

STRUKTURBESTIMMUNG AUSGEWÄHLTER
PROTEIN- UND LIPIDSYSTEME MIT
NICHT-TYPISCHEM AGGREGATIONS- UND
PHASENVERHALTEN

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
(DR. RER. NAT.)

VORGELEGT VON

MIRKO ERLKAMP

GEBOREN AM 08. OKTOBER 1983 IN HERNE

EINGEREICHT BEI DER
FAKULTÄT FÜR CHEMIE UND CHEMISCHE BIOLOGIE
DER TECHNISCHEN UNIVERSITÄT DORTMUND

Dortmund

25. März 2014

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2010 bis März 2014 am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I (Biophysikalische Chemie) der Technischen Universität Dortmund unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. R. Winter angefertigt.

Tag der mündlichen Prüfung: 29. April 2014

Prüfungskommission:

Prof. Dr. R. Winter	(Erstgutachter)
Prof. Dr. H. Rehage	(Zweitgutachter)
Dr. S. Zühlke	(wissenschaftlicher Mitarbeiter)
Prof. Dr. R. Weberskirch	(Vorsitzender)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die es mir durch ihre Hilfe und Unterstützung ermöglicht haben, diese Arbeit zu erstellen.

Allen voran bedanke ich mich bei **Herrn Prof. Dr. Roland Winter** für die interessanten Aufgabenstellungen und die Möglichkeit zur Realisierung dieser Arbeit. Außerdem möchte ich mich für die unermüdliche Diskussionsbereitschaft bei jedem noch so kleinen Problem und für das entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Mein Dank gilt weiterhin **Herrn Prof. Dr. Heinz Rehage** für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Herrn Dr. Sebastian Zühlke danke ich für die Besetzung der Position des wesentlichen Mitarbeiters in der Prüfungskommission.

Ein außerordentlicher Dank gebührt **Herrn Prof. Dr. Claus Czeslik** für seine stetige Hilfsbereitschaft und Lösungsfindung bei jedem auftretenden Problem.

Frau Andrea Kreusel danke ich für die große Hilfe bei allen bürokratischen Angelegenheiten.

Für die gute Atmosphäre und Zusammenarbeit innerhalb der Arbeitsgruppe möchte ich mich bei **allen Mitarbeitern sowie ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls Physikalische Chemie I** bedanken.

Der Feinmechanikwerkstatt der Fakultät Chemie unter der Leitung von **Herrn Holger Konopka** und der Elektronikwerkstatt der Fakultät Chemie unter der Leitung von **Herrn Ralf Maserski** möchte ich für die Umsetzung und Perfektionierung meiner Ideen und die schnelle Behebung mechanischer oder elektrischer Probleme danken.

Dank an **Dipl. Phys. Johannes Möller** für die gute Zusammenarbeit auf den Messzeiten.

Ein großer Dank gehört **M. Sc. Sebastian Grobelny**, der mir immer wieder Höchstleistungen abverlangt hat und gleichzeitig durch seine einzigartige Hilfsbereitschaft mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Mein einstiger Studienkollege ist mir heute ein guter Freund.

Meinem guten, alten Freund und Weggefährten **M. Sc. Christopher Rosin** danke ich für unzählige zielführende Diskussionen und für seine Hilfe bei den verschiedensten Problemen in jeder Lebenslage.

Meiner Freundin **Katharina Jäkel** danke ich dafür, dass sie mir in jeder Situation zur Seite gestanden hat und mich immer wieder ermutigt hat an meine Ziele zu glauben.

Mein größter Dank gilt **meinen Eltern** für ihre bedingungslose Unterstützung und ihr ständiges Vertrauen in meine Person.

Papa, du wirst immer mein größtes Vorbild sein. Danke für alles!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
2	Probenpräparation	17
2.1	Insulin	17
2.2	Staphylokokken-Nuklease (SNase) und makromolekulare Crowder	17
2.3	N-Ras HD/Far GppNHp und DOPC	19
2.4	Lipidmembran der Archaeen	20
2.5	Kakaobutter	21
3	Experimentelle Methoden	23
3.1	Neutronenreflektometrie	23
3.1.1	Verwendete Hochdruckzelle	26
3.1.2	Messungen am Forschungsreaktor HFR in Grenoble (Frankreich)	27
3.1.3	Messungen am Forschungsreaktor FRM II in Garching bei München	28
3.2	Röntgen-Klein- und Weitwinkelstreuung	28
3.2.1	Verwendete Hochdruckzellen	31
3.2.2	Messungen am Synchrotron ESRF in Grenoble (Frankreich)	33
3.2.3	Messungen am Synchrotron DESY in Hamburg	33
3.2.4	Messungen am Synchrotron DELTA in Dortmund	34
3.2.5	Messungen am Synchrotron SOLEIL in Gif-sur-Yvette (Frankreich)	35
3.2.6	Messungen am SAXSess mc ²	35
3.3	Neutronenspinecho-Spektroskopie	36
3.3.1	Messungen am Forschungsreaktor NCNR in Gaithersburg (USA)	38

3.4	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie	39
3.4.1	Messungen am FT-IR-Spektrometer Nicolet 5700	39
3.4.2	Messungen am FT-IR-Spektrometer Nicolet MAGNA 550	40
3.5	Fluoreszenzspektroskopie	42
3.5.1	Messungen am Fluoreszenz-Spektrometer LS 55	42
3.6	Interne Totalreflexionsfluoreszenzspektroskopie	43
3.6.1	Verwendete Hochdruckzelle	43
3.6.2	Messungen am K2-Fluorometer	44
3.7	Kalorimetrische Methoden	45
3.7.1	Dynamische Differenzkalorimetrie am VP-DSC-Kalorimeter	46
3.7.2	Druck-Perturbations-Kalorimetrie am VP-DSC-Kalorimeter	46
4	Ergebnisse und Diskussion	49
4.1	Lösungsmittelspezifische Dynamik von Insulin	49
4.2	Einfluss des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 auf die Stabilität des Proteins Staphylokokken-Nuklease	64
4.3	Einfluss des doppelt-lipidierten N-Ras-Proteins auf das drucksensitive Verhalten der Modellbiomembran DOPC	96
4.4	Strukturelle Charakterisierung der Lipidmembran von Archaeen	108
4.5	Temperatur- und druckinduzierte Kristallphasenübergänge der Triacyl- glycerole in Kakaobutter	113
5	Zusammenfassung	123
6	Anhang	131
6.1	Strukturelle Charakterisierung des makromolekularen Crowders Dextran 70	131
6.2	Temperatur- und Druckstabilität von mizellarem Dodecylphosphocholin	134
	Literaturverzeichnis	XII
	Publikationsliste	XIII
	Lebenslauf	XV

