhalten und eine eventuelle zeitliche Änderung zu verfolgen. Es wurde bei 25°C die Amid-I'-Bande für eine Dauer von 14 Stunden verfolgt.

3.2.4.15 Effekt von Insulinkeimen auf die Struktur von Insulin in oder auf Multischichten (ATR-FTIR-Spektroskopie)

Weiterhin wurde eine Multischicht bestehend aus PDDA-PSS-(Ins-HA)₃ auf Silicium adsorbiert und die oben erwähnte Insulinkeimlösung hinzugegeben. Die IR-Absorption wurde über einen Zeitraum von 17 Stunden bei einer Temperatur von 25 °C verfolgt.

Weiterhin wurde untersucht, wie sich die Struktur der im letzten Adsorptionsschritt abgeschiedenen Insulinschicht in Gegenwart von Insulinkeimen verändert. Zu diesem Zweck wurde die Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₂-Ins auf Silicium abgeschieden und anschließend eine Insulinkeimlösung mit einer Konzentration von 0.1 mg/mL, einem pD von 2.1 und einem 0.1 M NaCl-Zusatz zur Probenkammer gegeben. Eine analoge Messung wurde ebenfalls mit der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₂-Ins unter gleichen Bedingungen durchgeführt.

3.2.4.16 Visualisierung von Polyelektrolyt-Insulinmultischichten auf Deckgläsern (TIRF-Mikroskopie)

Zur Untersuchung der Aggregation des in Multischichten eingebetteten Insulins wurden neben nicht markierten auch fluoreszenzmarkierte Insulinmoleküle auf eine feste Grenzfläche adsorbiert. Der Aufbau der Polyelektrolyt-Insulinmultischichten erfolgte auf Deckgläsern mit einer Dicke von 0.17 mm, welche zuvor mit Ethanol gründlich gereinigt wurden. Die Präparation der Multischichten erfolgte wie in Punkt 3.2.4.1 mit den in der Tabelle 3.4 beschriebenen Lösungen. Die Deckgläser wurden komplett in die jeweiligen Lösungen eingetaucht und nach entsprechenden Adsorptions- und Waschschritten in eine Deckglashalterung eingebaut. Das fluoreszenzmarkierte Insulin wies einen Markierungsgrad I von 1:300 auf. Die Fluoreszenzmarkierung von Insulin wird in Punkt 3.2.2 beschrieben. Alle mikroskopischen Bilder wurden bei Raumtemperatur aufgenommen.

Zunächst wurden die Multischichten PDDA-PSS-Ins_{Alexa}, PDDA-PSS-Ins_{Alexa}-PSS und PDDA-PSS-Ins_{Alexa}-PSS-Ins_{Alexa} auf einem Deckglas adsorbiert, um die Verteilung des Insulins auf der Grenzfläche zu beobachten. Die Verteilung des Insulins wurde ebenfalls qualitativ für die hyaluronathaltige Multischicht PDDA-PSS-Ins_{Alexa}-HA untersucht.

3.2.4.17 Insulinkeiminduzierte Aggregation von Insulin in Multischichten (TIRF-Mikroskopie)

Um eine keiminduzierte Aggregation von Insulin zu untersuchen, wurden die Multischichten PDDA-PSS-Ins_{Alexa}, PDDA-PSS-Ins_{Alexa}-PSS, PDDA-PSS-(Ins_{Alexa}-PSS)₂, PDDA-PSS-Ins_{Alexa}-HA und PDDA-PSS-Ins_{Alexa}-HA-Ins_{Alexa} auf Deckgläser adsorbiert und anschließend jeweils eine Insulinkeimlösung mit einer Konzentration von 0.5 mg/mL, einem NaCl-Zusatz von 0.1 M NaCl und pH 2.1 hinzugegeben. Wichtig ist zu erwähnen, dass die Insulinkeime keine Fluoreszenzmarkierung aufweisen.

3.2.4.18 Insulinkeiminduzierte Aggregation von Insulin in Multischichten (konfokale Mikroskopie)

Die Untersuchung der Aggregation von Insulin erfolgte auch mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie, in gleicher Weise wie mit der bereits beschriebenen TIRF-Mikroskopie. Es wurden ebenfalls Deckgläser mit einer Dicke von 0.17 mm und eine Deckglashalterung verwendet. Vor dem Aufbau einer Multischicht wurde zunächst eine mit Alexa Fluor 488 fluoreszenzmarkierte Insulinlösung mit einer Konzentration $c(\text{Ins}_{\text{Alexa}}) = 0.1 \text{ mol/L}$, einem 0.05 M NaCl-Zusatz und einem pH – Wert von 3.0 auf ein Deckglas gegeben. Der Markierungsgrad betrug $l = 1:300$. Die Adsorption erfolgte für eine Dauer von 15 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte nach mehreren Waschrissen mit HCl bei pH 3 die Zugabe von 5 mL einer 0.1 mg/mL Insulinkeimlösung zur Probenkammer und nach weiteren 10 - 60 Minuten die Aufnahme der Bilder. Um die Aggregation von Insulin, welches die oberste Schicht in einer Multischicht darstellt, zu untersuchen, wurden die Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₂-Ins_{Alexa} und PDDA-PSS-(Ins-HA)₂-Ins_{Alexa} auf Quarz adsorbiert. Nur die letzte adsorbierte Schicht besteht aus fluoreszenzmarkiertem Insulin. Nach dem Aufbau der Multischicht wurden Waschrissen durchgeführt und anschließend 5 mL der bereits erwähnten Insulinkeimlösung zur Probenkammer hinzugegeben.

Im Gegensatz zu denjenigen Multischichten, bei denen Insulin letzte adsorbierte Schicht darstellt, wurden auch die Multischichten PDDA-PSS-(Ins-PSS)₂-(Ins_{Alexa}-PSS) und PDDA-PSS-(Ins-HA)₂-(Ins_{Alexa}-HA) hergestellt, bei denen Insulin eingebettet vorliegt. Dabei stellt das fluoreszenzmarkierte Insulin die vorletzte adsorbierte Schicht dar. Auch in diesem Fall wurde die Insulinkeimlösung zur den jeweiligen Multischichten gegeben.

3.2.5 Reinigung der Apparatur und Probenbehälter für Hochdruckmessungen

3.2.5.1 Reinigung von Quarzküvetten für die Hochdruck-Fluoreszenzspektroskopie und von Quarzplatten und –prismen für Hochdruck-TIRF-Spektroskopie

Die Reinigung der Quarzküvetten für die Hochdruck-Fluoreszenzspektroskopie erfolgte ebenfalls wie in Punkt 3.2.3.1 beschrieben. Auch die Reinigung der Quarzplatten und des -prismas für die Hochdruck-TIRF-Spektroskopie erfolgte in gleicher Art und Weise. Die

Quarzplatten weisen eine Abmessung von $4 \cdot 3 \text{ cm}^2$. Das Quarzprisma weist eine Tiefe von $t = 40 \text{ mm}$ und eine trapezförmige Grundfläche mit $l_1 = 30 \text{ mm}$, $l_2 = 21 \text{ mm}$ und $h = 15 \text{ mm}$ auf.

3.2.5.2 Reinigung der Hochdruckzellen für Fluoreszenzspektroskopie bzw. TIRF-Spektroskopie

Beide Arten von Hochdruckzellen verfügen über jeweils mehrere Schrauben, in welche die Fenster eingebaut und fixiert vorliegen. Durch das Entfernen dieser Schrauben ist eine schnelle und gründliche Reinigung mit Wasser und Spülmittel möglich.

3.2.6 Probenpräparation zur Untersuchung der Volumeneigenschaften von gelösten bzw. adsorbierten Proteinen mithilfe der Hochdruck-Fluoreszenzspektroskopie

3.2.6.1 Intrinsischen Druckeffekt auf N-Acetyl-L-tryptophanamid

Um die Druckabhängigkeit des freien Tryptophans, welches auch als natürlich vorkommende Sonde in vielen Proteinen dient, zu untersuchen, wurden Fluoreszenzspektren seines Derivats N-Acetyl-L-tryptophanamid (NATA) gemessen und ihre Änderungen bei steigenden hydrostatischen Drücken ermittelt. Zu diesem Zweck wurden bei Drücken von 1 bar bis 2.5 kbar Spektren von NATA in 10 mM Bistris-Puffer mit einer Konzentration von $c = 5.9 \text{ }\mu\text{M}$ (vergleiche SNase-Konzentration $c(\text{SNase}) = 0.1 \text{ mg/mL}$) bei pH 7 aufgenommen. Die Temperatur wurde mithilfe eines Wasserbads konstant auf $25 \text{ }^\circ\text{C}$ gehalten. Gemessen wurde die druckabhängige Änderung der NATA-Fluoreszenz auch in Gegenwart von 1, 2, 3, 4, 5 und 6 M Harnstoff sowie in Anwesenheit von Ludox AM ohne und mit 2 bzw. 4 M Harnstoff unter ansonsten gleichen Bedingungen. Ludox AM lag im Verhältnis von 1:100 (v/v) zur SNase-Lösung vor. Die gemessene Änderung der Fluoreszenzintensität bei $\lambda = 380 \text{ nm}$ wurden zur Korrektur der intrinsischen Druckeffekte von Tryptophanseitenketten in allen folgenden Proteinentfaltungskurven verwendet. Die Messungen der jeweiligen Spektren erfolgten nach einer Inkubationsdauer von mindestens 5 Minuten in Druckintervallen von 200 bar.

3.2.6.2 Bestimmung des Adsorptionsgrades von SNase bzw. Lysozym auf Ludox AM / AS

Zur Bestimmung des Adsorptionsgrades von SNase bzw. Lysozym auf den Silicapartikeln Ludox AM / AS wurde die *depletion method* angewandt. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, Proteine auf Nanopartikeln zu adsorbieren und anschließend eine Zentrifugation zur Trennung der Partikel von der Lösung durchzuführen. Anschließend wird UV-spektrometrisch die Proteinkonzentration des Überstands gemessen, wodurch dementsprechend auch der Adsorptionsgrad bestimmt werden kann. In dieser Arbeit wurden jeweils 3 mL der zu untersuchenden Proben angesetzt. Dabei lagen in allen gemessenen Proben SNase- bzw. Lysozymkonzentrationen von jeweils 0.1 mg/mL entweder im gelösten oder im adsorbierten Zustand vor. Gemessen wurden SNase in Lösung, SNase adsorbiert auf Ludox AM ohne bzw. mit 3 M Harnstoff, SNase auf Ludox AS, Lysozym in Lösung und Lysozym adsorbiert auf Ludox AM ohne bzw. mit 3 M Harnstoff. Im adsorbierten Zustand lag die Ludox AM- bzw. Ludox AS-Dispersion zur SNase-Lösung im Verhältnis von 1:100 (v/v) vor. Im Falle von Lysozym lag die Ludox AM-Dispersion zur Lysozym-Lösung im Verhältnis von 1:11 (v/v) vor. Für die Adsorption der Proteine auf den Nanopartikeln wurde jeweils eine Inkubationsdauer von mindestens 15 Minuten eingehalten. Alle Messungen erfolgten in einem 10 mM Bistris-Puffer bei pH = 7. Es wurden jeweils 3 mL Probenvolumen angesetzt und in die Zentrifugenröhrchen gefüllt. Nach einer Zentrifugationszeit von 60 min wurde vorsichtig der jeweilige Überstand entnommen und UV-Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich von 265-350 nm aufgenommen. Die Zentrifugation wurde mit einer Beschleunigung von 60000 g durchgeführt.

3.2.6.3 Volumeneigenschaften von SNase im gelösten Zustand

Zur Untersuchung der druckabhängigen Proteinentfaltung wurde SNase in 3 mL einer 10 mM Bistris-Pufferlösung gelöst, so dass eine Konzentration von $c(\text{SNase}) = 0.1 \text{ mg/mL}$ vorlag. Die druckabhängigen Fluoreszenzmessungen wurde bei pH 7 und einer konstanten Temperatur von 25 °C durchgeführt. In Intervallen von 200 bar wurden Fluoreszenzspektren von 1 bar bis zu einem maximalen Druck von 2.5 kbar aufgenommen. Vor jeder Messung eines Spektrums wurde eine Inkubationszeit von mindestens 20 Minuten eingehalten. Weiterhin wurden zu verschiedenen SNase-Lösungen unterschiedliche Mengen an Harnstoff von 0.5 und 1 M hinzugegeben, um den Entfaltungsdruck zu niedrigeren Drücken hin zu verschieben, so dass die

Intensitäten für den nativen bzw. komplett denaturierten Zustand der Proteinmoleküle ermittelt werden konnten. Nach der Zugabe von unterschiedlichen Harnstoffmengen lagen für alle Proben die gleiche Proteinkonzentration und der gleiche pH-Wert vor. Aufgenommen wurden Fluoreszenzspektren im Bereich von 300 bis 450 nm, wobei die Anregung bei $\lambda = 280$ nm erfolgte.

3.2.6.4 Volumeneigenschaften von SNase im adsorbierten Zustand

Um die Änderung des spezifischen Volumens adsorbierter Proteine zu bestimmen, wurden zu den kolloidalen Nanopartikeln Ludox AM bzw. Ludox AS eine SNase-Lösung im Verhältnis von 1:100 (v/v) hinzugegeben, so dass eine Proteinkonzentration von 0.1 mg/mL und ein Endvolumen von 3 mL bei einem pH-Wert von 7 vorlag. Für eine Konzentration von 0.1 mg/mL nehmen SNase-Moleküle in 100 mL Lösung eine Fläche von ca. 28 m² ein. Im Gegensatz zur Proteinfläche weisen die Nanopartikeln Ludox AM bzw. AS in jeweils 1 mL Dispersion in Bezug auf die erwähnte Konzentration eine Fläche von 80 m² bzw. 70 m² auf. Nach hinreichendem Schütteln der Probe wurde für die Adsorption von SNase-Molekülen auf den Nanopartikeln Ludox AM bzw. AS eine Inkubationsdauer von mindestens 15 Minuten eingehalten. Es wurde weiterhin ein von den Nanopartikeln und von der Ramanstreuung des Wassers resultierendes Untergrundspektrum aufgenommen. Zu diesem Zweck wurden die Nanopartikel Ludox AM bzw. Ludox AS zu 10 mM Bistris-Puffer im Verhältnis von 1:100 (v/v) gegeben und Fluoreszenzspektren im Bereich von 300 - 450 nm aufgenommen.

Das Untergrundspektrum der Ramanstreuung des Wassers und der Lichtstreuung, welche von den Nanopartikeln ausging, wurde anschließend von den jeweiligen Spektren der Proben subtrahiert. Auch für Messungen im adsorbierten Zustand wurden unterschiedliche Harnstoffzusätze hinzugegeben, um die mittleren Entfaltungsdrücke zu niedrigeren Drücken hin zu verschieben. Fluoreszenzspektren wurden ebenfalls im Wellenlängenbereich von 300 bis 450 nm aufgenommen. Die Anregungswellenlänge lag bei 280 nm.

3.2.6.5 Einfluss des pH-Werts auf die Volumeneigenschaften von SNase im gelösten bzw. adsorbierten Zustand

In weiteren Versuchen wurde der Einfluss des pH-Werts auf die druckabhängige Proteinfaltung von SNase im gelösten, aber auch im adsorbierten Zustand untersucht. Zunächst wurde eine 0.1 mg/mL SNase-Lösung in 10 mM Bistris-Puffer hergestellt und unterschiedliche pH-Werte von 6, 7, 10 und 11 eingestellt. Für Messungen im adsorbierten Zustand wurde wie zuvor beschrieben zu den kolloidalen Nanopartikeln Ludox AM-30 eine SNase-Lösung im Verhältnis von 1:100 (v/v) hinzugegeben, so dass eine finale Proteinkonzentration von 0.1 mg/mL und ein Endvolumen von 3 mL vorlag. Der pH-Wert wurde in unterschiedlichen Ansätzen von 6 auf 7, 8, 8.5, 9 und 10 variiert.

3.2.6.6 Präparation zur Untersuchung der Volumeneigenschaften von Lysozym im gelösten Zustand

Die Untersuchung der Volumenänderung von Lysozym erfolgte in gleicher Weise wie diejenige der SNase (siehe Punkt 3.2.6.5). Es wurden 3 mL einer 0.1 mg/mL Lysozymbilösung in 10 mM Bistris-Puffer bei pH 7 angesetzt. Nach dem Einfüllen der Probe und dem Zusammenbau der Hochdruck-Messzelle wurden Fluoreszenzspektren im Wellenlängenbereich von 300 bis 450 nm bei Drücken von 1 bar bis 2.5 kbar in 200 bar - Schritten bei einer konstanten Temperatur von 25 °C aufgenommen. Dabei wurde nach jeder Druckerhöhung eine Inkubationszeit von mindestens 20 Minuten eingehalten. Die Messung wurde ebenfalls mit verschiedenen Harnstoffzusätzen durchgeführt, wobei die Konzentrationen 3, 6 und 8 M betragen.

3.2.6.7 Präparation zur Untersuchung der Volumeneigenschaften von Lysozym im adsorbierten Zustand

Um die Änderung des spezifischen Volumens von adsorbiertem Lysozym zu bestimmen, wurde zu einer Ludox AM - Dispersion eine Lysozymbilösung im Verhältnis von 1:11 (v/v) hinzugegeben, so dass ein Endvolumen von 3 mL und eine finale Proteinkonzentration von 0.1 mg/mL vorlag. Wie auch bei den Experimenten im gelösten Zustand wurde ein 10 mM Bistris-Puffer verwendet. Alle folgenden Messungen mit Lysozym wurden bei einer Temperatur von

25 °C bei pH = 7 durchgeführt. Weitere Messungen mit jeweils unterschiedlichen Harnstoffzusätzen von 3, 6 und 8 M wurden unter ansonsten gleichen Bedingungen durchgeführt.

3.2.6.8 Präparation zur Untersuchung der Auswirkung des pH-Werts auf die Volumeneigenschaften von Lysozym im gelösten bzw. adsorbierten Zustand

Auch der Einfluss des pH-Wertes auf die Volumenänderung von Lysozym wurde untersucht. 3 mL einer 0.1 mg/mL Lysozymlösung wurden in 10 mM Bistris-Puffer bei jeweils unterschiedlichen pH-Werten von 8.6 bzw. 9.6 angesetzt und die Fluoreszenzspektren im Druckbereich von 1 bar bis 2.5 kbar in 200 bar - Schritten bei einer konstanten Temperatur von 25 °C aufgenommen. Zusätzlich wurde der Einfluss der pH-Wertes auf die Volumeneigenschaften von adsorbierten Lysozymmolekülen untersucht. Zu einer Ludox AM-Dispersion in 10 mM Bistris-Puffer wurde wie auch zuvor eine Lysozymlösung im Verhältnis von 1:11 (v/v) hinzugegeben, so dass das Endvolumen 3 mL und die finale Proteinkonzentration 0.1 mg/mL betrug. Dabei wurden bei unterschiedlichen Messungen jeweils pH-Werte von 8.5 und 9.6 eingestellt und die Fluoreszenzspektren im Druckbereich von 1 bar bis 2.5 kbar in 200 bar - Schritten bei einer konstanten Temperatur von 25 °C aufgenommen.

3.2.7 Präparation zur Untersuchung des Adsorptionsgrades von Lysozym mit Hilfe der Hochdruck-TIRF-Spektroskopie

3.2.7.1 Präparation zur Untersuchung des Phasenverhaltens von DOPC bzw. einer Mischung aus DOPC, DPPC und Cholesterin

Zur Verifizierung der Funktionstüchtigkeit der Hochdruck-TIRF-Zelle wurde beispielhaft die druckabhängige Membranstruktur von DOPC untersucht. Zu diesem Zweck wurden 3 µmol DOPC in 1.572 mL Chloroform gelöst und 6 nmol Laurdan hinzugegeben, so dass Laurdan zu DOPC im Verhältnis von 1:500 vorlag. Von dieser Lösung wurden nach gründlichem Durchmischen 100 µL mittig auf ein Quarzprisma pipettiert und das Chloroform verdampft. Anschließend wurde die Probenkammer mit entionisiertem Wasser befüllt und

Fluoreszenzspektren im Druckbereich von 1 bar bis 2.5 kbar in 200 bar – Schritten bei 25 °C aufgenommen. Spektren wurden im Wellenlängenbereich von 410 bis 520 nm aufgezeichnet, wobei die Anregungswellenlänge bei 390 nm lag. Nach jedem aufgezeichneten Spektrum wurde eine Inkubationszeit von 10 Minuten eingehalten. Diese Messung wurde ein weiteres Mal wiederholt.

Weiterhin wurde eine DOPC:DPPC:Cholesterin-Raftmischung im Verhältnis 1:2:1 hinsichtlich ihres Phasenverhaltens untersucht. Es wurde eine Lösung hergestellt, bei der 0.73 µmol DOPC, 1.46 µmol DPPC, 0.73 µmol Cholesterin und 5.8 nmol Laurdan in 0.2 mL Chloroform gelöst wurden. Diese Lösung wurde nach gründlichem Durchmischen anschließend 10fach mit Chloroform verdünnt. 100 µL dieser verdünnten Lösung wurden auf ein Prisma gegeben und das Chloroform bei Raumtemperatur verdampft. Die Probenkammer wurde mit Wasser gefüllt und Fluoreszenzspektren im Bereich von 410 bis 520 nm bei Drücken von 1 bar bis 2.5 kbar bei einer konstanten Temperatur von 25 °C aufgenommen. Die Anregungswellenlänge lag bei 390 nm. Nach jedem aufgezeichneten Spektrum wurde eine Inkubationszeit von 10 Minuten eingehalten.

3.2.7.2 Präparation zur Untersuchung des intrinsischen Druckeffekts auf Alexa Fluor 488

Zur Ermittlung des intrinsischen Druckeffekts des reinen Alexa Fluor 488 auf die Fluoreszenz wurde eine Lösung mit einer Konzentration von 20 nM in einem 10 mM Bistris - Puffer bei pH 7 hergestellt und Fluoreszenzspektren im Druckbereich von 1 bar bis 2.5 kbar mittels konventioneller Fluoreszenzspektroskopie aufgenommen. Nach jedem aufgezeichnetem Spektrum wurde eine Inkubationsdauer von 5 Minuten eingehalten. Die Fluoreszenzspektren wurden im Wellenlängenbereich von 505 bis 560 nm aufgenommen, wobei die Anregungswellenlänge bei 480 nm lag. Diese Emissionswellenlängen und Anregungswellenlänge wurden für alle folgenden Hochdruck-TIRF-Messungen mit Lysozym beibehalten. Der daraus resultierende intrinsische Druckeffekt wurde in allen folgenden Hochdruck-TIRF-Messungen berücksichtigt.

3.2.7.3 Präparation zur Untersuchung des Adsorptionsgrades von Lysozym unter hohen Drücken

Zur Untersuchung der Adsorptionseigenschaften von Proteinen unter hohen Drücken wurde mit Alexa Fluor 488 markiertes Lysozym ($\text{LyS}_{\text{Alexa}}$) auf einem Quarzprisma adsorbiert. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine Lysozymlösung mit einer Proteinkonzentration von 0.1 mg/mL in einem 10 mM Bistris-Puffer bei pH 7 hergestellt, wobei der Fluoreszenzmarkierungsgrad l 1:500 betrug. Nach einer Adsorptionsdauer von 15 Minuten wurde die $\text{LyS}_{\text{Alexa}}$ -Lösung vom Quarzprisma entfernt und anschließend mit 10 mM Bistris-Puffer bei pH 7 gründlich gewaschen, so dass nur eine Proteinschicht auf dem Substrat vorlag. Die Probenkammer der Hochdruck-TIRF-Zelle wurde mit der oben erwähnten Pufferlösung gefüllt und es wurden Fluoreszenzspektren im Druckbereich von 1 bar bis 2.5 kbar in 200 bar - Schritten bei einer Temperatur von 25 °C aufgenommen. Fluoreszenz wurde im Wellenlängenbereich zwischen 505 und 560 nm aufgezeichnet. Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 480 nm. Nach jedem aufgenommenen Spektrum wurde jeweils eine 20 minütige Inkubationsdauer eingehalten. Weiterhin erfolgten auch Messungen bei einem höheren Markierungsgrad von $l = 1:500$ ohne einen Harnstoffzusatz unter ansonsten gleichen Bedingungen.

3.2.7.4 Präparation zur Untersuchung des Adsorptionsgrades und des Adsorptionsvolumens von Lysozym unter hohen Drücken

Zur Untersuchung des Adsorptionsvolumens von Lysozym wurde die Probenkammer der Hochdruck-TIRF-Zelle mit einer $\text{LyS}_{\text{Alexa}}$ -Lösung mit einer Konzentration von 0.1 mg/mL in 10 mM Bistris-Puffer bei pH 7 befüllt. Der Markierungsgrad l betrug 1:500. Anschließend wurde zur Adsorption eine Inkubationsdauer von 15 Minuten bei Raumtemperatur eingehalten. Nach Verschließen der Probenkammer wurden in Gegenwart der 0.1 mg/mL $\text{LyS}_{\text{Alexa}}$ -Lösung bei Drücken von 1 bar bis 2.5 kbar Fluoreszenzspektren bei 25 °C aufgenommen. Auch hierbei wurden nach jedem aufgenommenen Spektrum jeweils eine 20 minütige Inkubationszeit aufgenommen. Weitere Messungen wurden in Gegenwart von chaotropem Harnstoff bei Konzentrationen von 1, 2, 3, 4, 5 und 6 M unter ansonsten gleichen Bedingungen durchgeführt. Um den Einfluss des kosmotropen Glycerins auf die Volumeneigenschaften und den Adsorptionsgrad zu untersuchen, wurden Proben mit Konzentrationen von 1, 2 und 3 M präpariert und unter ansonsten gleichen Bedingungen vermessen.

3.2.7.5 Präparation zur Untersuchung des pH-Effektes auf den Adsorptionsgrad und das Adsorptionsvolumen von Lysozym unter hohen Drücken

Der Einfluss des pH-Wertes auf den Adsorptionsgrad wurde ebenfalls unter gleichen Bedingungen wie in Punkt 3.2.7.4 beschrieben untersucht. Der pH-Wert des 10 mM Bistris-Puffers wurde auf jeweils 8, 9 und 10.4 mit Hilfe von NaOH eingestellt und in die Probenkammer gegeben. Fluoreszenzspektren wurde im Druckbereich von 1 bar bis 2.5 kbar in 200 bar - Schritten aufgenommen, wobei nach jedem aufgezeichnetem Spektrum eine Inkubationszeit von 20 Minuten eingehalten wurde.

3.2.7.6 Präparation zur Untersuchung der Auswirkung einer hydrophoben Grenzfläche auf den Adsorptionsgrad und das Adsorptionsvolumen von Lysozym unter hohen Drücken

Weiterhin wurden der druckabhängige Adsorptionsgrad und das -volumen von Lysozym auf einer hydrophoben Oberfläche untersucht. Zu diesem Zweck wurden Quarzprismen mit Poly(styrol) beschichtet. Es wurde zunächst eine Poly(styrol)-Lösung ($M_n \approx 50 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$) in Toluol mit einer Konzentration von 6 mg/mL hergestellt. In einer selbstangefertigten Halterung wurden die zu beschichtenden Quarzprismen mittig auf dem Ansaugstutzen des Spincoaters platziert und mittels Unterdruck fixiert. 300 μL der Poly(styrol)-Lösung wurden auf ein Prisma pipettiert. Anschließend erfolgte eine gleichmäßige Verteilung des Poly(styrol)s auf der vorgesehenen Fläche des Prismas bei 3000 Umdrehungen pro Minute. Das beschichtete Prisma wurde für mindestens 48 Stunden in einem Trockenschrank bei 110 °C getrocknet.

Eine 0.1 mg/mL mit Alexa Fluor 488 markierte Lysozymlösung (Markierungsgrad $l = 1:500$) in 10 mM Bistris-Puffer bei pH 7 wurde in die Probenkammer der Hochdruck-TIRF-Zelle gegeben. Die Lösung steht in direktem Kontakt zum Prisma, welches mit Poly(styrol) beschichtet wurde. Fluoreszenzspektren wurden im Wellenlängenbereich von 505 bis 560 nm aufgenommen, wobei die Anregung bei einer Wellenlänge von 480 nm lag. Nach jeder Druckerhöhung wurde eine Äquilibrierungszeit von 20 Minuten eingehalten. Spektren wurden im Druckbereich von 1 bar bis 2.5 kbar in 200 bar – Schritten aufgenommen.

3.3 Ablauf der Experimente zur Untersuchung der Polyelektrolyt-Insulinmultischichten

3.3.1 Ablauf der Röntgenreflektometrieexperimente

Um die Schichtdicke einer Polyelektrolyt-Insulinmultischicht zu untersuchen, wurde der beschichtete Si-Wafer in einer für das Röntgenreflektometrie hergestellten Probenkammer gelegt. Da XRR-Experimente an der Luft-Substrat-Grenzfläche erfolgen, wurden - falls nicht anders erwähnt - die Proben in einer luftdichten Probenkammer gehalten, um eine Austrocknung zu verhindern und eine konstante 100 %ige Luftfeuchtigkeit zu bewahren. Zu diesem Zweck wurde ein dünner Film aus entionisiertem Wasser auf dem Boden der Probenkammer aufgetragen, wobei die Probe auf einer Erhöhung auflag und nicht mit dem Wasser in direktem Kontakt stand. Alle in Punkt 3.2.4.1 erwähnten Proben wurden bei Raumtemperatur $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ vermessen. Messungen wurden mit einer Molybdän-Anode durchgeführt, welche Röntgenstrahlung mit einer Wellenlänge von 0.71 \AA (Mo-K_α) generiert. Nach der Justierung der Röntgenquelle und des Detektors relativ zur untersuchenden Probe wurden die Intensitäten der reflektierten Strahlung bis zu einem maximalen Winkel $2\theta = 3 \text{ }^\circ$ gemessen, wobei 600 Datenpunkte aufgenommen wurden. Die Rohdaten wurden zu Reflektivitätskurven konvertiert, wobei die Intensitäten der reflektierten Strahlung einer Messreihe auf die jeweilige anfängliche Intensität normiert wurden. Zusätzlich wurden die Daten für die Grundfläche des einfallenden Röntgenstrahls, welche bei kleinen Einfallswinkeln die Probenfläche übersteigt, korrigiert. Die Reflektivitäten $R(Q)$ wurden als Funktion des Wellenvektorübertrags Q aufgetragen. Die Auswertung erfolgte über die Software Parratt32 (Version 1.6), welche vom Helmholtz-Zentrum Berlin herausgegeben wird. Alle in Punkt 3.2.4.1 erwähnten Multischichten wurden mittels der Röntgenreflektometrie hinsichtlich ihrer Dicke, ihrer Rauigkeit und ihres Streulängendichteprofiles charakterisiert.

3.3.2 Ablauf der ATR-FTIR-Spektroskopie-Experimente

Vor dem Aufbau einer Multischicht auf einem Siliciumeinkristall erfolgte zunächst die Aufnahme eines Untergrundspektrums in Gegenwart von D_2O bei entsprechender Temperatur. Zu diesem Zweck wurde der Siliciumeinkristall in die vorgesehene Probenhalterung des FTIR-

Spektrometers fixiert und verschlossen. Nach Einfüllen von D₂O in die Probenkammer und Einstellung der entsprechenden Temperatur erfolgte die Aufnahme des Untergrundspektrums mit einer Auflösung von 2 cm⁻¹. Dabei wurden sukzessive 128 Interferogramme gemessen und gemittelt. Das interne Reflexionselement wurde anschließend aus der Probenhalterung entnommen und wie in Punkt 3.2.4.10 beschrieben, mit den zu untersuchenden Multischichten beschichtet. Nach dem Aufbau der Beschichtung erfolgte der Einbau in die Probehalterung. Die Messung erfolgte in gleicher Weise wie bei der Aufnahme des Untergrundspektrums. Vor der Messung wurde D₂O mit entsprechendem pD-Wert in die Probenkammer gefüllt, so dass die zu untersuchende Multischicht deuteriert vorlag. Das Untergrundspektrum wurde jeweils von allen gemessenen Spektren subtrahiert. Zur Prozessierung der Spektren wurde die Software GRAMS (Thermo Fischer Scientific) verwendet. Die Sekundärstrukturanalyse erfolgte durch die Anpassung von fünf Subbanden, die als gemischte Gauß-Lorentz-Funktionen dargestellt wurden, an die Amid-I' Bande. Die anfänglichen Positionen der Subbandenmaxima entsprechen denjenigen Wellenzahlen, die sich sowohl aus einer FSD als auch aus der 2. Ableitung eines Spektrums übereinstimmend ergeben (siehe Punkt 2.3.3.4). Während der Bandenanpassung wurden die Positionen der Subbandenmaxima nicht mehr als $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$ verschoben.

3.3.3 Ablauf der TIRF-Mikroskopie-Experimente

In einer Deckglashalterung wurde ein mit einem Adsorbat beschichtetes Deckglas so fixiert und verschraubt, dass eine wasserdichte Probenkammer vorlag, in welche eine Probenlösung oder Wasser hinzugegeben werden konnte. Die Deckglashalterung wurde mittig auf dem Objektiv platziert. Von allen in den Punkten 3.2.4.16 und 3.2.4.17 aufgeführten Proben wurden Bilder bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) aufgenommen.

3.3.4 Ablauf der konfokalen Mikroskopie-Experimente

Die zu untersuchende Polyelektrolyt-Insulinmultischicht wurde auf einem Deckglas präpariert und in die Deckglashalterung fixiert (vgl. 3.3.3), welche anschließend mittig auf dem Objektiv des konfokalen Mikroskops platziert wurde. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt (ca. 20 °C). Alle in Punkt 3.2.4.18 aufgeführten Proben wurden in gleicher Weise

vermessen. Die Untersuchungen der Polyelektrolyt-Insulinmultischichten erfolgten am *Micro Time 200* der Firma *Pico Quant*, welcher im *time-correlated single photon counting* (TCSPC) – Modus arbeitet. Die Hauptkomponenten dieses Geräts, welche in dieser Untersuchung verwendet wurden, waren der *Pico TA* Diodenlaser als Lichtquelle, ein dichroitischer Spiegel (z488/561lrpc von AHF), ein inverses Mikroskop (Olympus IX71), ein Wasserimmersionsobjektiv (Olympus, 60x, NA 1.2), welches auf einem verstellbaren Piezotisch befestigt ist, eine 30 μm Lochblende und eine *single-photon avalanche* Diode (SPAD) als Detektor.

3.4 Ablauf der Experimente zur Untersuchung der Volumeneigenschaften gelöster und adsorbierter Proteine

3.4.1 Ablauf der Hochdruck-Fluoreszenzspektroskopie-Experimente

Die Fluoreszenzspektren wurden mittels des K2 Fluorometers der Firma ISS (Champaign, Illinois, USA) im *photon-counting*-Modus aufgenommen. Alle Spektren wurden im Wellenlängenbereich von 300 bis 450 nm aufgenommen, wobei die Anregung bei $\lambda = 280$ nm mittels einer Xe-Bogenlampe erfolgte. Die Hochdruckexperimente wurden in einer Hochdruckzelle der Firma ISS durchgeführt, welche mit druckbeständigen Quarzfenstern bis zu einem Maximaldruck von 3000 bar bestückt war. Die jeweiligen in Punkt 3.2.7 beschriebenen Probenlösungen wurden in einer für die Hochdruckzelle angefertigten Quarzküvette mit einem Volumen von 1 mL pipettiert und in einer Küvettenhalterung fixiert. Zur Trennung der Probenlösung vom Druckmedium wurden die Quarzküvetten mithilfe einer druckübertragenden *Dura Seal*-Folie und einem O-Ring jedes Mal so verschlossen, dass sichtlich keine Luftblasen in der Probe vorhanden waren. Als Druckmedium wurde Ethanol verwendet, um eine Korrosion der Hochdruckzelle zu vermeiden und ihre Langlebigkeit zu gewährleisten. Eine konstante Temperatur von 25 °C bei allen Messungen wurde durch ein Wasserbad gewährleistet. Die hohen hydrostatischen Drücke wurden mittels einer handbetriebenen Spindelpresse der Firma HiP (High Pressure Equipment Company, Erie, Pennsylvania, USA), welche einen Maximaldruck von ca. 4.1 kbar erzeugen kann, generiert und über eine Druckkapillare in die Hochdruckzelle transmittiert. Als Drucksensor wurde ein Manometer der Firma Heise (Ashcroft Instruments GmbH, Baesweiler, Germany), welche für einen Maximaldruck von 4 kbar ausgelegt ist, verwendet. Nach jeder Druckerhöhung wurde eine

Äquilibrierungszeit von mindestens 20 Minuten eingehalten. Die experimentellen Fehler wurden aus replizierten Messungen und den Abweichungen der Kurvenanpassungen ermittelt.

3.4.2 Ablauf der Hochdruck-TIRF-Spektroskopie-Experimente

Zur Messung des Adsorptionsgrads und des -volumens der in Punkt 3.2.7 beschriebenen Proben wurde die in Punkt 2.3.4 beschriebene Gummimanschette auf ein Quarzprisma gelegt und per Hand leicht auf das Substrat gepresst, so dass ein wasserdichtes Probenreservoir vorlag. Anschließend wurde 1 mL einer Probenlösung vorsichtig in die Probenkammer pipettiert, so dass ein konvexer Meniskus vorlag. Dabei war zu beachten, dass keine Luftblasen innerhalb der Probenflüssigkeit auftraten. Mit einem Quarzplättchen wurde sandwichartig die Probenkammer verschlossen und in die in Punkt 2.3.4 beschriebene Metallhalterung fixiert und zugeschraubt. Nach dem Befüllen und dem Zusammenbau wurde die Probenküvette in die Hochdruckzelle gedrückt und mit Hilfe eines speziell angefertigten Werkzeugs durch vorsichtiges Rotieren so justiert, dass die an der zur untersuchenden Grenzfläche reflektierte Strahlung aus dem dafür vorgesehenen Fenster austrat. Die mit Druckmedium, welches in diesem Fall Wasser darstellte, befüllte Hochdruckzelle wurde anschließend mit der oberen Schraube, an der die Metallkapillare fixiert wurde, verschlossen. Hydrostatische Drücke wurden wie auch bei der Hochdruck-Fluoreszenzspektroskopie (siehe Punkt 3.4.1) mithilfe einer Spindelpresse generiert und über die Metallkapillare in die Probenkammer transmittiert. Eine konstante Temperatur von 25 °C wurde mithilfe eines Wasserbads erreicht.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Aufbau und Aggregationsverhalten von Insulin in Polyelektrolyt-Insulinmultischichten¹⁶⁴

4.1.1 Aufbau der Multischichten charakterisiert mit Hilfe der Röntgenreflektometrie

Die Schichtdicke von Polyelektrolyt-Protein-Multischichten ist auf der einen Seite abhängig von den Konzentrationen der Polyelektrolyt- bzw. Proteinlösung, auf der anderen Seite ist sie abhängig von der Ionenstärke in der Lösung. Die in Punkt 3.2.4.1 beschriebenen Multischichten wurden hinsichtlich ihrer Schichtdicke, ihres Streulängendichteprofiles und ihrer Rauigkeit untersucht. Die Dauer jeder Messung betrug 40 min.

Tabelle 4.1. Abgeschiedene (Multi-)schicht auf unterschiedlichen Wafern.

| Multischichten auf unterschiedlichen Si-Wafern | Schichtdicke $d / \text{Å}$ | Streulängendichte $\rho / \text{Å}^{-2}$ | Rauigkeit $\sigma / \text{Å}$ |
|--|-----------------------------|--|-------------------------------|
| PDDA | 31.91 | $7.69 \cdot 10^{-6}$ | 22.125 |
| PDDA-PSS | 38.76 | $8.36 \cdot 10^{-6}$ | 12 |
| PDDA-PSS-Ins | 53.88 | $9.40 \cdot 10^{-6}$ | 5.127 |
| PDDA-PSS-Ins-HA | 42.92 | $9.39 \cdot 10^{-6}$ | 14.164 |
| PDDA-PSS-Ins-HA (Repr.) | 42.27 | $8.92 \cdot 10^{-6}$ | 6.14 |
| PDDA-PSS-Ins-HA-Ins | 59.56 | $1.31 \cdot 10^{-5}$ | 7.092 |
| PDDA-PSS-(Ins-HA) ₃ | 90.91 | $1.26 \cdot 10^{-5}$ | 9.118 |
| PDDA-PSS-(Ins-HA) ₄ | 51.4 | $1.26 \cdot 10^{-5}$ | 8.292 |

Die in Tabelle 4.1 dargestellten Adsorbate wurden mit Hilfe der in Tabelle 3.1 aufgeführten Lösungen unabhängig voneinander hergestellt. Zur Auswertung der Reflektivitätskurven wurde für den Untergrund ein konstanter Wert für die Reflektivität von $R(Q) = 1 \cdot 10^{-8}$ abgeschätzt (siehe Abbildung 4.1). Durch das Anpassen eines einfachen Grenzflächenstrukturmodells an die gemessenen Reflektivitätsdaten konnten die Streulängendichten der Grenzflächenstrukturen bestimmt werden. Alle Strukturparameter wurden aus den Kurvenanpassungen ermittelt. Der Aufbau der in Tabelle 4.1 dargestellten Schichten erfolgte jeweils auf einem neuen sauberen Si-Wafer. Es ist zu erkennen, dass nach dem dritten Adsorptionsschritt die Multischicht nicht weiter wächst, so dass weitere Schichten nicht mehr in gewünschter Weise abgeschieden werden konnten. Im Falle der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₄ liegt eine relativ geringe

Schichtdicke von 51.4 Å vor. Aufgrund der Abwesenheit von NaCl in der Insulinlösung ist ein hier offensichtlich kontinuierlicher Aufbau einer Multischicht nicht möglich. Dieses Verhalten ist vermutlich auf die verstärkte Coulomb-Repulsion der bei pH 2.1 positiv geladenen Insulinmoleküle zurückzuführen.

Die Gegenwart von 0.1 M NaCl in der Insulinlösung sorgt für eine partielle Abschirmung von intermolekularen Coulomb-Wechselwirkungen. Weiterhin wurde der pH-Wert der Insulinlösung von 2.1 auf 3 erhöht, so dass insgesamt weniger positive Ladungen vorliegen. Die in der Tabelle 4.2 aufgeführten Multischichten wurden mit den in der Tabelle 3.2 dargestellten Lösungen hergestellt. Stichprobenartig wurden zwei Si-Wafer mit jeweils drei Doppelschichten (PDDA-PSS-(Ins-PSS)₂) untersucht.

Tabelle 4.2: Abgeschiedene Multischichten in Anwesenheit von NaCl (0.1 M) in der Insulinlösung.

| Multischichten auf unterschiedlichen Si-Wafern | Schichtdicke $d / \text{Å}$ | Streulängendichte $\rho / \text{Å}^{-2}$ | Rauigkeit $\sigma / \text{Å}$ |
|--|-----------------------------|--|-------------------------------|
| PDDA-PSS-(Ins-PSS) ₂ | 125.93 | $9.39 \cdot 10^{-6}$ | 9.188 |
| PDDA-PSS-(Ins-PSS) ₂ (Reproduktion) | 104.72 | $9.97 \cdot 10^{-6}$ | 7.686 |

Es ist zu erkennen, dass die Schichtdicken der drei Doppelschichten bei 125.93 Å bzw. 104.72 Å liegen. Der Aufbau der Polyelektrolyt-Insulinmultischichten ist dementsprechend gut reproduzierbar. Diese Werte repräsentieren einen größeren Adsorptionsgrad, im Vergleich zu dem in Abwesenheit von NaCl bestimmten. Durch geringere Coulomb-Repulsionen des Insulins in Anwesenheit von 0.1 M NaCl ist aufgrund geringerer lateraler Wechselwirkungen eine dichtere Packung der adsorbierten Moleküle und somit eine verstärkte Adsorption möglich. Der Einfluss eines größeren NaCl-Zusatzes in der Insulinlösung auf den Adsorptionsgrad wurde ebenfalls untersucht. Es wurde eine zu Tabelle 4.2 analoge Multischicht hergestellt, jedoch mit 0.2 M NaCl in der Insulinlösung. Werden die in der Tabelle 4.2 dargestellten Schichtdicken der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₂ mit denen in der Tabelle 4.3 verglichen, so ist keine signifikante Änderung zu erkennen. Eine Erhöhung der NaCl Konzentration von 0.1 auf 0.2 M bewirkt also keine Änderung in der Schichtdicke. Auch in diesem Fall zeigt sich eine hohe Reproduzierbarkeit für den Aufbau einer Polyelektrolyt-Insulinmultischicht. Für die Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₃ resultiert unter diesen Bedingungen eine Schichtdicke von 130.55 Å, was einen wesentlich größeren Wert darstellt als für die in der Tabelle 4.1 genannten Multischicht, die ohne NaCl-Zusatz präpariert wurde.

Tabelle 4.3: Nach weiterer Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 0.2 M in der Insulinlösung zeigt sich kein weiterer Anstieg der Schichtdicke.

| Multischichten auf unterschiedlichen Si-Wafern | Schichtdicke $d / \text{\AA}$ | Streulängendichte $\rho / \text{\AA}^{-2}$ | Rauigkeit $\sigma / \text{\AA}$ |
|--|-------------------------------|--|---------------------------------|
| PDDA-PSS-(Ins-PSS) ₂ | 120.37 | $9.80 \cdot 10^{-6}$ | 8.802 |
| PDDA-PSS-(Ins-PSS) ₂ (Reproduktion) | 101.32 | $1.03 \cdot 10^{-5}$ | 13.105 |
| PDDA-PSS-(Ins-HA) ₃ | 130.55 | $1.20 \cdot 10^{-5}$ | 39.236 |

Im Folgenden wurde die NaCl-Konzentration der Insulinlösung auf 0.05 M reduziert und die Messdauer auf 13 Minuten verringert, um eventuelle Strahlenschäden an der Probe zu minimieren. Weiterhin wurde für die Hyaluronsäurelösung ein pH-Wert von 4.5 eingestellt. In Abbildung 4.1 sind alle Reflektivitätskurven der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₄ in einem Diagramm dargestellt. Deutlich zu erkennen sind die Kiessig-Oszillationen, welche aus der Interferenz der an der obersten und der untersten Grenzfläche der Multischicht reflektierten Strahlen resultiert. Von der untersten bis zur obersten dargestellten Reflektivitätskurve ist der sukzessive Aufbau der Multischicht gezeigt.

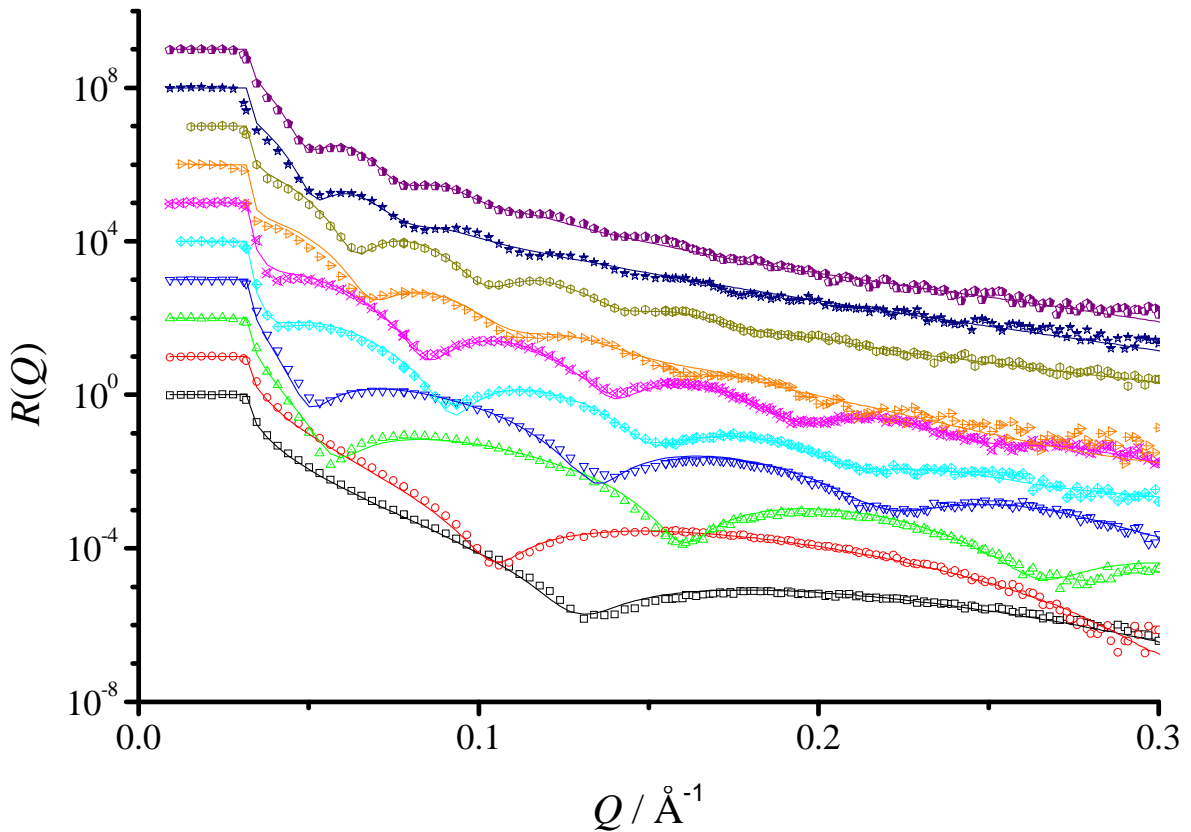


Abbildung 4.1. Reflektivitätskurven vom Aufbau der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₄ auf Si. Von unten nach oben zeigen die Kurven die sukzessiv adsorbierten Schichten. Die Reflektivitätskurven sind zur besseren Übersicht jeweils um einen Faktor 10 vertikal verschoben.

Zur besseren Übersicht sind die Reflektivitätskurven vertikal jeweils um einen Faktor 10 verschoben. Die Punkte stellen die gemessenen Daten und die durchgezogenen Linien die berechneten Reflektivitätskurven dar. Präpariert wurde die Multischicht mit den in der Tabelle 3.5 angegebenen Lösungen. Mit wachsender Schichtdicke ist eine deutliche Verkleinerung der Abstände zwischen den Reflektivitätsminima zu erkennen. Der Abstand zweier Minima ΔQ ist proportional zur reziproken Schichtdicke $1/d$. Der sukzessive Aufbau der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₄ auf einem Si-Wafer zeigt einen kontinuierlichen Anstieg der Schichtdicke bis zu einem Wert von 207 Å (siehe Tabelle 4.4). Nach der Erhitzung der Multischicht auf eine Temperatur von 70 °C für eine Dauer von einer Stunde ist zu erkennen, dass die Schichtdicke auf einen Wert von 156 Å abfällt (siehe Tabelle 4.4 letzte Zeile). Das entspricht einer Abnahme von ca. -25 %. Durch das Erhitzen der Probe werden adsorbierte Moleküle dichter gepackt, wobei leichte Konformationsänderungen der Insulinmoleküle erfolgen

Tabelle 4.4. Kontinuierlicher Anstieg der Schichtdicke einer Multischicht aus Insulin und PSS.

| Aufbau einer Multischicht auf einem Si-Wafer | Schichtdicke $d / \text{Å}$ | Streulängendichte $\rho / \text{Å}^{-2}$ | Rauigkeit $\sigma / \text{Å}$ |
|---|-----------------------------|--|-------------------------------|
| PDDA | 24.92 | $1.23 \cdot 10^{-5}$ | 6.463 |
| PDDA-PSS | 31 | $1.16 \cdot 10^{-5}$ | 6.211 |
| PDDA-PSS-Ins | 59.3 | $9.30 \cdot 10^{-6}$ | 6.2 |
| PDDA-PSS-Ins-PSS | 70.13 | $9.81 \cdot 10^{-6}$ | 7.874 |
| PDDA-PSS-Ins-PSS-Ins | 103.44 | $9.39 \cdot 10^{-6}$ | 10.65 |
| PDDA-PSS-(Ins-PSS)₂ | 113.19 | $8.11 \cdot 10^{-6}$ | 9.462 |
| PDDA-PSS-(Ins-PSS)₂-Ins | 143.62 | $9.3 \cdot 10^{-6}$ | 16.0 |
| PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ | 154.79 | $8.41 \cdot 10^{-6}$ | 14.119 |
| PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃-Ins | 201.94 | $9.5 \cdot 10^{-6}$ | 21.3 |
| PDDA-PSS-(Ins-PSS)₄ | 207.32 | $8.70 \cdot 10^{-6}$ | 22.4 |
| PDDA-PSS-(Ins-PSS)₄ nach Erhitzen | 155.79 | $8.05 \cdot 10^{-6}$ | 23.667 |

In Abbildung 4.2 sind die Schichtdicken der sukzessiv aufgebauten Multischicht als Funktion der Anzahl der adsorbierten Schichten dargestellt. Es ist ein linearer Anstieg der Schichtdicke zu erkennen. Die Schichtdicke steigt nach jedem Adsorptionsschritt, bei welchem Insulin abgeschieden wurde, signifikant stärker an als bei der Abscheidung von PSS. Für abgeschiedenes Insulin steigt die Schichtdicke um ca. 30 – 40 Å an, was im Bereich der Größe eines Insulinmoleküls ($40 \times 20 \times 10 \text{ Å}^3$) liegt.

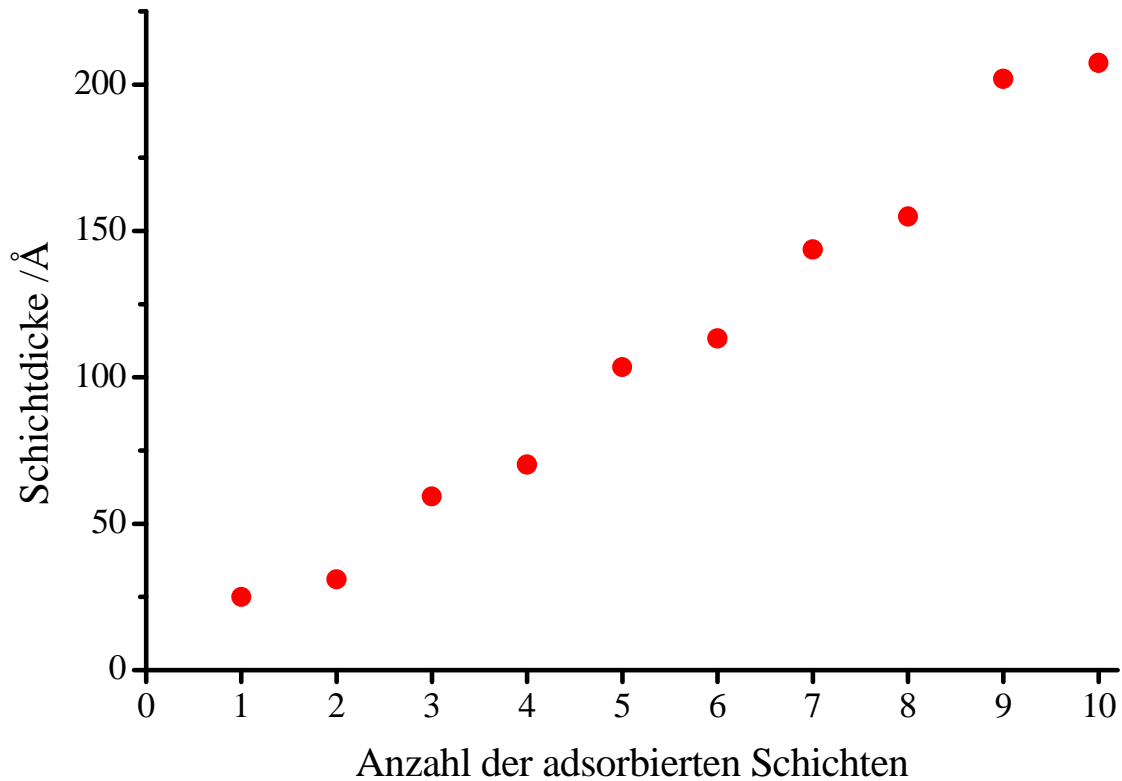


Abbildung 4.2. Der Aufbau der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₄ weist ein lineares Wachstum mit der Anzahl der abgeschiedenen Schichten auf.

Weiterhin besitzt Insulin eine berechnete Nettoladung von +5 bei einem pH-Wert von 3, bei dem es adsorbiert wurde. Demnach kann ein einzelnes Insulinmolekül 5 negativ geladene monomere Einheiten von PSS kompensieren.

Analoge Messungen wurden für die Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₄ durchgeführt (siehe Tabelle 4.5). In Abbildung 4.3 sind die Reflektivitätskurven für den Aufbau der Multischicht dargestellt. Aufgebaut wurde die Multischicht mit den in der Tabelle 3.5 angegebenen Lösungen. Der sukzessive Aufbau der Multischicht weist auch in diesem Fall einen kontinuierlichen Anstieg der Schichtdicke bis zu einem Wert von 181 Å auf. Nach dem einstündigen Erhitzen auf eine Temperatur von 70 °C liegt die Schichtdicke bei einem Wert von 112 Å, was einem Absinken von etwa -37.8 % entspricht (siehe Tabelle 4.5 letzte Zeile). Diese Abnahme ist im Gegensatz zur Multischicht mit PSS deutlich höher, was vermutlich mit der relativen flexiblen und wasserbindenden Struktur der HA zusammenhängt, welche durch das Erhitzen dichter wird und kondensiert. In Abbildung 4.4 ist die Schichtdicke als Funktion der Anzahl der adsorbierten Schichten dargestellt. Auch in diesem Fall zeigt sich ein lineares Wachstum der Schichtdicke.

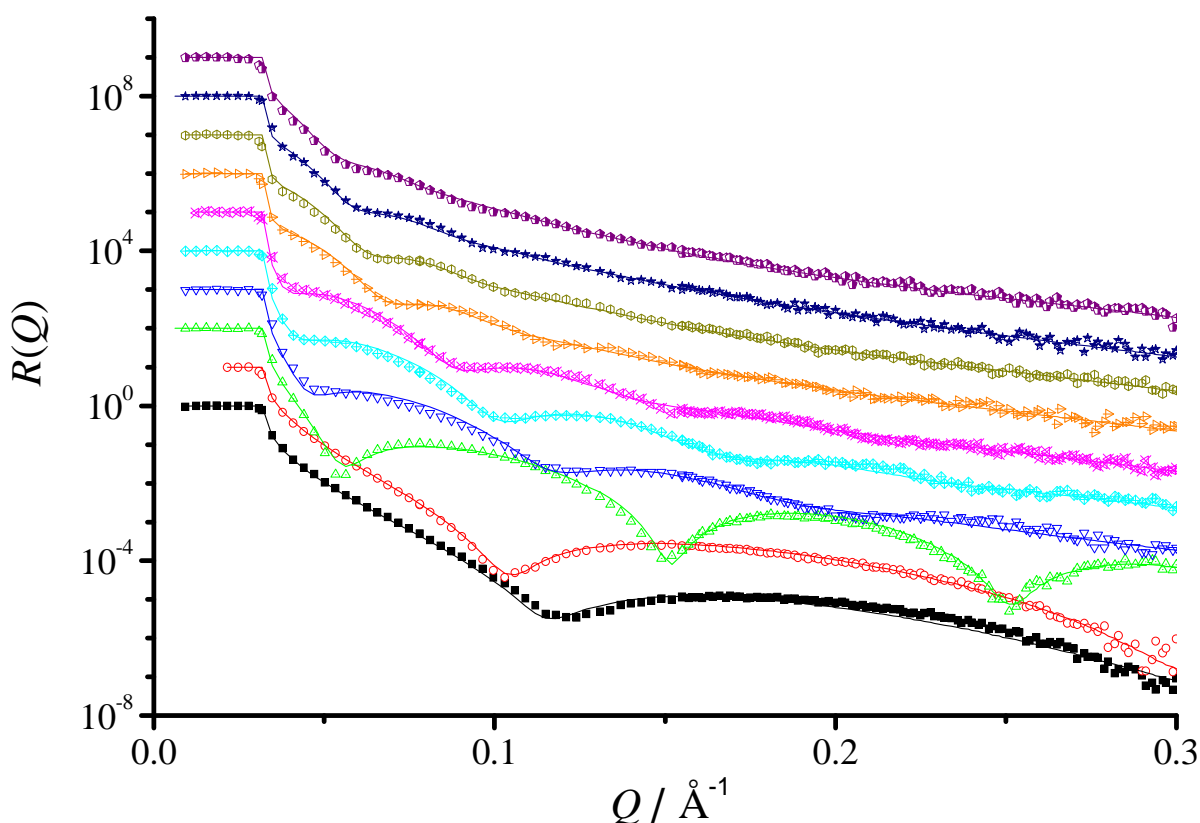


Abbildung 4.3. Reflektivitätskurven vom Aufbau der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₄ auf Si. Von unten nach oben zeigen die Kurven die sukzessiv adsorbierten Schichten. Die Reflektivitätskurven sind zur besseren Übersicht jeweils um einen Faktor 10 vertikal verschoben.

Tabelle 4.5. Kontinuierlicher Anstieg der Schichtdicke einer Multischicht aus Insulin und Hyaluronsäure.

| Aufbau einer Multischicht auf einem Si-Wafer | Schichtdicke $d / \text{Å}$ | Streulängendichte $\rho / \text{Å}^{-2}$ | Rauigkeit $\sigma / \text{Å}$ |
|--|-----------------------------|--|-------------------------------|
| PDDA | 27.69 | $9.68 \cdot 10^{-6}$ | 7.36 |
| PDDA-PSS | 31.17 | $9.1 \cdot 10^{-6}$ | 5.44 |
| PDDA-PSS-Ins | 62.74 | $9.41 \cdot 10^{-6}$ | 5.52 |
| PDDA-PSS-Ins-HA | 79.65 | $9.24 \cdot 10^{-6}$ | 13.001 |
| PDDA-PSS-Ins-HA-Ins | 92.85 | $8.90 \cdot 10^{-6}$ | 12.636 |
| PDDA-PSS-(Ins-HA) ₂ | 106.45 | $9.91 \cdot 10^{-6}$ | 17.484 |
| PDDA-PSS-(Ins-HA) ₂ -Ins | 141.33 | $9.67 \cdot 10^{-6}$ | 23.749 |
| PDDA-PSS-(Ins-HA) ₃ | 154.04 | $9.56 \cdot 10^{-6}$ | 26.649 |
| PDDA-PSS-(Ins-HA) ₃ -Ins | 165.77 | $9.96 \cdot 10^{-6}$ | 30.224 |
| PDDA-PSS-(Ins-HA) ₄ | 180.74 | $9.24 \cdot 10^{-6}$ | 35.367 |
| PDDA-PSS-(Ins-HA) ₄ nach Erhitzen | 112.26 | $1.06 \cdot 10^{-5}$ | 39.121 |

Die Daten der Multischichten PDDA-PSS-(Ins-PSS)₄ und PDDA-PSS-(Ins-HA)₄ sind relativ ähnlich. Der Unterschied zwischen den Schichtdicken von Insulin und Hyaluronsäure ist

deutlich weniger ausgeprägt im Vergleich zu PSS und Insulin. Die Rauigkeit der Multischicht, welche mit Hyaluronsäure aufgebaut wurde, ist deutlich größer.

