

## 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)<sub>x</sub> und PDDA-PSS-(Ins-HA)<sub>x</sub> 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $25\text{ °C}$  weist die Volumenänderung beim Entfaltungsprozess von SNase in Lösung  $-73\text{ mL mol}^{-1}$  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  $-41\text{ mL mol}^{-1}$  auf Ludox AM und  $-32\text{ mL mol}^{-1}$  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  $-49\text{ mL mol}^{-1}$ . Im adsorbierten Zustand auf Ludox AM erfolgt eine drastische Verringerung des Wertes auf  $-18\text{ mL mol}^{-1}$ . 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.