1 Einleitung

Die naturwissenschaftliche Grundlagenforschung ist die Basis für eine nachhaltige Entwicklung von Wirtschaft und Gesellschaft. Im Bereich der biophysikalischen Chemie ist die Erforschung von Biomolekülen mit modernster Technik der wesentliche Beitrag zur Grundlagenforschung. Der grundlegende Aufbau und die wesentlichen Mechanismen einer biologischen Zelle sind gut erforscht. Dennoch sind eine Vielzahl spezifischer Prozesse innerhalb der Zelle, wie beispielsweise die Entstehung von Krankheiten, immer noch terra incognita. Zum Verständnis dieser Prozesse werden immer komplexere Modellsysteme benötigt, die den Einsatz von fortgeschrittenen Techniken, wie beispielsweise die Anwendung von Synchrotronstrahlung, erfordern. Hier beginnen die Fragestellungen dieser Arbeit, die zu fünf verschiedenen Studien zur Struktur und Dynamik von Proteinen und Lipiden geführt haben. Stets wurde eine bestimmte Technik der Neutronen- oder Röntgenstreuung verwendet, um Informationen über das untersuchte System zu erhalten. Zudem wurde zur Vervollständigung oder Verifizierung der Ergebnisse eine ergänzende biophysikalische Methoden angewendet. Neben der Untersuchung des thermischen Verhaltens der Biomoleküle wurde auch Druck als thermodynamischer Parameter verwendet. Im weiteren Verlauf dieser Einleitung wird jede Studie kurz erläutert und die wesentliche Untersuchung beschrieben.

Die erste Studie im Rahmen dieser Arbeit diente zur Bestimmung der lösungsmittelspezifischen Dynamik des Proteins Insulin. Die biologische Aktivität eines Proteins basiert auf der fehlerfreien Faltung der Polypeptidkette in eine definierte dreidimensionale Struktur, die sogenannte Tertiärstruktur, die wiederum aus kleineren Strukturelementen (Sekundärstruktur) aufgebaut ist. Eine Mutation kann zu einer fehlerhaften Faltung des Proteins führen, wodurch die biologischen Aktivität teilweise oder vollständig

verloren geht. Diese Fehlfaltung kann der Auslöser der Keimbildung, Aggregation und Fibrillenbildung von Proteinen sein.^[1–5] Abbildung 1.1 zeigt eine hypothetische Energiehyperfläche mit einem Faltungstrichter für die native Proteinfaltung (links) und einem Aggregationstrichter für die Ausbildung von Fibrillen aufgrund von (teil-)entfalteten Proteinen (rechts). Viele verschiedene Krankheiten werden mit den ausgebildeten Fibrillen, die als Amyloid bezeichnet werden, in Verbindung gebracht. Aufgrund dessen ist das Verständnis der Fibrillenbildung eine der herausforderndsten und faszinierendsten Aufgabenstellungen der biomolekularen Wissenschaften.^[1,6–8] Trotz der fundamentalen Kenntnisse über die Zusammenhänge zwischen Struktur, Dynamik und Funktion von Proteinen und in Betracht der bereits vorhandenen detaillierten Strukturinformationen über Amyloidfibrillen sind die dynamischen Eigenschaften eines Proteins in der Entstehungsphase der Fibrillen weitgehend unbekannt. Unter den Proteinen, die bereitwillig Fibrillen ausbilden, stellt das Protein Insulin aufgrund seiner medizinischen Bedeutung und der enormen Menge an bereits verfügbaren Forschungsergebnissen ein gutes Modellsystem dar.^[9–14] Insulin wird in den β -Zellen der Langerhans-Inseln produziert. Diese spezialisierten Zellen befinden sich in der Bauchspeicheldrüse (Pankreas).^[15] Insulin besteht aus 51 Aminosäuren und besitzt eine molare Masse von 5800 Da.^[16] Die 51 Aminosäuren sind in zwei Polypeptidketten unterteilt, die Polypeptidkette A besteht aus 21 Aminosäuren und die Polypeptidkette B aus 30 Aminosäuren. Zwei α -Helices in Polypeptidkette A und eine α -Helix in Polypeptidkette B bestimmen die Faltung des monomeren Insulins. Zwei Disulfidbrücken verbinden die beiden Polypeptidketten kovalent. Eine intramolekulare Disulfidbrücke ist zusätzlich in Polypeptidkette A zu finden.^[15] Abgesehen von der möglichen lokalen Amyloidablagerung nach einer Insulininjektion bildet Insulin keine Amyloidfibrillen *in vivo*. *In vitro* kann die Fibrillenbildung jedoch durch Temperaturerhöhung, Absenkung des pH-Wertes oder durch Schütteln in Kontakt mit hydrophoben Oberflächen erreicht werden.^[9,17–19] Diese amyloidinduzierenden Bedingungen stellen ein ernsthaftes Problem bei der Produktion von und im Umgang mit Insulin dar. Eine Reihe von Studien dokumentieren Aggregationsmechanismen von Insulin mit unterschiedlicher Morphologie der entstandenen Amyloidfibrillen.^[13,20–22] Beispielsweise bildet Insulin bei einem pH-Wert von 2 größtenteils Dimere in Wasser aus.^[23] Abbildung 1.2 zeigt die dreidimensionale Struktur