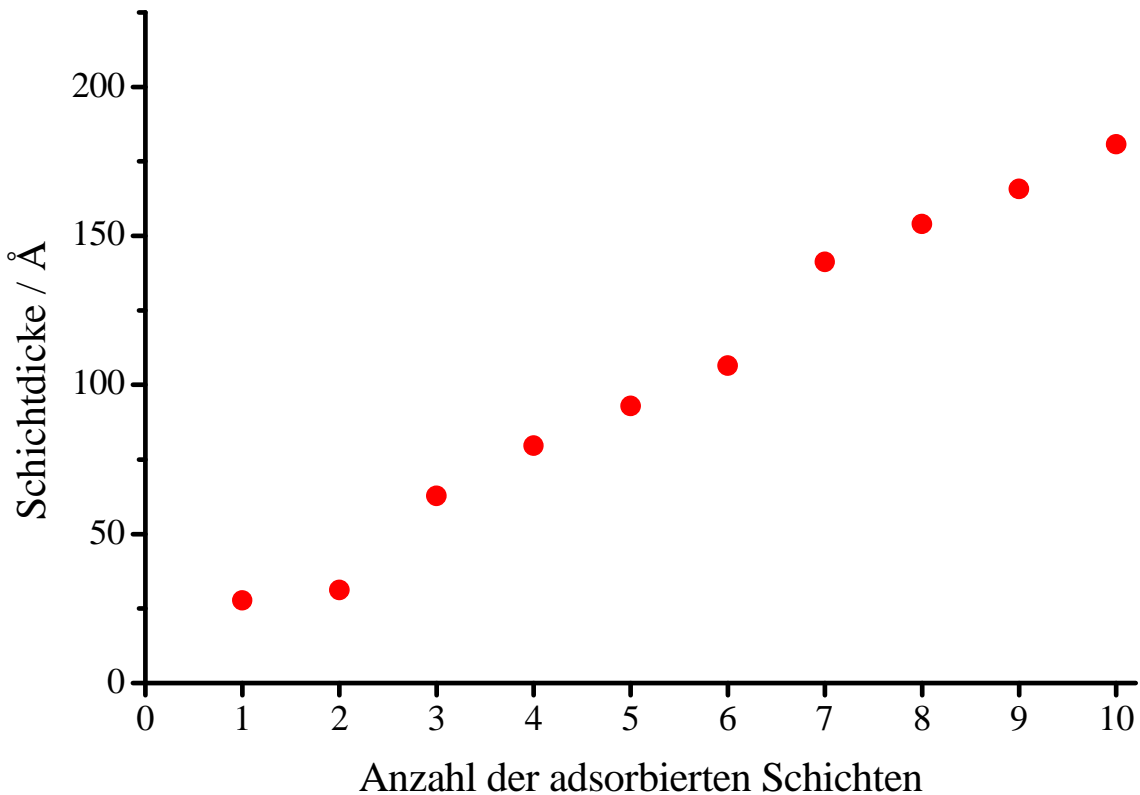


Abbildung 4.4. Der Aufbau der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₄ weist ein lineares Wachstum mit der Anzahl der abgeschiedenen Schichten auf.

Diese beiden strukturellen Merkmale können mithilfe der molekularen Struktur von Hyaluronsäure erklärt werden. Pro dimere Einheit von Hyaluronsäure liegt nur eine Carboxylgruppe vor, woraus im Vergleich zu PSS eine geringere Ladungsdichte resultiert. Weiterhin liegt Hyaluronsäure stark hydratisiert aufgrund der vielen polaren Gruppen vor und weist eine hohe konformelle Flexibilität auf. Diese molekularen Eigenschaften könnten zu einem fluideren Verhalten der Hyaluronsäureschichten führen.

Anhand der Tabelle 4.6 ist zu erkennen, dass nach einem einstündigen Erhitzen die Schichtdicke, der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ um -23 % abnimmt, was in Übereinstimmung mit der Abnahme der Schichtdicke der Multischicht aus Tabelle 4.4 steht. Nach weiterem Erhitzen für eine Dauer von bis zu jeweils 3 Stunden ist zu erkennen, dass keine weitere Änderung in der Schichtdicke mehr erfolgt.

Tabelle 4.6. Die Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ auf Silicium wurde für 3 h auf 70°C erhitzt, wobei nach jeder Stunde die Schichtdicke bei Raumtemperatur bestimmt wurde.

| Multischicht | Schichtdicke $d / \text{Å}$ | Streulängendichte $\rho / \text{Å}^{-2}$ | Rauigkeit $\sigma / \text{Å}$ |
|--|--------------------------------|---|----------------------------------|
| PDDA-PSS-(Ins-PSS) ₃ bei Raumtemperatur | 144.6 | $1.04 \cdot 10^{-5}$ | 15.574 |
| PDDA-PSS-(Ins-PSS) ₃ nach 1 h Erhitzen auf 70°C | 112.36 | $1.14 \cdot 10^{-5}$ | 18.609 |
| PDDA-PSS-(Ins-PSS) ₃ nach 2 h Erhitzen auf 70°C | 115.36 | $1.13 \cdot 10^{-5}$ | 23.35 |
| PDDA-PSS-(Ins-PSS) ₃ nach 3 h Erhitzen auf 70°C | 115.53 | $1.04 \cdot 10^{-5}$ | 20.516 |

4.1.2 Struktur und Dynamik von Insulin in Multischichten charakterisiert mit Hilfe der TIRF-Spektroskopie

4.1.2.1 Aufbau einer Polyelektrolyt-Insulinmultischicht *in situ*

Der Aufbau der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₅ konnte mittels der TIRF-Spektroskopie ebenfalls qualitativ verfolgt werden. Man beobachtet hier einen Intensitätsanstieg nach jeder abgeschiedenen Insulinschicht. Um eine keiminduzierte Aggregation zu untersuchen, wurden nach jeder adsorbierten Insulinschicht zusätzlich Insulinkeime hinzugegeben. In Abbildung 4.5 ist im Allgemeinen zu erkennen, dass die Fluoreszenzintensität des ThTs mit jeder adsorbierten Insulinschicht nahezu linear ansteigt. Durch die Zugabe der Insulinkeime ist ein sehr geringer weiterer Anstieg zu erkennen. Eine keiminduzierte Aggregation ist jedoch nicht zu erkennen, da die Intensität hierfür einen viel stärkeren Anstieg aufweisen müsste.

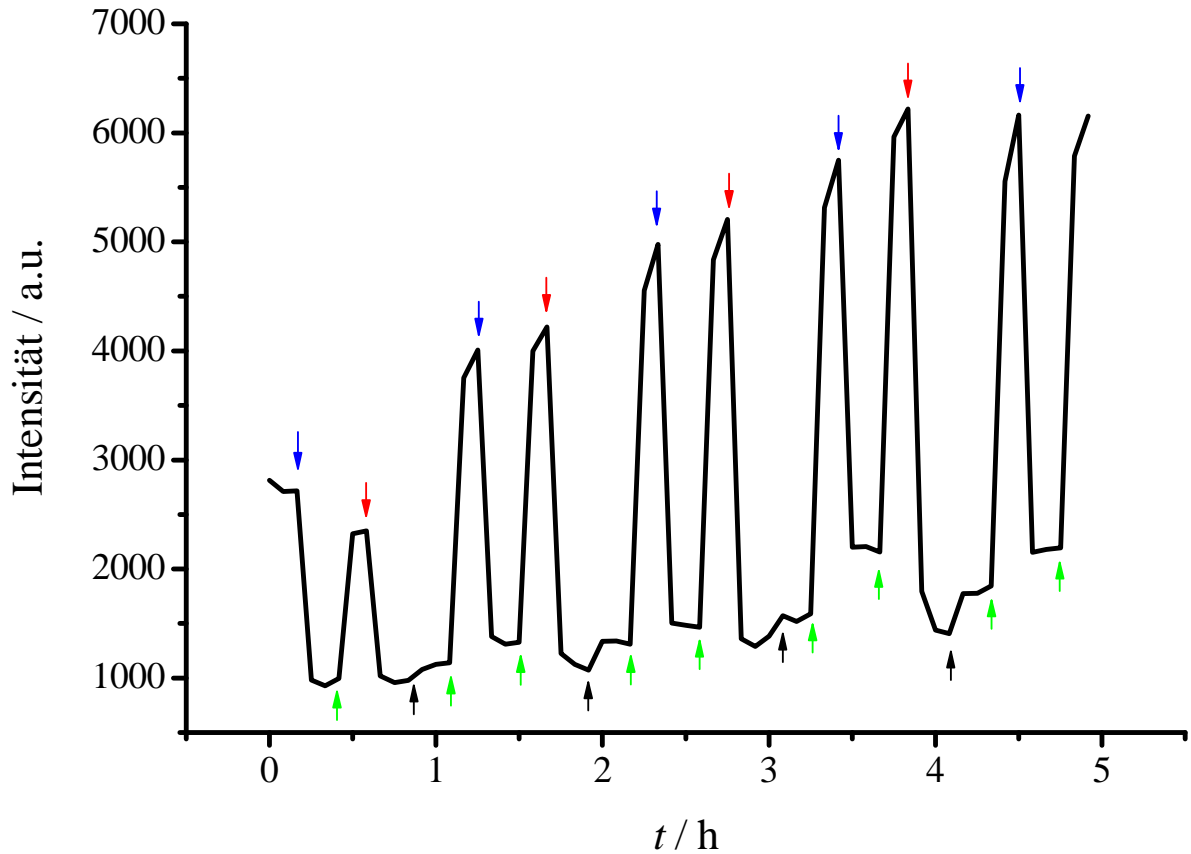


Abbildung 4.5. Aufbau der Insulinmultischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₅, bei welcher nach jeder adsorbierten Insulinschicht eine Insulinkeimlösung für eine 15 minütige Inkubationszeit zur Probe gegeben wurde. Eine keiminduzierte Fibrillenbildung lässt sich spektroskopisch nicht eindeutig nachweisen, da die Intensität nur im relativ geringen Maße ansteigt. (↓: Zugabe von Insulinkeimen, ↓: Zugabe von PSS, ↑: Zugabe von ThT, ↑: Zugabe von Insulin)

Der Aufbau einer Insulinmultischicht *in situ* mit Hyaluronsäure statt PSS als Polyanion wurde in gleicher Weise wie in Abbildung 4.5 durchgeführt. Auch in diesem Fall wurde die Multischicht PDDA-PSS-Ins auf Quarzglas adsorbiert und anschließend die Fluoreszenz von ThT detektiert. Alle weiteren Schritte verlaufen analog wie in Abbildung 4.5. Es wurde die Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₃ hergestellt. In Abbildung 4.6 zeigt sich nicht wie in Abbildung 4.5 ein linearer Anstieg der Fluoreszenzintensität, sondern eine nahezu konstante Emission des ThTs bei einer Wellenlänge von 482 nm bei wachsender Schichtdicke. In diesem Fall kann der Aufbau der Multischicht nicht fluoreszenzspektroskopisch verfolgt werden. Damit ein Anstieg der TIRF-Intensität des ThT mit wachsender Multischicht beobachtet wird, muss die Zahl der ThT-Moleküle an der Grenzfläche steigen. Möglicherweise wird dies durch den hydrophilen Charakter der Hyaluronsäure verhindert.

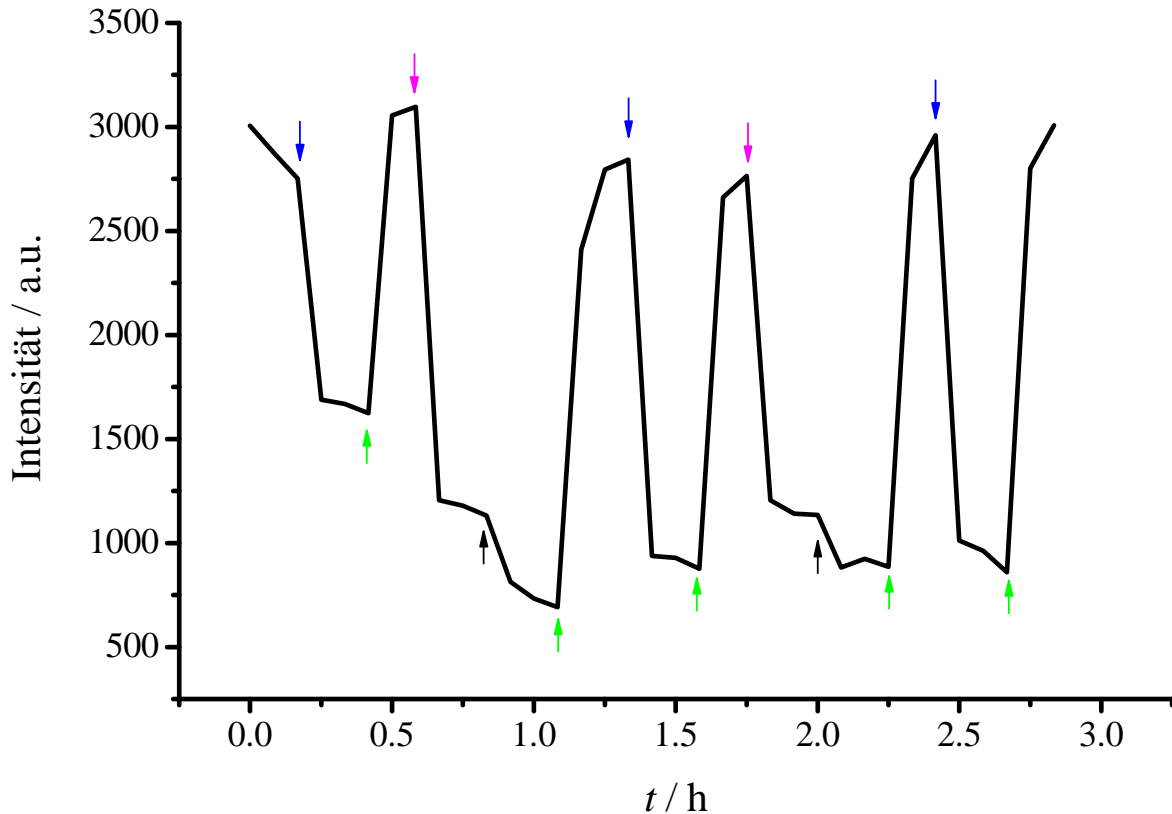


Abbildung 4.6. Aufbau der Insulinmultischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₃, bei welcher nach jeder adsorbierten Insulinschicht eine Insulinkeimlösung für eine 15minütige Inkubationszeit zur Probe gegeben wurde. Eine keiminduzierte Fibrillenbildung lässt sich spektroskopisch nicht nachweisen, da die Intensität nicht ansteigt. (↓: Zugabe von Insulinkeimen, ↓: Zugabe von Hyaluronsäure, ↑: Zugabe von ThT, ↑: Zugabe von Insulin)

Auch nach der Zugabe von Insulinkeimen zu den jeweiligen adsorbierten Insulinschichten zeigt sich kein Anstieg der Fluoreszenz. Direkt im Anschluss an den Aufbau der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₃ aus Abbildung 4.6 wurde die Fluoreszenzintensität des ThTs für eine weitere Dauer von 19 Stunden bei einer Temperatur von 25 °C verfolgt. Wie anhand der Abbildung 4.7 zu sehen ist, bleibt die Intensität auf einem relativ konstanten Wert. Die vermehrte Ausbildung fibrillärer Strukturen des Insulins bleibt offenbar aus.

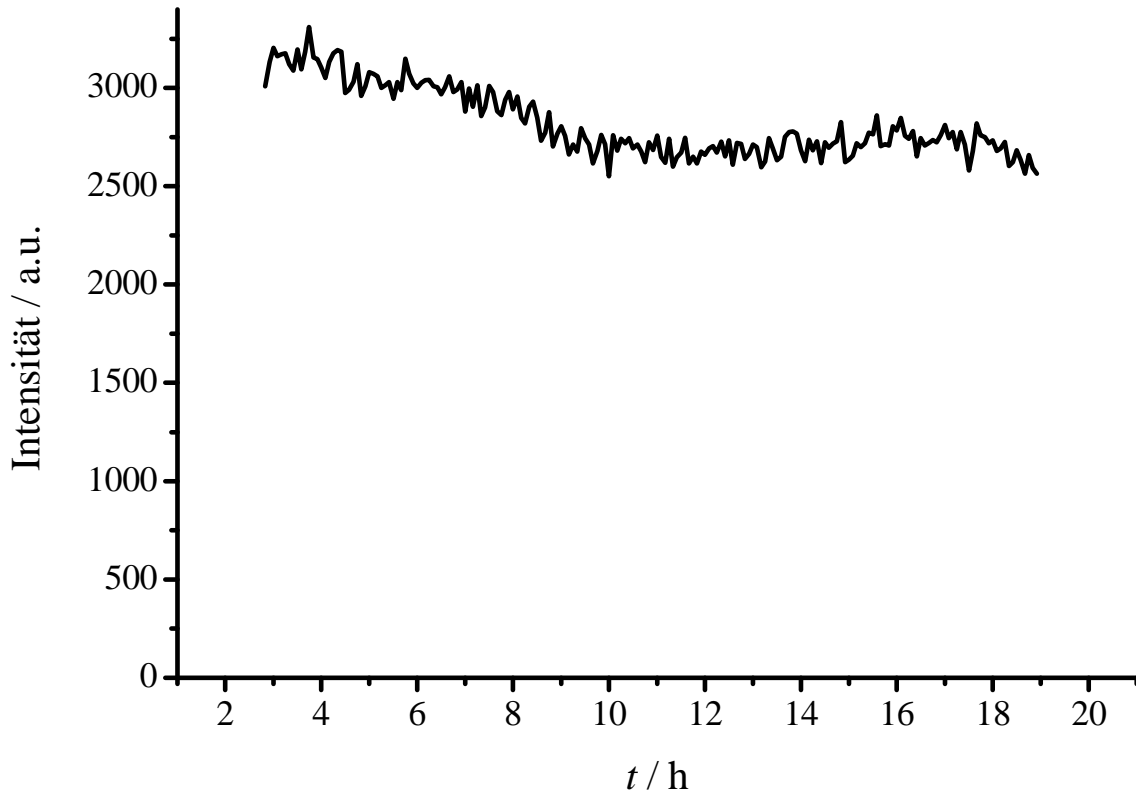


Abbildung 4.7. Nach dem Aufbau der Insulinmultischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₃ aus Abbildung 4.6 wurde eine 19 stündige Messung bei konstanter Raumtemperatur durchgeführt. Es ist zu erkennen, dass keine signifikanten Änderungen in der Fluoreszenzintensität auftreten. Es erfolgt dementsprechend keine Änderung der Struktur des in den Multischichten eingebetteten Insulins.

4.1.2.2 Temperatur- und keiminduzierte Aggregation von Insulin in Multischichten

Die Aggregation des in Multischichten eingebetteten Insulins wurde mit Hilfe der TIRF-Spektroskopie hinsichtlich einer Temperaturerhöhung auf 70°C über einen Zeitraum mehrerer Stunden untersucht. Die Präparation der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ wurde nach Punkt 3.2.4.3 durchgeführt. Es wurde die Fluoreszenz von Thioflavin T bei 482 nm gemessen (siehe Punkt 3.2.4.4). Die Anregung erfolgte bei 450 nm. Nach 30 min Messzeit wurde die Temperatur der Probe innerhalb von etwa 1 min auf 70 °C erhöht. Hierdurch sank die Fluoreszenzintensität erwartungsgemäß ab (siehe Abbildung 4.8)

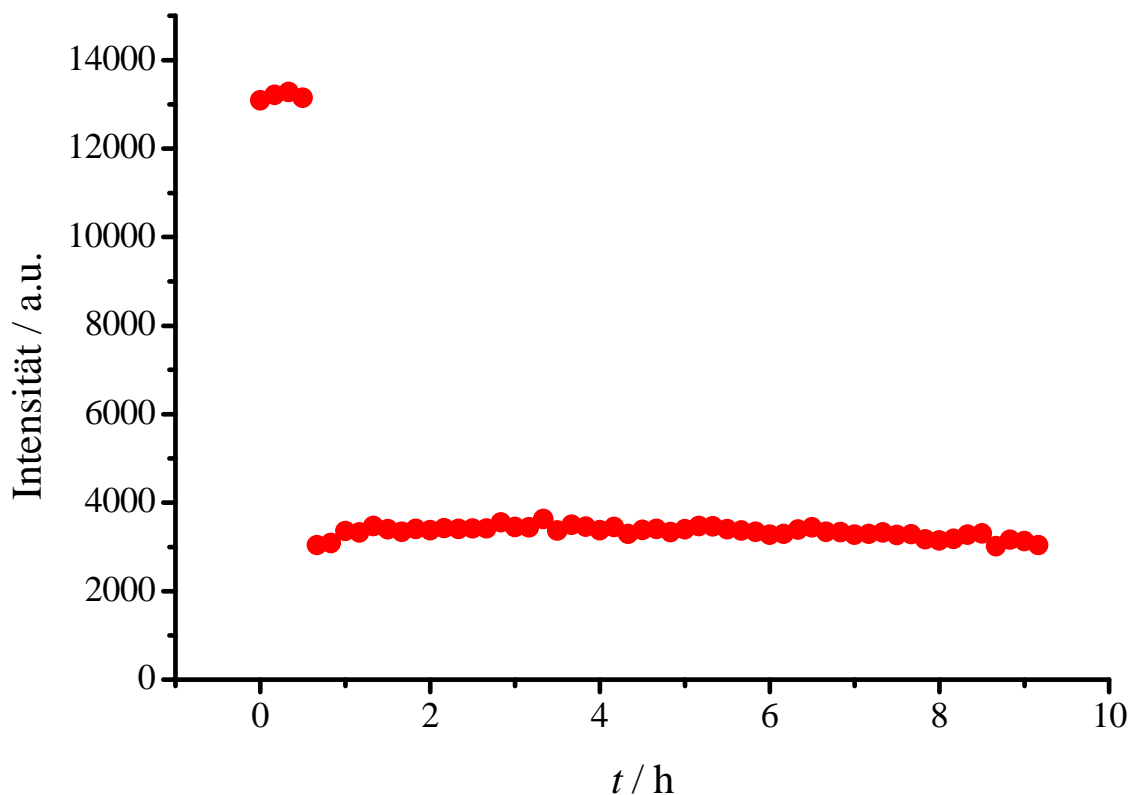


Abbildung 4.8. TIRF-Intensität von Thioflavin T, das zur Lösung über der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ mit einer Konzentration von $c(\text{ThT}) = 4 \mu\text{g/mL}$ und einem 0.1 M NaCl-Zusatz bei $\text{pH} = 2.1$ gegeben wurde. Eine Temperaturerhöhung von 25°C auf 70°C nach 30 min Messdauer wurde mittels eines vorgeheizten Wasserbads durchgeführt. Eine temperaturinduzierte Aggregation des Insulins erfolgt offenbar über einem Zeitraum von 9 h nicht.

In Abbildung 4.8 ist zu erkennen, dass in einem Zeitraum von 9 Stunden bei 70°C keine Aggregation des eingebetteten Insulins erfolgt, da die Intensität des ThTs auf einem konstanten Niveau bleibt. Im Falle einer Aggregation sollte die Emissionsintensität stark ansteigen, da sich das ThT in *cross*- β -Strukturen einlagert und damit dessen Rotationsdynamik eingeschränkt werden sollte. Weitere Messungen, bei denen die Konzentration des NaCl-Zusatzes in der ThT-Lösung variiert wurde, sind im Anhang (Abbildung 7.1 – 7.4) aufgeführt und weisen das gleiche Verhalten auf. Bei den jeweiligen Messungen mit 0.2, 0.3, 0.4 und 0.5 M NaCl-Zusatz bleibt die Fluoreszenzintensität ebenfalls konstant. Entsprechende Messungen wurden mit Hyaluronsäure statt mit PSS zum Aufbau der Multischichten durchgeführt, jedoch wurde die ThT-Konzentration auf 2.5 mg/L reduziert. In Abbildung 4.9 zeigt sich für die Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₃ in Gegenwart von 0.3 M NaCl und ThT ebenfalls kein Anstieg der Fluoreszenzintensität von ThT bei 70°C . Mit fortschreitender Zeit sinkt die Fluoreszenzintensität sogar weiter ab.

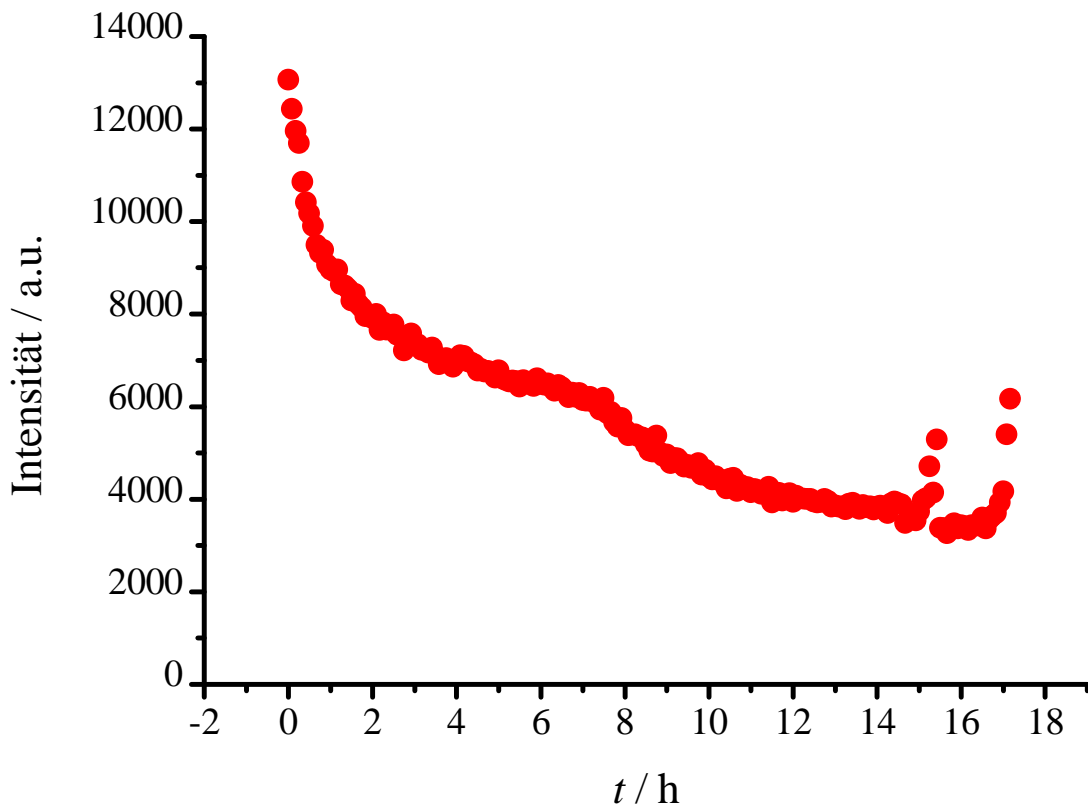


Abbildung 4.9. TIRF-Intensität von Thioflavin T, das zur Lösung über der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₃ mit einer Konzentration von $c(\text{ThT}) = 4 \mu\text{g/mL}$ und einem 0.3 M NaCl-Zusatz bei $\text{pH} = 2.1$ gegeben wurde. Die Messung erfolgte bei einer Temperatur von 70°C .

Die Abnahme der Intensität ist vermutlich auf Fluoreszenzlöschung bei erhöhter Temperatur zurückzuführen. Es wurden dementsprechend keine *cross*- β -Strukturen gebildet. Auch nach Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 0.5 M erfolgt keine Aggregation des in den Multischichten eingebetteten Insulins (siehe Anhang Abbildung 7.5). Die Intensität der Fluoreszenz des ThTs sinkt auch hier mit fortschreitender Messzeit.

Wie bereits in Kapitel 1.3 erwähnt, kann die Ausbildung von Amyloidfibrillen außer durch hohe Temperaturen auch durch die Zugabe von Amyloidkeimen zu nativ gefaltetem Insulin bei Raumtemperatur induziert werden.⁹⁴ Im Folgenden wurden die in Kapitel 3.2.4.5 beschriebenen Insulinkeime zur ThT-Lösung hinzugegeben, welche dann in die Probenkammer mit der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₃ eingeführt wurde. Die Lösung hatte eine Konzentration von $2.5 \mu\text{g/mL}$, einen NaCl-Zusatz von 0.1 M, einen pH von 2.1 und einen Insulinkeimzusatz von 0.2 mg/mL . Verfolgt wurde die Emission bei einer Wellenlänge von 482 nm. Die Messung erfolgte bei einer Temperatur von 25°C .

Nach der Zugabe der Insulinkeimlösung ist zu erkennen, dass bei einer konstanten Temperatur die Fluoreszenzintensität mit voranschreitender Zeit ein wenig sinkt (siehe Abbildung 4.10). Es erfolgte dementsprechend keine keiminduzierte Aggregation des eingebetteten Insulins.

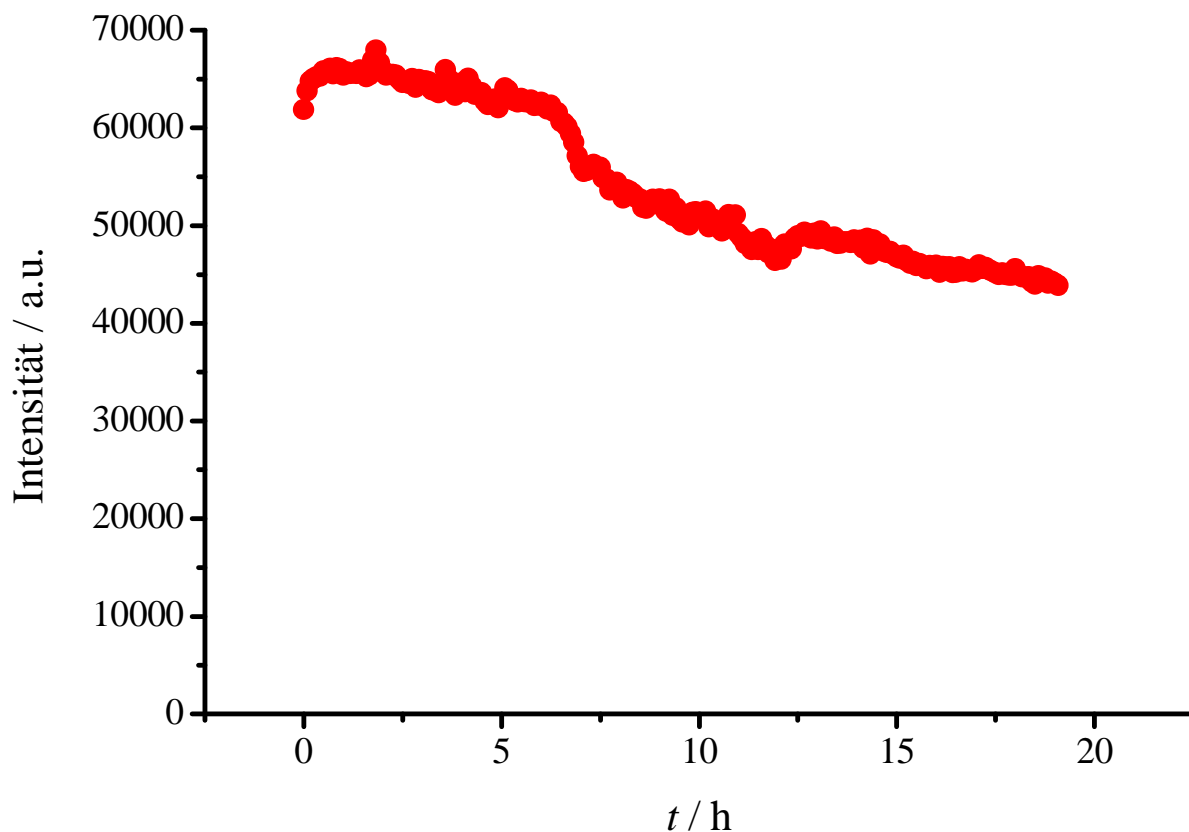


Abbildung 4.10. TIRF-Intensität von Thioflavin T, das sich in der Lösung über der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₃ mit einer Konzentration von $c(\text{ThT}) = 4 \mu\text{g/mL}$, einem 0.5 M NaCl-Zusatz und einem Insulinkeimzusatz von $c(\text{Insulinkeime}) = 0.2 \text{ mg/mL}$ von bei $\text{pH} = 2.1$ befand. Die Temperatur betrug über die gesamte Messdauer 25 °C. Es erfolgt offenbar keine keiminduzierte Aggregation des eingebetteten Insulins.

Auch nach einer Erhöhung des NaCl-Zusatzes von 0.1 auf 0.5 M erfolgt unter ansonsten gleichen Bedingungen kein Anstieg der Fluoreszenzintensität (siehe Anhang 7.6). Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass weder durch eine Temperaturerhöhung noch durch eine Keimzugabe eine Fibrillenbildung von Insulin, das in den Polyelektrolyt-Multischichten PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ und PDDA-PSS-(Ins-HA)₃ eingebettet ist, induziert werden kann. Offenbar sind die Insulin-Moleküle in diesen Multischichten in ihrer Bewegungsfreiheit zu stark eingeschränkt. Daher wurden auch Multischichten untersucht, in denen Insulin die oberste (äußere) Schicht bildet.

Im Falle der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃-Ins ist nach der Entfernung der ThT-Lösung und anschließender Zugabe der Insulinkeimlösung in die Probenkammer eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen (siehe Abbildung 4.8). Nach einer Inkubationszeit von 40 Minuten und mehreren Waschschritten, wie in Punkt 3.2.4.5 beschrieben, ist nach der Zugabe der ThT-Lösung in die Probekammer ein starker Anstieg der Fluoreszenzintensität zu beobachten (siehe Abbildung 4.11).

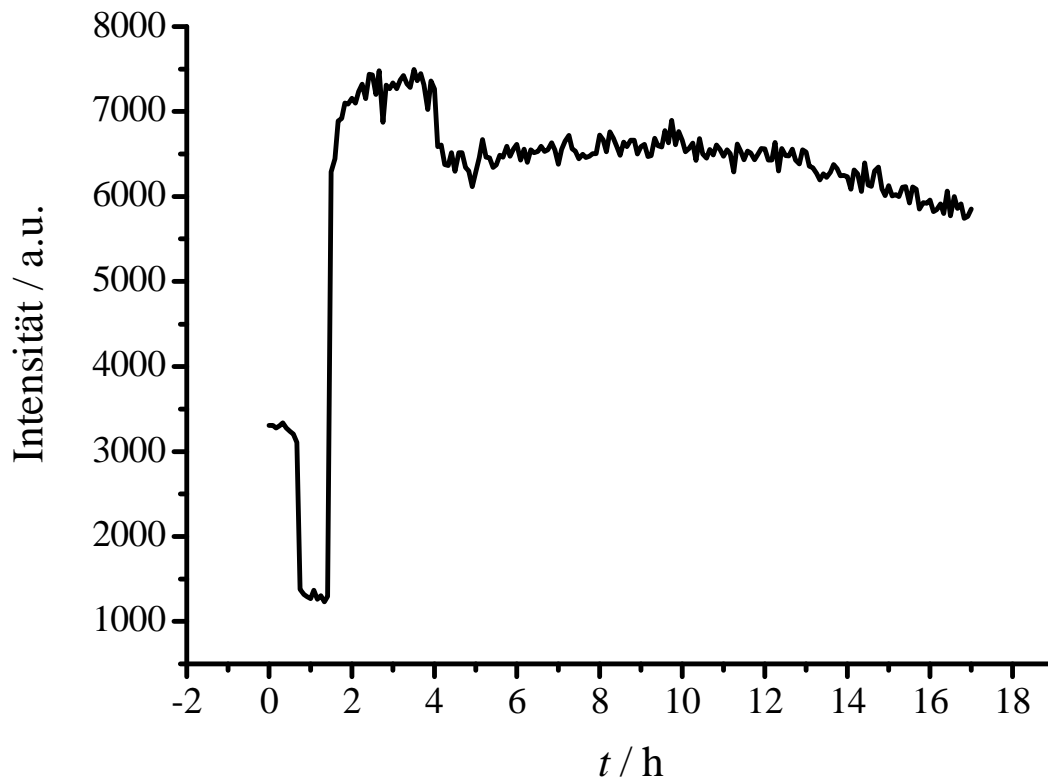


Abbildung 4.11. Bis zur 40. min wird die Fluoreszenz von Thioflavin T in Anwesenheit der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃-Ins gemessen. Anschließend erfolgt nach mehreren Waschschrritten die Zugabe von Insulinkeimen mit einer Konzentration von $c(\text{Insulinkeime}) = 0.1 \text{ mg/mL}$ bei pH 2.1 und einem 0.1 M NaCl-Zusatz zur Multischicht. Nach einer 40 minütigen Inkubationszeit erfolgt die Zugabe einer frischen ThT-Lösung. Die Fluoreszenzintensität ist jetzt um den Faktor 2.3 größer.

Der Faktor des Fluoreszenzanstiegs des ThTs vor und nach der Zugabe der Insulinkeime beträgt in etwa 2.3. Der Anstieg könnte aus der Bildung einiger fibrillärer Strukturen hervorgehen, welche durch die Zugabe der Insulinkeime an der obersten Schicht des Adsorbats entstanden sind. Nach dem Anstieg der Fluoreszenz wurde die Messung für weitere 15 Stunden verfolgt,

um eventuelle Intensitätsänderungen zu beobachten. Es zeigt sich jedoch im weiteren Verlauf keine Änderung der Struktur des adsorbierten Insulins.

Die Blindprobe, bei der die Doppelschicht PDDA-PSS auf Quarzglas adsorbiert wurde, zeigt nach der Zugabe der ThT-Lösung eine Fluoreszenzintensität von ca. 1600 (a.u.) bei einer Wellenlänge von 482 nm für eine Dauer von 105 min (siehe Abbildung 4.12).

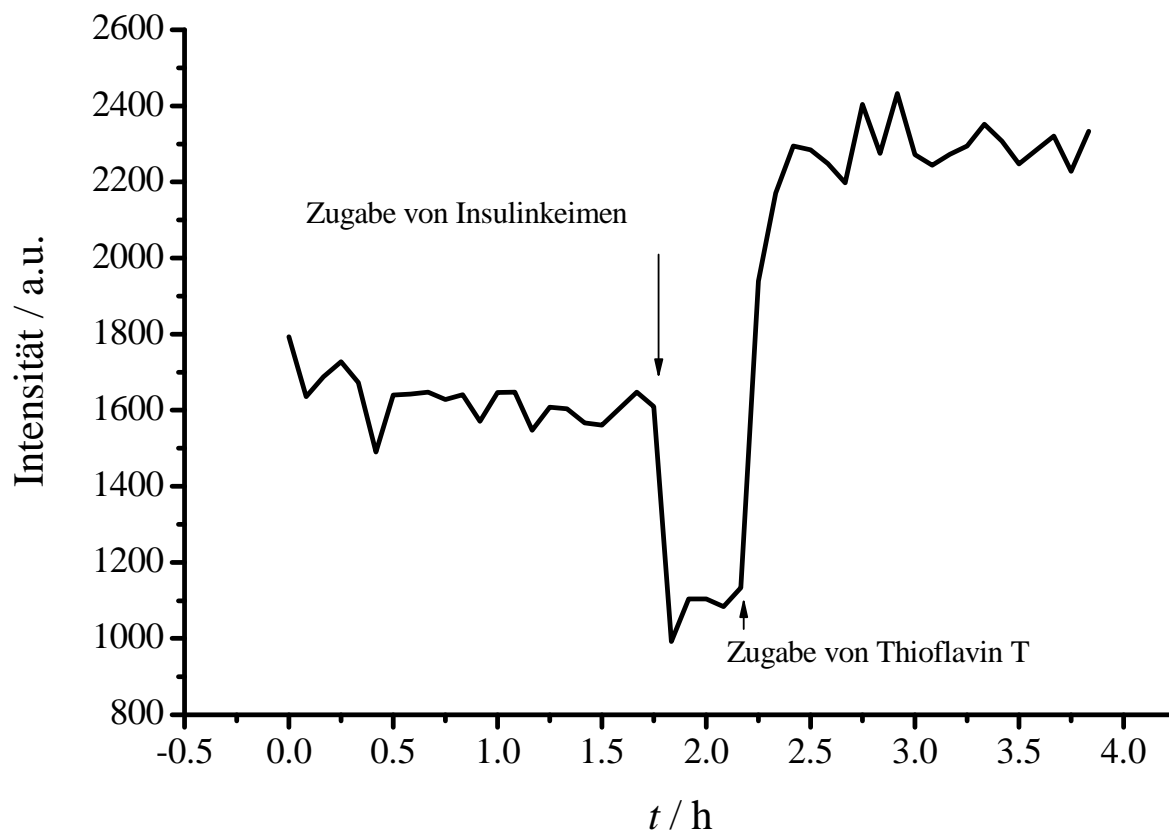


Abbildung 4.12. Zur Doppelschicht PDDA-PSS wurde eine ThT-Lösung mit einer Konzentration von $c(\text{Insulinkeime}) = 0.1 \text{ mg/mL}$ bei pH 2.1 und einem 0.1 M NaCl-Zusatz gegeben und die Fluoreszenz gemessen. Nach einer Messdauer von 100 min wurde nach mehreren Waschschritten mit Salzsäure (pH 2.1) eine Insulinkeimlösung zur Probenzelle gegeben und für eine Dauer von 25 min inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff wurde wieder die ThT-Lösung in die Zelle gefüllt.

Nach der Zugabe der Insulinkeime zur Doppelschicht sinkt die Fluoreszenzintensität, da kein ThT vorliegt. Nach einer 25minütigen Inkubationszeit werden die Insulinkeime ausgespült und eine ThT-Lösung zugegeben. Es zeigt sich ein Anstieg der Fluoreszenz auf einen Wert um 2300 cps. Der Faktor des Anstiegs vor und nach der Zugabe der Insulinkeime beträgt dementsprechend etwa 1.4. Es ist zu erwähnen, dass die Doppelschicht eine attraktive

elektrostatische Wechselwirkung mit den positiv geladenen Insulinkeimen unter diesen Bedingungen ausbildet. Eine Reproduktion der Messung ist im Anhang in Abbildung 7.7 dargestellt. Der Faktor der Intensitätszunahme vor und nach der Insulinkeimzugabe beträgt dort etwa 1.7. Damit zeigen die Blindproben einen kleineren Intensitätsanstieg des ThTs nach Inkubation mit Insulinkeimen. Der gemessene Anstieg kann zudem auf attraktive Wechselwirkungen zwischen den Insulinkeimen und PDDA-PSS zurückgeführt werden, welche bei der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃-Ins nicht auftreten.

4.1.2.3 Untersuchung der Dynamik von Insulin in Multischichten mit Hilfe der statischen TIRF-Anisotropie

Die statische TIRF-Anisotropie von Insulin, das mit Alexa Fluor 488 markiert wurde und in der Multischicht PDDA-PSS-(Ins_{Alexa}-PSS)₃ eingebettet ist, wurde, wie in Kapitel 3.2.4.7 beschrieben, gemessen. Es zeigt sich, dass bereits bei einer Temperatur von 20 °C ein Anisotropiewert von ca. $r \approx 0.36$ vorliegt, was bedeutet, dass die Insulinmoleküle in der Multischicht eine relativ eingeschränkte Beweglichkeit aufweisen (siehe Abbildung 4.13). Bei noch höheren Temperaturen steigt der Wert auf $r \approx 0.4$ an. Bei hohen Temperaturen ist die Rotationsdynamik des Insulins noch stärker eingeschränkt, was mit den Ergebnissen der Röntgenreflektometriedaten aus Tabelle 4.6 übereinstimmt. Durch erhöhte Temperaturen werden die Multischichten kompakter und adsorbierte Moleküle in ihrer Flexibilität einschränkt. Damit wird die Rotationsdynamik ebenfalls eingeschränkt. Allerdings liegt ein Anisotropieanstieg von 0.36 auf 0.4 im Bereich des experimentellen Fehlers.

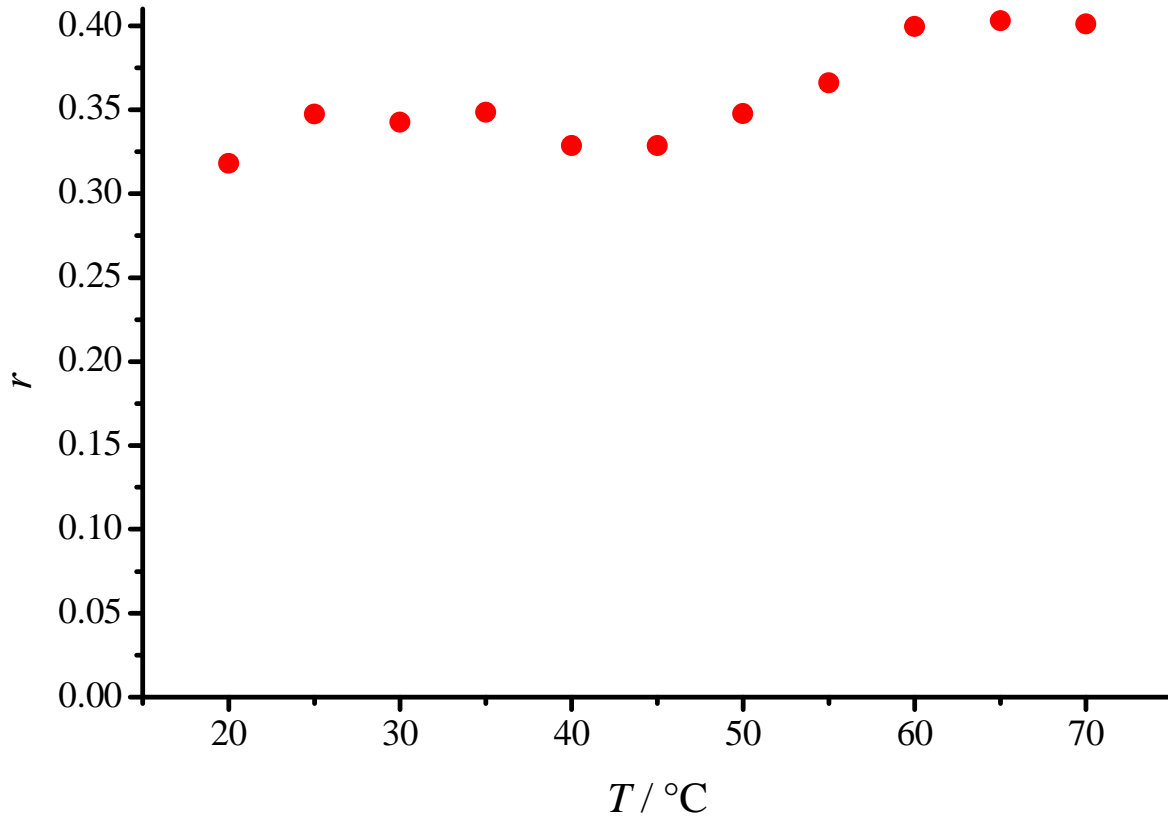


Abbildung 4.13. Statische Anisotropie von Alexa Fluor 488, welches kovalent an in Multischichten eingebettetes Insulin gebunden ist. Es wurde die Multischicht PDDA-PSS-(Ins_{Alexa}-PSS)₃ auf einer Quarzglasplatte adsorbiert. Bei geringen Temperaturen besitzt die Anisotropie einen Wert von 0.36 und steigt mit erhöhter Temperatur auf einen Wert von 0.4.

Es wurde eine Reproduktionsmessung (siehe Anhang, Abbildung 7.8) mit der gleichen Multischicht durchgeführt. Die Anisotropiewerte liegen hier bei einem hohen Wert von $r \approx 0.36$ über den gesamten Temperaturbereich.

4.1.2.4 Untersuchung der Dynamik von Insulin in Multischichten mit Hilfe der zeitaufgelösten TIRF-Anisotropie

Für Alexa Fluor 488, welches an Insulin in der Multischicht PDDA-PSS-(Ins_{Alexa}-PSS)₃ gebunden vorliegt, ergeben sich die in der Tabelle 4.7 dargestellten Fluoreszenzlebenszeiten, welche sich aus den Kurvenanpassungen für die Phasenverschiebung und die Modulation ergeben. Für die Anpassung wurde für das Streulicht eine Fluoreszenzlebenszeit $\tau_1 = 0$ ns festgelegt und eine zweite Fluoreszenzlebenszeit τ_2 variiert, wobei die fraktionelle Intensität f_2 für τ_2 mit einem relativ hohen Wert fixiert wurde.

Tabelle 4.7. Ermittelte Lebenszeiten des Fluorophors Alexa Fluor 488, welches an in Multischichten eingebetteten Insulinmolekülen kovalent gebunden ist. Der Markierungsgrad beträgt 1:50. Mit steigender Temperatur sinkt die Lebenszeit τ_2 von Alexa Fluor 488.

| $T / ^\circ\text{C}$ | τ_1 / ns | | fractionelle Intensität f_1 | τ_2 / ns | fractionelle Intensität f_2 | |
|----------------------|----------------------|---------|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------|---------|
| 20 | 0 | fixiert | $0.254 \pm 4 \cdot 10^{-4}$ | $1.58 \pm 1 \cdot 10^{-3}$ | 0.673 | fixiert |
| 30 | 0 | fixiert | $0.168 \pm 4 \cdot 10^{-4}$ | $1.49 \pm 8 \cdot 10^{-4}$ | 0.745 | fixiert |
| 40 | 0 | fixiert | $0.269 \pm 2 \cdot 10^{-3}$ | $1.17 \pm 8 \cdot 10^{-3}$ | 0.633 | fixiert |
| 50 | 0 | fixiert | $0.413 \pm 3 \cdot 10^{-3}$ | $1.05 \pm 7 \cdot 10^{-3}$ | 0.5 | fixiert |
| 60 | 0 | fixiert | $0.379 \pm 4 \cdot 10^{-3}$ | $0.85 \pm 7 \cdot 10^{-3}$ | 0.466 | fixiert |

Es ist zu erkennen, dass die Fluoreszenzlebenszeit τ_2 des Alexa Fluor 488 im Temperaturbereich von 20 – 60 °C von ca. 1.6 ns auf einen Wert von 0.9 ns abfällt (siehe Abbildung 4.14). Die relativ geringen Werte für τ_2 gehen sowohl eventuell aus dem relativ hohen Markierungsgrad und einem dadurch resultierenden Resonanzenergie transfer zwischen den Fluorophormolekülen hervor.

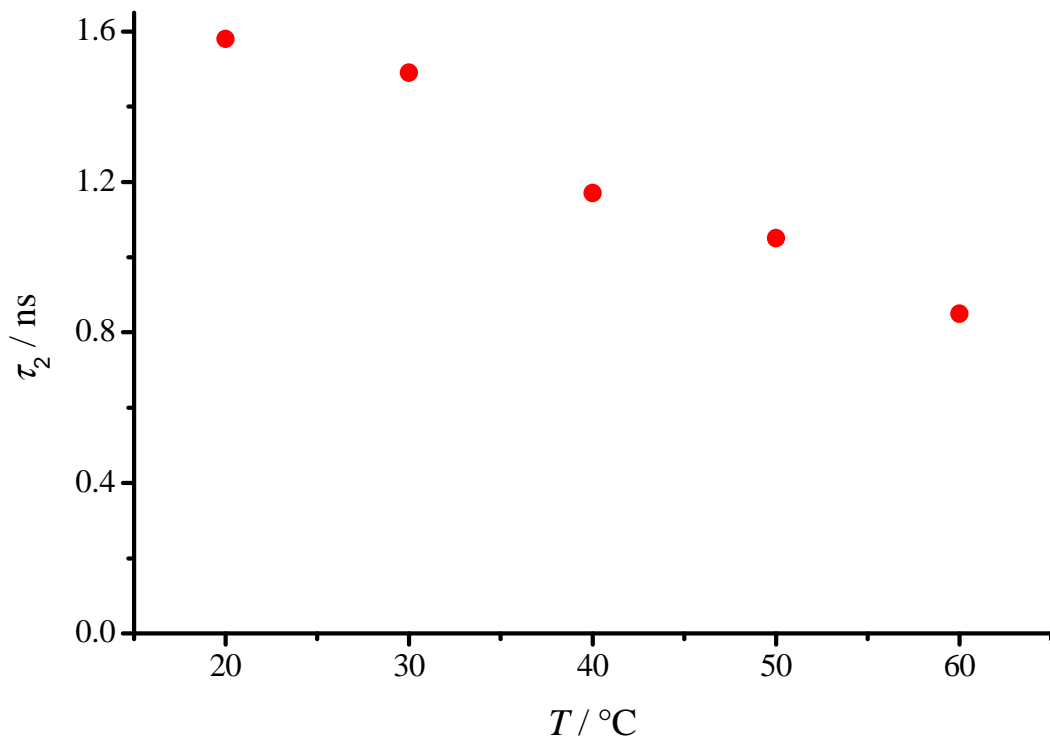


Abbildung 4.14. Fluoreszenzlebensdauer von Alexa Fluor 488, welches an das in Multischichten eingebettete Insulin kovalent gebunden ist.

Im Falle des Insulins mit einem geringeren Markierungsgrad von $l = 1:300$ wurden die in der Tabelle 4.8 aufgeführten Fluoreszenzlebenszeiten ermittelt.

Tabelle 4.8. Ermittelte Lebenszeiten des Fluorophors Alexa Fluor 488, welches an in Multischichten eingebetteten Insulinmolekülen kovalent gebunden ist. Der Markierungsgrad beträgt 1:300. Mit steigender Temperatur verkürzt sich die Lebenszeit τ_2 von Alexa Fluor 488.

| $T / ^\circ\text{C}$ | τ_1 / ns | | fraktionelle Intensität f_1 | τ_2 / ns | fraktionelle Intensität f_2 | |
|----------------------|----------------------|---------|--|----------------------------|-------------------------------|---------|
| 20 | 0 | fixiert | $4.36 \cdot 10^{-9} \pm 4 \cdot 10^{-4}$ | $2.56 \pm 5 \cdot 10^{-3}$ | 1 | fixiert |
| 30 | 0 | fixiert | $0.00387 \pm 8 \cdot 10^{-4}$ | $2.63 \pm 8 \cdot 10^{-3}$ | 0.996 | fixiert |
| 40 | 0 | fixiert | $0.01446 \pm 6 \cdot 10^{-4}$ | $2.44 \pm 5 \cdot 10^{-3}$ | 0.986 | fixiert |
| 50 | 0 | fixiert | $0.0444 \pm 6 \cdot 10^{-4}$ | $2.24 \pm 5 \cdot 10^{-3}$ | 0.956 | fixiert |
| 60 | 0 | fixiert | $0.043 \pm 1 \cdot 10^{-3}$ | $1.8 \pm 6 \cdot 10^{-3}$ | 0.957 | fixiert |

In Abbildung 4.15 ist die Fluoreszenzlebenszeit τ_2 von Alexa Fluor 488, gebunden an Insulin, als Funktion der Temperatur aufgetragen. Die Werte sind deutlich höher im Vergleich zu denjenigen Messungen mit einem höheren Markierungsgrad von $l = 1:50$. Auch in diesem Fall ist zu erkennen, dass über den gesamten Temperaturbereich die Lebenszeit sinkt. Bei einem Markierungsgrad von 1:300 liegt zwischen zwei adsorbierten Fluorophormolekülen im Mittel ein berechneter Abstand von ca. 50 nm vor, so dass kein Resonanzenergie transfer erfolgen sollte.

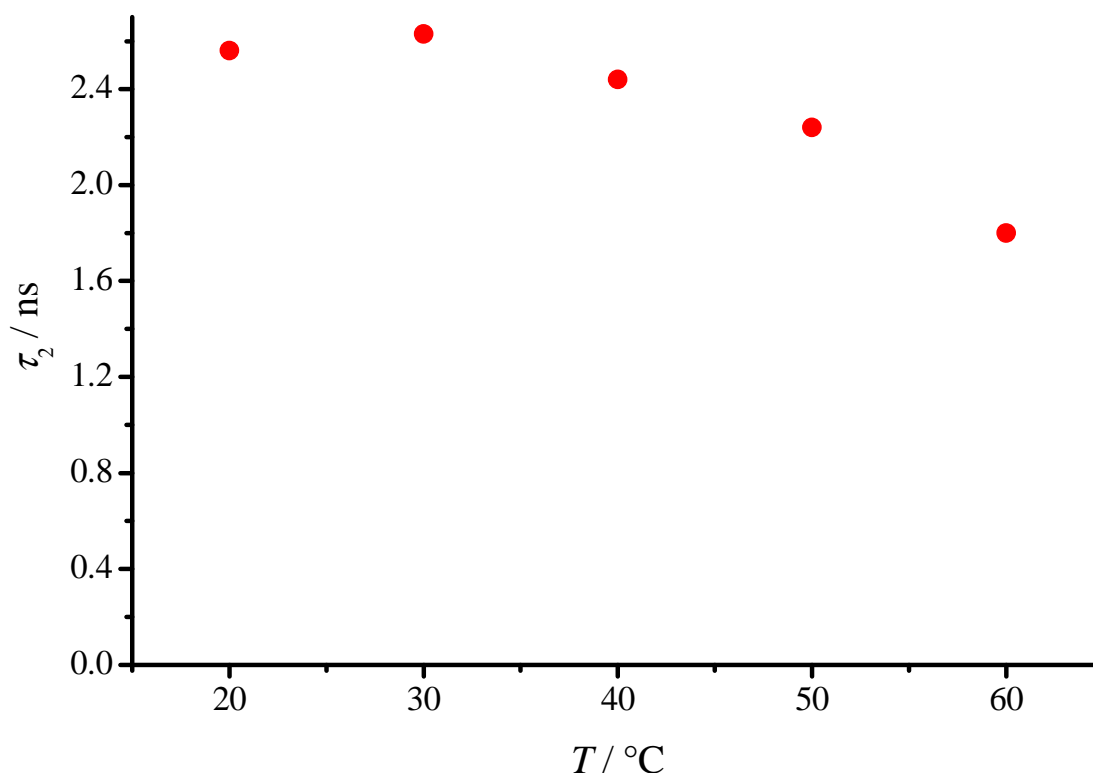


Abbildung 4.15. Fluoreszenzlebensdauer von Alexa Fluor 488, welches an das in Multischichten eingebettete Insulin kovalent gebunden ist.

Die Lebenszeit τ_2 von Alexa Fluor 488, welches an Insulin gebunden ist, sinkt über einen Temperaturbereich von 20 bis 60 °C von ca. 2.6 ns auf einen Wert von 1.8 ns. In Lösung hat Alexa Fluor 488 eine Lebenszeit von 4.1 ns bei einem pH-Wert von 7.¹⁶⁵ Für adsorbiertes Insulin liegt eine geringere Lebenszeit als in Lösung vor, möglicherweise aufgrund einer partiellen Entfaltung der Proteinmoleküle im Zuge des Adsorptionsprozesses vor. Dieses Verhalten wurde bereits im Falle von Lysozym an der Si-Wasser-Grenzfläche beobachtet.^{166,167} Die Rotationskorrelationszeiten konnten leider nicht bestimmt werden, da die zeitaufgelösten Anisotropiedaten aufgrund der hohen Lichtstreuung und des sehr geringen Signal-Rausch-Verhältnisses nicht gemessen werden konnten.

4.1.2.5 Stabilität der Multischichten charakterisiert mit Hilfe der TIRF-Spektroskopie

Die thermische Stabilität der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ auf einem Quarzglasplättchen wurde auch mithilfe der TIRF-Spektroskopie untersucht.

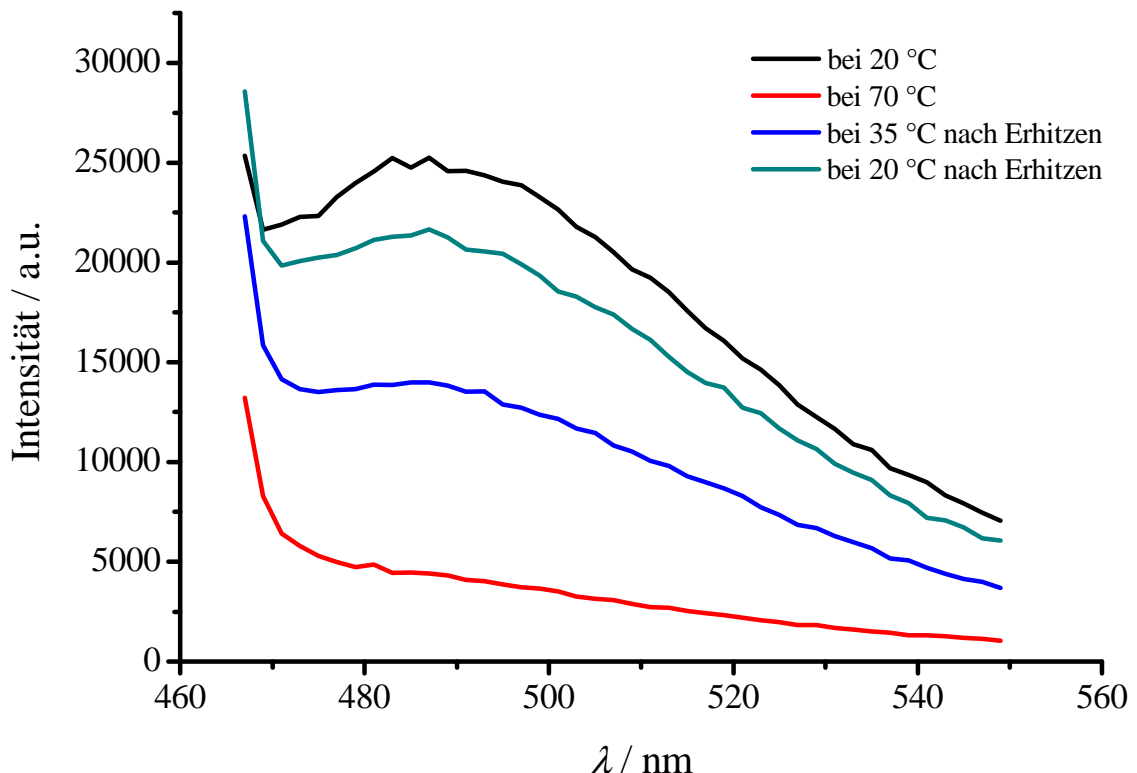


Abbildung 4.16. Die Stabilität der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ wurde nach Erhöhung der Temperatur auf 70°C und anschließendem Abkühlen auf 20 °C untersucht. Die Intensität des ThTs steigt nach dem Abkühlen wieder stark an, erreicht jedoch nicht den ursprünglichen Wert.

In Abbildung 4.16 sind die Fluoreszenzspektren von ThT, das zur wässrigen Lösung über der Multischicht gegeben wurde, im Wellenlängenbereich von 470 bis 550 nm dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Emission des ThTs bei einer Temperatur auf 70°C stark abnimmt, anschließend nach Abkühlen wieder ansteigt und fast ihren ursprünglichen Wert erreicht. Diese Messung zeigt qualitativ, dass sich die Polyelektrolyt-Insulinmultischicht bei erhöhten Temperaturen nicht ablöst. Die ursprüngliche Fluoreszenzintensität wird allerdings nicht nach dem Abkühlen auf 20 °C erreicht, was an einer konformellen Änderung der adsorbierten Moleküle liegen könnte.