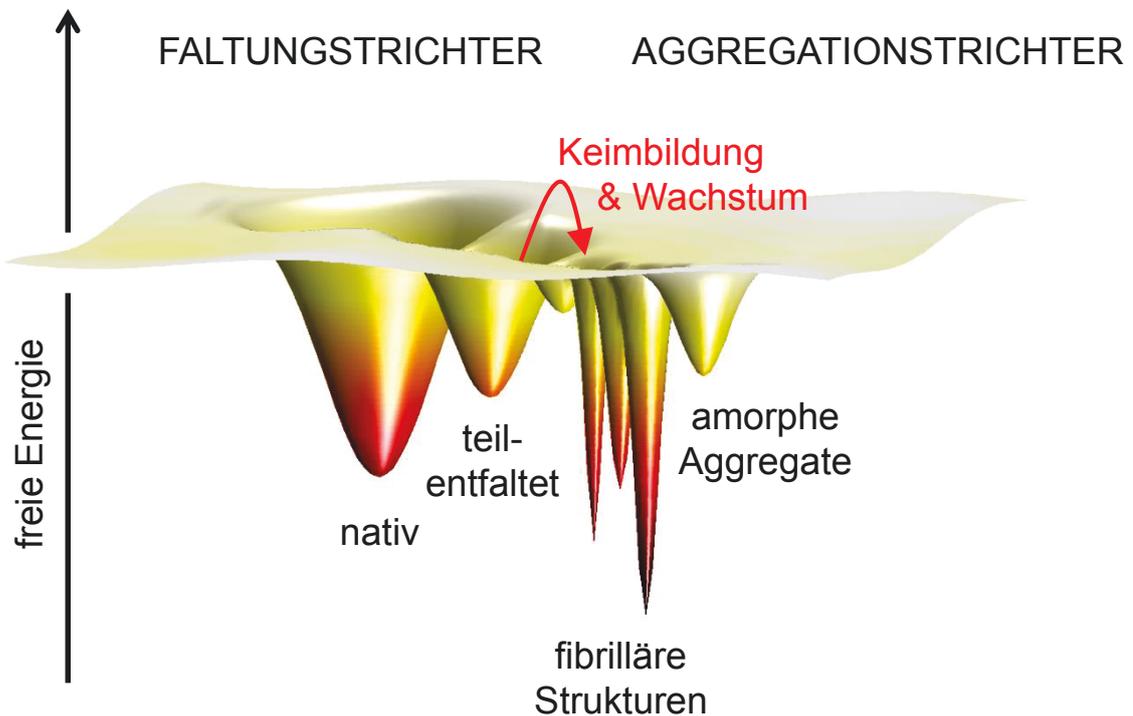


Abbildung 1.1: Hypothetische Energiehyperfläche mit einem Faltungstrichter für die native Proteinfaltung (links) und einem Aggregationstrichter für die Ausbildung von Fibrillen aufgrund von (teil-)entfalteten Proteinen (rechts).

des Dimers von Insulin. Die Dimerisierung wird durch die Ausbildung von β -Strängen zwischen den Aminosäuren B24 und B28 der beiden Monomere sowie durch van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Aminosäuren der α -Helix und den β -Strängen der Polypeptidkette B begünstigt.^[23] Das Aufheizen einer Insulinlösung mit 100 mM Natriumchlorid und einem pH-Wert von 2 auf 60 °C führt in wenigen Minuten zur Fibrillenbildung.^[20] Im Gegensatz hierzu liegt Insulin bei einem pH-Wert von 2 nach Zugabe von Ethanol hauptsächlich als Monomer vor, und die Verzögerungsphase bis zum Einsetzen der Fibrillenbildung bei 60 °C wird enorm verlängert.^[20]

In dieser Studie wurde die Beziehung zwischen der Struktur, der Wechselwirkungen und der Dynamik von Insulin unter zwei verschiedenen Lösungsmittelbedingungen bei einem pH-Wert von 2.4 und 45 °C untersucht, zum einen in der Anwesenheit von 100 mM Natriumchlorid (NaCl) und zum anderen nach Zugabe von 20 Vol.-% deuteriertem Ethanol in Abwesenheit von Salzen. Die Dynamik von Insulin konnte mittels Neutronenspin-echo (NSE)-Spektroskopie ermittelt werden. Zusätzliche Fluoreszenz-

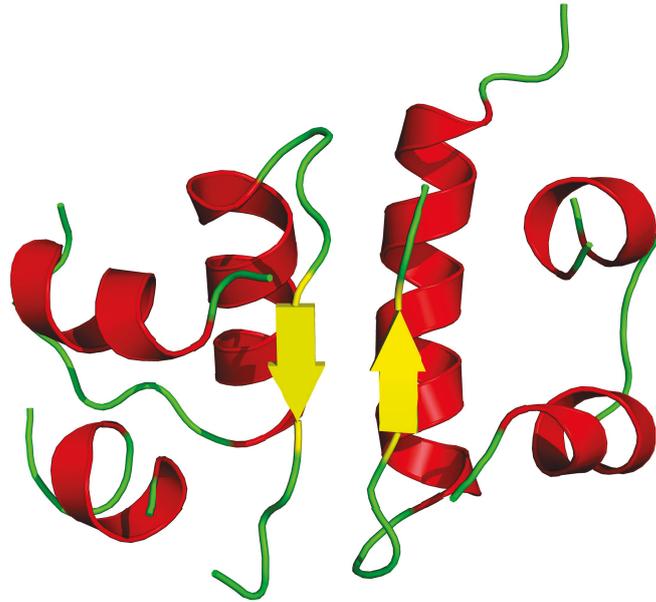


Abbildung 1.2: Dreidimensionale Struktur des Proteins Insulin (PDB ID: 1BEN). Die Abbildung zeigt die Struktur als Dimer.

spektroskopie-Messungen und Röntgen-Kleinwinkelstreuexperimente konnten den zeitlichen Verlauf der Strukturänderungen des Insulins und die entstehenden Amyloidfibrillen detektieren.

Der Einfluss des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 auf die Stabilität des Proteins Staphylokokken-Nuklease wurde in der zweiten Studie untersucht. Seit C. B. Anfinsen im Jahre 1973 den Entfaltungs- und Rückfaltungsprozess des Proteins *Ribonuklease A* studierte und veröffentlichte,^[24] wurde dem Verständnis der Beziehungen zwischen Aminosäuresequenz, Struktur, Dynamik und Faltungskinetik von Proteinen viel Aufmerksamkeit gewidmet.^[25,26] So wurden in der Vergangenheit meist nur die physikalisch-chemischen Parameter von Proteinen in verdünnten Pufferlösungen bestimmt, das heißt bei typischen Konzentrationen von wenigen mg mL^{-1} . Jedoch repräsentiert eine verdünnte Lösung nicht die Situation im Zellinneren, wo bis zu 30 % des Zellvolumens durch Makromoleküle besetzt werden.^[27,28] In diesen dicht-gepackten Umgebungen (engl.: macromolecular crowding) können Biomoleküle, wie beispielsweise Proteine, andere Eigenschaften besitzen. Häufig wird der Effekt des makromolekularen

Crowdings durch das Ausschlussvolumen des Biomoleküls in Anwesenheit von anderen Makromolekülen beschrieben. Hierzu wird auch die sogenannte „self-crowding“-Situation gezählt, in der die Konzentration der Proteine so hoch ist, dass es zu einer Einschränkung des verfügbaren Volumens (engl.: confinement) für das einzelne Protein kommt.^[27-36]