4.1.3 ATR-FTIR-Messungen zur Sekundärstrukturanalyse von Polyelektrolyt-Insulinmultischichten

4.1.3.1 Beitrag der IR-Absorption von PDDA, PSS und HA zur Amid-I'-Bande

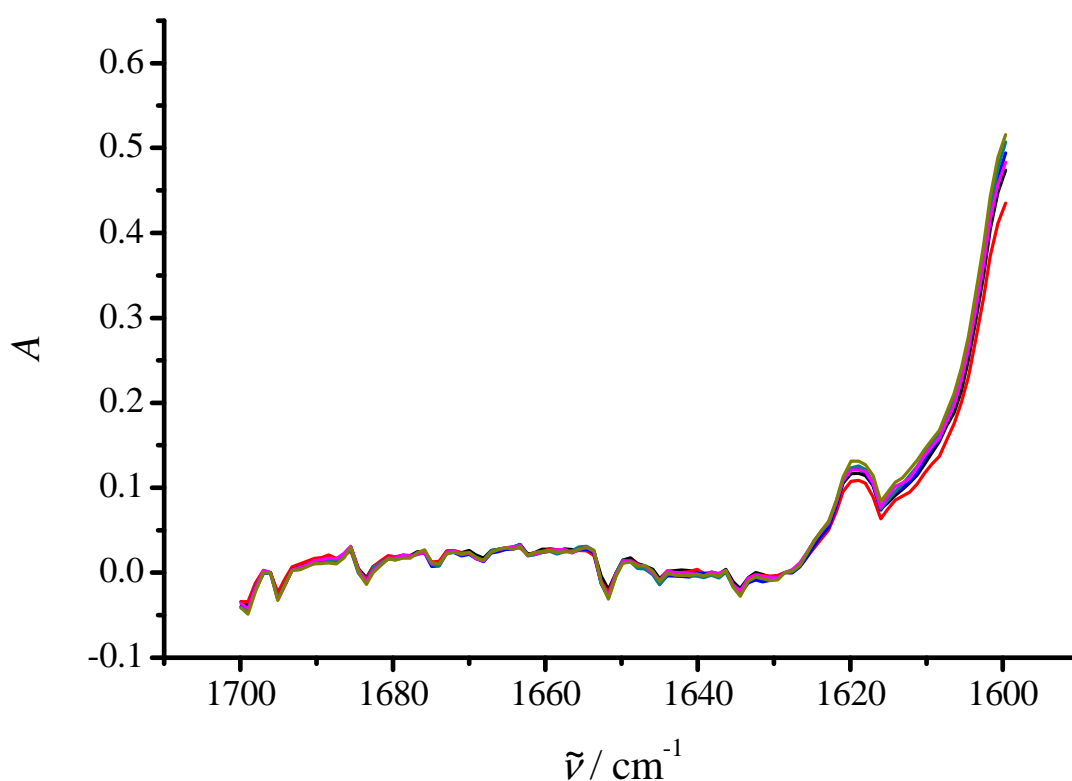


Abbildung 4.17. Ausgewählte ATR-FTIR-Spektren der Multischicht (PDDA-PSS)₄. Es zeigen sich nach einer Messdauer von 10 Stunden keine Änderungen im Bereich der Amid-I'-Bande.

Zur Untersuchung der Absorptionsintensitäten der verwendeten Polyelektrolyte sowie deren zeitliche Veränderung der Spektren bei 25 °C wurde die Polyelektrolytmultischicht (PDDA-PSS)₄ auf Si abgeschieden und Absorptionsspektren des Adsorbats in DCI bei pD 2.1 über eine Dauer von 10 h aufgenommen. In Abbildung 4.17 ist deutlich zu erkennen, dass keine zeitliche Veränderung der Spektren erfolgt. Eine relativ hohe Absorption ist bei einer Wellenzahl von 1600 cm⁻¹ zu sehen, welche auf die aromatische Struktur des PSS zurückzuführen ist.

Die FTIR-Absorptionsspektren von PDDA, PSS und Hyaluronsäure mit den jeweiligen Konzentrationen von $c = 50$ mg/mL, jeweils mit und ohne 0.5 M NaCl-Zusatz, wurden wie in Punkt 3.2.9 beschrieben in Transmission aufgezeichnet. Die D₂O-Untergrundspektren wurden anschließend von den gemessenen PolyelektrolytabSORptionsspektren subtrahiert. Die Absorption von PDDA ist in Abbildung 4.18 mit und ohne NaCl im Wellenzahlbereich von 1400 – 1700 cm⁻¹ dargestellt.

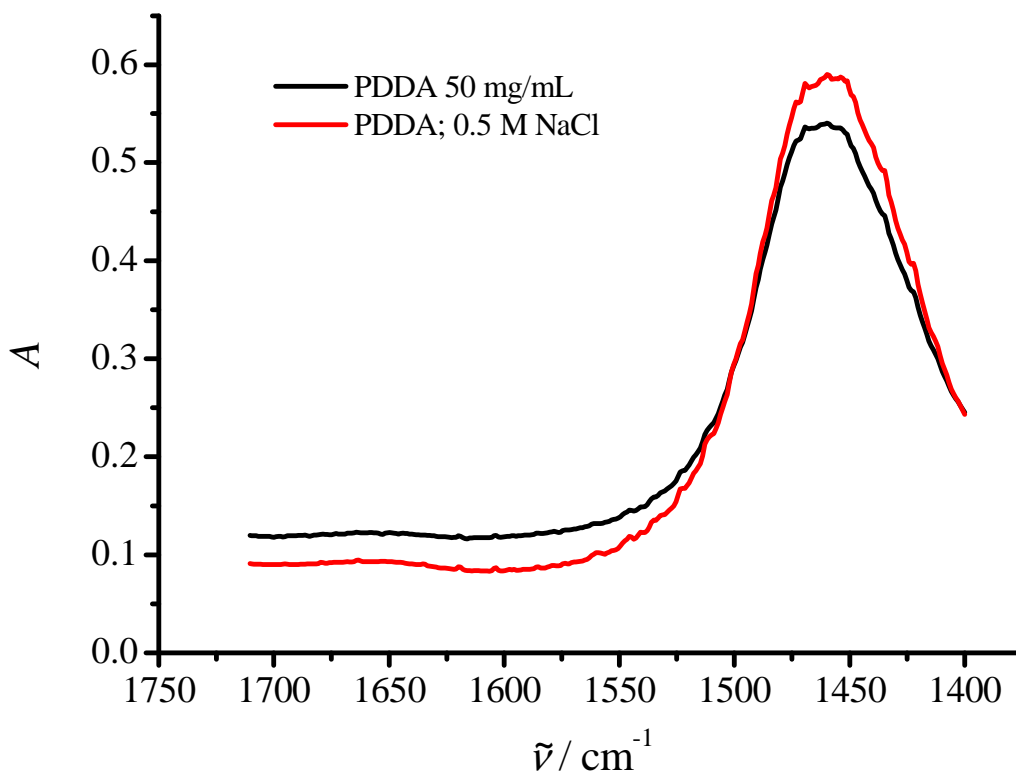


Abbildung 4.18. IR-Absorption von PDDA ($c = 50$ mg/mL) mit und ohne 0.5 M NaCl-Zusatz. Abgebildet ist der Wellenzahlbereich von 1400-1700 cm⁻¹ zur Veranschaulichung der relativen Intensitäten zum Vergleich zur Amid-I'-Bande.

Im Bereich von 1400 – 1500 cm⁻¹ ist eine deutliche Absorptionsbande zu erkennen, wohingegen im Bereich der Amid-I' Bande eine relativ geringe Intensität vorliegt. Da es sich

jedoch um eine sehr hohe Konzentration handelt, sollte die Absorption der Polyelektrolyte in Polyelektrolyt-Insulinmultischichten nur einen sehr geringen Beitrag liefern. In Abbildung 4.19 weisen die beiden Spektren mit bzw. ohne NaCl-Zusatz unterschiedliche Absorptionswerte auf, welche durch nicht exakte Einwaagen hervorgerufen werden können. Wichtig in diesem Fall ist, dass keine signifikante Absorption gegenüber der jeweiligen Basislinien auftritt. Das zeigt ebenfalls, dass aus der NaCl-Zugabe keine Auswirkung auf die Form von Amid-I'-Banden zu erwarten sind.

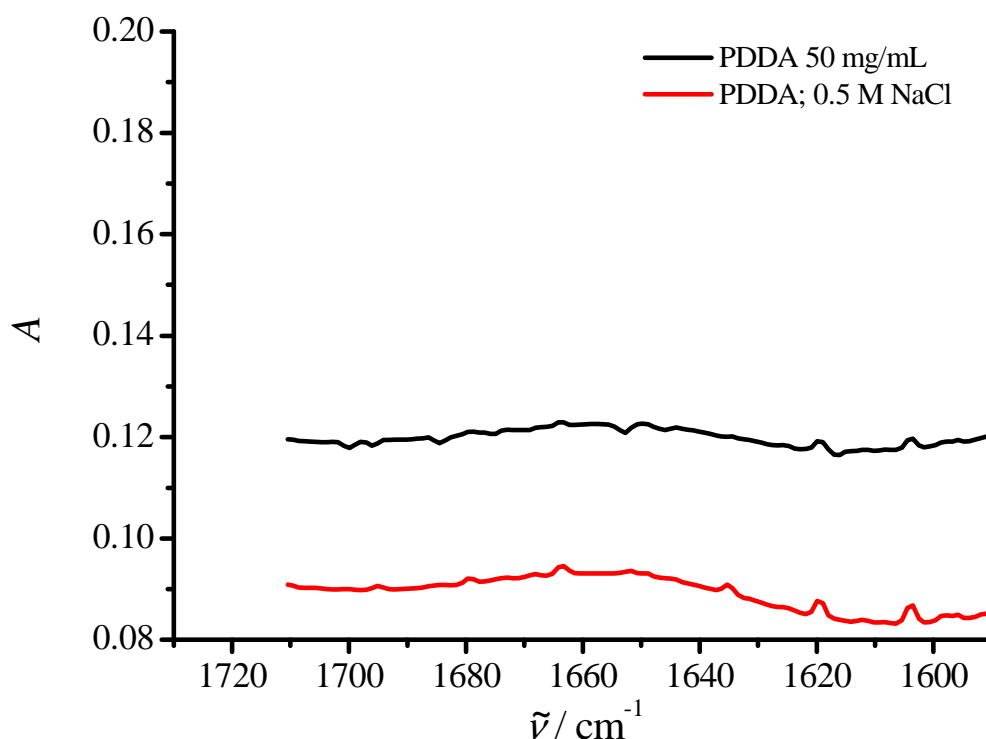


Abbildung 4.19. IR-Absorption von PDDA ($c = 50 \text{ mg/mL}$) mit und ohne 0.5 M NaCl-Zusatz. Abgebildet ist der Bereich der Amid-I'-Bande. Es liegt bei solch hohen Konzentrationen eine relativ geringe Absorption vor, welche in Polyelektrolyt-Insulin-Multischichten kaum einen Beitrag liefert.

In Abbildung 4.20 sind die Absorptionsspektren von Hyaluronsäure bzw. PSS mit bzw. ohne NaCl-Zusatz im Bereich der Amid-I'-Bande dargestellt. Im Falle von PSS weisen beide Spektren die gleiche Form auf und besitzen eine erhöhte Absorption bei einer Wellenzahl um 1600 cm^{-1} , was auf die aromatische Ringstruktur des Styrolrestes zurückgeführt werden kann. Auch in diesem Fall weisen die Spektren unterschiedliche Intensitäten aufgrund von nicht exakter Einwaagen auf. Im Bereich von $1610 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ ist keine Absorption relativ zur den jeweiligen Basislinien zu erkennen. Im Falle von Hyaluronsäure weisen beide Spektren

ebenfalls die gleiche Form auf, sind jedoch unterschiedlich in ihren Absorptionsintensitäten. Deutlich zu erkennen ist der absorbierende Bereich bei Wellenzahlen von $1600 - 1650 \text{ cm}^{-1}$. Hyaluronsäure besitzt eine Amidgruppe am N-Acetyl-glucosaminrest, welche einen Beitrag im Bereich der Amid-I'-Bande liefert.

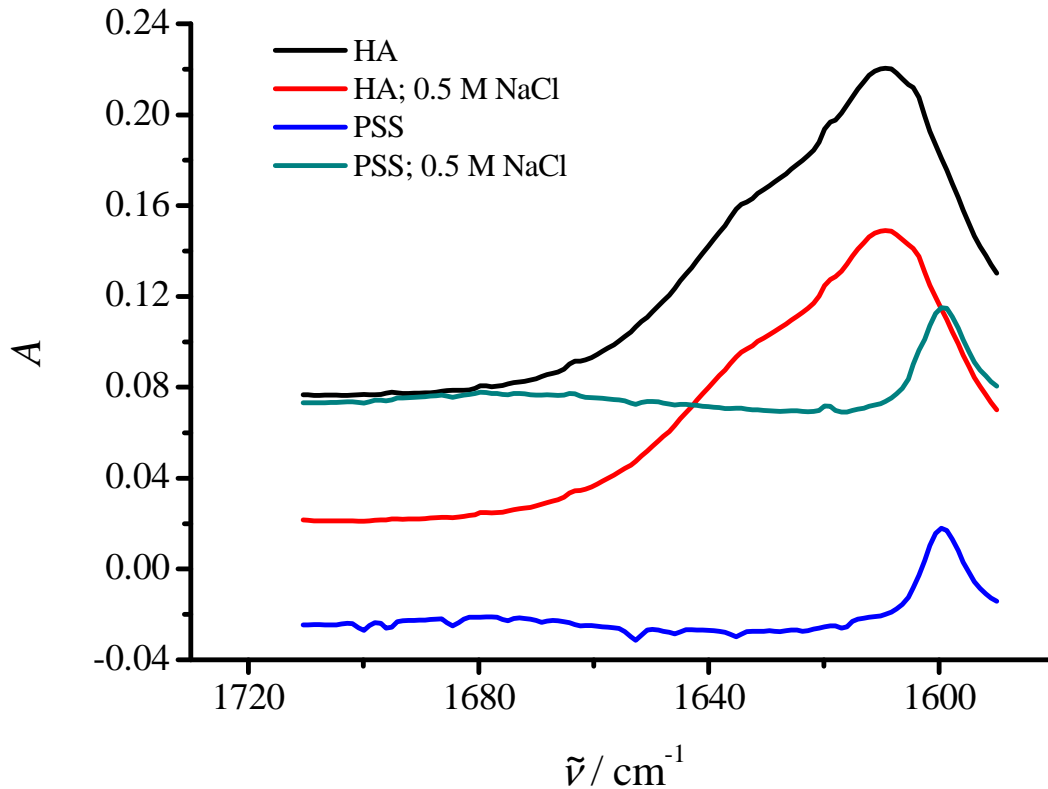


Abbildung 4.20. IR-Absorption von Hyaluronsäure bzw. PSS ($c = 50 \text{ mg/mL}$) jeweils mit und ohne 0.5 M NaCl -Zusatz.

Dennoch sind ATR-FTIR Messungen mit Hyaluronsäure-Insulinmultischichten möglich, da nur eine Amidgruppe pro negativer Ladung eines Hyaluronsäuremoleküls vorhanden ist. Im Gegensatz dazu existieren in einem Insulinmolekül 49 Amidbindungen mit einer Nettoladung von +5 bei $\text{pH} = 3$. Dementsprechend wären 10mal mehr Amidbindungen in Insulin als in der Hyaluronsäure in einer Hyaluronsäure-Insulindoppelschicht vorhanden, wenn eine Ladungskompensation vorliegen würde. Einerseits kann der Messuntergrund ausgehend von den Polyelektrolyten vernachlässigt werden, andererseits werden im Folgenden hauptsächlich die Änderungen der beobachteten ATR-FTIR-Spektren von Insulin betrachtet.

4.1.3.2 Untersuchung der Amid-I'-Bande von Polyelektrolyt-Insulinmultischichten ohne Keimzugabe bei konstanter Temperatur

Die zeitliche Änderung der Struktur der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ auf Silicium ohne Keimzugabe bei $T = 25^\circ\text{C}$ wurde, wie in Punkt 3.2.10 beschrieben, untersucht. In Abbildung 4.21 ist zu erkennen, dass keine signifikante Änderung der Spektren nach einer Messdauer von 10 Stunden zu erkennen ist. Das bedeutet, dass bei Raumtemperatur keine Sekundärstrukturänderung in Abwesenheit von Insulinkeimen erfolgt.

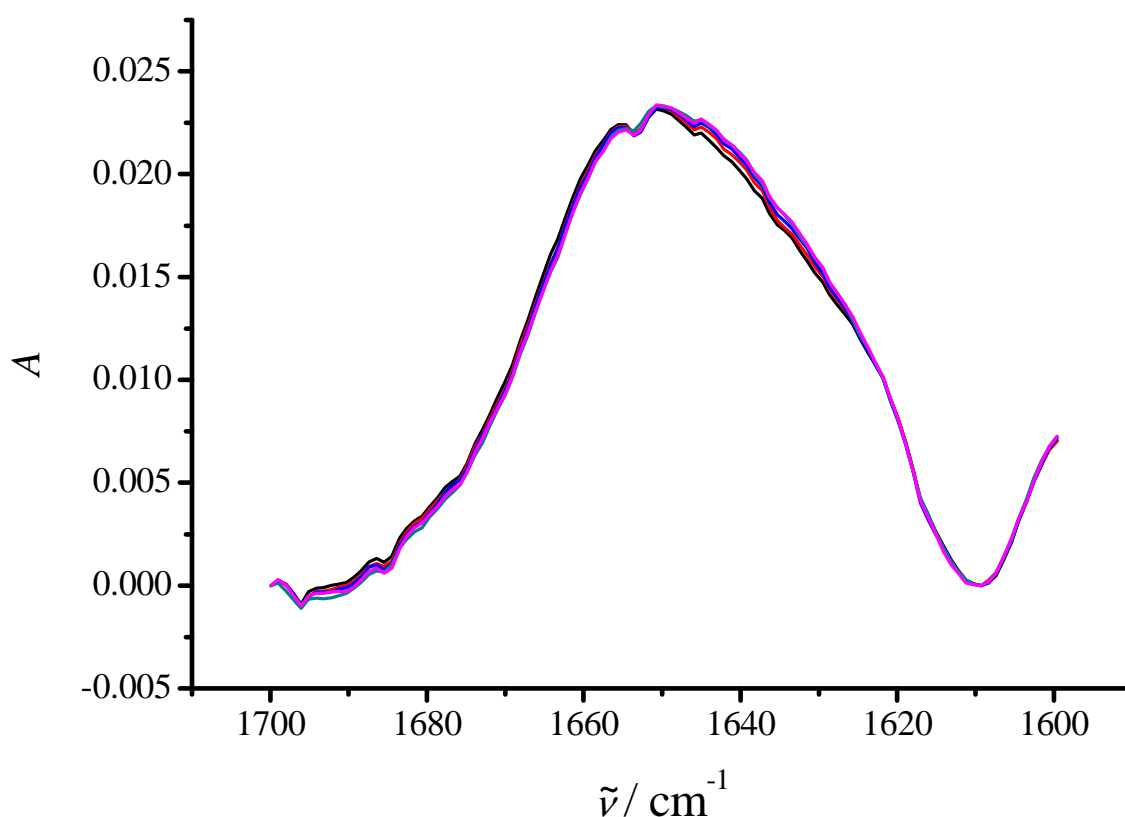


Abbildung 4.21. Ausgewählte ATR-FTIR-Spektren der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃. Nach einer Messdauer von 10 Stunden sind keine signifikanten Änderungen der Amid-I'-Bande zu erkennen.

Analog wurde die zeitliche Änderung der Spektren auch bei der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₃ ohne Keimzugabe bei $T = 25^\circ\text{C}$ wie in Punkt 3.2.10 beschrieben untersucht. In Abbildung 4.22 ist zu erkennen, dass auch in diesem Fall keine signifikante Änderung erfolgt.

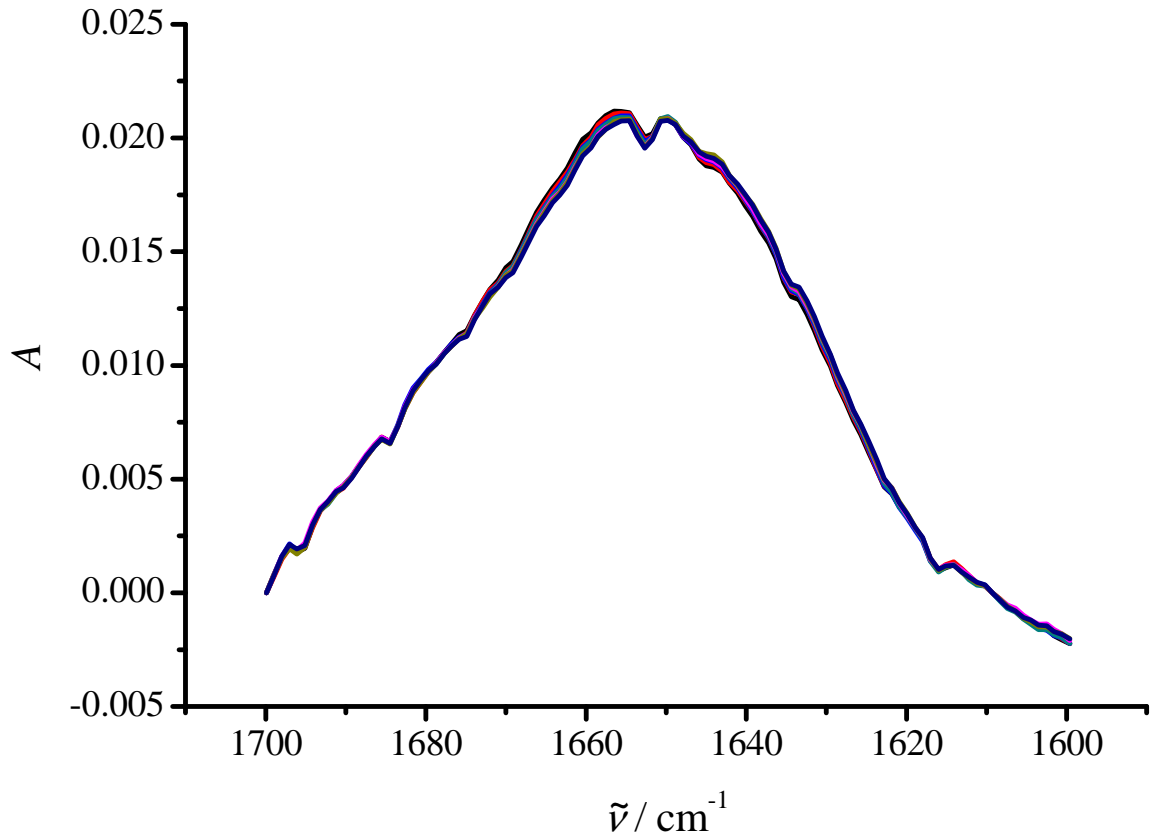


Abbildung 4.22. Ausgewählte ATR-FTIR-Spektren der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₃. Nach einer Messdauer von 10 Stunden sind keine signifikanten Änderungen der Amid-I'-Bande zu erkennen.

4.1.3.3 Untersuchung der Amid-I'-Bande von Polyelektrolyt-Insulinmultischicht bei einer Temperatur von 70 °C

Nach dem Einbau des mit der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ beschichteten Si-Kristalls in die ATR-Zelle wurde DCI bei pD 2.1 mit 0.1 M NaCl in die Probenkammer eingefüllt. Die Dauer der Messungen betrug 17 Stunden, wobei eine konstante Temperatur von 70°C eingestellt wurde, welche zu Beginn der Messung mittels eines vorgeheizten Wasserbads sehr schnell in der Probenkammer erreicht wurde. In Abbildung 4.23 sind ausgewählte Spektren der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ bei einer Temperatur von 70 °C dargestellt. Das Absorptionsmaximum liegt zu Beginn der Messung bei einer Wellenzahl von 1644 cm⁻¹, was auf einen erhöhten Anteil an ungeordneten Strukturen schließen lässt. Mit fortschreitender Zeit verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf einen Wert von 1627 cm⁻¹. Das bedeutet, dass eine leichte Änderung der Sekundärstruktur des Insulins nach Erhöhung der Temperatur auf 70 °C erfolgt, wobei eine leichte Zunahme der β -Faltblattstrukturen und eine Abnahme der α -

Helixstrukturen stattfindet. Eine semiquantitative Aussage liefert die Auftragung der Absorption bei einer Wellenzahl von 1627 cm^{-1} .

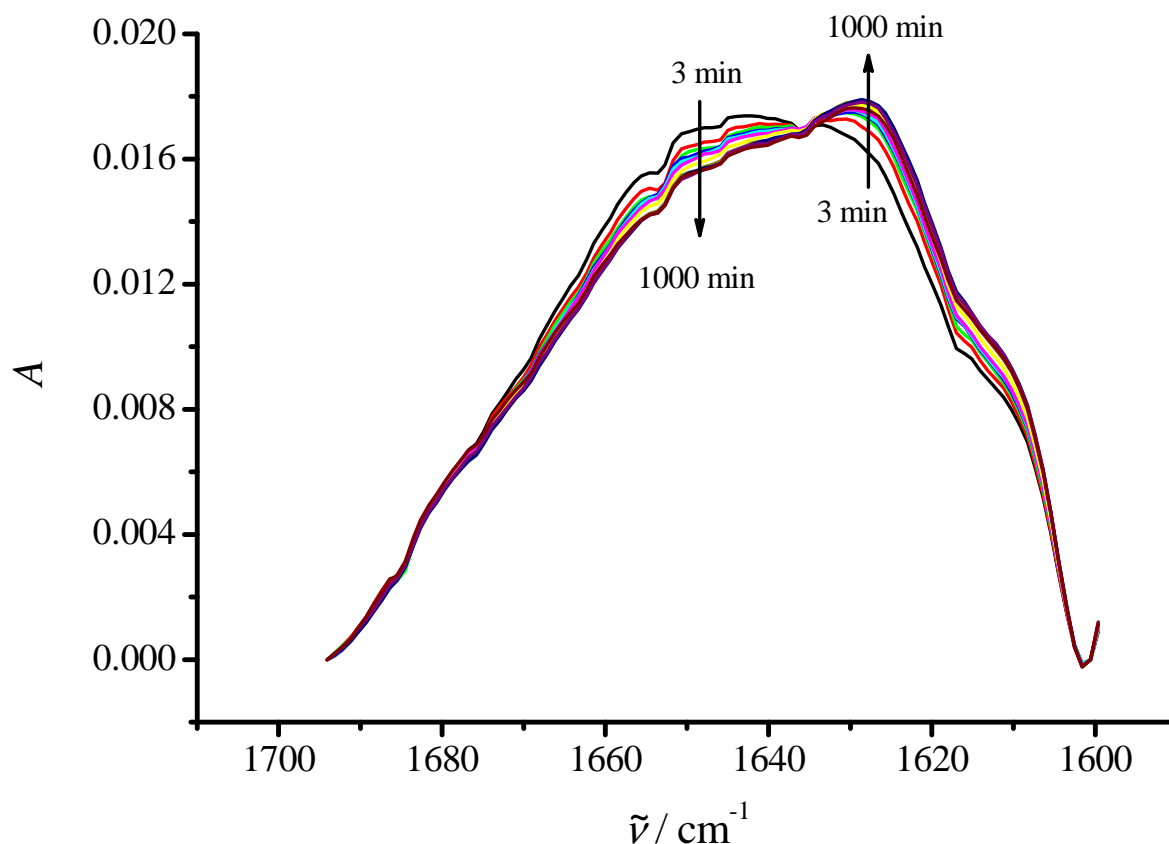


Abbildung 4.23. Ausgewählte ATR-FTIR-Spektren der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ in Kontakt mit DCI bei $\text{pD} = 2.1$ und 0.1 M NaCl -Zusatz. Für 17 h wurde die Multischicht auf 70°C erhitzt und die Absorption verfolgt.

In Abbildung 4.24 ist zu erkennen, dass der Sekundärstrukturanteil der β -Faltblätter im Zeitraum von bis zu ca. 3 Stunden eine Änderung aufweist und anschließend keine weitere signifikante Änderung bis zu einem Zeitpunkt von 1000 Minuten auftritt. Gleichzeitig kann qualitativ gesagt werden, dass die Anteile an α -Helices und ungeordneter Strukturen abnehmen, da die Absorptionen bei den jeweiligen Wellenzahlen um 1650 cm^{-1} bzw. um 1644 cm^{-1} sinken. Die Änderung des β -Faltblattanteils resultiert möglicherweise in der Ausbildung von amorphen, ungeordneten Aggregaten des Insulin in der Multischicht.

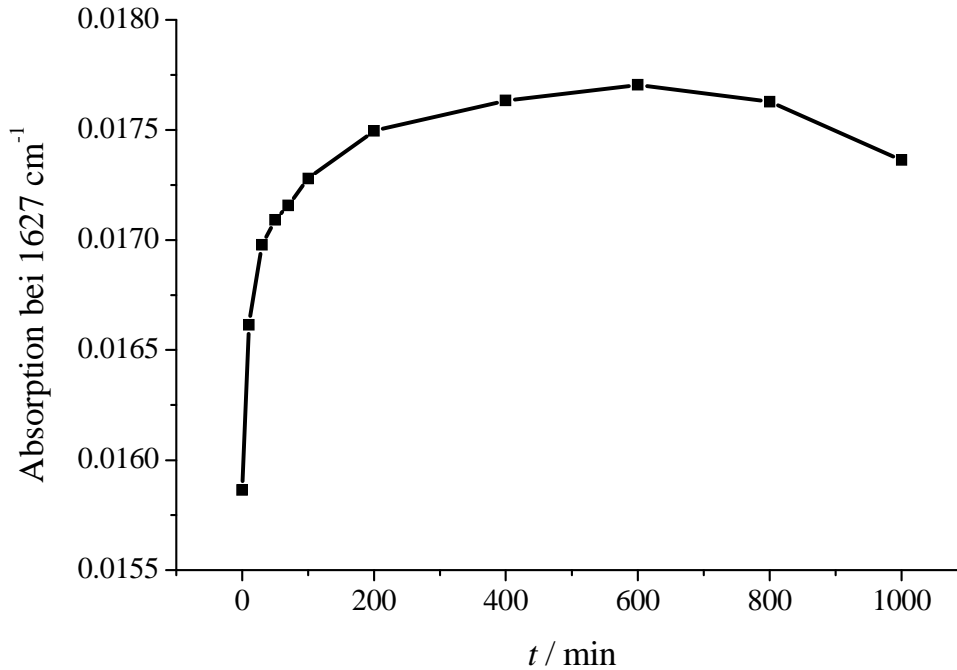


Abbildung 4.24. Absorption bei einer Wellenzahl von 1627 cm^{-1} als Funktion der Zeit. Bis zu einer Messdauer von 3 Stunden steigt die Absorption an, was aus der Ausbildung von β -Faltblattstrukturen des Insulins in der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ hervorgeht.

In einem weiteren Versuch, bei welchem die NaCl-Konzentration von 0.1 auf 0.5 M erhöht wurde, wurde die IR-Absorption der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ bei $T = 70\text{ °C}$ in DCl bei $\text{pD} = 2.1$ über eine Dauer von 17 h verfolgt. In Abbildung 4.25 ist zu erkennen, dass sich das Absorptionsmaximum der Amid-I'-Bande zu Beginn der Messung bei einer Wellenzahl um 1648 cm^{-1} befindet, was einen erhöhten Anteil an ungeordneten Strukturen (allgemein bei einer Wellenzahl von 1645 cm^{-1} zu finden.¹⁶⁸ vermuten lässt. Im Bereich um 1600 cm^{-1} liegt die Absorption durch das Polyanion PSS vor. In Abbildung 4.26 ist eine Auftragung der Absorptionen bei einer Wellenzahl von 1627 cm^{-1} als Funktion der Zeit von ausgewählten Spektren zu sehen.

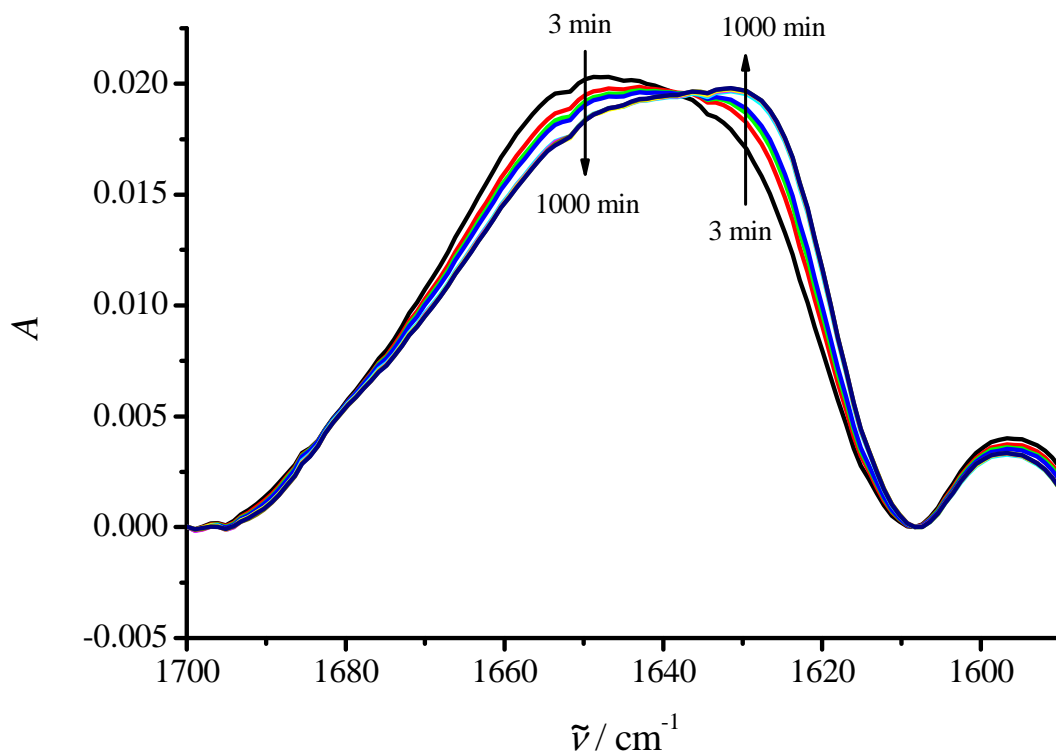


Abbildung 4.25. Ausgewählte Spektren der Amid-I'-Bande von der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ bei einer Temperatur von 70°C bei pD 2.1 und einem 0.5 M NaCl-Zusatz. Es zeigt sich eine leichte Änderung der Sekundärstruktur des in der Multischicht eingebetteten Insulins.

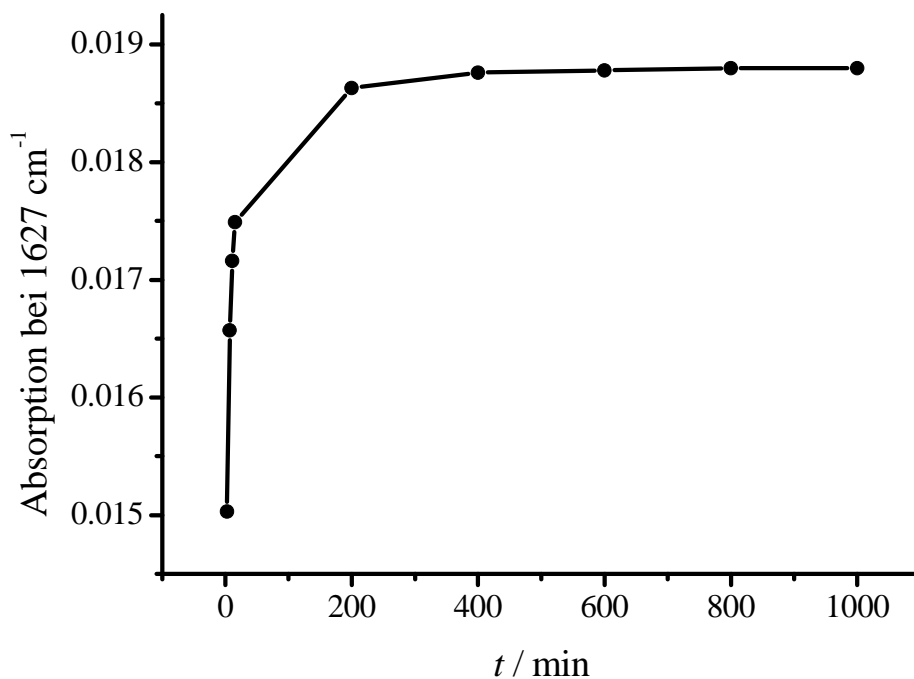


Abbildung 4.26. Absorption bei einer Wellenzahl von 1627 cm⁻¹ als Funktion der Zeit. Bis zu einer Messdauer von 3 Stunden steigt die Absorption an, was aus der Ausbildung von β -Faltblattstrukturen des Insulins in der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ hervorgeht.

In einem Zeitraum von ca. 3 Stunden erfolgt eine Konformationsänderung des Insulins zugunsten von β -Faltblattstrukturen. Nach dieser Messdauer ist keine weitere Änderung der Absorption bei einer Wellenzahl von 1627 cm^{-1} zu erkennen. Das bedeutet, dass sich die Sekundärstrukturanteile zugunsten der β -Faltblattstrukturen verschoben haben. Auch die Sekundärstrukturanalysen (siehe Abbildung 4.27), welche zu Beginn nach 3 Minuten und am Ende der Messdauer nach 1000 Minuten durchgeführt wurden, zeigen, dass nach einer längeren Zeit eine partielle Umwandlung in β -Faltblattstrukturen erfolgt. Vermutlich entstehen jedoch nur amorphe, ungeordnete Insulinaggregate innerhalb der Multischicht, wobei eine Umwandlung in Amyloidfibrillen nicht oder nur in sehr geringem Maße erfolgt. In den folgenden Abbildungen 4.27 und 4.28 sind beispielhaft die angepassten Banden und die experimentell ermittelten Amid-I'-Banden, welche nach einer Messdauer von 3 Minuten bzw. nach 1000 Minuten aufgenommen wurden, dargestellt. Die Bandenanpassungen wurden im Wellenzahlbereich zwischen 1700 und 1609 cm^{-1} (Absorption um 1600 cm^{-1} von PSS wurde ausgeschlossen) durchgeführt.

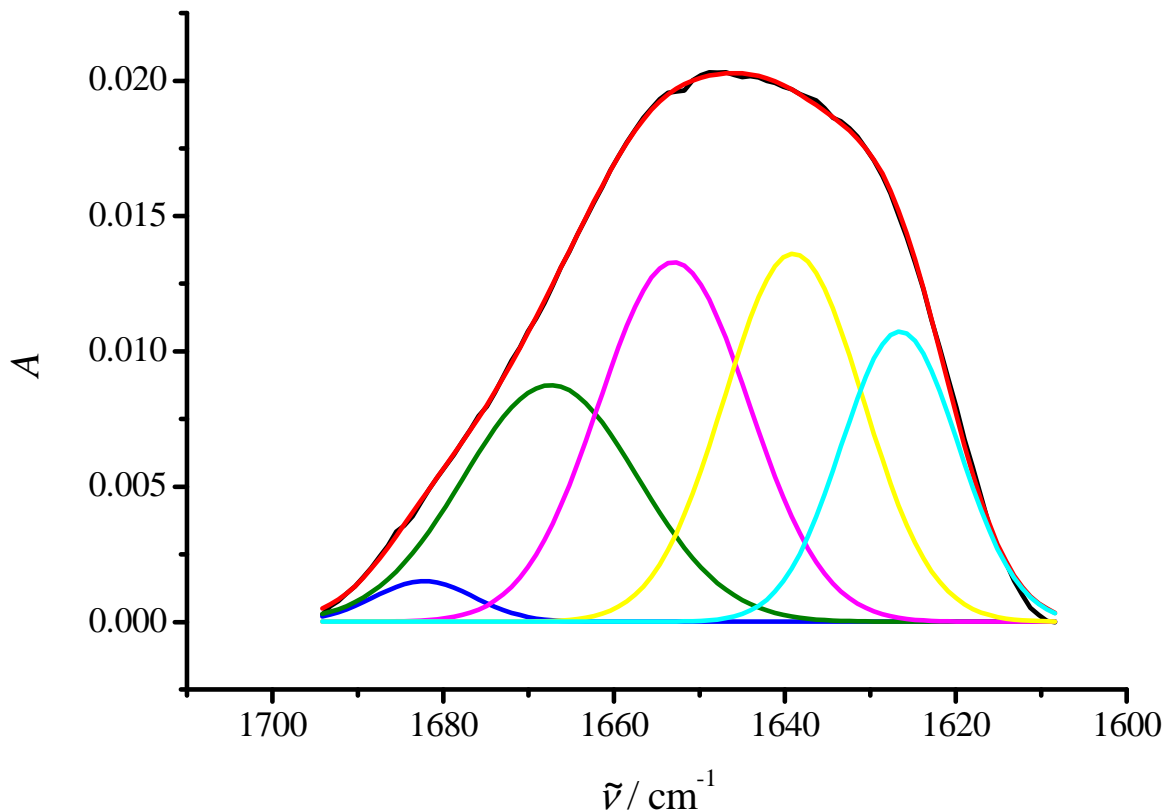


Abbildung 4.27. Amid-I'-Bande der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ bei einer Temperatur von $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ nach einer Messdauer von 3 Minuten. Der β -Faltblattstrukturanteil ist zu diesem Zeitpunkt relativ gering. (experimentell ermitteltes Spektrum (schwarz), angepasste Kurve (rot), Subbanden: β -Faltblattstrukturen (hellblau), ungeordnete Strukturen (gelb), α -Helixstrukturen (pink) und Schleifenstrukturen (grün, dunkelblau))

Die in Abbildung 4.27 dargestellte Amid-I'-Bande von Insulin in der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ nach einer Messdauer von 3 Minuten weist einen relativ geringen Anteil an β -Faltblattstrukturen auf, welche durch die hellblaue Subbande beschrieben werden. Der Anteil der β -Faltblattstrukturen liegt im Bereich von ca. 20% in Bezug auf die gesamten Sekundärstrukturanteile (siehe Tabelle 4.9). Der Anteil an α -Helices sowie derjenige ungeordneter Strukturen liegt bei jeweils 30%. Nach einer Messdauer von 1000 Minuten zeigt sich ein starker Anstieg des β -Faltblattstrukturanteils (siehe Abbildung 4.28).

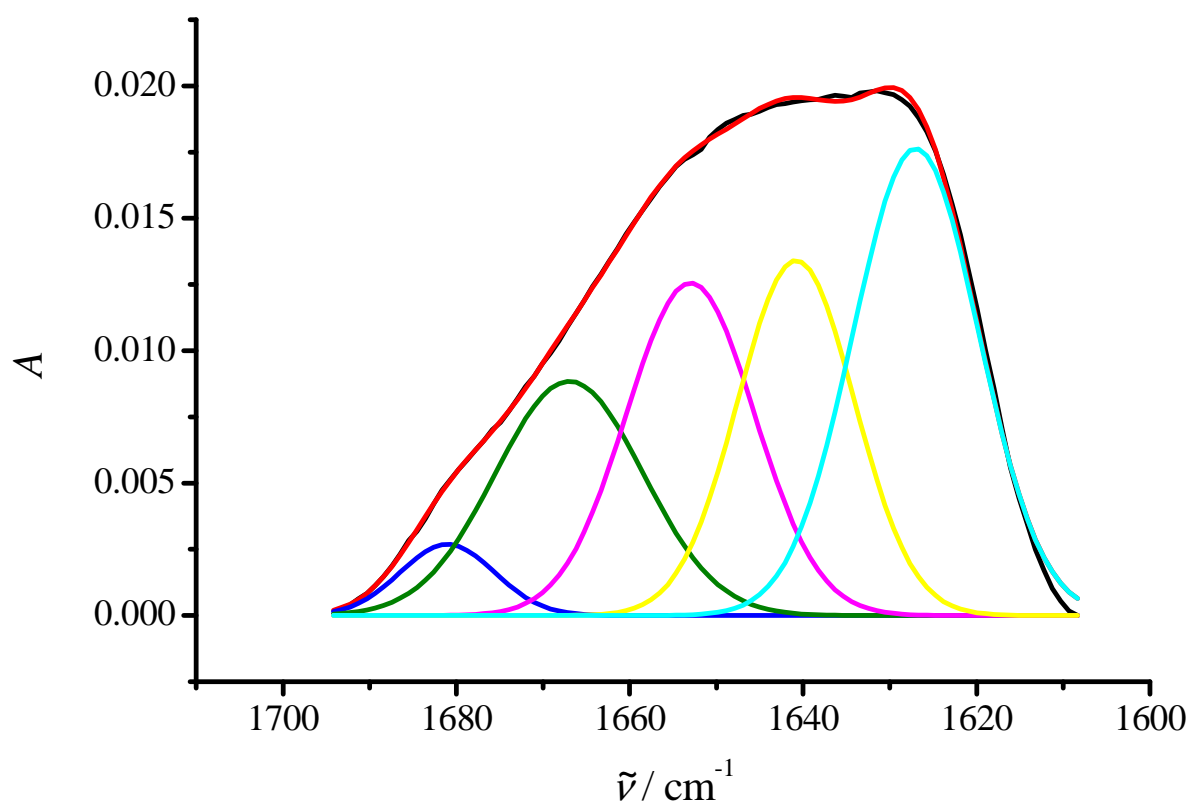


Abbildung 4.28. Amid-I'-Bande der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ bei einer Temperatur von 70 °C nach einer Messdauer von 1000 Minuten. Der β -Faltblattstrukturanteil ist deutlich angestiegen (experimentell ermitteltes Spektrum (schwarz), angepasste Kurve (rot), Subbanden: β -Faltblattstrukturen (hellblau), ungeordnete Strukturen (gelb), α -Helixstrukturen (pink) und Schleifenstrukturen (grün, dunkelblau)).

Der Anteil der β -Faltblätter steigt auf einen Wert von ca. 32 %, wobei die Anteile der Schleifenstrukturen, der α -Helices und der ungeordneten Strukturen alle im vergleichbaren Maße abnehmen (siehe Tabelle 4.9).

Tabelle 4.9. Sekundärstrukturanteile (in %) von Insulin in der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ bei einer Temperatur von 70 °C bei pD 2.1 mit einem 0.5 M NaCl-Zusatz. Nach einer Messdauer von 1000 Minuten steigt der Anteil an β -Faltblättern von 20 auf 32 % auf Kosten der restlichen Sekundärstrukturanteile an. Alle Wellenzahlen der Subbanden besitzen die Einheit cm^{-1} .

| | Schleifenstrukturen | | α -Helix | ungeordnet | β -Faltblatt |
|---------------------------------------|---------------------|-----------|-----------------|------------|--------------------|
| | 1683-1680 | 1667-1665 | 1653 | 1641-1639 | 1627-1625 |
| PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ | | | | | |
| 3 min | 0.77 | 20.34 | 30.19 | 29.41 | 19.61 |
| 1000 min | 1.16 | 15.71 | 27.21 | 23.80 | 32.49 |

Im Anhang ist in Abbildung 7.9 die Reproduktionsmessung dargestellt. Die relativen Fehler der angegebenen prozentualen Anteile liegen im Bereich von $\pm 2\%$ innerhalb einer Messreihe, wobei die absoluten Fehler für jede Probe bei ca. $\pm 5\text{-}10\%$ liegen. Das bedeutet, dass die Änderungen der einzelnen Sekundärstrukturanteile genauer sind als die absoluten Werte. Diese Fehlerabschätzung gilt für alle folgenden Sekundärstrukturanalysen.

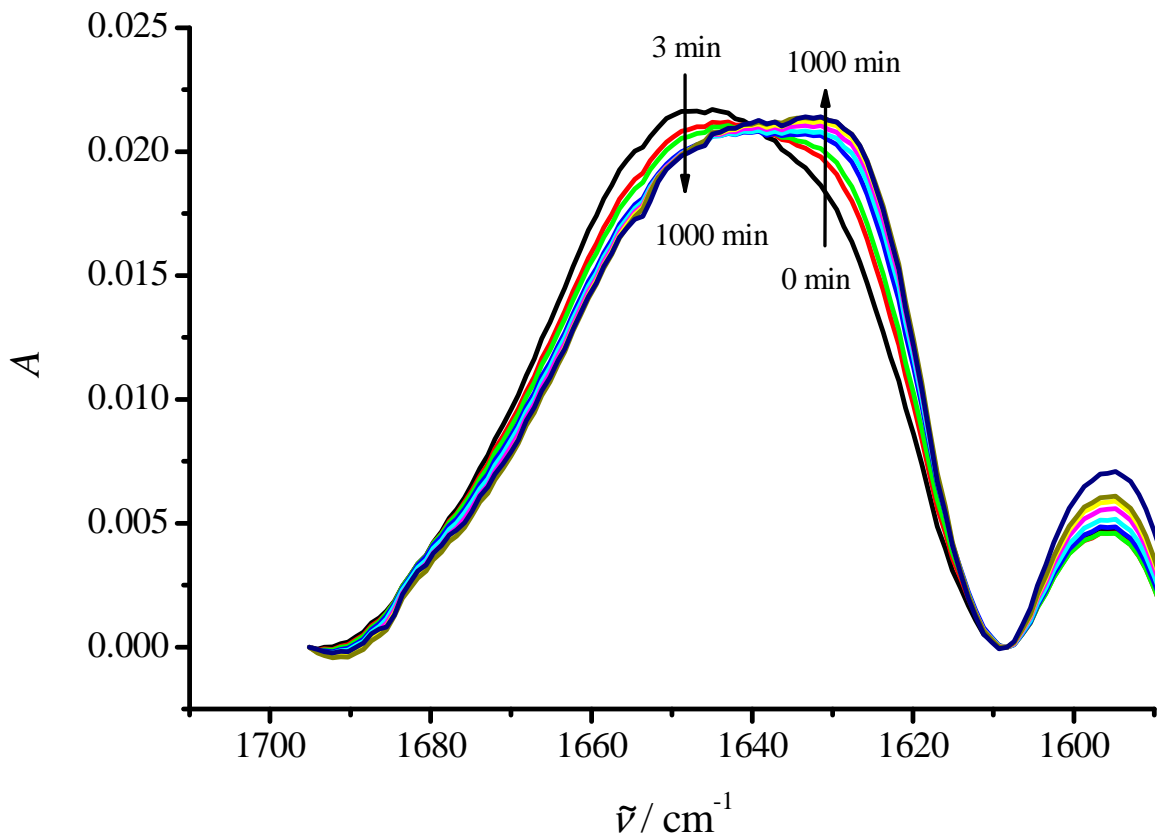


Abbildung 4.29. Ausgewählte Spektren der Amid-I'-Bande der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₃ bei einer Temperatur von 70°C und einem 0.5 M NaCl-Zusatz. Es zeigt sich eine Änderung der Sekundärstruktur des in der Multischicht eingebetteten Insulins.

Analoge Messungen wurden für die Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₃ durchgeführt, wobei auch in diesem Fall in Gegenwart von DCI bei pD 2.1, einem 0.5 M NaCl-Zusatz bei einer Temperatur von 70 °C für eine Dauer von 17 Stunden die Amid-I'-Bande verfolgt wurde.

In Abbildung 4.29 ist zu erkennen, dass die Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₃ ein vergleichbares Verhalten bei einer Temperatur von 70°C aufweist, wie die Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ (siehe Abbildung 4.25) unter gleichen Bedingungen. In Abbildung 4.30 sind die Absorptionen bei einer Wellenzahl von 1627 cm⁻¹ als Funktion der Zeit aufgetragen. Bis zu einer Messdauer von ca. 3 Stunden ist eine relative große Änderung der Absorption zu beobachten, welche vermutlich aus der Ausbildung von amorphen, ungeordneten Aggregaten des Insulins in der Multischicht resultiert. Anschließend liegt eine nicht signifikante Änderung der Absorption vor.

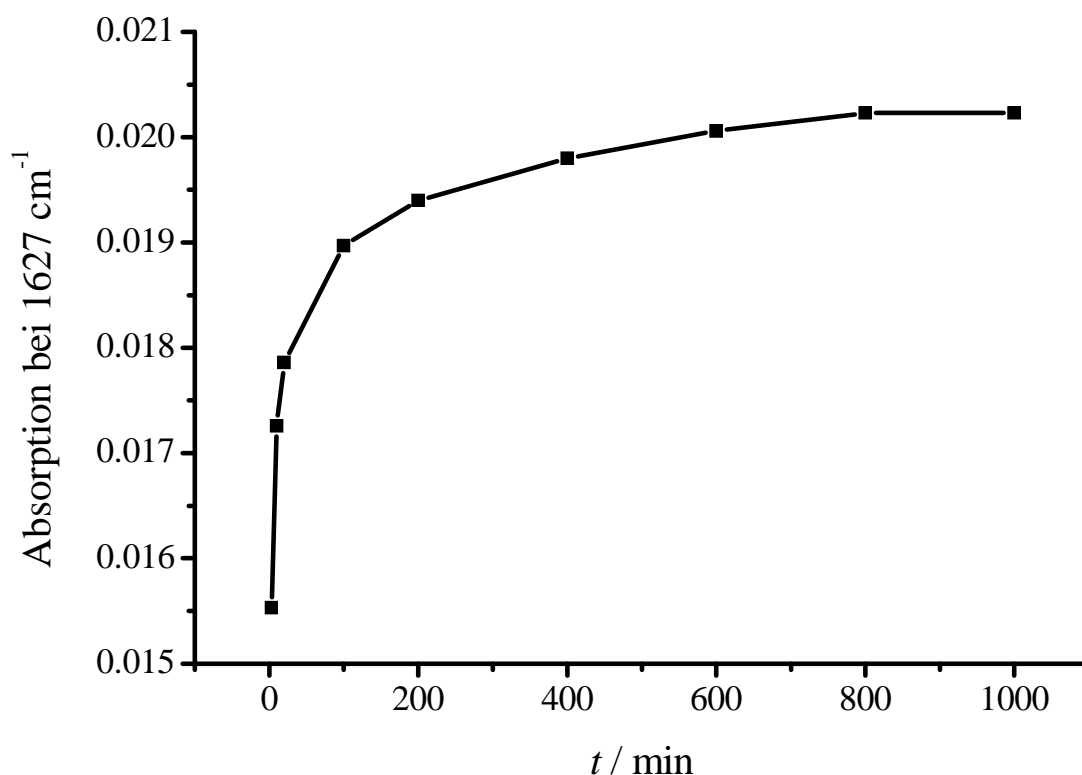


Abbildung 4.30. Absorption bei einer Wellenzahl von 1627 cm⁻¹ als Funktion der Zeit. Bis zu einer Messdauer von ca. 3 Stunden steigt die Absorption an, was aus der Ausbildung von β -Faltblattstrukturen des Insulins in der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₃ hervorgeht.

Die Sekundärstrukturanteile des Insulins in der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₃ nach 3 Minuten bzw. nach 1000 Minuten Messdauer sind in der Tabelle 4.10 aufgeführt. Nach einer Dauer von 1000 Minuten wächst der β -Faltblattanteil ähnlich wie bei der Multischicht

PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ von 18 auf 32 %, wobei eine Abnahme der prozentualen Anteile der restlichen Sekundärstrukturen erfolgt.

Tabelle 4.10. Sekundärstrukturanteile (in %) von Insulin in der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₃ bei einer Temperatur von 70 °C bei pD 2.1 mit einem 0.5 M NaCl-Zusatz. Nach einer Messdauer von 1000 Minuten steigt der Anteil an β -Faltblättern von 20 auf 30 % auf Kosten der restlichen Sekundärstrukturanteile an. Alle Wellenzahlen der Subbanden besitzen die Einheit cm^{-1} .

| | Schleifenstrukturen | | α -Helix | ungeordnet | β -Faltblatt |
|--------------------------------------|---------------------|-----------|-----------------|------------|--------------------|
| | 1683-1680 | 1667-1665 | 1653 | 1641-1639 | 1627-1625 |
| PDDA-PSS-(Ins-HA)₃ | | | | | |
| 3 min | 2.18 | 22.42 | 29.34 | 27.70 | 18.45 |
| 1000 min | 3.65 | 18.90 | 23.23 | 22.55 | 31.90 |

Sowohl die Daten aus der Röntgenreflektometrie (siehe Tabelle 4.6), als auch die Sekundärstrukturanalyse der ATR-FTIR-Messungen zeigen, dass der Aggregationsprozess von Insulin in den Multischichten innerhalb weniger Stunden zum Stillstand gelangt. Wird das Aggregationsverhalten von Insulin in Polyelektrolytmultischichten mit demjenigen in Polyacrylsäure (PAA)-Bürsten verglichen, so zeigt sich eine ähnlich geringe Veränderung der Proteinstruktur. In PAA-Bürsten wird nach einer Adsorption die native Proteinkonformation bei einem pD-Wert von 7 aufrechterhalten.¹⁶⁹ Bei einem pD-Wert von 2 ist nur ein geringer Anstieg des β -Faltblattanteils des Insulins in PAA-Bürsten zu verzeichnen. Bei einer Temperatur von 60 °C über eine Messdauer von 10 Stunden erfolgt keine Ausbildung von Amyloidfibrillen bei pD 2.^{169,170} Somit ist das Verhalten an PAA-Bürsten vergleichbar mit dem in Multischichten. Weiterhin ist bekannt, dass eine starke Ausbildung amorpher Aggregate in PAA-Bürsten resultiert, wenn eine Erhöhung der Ionenstärke auf 500 mM bei pD = 2 bei 23 °C erfolgt.¹⁷⁰ Diese Beobachtung ist konsistent mit dem starken Anstieg der Multischichtdicke bei Abscheidung von Insulin in dieser Arbeit.

4.1.3.4 Untersuchung der zeitlichen Änderung der Amid-I'-Bande von adsorbierten Insulinkeimen

Zunächst wurde die zeitliche Änderung der Amid-I'-Bande von Insulinkeimen untersucht, indem die Doppelschicht PDDA-PSS auf einem Si-Kristall adsorbiert und anschließend eine Lösung aus DCI mit pD 2.1, einem 0.5 M NaCl-Zusatz und einem Insulinkeimzusatz von 0.1 mg/mL in die Probenkammer gegeben wurde. Für eine Dauer von 14.2 Stunden wurden Absorptionsspektren aufgenommen (siehe Abbildung 4.31).

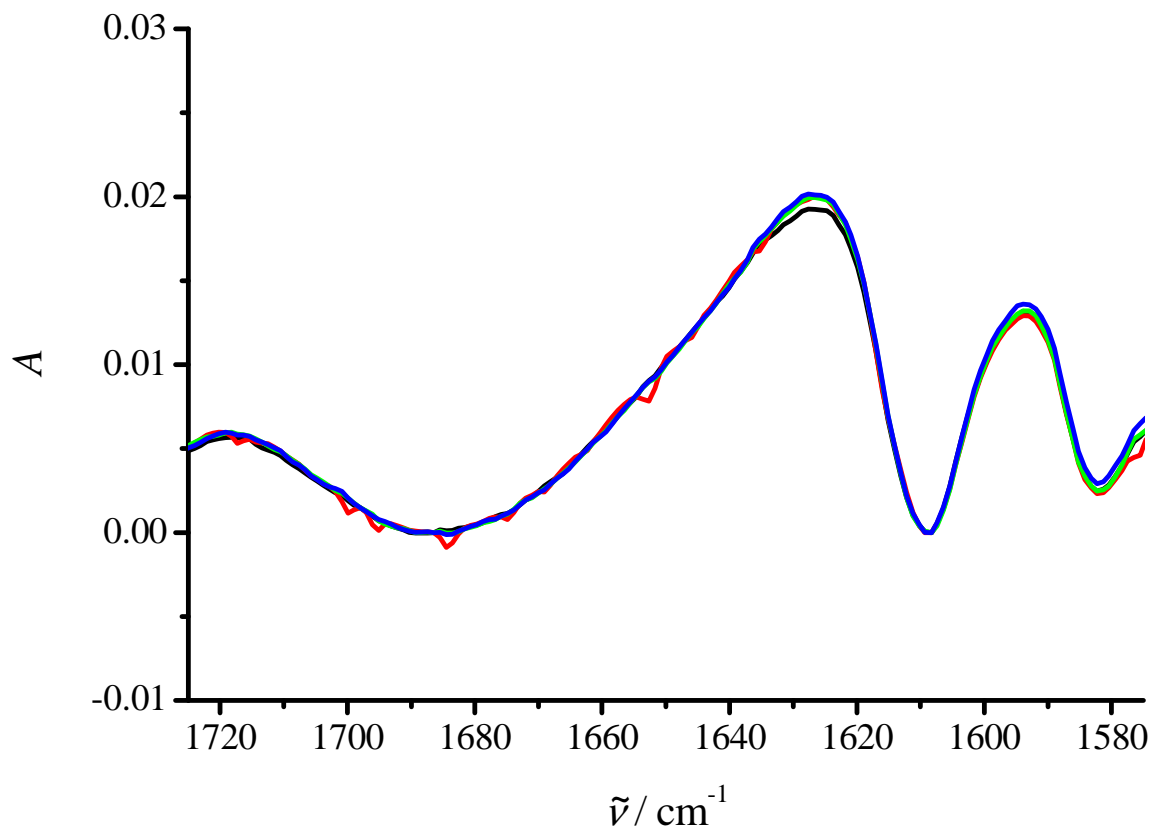


Abbildung 4.31. Insulinkeime in Gegenwart der Doppelschicht PDDA-PSS. Die IR-Absorption wurde in DCI mit pD 2.1, einem 0.5 M NaCl-Zusatz und einem Insulinkeimzusatz von 0.1 mg/mL gemessen. Die Absorption ändert sich über einen Zeitraum von 14.2 Stunden bei 25°C nicht. Die Maxima der Spektren liegen bei einer Wellenzahl um 1627 cm^{-1} . Gezeigt sind vier ausgewählte Spektren nach einer Messdauer 0 (schwarz), 300 (rot), 600 (grün), 850 (blau) Minuten.

In Abbildung 4.31 ist zu sehen, dass keine zeitlichen Änderungen hinsichtlich der Intensität und der Lage der Absorptionsmaxima der Spektren erfolgen. Die Maxima der Spektren liegen bei einer Wellenzahl um 1627 cm^{-1} , was aus der großen Anzahl der intermolekularen β -Faltblätter der fibrillären Strukturen hervorgeht. Im Falle einer keiminduzierten Aggregation von Insulin in oder an Multischichten ist eine zeitliche Änderung der IR-Absorption im Bereich der Amid-I'-Bande somit durch die Insulinkeime selbst auszuschließen.

4.1.3.5 Untersuchung der Amid-I'-Bande von Polyelektrolyt-Insulinmultischichten nach der Zugabe von Insulinkeimen

Zur Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ wurde eine Insulinkeimlösung, wie bereits in Punkt 3.2.4.15 beschrieben, hinzugegeben. Diese Messung wurde bei einer konstanten Temperatur von 25 °C durchgeführt.

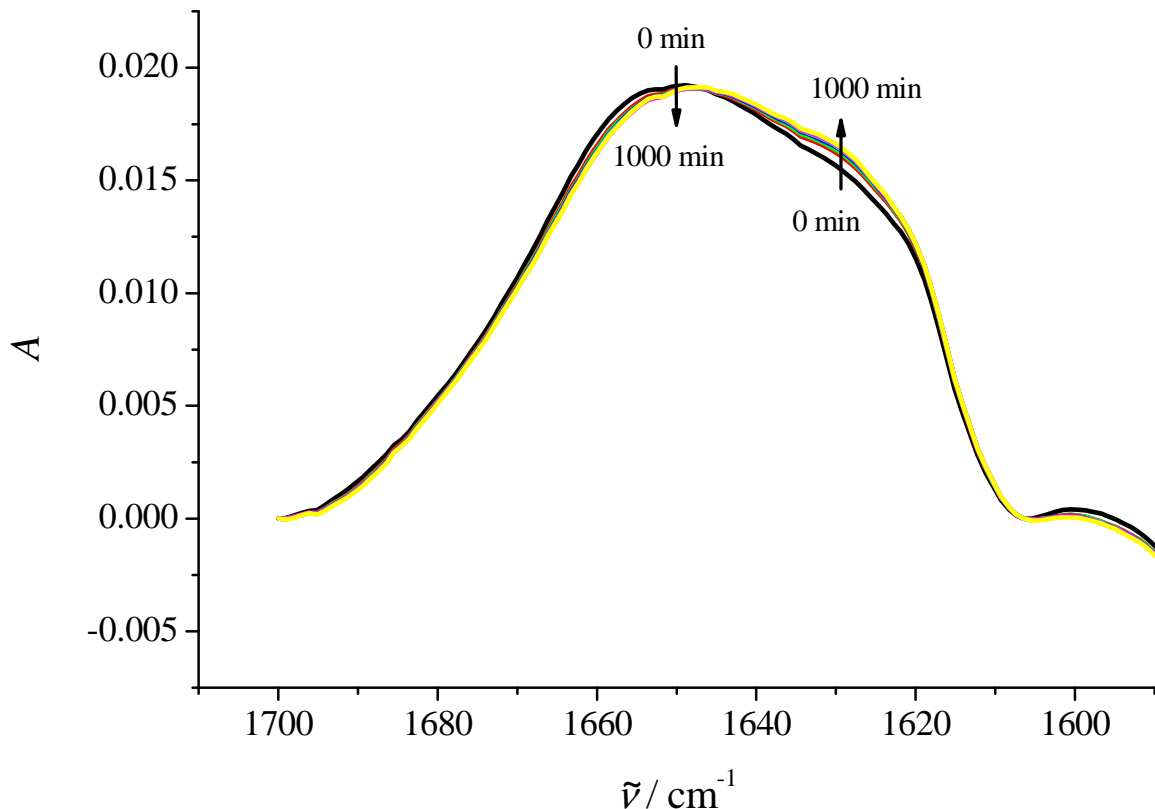


Abbildung 4.32. Ausgewählte ATR-FTIR-Spektren der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ nach der Zugabe einer Insulinkeimlösung in DCI bei pD 2.1 in Gegenwart von 0.5 M NaCl und einer Konzentration von $c(\text{Insulinkeime}) = 0.1 \text{ mg/mL}$. Bei einer Temperatur von 25 °C tritt keine signifikante Änderung der Sekundärstruktur des in der Multischicht eingebetteten Insulins auf.

In Abbildung 4.32 ist zu erkennen, dass durch die Zugabe von Insulinkeimen die Sekundärstruktur des in der Multischicht eingebetteten Insulins kaum verändert wird. Eine Sekundärstrukturanalyse zeigt, dass die Sekundärstrukturanteile über einen Zeitraum von 1000 Minuten nahezu konstant bleiben (siehe Tabelle 4.11). Der β -Faltblattanteil steigt nur um einen geringen Wert von 22 auf 24 % an. Bei einer Wellenzahl um 1627 cm^{-1} ist eine Schulter in der Amid-I'-Bande zu sehen, welche aus einem signifikanten Anteil an intermolekularen β -Faltblättern vermutlich ausgehend von amorphen Aggregaten resultiert.

Tabelle 4.11. Sekundärstrukturanteile (in %) von Insulin in der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ bei einer konstanten Temperatur 25 °C in Gegenwart von Insulinkeimen bei pD 2.1 mit einem 0.5 M NaCl-Zusatz. Nach einer Messdauer von 1000 Minuten ist keine signifikante Änderung des β -Faltblattanteils zu erkennen. Alle Wellenzahlen der Subbanden besitzen die Einheit cm^{-1} .

| | Schleifenstrukturen | | α -Helix | ungeordnet | β -Faltblatt |
|---------------------------------------|---------------------|-----------|-----------------|------------|--------------------|
| | 1683-1680 | 1667-1665 | 1653 | 1641-1639 | 1627-1625 |
| PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ | | | | | |
| 3 min | 2.83 | 26.55 | 30.31 | 18.62 | 21.70 |
| 1000 min | 1.67 | 24.46 | 28.72 | 21.40 | 23.92 |

Eine Analoge Messung wurde mit der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₃ durchgeführt. Nach der Zugabe der Insulinkeimlösung mit einer Konzentration $c(\text{Ins}_{\text{Keime}}) = 0.1 \text{ mg/mL}$ in DCI bei pD 2.1 und einem 0.5 M NaCl-Zusatz wurden IR-Absorptionsspektren über einen Zeitraum von 17 Stunden bei einer Temperatur von 25 °C aufgezeichnet.

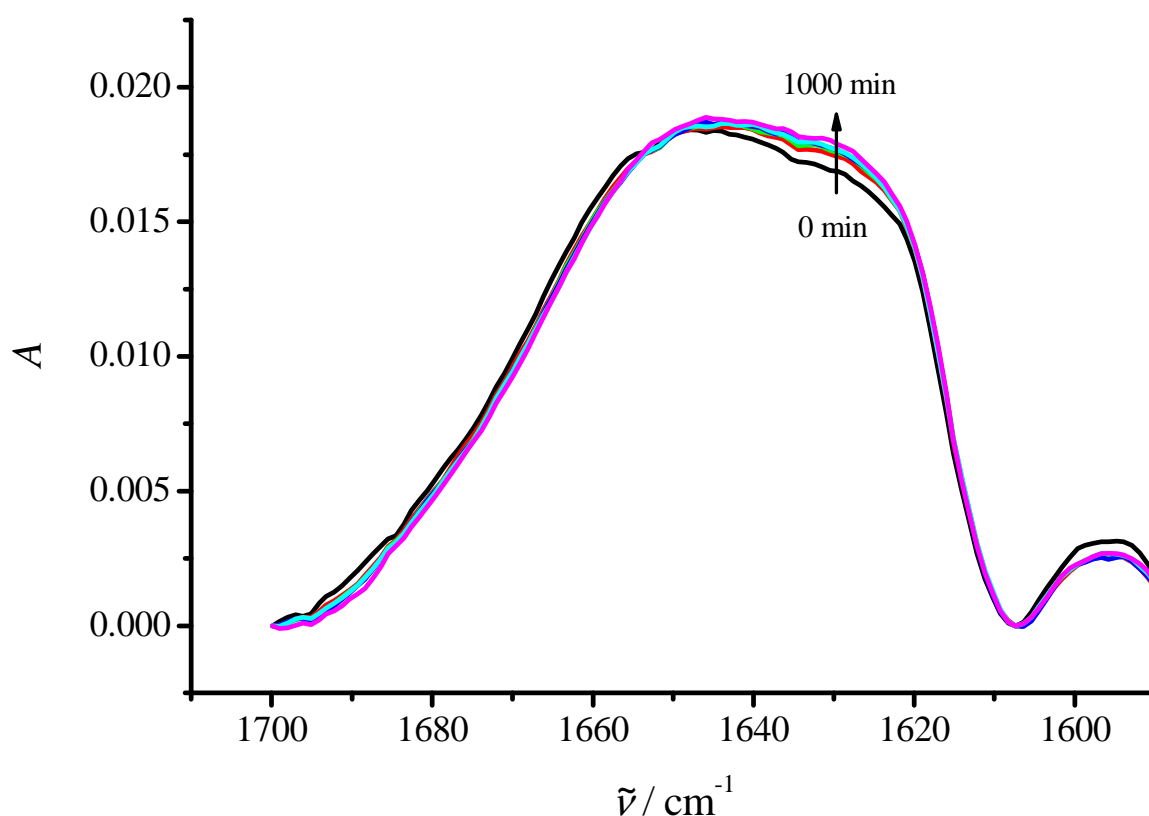


Abbildung 4.33. Ausgewählte ATR-FTIR-Spektren der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₃ nach der Zugabe einer Insulinkeimlösung. Es zeigt sich keine signifikante Änderung der Sekundärstruktur des in der Multischicht eingebetteten Insulins.

In Abbildung 4.33 sind ausgewählte Spektren nach der Zugabe von Insulinkeimen zur Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₃ zu erkennen. Es zeigt sich keine signifikante Änderung der Sekundärstruktur des Insulins in der Multischicht, d.h., dass durch die Zugabe von

Insulinkeimen keine Amyloidfibrillen ausgebildet werden können. Wahrscheinlich wird dieser Prozess durch die dominierenden Insulin-Polyelektrolyt-Wechselwirkungen unterbunden, welche die konformelle energetische Landschaft von Insulin durch Einschränkung der Rotationsbewegung und der Konformation stark beeinflussen. Auch bei dieser Multischicht ist in der Amid-I'-Bande eine große Schulter bei einer Wellenzahl von 1627 cm^{-1} zu sehen, welche ebenfalls aus einem signifikanten Anteil an intermolekularen β -Faltblättern ausgehend von amorphen Aggregaten resultiert. Die Sekundärstrukturanalyse zeigt, dass eine sehr geringe und damit nicht signifikante Änderung des β -Faltblattanteils durch Keimzugabe vorliegt (siehe Tabelle 4.12).

Tabelle 4.12. Sekundärstrukturanteile (in %) von Insulin in der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₃ bei einer konstanten Temperatur 25 °C in Gegenwart von Insulinkeimen bei pD 2.1 mit einem 0.5 M NaCl-Zusatz. Nach einer Messdauer von 1000 Minuten ist keine signifikante Änderung des β -Faltblattanteils zu erkennen. Alle Wellenzahlen der Subbanden besitzen die Einheit cm^{-1} .

| | Schleifenstrukturen | | α -Helix | ungeordnet | β -Faltblatt |
|--------------------------------------|---------------------|-----------|-----------------|------------|--------------------|
| | 1683-1680 | 1667-1665 | 1653 | 1641-1639 | 1627-1625 |
| PDDA-PSS-(Ins-HA)₃ | | | | | |
| 3 min | 2.87 | 21.28 | 28.65 | 21.48 | 26.23 |
| 1000 min | 1.24 | 19.85 | 27.35 | 24.85 | 27.09 |

Auch die anderen in der Tabelle 4.12 aufgeführten Sekundärstrukturen weisen keine Änderung auf, was eine Aufrechterhaltung der konformellen Struktur des Insulins in der Multischicht widerspiegelt.

Schließlich wurde die Struktur des Insulins untersucht, wenn es die letzte adsorbierte Schicht in der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₂-Ins darstellt und somit dem Lösungsmittel und Insulinkeimen exponiert vorliegt. Zu diesem Zweck wurde wie zuvor eine Insulinkeimlösung mit einer Konzentration $c(\text{Ins}_{\text{Keime}}) = 0.1\text{ mg/mL}$ in DCl bei pD 2.1 und einem 0.5 M NaCl-Zusatz zur Multischicht gegeben und die IR-Absorptionsspektren über einen Zeitraum von 17 Stunden bei einer Temperatur von 25 °C aufgezeichnet. In Abbildung 4.34 sind die Absorptionsspektren zu sehen. Es treten bei der mit Insulin bedeckten Multischicht kleine, aber reproduzierbare Änderungen bei einer Wellenzahl von 1627 cm^{-1} auf, welche aus einer keiminduzierten Aggregation des Insulins der obersten Schicht resultieren. Die Sekundärstrukturanalyse der Amid-I'-Bande aus Abbildung 4.34 unterstützt diesen Befund. Ein leichter Anstieg des β -Faltblattanteils von ca. 3-4 % liegt vor.

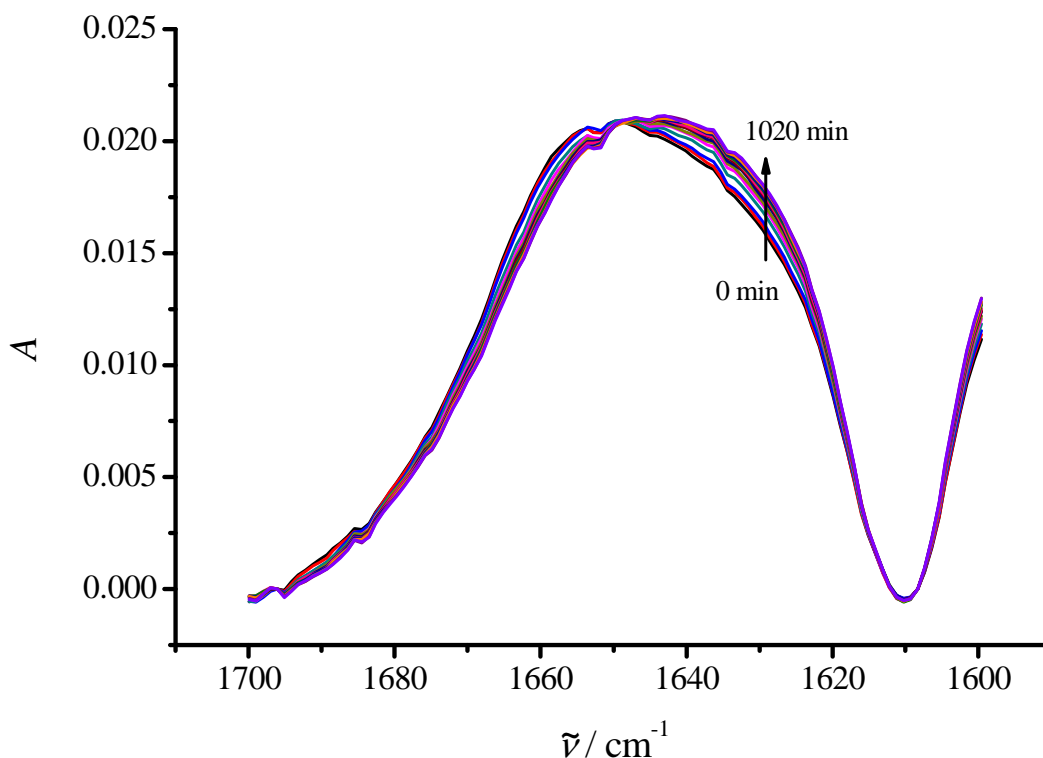


Abbildung 4.34. Ausgewählte ATR-FTIR-Spektren der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₂-Ins nach der Zugabe einer Insulinkeimlösung. Es zeigt sich eine geringe Änderung der Sekundärstruktur des in der Multischicht eingebetteten Insulins.

Wichtig dabei ist zu erwähnen, dass nur eine der drei Insulinschichten für die in der Tabelle 4.13 aufgeführten Sekundärstrukturänderung verantwortlich ist, da nur die Struktur der obersten Insulinschicht von den zugegebenen Insulinkeimen beeinflusst wird. Somit sind die Sekundärstrukturänderungen in der obersten Insulinschicht deutlich größer als die in Tabelle 4.13 aufgelisteten. Durch die Anwendung der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie ist die Bildung von fibrillären Strukturen zu erkennen (s.u.).

Tabelle 4.13. Sekundärstrukturanteile (in %) von Insulin in der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₂-Ins bei einer konstanten Temperatur 25 °C in Gegenwart von Insulinkeimen bei pD 2.1 mit einem 0.5 M NaCl-Zusatz. Über eine Messdauer von 1020 Minuten tritt eine Änderung des β -Faltblattanteils auf, welche nur auf die oberste Insulinschicht zurückzuführen ist. Alle Wellenzahlen der Subbanden besitzen die Einheit cm^{-1} .

| | Schleifenstrukturen | | α -Helix | ungeordnet | β -Faltblatt |
|---|---------------------|-----------|-----------------|------------|--------------------|
| | 1683-1680 | 1667-1665 | 1653 | 1641-1639 | 1627-1625 |
| PDDA-PSS-(Ins-PSS)₂-Ins | | | | | |
| 3 min | 2.88 | 22.79 | 29.88 | 24.72 | 19.85 |
| 1000 min | 1.37 | 19.81 | 29.61 | 26.21 | 23.18 |

Eine weitere vergleichbare Messung anhand der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃-Ins wurde ebenfalls durchgeführt (siehe Anhang, Abbildung 7.10). Es liegt somit eine weitere

Doppelschicht an Ins-PSS im Vergleich zur Messung aus der Abbildung 4.34 vor, jedoch zeigt sich qualitativ das gleiche Verhalten. Eine Sekundärstrukturanalyse wurde jedoch nicht durchgeführt.

Analoge Messungen wurden ebenfalls mit der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₂-Ins in Gegenwart von Insulinkeimen durchgeführt (siehe Abbildung 4.35).

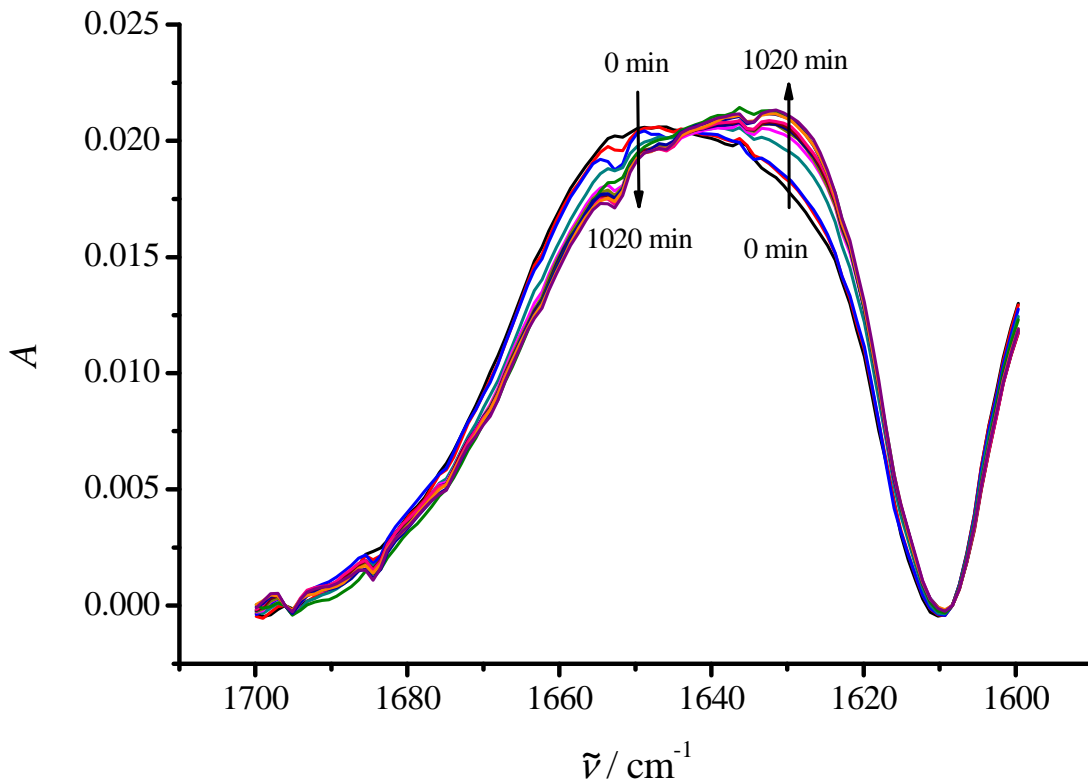


Abbildung 4.35. Ausgewählte ATR-FTIR-Spektren der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₂-Ins nach der Zugabe einer Insulinkeimlösung. Es zeigt sich eine starke Änderung der Intensität um 1627 cm⁻¹.

Im Falle der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₂-Ins zeigt sich nach Zugabe der Insulinkeimlösung mit der Konzentration $c(\text{Ins}_{\text{Keime}}) = 0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ bei pD 2.1 und einem 0.5 M NaCl-Zusatz ebenfalls eine deutliche Änderung der Spektren im zeitlichen Verlauf, wie bereits in Abbildung 4.34 beobachtet werden konnte. Die Sekundärstrukturanalyse zeigt (siehe Tabelle 4.12), dass ein Anstieg des β -Faltblattanteils von ca. 6 % vorliegt. Auch in diesem Fall ist zu erwähnen, dass nur eine der drei Insulinschichten für die Sekundärstrukturänderung verantwortlich ist, da ebenfalls nur die Struktur der obersten Insulinschicht von den zugegebenen Insulinkeimen beeinflusst wird. Durch die Anwendung der konfokalen

Fluoreszenzmikroskopie ist auch in diesem Fall die Bildung von fibrillären Strukturen zu erkennen (s.u.).

Tabelle 4.12. Sekundärstrukturanteile (in %) von Insulin in der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₂-Ins bei einer konstanten Temperatur 25 °C in Gegenwart von Insulinkeimen bei pD 2.1 mit einem 0.5 M NaCl-Zusatz. Über eine Messdauer von 1020 Minuten tritt eine Änderung des β -Faltblattanteils auf, welche nur auf die oberste Insulinschicht zurückzuführen ist. *a* Alle Wellenzahlen der Subbanden besitzen die Einheit cm⁻¹.

| | Schleifenstrukturen | | α -Helix | ungeordnet | β -Faltblatt |
|--|---------------------|-----------|-----------------|------------|--------------------|
| | 1683-1680 | 1667-1665 | 1653 | 1641-1639 | 1627-1625 |
| PDDA-PSS-(Ins-HA)₂-Ins | | | | | |
| 3 min | 0.84 | 21.07 | 29.28 | 23.91 | 25.15 |
| 1000 min | 2.42 | 14.74 | 28.06 | 23.48 | 31.67 |

4.1.4 Fluoreszenz-Mikroskopie zur Visualisierung von Polyelektrolyt-Insulin-multischichten

4.1.4.1 Aufbau und Struktur von Polyelektrolyt-Insulinmultischichten

Zunächst wurde der Aufbau einer Multischicht anhand von PDDA-PSS-Ins_{Alexa} mit Hilfe der TIRF-Mikroskopie verfolgt. In Abbildung 4.36, Bild (A), ist die Multischicht PDDA-PSS-Ins_{Alexa} zu erkennen. Kleine amorphe Insulinaggregate in Form heller Punkte sind auf einer ansonsten homogenen grün dargestellten Insulinschicht zu erkennen. Weiterhin sind ringförmige Strukturen zu sehen, welche jedoch durch eine Reflexion des Lasers hervorgerufen werden.

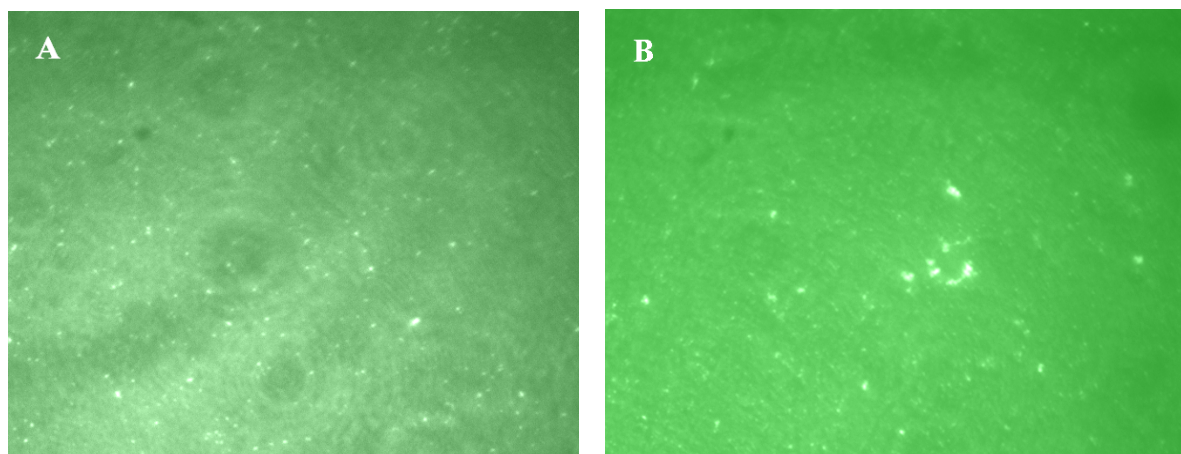


Abbildung 4.36. In Bild (A) ist Multischicht PDDA-PSS-Ins_{Alexa} zu sehen. Neben dem homogen verteilten Insulin sind kleine Aggregate zu erkennen, welche aus Insulin und PSS bestehen. Die kreisförmigen Strukturen gehen aus der Reflexion des Lasers hervor. In Bild (B) ist die Multischicht PDDA-PSS-Ins_{Alexa}-PSS zu sehen.

In Abbildung 4.36 Bild (B) ist die Multischicht PDDA-PSS-Ins_{Alexa}-PSS dargestellt. Auch hier zeigt sich ein vergleichbares Bild wie in (A).

Weiterhin ist in Abbildung 4.37 die Multischicht PDDA-PSS-Ins_{Alexa}-PSS-Ins_{Alexa} dargestellt. Auch hier liegt ein vergleichbares Bild wie in Abbildung 4.36 vor.

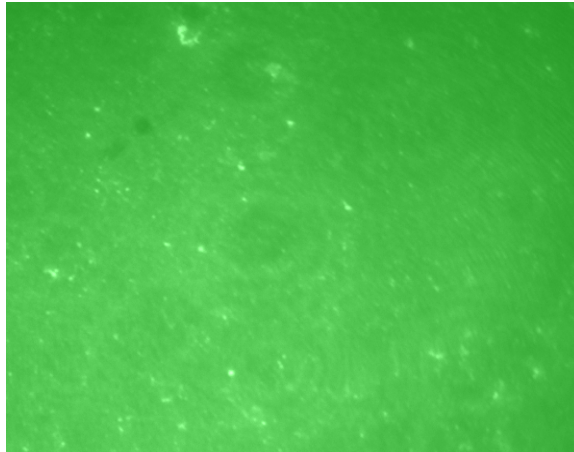


Abbildung 4.37. TIRF-Mikroskopiebild der Multischicht PDDA-PSS-Ins_{Alexa}-PSS-Ins_{Alexa}.

Bei dem Aufbau einer Multischicht erfolgt offenbar mit zunehmenden Insulinschichten keine sichtbare Änderung, wie z.B. eine signifikante Zunahme der sichtbaren Insulinaggregate, die mittels TIRF-Mikroskopie verfolgt werden können.

Um die Homogenität des in den Multischichten adsorbierten Insulins zu visualisieren, wurde, wie in Abbildung 4.38 zu sehen ist, durch das vorsichtige Abstreifen der Multischicht PDDA-PSS-Ins_{Alexa}-HA mit Hilfe einer feinen Pinzette eine dunkel erscheinende Fläche verursacht.

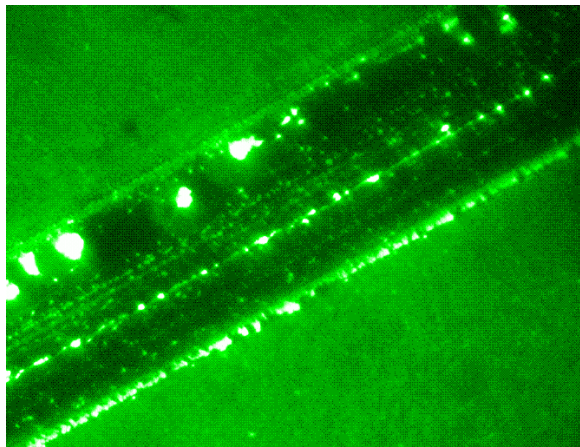


Abbildung 4.38. Mit Hilfe einer feinen Pinzette wurde die Multischicht PDDA-PSS-Ins_{Alexa}-HA abgetragen. Es ist zu erkennen, dass eine homogene Verteilung des Insulins in der Multischicht vorliegt (außerhalb der dunkel erscheinenden Flächen).

Ober- und unterhalb dieser dunklen Fläche ist die Homogenität des gleichmäßig verteilten Insulins gut zu erkennen. Die Homogenität spiegelt auch die Ergebnisse aus den Röntgenreflektometriemessungen wider (siehe Abbildung 4.2 und 4.4), bei denen kontinuierlich linear anwachsende Schichten zu sehen sind. Wäre keine homogene Verteilung einer Multischichtkomponente auf einem Substrat vorhanden, so würde die mittlere Schichtdicke nicht kontinuierlich im vorliegenden Maße unter Einbezug der Abmessungen eines einzelnen Insulinmoleküls ansteigen.

4.1.4.2 Struktur von Polyelektrolyt-Insulinmultischichten nach der Zugabe von Insulinkeimen

Zur Multischicht PDDA-PSS-Ins_{Alexa} wurde eine Insulinkeimlösung nicht fluoreszent, unmarkiert mit einer Konzentration von 0.1 mg/mL bei pH 2.1 mit einem 0.1 M NaCl-Zusatz gegeben, und im Anschluss wurden die in Abbildung 4.39 dargestellten TIRF-Mikroskopiebilder aufgenommen. In Bild (A) sind neben amorphen Aggregaten auch vereinzelt helle fibrilläre Strukturen zu sehen.

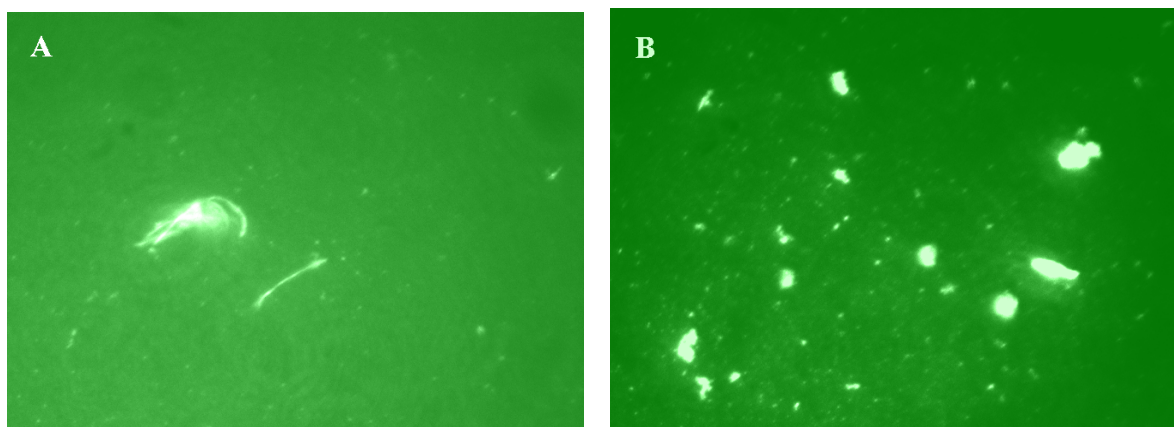


Abbildung 4.39. In Bild (A) wurde zur Multischicht PDDA-PSS-Ins_{Alexa} eine Insulinkeimlösung mit $c(\text{Ins}_{\text{Keime}}) = 0.1 \text{ mg/mL}$ gegeben. Unmittelbar nach der Zugabe sind kurze fibrilläre Strukturen zu erkennen, welche vereinzelt auftreten. In Bild (B) wurde zur gleichen Multischicht wie in (A) eine Insulinkeimlösung mit einer Konzentration von $c(\text{Ins}_{\text{Keime}}) = 0.5 \text{ mg/mL}$ gegeben. Es sind große Aggregate zu erkennen, jedoch bleibt die Ausbildung fibrillärer Strukturen hier vermutlich aus.

Dabei ist zu bemerken, dass Insulin die oberste Schicht bildet, welche zum Lösungsmittel exponiert vorliegt. Durch die Erhöhung der Konzentration der Insulinkeimlösung auf 0.5

mg/mL erscheinen bei einer vergleichbaren Multischicht relativ große Aggregate, wobei jedoch keine fibrillären Strukturen zu sehen sind.

Weiterhin wurde zur Multischicht PDDA-PSS-Ins_{Alexa}-PSS die Insulinkeimlösung, wie in Punkt 3.2.4.17 beschrieben, hinzugefügt (siehe Abbildung 4.40, Bild (A)).

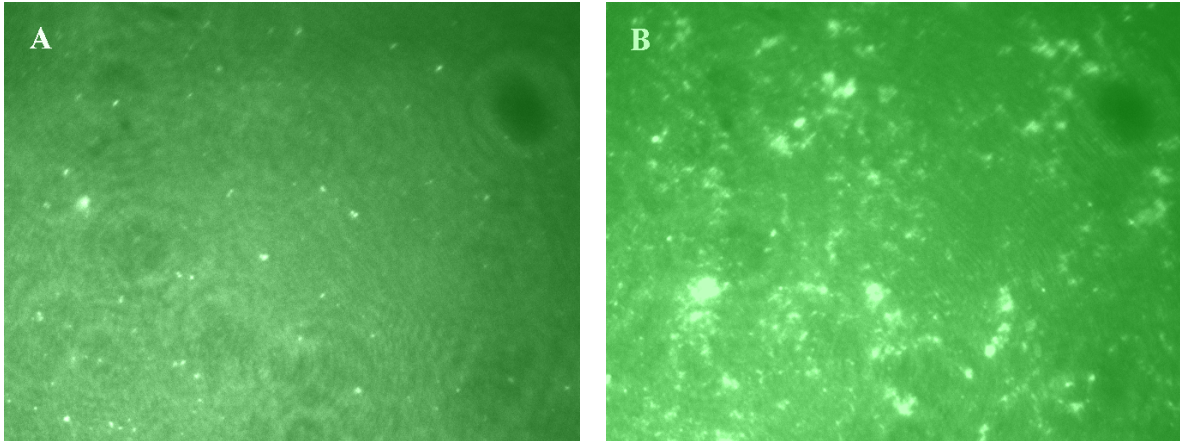


Abbildung 4.40. In Bild (A) ist die Multischicht PDDA-PSS-Ins_{Alexa}-PSS dargestellt, zu der eine Insulinkeimlösung mit einer Konzentration von $c(\text{Ins}_{\text{Keime}}) = 0.5 \text{ mg/mL}$ gegeben wurde. Es sind kleine amorphe Aggregate zu erkennen. In Bild (B) wurde die gleiche Insulinkeimlösung wie in (A) zur Multischicht PDDA-PSS-Ins_{Alexa}-PSS-Ins_{Alexa} gegeben. Es sind große Aggregate zu erkennen, welche aus der obersten dem Lösungsmittel exponierten Insulinschicht hervorgehen.

Da Insulin nicht die oberste Schicht darstellt, sondern in Polyelektrolyten eingebettet vorliegt, sind nur kleine amorphe Aggregate zu sehen, welche bereits bei der Präparation der Multischicht vorhanden waren (vergleiche Abbildung 4.36 und 4.37). In Bild (B) wurde zur Multischicht PDDA-PSS-Ins_{Alexa}-PSS-Ins_{Alexa} die gleiche Insulinkeimlösung hinzugegeben. In diesem Fall ist eine Ausbildung großer Aggregate in Form von hellen unregelmäßig geformten Flecken zu erkennen. Ob eine Ausbildung fibrillärer Strukturen erfolgte, ist anhand dieses Bildes schwer abzuschätzen. In einem weiteren Experiment wurde ein vergleichbarer Versuch wie in Abbildung 4.40 durchgeführt (siehe Anhang, Abbildung 7.11), jedoch wurden die Multischichten mit jeweils einer weiteren entsprechenden Doppelschicht (Ins_{Alexa}-PSS) präpariert, sodass die Multischichten PDDA-PSS-(Ins_{Alexa}-PSS)₂ bzw. PDDA-PSS-(Ins_{Alexa}-PSS)₂-Ins_{Alexa} vorlagen. Nach der Insulinkeimzugabe, wie in Punkt 3.2.4.17 beschrieben, sind sowohl in Bild (A) als auch in Bild (B) sehr kleine Aggregate zu sehen. Die Ausbildung von großen fibrillären Strukturen erfolgte in diesem Fall nicht.

Analoge Messungen mit den Multischichten PDDA-PSS-Ins_{Alexa}-HA und PDDA-PSS-Ins_{Alexa}-HA-Ins_{Alexa} wurden ebenfalls durchgeführt (siehe Abbildung 4.41). Nach der

Insulinkeimzugabe sind auf der Multischicht PDDA-PSS-Ins_{Alexa}-HA in Bild (A) amorphe Aggregate zu sehen, welche auch bereits vor der Zugabe der Keimlösung zu sehen waren.

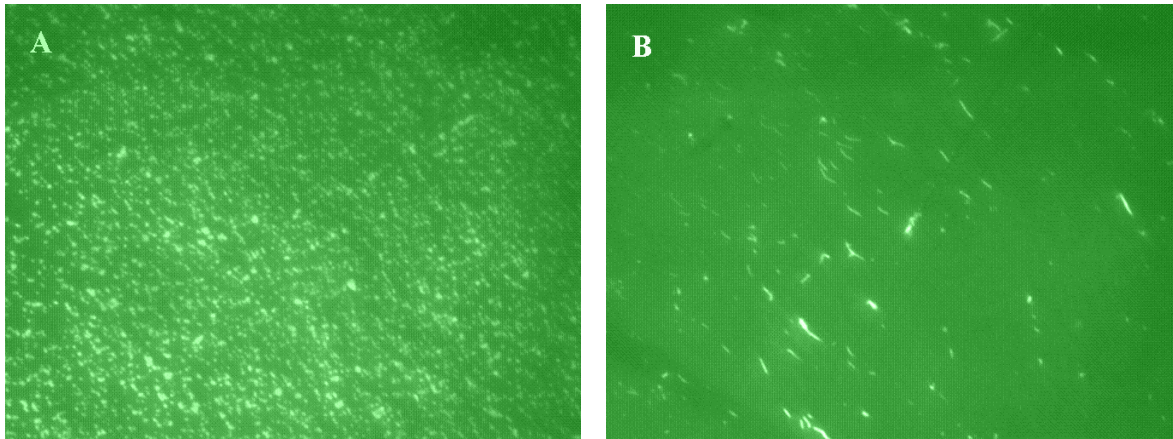


Abbildung 4.41. In Bild (A) ist die Multischicht PDDA-PSS-Ins_{Alexa}-HA nach der Zugabe von Insulinkeimen ($c(\text{Ins}_{\text{Keime}}) = 0.5 \text{ mg/mL}$) dargestellt. Es sind keine fibrillären Strukturen zu erkennen. Die sichtbaren hellen Punkte waren bereits vor der Zugabe der Insulinkeimlösung sichtbar. In Bild (B) ist die Multischicht PDDA-PSS-Ins_{Alexa}-HA-Ins_{Alexa} nach der Zugabe der gleichen Insulinkeimlösung wie in Bild (A) dargestellt. Es sind kurze fibrilläre Strukturen zu erkennen, welche sich aus der obersten, der Lösung exponierten Insulinschicht gebildet haben.

In Bild (B) ist die Multischicht PDDA-PSS-Ins_{Alexa}-HA-Ins_{Alexa} abgebildet, welche nach der Insulinkeimzugabe fibrilläre Strukturen aufweist. Die Ausbildung von Amyloidfibrillen unter diesen Bedingungen wird durch Messungen am konfokalen Fluoreszenzmikroskop (s.u.) und am ATR-FTIR-Spektrometer (siehe Abbildungen 4.34 und 4.35) bestätigt.

4.1.5 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie zur Visualisierung von Polyelektrolyt-Insulinmultischichten

Amyloidfibrillen werden oft mithilfe der Rasterkraftmikroskopie (AFM) oder Elektronenmikroskopie visualisiert.^{93,96,99} Diese Methoden besitzen eine hohe Auflösung, die zur genauen Darstellung der Fibrillen notwendig ist. Das bedeutet, dass ihre Durchmesser und die Längen, welche in der Größenordnung einiger Nanometer bzw. Mikrometer liegen, aufgelöst werden können. Mit der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie (CFM) ist es nicht möglich, Objekte im Nanometermaßstab aufzulösen, jedoch wird sie bevorzugt zur Visualisierung von sehr weichen und fluiden Systemen angewandt. Zur Untersuchung der Morphologie von Insulinaggregaten in Polyelektrolyt-Insulinmultischichten und des Effekts

von Insulinkeimen auf das Aggregationsverhalten hingegen eignet sich die konfokale Mikroskopie, da Amyloidfibrillen mit Längen im μm -Maßstab problemlos aufgelöst werden können. Der Effekt der Temperatur auf die Insulinaggregation in Multischichten konnte aufgrund der Instabilität der Insulin-Alexa Fluor 488-Konjugate bei $70\text{ }^\circ\text{C}$ und bei einem niedrigen pH-Wert von 2 für eine Dauer von mehreren Stunden nicht durchgeführt werden. In Abbildung 4.42, Bild (A), sind CFM-Bilder der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₂-(Ins_{Alexa}-PSS) zu sehen, welche auf einem Deckglas abgeschieden wurde. Sichtbar im Mikroskop sind nur die mit Alexa Fluor 488 markierten Insulinmoleküle. Die Ins_{Alexa}-Schicht innerhalb der Multischicht weist eine heterogene laterale Struktur auf einer Längenskala von ca. $0.5\text{ }\mu\text{m}$ auf.

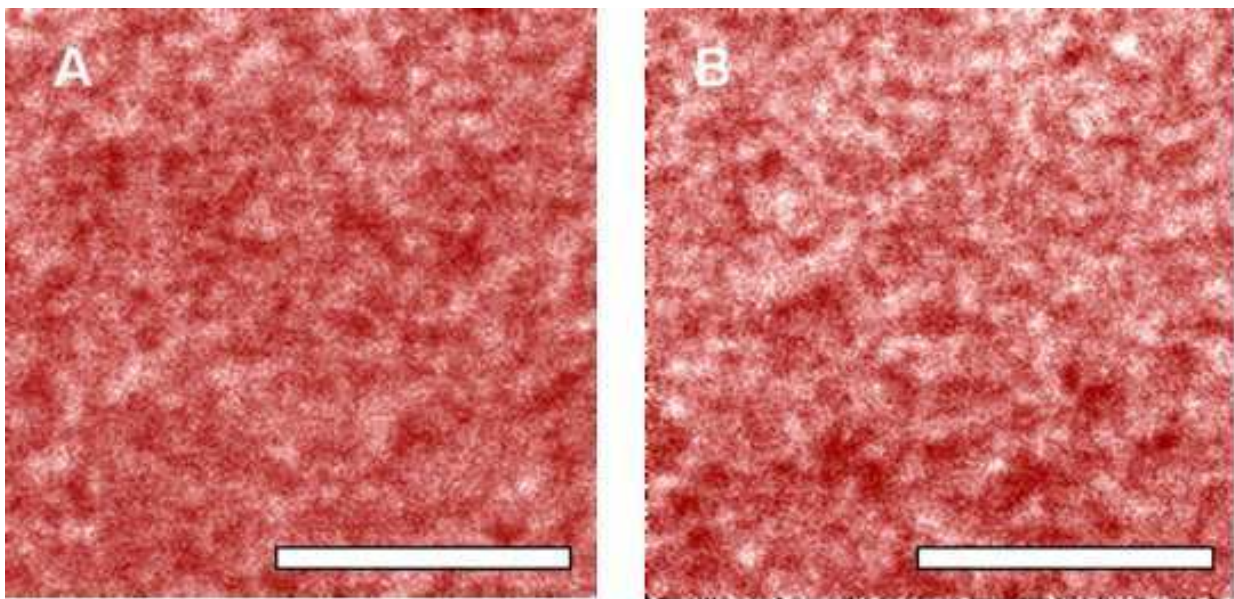


Abbildung 4.42. CFM-Bilder der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₂-(Ins_{Alexa}-PSS) (A, B) adsorbiert auf einem Deckglas. Bild (A) zeigt die Multischicht vor und Bild (B) nach der Zugabe von nicht fluoreszenzmarkierten Insulinkeimen ($5\text{ }\mu\text{m}$ Balken).

Die hellen Bereiche repräsentieren aggregierte Insulinmoleküle mit keiner bevorzugten Geometrie. Einzelne Insulinmoleküle können unter diesen Bedingungen nicht detektiert werden, da unter der Annahme einer homogenen Verteilung von dicht gepacktem Insulin in einer Monoschicht der intermolekulare Abstand im Mittel ca. 3 nm betragen würde. Da nur 1 von 300 Molekülen fluoreszenzmarkiert ist, beträgt der Abstand zwischen 2 Fluorophoren ca. $0.05\text{ }\mu\text{m}$, was wesentlich kleiner ist als die optische Auflösung der CFM. Findet keine Aggregation statt, so würden die Fluorophormoleküle gleichmäßig verteilt sein und die Insulinschicht erschiene dann mit einer homogenen Helligkeit. Da dies jedoch nicht der Fall ist, können amorphe Insulinaggregate mit einer Größe von ca. $0.5\text{ }\mu\text{m}$ anhand der CFM-Bilder angenommen werden. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den TIRF-Mikroskopiebildern

in Abbildung 4.36, auf welchen ebenfalls amorphe Aggregate zu sehen sind. Nach der Zugabe von Insulinkeimen zur Lösung, welche die Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₂-(Ins_{Alexa}-PSS) bedeckt, ist keine sichtbare Änderung des Aggregationsmusters von Insulin zu sehen (siehe Abbildung 4.42, Bild (B)), was mit den entsprechenden ATR-FTIR-Spektren in Abbildung 4.32 in guter Übereinstimmung steht. Wie auch bei den TIRF-Mikroskopieexperimenten waren die Insulinkeime nicht fluoreszenzmarkiert und dementsprechend nicht sichtbar in den CFM-Experimenten. Alle in den CFM-Bildern sichtbaren Strukturen gehen aus den zuvor adsorbierten Insulinmolekülen hervor.

Weiterhin wurde die Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₂-Ins_{Alexa}, bei der Ins_{Alexa} die oberste Schicht bildet, hinsichtlich der keiminduzierten Fibrillbildung untersucht (siehe Abbildung 4.43 (C,D)).

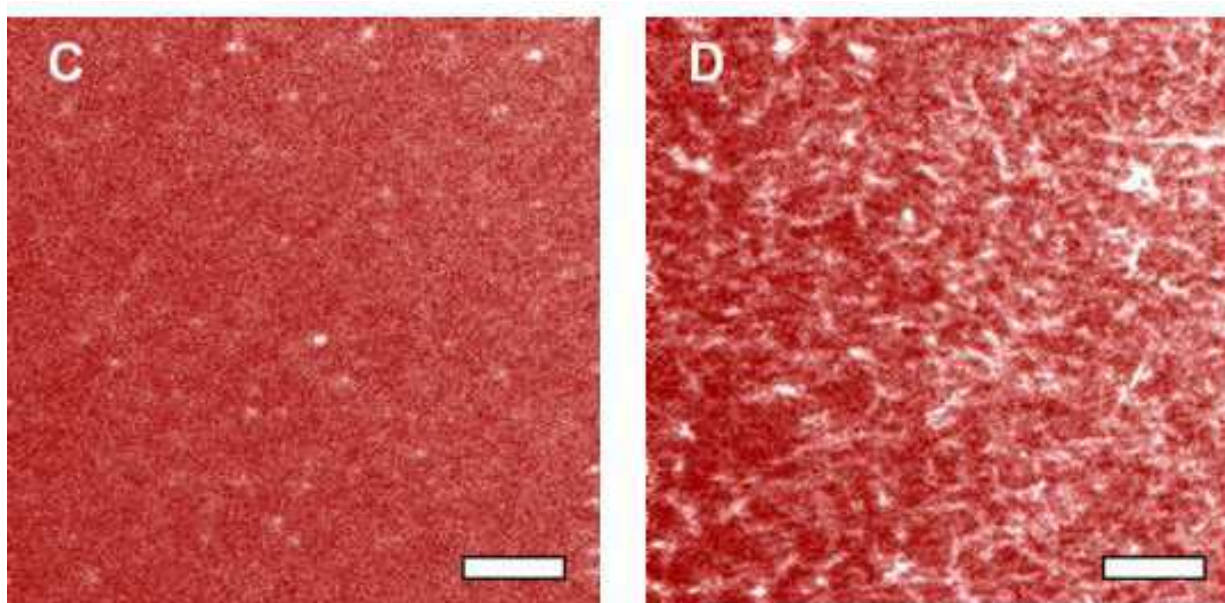


Abbildung 4.43. CFM-Bilder der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₂-Ins_{Alexa} (C,D) adsorbiert auf einem Deckglas. Bild (C) zeigt die Multischicht vor und Bild (D) nach der Zugabe von nicht fluoreszenzmarkierten Insulinkeimen (5 μ m Balken). Nur die Ins_{Alexa}Schicht beinhaltet fluoreszenzmarkierte Insulinmoleküle.

Während die Ins_{Alexa}-Schicht eine amorphe Struktur vor der Zugabe der Insulinkeimlösung zeigt (siehe Abbildung 4.43, Bild (C)), sind nach der Zugabe fibrilläre Strukturen sichtbar (siehe Abbildung 4.43, Bild (D)). Da Insulinkeime keine Fluoreszenzmarkierung aufweisen, gehen die beobachteten Fibrillen aus der Umwandlung der adsorbierten Insulinmoleküle der obersten, dem Lösungsmittel exponierten Schicht hervor. Ein weiteres Bild ist im Anhang in Abbildung 7.13 dargestellt. Wie anhand in Abbildung 4.43, Bild (D) zu sehen ist, besitzen die Fibrillen eine Länge von einigen Mikrometern und bilden ein zweidimensionales Netzwerk aus. Obwohl

das Netzwerk durch Insulinkeime ausgelöst wurde, wird seine Geometrie durch die Multischicht, welche als Templat dient, kontrolliert.

Analoge Bilder wurden für die Multischichten PDDA-PSS-(Ins-HA)₂-(Ins_{Alexa}-HA) und PDDA-PSS-(Ins-HA)₂-Ins_{Alexa} aufgenommen (siehe Abbildung 4.44 und 4.45).

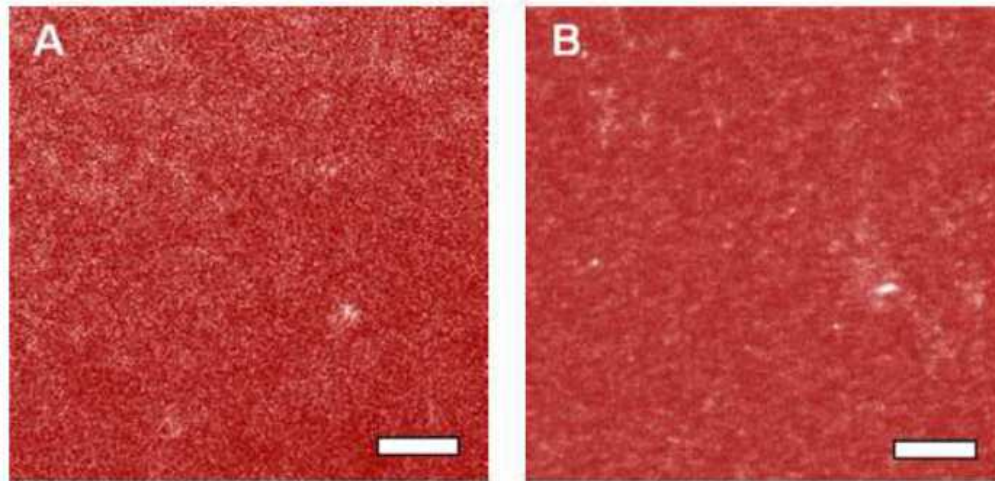


Abbildung 4.44. CFM-Bilder der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₂-(Ins_{Alexa}-HA) (A, B) adsorbiert auf einem Deckglas. Bild (A) zeigt die Multischicht vor und Bild (B) nach der Zugabe von nicht fluoreszenzmarkierten Insulinkeimen (5 μm Balken). Nur die Ins_{Alexa}-Schicht beinhaltet fluoreszenzmarkierte Insulinmoleküle.

Im Falle der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₂-(Ins_{Alexa}-HA) liegt Insulin zwischen zwei HA-Schichten (siehe Abbildung 4.44, Bild (A)), wobei nach der Zugabe der Insulinkeime keine signifikante Änderung in der Morphologie der Insulinaggregate erfolgt (siehe Abbildung 4.44, Bild B). Das Ergebnis stimmt mit den Resultaten aus den ATR-FTIR-Spektren in Abbildung 4.33 überein. Im Gegensatz dazu resultiert eine Ausbildung fibrillärer Aggregate, wenn die Ins_{Alexa}-Schicht die oberste Schicht darstellt (siehe Abbildung 4.45, Bild (D)). Bild (C) zeigt die Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₂-Ins_{Alexa} vor der Insulinkeimzugabe.

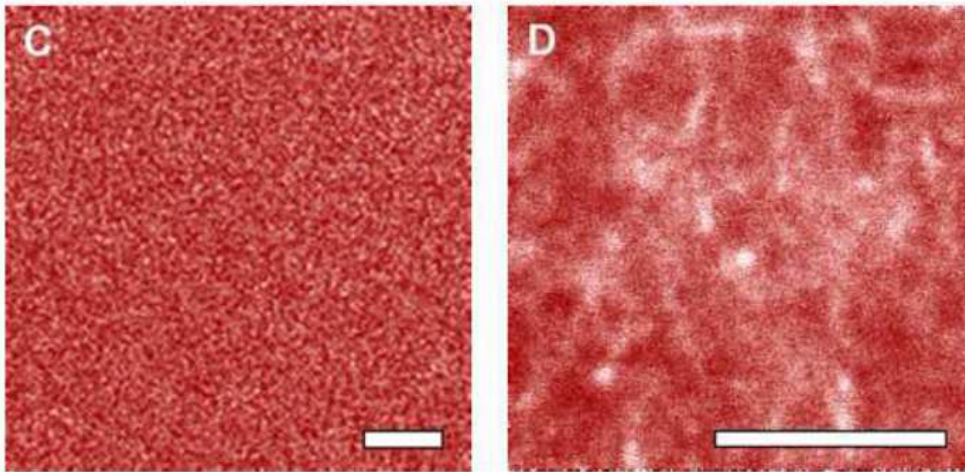


Abbildung 4.45. CFM-Bilder der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₂-Ins_{Alexa} (C, D) adsorbiert auf einem Deckglas. Bild (C) zeigt die Multischicht vor und Bild (D) nach der Zugabe von nicht fluoreszenzmarkierten Insulinkeimen (5 μm Balken). Nur die Ins_{Alexa}-Schicht beinhaltet fluoreszenzmarkierte Insulinmoleküle.

Der relativ schwache Kontrast in Abbildung 4.45 geht vermutlich aus einer größeren Fraktion von nicht fibrillären Insulinmolekülen und einer unvollständigen Umwandlung der Ins_{Alexa}-Schicht hervor. Die Reproduktion der Aufnahme ist im Anhang in Abbildung 7.14 dargestellt.

4.1.6 Schlussfolgerung aus dem Experimenten mit Polyelektrolyt-Insulinmultischichten

In diesem Teil der Arbeit wurden die intrinsische Aggregation und die Eigenschaften von Insulin in Polyelektrolytmultischichten untersucht. Die Idee dieser Untersuchungen liegt in der Anwendung solcher Polyelektrolytmultischichten als Templat zur Kontrolle der Geometrie der gebildeten Insulinnetzwerke. Das Ergebnis dieser Arbeit zeigt einen erfolgreichen Aufbau von Insulin-Polyelektrolytmultischichten, bei welchem Insulin alternierend mit PSS bzw. HA abgeschieden wird. Die präparierten Multischichten wurden hohen Temperaturen, niedrigen pH-Werten und Amyloidkeimen zur Induzierung lateraler Aggregation von Insulin ausgesetzt. Die erhaltenen Daten deuten auf eine erhöhte Aggregation von Insulin hin, wenn die Multischichten auf 70 °C erhitzt werden. Nach einigen Stunden bei einer erhöhten Temperatur erfolgt ein Stopp der Aggregation, und es resultieren eher amorphe Aggregate als fibrilläre Strukturen. Dieses Verhalten deutet auf eine starke Insulin-Polyelektrolyt Wechselwirkung hin, welche die konformelle Energielandschaft von Insulin modifiziert. Werden Amyloidkeime zu denjenigen Multischichten, bei denen die Insulinschicht die oberste Schicht bildet, hinzugegeben, so kann eine partielle Ausbildung fibrillärer Strukturen induziert werden.

Demnach zeigen diese Experimente die Fähigkeit von Polyelektrolytmultischichten, als Templat für die Präparation zweidimensionaler Netzwerke aus aggregierten Insulinmolekülen, welche als biokompatible und biologisch abbaubare Ultradünnschichten verwendet werden könnten, zu dienen.

4.2 Druckabhängige Proteinentfaltung – Fluoreszenzspektroskopie

Teile der in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse wurden in Referenz 171 veröffentlicht.

4.2.1 Messungen mit N-Acetyl-L-tryptophanamid NATA

In Abbildung 4.46 sind auf die jeweiligen spektralen Maxima normierte Fluoreszenzspektren von NATA bei Drücken von 1 bis 2500 bar dargestellt. Die maximalen Intensitäten liegen im Bereich um ca. $\lambda = 360$ nm. Die druckabhängige Änderung der Lage der Fluoreszenzspektren ist relativ gering, jedoch ist mit einem steigenden Druck eine kontinuierliche Rotverschiebung zu erkennen.

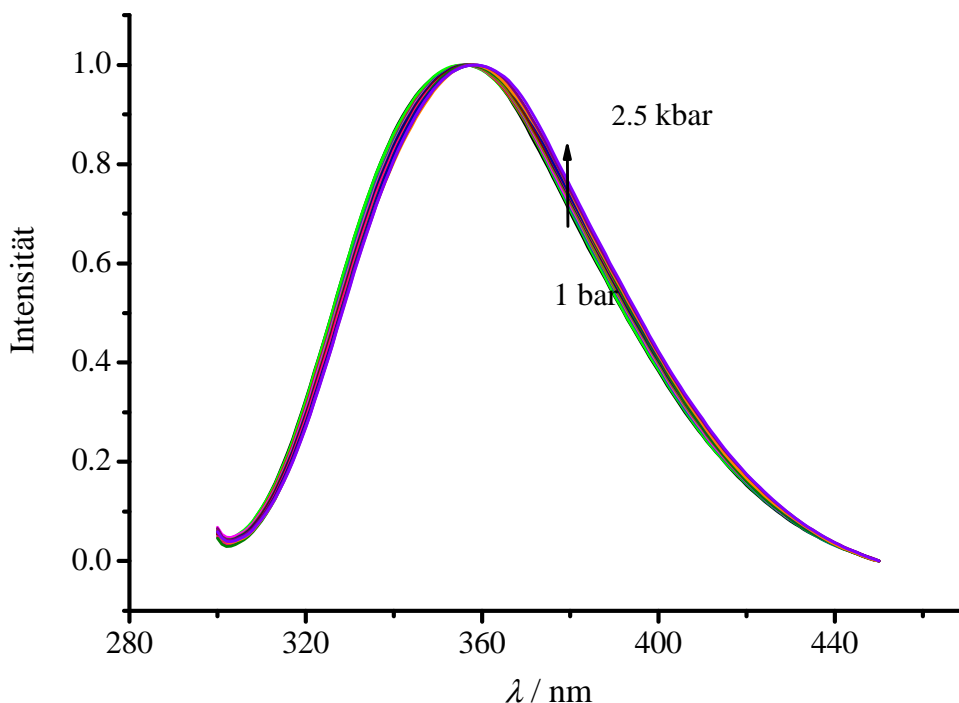


Abbildung 4.46. Druckabhängige Rotverschiebung normierter Fluoreszenzspektren von NATA mit einer Konzentration von $c(\text{NATA}) = 5.9 \mu\text{M}$ in 10 mM Bistris-Puffer bei pH 7 und einer Temperatur von 25°C .

Dieser Druckeffekt tritt bei einer Vielzahl von Fluorophoren auf und kann durch die sog. Lippert-Mataga-Gleichung (50), die gegeben ist als

$$\tilde{\nu}_A - \tilde{\nu}_F = \frac{2}{hc} \left(\frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right) \frac{(\mu_E - \mu_G)^2}{a^3} + \text{Konstante} \quad (50)$$

erklärt werden. Dabei ist h das Plancksche Wirkungsquantum, c die Lichtgeschwindigkeit, a der Radius der Kavität, in welchem sich der Fluorophor befindet, ε die Permittivität und n der Brechungsindex des Lösungsmittels, μ_E und μ_G das Dipolmoment des Fluorophors im angeregten bzw. im Grundzustand und $\tilde{\nu}_A$ und $\tilde{\nu}_F$ die Wellenzahlen der Absorption bzw. Emission. Mit steigendem hydrostatischen Druck steigt ebenfalls der Wert der Permittivität des Lösungsmittels, was eine Vergrößerung der Wellenzahldifferenz und somit eine größere Rotverschiebung zur Folge hat.

Die druckabhängigen Änderungen der Fluoreszenzspektren von NATA wurden ebenfalls in Gegenwart von Harnstoffzusätzen mit $c(\text{Harnstoff}) = 1$ bis 6 M, aber auch in Gegenwart von Ludox AM Partikeln untersucht. In der Abbildung 4.47 sind die Fluoreszenzintensitäten bei einer Wellenlänge von 380 nm als Funktion des Drucks aufgetragen. Diese Intensitäten gehen aus der Normierung der Spektren auf ihre jeweiligen Maxima hervor. Zur Korrektur aller folgenden Entfaltungskurven wurde jedoch nur die Messung ohne Harnstoffzusatz und ohne Ludox AM berücksichtigt, da kein signifikanter Unterschied in den druckabhängigen Intensitätsänderungen in Gegenwart bzw. in Abwesenheit von Harnstoff oder Ludox AM-Partikeln vorliegt. Die Unterschiede in den Intensitäten bei einem betrachteten Druck gehen aus experimentellen Ungenauigkeiten hervor.

Um den intrinsischen Druckeffekt auf den Proteinfluorophor Tryptophan für alle folgenden Daten aus der Hochdruck-Fluoreszenzspektroskopie zu berücksichtigen, wurde zunächst die Steigung der Ausgleichsgerade für NATA ermittelt. Der y-Achsenabschnitt der Ausgleichsgerade wurde auf null verschoben. In den Proteinentfaltungskurven wurde so nur die druckabhängige Änderung des Tryptophans durch Subtraktion korrigiert. Es resultiert die Geradengleichung $I_{380, \text{NATA}} = 1.9 \cdot 10^{-5} p / \text{bar}$.

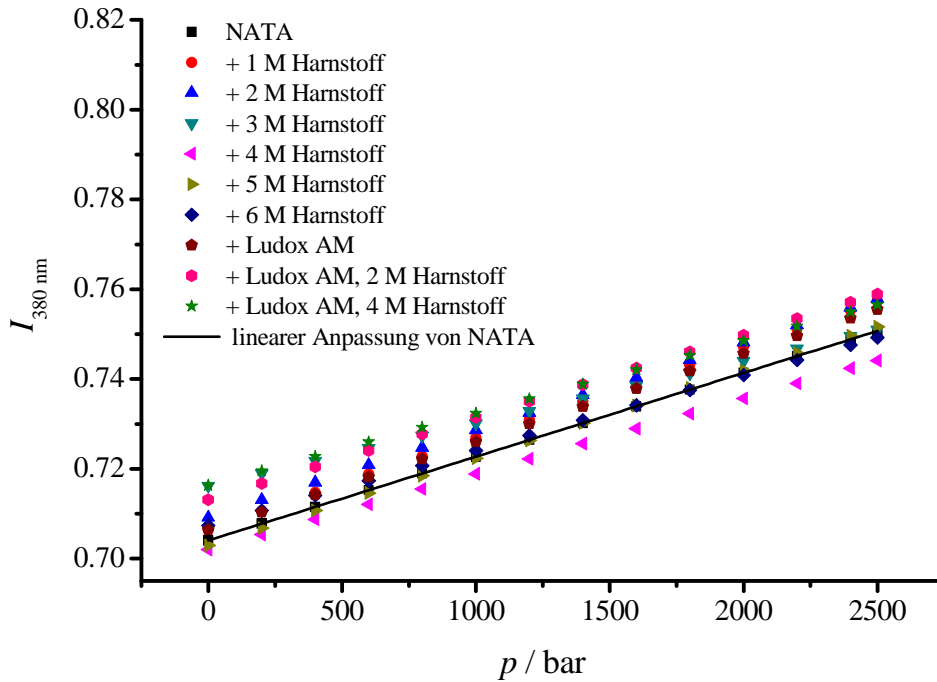


Abbildung 4.47. Druckabhängige Intensitätsänderungen bei $\lambda = 380 \text{ nm}$ von NATA ohne und mit Harnstoffzusätzen sowie in Gegenwart von Ludox AM. Die Steigungen in Gegenwart von Harnstoff bzw. Ludox AM zeigen keine signifikante Änderung zur Messung des reinen NATA.