Während in den letzten Jahren der Effekt des makromolekularen Crowdings auf die Stabilität und den Faltungsprozess von Proteinen intensiv untersucht worden ist, ist sehr wenig über den Effekt auf das p, T -Stabilitätsdiagramm und die druckinduzierte Faltungskinetik bekannt.^[37-39] Druck ist, neben der Temperatur und dem chemischen Potential bzw. der Aktivität des gelösten Stoffs und des Lösungsmittels, ein entscheidender Parameter um eine vollständige Beschreibung des thermodynamischen Verhaltens von biologischen Systemen geben zu können.^[40-50] Die Ergebnisse von druckabhängigen Untersuchungen führen häufig zu einem besseren Verständnis der volumetrischen und solvatisierenden Eigenschaften. Daher gewinnt man hieraus auch detaillierte Informationen über Stabilität und Funktion von Proteinen sowie über intra- und intermolekulare Wechselwirkungen, Faltungsprozesse und Aggregationsmechanismen.^[40-54] Auf der anderen Seite sind druckabhängige Untersuchungen von Wichtigkeit, um ein grundlegendes Verständnis zu erlangen, wie lebende Organismen extreme Umwelteinflüsse überleben, wie sie beispielsweise in der Tiefsee vorzufinden sind.^[41] Des Weiteren können Cosolventien die temperatur- und druckabhängigen physikalisch-chemischen Eigenschaften von Protein beeinflussen.^[55,56] Die Anwesenheit von Makromolekülen in der unmittelbaren Umgebung von Proteinen hat allein schon aufgrund des Ausschlussvolumens einen Einfluss auf die Energiehyperfläche der Proteinfaltung. Dies gilt, wenn die Proteinfaltung zu einer kompakteren Form der Polypeptidketten führt. Da Druck direkt mit einer Volumenänderung verknüpft ist, stellt er einen idealen Parameter zum Studium des Einflusses von makromolekularen Crowdern auf Proteine dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FT-IR)-Messungen durchgeführt, um den Effekt des makromolekularen Crowdern Ficoll PM 70 (Abbildung 1.3) auf das p, T -Stabilitätsdiagramm, thermodynamische Eigenschaften und die Faltungskinetik des Proteins *Staphylokokken-Nuklease* (SNase) zu untersuchen. Thermodynamische Parameter des Proteins in Abwesenheit und Anwesenheit

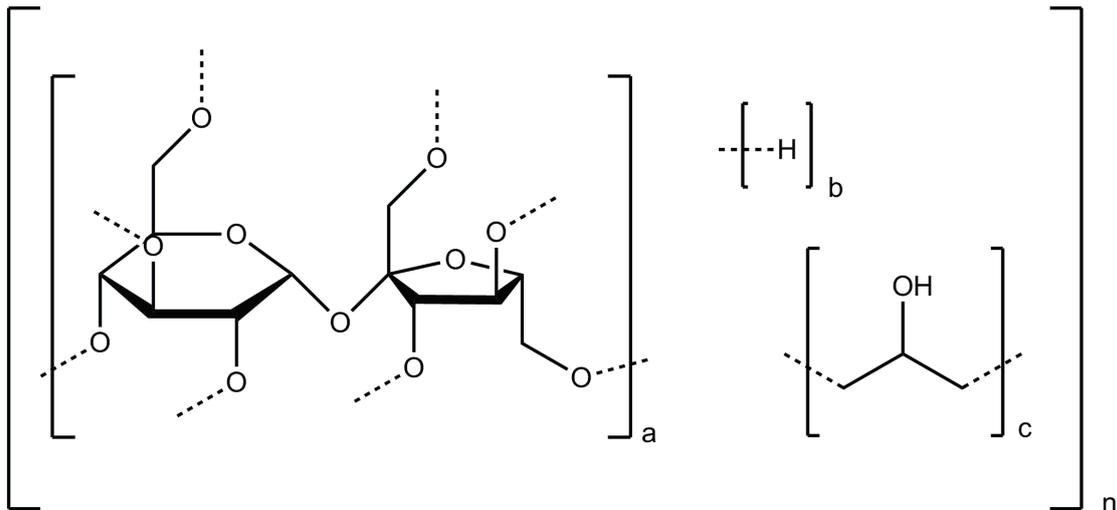


Abbildung 1.3: Strukturformel des verwendeten makromolekularen Crowders Ficoll PM 70.

des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 wurden zusätzlich durch kalorimetrische Messungen bestimmt. Die resultierenden Ergebnisse, die einen großen Temperatur- und Druckbereich abdecken, wurden zusätzlich mit theoretischen Modellen verglichen und bewertet.

SNase ist ein kleines, monomeres Protein mit nur einer Domäne. Es besteht aus 149 Aminosäuren und besitzt eine molare Masse von 16.8 kDa. Das Enzym SNase katalysiert die Hydrolyse des Phosphatrückgrats der DNA und RNA unter der Bildung von Nukleosid-3'-mono- und diphosphaten. Das Protein ist gut charakterisiert und weist eine reversible Entfaltung auf.^[34,46,54] Abbildung 1.4 zeigt die von Hynes und Fox im Jahre 1991 publizierte dreidimensionale Röntgenkristallstruktur des Proteins SNase.^[57] Die Röntgenkristallstrukturanalyse ergab einen Anteil von 26.2 % α -Helices, 24.8 % β -Faltblätter, 26.8 % β -Schleifen, 8.7 % ungeordnete Polypeptidketten und 7.4 % lange, gerade Polypeptidketten. Des Weiteren konnten 6.1 % der Proteinstruktur nicht genau zugeordnet werden. Der verwendete makromolekulare Crowder Ficoll PM 70 ist ein stark verzweigtes und leicht wasserlösliches Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer mit einer molaren Masse von 70 kg mol^{-1} . Die entstehenden Makromoleküle nehmen eine halbstarre ellipsoidförmige Struktur mit einem hydrodynamischen Radius von ungefähr 5 nm ein. Die Eignung des makromolekularen Crowders wurde in einer temperatur- und druckabhängigen Strukturuntersuchung mittels Röntgen-

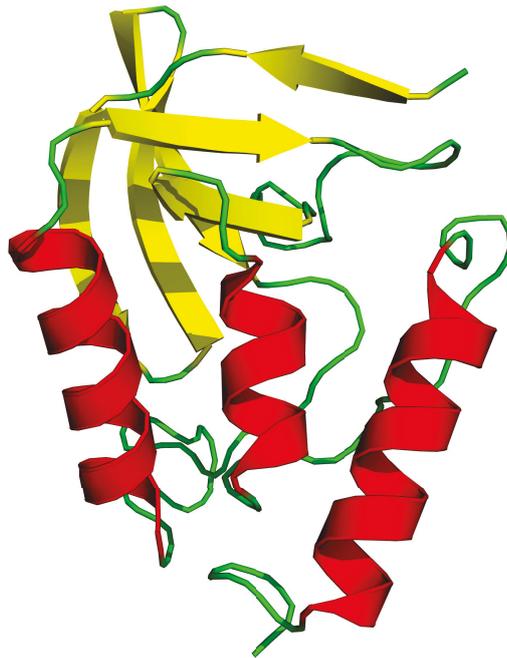


Abbildung 1.4: Dreidimensionale Struktur des Proteins SNase (PDB ID: 1STN).