4.2.2 Messung des Adsorptionsgrads von SNase bzw. Lysozym auf Ludox AM bzw. Ludox AS

Wie in Punkt 3.2.6.2 beschrieben, wurden jeweils 3 mL Probenvolumen angesetzt und in die Zentrifugenröhrchen gefüllt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entnommen und UV-Absorptionsspektren im Wellenlängen von 265-350 nm aufgenommen. Alle Absorptionsspektren wurden nach der jeweiligen Subtraktion der Untergrundspektren ausgewertet. So wurde für die SNase in Lösung als Untergrundspektrum ein UV-Absorptionsspektrum des 10 mM Bistris-Puffer aufgenommen, für SNase auf Ludox AM hingegen wurde eine Suspension, welche zunächst nur Ludox AM enthielt, in gleicher Weise wie die proteinhaltige Probe zentrifugiert und das UV-Absorptionsspektrum des Überstands als Untergrundspektrum verwendet. Für alle anderen Proben wurden analoge Untergrundspektren aufgenommen.

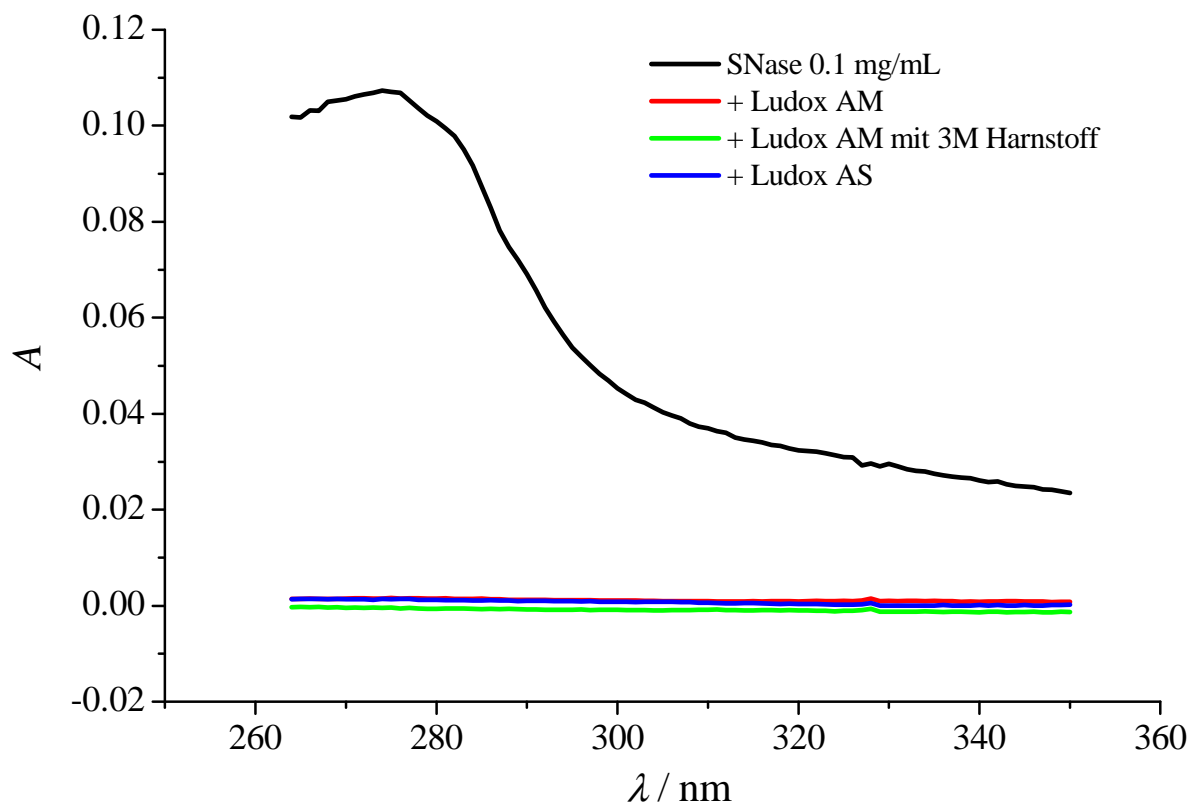


Abbildung 4.48. UV-Absorptionsspektren von SNase in Lösung und auf Ludox AM bzw. AS nach Zentrifugation mit 60000 g. Adsorbierte SNase wird durch die Zentrifugation komplett aus der Lösung entfernt. Nicht adsorbierte SNase bleibt in Lösung. Es liegt ein Adsorptionsgrad $> 98\%$ vor.

In Abbildung 4.48 sind beispielhaft Absorptionsspektren der Überstände nach der Zentrifugation dargestellt. Es ist zu erkennen, dass SNase im gelösten Zustand eine sehr hohe Absorptionsintensität aufweist, wohingegen nach der Adsorption auf Ludox AM bzw. AS ohne und in Gegenwart von 3 M Harnstoff keine Absorption über den gesamten Wellenlängenbereich zu sehen ist. Das bedeutet, dass im Überstand kein Protein vorhanden ist und dementsprechend komplett auf den Nanopartikeln adsorbiert sein muss.

Anhand der Tabelle 4.13 ist zu erkennen, dass für SNase bzw. Lysozym in Lösung vor und nach der Zentrifugation die Konzentrationen nahezu unverändert bleiben. Im adsorbierten Zustand hingegen liegen sehr niedrige Konzentrationen im Überstand vor. Der Adsorptionsgrad für die beiden Proteine auf Ludox AM / AS ist in allen Fällen $>98\%$. Die Konzentrationen wurden mithilfe der molaren Extinktionskoeffizienten für SNase $\epsilon_{280}(\text{SNase}) = 15600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und Lysozym $\epsilon_{280}(\text{Lysozym}) = 38700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ berechnet.^{152,172}

Tabelle 4.13. Mittels der *depletion method* untersuchte Adsorptionsgrade von SNase und Lysozym auf Ludox AM bzw. Ludox AS.

| Probe | A_{280} | Konzentration im Überstand $c / \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ | Anteil im Überstand in % | Adsorptionsgrad in % |
|--|-----------|---|-----------------------------|-------------------------|
| SNase in Lösung vor und nach Zentrifugation | 0.1009 | 0.109 | 100 | - |
| SNase auf LudoxAM (1:100) | 0.0015 | 0.0016 | 1.5 | 98.5 |
| SNase auf LudoxAM (1:100) + 3 M Harnstoff | 0 | 0 | 0 | 100 |
| SNase auf LudoxAS (1:100) | 0.0014 | 0.0014 | 1.2 | 98.8 |
| Lysozym in Lösung vor Zentrifugation | 0.255 | 0.095 | 100 | - |
| Lysozym in Lösung nach Zentrifugation | 0.2513 | 0.0936 | 98.53 | - |
| Lysozym auf LudoxAM (1:11) | 0 | 0 | 0 | 100 |
| Lysozym auf LudoxAM (1:11) + 3 M Harnstoff | 0 | 0 | 0 | 100 |

4.2.3 Volumenänderung von SNase in Lösung

Zur Bestimmung der Volumenänderung von SNase im gelösten Zustand wurden Fluoreszenzspektren bei Drücken von 1 bar bis zu 2500 bar in 200 bar-Schritten aufgenommen. Diese Messung wurde ebenfalls in Gegenwart von 0.5 und 1 M Harnstoff durchgeführt. In Abbildung 4.49 sind beispielhaft die gemessenen Fluoreszenzspektren von SNase in Gegenwart von 1 M Harnstoff dargestellt. Mit steigendem Druck sind eine Abnahme der Fluoreszenzintensität und eine Rotverschiebung der spektralen Maxima zu sehen. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität geht einerseits aus der Exposition der Tryptophanreste zum umgebenden Wasser und der damit einhergehenden steigenden Polarität der Umgebung, andererseits aber auch aus der steigenden Permittivität des Wassers mit steigendem Druck hervor.

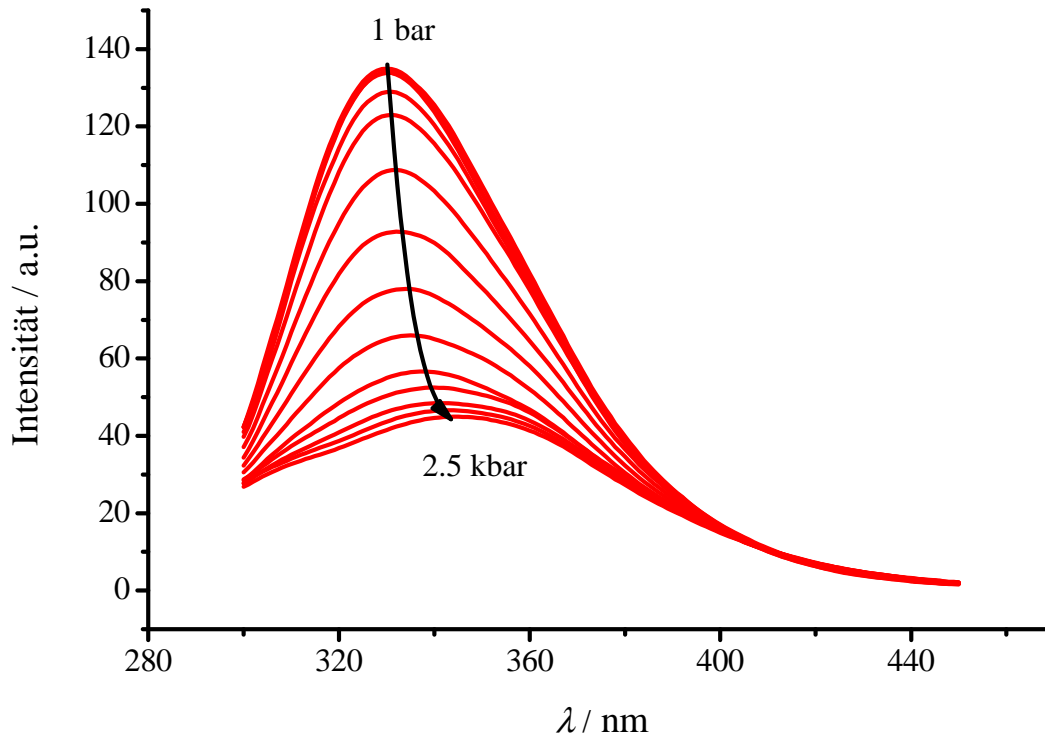


Abbildung 4.49. Gemessene Fluoreszenzspektren von SNase mit einer Konzentration 0.1 mg/mL in Gegenwart von 1 M Harnstoff. Eine Rotverschiebung sowie eine Abnahme der Fluoreszenzintensität mit steigendem Druck sind zu erkennen.

Anschließend wurden diese Fluoreszenzspektren auf ihre jeweiligen Maxima normiert. In Abbildung 4.50 sind die normierten Spektren aus Abbildung 4.49 dargestellt. Bei einer konstanten Wellenlänge von 380 nm ist eine große Änderung der Intensität mit steigendem Druck zu erkennen, was die Denaturierung der Proteinmoleküle widerspiegelt. Zur Bestimmung der Volumenänderung bei der Denaturierung von SNase wurde die Änderung der Fluoreszenzintensität bei einer Wellenlänge von 380 nm als Funktion des Drucks betrachtet.

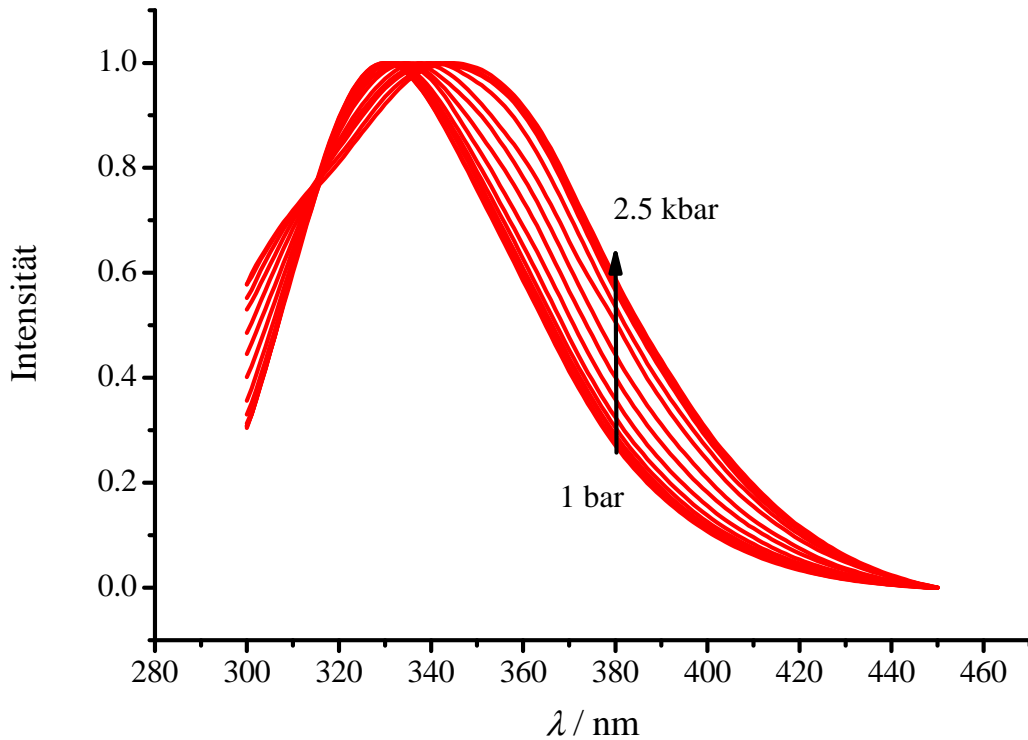


Abbildung 4.50. Normierte Fluoreszenzspektren von SNase mit einer Konzentration von 0.1 mg/mL in Gegenwart von 1 M Harnstoff. Die größten druckabhängigen Änderungen der Intensitäten liegen bei einer Wellenlänge um $\lambda = 380$ nm.

In Abbildung 4.51 sind die normierten Intensitäten bei $\lambda = 380$ nm als Funktion des Drucks aufgetragen, wobei die Druckabhängigkeit des Tryptophans anhand der druckabhängigen Intensitätsänderung von NATA bereits berücksichtigt wurde. Zu diesem Zweck wurde von den druckabhängigen Fluoreszenzintensitäten der SNase bei $\lambda = 380$ nm die jeweiligen Intensitäten bei entsprechendem Druck subtrahiert nach

$$I_{380}(p) = I_{380,SNase}(p) - I_{380,NATA}(p) \quad (51)$$

Mit steigender Harnstoffkonzentration ist eine deutliche Verschiebung des sigmoidalen Kurvenverlaufs zu niedrigeren Drücken hin zu erkennen. Durch sigmoidale Kurvenanpassungen wurden die Plateauwerte der gelösten SNase in Gegenwart von 0.5 M bzw. 1 M Harnstoff ermittelt, wobei für die Intensität des gefalteten Zustandes ein gemittelter Wert von $I_f = 0.276$ resultiert.

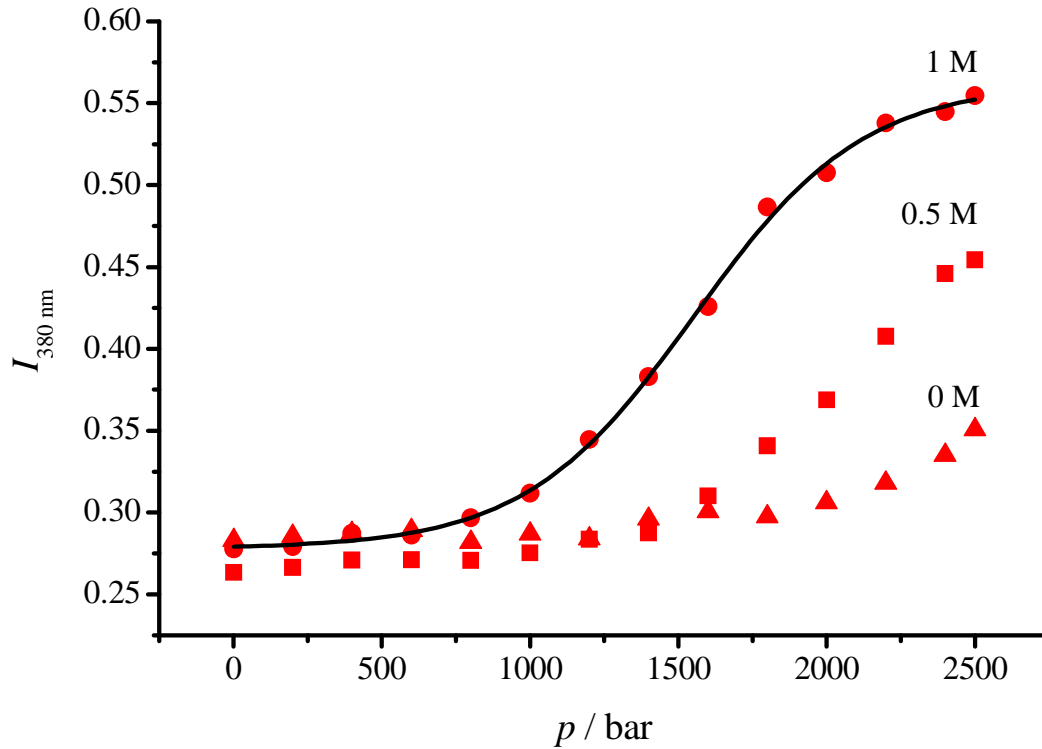


Abbildung 4.51. Fluoreszenzintensitäten von SNase mit einer Konzentration von $c = 0.1 \text{ mg/mL}$ bei $\lambda = 380 \text{ nm}$ ohne und mit 0.5 bzw. 1 M Harnstoffzusätzen bei $\text{pH } 7$ und $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Mit steigender Harnstoffkonzentration verschiebt sich der Entfaltungsdruck zu kleineren Drücken.

Die Ermittlung der Fluoreszenzintensität I_u des entfalteten Zustandes erfolgte durch sigmoidale Kurvenanpassungen sowohl der gelösten SNase in Gegenwart von 1 M Harnstoff als auch der auf Ludox AM adsorbierten SNase. Zu diesem Zweck wurden bei unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen die oberen Plateauwerte bestimmt und gemittelt. Es resultiert ein Wert von $I_{u,AM} = 0.581$. Im Falle der Messungen mit Ludox AS wurden analoge sigmoidale Anpassungen durchgeführt. Es resultiert ein Wert von $I_{u,AS} = 0.574$. Zur Bestimmung des Entfaltungsvolumens eines Proteins gelten folgende thermodynamische Zusammenhänge:

$$\Delta G_u^\circ = -RT \ln K_u = -RT \ln \frac{I_f - I(p)}{I(p) - I_u} \quad (52)$$

und

$$\left(\frac{\partial \Delta G_u}{\partial p} \right)_T = \Delta V_u \quad (53)$$

Dabei ist ΔG_u° die Standard-Entfaltungs-Gibbsenergie, K_u die Gleichgewichtskonstante der Proteinentfaltung, I_f und I_u die Intensitäten des gefalteten bzw. entfalteten Zustands und $I(p)$ die Intensität bei einem Druck p . Die Berechnung der Standard-Entfaltungs-Gibbsenergie ΔG_u° für unterschiedliche Drücke liefert letztlich die molare Volumenänderung ΔV_u . Mithilfe der Intensitäten bei 380 nm wurden durch Anwendung von Gleichung (52) die Werte für die Standard-Entfaltungs-Gibbsenergien ΔG_u° berechnet. Aus der Messung von SNase mit einem 0.5 M bzw. 1 M Harnstoffzusatz wurden die berechneten Werte für ΔG_u° als Funktion des Drucks aufgetragen. Da Harnstoff keine Auswirkung auf die Volumenänderung eines Proteins bei einer Druckdenaturierung aufweist, können aus den beiden Auftragnungen die Entfaltungsvolumina bestimmt werden.^{70,173,174}

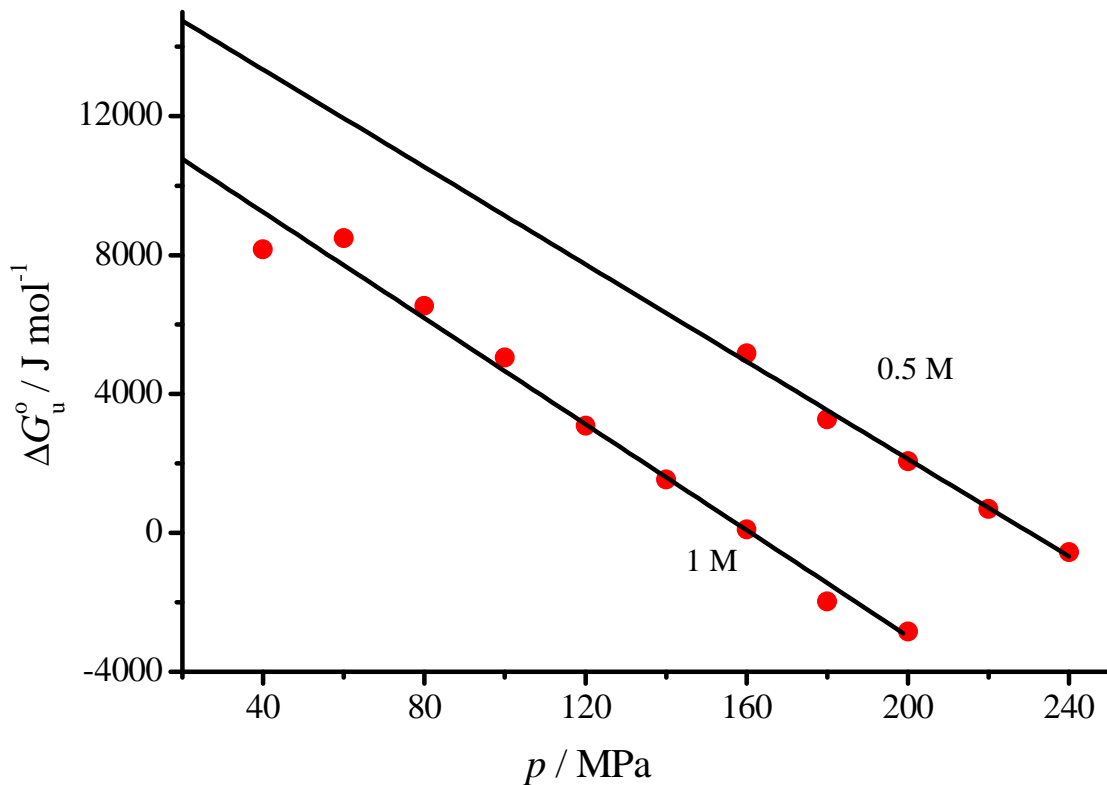


Abbildung 4.52. Standard-Entfaltungs-Gibbsenergie von SNase in Gegenwart von 0.5 und 1 M Harnstoff bei Drücken von 400 bis 2200 bar. Die Konzentration der SNase beträgt $c(\text{SNase}) = 0.1 \text{ mg/mL}$ bei pH 7 und $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Aus der Auftragung resultiert eine lineare Beziehung, wobei die Steigung ΔV_u und der y-Achsenabschnitt $\Delta G_u^\circ(p_0)$ liefert. Der mittlere Entfaltungsdruck p_u ist derjenige Druck, bei dem $\Delta G_u^\circ = 0$ ist. Aus dem linearen Fit für SNase in Gegenwart von 0.5 M Harnstoff ergibt sich

für die Änderung des molaren Proteinvolumens ein Wert von $\frac{\partial \Delta G_u^\circ}{\partial p} = \Delta V_u = -70 \pm 2 \text{ mL mol}^{-1}$ und für den 1 M Harnstoffzusatz ein Wert von $\Delta V_u = -76 \text{ mL mol}^{-1}$. Das mittlere Entfaltungsvolumen von -73 mL mol^{-1} liegt in guter Übereinstimmung mit Literaturdaten, welche im Bereich von -70 bis -94 mL mol^{-1} liegen.^{56,57,110,175} Wie erwartet, sinken sowohl die Standard-Entfaltungs-Gibbsenergie bei 1 bar, $\Delta G_u^\circ(p_0)$, als auch der mittlere Entfaltungsdruck mit steigender Harnstoffkonzentration (siehe Tabelle 4.14). $\Delta G_u^\circ(p_0)$ wurde durch Extrapolierung auf $p_0 = 1$ bar bestimmt. Die Größenordnung der Volumenänderung von SNase mit einem Wert von -73 mL mol^{-1} liegt im Bereich von weniger als 1 % des molaren Volumens eines SNase-Moleküls. Diese Volumenänderung liegt im Bereich von nur ca. 4 Wassermolekülen pro SNase-Moleküle. Dementsprechend liegt für gefaltete, native Proteine eine sehr dichtgepackte Struktur vor, und nur kleine Defektvolumina werden durch Wassermoleküle im Zuge der Denaturierung aufgefüllt.

4.2.4 Volumenänderung von SNase im adsorbierten Zustand

Um die Änderung des molekularen Volumens adsorbierter Proteine zu bestimmen, wurde SNase auf Ludox AM-Partikeln, wie in Punkt 3.2.6.4 beschrieben, adsorbiert. Aufgrund der eingelagerten Al^{3+} -Ionen liegt eine hohe negative Oberflächenladung bei Ludox AM vor, so dass in erster Linie elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Proteinen und der Grenzfläche zur Adsorption führen. In Abbildung 4.53 sind beispielhaft die gemessenen Fluoreszenzspektren zu sehen, welche noch nicht untergrundkorrigiert wurden und somit relativ hohe Intensitäten bei niedrigen Wellenlängen aufgrund von Lichtstreuung durch die Nanopartikel aufweisen. Diese hohen Lichtstreuungseffekte in den Spektren wurden durch die Messung eines reinen Ludox AM - Spektrums bei vergleichbarer Konzentration korrigiert. Das Ludox AM-Spektrum wurde vorher mit einem willkürlichen Faktor multipliziert, um Fluoreszenzspektren zu erhalten, die im Wellenlängenbereich um 300 nm einen Anstieg der Fluoreszenz zum Maximum der Fluoreszenzbande hin aufweisen.

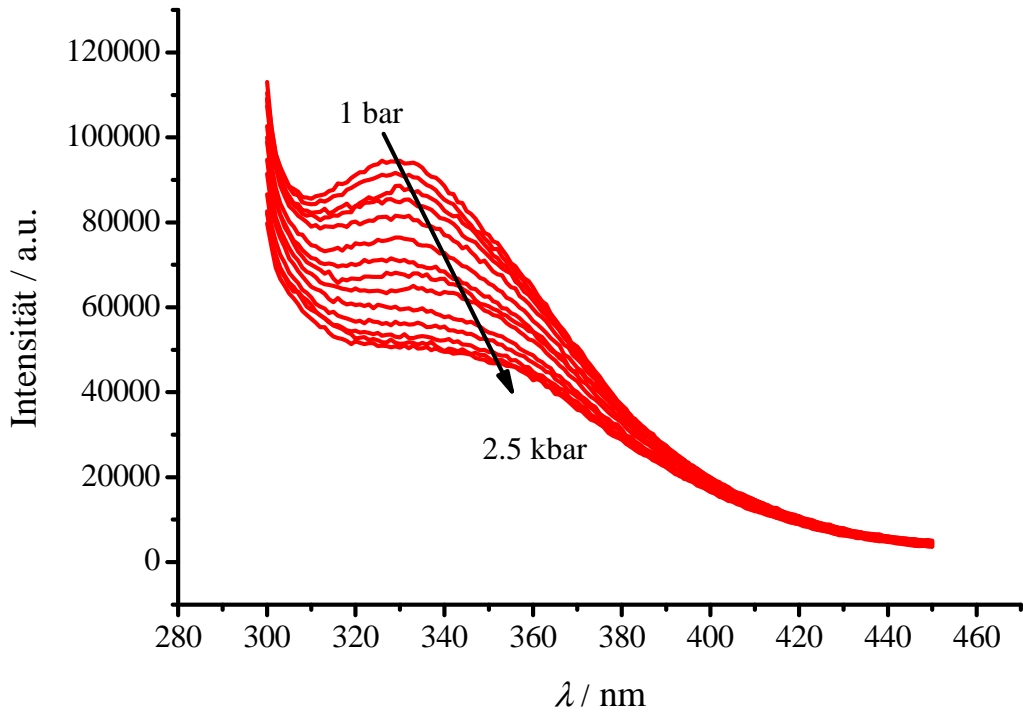


Abbildung 4.53. Fluoreszenzspektren von adsorbierter SNase auf Ludox AM bei hydrostatischen Drücken von 1 - 2500 bar. Die Konzentration von SNase beträgt $c(\text{SNase}) = 0.1 \text{ mg/mL}$ bei $\text{pH} = 7$ und $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Das Verhältnis von Ludox AM : SNase ist 1:100 (v/v).

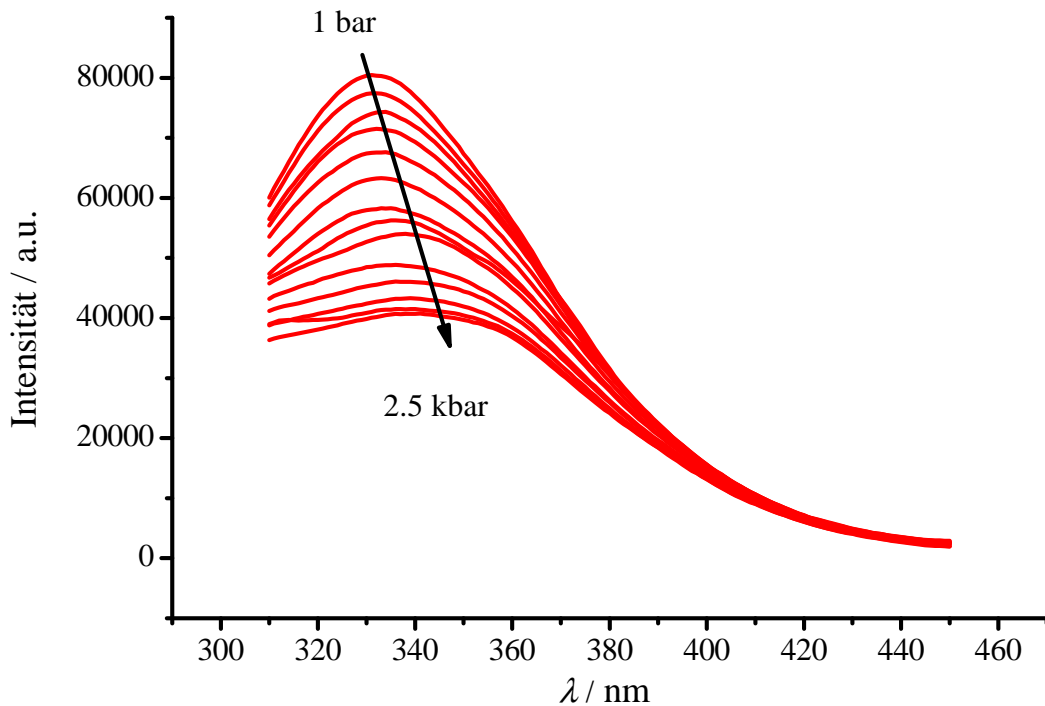


Abbildung 4.54. Fluoreszenzspektren von adsorbierter SNase auf Ludox AM nach Subtraktion der Lichtstreuintensität und anschließender Glättung.

In Abbildung 4.54 sind untergrundkorrigierte und geglättete Spektren adsorbierter SNase zu erkennen. Deutlich zu erkennen sind die Verschiebung der Intensitätsmaxima sowie eine allgemeine Abnahme der Intensitäten mit steigendem Druck. Im Folgenden wurde eine Normierung auf das jeweilige Maximum durchgeführt (siehe Abbildung 4.55).

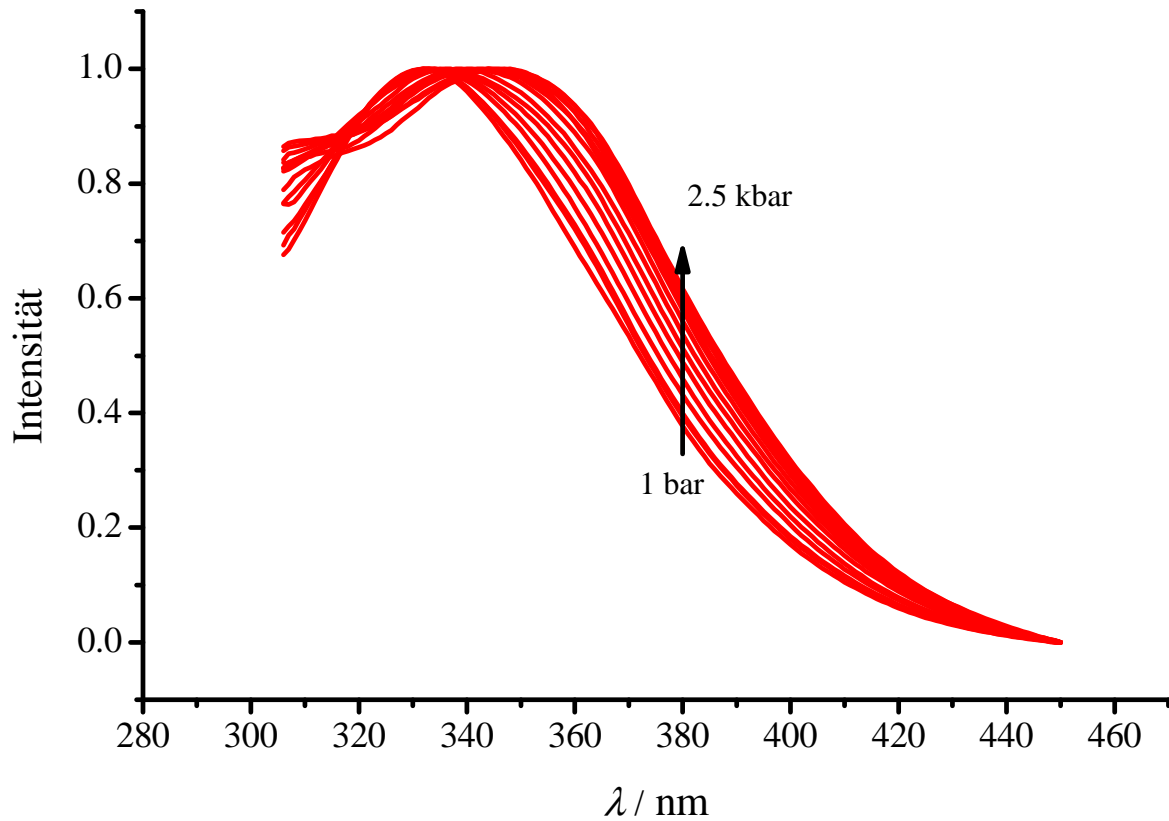


Abbildung 4.55. Normierung von Fluoreszenzspektren adsorbierter SNase auf Ludox AM bei Drücken von 1 bis 2500 bar.

Auch in diesem Fall ist ein druckabhängiger Anstieg der Intensität bei einer Wellenlänge von 380 nm zu sehen. Diese Intensitätsänderung repräsentiert den Entfaltungsgrad von adsorbierter SNase. Diese Messungen wurden mit unterschiedlichen Harnstoffzusätzen von 1, 2 und 4 mol/L wiederholt. In der folgenden Abbildung 4.56 sind die normierten Intensitäten bei $\lambda = 380 \text{ nm}$ unterschiedlicher Messreihen von adsorbierter bzw. gelöster SNase bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen zwischen 0 bis 4 M zu sehen.

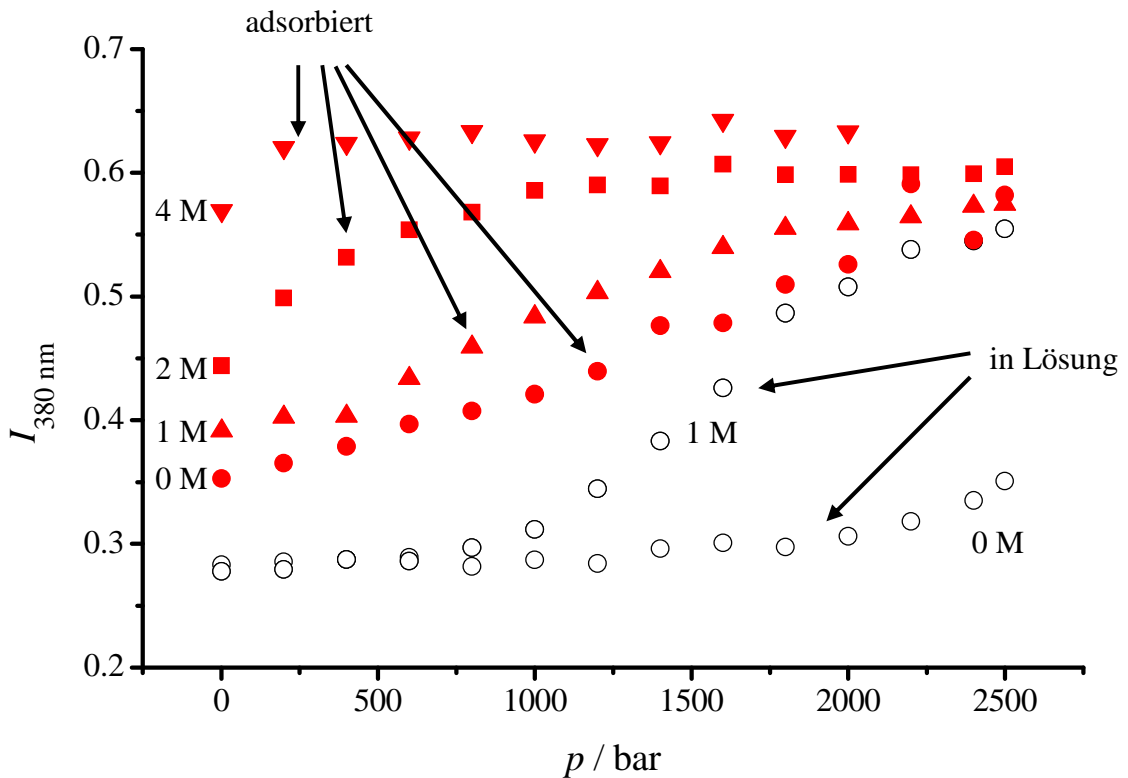


Abbildung 4.56. Vergleich normierter Intensitäten bei $\lambda = 380 \text{ nm}$ von gelöster bzw. adsorbierter SNase mit unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen im Vergleich (○ SNase gelöst in H_2O ohne und mit 1 M Harnstoff; ● adsorbiert auf Ludox AM ohne Harnstoff; ▲ mit 1 M Harnstoff; ■ mit 2 M Harnstoff; ▼ 4 M Harnstoff).

Wie im Diagramm zu erkennen ist, resultiert bei einem gegebenen Druck und einer gegebenen Harnstoffkonzentration eine erhöhte Fluoreszenzintensität bei 380 nm für SNase im adsorbierten Zustand relativ zur SNase in Lösung. Diese erhöhte Intensität geht aus der größeren Rotverschiebung der Tryptophan-Fluoreszenzbande und demnach einem größeren Entfaltungsgrad der SNase im adsorbierten Zustand hervor. Mit anderen Worten erfolgt eine Verringerung der thermodynamischen Stabilität der gefalteten SNase im Zuge des Adsorptionsprozesses. Mit steigender Harnstoffkonzentration ist eine zusätzliche Rotverschiebung bei vergleichbaren Drücken zu erkennen. Alle Kurven laufen bei hohen Drücken zu einem vergleichbaren Plateau zusammen, dessen Intensität über eine Mittelung der sigmoidalen Kurvenanpassungen bestimmt wurde. Durch die Anwendung von Gleichung (52) wurden die Standard-Entfaltungs-Gibbsenergien ΔG_u° aus den Intensitäten bei 380 nm berechnet.

In Abbildung 4.57 sind die Auftragungen der Standard-Entfaltungs-Gibbsenergien als Funktion des Drucks für SNase, welche auf Ludox AM in Abwesenheit und in Gegenwart von Harnstoff

abgeschieden wurde, aufgetragen. Die linearen Anpassungen wurden extrapoliert, so dass die Standard-Entfaltungs-Gibbsenergien bei $p_0 = 1$ bar bestimmt werden konnten.

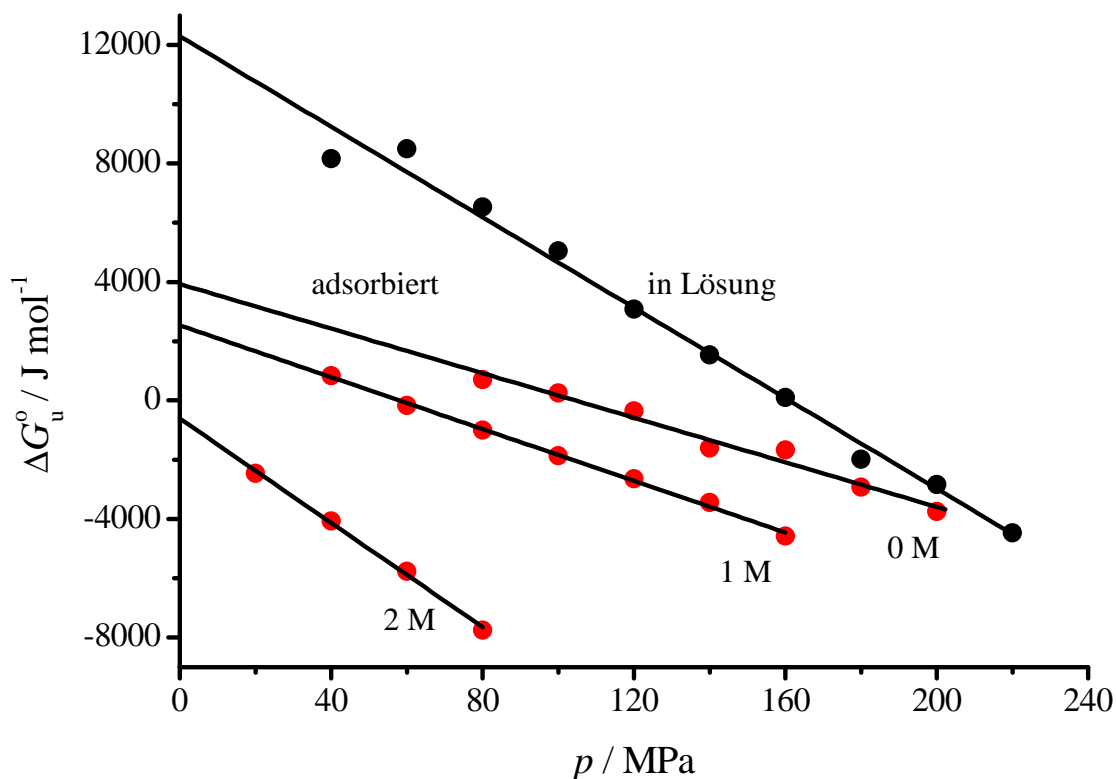


Abbildung 4.57. Standard-Entfaltungs-Gibbsenergie von gelöster und adsorbierter SNase auf Ludox AM bei Drücken von 200 bis 2200 bar. ($c(\text{SNase}) = 0.1$ mg/mL; pH 7; $T = 25$ °C), (● SNase gelöst in H_2O mit 1 M Harnstoff; ● adsorbiert auf Ludox AM ohne und mit Harnstoff).

Die Volumenänderung der Proteinentfaltung im adsorbierten Zustand ist unabhängig von der Harnstoffkonzentration, wie es auch bei gelöster SNase der Fall ist. Dadurch ist es möglich einen Mittelwert eines Entfaltungsvolumens von adsorbierter SNase zu berechnen. Im Falle des 2 M Harnstoffzusatzes ist eine verlässliche thermodynamische Analyse nicht möglich, da die Gegenwart einer solch hohen Harnstoffkonzentration das Entfaltungsgleichgewicht von SNase zu stark verschiebt. In Gegenwart von 2 M Harnstoff liegt offenbar ein deutlich größerer Betrag der Steigung im Vergleich zum 0 bzw. 1 M Harnstoffzusatz vor. Für die adsorbierte SNase auf Ludox AM ergeben sich für den 0 bzw. 1 M Harnstoffzusatz Volumenänderungen im Bereich von -38 bzw. -43 mL mol^{-1} , so dass ein Mittelwert von -41 mL mol^{-1} resultiert. Alle weiteren thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 4.14. dargestellt.

Anstatt mit Ludox AM- wurden Messungen auch mit Ludox AS-Silicananopartikeln durchgeführt. Aufgrund des geringeren ζ -Potentials liegen im Falle von Ludox AS deutlich

größere hydrophobe Wechselwirkungen im Vergleich zu Ludox AM vor. Die Messungen wurden mit Ludox AS unter gleichen Bedingungen wie zuvor durchgeführt. Es zeigen sich sehr ähnliche Ergebnisse verglichen zu Ludox AM. In Abbildung 4.58 sind die Intensitäten bei einer Wellenlänge von 380 nm von gelöster und adsorbierter SNase auf Ludox AS in Gegenwart von 0, 1 und 2 M Harnstoff dargestellt.

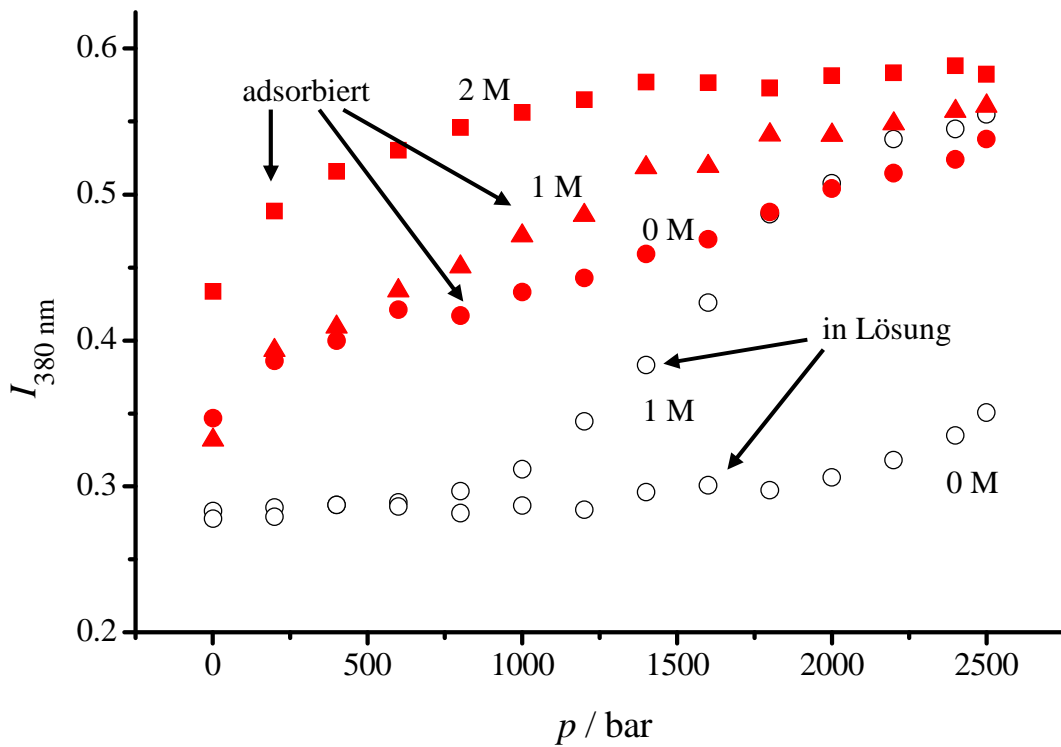


Abbildung 4.58. Vergleich normierter Intensitäten bei $\lambda = 380 \text{ nm}$ von gelöster bzw. adsorbierter SNase auf Ludox AS mit unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen im Vergleich (\circ SNase gelöst in H_2O ohne und mit 1 M Harnstoff; \bullet adsorbiert auf Ludox AS ohne Harnstoff; \blacktriangle mit 1 M Harnstoff; \blacksquare mit 2 M Harnstoff).

Auch in diesem Fall sind die Intensitäten der adsorbierten SNase bei konstantem Druck und gleicher Harnstoffkonzentration deutlich höher als im gelösten Zustand, was auf den größeren Entfaltungsgrad zurückzuführen ist. Alle Intensitäten laufen bei hohen Drücken auf einen gemeinsamen Plateauwert zu, dessen Wert sich, wie bereits oben erwähnt, durch die Mittelung von sigmoidalen Anpassungen an die Entfaltungskurven ergibt. Die berechneten Werte der Standard-Entfaltungs-Gibbsenergien wurden als Funktion des Drucks aufgetragen (siehe Abbildung 4.59). Es liegen vergleichbare Werte wie für die Messungen in Gegenwart von Ludox AM vor.

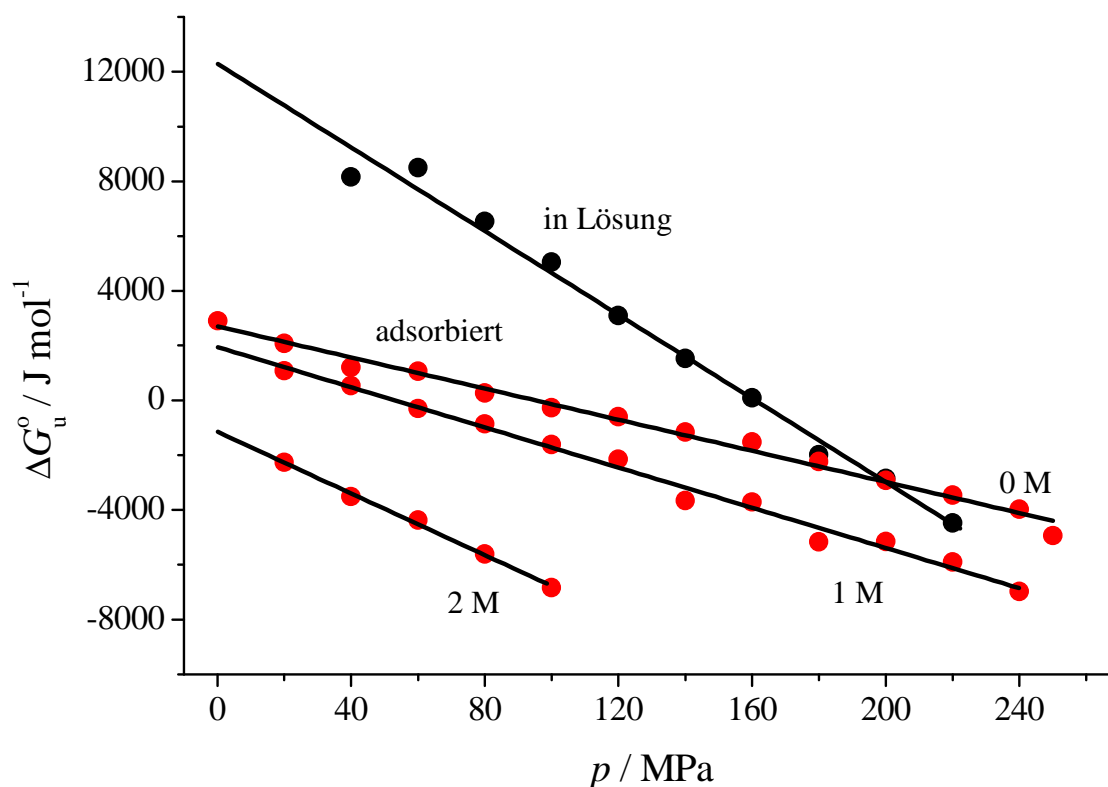


Abbildung 4.59. Standard-Entfaltungs-Gibbsenergie von gelöster und adsorbierter SNase auf Ludox AS bei Drücken von 1 bis 2500 bar ($c(\text{SNase}) = 0.1 \text{ mg/mL}$; $\text{pH } 7$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$), (\bullet SNase gelöst in H_2O mit 1 M Harnstoff; \bullet adsorbiert auf Ludox® AS-40 ohne und mit 1 bzw. 2 M Harnstoff).

Im Falle des 2 M Harnstoffzusatzes ist auch in diesem Falle keine verlässliche thermodynamische Analyse möglich, da das Entfaltungsgleichgewicht von SNase zu stark in Richtung des denaturierten Zustandes verschoben ist. Ein deutlich größerer Betrag der Steigung im Vergleich zum 0 bzw. 1 M Harnstoffzusatz liegt hierbei vor. Für die adsorbierte SNase auf Ludox AS ergeben sich für den 0 bzw. 1 M Harnstoffzusatz Volumenänderungen im Bereich von -28 bzw. -36 mL mol^{-1} , so dass der Mittelwert bei -32 mL mol^{-1} liegt. Alle weiteren thermo-dynamischen Parameter sind in Tabelle 4.14 dargestellt.

Tabelle 4.14. Änderung der molaren Volumina, Standard-Entfaltungs-Gibbsenergien und mittlere Entfaltungsdrücke von adsorbierter bzw. gelöster SNase.

| SNase | $\Delta V_u / (\text{mL} \cdot \text{mol}^{-1})$ | $\Delta G_u^\circ / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$ | p_u / kbar |
|--|--|--|---------------------|
| Volumenänderung in H ₂ O; pH 7; 0.5 M Harnstoff | -70±7 | 16±2 | 2.3 |
| Volumenänderung in H ₂ O; pH 7; 1 M Harnstoff | -76±8 | 12±2 | 1.6 |
| Mittelwert | -73±10 | ---- | ---- |
| adsorbiert auf Ludox AM; pH 7; 0 M Harnstoff | -38±8 | 3.8±1 | 1.2 |
| adsorbiert auf Ludox AM; pH 7; 1 M Harnstoff | -43±8 | 2.6±1 | 0.7 |
| adsorbiert auf Ludox AM; pH 7; 2 M Harnstoff | -88 | -0.6±1 | ---- |
| Mittelwert für 0 und 1 M Harnstoff | -41±11 | ---- | ---- |
| Adsorptionsvolumen bei pH 7 | -32 | | |
| adsorbiert auf Ludox AS; pH 7; 0 M Harnstoff | -28±6 | 2.7±1 | 0.9 |
| adsorbiert auf Ludox AS; pH 7; 1 M Harnstoff | -36±7 | 1.9±1 | 0.5 |
| adsorbiert auf Ludox AS; pH 7; 2 M Harnstoff | -56 | -1.1±1 | ---- |
| Mittelwert für 0 und 1 M Harnstoff | -32±9 | ---- | ---- |
| Adsorptionsvolumen bei pH 7 | -41 | | |

In Tabelle 4.14 ist zu sehen, dass das Entfaltungsvolumen der SNase einen deutlich geringen Betrag aufweist, wenn die Proteinmoleküle im adsorbierten Zustand vorliegen. Werden die mittleren Entfaltungsvolumina im adsorbierten Zustand, welche im Falle von Ludox AM bei -41 mL mol^{-1} und Ludox AS bei -32 mL mol^{-1} liegen, mit derjenigen in Lösung, welche bei -73 mL mol^{-1} liegt, verglichen, so liegt scheinbar ein großer Effekt durch die Adsorption vor. Demnach führen Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Grenzflächen zu starken Volumenänderungen. In vielen Proteinadsorptionsstudien wurde gezeigt, dass hydrophobe Grenzflächen am stärksten mit Proteinen wechselwirken. Auch dieser Effekt zeigt sich hier anhand des stärkeren Effekts auf die Volumenänderung von SNase auf den Ludox AS-Partikeln, welche eine geringere Oberflächenladung als Ludox AM aufweisen. Weiterhin wird die Standard-Entfaltungs-Gibbsenergie der SNase bei 1 bar durch die Adsorption auf Silicapartikeln drastisch verringert. Diese Ergebnisse implizieren eine Stabilisierung der entfalteten Konformation der adsorbierten SNase durch Grenzflächenwechselwirkungen.

Die Ergebnisse können weitere Information über den Adsorptionsprozess der SNase auf Silicapartikeln liefern. Aus der Differenz der Entfaltungsvolumina in Lösung und derjenigen im adsorbierten Zustand kann unter der Annahme eines Zweizustandsprozesses und unter der

Annahme gleicher molarer Volumina sowohl der gelösten als auch der adsorbierten SNase im entfalteten Zustand die Volumenänderung durch den Adsorptionsprozess auf den jeweiligen Grenzflächen berechnet werden. Im Zuge des Adsorptionsprozesses erfolgt damit eine Volumenänderung von -32 mL mol^{-1} für SNase auf Ludox AM und für SNase auf Ludox AS ein Wert von -41 mL mol^{-1} . Das bedeutet, dass auf der hydrophoberen Grenzfläche der Ludox AS- Partikel der Denaturierungsgrad größer ist als auf der polareren Grenzfläche der Ludox AM-Partikel. Aus diesen Parametern kann ein Volumendiagramm erstellt werden, in welchem die Volumenänderungen durch den Adsorptionsprozess, so wie die Volumenänderungen durch den Entfaltungsprozess aufgeführt werden (siehe Abbildung 4.60).

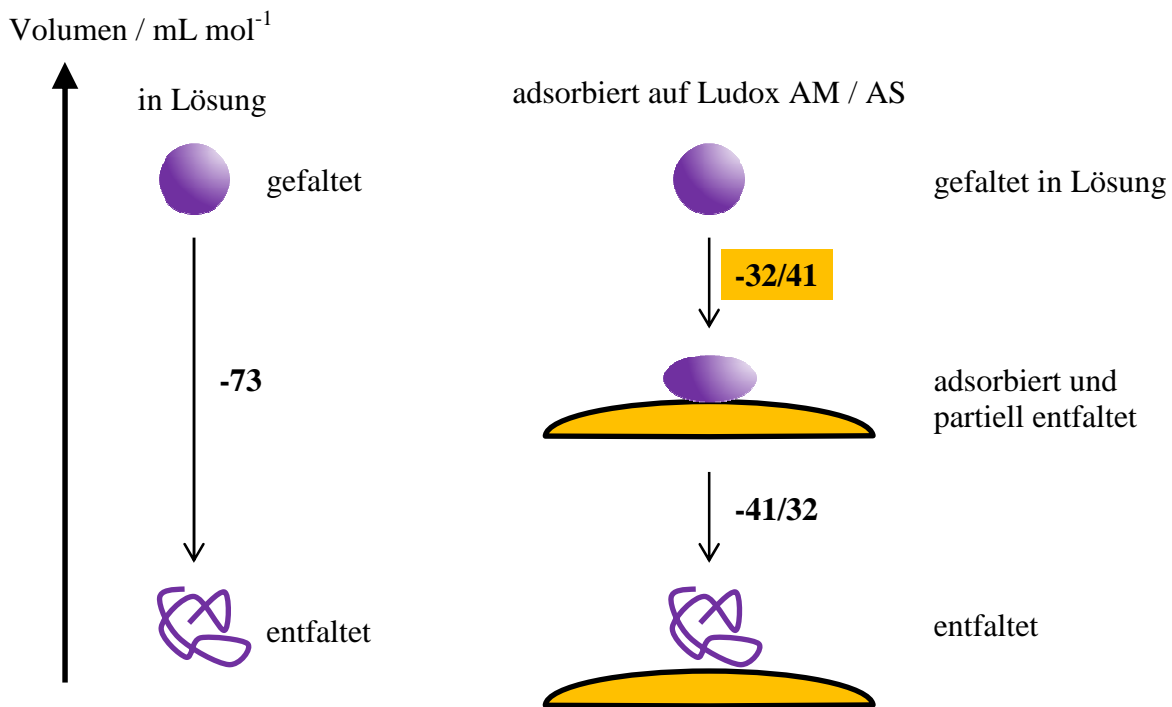


Abbildung 4.60. Volumendiagramm von SNase. In Lösung wird das molare Volumen der SNase um -73 mL mol^{-1} durch Druckdenaturierung verringert. Im adsorbierten Zustand auf Ludox AM / AS erfolgt eine geringere Volumenänderung von -41 bzw. -32 mL mol^{-1} . Die Differenz der Volumenänderungen im gelösten sowie im adsorbierten Zustand liefert die Volumenänderung durch den Adsorptionsprozess.

4.2.5 Effekt des pH-Wertes auf die druckabhängige Entfaltung von adsorbierter SNase

Weiterhin wurde der Einfluss des pH-Werts auf die druckabhängige Proteinentfaltung von SNase untersucht. In Abbildung 4.61 sind normierte Intensitäten bei einer Wellenlänge $\lambda = 380$ nm von gelöster SNase ($c(\text{SNase}) = 0.1 \text{ mg/mL}$) bei pH 6, 7, 10 und 11 bei einer Temperatur von $25 \text{ }^\circ\text{C}$ zu sehen. Im Allgemeinen kann gesagt werden, dass bei pH 6, 7, 10 und 11 keine signifikanten Unterschiede auftreten. Für gelöste Proteine werden die Entfaltungsvolumina nicht maßgeblich durch die Änderung des Ladungszustandes beeinflusst, was bedeutet, dass die Elektrostriktion nur einen sehr geringen Beitrag zur Druckdenaturierung beiträgt.

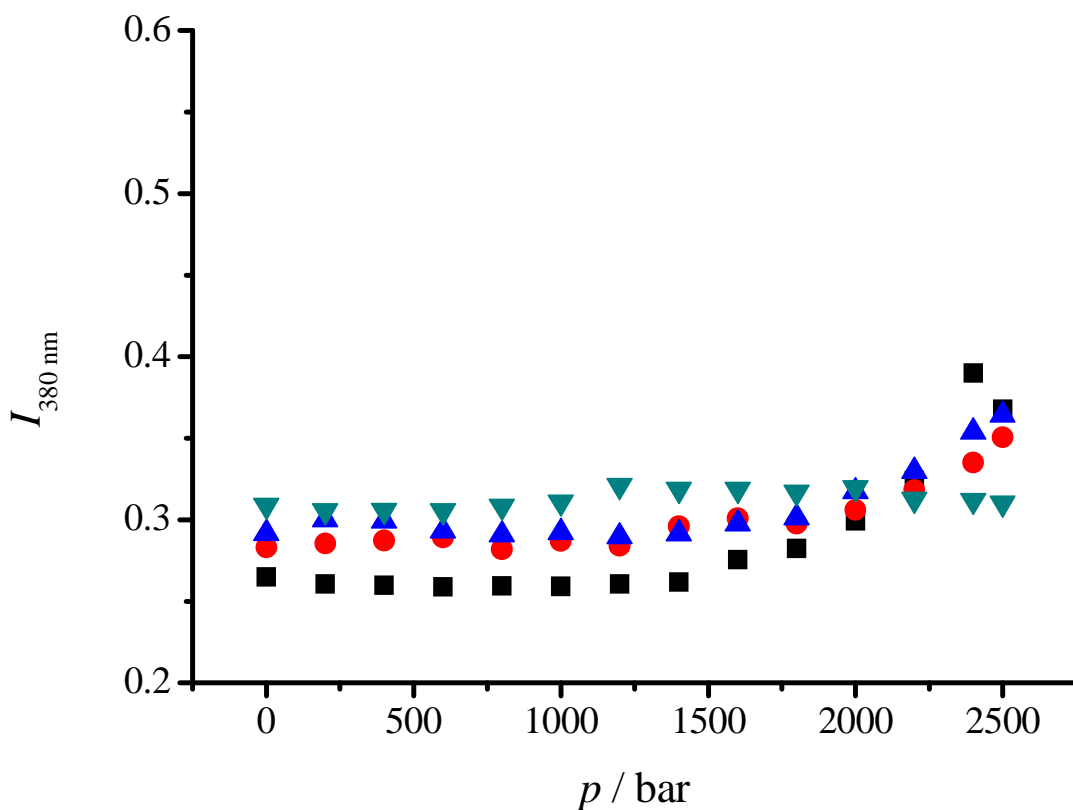


Abbildung 4.61. Vergleich von normierten Intensitäten bei $\lambda = 380$ nm von SNase in Lösung bei unterschiedlichen pH-Werten. Die Konzentration der SNase lag bei $c(\text{SNase}) = 0.1 \text{ mg/mL}$. Die Messung erfolgte bei einer konstanten Temperatur von $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (■ pH 6; ● pH 7; ▲ pH 10; ▼ pH 11).