Kleinwinkelstreuung (engl.: small-angle X-ray scattering; SAXS) überprüft.

Nachdem die oben beschriebenen zwei Studien ausschließlich zur Bestimmung von strukturellen und dynamischen Eigenschaften von Proteinen dienten, wurde in der dritten Studie im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von doppelt-lipidiertem N-Ras-Proteinen auf das drucksensitive Verhalten der Modellbiomembran 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC) untersucht. Es existieren mehr als 150 Proteine, die zur menschlichen Ras-Superfamilie der kleinen Guanosintriphosphatasen (GTPasen) gehören. Diese werden aufgrund ihrer Sequenz und Funktionalität in fünf Familien unterteilt: Ras, Rho, Rab, Ran und Arf.^[58] Kleine GTPasen fungieren als GDP/GTP-regulierender molekularer Schalter, indem diese zwischen einer inaktiven GDP-gebundenen und einer aktiven GTP-gebundenen Form wechseln. Des Weiteren sind kleine GTPasen an Signaltransduktionswegen, die Zellwachstum, -differenzierung und -apoptose regulieren, beteiligt.^[59] Eine wichtige biochemische Eigenschaft der Regulation der Signalweiterleitung, die ausgehend von zell- oder membranständigen Rezeptoren zu intrazellulären Signalkaskaden führt, ist die posttranslationale Modifikation des Proteins Ras mit Lipidmolekülen, die als Anker in der zytosolischen Seite der Zell-

membran dienen.^[60] Die onkogenen Proteine Rat sarcoma (Ras) sind die Gründungsmitglieder der Ras-Superfamilie. Aufgrund der entscheidenden Rolle in der menschlichen Krebsentstehung stehen Ras-Proteine im Fokus des Interesses bei biochemischen, biophysikalischen und zellbiologischen Untersuchungen. Ungefähr 30 % aller auftretenden Tumore sind auf Punktmutationen im Ras-Protein zurückzuführen.^[61] Hierbei kommt es zum Verlust der GTPase-Aktivität des Ras. Auch die Zugabe von GTPase-aktivierenden Proteinen (GAP) kann diese Aktivität nicht mehr herbeiführen, so dass der Wechsel von der GTP-gebundenen Form zur GDP-Form blockiert ist. Die Folge ist eine Akkumulation von aktiven Ras-Proteinen, und somit entsteht ein permanentes wachstumstimulierendes Signal in der Zelle.

In dieser Arbeit wurde nun das Protein N-Ras, dessen Name aus dem ursprünglichen Nachweisort in menschlichen Neuroblastomzellen resultiert, verwendet. Die posttranslationale Modifikation am C-Terminus, auch hypervariabler Bereich (engl.: hypervariable region; HVR) genannt, besteht aus einem Linker sowie den Hexadecyl (HD)- und Farnesyl (Far)-Ankermotiven (Abbildung 1.5). Um einen strukturellen Einblick des Einflusses der Verankerung des Proteins in die Lipiddoppelschicht zu erhalten, wurden die Neutronenreflektometrie und die interne Totalreflexionsfluoreszenzspektroskopie verwendet. Vorausgehende Arbeiten konnten zeigen, dass die direkte Lipidumgebung eine wichtige Rolle bei der Regulation der Signalvermittlung durch Ras-Proteine spielt.^[60,62–67] Sogenannte „lipid rafts“ bilden Cholesterin-reiche Mikrodomänen in der Zellmembran, die als Signalplattformen dienen, um extrazelluläre Effekte mit intrazellulären Signalkaskaden zu verbinden.^[68,69] Zusätzlich wird der Grenzfläche zwischen den Domänen eine besondere Rolle zugeordnet.^[70,71] Mittels Rasterkraftmikroskopie (engl.: atomic force microscopy; AFM) wurde festgestellt, dass das Protein N-Ras HD/Far in einer neutralen raft-Modellmembran (DOPC/DPPC/Cholesterin 1:2:1) zunächst in die flüssig-ungeordnete Phase l_d der Membran inkorporiert und anschließend an die l_d/l_o -Grenzfläche diffundiert. In dieser Studie wurde das Phospholipid DOPC, das sich bei 25 °C in der fluiden Phase befindet ($T_m = -17$ °C), als Lipiddoppelschicht auf einem festen Trägermaterial adsorbiert und anschließend mit dem Protein N-Ras HD/Far versetzt. Zusätzlich wurde Druck auf das System angewendet. Durch Druckapplikation kann die Packungsdichte der Modellbiomembran kontinuierlich erhöht werden, so dass