Im Falle der adsorbierten SNase zeigt eine Veränderung des pH-Wertes deutlich größere Effekte auf die Druckdenaturierung im Vergleich zur SNase in Lösung. SNase wurde auf Ludox AM adsorbiert und bei pH-Werten von 7, 8, 8.5, 9 und 10 bei unterschiedlichen Drücken gemessen. In der Abbildung 4.62 ist bei einem steigenden pH-Wert von 7 bis 10 im Allgemeinen eine Rotverschiebung gleichem Druck zu erkennen.

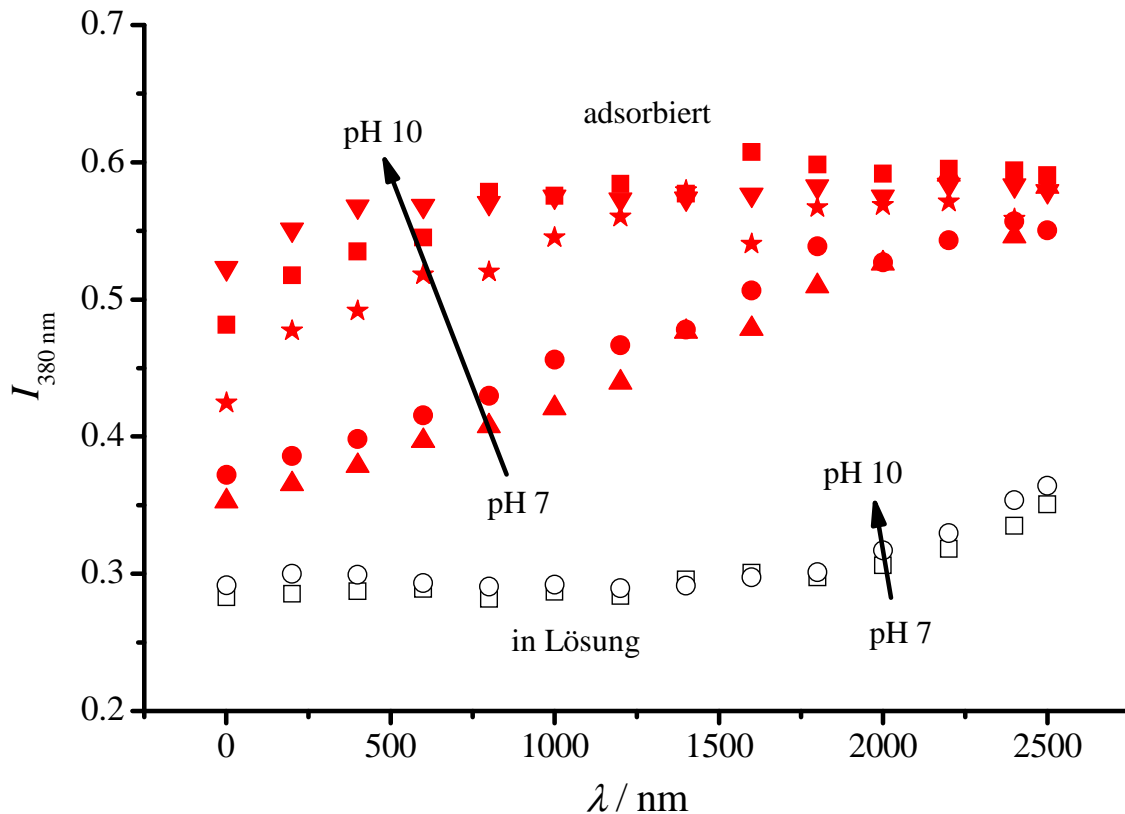


Abbildung 4.62. Vergleich normierter Intensitäten bei $\lambda = 380$ nm von gelöster SNase jeweils bei pH 7 und pH 10 sowie von adsorbierter SNase bei pH 7, 8, 8.5, 9 und 10 ($c(\text{SNase}) = 0.1$ mg/mL; $T = 25$ °C; Verhältnis Ludox AM : SNase, 1:100 (v/v)).

In vielen Proteinadsorptionsstudien wurde der Adsorptionsgrad als Funktion des pH-Wertes gemessen, wobei der größte Bedeckungsgrad im Allgemeinen in der Nähe des isoelektrischen Punkts des Proteins liegt, bei welchem die Nettoladung gleich Null ist.^{176,177} Unter diesen Bedingungen liegen sehr geringe laterale Protein-Protein-Wechselwirkungen innerhalb einer adsorbierten Schicht vor, und es kommt zu einer relativ dichten Packung von Proteinen an einer Grenzfläche. Jedoch können auch Protein-Grenzflächen-Wechselwirkungen durch den pH-Wert verändert werden.

Im Falle von pH = 6 (Daten sind nicht gezeigt) und tiefer resultiert eine sichtbare Trübung der Probe, welche aus der Aggregation der proteinbedeckten Silicapartikel hervorgeht. Ein vergleichbarer pH-Effekt wurde ebenfalls für Lysozym-Silica-Dispersionen gefunden.¹⁷⁸ Dementsprechend wurde der pH-Wert im Bereich von 7 – 10 variiert. Der obere pH-Wert liegt in der Nähe des isoelektrischen Punkts der SNase, welcher bei pH = 9.5 liegt. Dementsprechend werden durch Erhöhung des pH-Wertes von 7 auf 10 die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen SNase und Silicapartikel verringert, auch wenn die negative Ladung der Silicapartikel ansteigt. Wie anhand des Kurvenverlaufs in Abbildung 4.62 zu sehen ist, steigen die

Intensitäten mit größerem pH-Wert für SNase im adsorbierten Zustand an. Dementsprechend liegt ein höherer Entfaltungsgrad bei einem höheren pH-Wert vor, bei denen die Nettoladung der adsorbierten SNase gering ist. SNase in Lösung hingegen weist keinen signifikanten pH-Effekt im pH-Bereich von 7 bis 10 auf.

In Abbildung 4.63 sind die Werte der Standard-Entfaltungs-Gibbsenergien der adsorbierten SNase auf Ludox AM bei verschiedenen pH-Werten als Funktion des Drucks aufgetragen. Zur Berechnung dieser Werte wurde die mittlere Intensität des entfalteten Zustands des Proteins aus den sigmoidalen Kurvenanpassungen aus Abschnitt 4.2.4 verwendet. Es ist zu erkennen, dass die Änderungen der Standard-Entfaltungs-Gibbsenergien mit steigendem Druck im Falle der adsorbierten SNase bei allen pH-Werten deutlich kleiner sind als in Lösung. Da die Steigungen vergleichbare Werte aufweisen, sollten sich die Volumenänderungen der SNase im adsorbierten Zustand bei unterschiedlichen pH-Werten nicht signifikant unterscheiden. Zusätzlich erfolgt mit steigendem pH-Wert eine Abnahme der Standard-Entfaltungs-Gibbsenergie bei 1 bar im adsorbierten Zustand. Scheinbar liegen bei einer Verringerung der Oberflächenladung der Proteinmoleküle stärkere Protein-Silica-Wechselwirkungen vor, die die adsorbierten Proteine in den entfalteten Zustand lenken. Das führt zur Annahme, dass die im Allgemeinen beobachtete stärkere Proteinadsorption in der Nähe des isoelektrischen Punktes des Proteins durch starke Protein-Silica-Wechselwirkungen unterstützt wird. In Tabelle 4.15 sind Änderungen der molaren Volumina ΔV_u , die Standard-Entfaltungs-Gibbsenergien ΔG_u° und die Entfaltungsdrücke p_u für adsorbierte SNase auf Ludox AM bei verschiedenen pH-Werten aufgeführt. Der pH-Wert weist einen Effekt auf die Standard-Entfaltungs-Gibbsenergien von adsorbierten Proteinen auf, jedoch zeigt sich kein pH-Effekt auf die Volumenänderungen innerhalb der experimentellen Fehler.

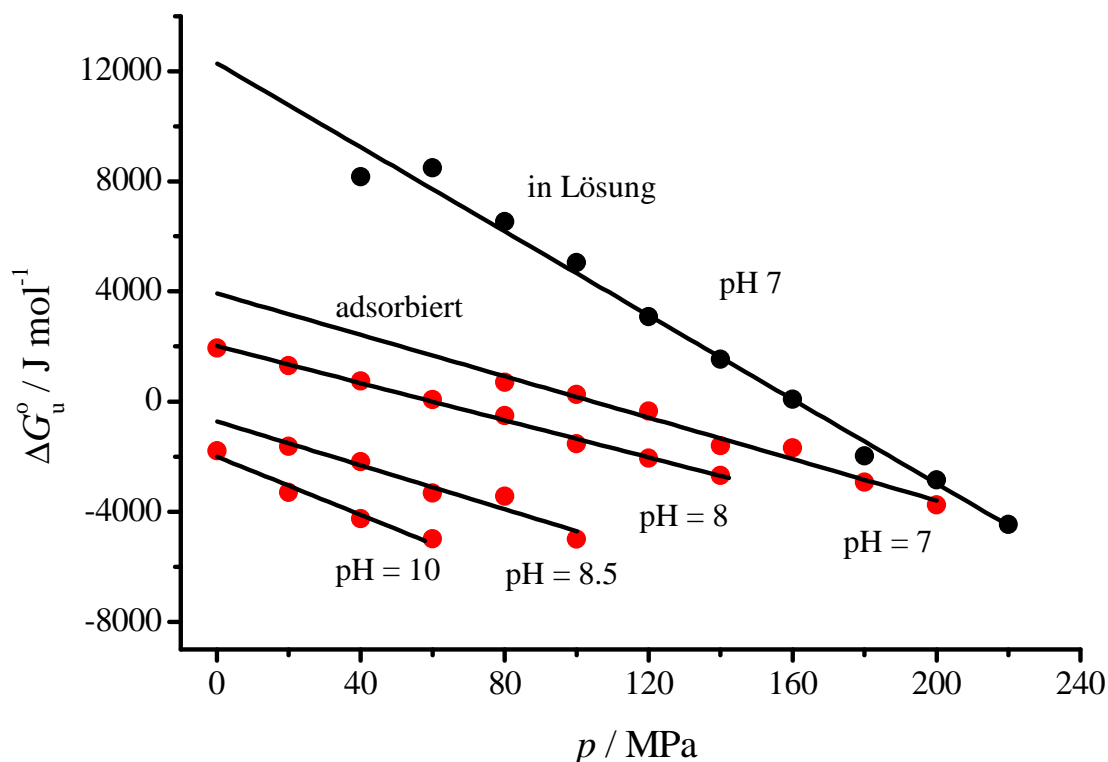


Abbildung 4.63. Standard-Entfaltungs-Gibbsenergien von gelöster und adsorbierter SNase auf Ludox AM bei unterschiedlichen pH-Werten bei Drücken von 1 bis 2500 bar ($c(\text{SNase}) = 0.1 \text{ mg/mL}$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$).

Diese Ergebnisse zeigen, dass auch im adsorbierten Zustand Proteinladungen, Coulomb-Wechselwirkungen und Ladungshydratation nicht signifikant zur Volumenänderung beitragen. Das bedeutet, dass die Eliminierung der Defektvolumina die größte Triebkraft bei der Entfaltung von SNase zu sein scheint. Zur Berechnung des Mittelwertes wurden die Volumenänderungen bei pH 7, 8, 8.5 berücksichtigt, da bei pH = 10 nur vier Datenpunkte vorliegen.

Tabelle 4.15. ΔV_u , ΔG_u° und p_u von adsorbierter SNase auf Ludox AM bei unterschiedlichen pH-Werten.

| SNase adsorbiert auf Ludox AM | $\Delta V_u / (\text{mL} \cdot \text{mol}^{-1})$ | $\Delta G_u^\circ / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$ | p_u / kbar |
|-------------------------------|--|--|---------------------|
| pH 7 | -38 ± 8 | 3.8 ± 1 | 1.2 |
| pH 8 | -34 ± 7 | 2.0 ± 1 | 0.6 |
| pH 8.5 | -40 ± 8 | -0.7 ± 1 | --- |
| pH 10 | -54 | -2.0 ± 0.2 | --- |
| Mittelwert | -37 ± 13 | | |

4.2.6 Volumenänderung von Lysozym in Lösung

Im Vergleich zur SNase besitzt Lysozym (Lys) sechs Tryptophanreste, deren Fluoreszenz jedoch zum größten Teil von nur 2 Resten (Trp-62, Trp-108) ausgeht. Zur Untersuchung der Volumenänderung von Lysozym bei der Entfaltung wurden 3 mL einer 0.1 mg/mL Lösung in 10 mM Bistris-Puffer angesetzt und Fluoreszenzspektren bei pH 7 und $T = 25\text{ °C}$ aufgenommen. Die Spektren wurden mittels gleitenden Durchschnitts über 5 Datenpunkte geglättet.

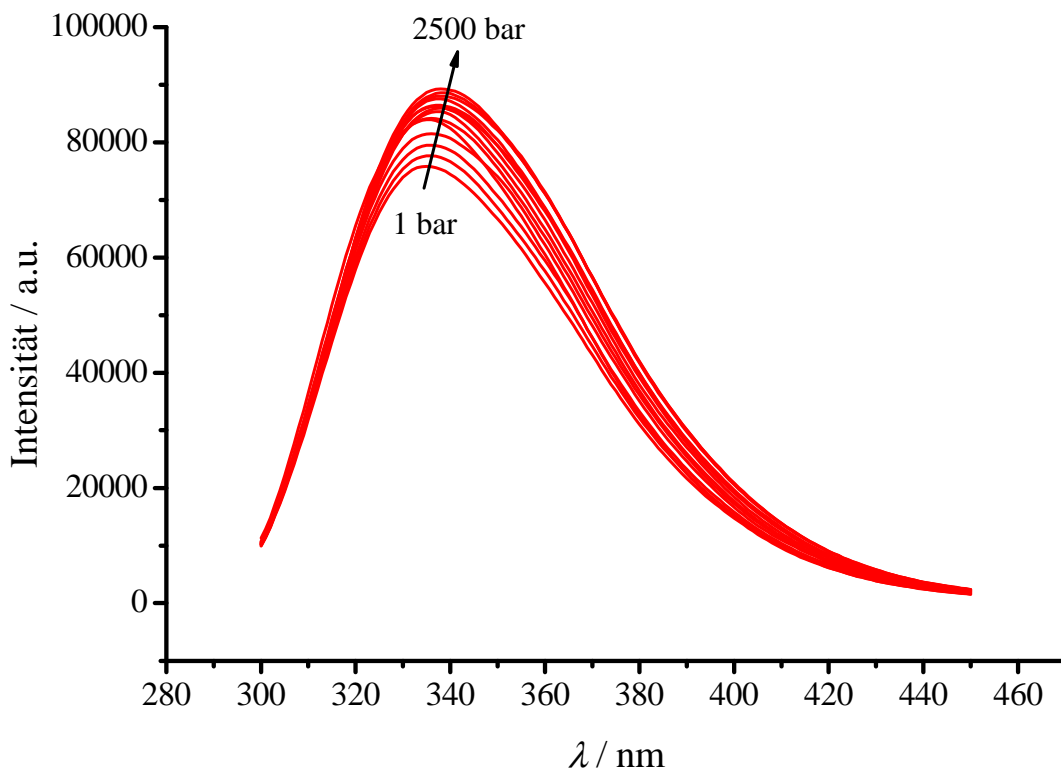


Abbildung 4.64. Geglättete Fluoreszenzspektren von Lysozym in Lösung bei pH 7 und Drücken von 1 bis 2500 bar ($c(\text{Lys}) = 0.1\text{ mg/mL}$; $T = 25\text{ °C}$).

In Abbildung 4.64 sind die Fluoreszenzspektren von Lysozym in Lösung bei Drücken von 1 bis 2500 bar zu sehen. Mit steigendem Druck sind eine leichte Rotverschiebung der spektralen Maxima und eine Zunahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Ein Teil der Rotverschiebung erfolgt aus dem intrinsischen Druckeffekt von Tryptophan, welcher in jeder folgenden druckabhängigen Auftragung berücksichtigt wurde. Abhängig von der Umgebung der Tryptophanreste resultieren unterschiedliche Quantenausbeuten, welche dazu führen, dass die Intensitäten mit steigendem Druck im Allgemeinen größer werden.

Eine Normierung auf die jeweiligen spektralen Maxima wie bei den Messungen mit SNase ist nicht möglich, da unterschiedliche Fluoreszenzbeiträge mehrerer Tryptophanreste in den Spektren auftreten. Daher wurden die Intensitäten bei $\lambda = 380$ nm auf die Flächen der jeweiligen Spektren über einen Wellenlängenbereich von 320 bis 450 nm normiert, um alle Fluoreszenzbeiträge zu berücksichtigen. Anschließend erfolgte die Subtraktion des Druckeffekts auf Tryptophan mittels der flächennormierten Steigung der Fluoreszenzintensität von NATA bei 380 nm. Diese korrigierten Intensitäten $I_{380 \text{ nm}}$ wurden als Funktion des Drucks aufgetragen (siehe Abbildung 4.65). Weiterhin wurde die Messung in Gegenwart von Harnstoffzusätzen mit Konzentrationen von 3, 6 und 8 M durchgeführt.

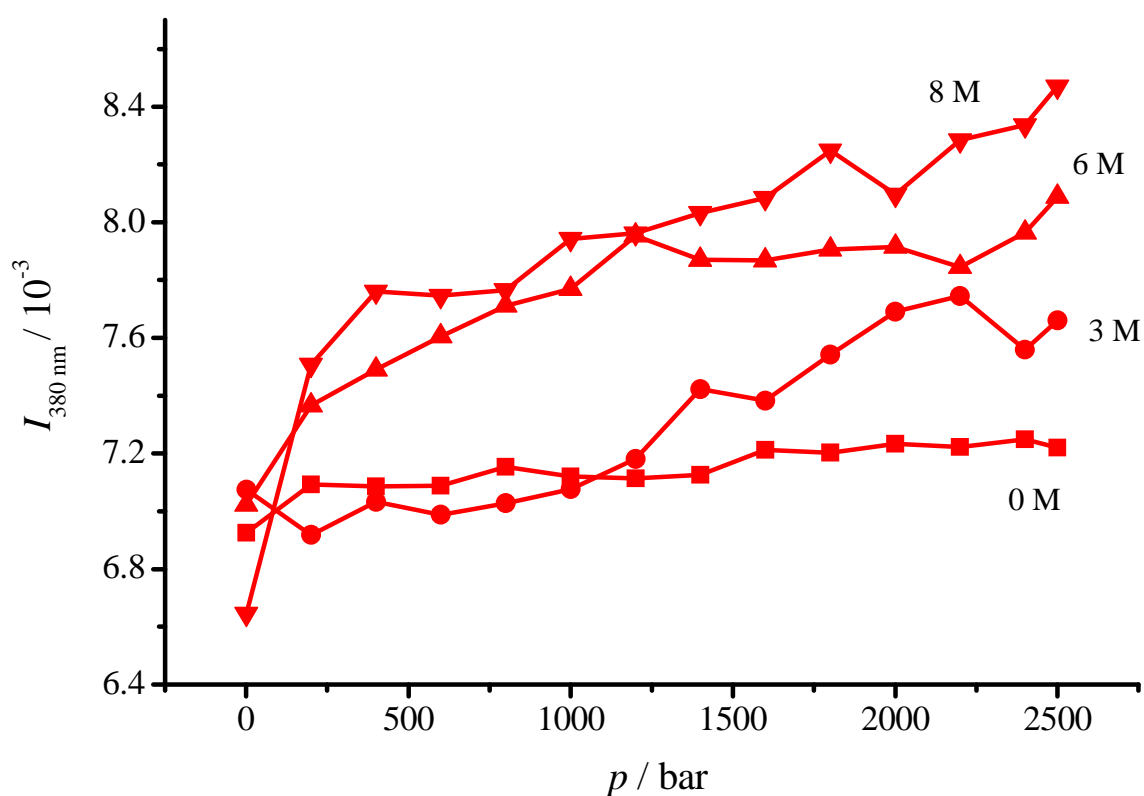


Abbildung 4.65. Normierte Fluoreszenzintensitäten bei 380 nm von Lysozym in Lösung bei pH 7 und unterschiedlichen Harnstoffzusätze ($c(\text{Lys}) = 0.1$ mg/mL; $T = 25$ °C; ■ 0 M Harnstoff; ▲ 3 M Harnstoff; ● 6 M Harnstoff, ▼ 8 M Harnstoff).

Im Gegensatz zur SNase ist bei Lysozym keine komplette sigmoidale Kurve aufgrund der höheren Stabilität des Proteins zu sehen, welche aus den vier Disulfidbrücken resultiert. Jedoch können durch die Zugabe von Harnstoff einzelne Ausschnitte der sigmoidalen Kurve vom nativen bis zu einem entfalteten Zustand gemessen werden. Als unteres Plateau, welches den nativen Zustand widerspiegelt, kann ein Wert von 0.007 angenommen werden. Als oberes

Plateau dient die höchste Intensität in Gegenwart von 8 M Harnstoff. In Abbildung 4.66 sind die berechneten Werte für ΔG_u° von Lysozym in Gegenwart von 3 M Harnstoff im Bereich zwischen 600 und 1800 bar und in Gegenwart von 6 M zwischen 200 und 1000 bar als Funktion des Drucks aufgetragen.

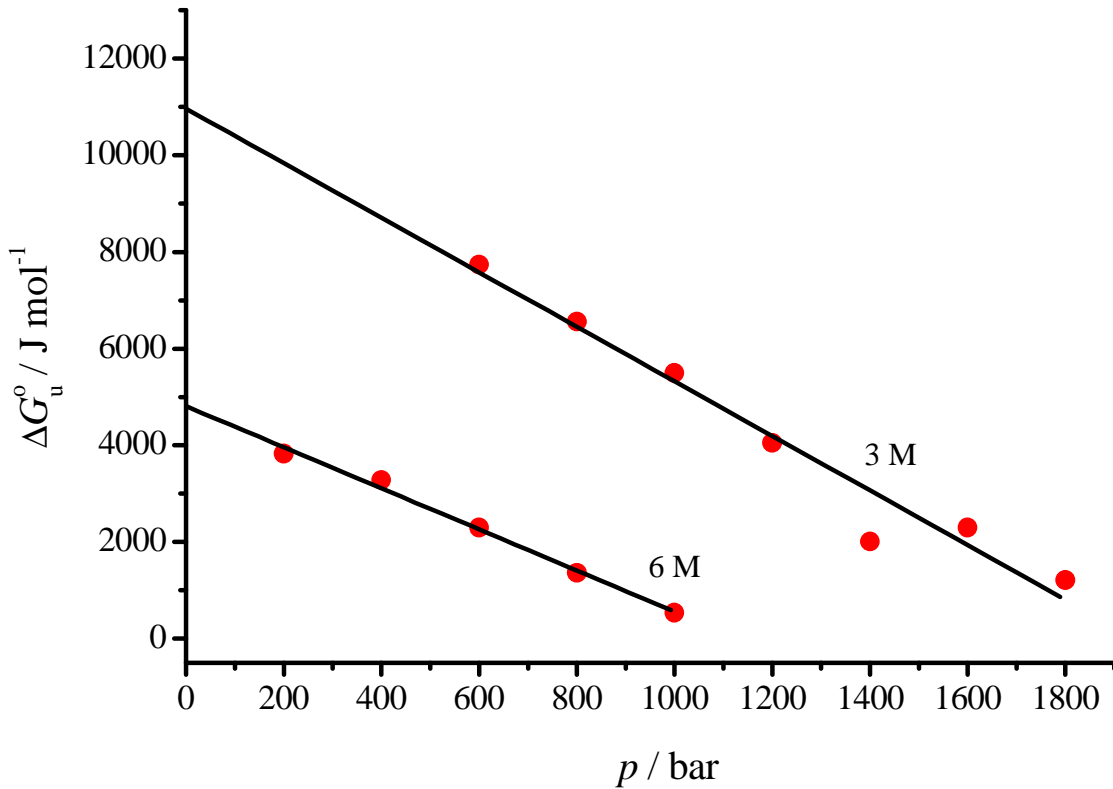


Abbildung 4.66. ΔG_u° -Werte für Lysozym in Lösung in Gegenwart von 3 und 6 M Harnstoff. Aus den Steigung ergeben sich Volumenänderungen von -56 bzw. -42 mL mol⁻¹.

Für Lysozym in Gegenwart von 3 und 6 M Harnstoff resultieren Volumenänderungen von -56 ± 2 mL mol⁻¹ bzw. -42 ± 3 mL mol⁻¹ aus linearen Anpassungen an die Datenpunkte. Es ergibt sich eine mittlere Volumenänderung von -49 ± 6 mL mol⁻¹.

4.2.7 Volumenänderung von Lysozym im adsorbierten Zustand

In Abbildung 4.67 sind beispielhaft Fluoreszenzspektren von adsorbiertem Lysozym auf Ludox AM bei Drücken von 1 bis 2500 bar dargestellt, welche im kurzwelligen Bereich hohe Intensitäten aufgrund von Lichtstreuung durch die Silicapartikel aufweisen.

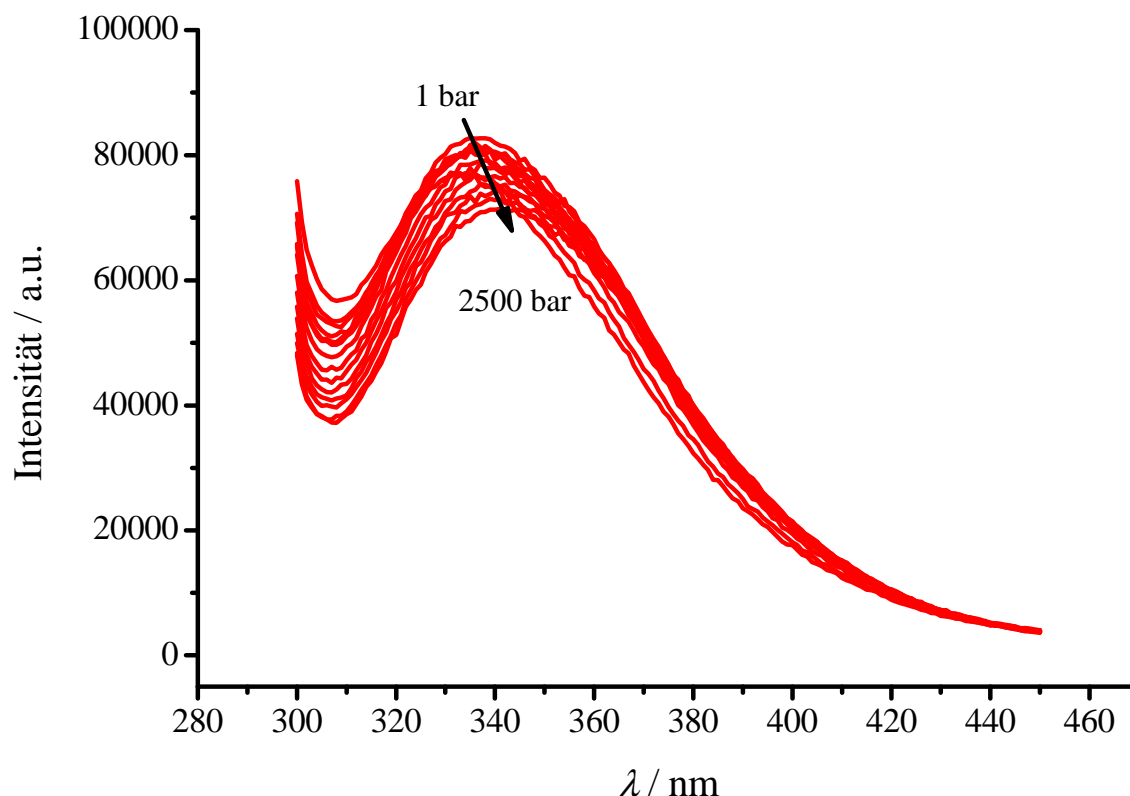


Abbildung 4.67. Gemessene Fluoreszenzspektren von adsorbiertem Lysozym auf Ludox AM bei Drücken von 1 bis 2500 bar ($c(\text{Lys}) = 0.1 \text{ mg/mL}$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, Verhältnis Ludox AM : Lysozym 1:11 (v/v)).

Zur Subtraktion der Lichtstreuintensität wurde das Spektrum einer reinen Ludox AM Suspension unter gleichen Bedingungen (ohne Lysozym) im Volumenverhältnis Ludox AM: Puffer 1:11 (v/v) wie zuvor gemessen (Daten nicht gezeigt). Die Lichtstreuintensität der reinen Ludox AM-Suspension wurde je nach Spektrum mit einem bestimmten Faktor multipliziert und anschließend subtrahiert, so dass eine physikalisch sinnvolle Form einer Tryptophanbande resultierte, ohne deren Maximum zu verschieben. Die daraus resultierenden Fluoreszenzspektren wurden mittels gleitenden Durchschnitts mit 5 Datenpunkten geglättet (siehe Abbildung 4.68). Es erfolgte dann eine Flächennormierung bei Wellenlängen von 320 bis 450 nm. Zur weiteren Analyse wurden die Intensitäten bei $\lambda = 380 \text{ nm}$ um den Druckeffekt auf das Fluoreszenzspektrum von NATA durch Subtraktion korrigiert. Die daraus resultierenden Intensitäten wurden als Funktion des Drucks aufgetragen. Diese Messungen wurden ebenfalls in Gegenwart von unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen von 3, 6 und 8 M durchgeführt.

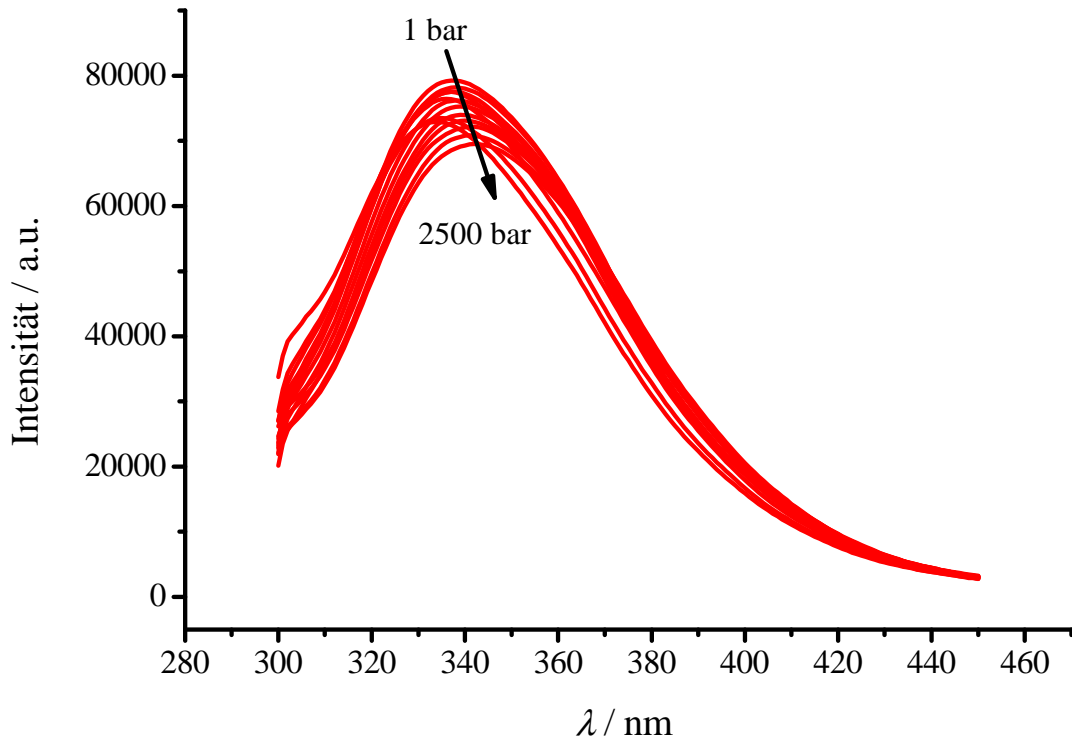


Abbildung 4.68. Untergrundkorrigierte und geglättete Fluoreszenzspektren von adsorbiertem Lysozym auf Ludox AM bei Drücken von 1 bis 2500 bar ($c(\text{Lys}) = 0.1 \text{ mg/mL}$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, Verhältnis Ludox AM : Lysozym 1:11 (v/v)).

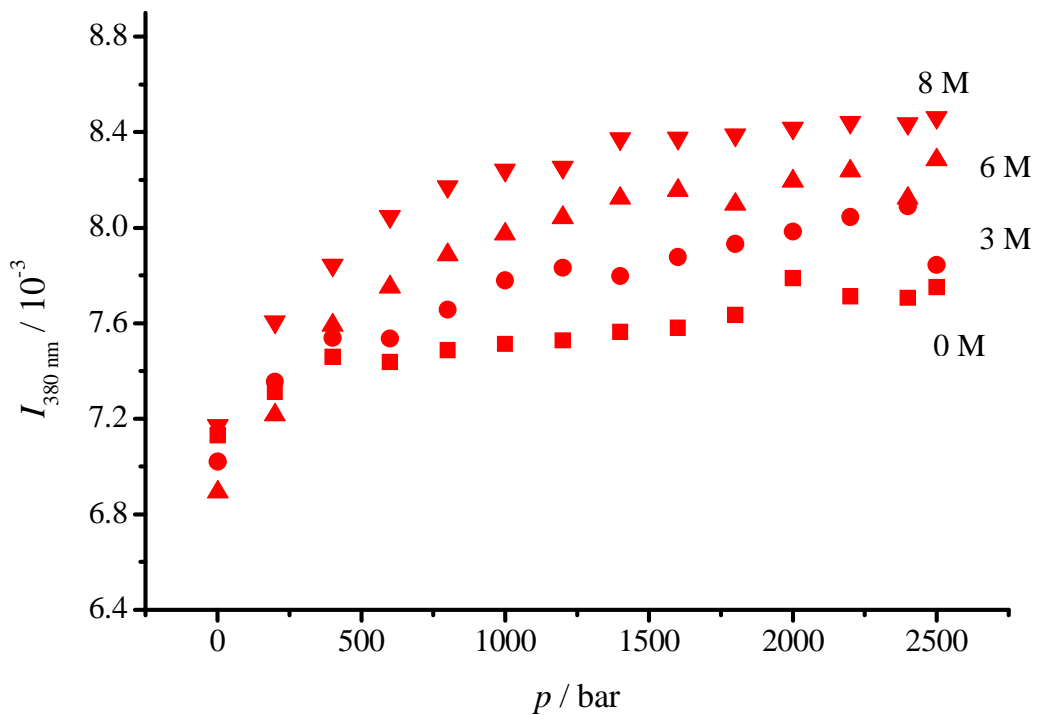


Abbildung 4.69. Normierte Fluoreszenzintensität bei 380 nm von adsorbiertem Lysozym bei pH 7 und unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen von 0, 3, 6 und 8 M ($c(\text{Lys}) = 0.1 \text{ mg/mL}$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, Verhältnis Ludox AM : Lysozym 1:11 (v/v)).

In Abbildung 4.69 ist zu erkennen, dass die Intensitäten des adsorbierten Lysozyms im Vergleich zum gelösten bei gleichem Druck und gleicher Harnstoffkonzentration höher sind (vgl. Abbildung 4.65), was auf eine stärkere Solvataion der Tryptophanreste und somit auf einen höheren Denaturierungsgrad schließen lässt. Zur Berechnung der Volumenänderungen des adsorbierten Lysozyms dienen die in Lösung gemessenen Plateauwerte. Es ist zu erkennen, dass je nach Harnstoffkonzentration die Intensitäten bei Drücken von bis ca. 500 bar eine relativ große Änderung aufweisen, wohingegen mit erhöhtem Druck geringere Steigungen vorliegen. Vermutlich erfolgt eine Konformationsänderung zu einem Zwischenzustand bereits bei relativ geringen Drücken und anschließend erfolgt ein weiterer Entfaltungsvorgang unter Anwendung hoher Drücke in Gegenwart von Cosolventien. Dementsprechend wurden zur Bestimmung der Entfaltungsvolumina nur diejenigen Bereiche berücksichtigt, bei denen die anfängliche hohe Steigung nicht mehr vorhanden ist.

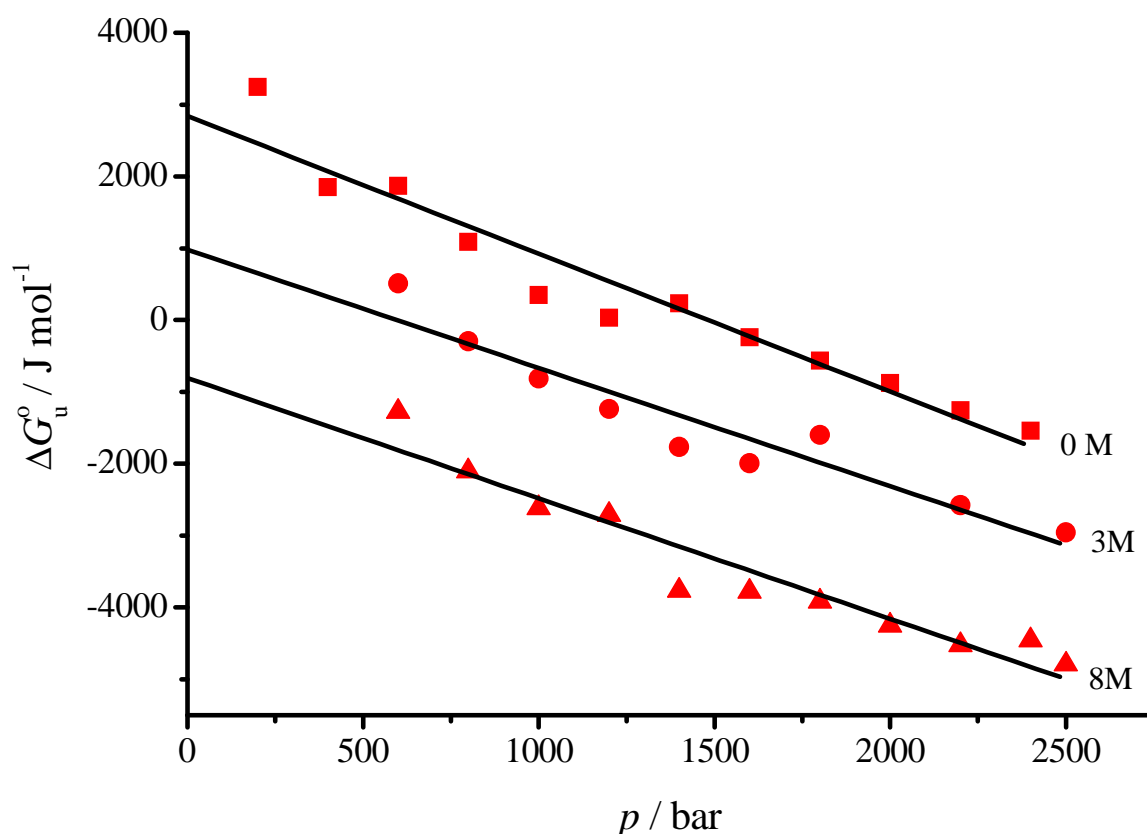


Abbildung 4.70. Die Standard-Entfaltungs-Gibbsenergien von Lysozym, adsorbiert auf Ludox AM, sinken erwartungsgemäß mit steigender Harnstoffkonzentration von 0, 3 und 8 M bei konstantem Druck. Die Steigungen der Ausgleichsgeraden werden nicht durch die Zugabe von Harnstoff beeinflusst ($c(\text{Lys}) = 0.1 \text{ mg/mL}$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, Verhältnis Ludox AM : Lysozym 1:11 (v/v)).

Wie in Abbildung 4.70 zu erkennen ist, sinkt die Standard-Entfaltungs-Gibbsenergie von adsorbiertem Lysozym mit steigender Harnstoffkonzentration, wohingegen sich die Steigungen nicht ändern. Das bedeutet, dass Harnstoff, wie auch im Falle der SNase, keine Auswirkung auf die Volumenänderung von adsorbiertem Lysozym zeigt. In Tabelle 4.16 sind alle wesentlichen Parameter ΔV_u , ΔG_u° und p_u von Lysozym sowohl im gelösten als auch im adsorbierten Zustand dargestellt. Für Lysozym in Lösung liegt ein mittleres Entfaltungsvolumen von $-49 \pm 6 \text{ mL mol}^{-1}$ vor, was mit den Literaturdaten, welche bei Werten zwischen 50 und 60 mL mol^{-1} liegen, gut übereinstimmt.¹⁷⁴ Im adsorbierten Zustand weist Lysozym ein mittleres Entfaltungsvolumen von nur -18 mL mol^{-1} auf.

Tabelle 4.16. ΔV_u , ΔG_u° und p_u des adsorbierten und gelösten Lysozyms in Gegenwart von unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen.

| Lysozym | $\Delta V_u / (\text{mL} \cdot \text{mol}^{-1})$ | $\Delta G_u^\circ / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$ | p_u / kbar |
|--|--|--|---------------------|
| in H ₂ O; pH 7; 3 M Harnstoff | -56 ± 2 | 11 ± 0.7 | 1.94 |
| in H ₂ O; pH 7; 6 M Harnstoff | -42 ± 3 | 4.8 ± 0.2 | 1.13 |
| mittleres Entfaltungsvolumen | -49 ± 6 | | |
| adsorbiert auf Ludox AM; pH 7; 3 M Harnstoff | -19 ± 2 | 2.8 ± 0.2 | 1.48 |
| adsorbiert auf Ludox AM; pH 7; 6 M Harnstoff | -17 ± 1 | 0.9 ± 0.3 | 0.59 |
| adsorbiert auf Ludox AM; pH 7; 8 M Harnstoff | -17 ± 2 | -0.8 ± 0.2 | ---- |
| mittleres Entfaltungsvolumen | -18 ± 3 | | |
| resultierendes Adsorptionsvolumen | -31 ± 5 | | |

Im Allgemeinen liegt für Lysozym ein vergleichbares Verhalten wie bei SNase vor. Im adsorbierten Zustand wird das Entfaltungsvolumen aufgrund der partiellen Denaturierung im Zuge des Adsorptionsprozesses stark verringert. Auch in diesem Fall lässt sich, unter den in Punkt 1.4.1 beschriebenen Annahmen, die Volumenänderung durch den Adsorptionsprozess mit einem Wert von -31 mL mol^{-1} bestimmen.

4.2.8 Effekt des pH-Wertes auf die druckabhängige Entfaltung von adsorbiertem Lysozym

Der Einfluss des pH-Wertes auf die druckabhängige Volumenänderung von gelöstem und adsorbiertem Lysozym wurde ebenfalls untersucht. Im Falle von Lysozym in Lösung lag eine Konzentration von 0.1 mg/mL vor. Fluoreszenzspektren wurden bei pH 7, 8.5 und 9.6 und bei einer Temperatur von 25 °C aufgenommen. Die Messungen wurden analog zu denjenigen in Punkt 4.2.7 beschriebenen, durchgeführt. In Abbildung 4.71 sind die normierten Intensitäten von Lysozym in Lösung als Funktion des Drucks aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass keine Änderung der Intensität bei verändertem pH-Wert erfolgt.

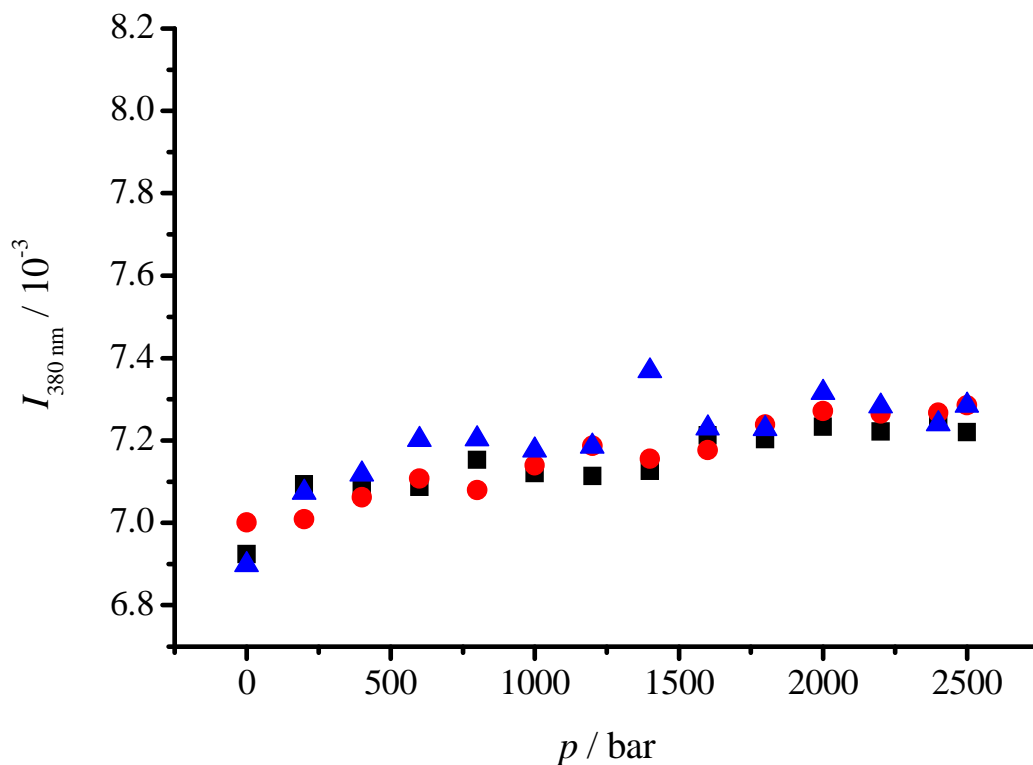


Abbildung 4.71. Normierte Fluoreszenzintensität bei 380 nm von gelöstem Lysozym bei pH 7, 8.5 und 9.6 im Druckbereich von 1 bis 2500 bar. Die Konzentration von Lysozym lag bei $c(\text{Lys}) = 0.1 \text{ mg/mL}$. Messungen wurden bei $T = 25 \text{ °C}$ durchgeführt. Es liegt kein Effekt des pH-Wertes auf die Druckdenaturierung von Lysozym in Lösung vor (■ Lysozym in Lösung bei pH 7; ● pH 8.5; ▲ pH 9.6).

Weiterhin wurden die Fluoreszenzspektren des adsorbierten Lysozyms bei einer Konzentration von 0.1 mg/mL in Gegenwart von Ludox AM im Verhältnis von 11:1 (v/v) bei unterschiedlichen pH-Werten von 7, 8.5 und 9.6 gemessen. Die resultierenden Spektren

wurden aufgrund der Lichtstreuung der Nanopartikel untergrundkorrigiert und auf die jeweiligen Flächen, analog zu Punkt 4.2.7, normiert. In Abbildung 4.72 sind die normierten Intensitäten bei einer Wellenlänge von 380 nm als Funktion des Drucks für adsorbiertes Lysozym dargestellt.

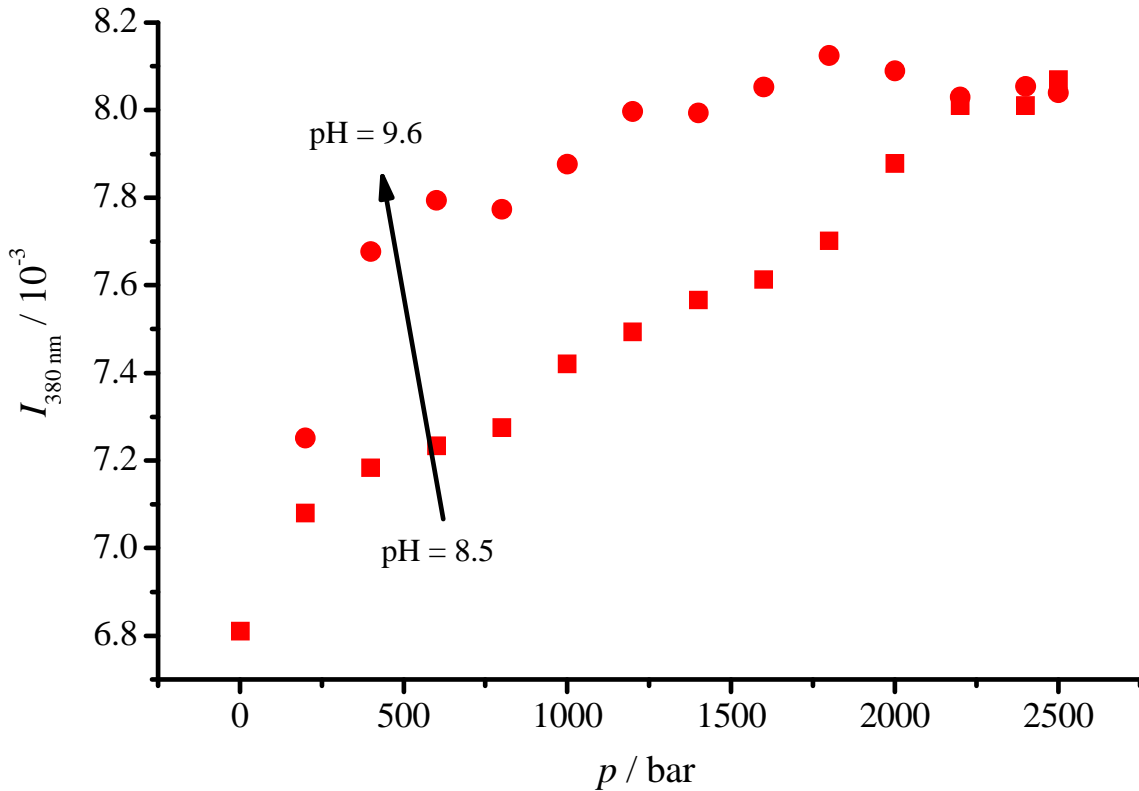


Abbildung 4.72. Normierte Fluoreszenzintensität bei 380 nm von adsorbiertem Lysozym auf Ludox AM bei pH 7, 8.5 und 9.6. Die Konzentration betrug $c(\text{Lys}) = 0.1 \text{ mg/mL}$ und das Verhältnis von Ludox AM : Lys lag bei 1:11 (v/v)). Messungen wurden bei $T = 25 \text{ °C}$ durchgeführt. Der pH-Wert weist einen großen Effekt auf die Struktur von adsorbiertem Lysozym auf (■ bei pH = 8.5; ● bei pH = 9.6).

Im Falle des adsorbierten Lysozyms ist eine deutliche Änderung in den Intensitäten bei konstanten Drücken zu erkennen. Wie auch bei der SNase liegt eine relativ große Rotverschiebung bei höherem pH-Wert vor.

Die aus den Messungen ermittelten Volumenänderungen sind in Tabelle 4.17 aufgeführt. Im Falle von pH = 8.5 bzw. 9.6 liegen bei adsorbiertem Lysozym gleiche Volumenänderungen durch Druckdenaturierung vor.

Tabelle 4.17. Druckinduzierte Änderung der molaren Volumina von adsorbiertem Lysozym auf Ludox AM bei pH 8.5 und 9.6.

| Lysozym | $\Delta V_u / (\text{mL} \cdot \text{mol}^{-1})$ | $\Delta G_u^\circ / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$ | p_u / kbar |
|---------------------------------|--|--|---------------------|
| adsorbiert auf Ludox AM; pH 8.5 | -19 ± 1 | 4.7 ± 0.2 | 2.46 |
| adsorbiert auf Ludox AM; pH 9.6 | -19 ± 2 | 1.6 ± 0.2 | 0.86 |

Dieses Ergebnis zeigt, dass auch im Falle von Lysozym eine geringe Oberflächenladung zu einer Destabilisierung der Proteinstruktur im adsorbierten Zustand führt, da mit steigendem pH-Wert die Standard-Entfaltungs-Gibbsenergie abnimmt. Jedoch hat der Ladungszustand keinen Einfluss auf die Volumenänderung von adsorbiertem Lysozym, so dass gesagt werden kann, dass die Elektrostriktion nur einen nicht signifikanten Beitrag zur Volumenänderung liefert. Die Volumenänderung liegt in beiden Fällen bei einem Wert von -19 mL mol^{-1} .

4.2.9 Schlussfolgerung aus der Bestimmung von Volumenänderung adsorbierter Proteine

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die druckinduzierte Entfaltung adsorbierter Proteine anhand von SNase und Lysozym untersucht. Durch die Verwendung unterschiedlicher Silicapartikel als Substrat konnten starke Effekte an der Silicium-Wasser-Grenzfläche auf die Thermodynamik der Proteinentfaltung nachgewiesen werden. An der Grenzfläche werden die Volumenänderung, die Standard-Entfaltungs-Gibbsenergie und der Entfaltungsdruck reduziert. Die erhaltenen Daten sind konsistent in Hinblick darauf, dass Packungseffekte und die Eliminierung von Defektvolumina den Hauptbeitrag zur Volumenänderung ΔV_u liefern. Es wird angenommen, dass der Unterschied der Volumenänderungen $\Delta V_{u,\text{sol}}$ und $\Delta V_{u,\text{ads}}$, welche in Lösung bzw. im adsorbierten Zustand gemessen wurden, die Volumenänderung ΔV_{ads} beim Adsorptionsprozess darstellt. Diese Volumenänderung ist negativ, was bedeutet, dass Wassermoleküle in die partiell entfaltenen Proteine im adsorbierten Zustand eindringen und dadurch einen signifikanten Anteil der Defektvolumina, die im nativen Zustand auftreten, füllen. Diese Ergebnisse führen zu der Erkenntnis, dass Proteine im adsorbierten Zustand partiell entfaltet vorliegen.

4.3 Hochdruck-TIRF-Spektroskopie zur Bestimmung des Adsorptionsgrades und des Adsorptionsvolumens eines Proteins

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hochdruck-TIRF-Spektroskopie für den Kilobar-Bereich etabliert. Hierfür wurde eine Hochdruckzelle mit einer druckübertragenden, nach außen abgeschlossenen Probenküvette modifiziert, die auf einem Quarzprisma als internes Reflexionselement basiert (siehe Kapitel 2.5.4). Die im Folgenden beschriebenen Testmessungen mit Lipiden sowie die Konstruktion der Hochdruck-TIRF-Zelle wurden bereits veröffentlicht. (siehe Referenz 156)

4.3.1 Testmessungen mit der Hochdruck-TIRF-Zelle anhand des druckabhängigen Phasenverhaltens von DOPC

Es wurden zwei unterschiedliche Lipidmembranen an der Quarz-Wasser-Grenzfläche durch Spreiten der Lipidlösung in Chloroform auf dem Quarzprisma der Probenküvette immobilisiert.

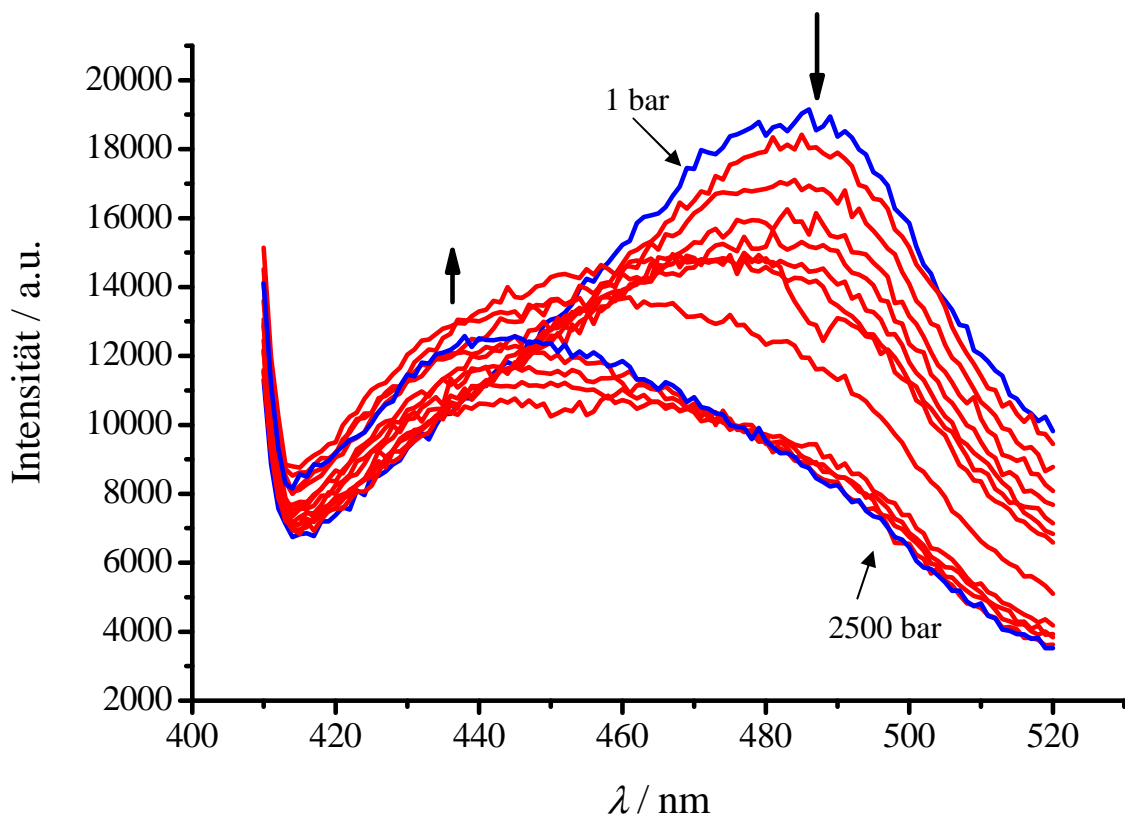


Abbildung 4.73. Fluoreszenzspektren von Laurdan in DOPC im Druckbereich von 1 bis 2500 bar. Das spektrale Maximum verschiebt sich von 490 nm zu 440 nm.

Im Falle von DOPC in Gegenwart von Laurdan liegt bei einem steigenden Druck eine Abnahme der Fluoreszenzintensität bei 490 nm vor, welche aus der anwachsenden hydrophoben Umgebung des Laurdans hervorgeht.

Aus den Intensitäten bei 440 nm und 490 nm lässt sich der GP-Wert bilden (siehe Punkt 2.2.4). In Abbildung 4.74 sind die GP-Werte als Funktion des Drucks aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass mit steigendem Druck ein Anstieg des GP-Werts resultiert.

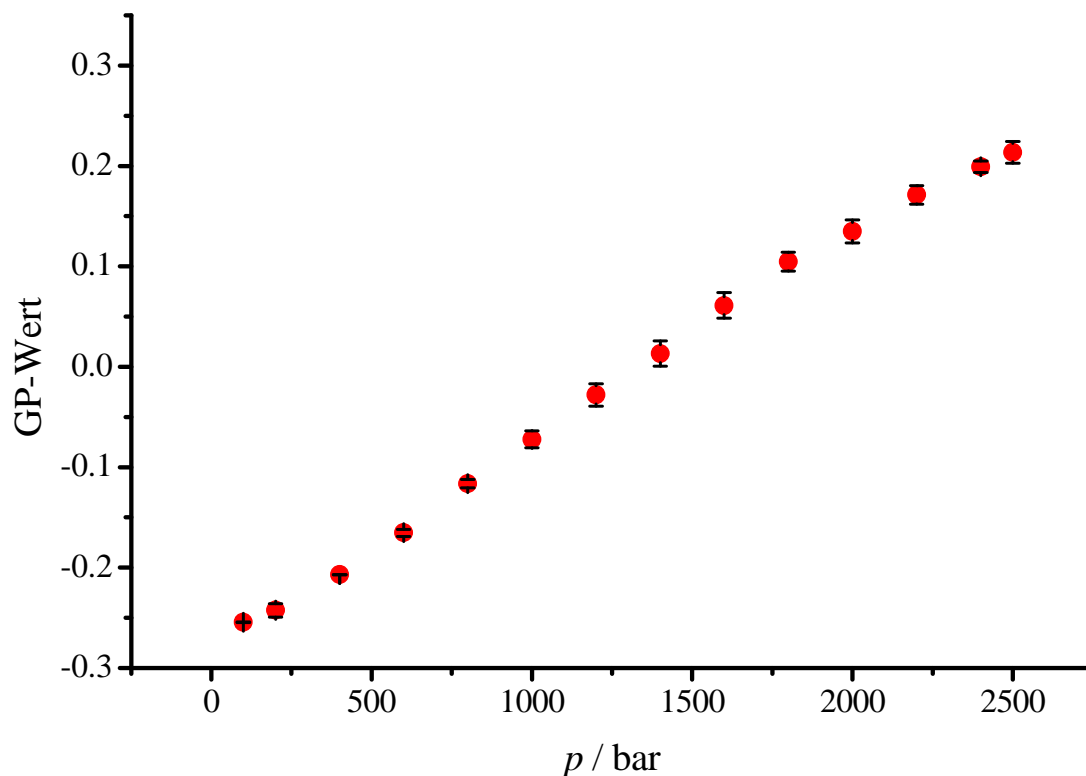


Abbildung 4.74. GP-Wert von Laurdan in DOPC. Mit steigendem Druck steigt der GP-Wert aufgrund der steigenden Packungsdichte der Lipide.

Obwohl DOPC über den gesamten Druckbereich bei 25 °C in der fluiden Phase vorliegt,⁶² zeigen die GP-Werte (siehe Abbildung 4.74) einen deutlichen druckinduzierten Anstieg der Packungsdichte und eine damit verknüpfte Reduktion des Wassergehalts in der Lipiddoppelschicht.

4.3.2 Testmessungen mit der Hochdruck-TIRF-Zelle anhand des druckabhängigen Phasenverhaltens von DOPC/DPPC/Cholesterin (1:2:1)

Weiterhin wurde eine realistischere Modellbiomembran aus DOPC/DPPC/Cholesterin (1:2:1) untersucht. Solche Lipidmischungen werden als Raftmischungen betrachtet und ähneln der heterogenen Struktur und Dynamik von natürlichen Zellmembranen. Das komplexe Phasendiagramm von DOPC/DPPC/Cholesterin (1:2:1), welches aus der Röntgenstreuung und der FTIR-Spektroskopie hervorgeht,¹⁷⁹ ist in Abbildung 4.75 gezeigt.