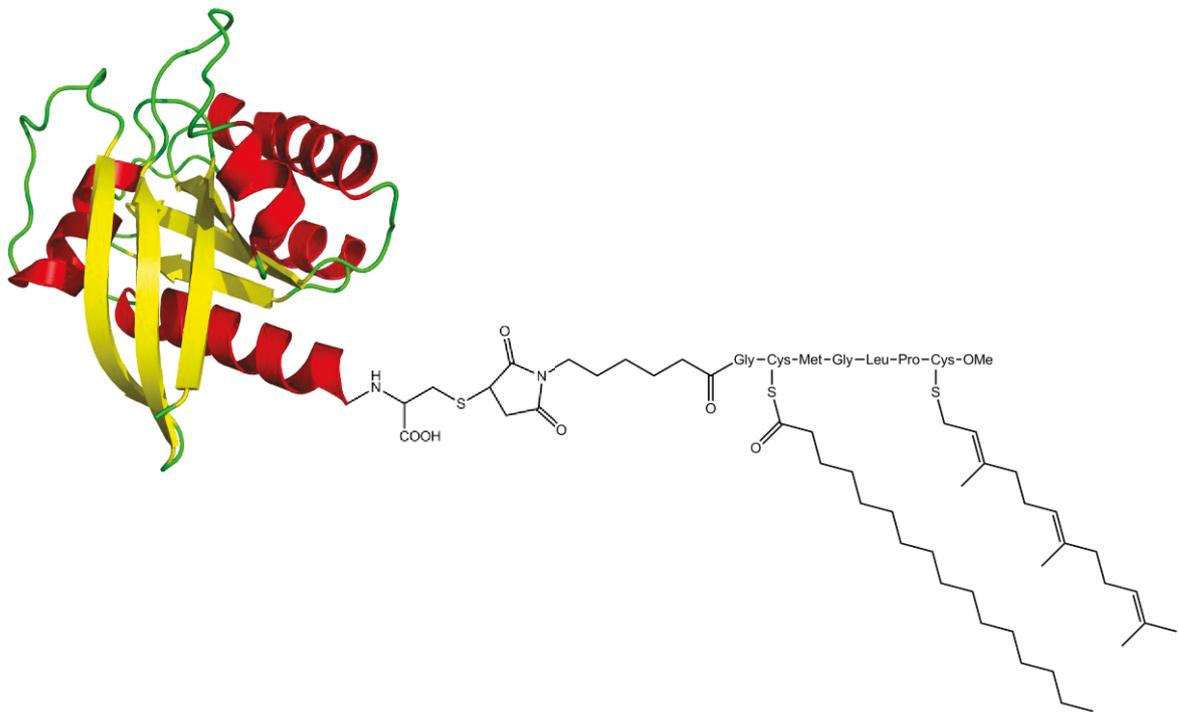


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des doppelt-lipidierten Proteins N-Ras HD/Far. Die strukturelle Darstellung des Proteins N-Ras entspricht dem PDB Eintrag 4Q21. Die posttranslationale Modifikation am C-Terminus, auch hypervariabler Bereich (engl.: hypervariable region; HVR) genannt, besteht aus einem Linker sowie den Hexadecyl(HD) und Farnesyl(Far)-Ankermotiven.

sich die Eigenschaften der flüssig-ungeordneten Phase l_d der Lipiddoppelschicht denen der flüssig-geordneten Phase l_o annähern.

Die vierte Studie im Rahmen dieser Arbeit ermöglichte einen Einblick in die außergewöhnliche Struktur der Lipidmembran von Archaeen. Zelluläre Lebewesen werden in drei verschiedene Domänen eingeteilt: Bakterien, Eukaryoten und Archaeen. Die Archaeen (aus dem griech., „uralt“, „ursprünglich“) sind Extremophile, das heißt, sie können sich an extreme Bedingungen anpassen. Der *Sulfolobus acidocaldarius* ist ein thermoacidophiles Archaeon und sein natürliches Habitat ist die Umgebung von Vulkanen bei sehr hohen Temperaturen (65 – 90 °C) und pH-Werten zwischen 1 und 5. Die Plasmamembran der Archaeen besteht zu über 90 % aus bipolaren Tetraetherlipiden (engl.: bipolar tetraether lipids; BTLs), die eine entscheidende Rolle in der bemerkenswerten Stabilität gegenüber extremen Wachstumsbedingungen spielen.^[72] Die

bipolaren Tetraetherlipide, die der *Sulfolobus acidocaldarius* enthält, sind in der polaren Lipidfraktion E (engl.: polar lipid fraction E; PLFE) zu finden.^[73] Die PLFE ist eine Mischung aus ~90 % Glycerol-dialkyl-nonitol-tetraether (GDNT) und ~10 % Glycerol-dialkyl-glyceryl-tetraether (GDGT) (Abbildung 1.6). Der hydrophobe Teil dieser Lipide besteht aus zwei Diphytanylketten mit einer Kettenlänge von je 40 Kohlenstoffatomen. In Abhängigkeit der Wachstumsbedingung kann jede Alkylkette bis zu 4 Cyclopentanringe enthalten.^[74] Die PLFE kann sowohl multilamellare als auch unilamellare Vesikel in verschiedenen Größen (~0.65 – 150 μm) ausbilden,^[75,76] aber auch planare Membranen.^[77] Im Vergleich zu herkömmlichen Liposomen, die aus Diestern oder Diethern bestehen, weisen PLFE-Liposome bemerkenswerte physikalische Eigenschaften auf. Hierzu gehören unter anderem die geringe Protonenpermeabilität, die geringe Farbstofffreisetzung,^[75,78] eine hohe Stabilität gegenüber Autoklavierung und Ca^{2+} -induzierter Vesikelfusion,^[79,80] eine dicht-gepackte und rigide Membranstruktur^[76] sowie nur kleine Enthalpie- und Volumenänderungen während Phasenübergängen.^[81,82]

Um einen detaillierteren Einblick in die physikalische Natur der PLFE-Lipidmembranen zu erlangen, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von hohen hydrostatischen Drücken auf die Membrandicke, die Rauigkeit und die Streulängendichte einer PLFE-Lipidmembran getestet. Die PLFE-Lipidmembran wurde hierzu an eine Siliziumoberfläche adsorbiert und mithilfe der Neutronenreflektometrie (NR) bei 25 °C und 50 bar bzw. 55 °C und Drücken bis 1800 bar untersucht. Neben Volumenfluktuationen ist die Kenntnis der Membrandicke ein wichtiger Faktor, um die Permeabilität von gelösten Substanzen entlang der Lipidmembran zu bestimmen.^[84] Die lamellare Schichtdicke d eines PLFE-Vesikels in Lösung wurde bereits mithilfe der Röntgen-Kleinwinkelstreuung in Abhängigkeit der Temperatur untersucht.^[81] Während die Röntgen- bzw. Neutronen-Kleinwinkelstreuung vorwiegend Informationen über die Größe der Vesikel und deren multilamellare Struktur in Lösung gibt, kann aus der Röntgen- bzw. Neutronenreflektometrie das Streulängendichteprofil des Lipids senkrecht zur Oberfläche relativ leicht ermittelt werden. Hier profitiert die Neutronenreflektometrie zusätzlich vom starken Streukontrast zwischen der untersuchten Grenzfläche (PLFE-Lipidmembran, adsorbiert an einer Siliziumoberfläche) und ihrer direkten Umgebung (D_2O). Druck ist auch hier ein geeigneter Parameter um physikalische Eigenschaften von Biomolekülen zu bestimm-