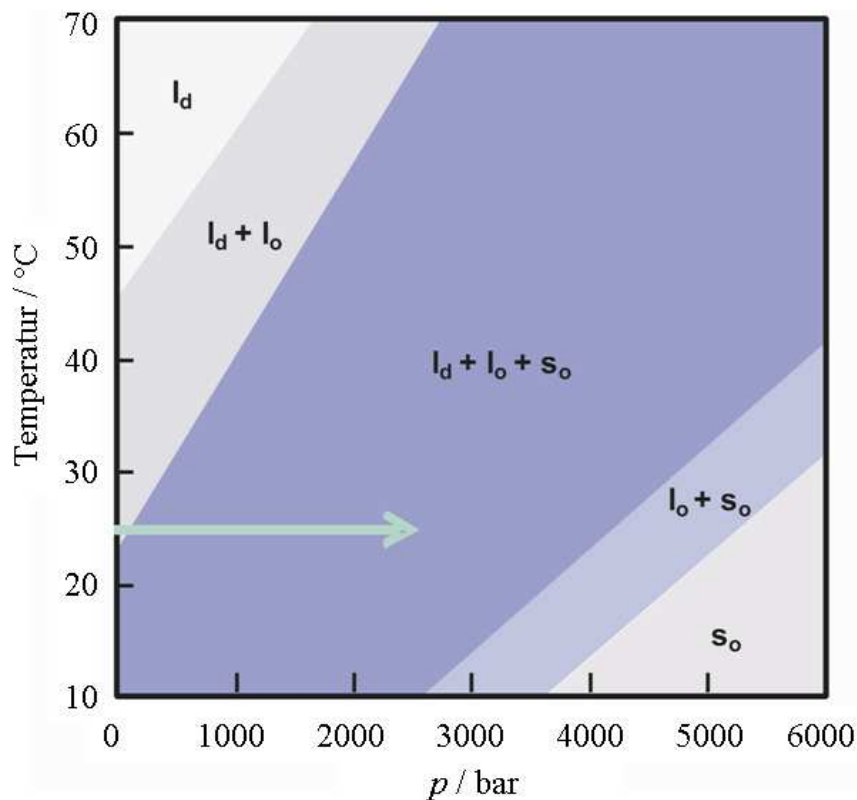


Abbildung 4.75. T,p -Phasendiagramm von DOPC:DPPC:Cholesterin (1:2:1) aus Referenz 179.

Es liegen zwei fluide Phasen l_d und l_o vor, welche sich in der konformellen Anordnung der Lipidketten unterscheiden, sowie eine Gelphase, s_o . Mit Hilfe der Hochdruck-TIRF-Spektroskopie wurde der GP-Wert von Laurdan in einer immobilisierten DOPC/DPPC/Cholesterin (1:2:1)-Modellmembran untersucht (siehe Abbildung 4.76). Mit steigendem Druck wird bei 25 °C die Dreiphasenregion $l_d + l_o + s_o$ durchquert (Pfeil in Abbildung 4.75). Mit steigendem Abstand von dem $(l_d + l_o)$ -Phasengebiet nimmt der Anteil der Lipidmoleküle, welche die l_d -Phase bilden, ab, da Druck die konformelle Unordnung der Lipidketten reduziert. Das zeigt sich auch in den GP-Werten im Druckbereich bis 2500 bar.

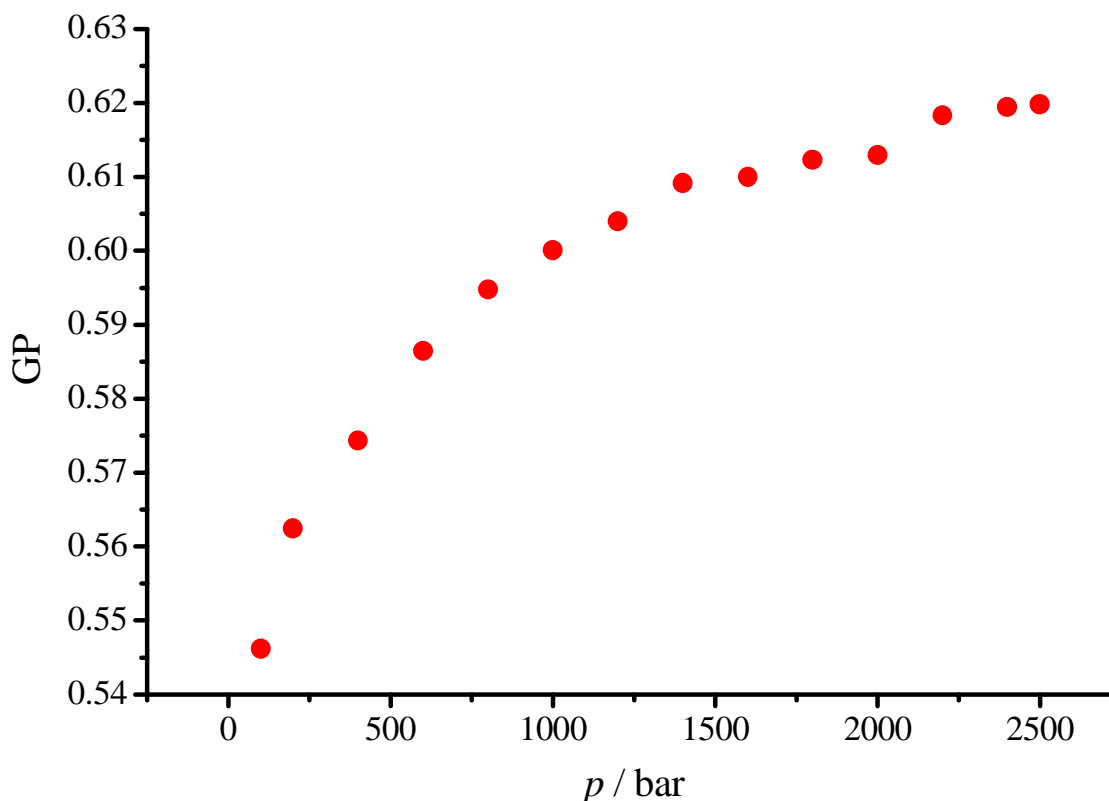


Abbildung 4.76. Mit steigendem Druck steigen die GP-Werte aufgrund der dichteren Packungsdichte der Lipide und die damit einhergehende Reduktion der eingelagerten Wassermoleküle.

4.3.3 Druckeffekt auf Alexa Fluor 488 in Lösung

Zur Untersuchung des druckabhängigen Adsorptionsgrades und des Adsorptionsvolumens von mit Alexa Fluor 488 markiertem Lysozym mit Hilfe der Hochdruck-TIRF-Spektroskopie wurde zunächst der intrinsische Druckeffekt auf Alexa Fluor 488 zur Korrektur aller folgenden Untersuchungen gemessen. In Abbildung 4.77 sind eine allgemeine Abnahme der Intensität und eine Rotverschiebung der spektralen Maxima mit steigendem Druck zu erkennen. Die Rotverschiebung erfolgt aufgrund der erhöhten Dielektrizitätskonstante des Wassers mit erhöhtem Druck. Die Flächen unter den jeweiligen Spektren wurden anschließend bestimmt. Alle Flächen wurden auf diejenige bei 1 bar normiert und als Funktion des Drucks aufgetragen (siehe Abbildung 4.78). Mit steigendem Druck erfolgt eine Abnahme der Fläche um ca. 4 % pro 1000 bar.

4.3 Hochdruck-TIRF-Spektroskopie zur Bestimmung des Adsorptionsgrades und des Adsorptionsvolumens eines Proteines

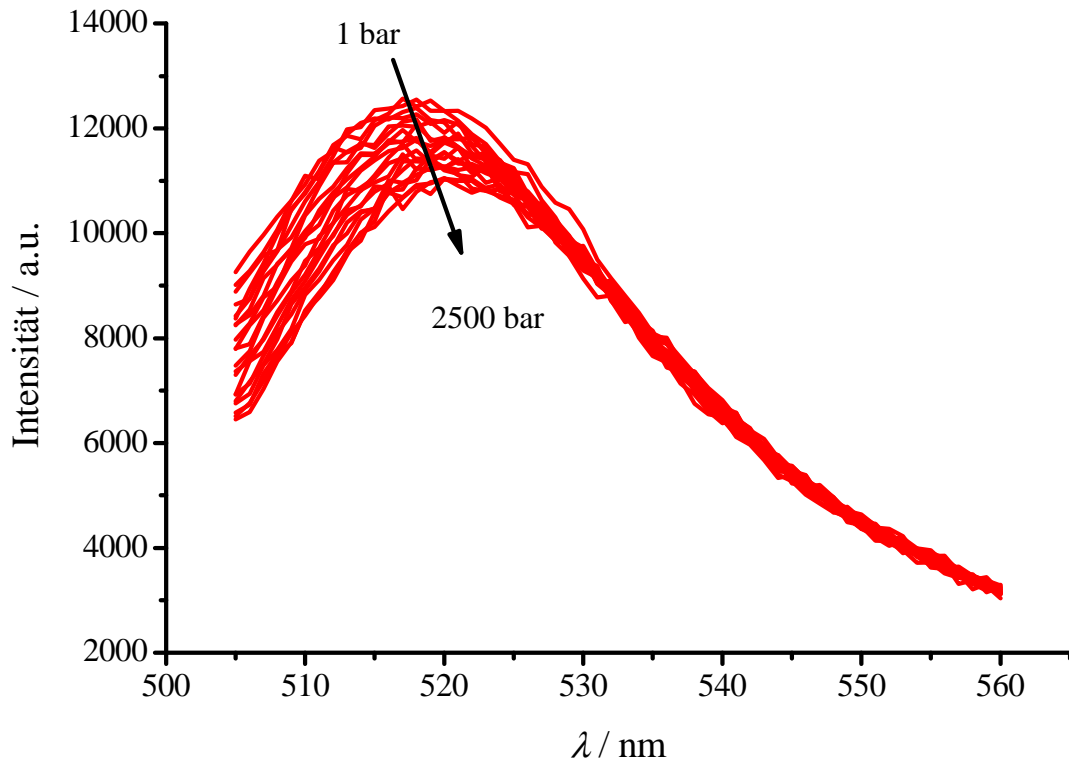


Abbildung 4.77. Fluoreszenzspektren von Alexa Fluor 488 im Druckbereich von 1 bar bis 2500 bar aufgenommen mittels konventioneller Hochdruck-Fluoreszenzspektroskopie. Die Konzentration beträgt 20 nM. Mit steigendem Druck erfolgt eine allgemeine Abnahme der Intensitäten und eine Rotverschiebung der Maxima der Spektren.

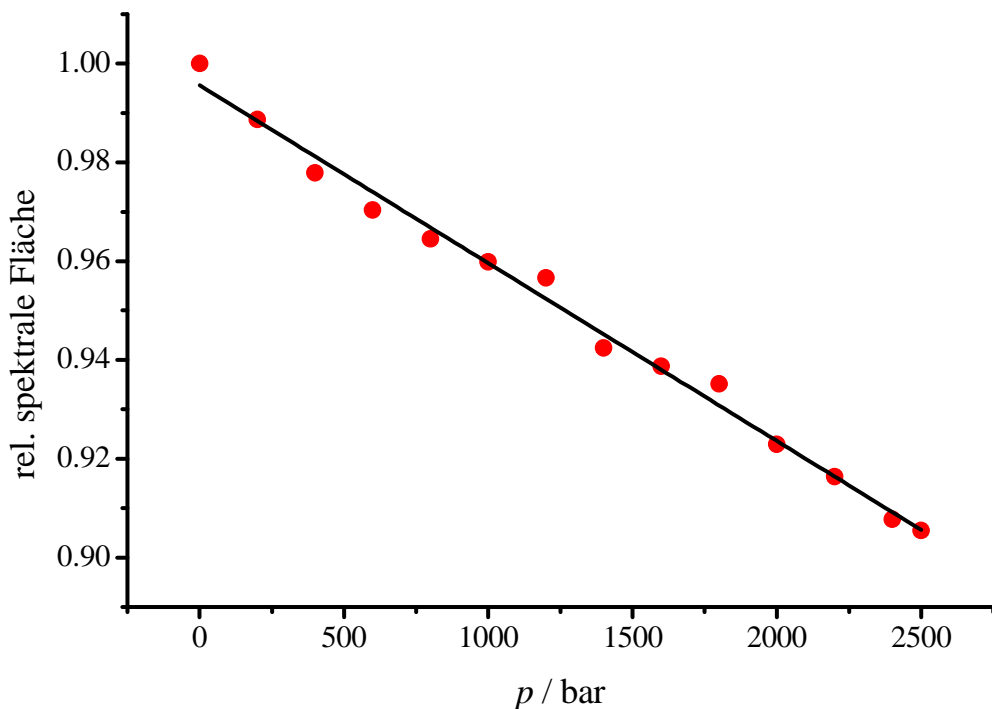


Abbildung 4.78. Fläche unter den Fluoreszenzspektren von Alexa Fluor 488 bei Drücken von 1 bis 2500 bar (siehe Abbildung 4.77). Diese Werte dienen zur Korrektur aller druckabhängigen TIRF-Spektroskopiemessungen mit Alexa Fluor 488.

Dieser Wert dient zur Korrektur für alle folgenden Hochdruck-TIRF-Messungen mit Alexa Fluor 488.

4.3.4 Untersuchung des Druckeffekts auf adsorbiertes Lysozym

Zur Untersuchung des Druckeffekts auf eine Monolage aus Lysozym, welches zuvor mit Alexa Fluor 488 markiert wurde, erfolgten Messungen, wie in Punkt 3.2.7.2 beschrieben. Diese Messungen wurden mit einem Markierungsgrad von 1:500 durchgeführt. In Abbildung 4.79 zeigt sich keine druckinduzierte Änderung der Flächen unter den Fluoreszenzspektren, welche den relativen Adsorptionsgrad repräsentieren. Daraus resultiert, dass keine Desorption der Proteinschicht bei erhöhten Drücken erfolgt. Die vorliegenden Daten wurden durch die Division der relativen Fluoreszenzintensität von Alexa Fluor 488 bei entsprechenden Drücken korrigiert. Eine Photobleichung erfolgt nur im nicht signifikanten Maße, da keine druckabhängige Intensitätsänderung zu sehen ist. Die schwarzen Punkte stellen die Flächen unter den Spektren bei einer Druckerhöhung dar, die roten bei der Druckerniedrigung. Es ist zu sehen, dass nach der Druckerniedrigung offenbar keine Änderung des relativen Adsorptionsgrads vorliegt. Diese Messungen wurden mit einem höheren Markierungsgrad wiederholt, um ein größeres Signal-Rausch-Verhältnis zu erlangen. In Abbildung 4.80 ist zu erkennen, dass mit sinkendem Druck (rote Punkte) eine Abnahme der Flächen unter den TIRF-spektren zu erkennen ist. Eine Photobleichung wurde durch die Aufnahme der Intensität bei einer konstanten Wellenlänge über einen Zeitraum von 30 Minuten bei kontinuierlicher Bestrahlung untersucht (Daten nicht gezeigt). Da die Intensität über diesen Zeitraum nicht absank liegt vermutlich keine Photobleichung vor, so dass die Intensitätsabnahme durch Desorption oder Resonanzenergietransfer verursacht sein könnte

4.3 Hochdruck-TIRF-Spektroskopie zur Bestimmung des Adsorptionsgrades und des Adsorptionsvolumens eines Proteines

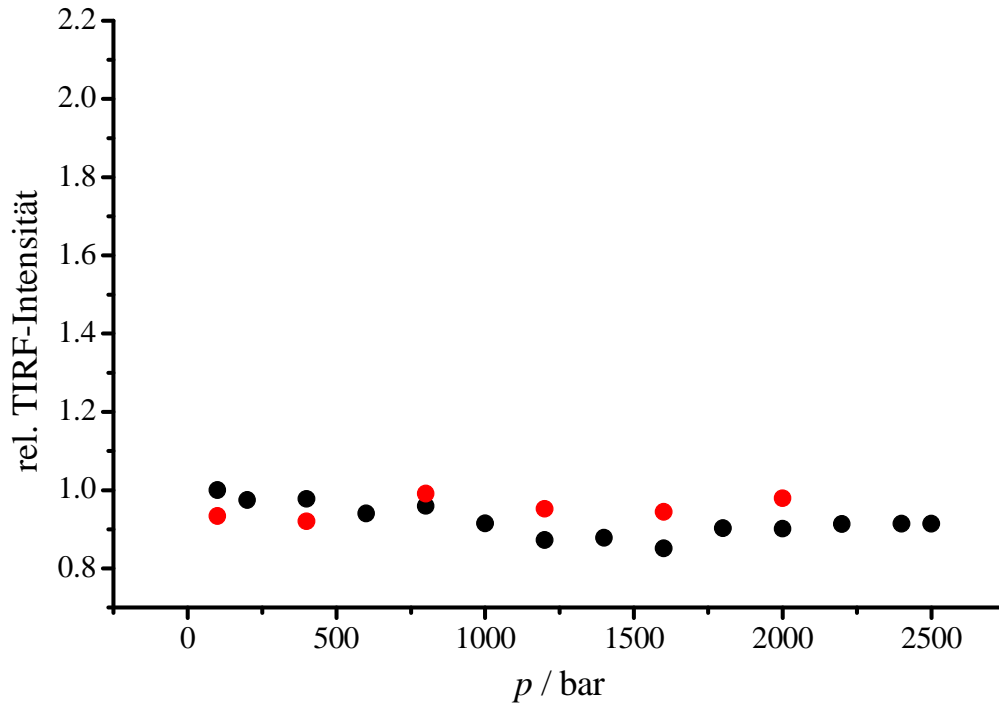


Abbildung 4.79. Lysozym_{Alexa} (Markierungsgrad $l = 1:500$) wurde für 15 min adsorbiert. Die Probenkammer wurde anschließend mit 10 mM Bistris-Puffer gespült und befüllt, so dass kein Protein in Lösung vorhanden war. Der Druckeffekt auf Alexa Fluor 488 wurde berücksichtigt (● nach Druckerhöhung; ● nach Druckerniedrigung).

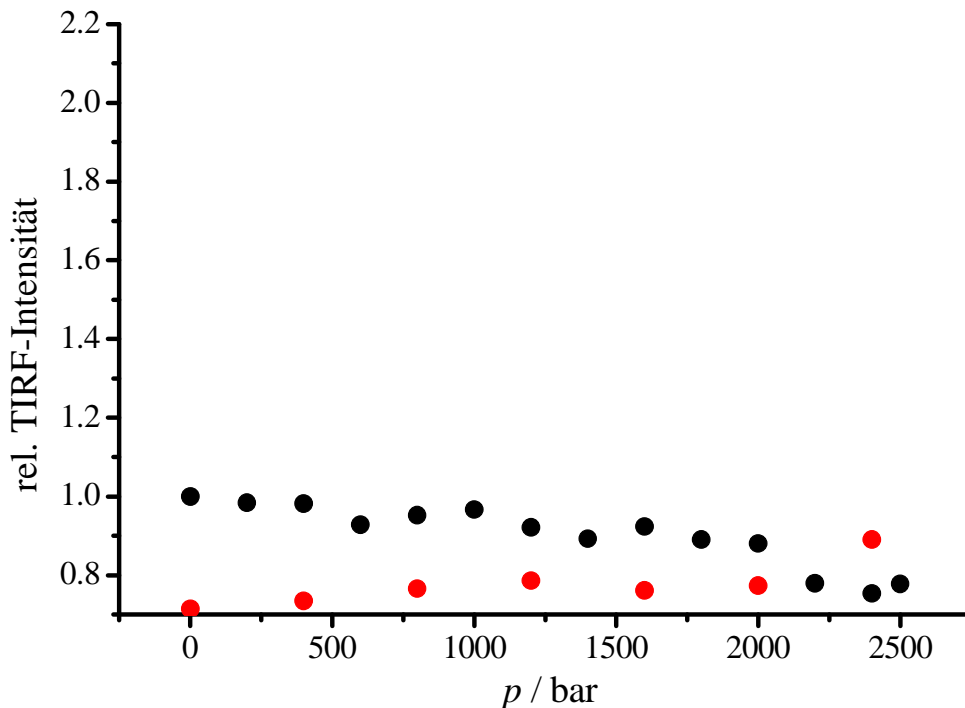


Abbildung 4.80. Lysozym_{Alexa} (Markierungsgrad $l = 1:300$) wurde für 15 min adsorbiert. Die Probenkammer wurde anschließend mit 10mM Bistris-Puffer gespült und befüllt, so dass kein Protein in Lösung vorhanden war. Der Druckeffekt auf Alexa Fluor 488 wurde berücksichtigt (● nach Druckerhöhung; ● nach Druckerniedrigung).

4.3.5 Druckabhängiger Adsorptionsgrad von Lysozym

Für weitere Messungen wurde mit Alexa Fluor 488 markiertes Lysozym mit einem Markierungsgrad von 1:500 verwendet. Mittels der Hochdruck-TIRF-Spektroskopie kann der relative Adsorptionsgrad sowie das ungefähre Adsorptionsvolumen eines Proteins bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde nicht wie bei den vorherigen Versuchen die Lysozymlösung nach dem Adsorptionsprozess weggespült, sondern in der Probenkammer beibehalten, so dass sich ein Adsorptionsgleichgewicht bei den jeweiligen Drücken einstellen konnte. Aus den Messungen resultieren Fluoreszenzspektren mit einem relativ hohen Signal-Rausch-Verhältnis. Die Anregungswellenlänge lag bei 480 nm, und die Fluoreszenzspektren wurden im Bereich von 505 nm bis 560 nm aufgenommen. In Abbildung 4.81 ist zu erkennen, dass mit steigendem Druck eine Rotverschiebung und ein Anstieg der spektralen Intensität erfolgen.

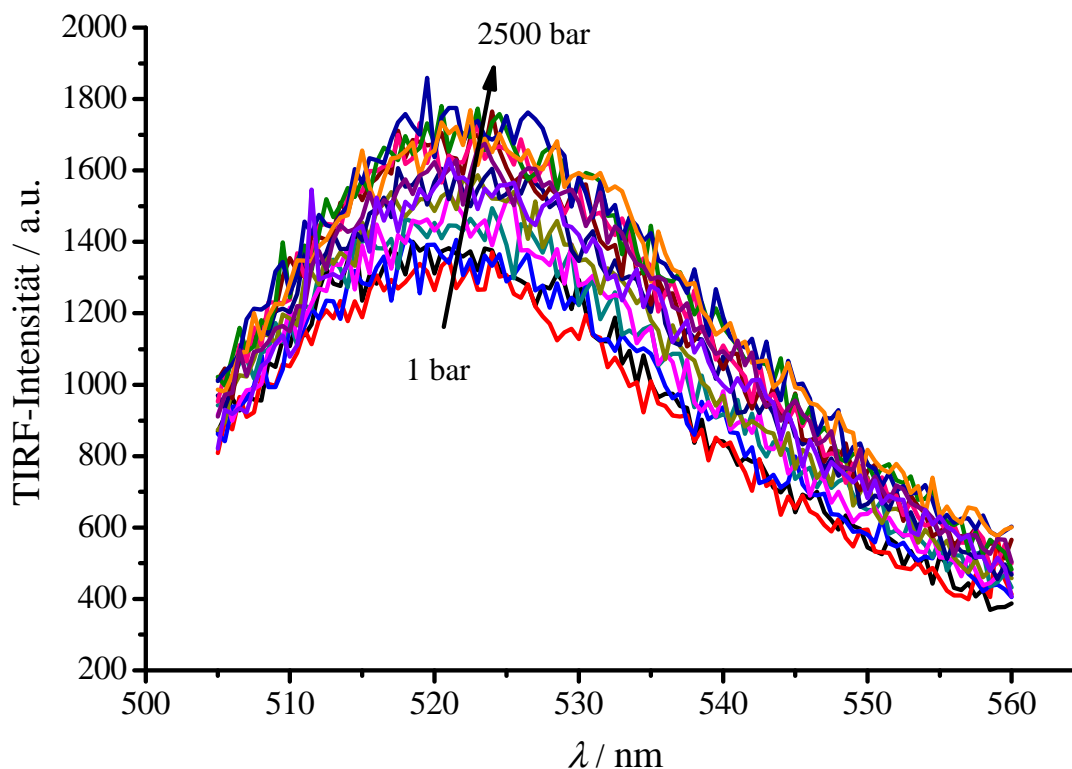


Abbildung 4.81. Fluoreszenzspektren des an Lysozym gebundenen Alexa Fluor 488 wurden in einer Hochdruck-TIRF-Zelle in 10 mM Bistris Puffer bei pH = 7 gemessen. Die Anregungswellenlänge lag bei 480 nm. Ein Anstieg der Intensitäten sowie eine Rotverschiebung mit steigendem Druck sind zu erkennen.

Die Flächen unter den jeweiligen Spektren wurden bestimmt und als Funktion des Drucks aufgetragen. In Abbildung 4.82 wurde der Mittelwert aus zwei Messungen mit der

4.3 Hochdruck-TIRF-Spektroskopie zur Bestimmung des Adsorptionsgrades und des Adsorptionsvolumens eines Proteines

Hochdruckzelle gebildet. Nur bei erhöhten Drücken liegen größere Abweichungen vom Mittelwert im Bereich von ca. $\pm 6\%$ vor.

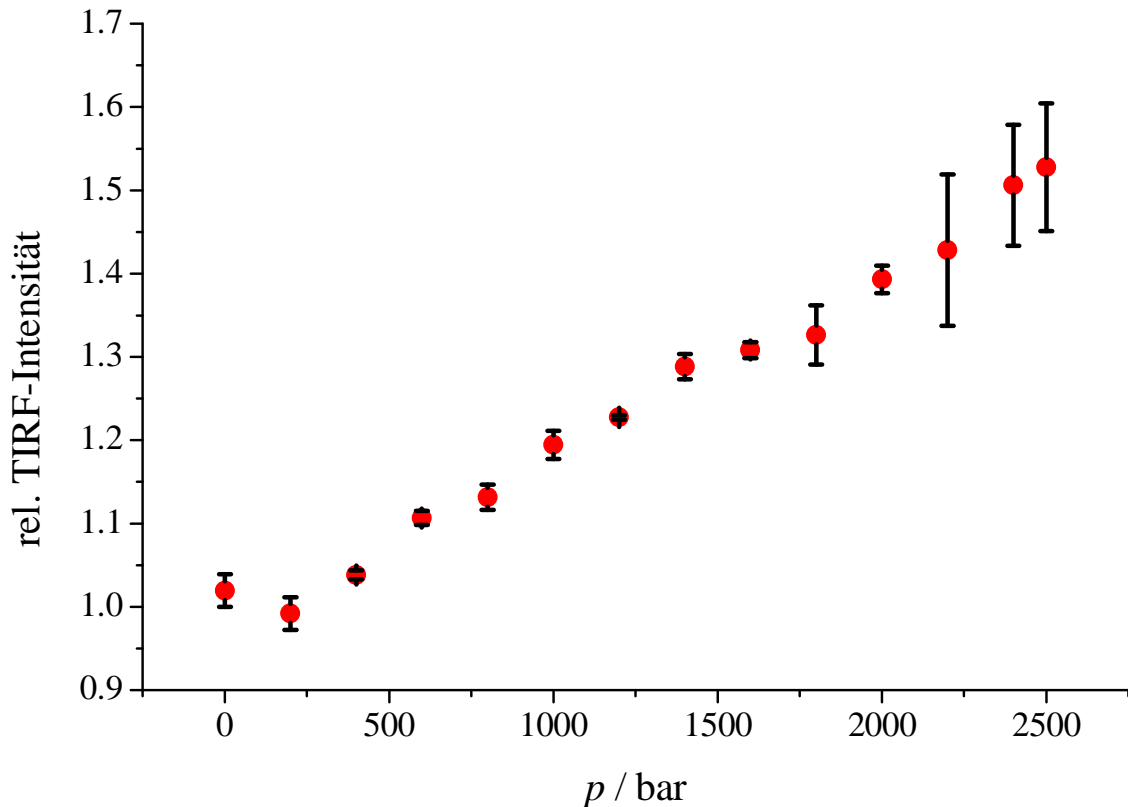


Abbildung 4.82. LyS_{Alexa} mit einer Konzentration von 0.1 mg/mL (Markierungsgrad $l = 1:500$) wurde in 10 mM Bistris-Puffer bei pH 7 in der Hochdruck-TIRF-Zelle auf Quarz adsorbiert. Zwischen jedem aufgenommenen Spektrum wurde eine Äquilibrationszeit von mindestens 20 min eingehalten (Mittelwerte aus 2 Messreihen).

Mit steigendem Druck ist eine lineare Zunahme des relativen Adsorptionsgrads zu sehen. Bei einem Druck von 2500 bar liegt ein 1.52-fach höherer Wert vor als in Bezug auf derjenigen bei 1 bar. Der Druckeffekt auf Alexa Fluor 488 wurde dabei berücksichtigt.

4.3.6 Adsorptionsvolumen und druckabhängiger Adsorptionsgrad von Lysozym in Gegenwart von Harnstoff oder Glycerin

Weiterhin wurde der Einfluss von Cosolventien wie Harnstoff und Glycerin auf den Adsorptionsgrad von Lysozym unter hohen Drücken untersucht. Im Fall von Harnstoff zeigt sich bei Konzentrationen von 1 bis 3 M keine große Änderung der TIRF-Bandenintensitäten in

Bezug auf die Messreihe ohne Harnstoffzusatz. Durch die Zugabe von Harnstoff wird allgemein der Adsorptionsgrad von Proteinen erniedrigt, auch wenn eine Erniedrigung der Freien-Standard-Entfaltung-Gibbsenergie erfolgt. Bei höheren Konzentrationen von Harnstoff zeigt sich eine starke Reduktion des Adsorptionsgrades von Lysozym (siehe Abbildung 4.83). Bei den dargestellten Kurven handelt es sich um gemittelte Werte aus jeweils 2 bis 3 Messreihen.

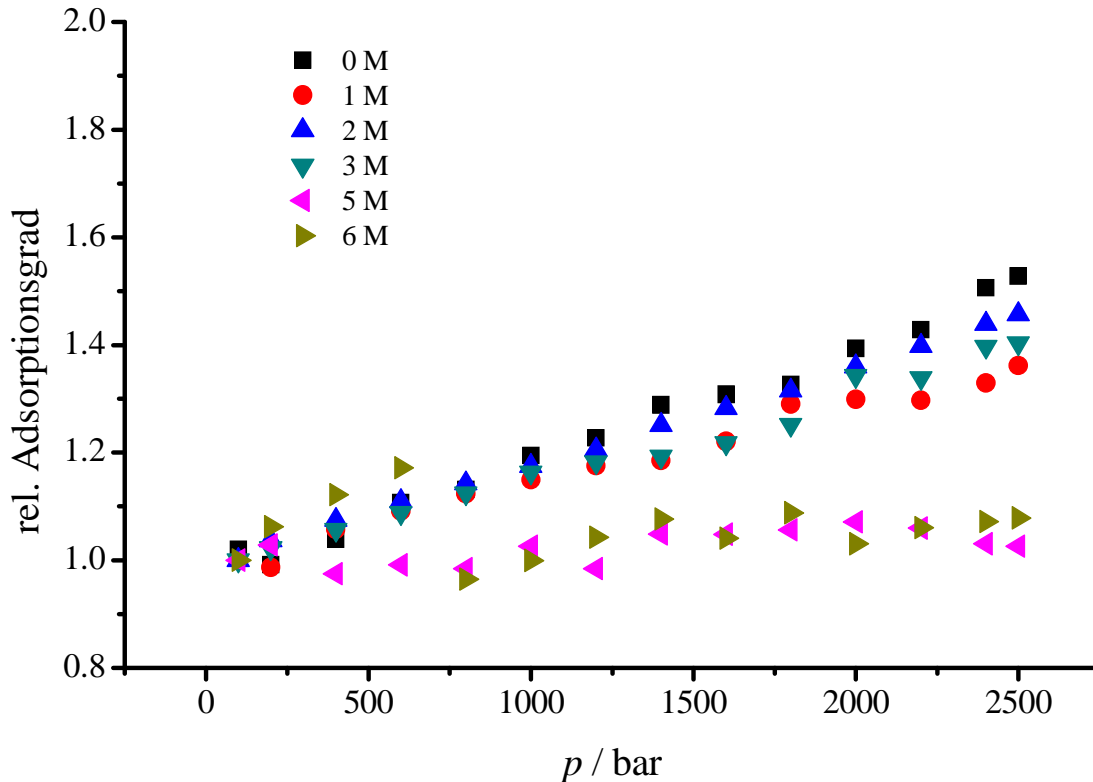


Abbildung 4.83. $\text{Lys}_{\text{Alexa}}$ mit einer Konzentration von 0.1 mg/mL (Markierungsgrad $l = 1:500$) wurde in 10 mM Bistris-Puffer bei pH 7 in Gegenwart 0-6 M Harnstoff auf Quarz adsorbiert. Fluoreszenzspektren wurden im Bereich von 505 bis 560 nm aufgenommen. Zwischen jedem aufgenommenen Spektrum wurde eine Äquilibrationszeit von mindestens 20 min eingehalten.

Unter der Annahme, dass die in Lösung befindlichen Lysozymmoleküle eine konstante Teilchenzahl aufweisen und keine Selbstlöschung des adsorbierten $\text{Lys}_{\text{Alexa}}$ erfolgt, kann das Adsorptionsvolumen ΔV_{ads} durch die Gleichung

$$-RT \left(\frac{\partial \ln K_{\text{ads}}}{\partial p} \right)_T = \Delta V_{\text{ads}} \quad \text{mit } K_{\text{ads}} = \frac{x_{\text{ads}}}{x_{\text{sol}}} \quad \text{und } x_{\text{sol}} \approx \text{konstant} \quad (54)$$

4.3 Hochdruck-TIRF-Spektroskopie zur Bestimmung des Adsorptionsgrades und des Adsorptionsvolumens eines Proteines

bestimmt werden. Dabei ist K_{ads} das Adsorptionsgleichgewicht und x_{ads} und x_{sol} die Anteile der adsorbierten bzw. gelösten Proteinmoleküle (siehe Abbildung 4.84). Weiterhin gilt:

$$K_{\text{ads}} = I \cdot \text{konst.} \Rightarrow \ln K_{\text{ads}} = \ln I + \ln \text{konst.} \Rightarrow \Delta V_{\text{ads}} = -RT \left(\frac{\partial \ln I}{\partial p} \right)_T \quad (55)$$

wobei I die TIRF-Intensität darstellt.

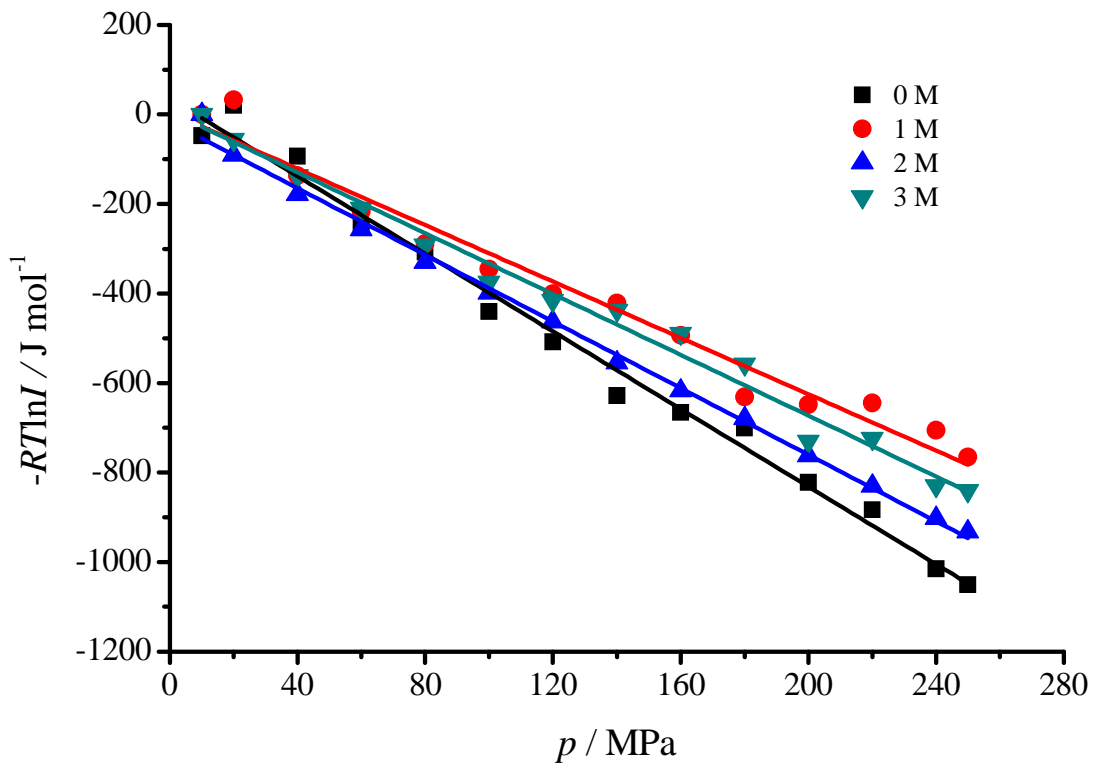


Abbildung 4.84. Bestimmung des Adsorptionsvolumens von Lysozym auf Quarz. Es liegt ein Wert von -4.3 mL mol^{-1} ohne Harnstoff vor. Ein Vergleich der Auftragungen in Gegenwart von Harnstoff zeigt, dass vergleichbare Steigungen vorliegen.

Das Adsorptionsvolumen ΔV_{ads} nimmt für die Messreihe in Abwesenheit von Harnstoff einen Wert von -4.3 mL mol^{-1} an. In Gegenwart von 1, 2 und 3 M Harnstoff resultieren geringfügig kleinere Beträge jeweils von -3.1 mL mol^{-1} , -3.7 mL mol^{-1} und -3.4 mL mol^{-1} .

Im Falle von Glycerin ist im Vergleich zu Harnstoff ein deutlich stärkerer Effekt zu erkennen. Bereits bei einer Konzentration von 3 M erfolgt keine Erhöhung des Adsorptionsgrades mehr (siehe Abbildung 4.85). Dieses Verhalten ist auch bei Ribonuclease A zu beobachten, deren Adsorptionsgrad abhängig von der Harnstoff- bzw. Glycerinkonzentration mittels optischer und Neutronenreflektometrie bei Normaldruck untersucht wurde.¹⁸⁰ Mit steigender Cosolvenskonzentration erfolgt eine Abnahme des Adsorptionsgrads, wobei ein stärkerer Effekt für Glycerin zu beobachten ist.

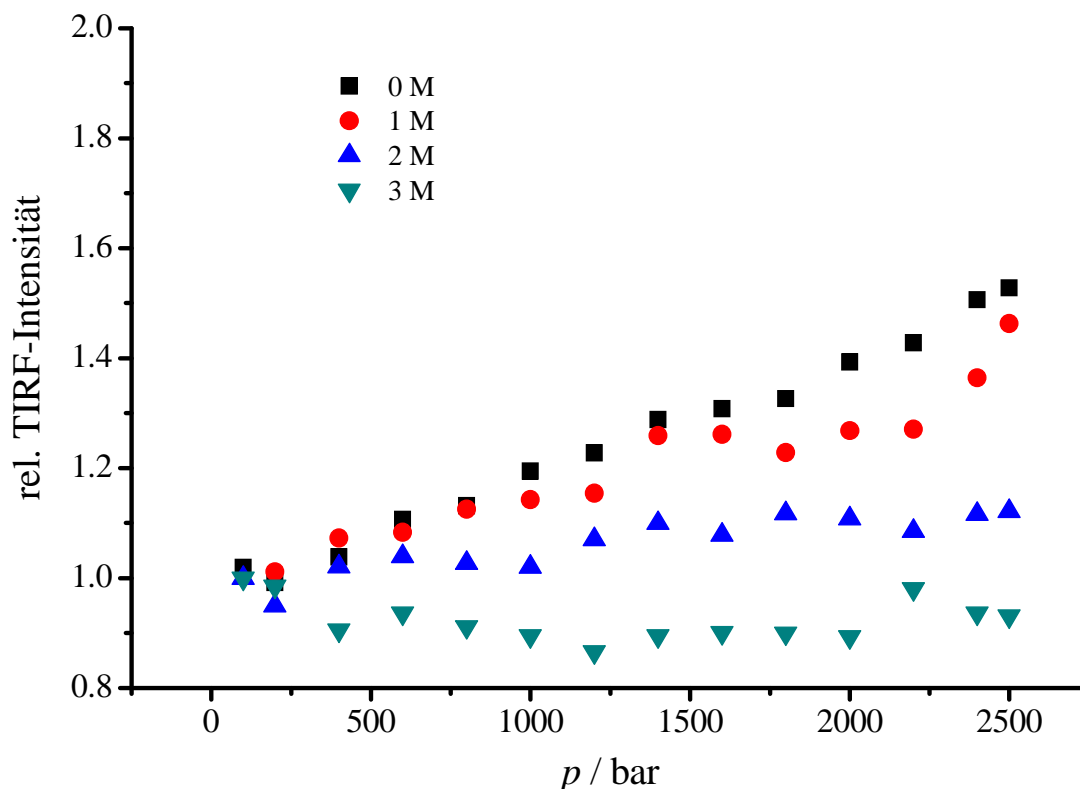


Abbildung 4.85. $\text{Lys}_{\text{Alexa}}$ mit einer Konzentration von 0.1 mg/mL (Markierungsgrad $l = 1:500$) wurde in 10 mM Bistris-Puffer bei pH 7 in Gegenwart unterschiedlicher Glycerinkonzentrationen auf Quarz adsorbiert. Spektren wurden im Bereich von 505 bis 560 nm aufgenommen. Die Anregungswellenlänge lag bei 480 nm. Zwischen jedem aufgenommenen Spektrum wurde eine Äquilibrierungszeit von mindestens 20 min eingehalten.

4.3.7 Adsorptionsvolumen und druckabhängiger Adsorptionsgrad von Lysozym auf einer hydrophoben Grenzfläche

Weiterhin wurde der druckabhängige Adsorptionsgrad von Lysozym auf einer hydrophoben Polystyrol-Oberfläche untersucht. In Abbildung 4.86 ist der relative Adsorptionsgrad als Funktion des Drucks aufgetragen. Der Adsorptionsgrad von Lysozym auf Polystyrol steigt bis zu einem Druck von 1600 bar kontinuierlich an, anschließend erfolgt eine Abnahme der Bandenintensität. Diese Kurve (rot) besteht aus den Mittelwerten zweier Messreihen. Wie die anfängliche Steigung zeigt, liegt im Vergleich zu Quarz auf PS ein höherer Adsorptionsgrad vor. In Abbildung 4.87 ist eine Auftragung zur Ermittlung des Adsorptionsvolumens durchgeführt.

4.3 Hochdruck-TIRF-Spektroskopie zur Bestimmung des Adsorptionsgrades und des Adsorptionsvolumens eines Proteines

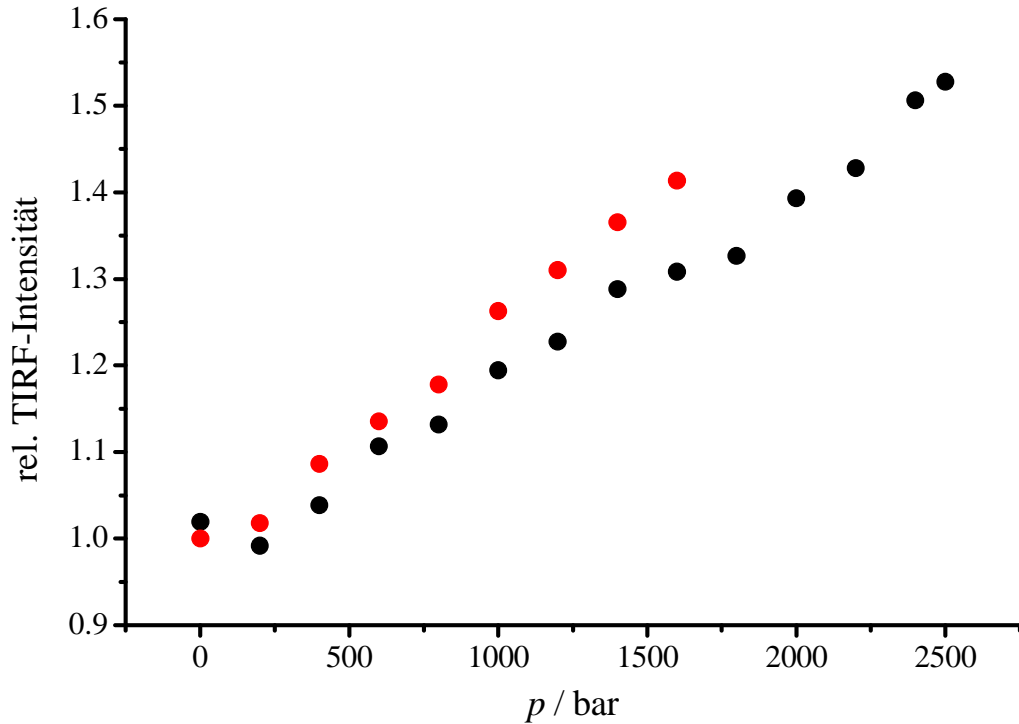


Abbildung 4.86. $\text{LyS}_{\text{Alexa}}$ mit einer Konzentration von 0.1 mg/mL (Markierungsgrad $l = 1:500$) wurde in 10 mM Bistris-Puffer bei pH 7 auf \bullet Quarz bzw. \bullet Polystyrol adsorbiert. Auf Polystyrol zeigt sich im Allgemeinen ein höherer Adsorptionsgrad als auf Quarz.

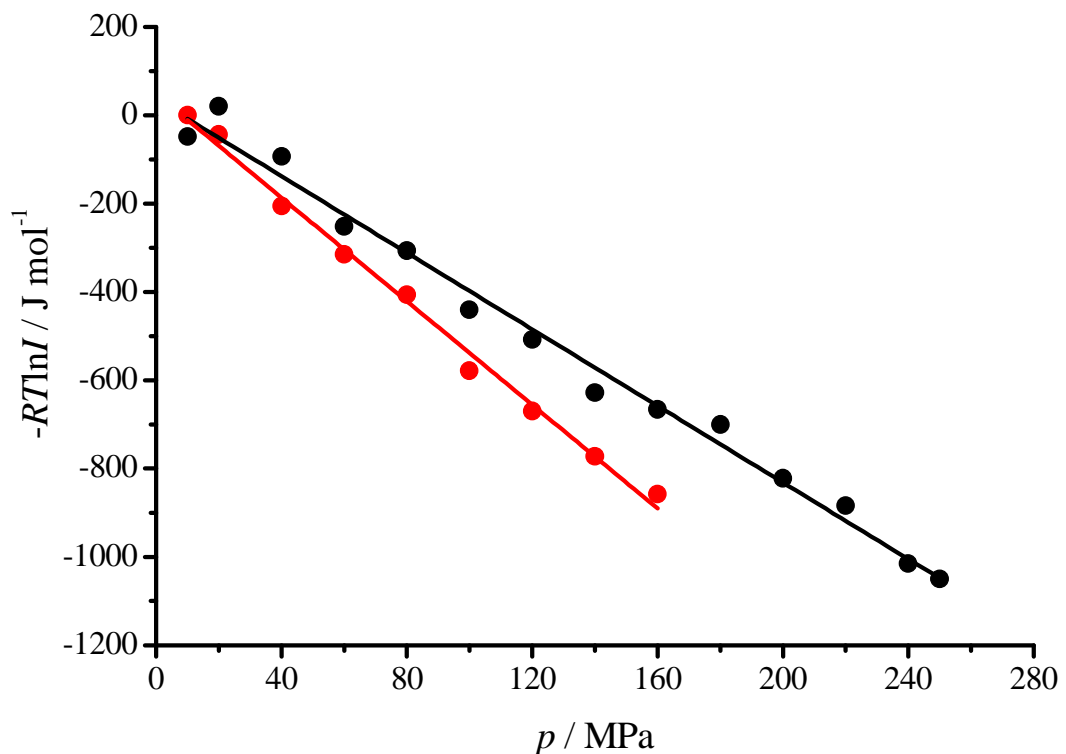


Abbildung 4.87. Bestimmung des Adsorptionsvolumens von Lysozym auf Polystyrol. Es resultiert für Lysozym auf Polystyrol ein Adsorptionsvolumen von -6 mL mol^{-1} (rot) und auf Quarz ein Wert von -4.3 mL mol^{-1} (schwarz).

Für das Adsorptionsvolumen auf Polystyrol liegt ein geringfügig größerer Wert von -6 mL mol^{-1} vor, welcher mit der hydrophoben Struktur der Oberfläche und den damit einhergehenden stärkeren hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Protein und Grenzfläche erklärt werden kann.

4.3.8 Effekt des pH-Wertes auf den druckabhängigen Adsorptionsgrad von Lysozym

Der Einfluss des pH-Wertes auf den Adsorptionsgrad wurde ebenfalls untersucht. Mit steigendem pH-Wert von 7, 8, 9 und 11.4 zeigt sich generell eine Verringerung des Druckeffekts auf den Adsorptionsgrad (siehe Abbildung 4.88). Jede Messung wurde mindestens einmal wiederholt. Es handelt sich bei den dargestellten Kurven um gemittelte Werte. Aus Gründen der übersichtlichen Darstellung werden die Fehlerbalken nicht gezeigt, sie liegen jedoch im Bereich von $\pm 15 \%$.

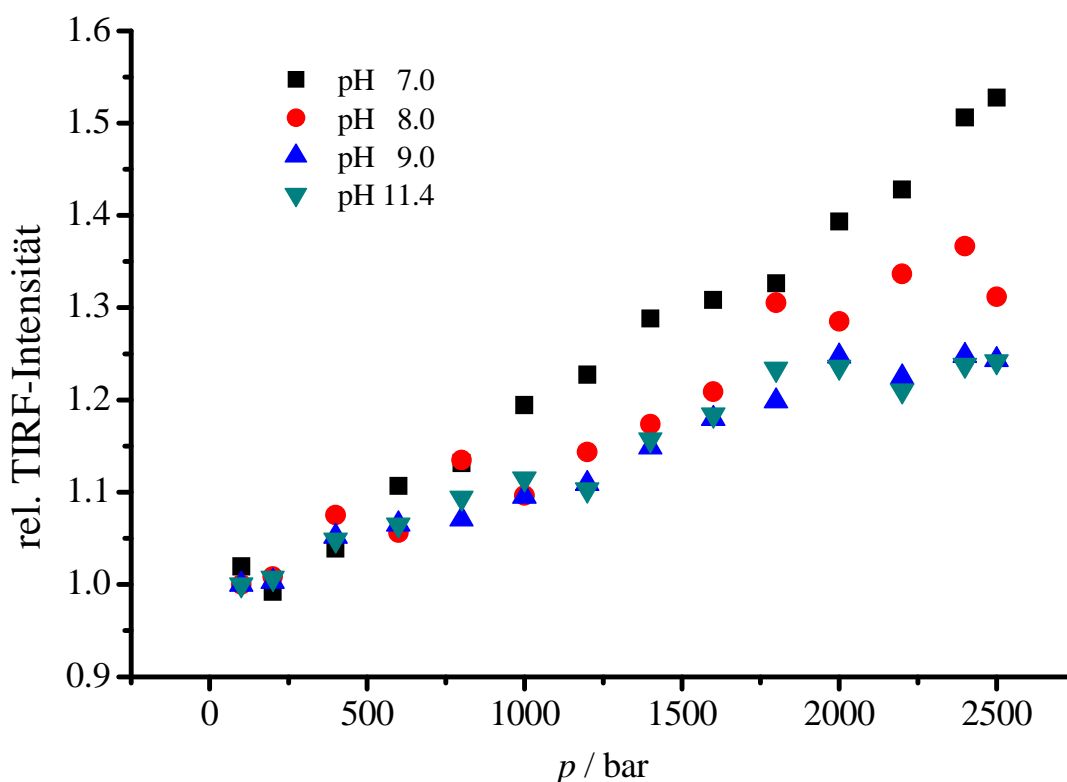


Abbildung 4.88. $\text{LyS}_{\text{Alexa}}$ mit einer Konzentration von 0.1 mg/mL wurde bei unterschiedlichen pH-Werten von 7, 8, 9 und 11.4 auf Quarz adsorbiert. Mit steigendem pH-Wert sinkt im Allgemeinen der druckabhängige Adsorptionsgrad.

Der beobachtete pH-Effekt widerspricht den Erwartungen, dass mit einer Annäherung an den isoelektrischen Punkt eines Proteins der Adsorptionsgrad steigt, wobei in Abbildung 4.88 nur

4.3 Hochdruck-TIRF-Spektroskopie zur Bestimmung des Adsorptionsgrades und des Adsorptionsvolumens eines Proteines

Druckeffekte und keine absoluten Adsorptionsgrade miteinander verglichen werden.. Der isoelektrische Punkt von Lysozym liegt bei einem Wert um 11. Um zu überprüfen, ob unter diesen Bedingungen das kovalent an Lysozym gebundene Alexa Fluor 488 dissoziiert, wurden Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)-Messungen durchgeführt (s.u.).

Um aussagekräftige quantitative Informationen aus TIRF-Daten gewinnen zu können, müssen zusätzlich noch verschiedene Punkte beachtet werden. Im Allgemeinen liegen einige Signalbeiträge von nicht adsorbierten Proteinmolekülen vor, welche in Lösung vorliegen und von der evaneszenten Welle angeregt werden. Zur Berechnung der Eindringtiefe der evaneszenten Welle sollte ein kleiner Druckeffekt auf den Brechungsindex von Wasser berücksichtigt werden. Durch die Verwendung der in Referenz 181 angegebenen Brechungsindices n_0 von Wasser, steigt bei einer Wellenlänge von 404 nm und bei einer Temperatur von 20 °C der Wert von 1.34287 bei 1 bar auf 1.35874 bei 1000 bar. Mit dem Brechungsindex von Quarzglas $n_1 = 1.469$, einem Winkel von $\theta_1 = 20^\circ$ und einer Wellenlänge von 404 nm ergibt sich eine Eindringtiefe der evaneszenten Welle von $d = 201$ nm bei 1 bar und 264 nm bei 1000 bar durch Anwendung von Gleichung (43). Demnach könnte ein Anstieg des TIRF-Beitrags der Lösung bei ansteigendem Druck erwartet werden. In Proteinadsorptionsstudien werden verdünnte Proteinlösungen wie auch in dieser Arbeit verwendet ($c(\text{Protein}) = 0.1$ mg/mL). Aus Neutronenreflektometriemessungen bei Atmosphärendruck geht hervor, dass Lysozym eine Monolage an einer Silicium-Wasser-Grenzfläche ausbildet, welche eine Oberflächenkonzentration von $\Gamma = 2$ mg m⁻² aufweist.¹⁶⁶ Der Anteil f an adsorbierten Molekülen kann durch

$$f = \frac{\Gamma}{\Gamma + c \cdot d / 2} \quad (56)$$

abgeschätzt werden. Für $d = 201$ nm und 264 nm liegen ca. 99 % aller Proteinmoleküle, die innerhalb der evaneszenten Welle liegen, im adsorbierten Zustand an der wässrig-festen Grenzfläche vor. Signalbeiträge von Proteinen in Lösung können somit vernachlässigt werden. Weiterhin gibt es einen Einfluss von Druck auf die anfängliche Intensität der evaneszenten Welle bei $z = 0$, da sie vom Brechungsindex abhängig ist. Für die senkrecht polarisierte Lichtkomponente ist dieser Zusammenhang gegeben durch

$$I_{0,\perp} = \frac{4 \sin^2 \theta_1}{1 - n_0^2/n_1^2} \quad (57)$$

und für die parallel polarisierte Komponente liegt der Zusammenhang

$$I_{0,\parallel} = \frac{4 \sin^2 \theta_1 (2 \cos^2 \theta_1 - n_0^2/n_1^2)}{(n_0^4/n_1^4) \sin^2 \theta_1 + \cos^2 \theta_1 - n_0^2/n_1^2} \quad (58)$$

vor.¹⁵⁷ Bezüglich der Gleichungen (57) und (58) steigen die anfänglichen Intensitäten bei 404 nm von 2.847 bei 1 bar auf 3.238 bei 1000 bar für die senkrechte Komponente (+14%) und von 3.373 bei 1 bar auf 3.766 bei 1000 bar für die parallele Komponente (+12%). Falls die TIRF-Intensitäten als Funktion des Drucks quantitativ ausgewertet werden, so müssen diese Effekte mit berücksichtigt werden. Weiterhin liegen Druckeffekte auf die Entfaltungstabilität eines Proteins^{53,58,62} und Protein-Grenzflächen-Wechselwirkungen vor, welche den Adsorptionsgrad und damit die TIRF-Intensität ändern.^{51,56,60}

4.3.9 Qualitative Bestimmung der Markierung von Lysozym mit Alexa Fluor 488

Zur Untersuchung der Dissoziation des an Lysozym gebundenen Alexa Fluor 488 bei unterschiedlichen pH-Werten wurden FCS-Kurven aufgenommen und qualitativ miteinander verglichen (siehe Abbildung 4.89). Die FCS-Kurven wurden jeweils den y-Achsenabschnitt normiert. Frei in Lösung vorliegendes Alexa Fluor 488 mit einer Konzentration von 10 nM (grün) weist eine kürzere Diffusionszeit als an Lysozym gebundener Fluorophor. Qualitativ lässt sich anhand der nahezu überlappenden Kurven bei pH 7 und pH 11 zeigen, dass keine Dissoziation bei Erhöhung des pH-Wertes erfolgt.

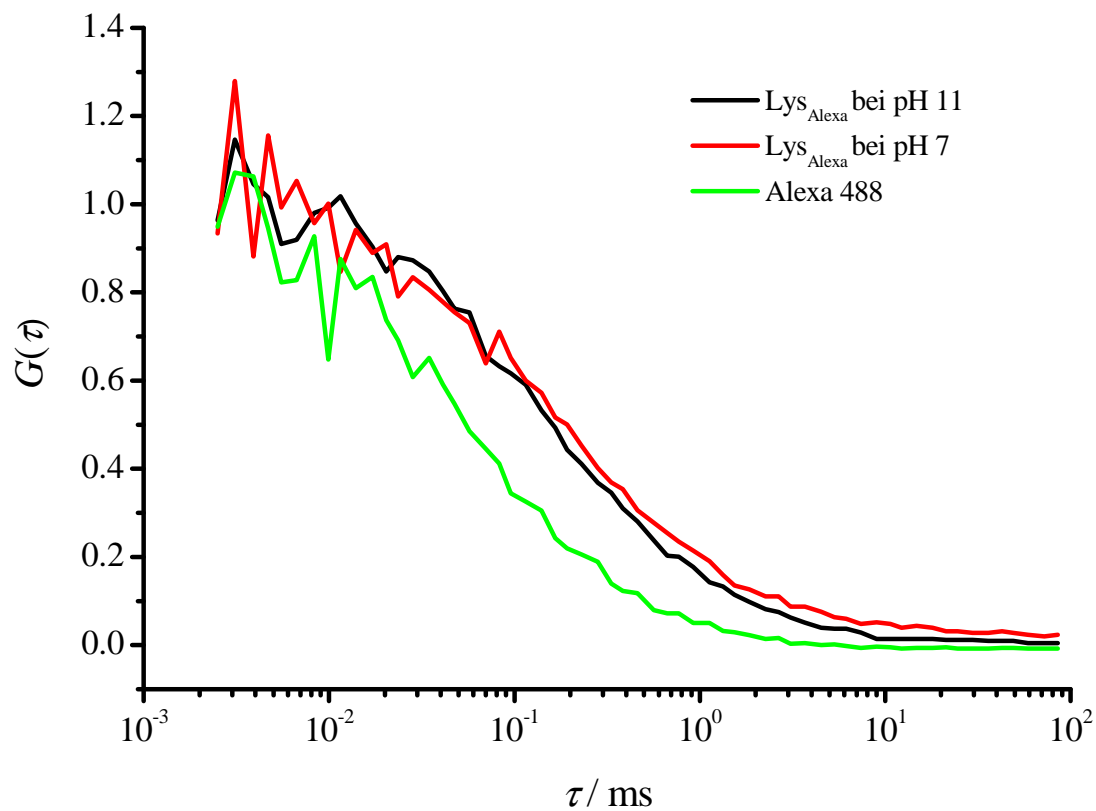


Abbildung 4.89. Autokorrelationsfunktionen für Alexa Fluor 488 im ungebundenen Zustand (grün) sowie im gebundenen Zustand an Lysozym bei pH 7 und 11 (rot, schwarz).

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Themengebiete hinsichtlich adsorbierter Proteine an wässrig-festen Grenzflächen behandelt. Zum einen wurde der Aufbau von zweidimensionalen fibrillären Proteinnetzwerken in Polyelektrolyt-Multischichten und zum anderen wurden Volumeneigenschaften von adsorbierten Proteinen mit Hilfe von hohen hydrostatischen Drücken untersucht.

Im Falle der Protein-Polyelektrolytmultischichten wurden Verfahrensweisen zur Ausbildung zweidimensionaler Proteinnetzwerke untersucht, welche biokompatibel und biologisch abbaubare Ultradünnschichten darstellen. Ultradünnschichten werden als Benetzungsmaterialien aber auch zur Kontrolle von Wirkstofftransportprozessen angewandt. Die laterale Aggregation und die Ausbildung von Amyloidfibrillen von adsorbiertem bzw. eingebettetem Rinderinsulin auf bzw. in Polyelektrolytmultischichten, welche aus Poly(diallyldimethylammoniumchlorid) (PDDA), Poly(natrium 4-styrolsulfat) (PSS) und Hyaluronsäure (HA) aufgebaut wurden, wurden untersucht. Dabei wurden die Multischichten PDDA-PSS-(Ins-PSS)_x und PDDA-PSS-(Ins-HA)_x mit $x = 1-4$ präpariert und im komplett hydratisierten Zustand mittels der Röntgenreflektometrie, der ATR-FTIR-Spektroskopie, der TIRF-Mikroskopie und der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die erhaltenen Daten zeigen einen erfolgreichen Aufbau der Polyelektrolyt-Insulinmultischichten auf Siliciumwafern mit einem starken Anstieg der Schichtdicke nach der Adsorption von Insulin auf PSS oder HA. Die Sekundärstrukturanalyse von Insulin, basierend auf der Amid-I'-Bande, zeigt eine verstärkte Ausbildung intermolekularer β -Faltblätter innerhalb der Multischichten bei einer Temperatur von 70 °C und bei pD = 2. Unter diesen Bedingungen wird generell die Bildung von Insulinamyloidfibrillen mit einem hohen β -Faltblattanteil gefördert. Liegt Insulin zwischen zwei Polyelektrolytschichten eingebettet vor, so werden amorphe Aggregate, wie aus den TIRF- und konfokalen Mikroskopiebildern hervorgeht, gebildet. Bemerkenswerterweise kann, wenn Insulin als oberste Schicht abgeschieden wurde, die Ausbildung eines zweidimensionalen fibrillären Netzwerks durch die Zugabe von Amyloidkeimen zur Lösung induziert werden. Demnach zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung die Fähigkeit von Polyelektrolytmultischichten als Templat für die Bildung von Proteinnetzwerken.