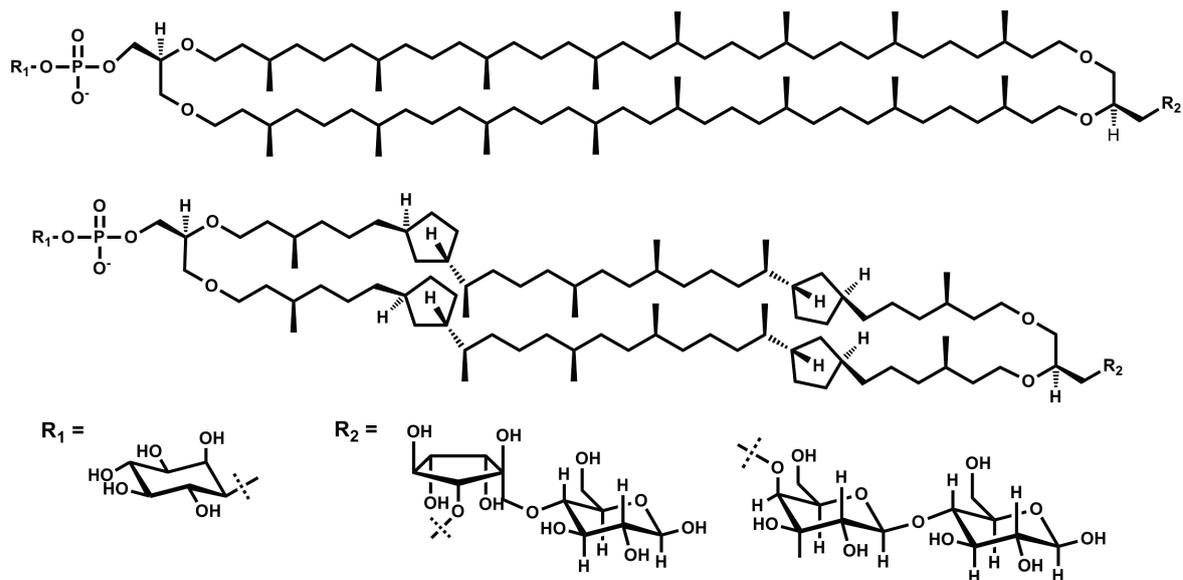


Abbildung 1.6: Strukturformeln der bipolaren Tetraetherlipide in der polaren Lipidfraktion E (PLFE) des Archaeons *Sulfolobus acidocaldarius*. Der hydrophobe Teil der Lipide besteht aus zwei Alkylketten mit je 40 Kohlenstoffatomen, die entweder in einer offenkettigen Form (oben) vorliegen oder bis zu vier Cyclopentanringe (unten) enthalten können. Die hydrophilen Kopfgruppen sind zum einen Inosit (Cyclohexanhexanol; R_1) und zum anderen im Fall des Glycerol-dialkyl-nonitol-tetraethers (GDNT) β -D-Glucopyranose (R_2 links) oder im Fall des Glycerol-dialkyl-glycerol-tetraethers (GDGT) β -D-Galactosyl- β -D-glucopyranose (R_2 rechts).^[83]

men. Unter isothermen Bedingungen führt Druck ausschließlich zu Volumenänderungen des Systems, ohne dabei die thermische Energie zu ändern. Der Druckeffekt auf herkömmliche Vesikel ist bereits ausgiebig untersucht worden. Jedoch ist das druckabhängige Verhalten von bipolaren Tetraetherlipiden weitgehend unbekannt.

Etwas entfernt von der Grundlagenforschung wurden schließlich in einer anwendungsorientierten Studie die temperatur- und druckinduzierten Kristallphasenübergänge der Triacylglycerole aus Kakaobutter untersucht. Triacylglycerole (TAG) resultieren aus der dreifachen Veresterung von Glycerin mit Fettsäuren. Diese Verbindungsklasse ist vorwiegend in Fetten und fetten Ölen vorzufinden. Triacylglycerole spielen in der Industrie eine entscheidende Rolle. Beispielsweise besteht fertige Schokolade zu 25 – 36 % aus Kakaobutter (lat.: Oleum Cacao), die fast ausschließlich aus Triacylglycerolen besteht. Kakaobutter ist entscheidend für Eigenschaften der Schokolade, wie Glanz, Struktur oder Geschmack.^[85] Neben kleinen Mengen an freien Fettsäu-

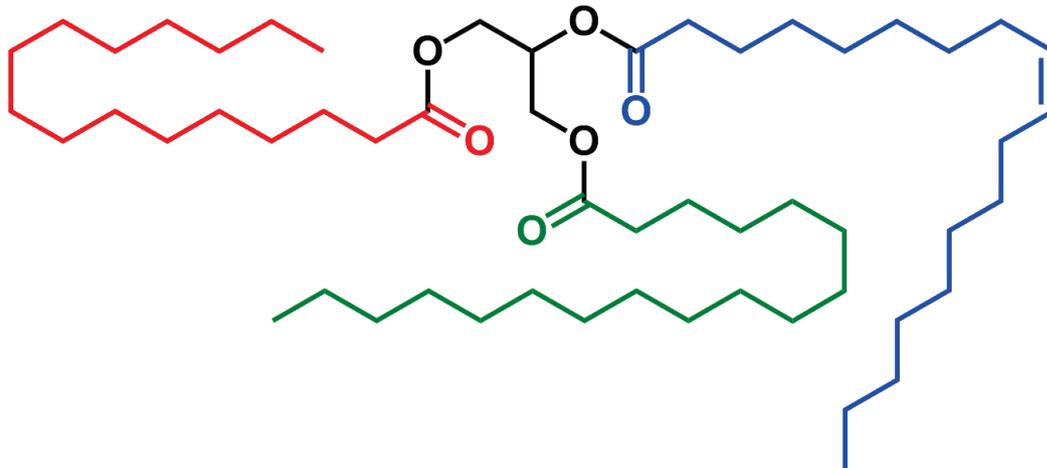


Abbildung 1.7: Strukturformel des Triacylglycerols, 1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl-glycerol (POS).

ren, Mono- und Diacylglycerolen sind die drei Triacylglycerole 1,3-Dipalmitoyl-2-oleoyl-glycerol (POP), 1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl-glycerol (POS; Abbildung 1.7) und 1,3-Distearoyl-2-oleoyl-glycerol (SOS) zusammengerechnet mit über 80 % die Hauptbestandteile der Kakaobutter.^[86]