Weiterhin erfolgten im Rahmen dieser Arbeit die ersten Untersuchungen der Volumeneigenschaften adsorbierter Proteine, welche partiell entfaltet vorliegen und eine geringere biologische Aktivität aufweisen können. In dieser Arbeit wurden die

Entfaltungsvolumina und Entfaltungs-Gibbsenergien anhand der Modellproteine SNase und Lysozym auf den kolloidalen Silicapartikeln Ludox AM bzw. AS ermittelt. Ludox AM weist aufgrund von Aluminatgruppen eine hydrophilere Oberfläche über einen großen pH-Bereich auf. Es wurden Hochdruck-Fluoreszenzexperimente im Druckbereich von 1 – 2500 bar unter Verfolgung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz von SNase bzw. Lysozym durchgeführt. Bei $\text{pH} = 7$ und $25\text{ }^\circ\text{C}$ weist die Volumenänderung beim Entfaltungsprozess von SNase in Lösung -73 mL mol^{-1} auf. Dieser Wert wird drastisch verringert, wenn SNase auf Silicapartikel adsorbiert vorliegt. Die Volumenänderungen liegen abhängig von der Oberflächenladung der Nanopartikeln bei unterschiedlichen Werten im Bereich von -41 mL mol^{-1} auf Ludox AM und -32 mL mol^{-1} auf Ludox AS. Zusätzlich wurde die Standard-Entfaltungs-Gibbsenergie von SNase bestimmt, welche eine starke Verringerung im adsorbierten Zustand aufgrund einer grenzflächeninduzierten Destabilisierung der nativen Proteinstruktur aufweist. Weiterhin wurden der Effekt des pH-Wertes auf die Volumenänderung, die Standard-Entfaltungs-Gibbsenergie und die Entfaltungsdrücke untersucht. Während eine pH-Änderung im Bereich von 7-10 keinen signifikanten Effekt auf die druckinduzierte Entfaltung von gelöster SNase zeigt, liegt eine starke pH-Abhängigkeit für adsorbierte SNase vor. Bei Annäherung an den isoelektrischen Punkt von SNase erfolgt eine drastische Verringerung der konformellen Stabilität im adsorbierten Zustand. Im Falle der SNase kann die Verringerung des molekularen Volumens durch die Besetzung der Defektvolumina mit Wasser in der Größenordnung von zwei Wassermolekülen erklärt werden.

Analoge Messungen wurden für Lysozym durchgeführt, wobei ein vergleichbares Verhalten zur SNase vorliegt. Die Volumenänderung beim Entfaltungsprozess für gelöstes Lysozym liegt bei einem Wert von -49 mL mol^{-1} . Im adsorbierten Zustand auf Ludox AM erfolgt eine drastische Verringerung des Wertes auf -18 mL mol^{-1} . Der Effekt des pH-Wertes weist ebenfalls ein vergleichbares Verhalten zur SNase auf. Für Lysozym in Lösung ist keine signifikante druckinduzierte Entfaltung im pH-Bereich von 7-9.6 zu erkennen, im adsorbierten Zustand wird jedoch mit Annäherung des pH-Wertes an den isoelektrischen Punkt eine drastische Abnahme der Standard-Entfaltungs-Gibbsenergie und eine Verringerung des Entfaltungsdrucks beobachtet. Die Volumenänderung bei der Entfaltung von adsorbiertem Lysozym hingegen wird nicht durch den pH-Wert beeinflusst, was den geringen Beitrag der Elektrostriktion zum Entfaltungsvolumen widerspiegelt.

Zur Bestimmung des Adsorptionsgrades und des Adsorptionsvolumens von Proteinen wurde die Hochdruck-TIRF-Spektroskopie erstmalig im Kilobarbereich angewandt. Die Struktur und Dynamik biomolekularer Systeme wie Proteinadsorbate an planaren Grenzflächen können

leicht mit Hilfe der TIRF-Spektroskopie analysiert werden. Durch die Anwendung hoher hydrostatischer Drücke können alle Arten von Volumenänderungen bei einer Assemblierung von Molekülen, Phasenübergängen oder chemischen Reaktionen bestimmt werden. Die meisten Volumenänderungen von Proteinen wurden nur im gelösten Zustand charakterisiert. In dieser Arbeit erfolgten Messungen mit Hilfe einer Hochdruck-TIRF-Zelle im Druckbereich von bis zu 2500 bar, um das Verständnis der Volumeneffekte auf den adsorbierten Zustand zu erweitern. Die zylindrische Hochdruck-Messzelle wurde aus einer Nimonic 90-Legierung gefertigt, und weist eine druckübertragende Probenküvette auf. Die Küvette besteht aus einem Quarzglasprisma und einer flexiblen Gummimanschette, in welcher die Probenlösung vorliegt, welche komplett von dem umgebenden flüssigen Druckmedium ausgeschlossen wird. Die Probenlösung steht mit der inneren Wand des Prismas in Kontakt, welche die zu untersuchende Grenzfläche darstellt. Auf diese Weise können jegliche biomolekulare Schichten, welche an planaren wässrig-festen Grenzflächen adsorbiert vorliegen, untersucht werden. Untersucht wurde der Einfluss von Druck auf Lysozym ohne und in Gegenwart von Harnstoff bzw. Glycerin und der pH-Effekt auf den Adsorptionsgrad. Der Einfluss der Polarität der Grenzfläche auf den Adsorptionsgrad wurde ebenfalls durch die Beschichtung des Quarzprismas mit Polystyrol untersucht. Zur Bestimmung des Adsorptionsgrades und des Adsorptionsvolumens eines Proteins wurde Lysozym verwendet. Mit steigendem Druck erfolgte ein Anstieg des Adsorptionsgrades von Lysozym von +21 % pro 1000 bar. Unter der Annahme einer konstanten Konzentration von Lysozym im gelösten Zustand in der Probenkammer ergibt sich ein Adsorptionsvolumen von $\Delta V_{\text{ads}} = -4.3 \text{ mL mol}^{-1}$. Durch die Zugabe von Harnstoff oder Glycerin wird die Zunahme des Adsorptionsgrades bei steigendem Druck mit steigender Cosolvenskonzentration herabgesenkt, wobei ein stärkerer Effekt im Falle von Glycerin vorliegt. Die Beschichtung des Substrats mit Polystyrol führt zu einem erhöhten Adsorptionsgrad im Vergleich zur polaren unbeschichteten Grenzfläche bei konstantem Druck. Hierbei ergibt sich ein Anstieg des Adsorptionsgrads von +24 % pro 1000 bar. Für das Adsorptionsvolumen auf Polystyrol wurde für Lysozym ein Wert von $\Delta V_{\text{ads}} = -6 \text{ mL mol}^{-1}$ gefunden. Der größere Betrag des Adsorptionsvolumens und der größere Adsorptionsgrad deuten auf eine stärkere Wechselwirkung der Proteine mit einer hydrophoben Grenzfläche hin. Die Annäherung des pH-Wertes an den isoelektrischen Punkt von Lysozym bewirkt nur eine geringere Zunahme des Adsorptionsgrades mit steigendem Druck.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Levinthal, C. *J. Chim. Phys. Pcb.* **1968**, 65, 44.
- (2) Ellis, R. J.; Hartl, F. U. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, 9, 102.
- (3) Stefani, M.; Dobson, C. M. *J. Mol. Med.* **2003**, 81, 678.
- (4) Sipe, J. D.; Cohen, A. S. *J. Struct. Biol.* **2000**, 130, 88.
- (5) Selkoe, D. J. *Nature* **2003**, 426, 900.
- (6) Chiti, F.; Dobson, C. M. *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, 75, 333.
- (7) Dobson, C. M. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **2004**, 15, 3.
- (8) Sunde, M.; Blake, C. *Adv. Protein Chem.* **1997**, 50, 123.
- (9) Chiti, F.; Webster, P.; Taddei, N.; Clark, A.; Stefani, M.; Ramponi, G.; Dobson, C. M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, 96, 3590.
- (10) Fandrich, M.; Fletcher, M. A.; Dobson, C. M. *Nature* **2001**, 410, 165.
- (11) Fandrich, M.; Dobson, C. M. *EMBO J.* **2002**, 21, 5682.
- (12) Czeslik, C. *Z. Phys. Chem.* **2004**, 218, 771.
- (13) Kasemo, B. *Curr. Opin. Solid St. M.* **1998**, 3, 451.
- (14) Lottspeich, F.; Zorbas, H. *Bioanalytik*; Spektrum Akad. Verl.: Heidelberg, **1998**.
- (15) Weinberger, S. R.; Morris, T. S.; Pawlak, M. *Pharmacogenomics* **2000**, 1, 395.
- (16) Wittemann, A.; Ballauff, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, 8, 5269.
- (17) Sever, M. J.; Weisser, J. T.; Monahan, J.; Srinivasan, S.; Wilker, J. J. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2004**, 43, 448.
- (18) Malmsten, M. *Biopolymers at Interfaces*; Marcel Dekker Inc: Hoboken, **2003**.
- (19) Baszkin, A.; Norde, W. *Physical chemistry of biological interfaces*; M. Dekker: New York, **2000**.
- (20) Horbett, T. A. *Proteins at interfaces II* American Chemical Society: Washington, DC, **1995**.
- (21) Creighton, T. E. *Proteins : structures and molecular properties*; 2. ed.; Freeman: New York, **1993**.
- (22) Calonder, C.; Tie, Y.; Van Tassel, P. R. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, 98, 10664.
- (23) Ball, V.; Bentaleb, A.; Hemmerle, J.; Voegel, J. C.; Schaaf, P. *Langmuir* **1996**, 12, 1614.
- (24) Schmidt, C. F.; Zimmermann, R. M.; Gaub, H. E. *Biophys. J.* **1990**, 57, 577.
- (25) Prime, K.; Whitesides, G. *Science* **1991**, 252, 1164.
- (26) Jeon, S. I.; Andrade, J. D. *J. Colloid. Interf. Sci.* **1991**, 142, 159.
- (27) Szleifer, I. *Biophys. J.* **1997**, 72, 595.
- (28) Osterberg, E.; Bergstrom, K.; Holmberg, K.; Schuman, T. P.; Riggs, J. A.; Burns, N. L.; Van Alstine, J. M.; Harris, J. M. *J. Biomed. Mater. Res.* **1995**, 29, 741.
- (29) Piehler, J.; Brecht, A.; Hehl, K.; Gauglitz, G. *Colloid Surface B* **1999**, 13, 325.
- (30) Czeslik, C.; Jansen, R.; Ballauff, M.; Wittemann, A.; Royer, C. A.; Gratton, E.; Hazlett, T. *Phys. Rev. E* **2004**, 69, 021401.
- (31) Decher, G. *Science* **1997**, 277, 1232.

- (32) Caruso, F.; Mohwald, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6039.
- (33) Caruso, F.; Schuler, C. *Langmuir* **2000**, *16*, 9595.
- (34) Schwinte, P.; Voegel, J. C.; Picart, C.; Haikel, Y.; Schaaf, P.; Szalontai, B. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 11906.
- (35) Schwinte, P.; Ball, V.; Szalontai, B.; Haikel, Y.; Voegel, J. C.; Schaaf, P. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 1135.
- (36) Fang, M.; Grant, P. S.; McShane, M. J.; Sukhorukov, G. B.; Golub, V. O.; Lvov, Y. M. *Langmuir* **2002**, *18*, 6338.
- (37) Schlenoff, J. B. *Langmuir* **2009**, *25*, 14007.
- (38) Izumrudov, V. A.; Kharlampieva, E.; Sukhishvili, S. A. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1782.
- (39) Weidinger, I. M.; Murgida, D. H.; Dong, W. F.; Mohwald, H.; Hildebrandt, P. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 522.
- (40) Dronov, R.; Kurth, D. G.; Mohwald, H.; Spricigo, R.; Leimkuehler, S.; Wollenberger, U.; Rajagopalan, K. V.; Scheller, F. W.; Lisdat, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1122.
- (41) Pommersheim, R.; Schrezenmeir, J.; Vogt, W. *Macromol. Chem. Phys.* **1994**, *195*, 1557.
- (42) Donath, E.; Sukhorukov, G. B.; Caruso, F.; Davis, S. A.; Mohwald, H. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1998**, *37*, 2202.
- (43) Yu, X.; Zhao, Z.; Nie, W.; Deng, R.; Liu, S.; Liang, R.; Zhu, J.; Ji, X. *Langmuir* **2011**, *27*, 10265.
- (44) Lin, C. C.; Anseth, K. S. *Pharm. Res.* **2009**, *26*, 631.
- (45) Kumari, A.; Yadav, S. K.; Pakade, Y. B.; Singh, B.; Yadav, S. C. *Colloid Surface B* **2010**, *80*, 184.
- (46) Boulmedais, F.; Schwinte, P.; Gergely, C.; Voegel, J. C.; Schaaf, P. *Langmuir* **2002**, *18*, 4523.
- (47) Laugel, N.; Betscha, C.; Winterhalter, M.; Voegel, J. C.; Schaaf, P.; Ball, V. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 19443.
- (48) Jayasinghe, S. A.; Langen, R. *Bba-Biomembranes* **2007**, *1768*, 2002.
- (49) Marshall, K. E.; Serpell, L. C. *Soft Matter* **2010**, *6*, 2110.
- (50) Buell, A. K.; White, D. A.; Meier, C.; Welland, M. E.; Knowles, T. P. J.; Dobson, C. M. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 10925.
- (51) Atkins, P. W.; De Paula, J. *Physical chemistry*; 9. ed.; Freeman: New York, **2010**.
- (52) Yamaguchi, T.; Yamada, H.; Akasaka, K. *J. Mol. Biol.* **1995**, *250*, 689.
- (53) Winter, R.; Lopes, D.; Grudzielanek, S.; Vogtt, K. *J. Non-Equil. Thermody.* **2007**, *32*, 41.
- (54) Akasaka, K. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1814.
- (55) Li, T. M.; Hook, J. W.; Drickamer, H. G.; Weber, G. *Biochemistry* **1976**, *15*, 3205.
- (56) Vidugiris, G. J. A.; Markley, J. L.; Royer, C. A. *Biochemistry* **1995**, *34*, 4909.
- (57) Panick, G.; Vidugiris, G. J. A.; Malessa, R.; Rapp, G.; Winter, R.; Royer, C. A. *Biochemistry* **1999**, *38*, 4157.
- (58) Akasaka, K.; Tezuka, T.; Yamada, H. *J. Mol. Biol.* **1997**, *271*, 671.
- (59) Samarasinghe, S. D.; Campbell, D. M.; Jonas, A.; Jonas, J. *Biochemistry* **1992**, *31*, 7773.
- (60) Winter, R.; Czeslik, C. Z. *Kristallogr.* **2000**, *215*, 454.

- (61) Dabney, M. J.; Bright, F. V. *Appl. Spectrosc.* **2011**, *65*, 1233.
- (62) Royer, C. A. *Bba-Protein Struct. M* **2002**, *1595*, 201.
- (63) Inoue, K.; Yamada, H.; Akasaka, K.; Herrmann, C.; Kremer, W.; Maurer, T.; Doker, R.; Kalbitzer, H. R. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 547.
- (64) Seemann, H.; Winter, R.; Royer, C. A. *J. Mol. Biol.* **2001**, *307*, 1091.
- (65) Danielewicz-Ferchmin, I.; Banachowicz, E. M.; Ferchmin, A. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 17722.
- (66) Hummer, G.; Garde, S.; Garcia, A. E.; Paulaitis, M. E.; Pratt, L. R. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 10469.
- (67) Grigera, J. R.; McCarthy, A. N. *Biophys. J.* **2010**, *98*, 1626.
- (68) Frye, K. J.; Royer, C. A. *Protein Sci.* **1998**, *7*, 2217.
- (69) Weber, G.; Drickamer, H. G. *Q. Rev. Biophys.* **1983**, *16*, 89.
- (70) Rouget, J. B.; Aksel, T.; Roche, J.; Saldana, J. L.; Garcia, A. E.; Barrick, D.; Royer, C. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6020.
- (71) Pegram, L. M.; Record, M. T. *Chem. Phys. Lett.* **2008**, *467*, 1.
- (72) Vonhippel, P. H.; Schleich, T. *Acc. Chem. Res.* **1969**, *2*, 257.
- (73) Vonhippel, P. H.; Wong, K. Y. *Science* **1964**, *145*, 577.
- (74) Pegram, L. M.; Record, M. T. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 9428.
- (75) Pegram, L. M.; Record, M. T. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 5411.
- (76) Arakawa, T.; Timasheff, S. N. *Biophys. J.* **1985**, *47*, 411.
- (77) Gekko, K.; Timasheff, S. N. *Biochemistry* **1981**, *20*, 4667.
- (78) Tardieu, A.; Luzzati, V.; Reman, F. C. *J. Mol. Biol.* **1973**, *75*, 711.
- (79) Driscoll, D. A.; Jonas, J.; Jonas, A. *Chem. Phys. Lipids* **1991**, *58*, 97.
- (80) Winter, R.; Pilgrim, W. C. *Ber. Bunsen Phys. Chem.* **1989**, *93*, 708.
- (81) Wong, P. T. T.; Siminovitch, D. J.; Mantsch, H. H. *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *947*, 139.
- (82) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 3. ed.; Springer-Verlag, **2010**.
- (83) Bagatolli, L. A.; Gratton, E. *Biophys. J.* **2000**, *78*, 290.
- (84) Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W.; Beck-Sickinger, A. *Lehrbuch der Biochemie*; Wiley-VCH: Weinheim, **2002**.
- (85) Alberts, B. *Molecular biology of the cell*; Garland: New York, **1983**.
- (86) Pedersen, J. S.; Hansen, S.; Bauer, R. *Eur. Biophys. J.* **1994**, *22*, 379.
- (87) Conway-Jacobs, A.; Lewin, L. M. *Anal. Biochem.* **1971**, *43*, 394.
- (88) Brems, D. N.; Brown, P. L.; Heckenlaible, L. A.; Frank, B. H. *Biochemistry* **1990**, *29*, 9289.
- (89) <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>
- (90) <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2A3G>
- (91) <http://www.pdb.org/>
- (92) Stryer, L.; Pfeiffer, B.; Guglielmi, J. *Biochemie*; Spektrum-der-Wissenschaft-Verl.-Ges.: Heidelberg, **1990**.
- (93) Whittingham, J. L.; Scott, D. J.; Chance, K.; Wilson, A.; Finch, J.; Brange, J.; Dodson, G. G. *J. Mol. Biol.* **2002**, *318*, 479.
- (94) Dzwolak, W.; Smirnovas, V.; Jansen, R.; Winter, R. *Protein Sci.* **2004**, *13*, 1927.
- (95) Hong, D. P.; Fink, A. L. *Biochemistry* **2005**, *44*, 16701.

- (96) Smirnovas, V.; Winter, R. *Biophys. J.* **2008**, *94*, 3241.
- (97) Brange, J.; Andersen, L.; Laursen, E. D.; Meyn, G.; Rasmussen, E. *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 517.
- (98) Jimenez, J. L.; Nettleton, E. J.; Bouchard, M.; Robinson, C. V.; Dobson, C. M.; Saibil, H. R. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 9196.
- (99) Sluzky, V.; Tamada, J. A.; Klibanov, A. M.; Langer, R. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88*, 9377.
- (100) Nielsen, L.; Khurana, R.; Coats, A.; Frokjaer, S.; Brange, J.; Vyas, S.; Uversky, V. N.; Fink, A. L. *Biochemistry* **2001**, *40*, 6036.
- (101) Tanford, C.; Roxby, R. *Biochemistry* **1972**, *11*, 2192.
- (102) <http://www.rcsb.org/pdb/search/structidSearch.do?structureId=%202LYZ>
- (103) Heins, J. N.; Suriano, J. R.; Taniuchi, H.; Anfinsen, C. B. *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 1016.
- (104) <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1EY0>
- (105) Alexander, M.; Hurwitz, J.; Heppel, L. A. *J. Biol. Chem.* **1961**, *236*, 3014.
- (106) Sibbald, M. J. J. B.; Ziebandt, A. K.; Engelmann, S.; Hecker, M.; de Jong, A.; Harmsen, H. J. A.; Raangs, G. C.; Stokroos, I.; Arends, J. P.; Dubois, J. Y. F.; van Dijl, J. A. *Microbiol Mol Biol R* **2006**, *70*, 755.
- (107) Cooke, G. D.; Cranenburgh, R. M.; Hanak, J. A. J.; Ward, J. M. *J. Biotechnol.* **2003**, *101*, 229.
- (108) Mabrey, S.; Sturtevant, J. M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1976**, *73*, 3862.
- (109) Craig, D.; Howell, M. T.; Gibbs, C. L.; Hunt, T.; Jackson, R. J. *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 4987.
- (110) Royer, C. A.; Hinck, A. P.; Loh, S. N.; Prehoda, K. E.; Peng, X. D.; Jonas, J.; Markley, J. L. *Biochemistry* **1993**, *32*, 5222.
- (111) <http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/References/Molecular-Probes-TheHandbook/tables/Fluorescence-quantum-yields-and-lifetimes-for-Alexa-Fluor-dyes.html>
- (112) Panchuk-Voloshina, N.; Haugland, R. P.; Bishop-Stewart, J.; Bhalgat, M. K.; Millard, P. J.; Mao, F.; Leung, W. Y. *J. Histochem. Cytochem.* **1999**, *47*, 1179.
- (113) Brinkley, M. *Bioconjug. Chem.* **1992**, *3*, 2.
- (114) Rusinova, E.; Tretyachenko-Ladokhina, V.; Vele, O. E.; Seneor, D. F.; Alexander Ross, J. B. *Anal. Biochem.* **2002**, *308*, 18.
- (115) Vassar, P. S.; Culling, C. F. *Arch. Pathol.* **1959**, *68*, 487.
- (116) Kelenyi, G. *J. Histochem. Cytochem.* **1967**, *15*, 172.
- (117) Naiki, H.; Higuchi, K.; Hosokawa, M.; Takeda, T. *Anal. Biochem.* **1989**, *177*, 244.
- (118) Levine, H. *Protein Sci.* **1993**, *2*, 404.
- (119) Friedhoff, P.; Schneider, A.; Mandelkow, E. M.; Mandelkow, E. *Biochemistry* **1998**, *37*, 10223.
- (120) Levine, H. *Amyloid* **1995**, *2*, 1.
- (121) Krebs, M. R. H.; Bromley, E. H. C.; Donald, A. M. *J. Struct. Biol.* **2005**, *149*, 30.
- (122) Khurana, R.; Coleman, C.; Ionescu-Zanetti, C.; Carter, S. A.; Krishna, V.; Grover, R. K.; Roy, R.; Singh, S. *J. Struct. Biol.* **2005**, *151*, 229.
- (123) Paladini, A. A.; Weber, G. *Rev. Sci. Instrum.* **1981**, *52*, 419.

- (124) King, L.; Weber, G. *Biochemistry* **1986**, *25*, 3637.
- (125) Silva, J. L.; Miles, E. W.; Weber, G. *Biochemistry* **1986**, *25*, 5780.
- (126) Ruan, K. C.; Weber, G. *Biochemistry* **1988**, *27*, 3295.
- (127) Weinryb, I.; Steiner, R. F. *Biochemistry* **1970**, *9*, 135.
- (128) Luppi, B.; Bigucci, F.; Mercolini, L.; Musenga, A.; Sorrenti, M.; Catenacci, L.; Zecchi, V. *J. Pharm. Pharmacol.* **2009**, *61*, 151.
- (129) Picart, C. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 685.
- (130) Balazs, E. A.; Laurent, T. C.; Jeanloz, R. W. *Biochem. J.* **1986**, *235*, 903.
- (131) Toole, B. P.; Wight, T. N.; Tammi, M. I. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 4593.
- (132) Turley, E. A.; Noble, P. W.; Bourguignon, L. Y. W. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 4589.
- (133) Hascall, V. C.; Majors, A. K.; de la Motte, C. A.; Evanko, S. P.; Wang, A. M.; Drazba, J. A.; Strong, S. A.; Wight, T. N. *Bba-Gen. Subjects* **2004**, *1673*, 3.
- (134) Necas, J.; Bartosikova, L.; Brauner, P.; Kolar, J. *Vet. Med.* **2008**, *53*, 397.
- (135) Brown, M. B.; Jones, S. A. *J. Eur. Acad. Dermatol.* **2005**, *19*, 308.
- (136) Detzel, C. J.; Larkin, A. L.; Rajagopalan, P. *Tissue Eng. Part B* **2011**, *17*, 101.
- (137) Sigma-Aldrich, Product Specification, Ludox AM-30 colloidal silica.
- (138) Sigma-Aldrich, Product Specification, Ludox AS-40 colloidal silica.
- (139) Parratt, L. G. *Phys. Rev.* **1954**, *95*, 359.
- (140) Nevot, L.; Croce, P. *Rev. Phys. Appl.* **1980**, *15*, 761.
- (141) Zabel, H. *Appl. Phys. a-Mater.* **1994**, *58*, 159.
- (142) Hansen, W. N. *J. Opt. Soc. Am.* **1968**, *58*, 380.
- (143) Born, M.; Wolf, E. *Principles of optics*; 7. ed.; Pergamon Pr.: Oxford, **1999**.
- (144) Hartwig, J.; Grosswig, S.; Becker, P.; Windisch, D. *Phys. Status Solidi. A* **1991**, *125*, 79.
- (145) Als-Nielsen, J.; MacMorrow, D. *Elements of modern X-ray physics*; Wiley: New York, **2010**.
- (146) Czeslik, C.; Seemann, H.; Winter, R. *Basiswissen Physikalische Chemie*; 4. ed.; Vieweg + Teubner Verlag: Wiesbaden, **2010**.
- (147) Barth, A. *Bba-Bioenergetics* **2007**, *1767*, 1073.
- (148) Hummel, H. *IR-spektroskopische Analyse der Konfiguration und H-Brückenassoziation von N-Methylacetamid als Modellsubstanz für Polymere mit Peptidbindungen*; Univ., Diss.-Regensburg **1984**.
- (149) Kong, J.; Yu, S. *Acta. Bioch. Bioph. Sin* **2007**, *39*, 549.
- (150) Elliott, A.; Ambrose, E. *J. Nature* **1950**, *165*, 921.
- (151) Krimm, S.; Bandekar, J. *Adv. Protein Chem.* **1986**, *38*, 181.
- (152) Winter, R.; Noll, F. *Methoden der biophysikalischen Chemie*; Teubner: Stuttgart, **1998**.
- (153) Kauppinen, J. K.; Moffatt, D. J.; Mantsch, H. H.; Cameron, D. G. *Appl. Spect.* **1981**, *35*, 271.
- (154) Cameron, D. G.; Moffatt, D. J. *Appl. Spectrosc.* **1987**, *41*, 539.
- (155) Seshadri, S.; Khurana, R.; Fink, A. L. *Method. Enzymol.* **1999**, *309*, 559.
- (156) Koo, J.; Czeslik, C. *Rev. Sci. Instrum.* **2012**, *83*, 085109.
- (157) Axelrod, D.; Burghardt, T. P.; Thompson, N. L. *Annu. Rev. Biophys. Bio.* **1984**, *13*, 247.
- (158) Christopher, T.; Sankarnarayanan, K.; Rao, B. N. *Cryogenics* **2002**, *42*, 661.
- (159) Cantor, D. M.; Schroeder, J.; Jonas, J. *Appl. Spectrosc.* **1975**, *29*, 393.
- (160) <http://www.microscopyu.com+tirfintro.html>

- (161) Axelrod, D. *Traffic* **2001**, 2, 764.
- (162) Aune, K. C.; Tanford, C. *Biochemistry* **1969**, 8, 4586.
- (163) Alexa Fluor® 488 Protein Labeling Kit, Manual, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, **2001**.
- (164) Koo, J.; Czeslik, C. *Colloid Surface B* **2012**, 94, 80.
- (165) http://www.iss.com/resources/reference/data_tables/LifetimeDataFluorophores.html
- (166) Jackler, G.; Steitz, R.; Czeslik, C. *Langmuir* **2002**, 18, 6565.
- (167) Czeslik, C.; Royer, C.; Hazlett, T.; Mantulin, W. *Biophys. J.* **2003**, 84, 2533.
- (168) Byler, D. M.; Susi, H. *Biopolymers* **1986**, 25, 469.
- (169) Wahl, M.; Koberling, F.; Patting, M.; Rahn, H.; Erdmann, R. *Curr. Pharm. Biotechno.* **2004**, 5, 299.
- (170) Evers, F., Reichhart, C., Steitz, R., Tolan, M. & Czeslik, C. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, 12, 4375-4382
- (171) Koo, J.; Czeslik, C. *Soft Matter* **2012**, 8, 11670-11676
- (172) Chimenti, M. S.; Castaneda, C. A.; Majumdar, A.; Garcia-Moreno, B. *J. Mol. Biol.* **2011**, 405, 361.
- (173) Pappenberger, G.; Saudan, C.; Becker, M.; Merbach, A. E.; Kiefhaber, T. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, 97, 17.
- (174) Sasahara, K.; Sakurai, N.; Nitta, K. *J. Mol. Biol.* **1999**, 291, 693.
- (175) Prehoda, K. E.; Mooberry, E. S.; Markley, J. L. *Biochemistry* **1998**, 37, 5785.
- (176) Galisteo, F.; Norde, W. *Colloid Surface B* **1995**, 4, 375.
- (177) Kondo, A.; Higashitani, K. *J. Colloid. Interf. Sci.* **1992**, 150, 344.
- (178) Bharti, B.; Meissner, J.; Findenegg, G. H. *Langmuir* **2011**, 27, 9823.
- (179) Jeworrek, C.; Puhse, M.; Winter, R. *Langmuir* **2008**, 24, 11851.
- (180) Koo, J.; Gutberlet, T.; Czeslik, C. *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 6292.
- (181) Thormahlen, I.; Straub, J.; Grigull, U. *J. Phys. Chem.* **1985**, 14, 933.

7. Anhang

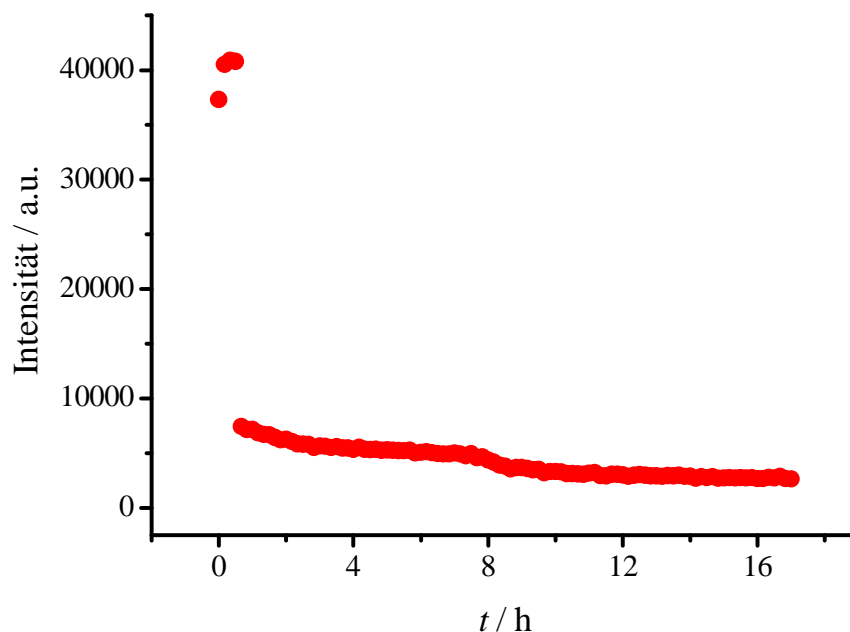


Abbildung 7.1. Fluoreszenz von Thioflavin T an der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ ($c(\text{ThT}) = 4 \mu\text{g/mL}$; 0.2 M NaCl; pH = 2.1). Temperaturerhöhung erfolgte von 25°C auf 70°C nach einer 30 minütigen Messdauer mittels eines vorgeheizten Wasserbads.

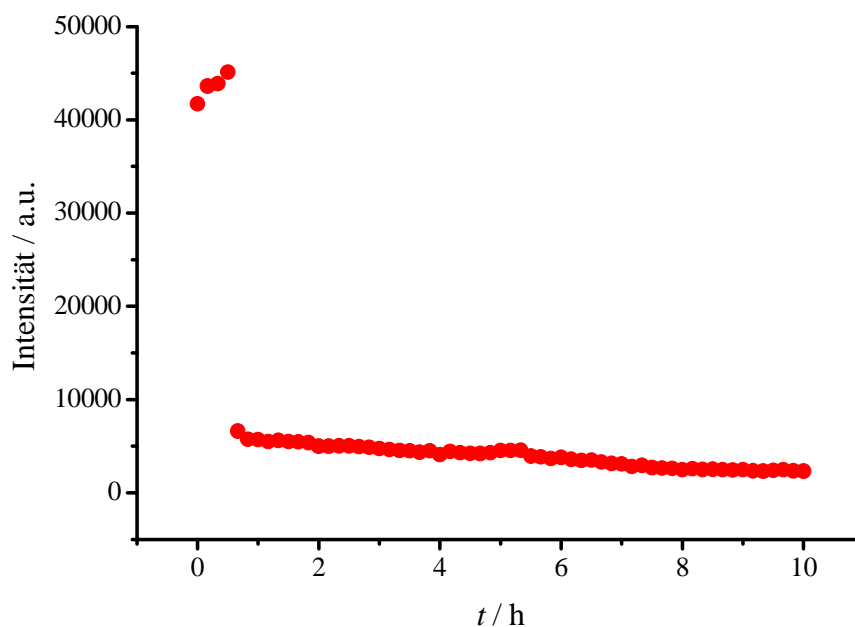


Abbildung 7.2. Fluoreszenz von Thioflavin T an der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃ ($c(\text{ThT}) = 4 \mu\text{g/mL}$; 0.3 M NaCl; pH = 2.1). Temperaturerhöhung erfolgte von 25°C auf 70°C nach einer 30 minütigen Messdauer mittels eines vorgeheizten Wasserbads.

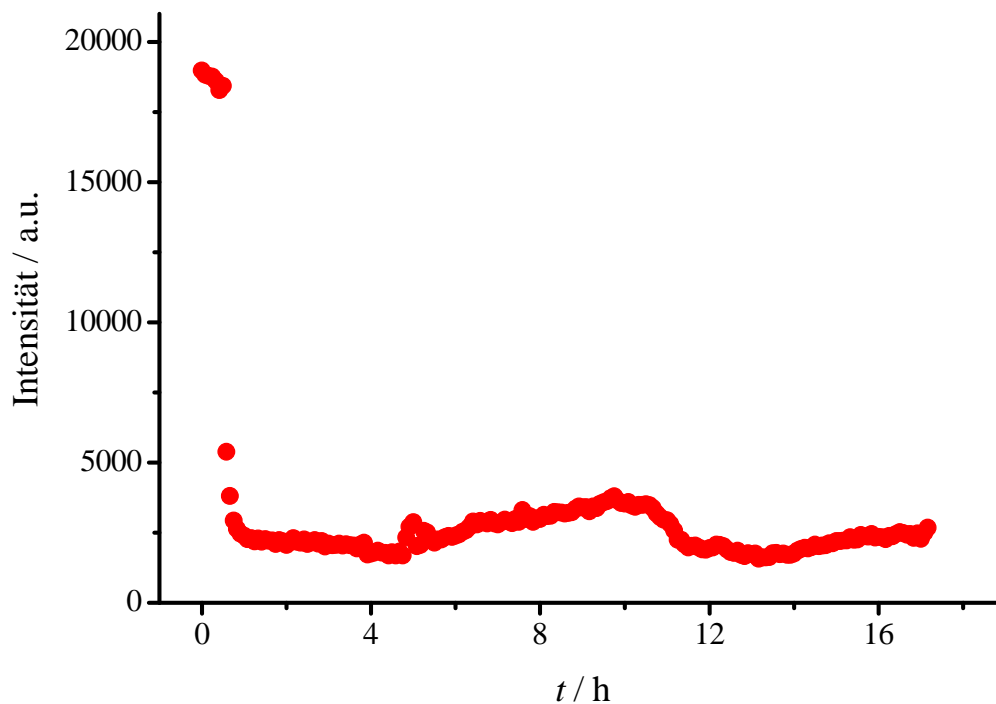


Abbildung 7.3. Fluoreszenz von Thioflavin T an der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃. ($c(\text{ThT}) = 4 \mu\text{g/mL}$; 0.4 M NaCl ; $\text{pH} = 2.1$). Temperaturerhöhung erfolgte von 25°C auf 70°C nach einer 30 minütigen Messdauer mittels eines vorgeheizten Wasserbads.

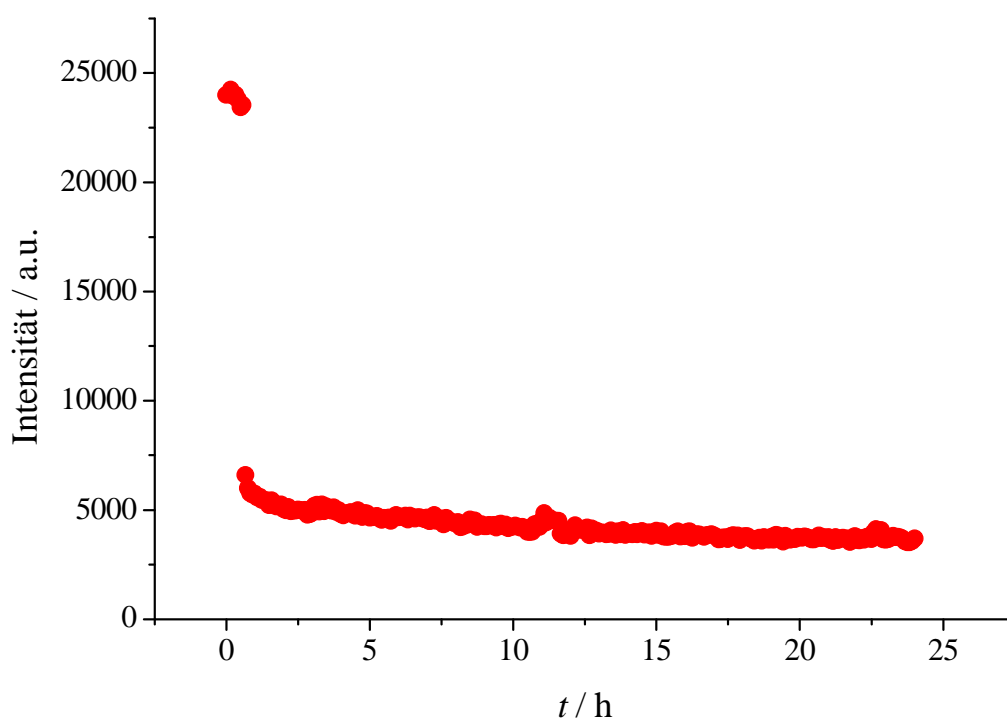


Abbildung 7.4. Fluoreszenz von Thioflavin T an der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃. ($c(\text{ThT}) = 4 \mu\text{g/mL}$; 0.5 M NaCl ; $\text{pH} = 2.1$). Eine Temperaturerhöhung erfolgte von 25°C auf 70°C nach einer 30 minütigen Messdauer mittels eines vorgeheizten Wasserbads.

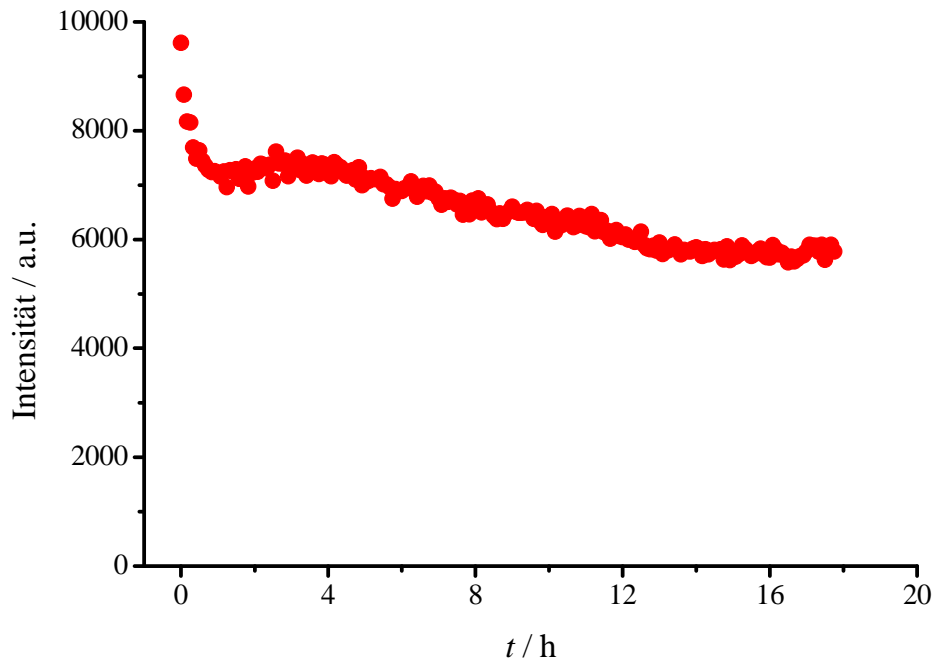


Abbildung 7.5. Fluoreszenz von Thioflavin T an der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₃. ($c(\text{ThT}) = 2.5 \mu\text{g/mL}$; 0.5 M NaCl ; $\text{pH} = 2.1$). Die Temperatur ab dem Zeitpunkt $t = 0 \text{ min}$ betrug $T = 70^\circ\text{C}$.

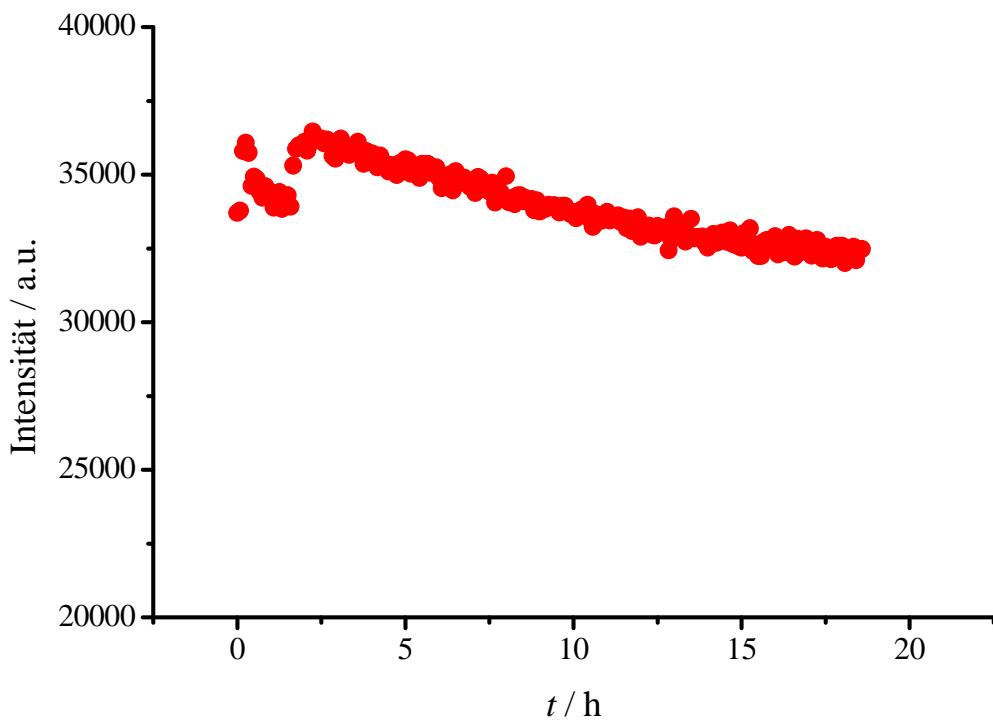


Abbildung 7.6. Fluoreszenz von Thioflavin T an der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-HA)₃. ($c(\text{ThT}) = 2.5 \mu\text{g/mL}$; 0.5 M NaCl ; $\text{pH} = 2.1$). Zugabe von Insulinkeimen zur ThT-Lösung mit $c(\text{Insulinkeime}) = 0.2 \text{ mg/mL}$. Die Temperatur lag bei 25°C über die gesamte Messdauer.

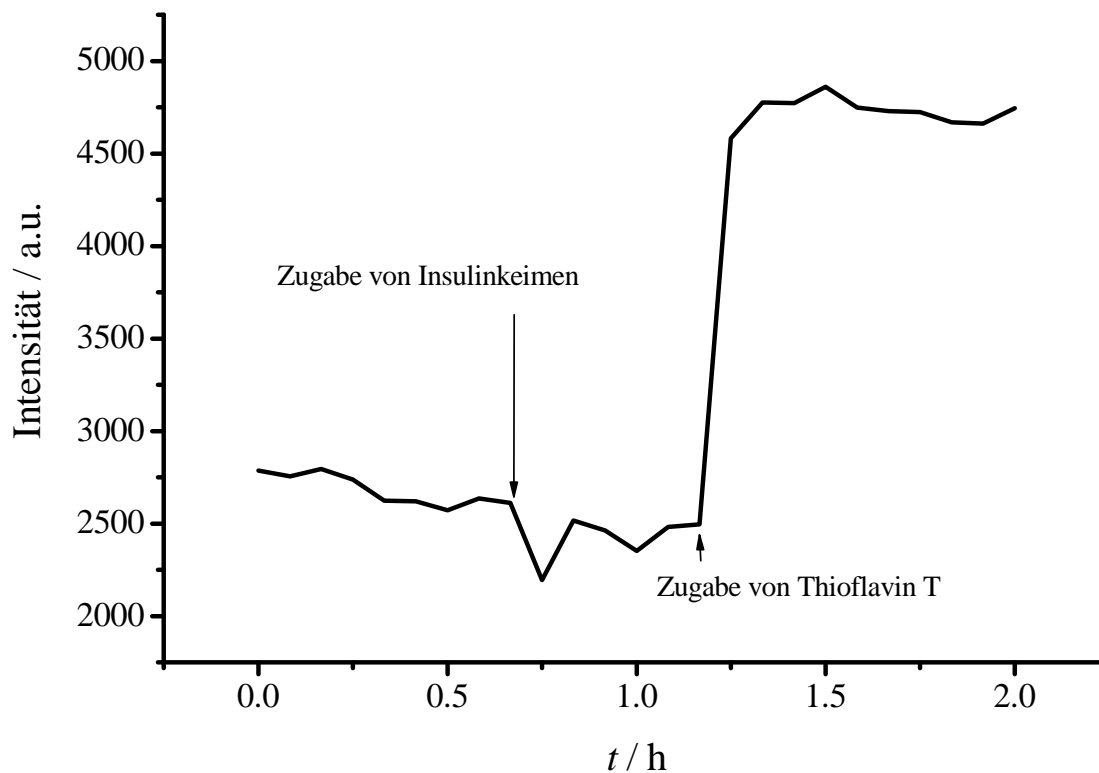


Abbildung 7.7. Reproduktionsmessung des Versuchs aus Abbildung 4.9. Die Zugabe der Insulinkeime zur Doppelschicht PDDA-PSS erfolgte nach einer Messdauer von 40 min. Nach einer Inkubationszeit von 40 Minuten wurde nach mehreren Waschschrinen eine ThT-Lösung bei $\text{pH} = 2.1$ zur Doppelschicht gegeben und die Fluoreszenz bei 482 nm detektiert.

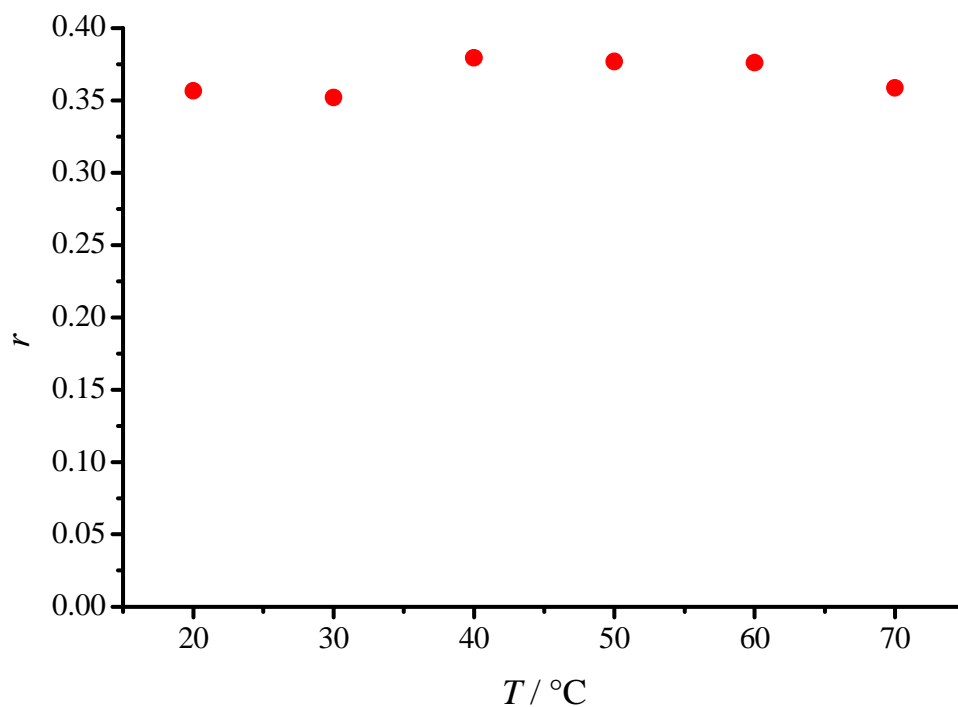


Abbildung 7.8. Reproduktion der Messung in Abbildung 4.13.

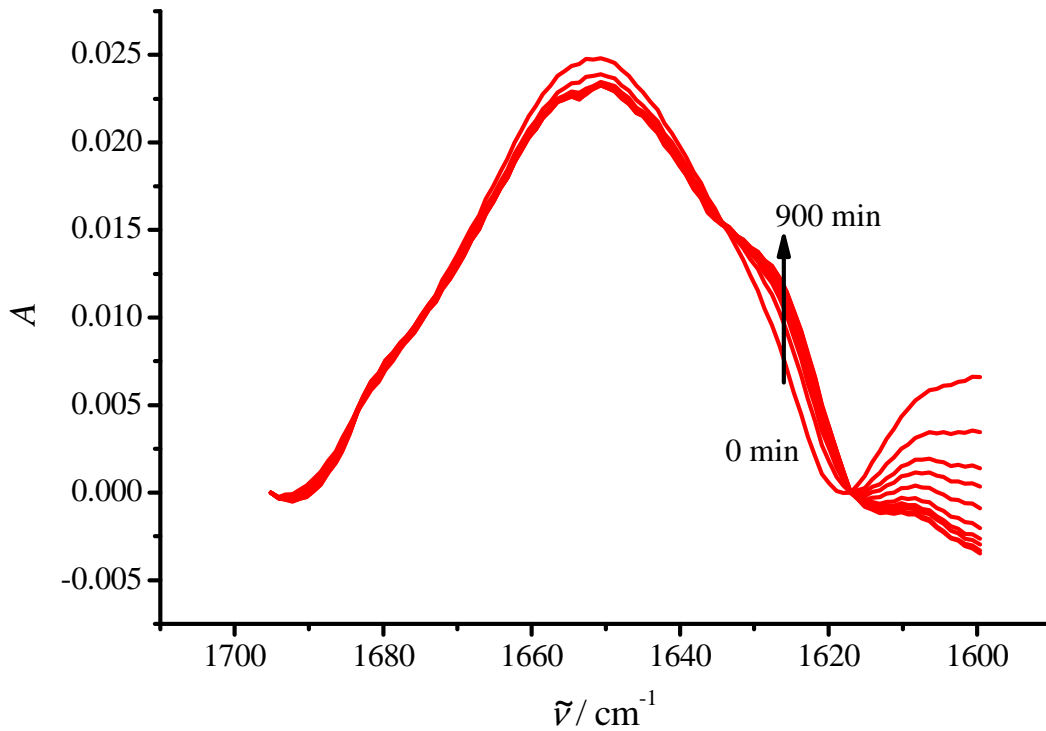


Abbildung 7.9. Reproduktion der Messung aus Abbildung 4.25. Es zeigt sich eine Zunahme der Intensität bei einer Wellenzahl um 1627 cm^{-1} .

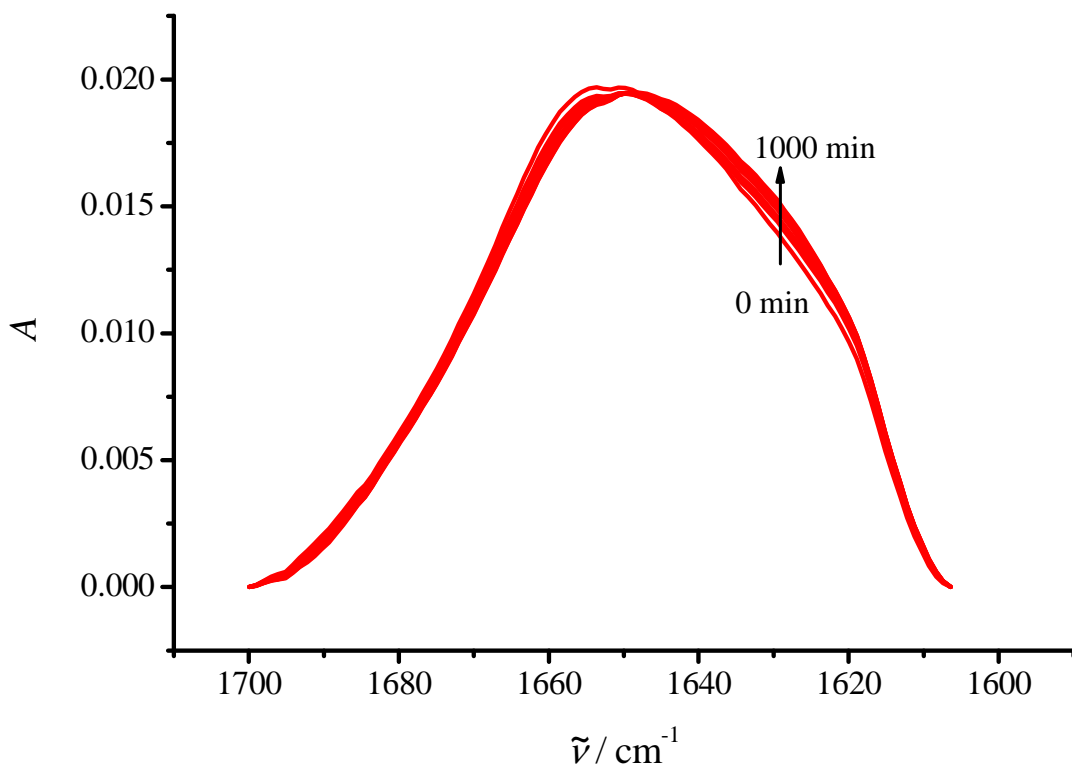


Abbildung 7.10. Ausgewählte ATR-FTIR-Spektren der Multischicht PDDA-PSS-(Ins-PSS)₃-Ins nach der Zugabe einer Insulinkeimlösung. Es zeigt sich eine relativ geringe Änderung der Sekundärstruktur des in der Multischicht eingebetteten Insulins.

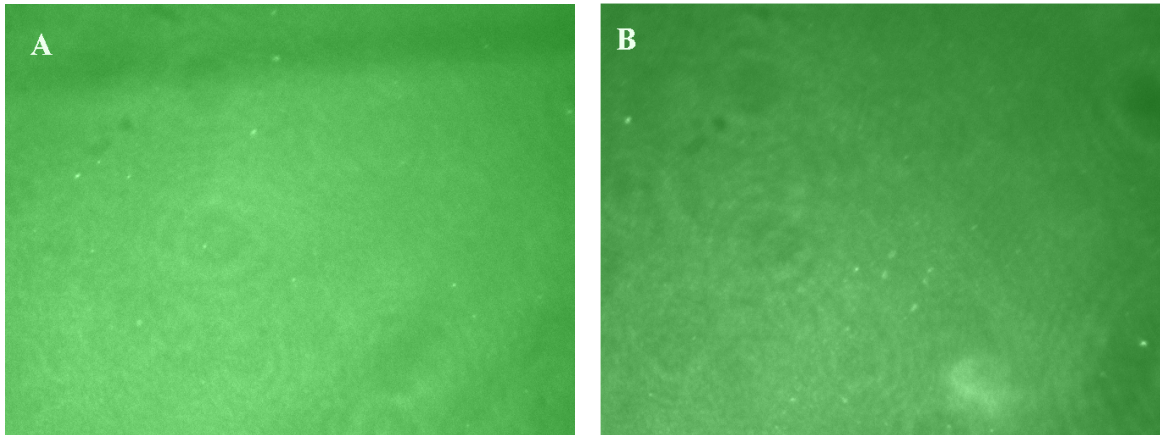


Abbildung 7.11. In Bild (A) ist die Multischicht PDDA-PSS-(Ins_{Alexa}-PSS)₂ dargestellt, zu der eine Insulinkeimlösung mit einer Konzentration von $c(\text{Ins}_{\text{Keime}}) = 0.5 \text{ mg/mL}$ gegeben wurde. Es sind weder Aggregate, noch fibrilläre Strukturen zu erkennen. In Bild (B) wurde die gleiche Insulinkeimlösung wie in (A) zur Multischicht PDDA-PSS-(Ins_{Alexa}-PSS)₂-Ins_{Alexa} gegeben. Auch hier sind keine Aggregate oder fibrilläre Strukturen zu erkennen.

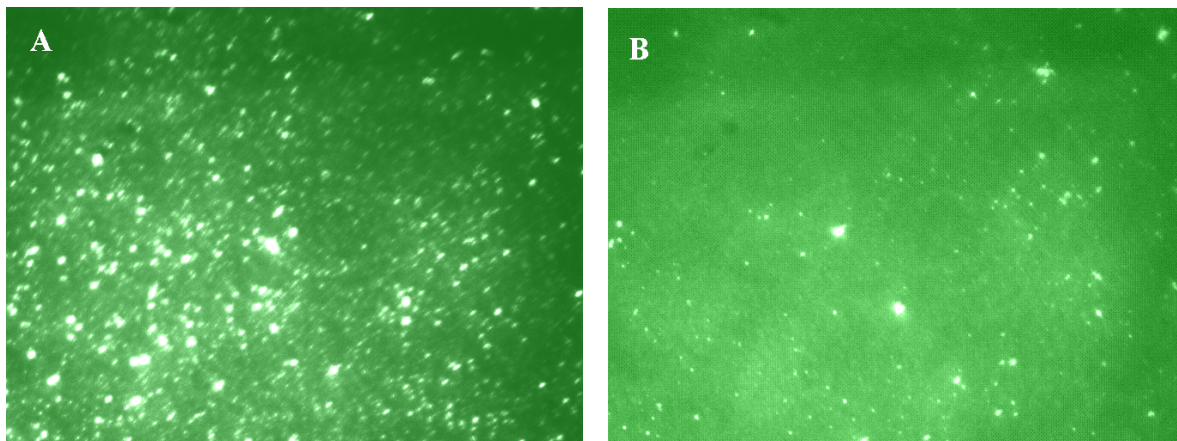


Abbildung 7.12. In Bild (A) ist die Multischicht PDDA-PSS-Ins_{Alexa}-HA dargestellt. Neben dem homogen verteilten Insulin liegen viele kleine Aggregate, bestehend aus Hyaluronsäure und Insulin, vor (helle Punkte). In Bild (B) ist die Multischicht PDDA-PSS-Ins_{Alexa}-HA-Ins_{Alexa} dargestellt. Es sind deutlich weniger helle Punkte zu erkennen. Die Anzahl der adsorbierten Aggregate ist Abhängig vom Ort.

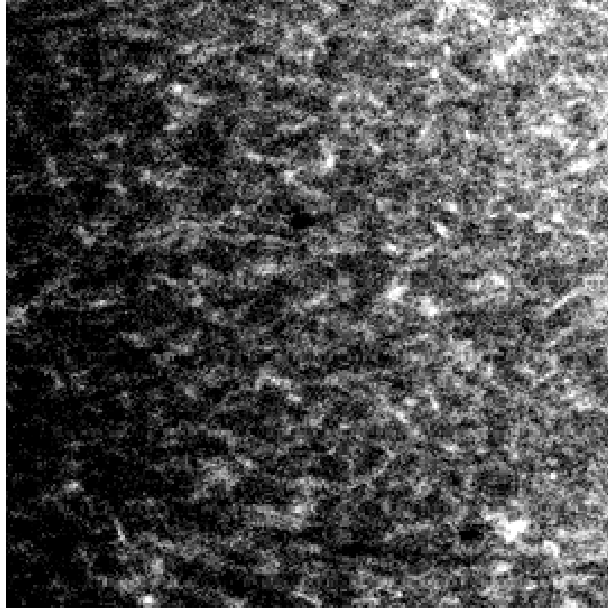


Abbildung 7.13 Adsorption von PDDA-PSS-(Ins-PSS)₂-Ins_{Alexa} auf einem Deckglas. Nach mehreren Waschsritten mit HCl (pH 3) erfolgte die Zugabe von 5 mL einer 0.1 mg/mL Insulinkeimlösung zur Deckglashalterung und die Aufnahme des Bildes. Die Abmessung des Bildes liegen bei (30 µm)².

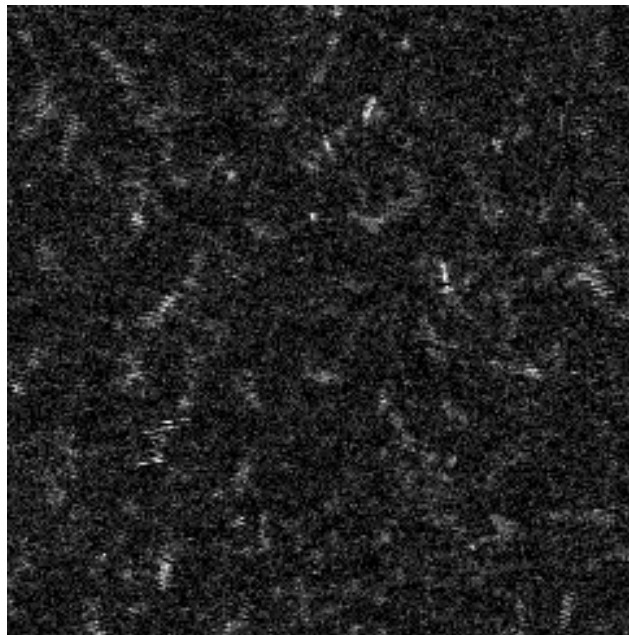


Abbildung 7.14 Adsorption von PDDA-PSS-(Ins-HA)₂-Ins_{Alexa} auf einem Deckglas. Nach mehreren Waschsritten mit HCl (pH 3) erfolgte die Zugabe von 5 mL einer 0.1 mg/mL Insulinkeimlösung zur Deckglashalterung und die Aufnahme des Bildes. Die Abmessung des Bildes liegen bei (30 µm)².

Lebenslauf

Juny Koo

Physikalische Chemie I – Biophysikalische Chemie
Fakultät Chemie, Technische Universität Dortmund
Otto-Hahn-Straße 6, 44221 Dortmund

Persönliche Angaben

Familienstand: ledig
Geburtsdatum: 13. Juni 1982
Geburtsort: Ahlen (Westf.)
Staatsangehörigkeit: südkoreanisch

Ausbildung

| | |
|-----------------------|---|
| Jun. 2003 | Abitur |
| Okt. 2003 - Aug. 2007 | Bachelorstudium der Chemischen Biologie an der TU Dortmund |
| Aug. 2007 | Bachelor of Science in Chemischer Biologie Thema der Bachelorarbeit: „Untersuchung der Adsorption von Ribonuclease an Silicium in Anwesenheit von Cosolventien optischer Reflektometrie“ |
| Okt. 2007 - Jul. 2009 | Masterstudium der Chemischen Biologie an der TU Dortmund |
| Aug. 2009 | Master of Science in Chemischer Biologie Thema der Masterarbeit: „Struktur und Aggregation in polyelektrolytvermittelten Proteinadsorbaten auf festen Grenzflächen“ |
| seit Okt. 2009 | Doktorarbeit auf dem Arbeitsgebiet der Biophysikalischen Chemie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Czeslik an der TU Dortmund |

Beschäftigung

| | |
|-----------------------|--|
| Okt. 2009 - März 2013 | Wissenschaftlicher Angestellter an der TU Dortmund |
|-----------------------|--|