Bei der Herstellung von Schokolade ist die richtige Wärmebehandlung (engl.: tempering) während des Kristallisationsprozesses von enormer Wichtigkeit, da hierbei rheologische und weitere physikalische Eigenschaften festgelegt werden.^[87] Die entstehenden Eigenschaften sind eng mit der auskristallisierten Phase der Kakaobutter verknüpft. Der Polymorphismus von Kakaobutter wird durch 6 verschiedene Kristallphasen beschrieben.^[88] Schmelzpunkte und die genaue Nomenklatur der einzelnen Kristallphasen werden in der Literatur dennoch unterschiedlich beschrieben. Die Nomenklatur von Lovegren et al.^[88] beschreibt die Kristallphasen mit römischen Zahlen von I bis VI, wobei die Kristallphasen nach steigendem Schmelzpunkt sortiert sind. I beschreibt die instabilste und V die stabilste Kristallphase der Kakaobutter. Bei der Herstellung der Schokolade wird gezielt Kristallphase V erzeugt, da diese über die gewünschten physikalischen Eigenschaften verfügt und eine lange Lagerzeit ermöglicht.^[86] Eine direkte Kristallisation der aufgeschmolzenen Kakaobutter bzw. Schokolade in die gewünschte Kristallphase V ist mit langen Kristallisationszeiten verbunden und somit unwirtschaftlich. Daher wird in der Industrie die Schmelze so stark abgekühlt, dass die Kakaobutter in Kristallphase II oder III auskristallisiert. Anschließend wird durch erneutes Erwärmen

eine Kristallphasenumwandlung in Kristallphase V erzielt und somit das gewünschte Endprodukt erreicht.^[87] Eine schlechte Wärmebehandlung während der Kristallisation der Kakaobutter kann die Lagerzeit der Schokolade drastisch verkürzen, und ein weißer, unappetitlicher Film bildet sich auf der Schokolade.^[89] Diese Fettkristallisation (engl.: fat bloom) an der Oberfläche wird häufig mit der Kristallphasenumwandlung von V nach VI in Verbindung gebracht.^[85,90] Während die temperatur-gesteuerte Kristallisation von Kakaobutter, der Einfluss von Inhibitoren, die Charakterisierung der Einzelkomponenten und der Einsatz von Kakaobutteräquivalenten intensiv untersucht worden ist^[87,91,92], ist der Einfluss von Druck bisher ohne Berücksichtigung geblieben.

In dieser Studie wurde der Einfluss von hydrostatischen Drücken bis 2000 bar auf die Kristallphasen von Kakaobutter bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Die resultierenden Diffraktogramme aus der Röntgen-Klein- und Weitwinkelstreuung wurden anhand der auftretenden Bragg-Reflexe analysiert und den verschiedenen Kristallphasen der Kakaobutter zugeordnet.

2 Probenpräparation

2.1 Insulin

Die verwendeten Chemikalien (Deuteriumoxid (D_2O), Deuteriumchlorid (DCl), Natriumchlorid (NaCl), Thioflavin T (ThT) und Ethanol- d_6 (EtOD)) und das nicht-deuterierte Protein Rinderinsulin wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Deutschland) erworben und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Das Protein Insulin wurde in D_2O gelöst und durch Zugabe kleiner Mengen einer konzentrierten DCl-Lösung auf einen pD-Wert von 2.4 ± 0.1 eingestellt. Für jede Probe wurde der pD-Wert mit einer herkömmlichen pH-Elektrode, unter Berücksichtigung des Korrekturterms zwischen pD und pH von 0.4, eingestellt.^[93] Die verwendeten Proben wurden vor jeder Messung frisch präpariert und für alle verwendeten Methoden (NSE-Spektroskopie, Fluoreszenzspektroskopie und Röntgen-Kleinwinkelstreuung) identisch in Bezug auf Proteinkonzentration, Lösungsmittel, pD-Wert und der Zugabe der Cosolventien (100 mM NaCl bzw. 20 Vol.-% EtOD) hergestellt.

2.2 Staphylokokken-Nuklease (SNase) und makromolekulare Crowder

Das untersuchte Protein *Staphylokokken-Nuklease* (SNase) wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. C. A. Royer (Centre de Biochimie Structurale, Montpellier, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Details der Synthese und Aufreinigung können in Referenz^[94] nachgelesen werden. Die Messungen wurden bei einem pD-Wert von 5.5 durchgeführt, da bisherige Hochdruck-Untersuchungen an SNase in verdünnten Lösungen vorwiegend unter diesen Bedingungen durchgeführt worden sind

und somit ein Vergleich möglich ist.^[95–98] Der pD-Wert wurde mit einer herkömmlichen pH-Elektrode eingestellt, und dem abgelesenen pH-Wert wurde ein Korrekturterm von 0.4 hinzu addiert.^[93] Der verwendete Puffer, Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan (BisTris) sowie die makromolekularen Crowder Ficoll PM 70 (Poly(sucrose-co-epichlorhydrin)) und Dextran 70 (vom *Leuconostoc* spp.) wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Deutschland) erworben und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

1, 15 und 30 gew.-%ige Lösungen der makromolekularen Crowder Ficoll PM 70 und Dextran 70 wurden in 20 mM BisTris-Pufferlösung (pH 5.5) hergestellt und mittels Röntgen-Kleinwinkelstreuung vermessen. Für die FT-IR-Messungen wurde das Protein SNase in D₂O gelöst und für eine Stunde auf 40 °C aufgeheizt. Um einen vollständigen H-D-Austausch zu gewährleisten, wurde die Probe über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Die überstehende Lösung wurde mithilfe eines Porenfilters (Milipore Centrifugal Filter Units, MWCO = 10 kDa) abzentrifugiert (4 °C, 14000 g) und dreimal mit jeweils 500 µL einer 20 mM BisTris-Pufferlösung (pD 5.5) gewaschen. Anschließend wurde dem Filtrückstand die entsprechende Menge einer 20 mM BisTris-Pufferlösung (pD 5.5) hinzugefügt, so dass eine 3 bzw. 15 gew.-%ige Proteinlösung resultierte. Die Deuterierung des makromolekularen Crowders wurde ebenfalls mit reinem D₂O durchgeführt. Hierzu wurde die Lösung für mehrere Stunden bei Raumtemperatur belassen und über Nacht gefriergetrocknet. Das deuterierte Ficoll PM 70 wurde anschließend als 30 gew.-%ige Lösung in 20 mM BisTris-Puffer (pD 5.5) dem Protein hinzugefügt. Die Probenpräparation für die kalorimetrischen Messungen wurde analog zu der der FT-IR-Messungen durchgeführt, jedoch wurde hierbei das Protein nicht auf 40 °C aufgeheizt. Für die dynamische Differenzkalorimetrie wurde eine Proteinkonzentration von 0.3 Gew.-% und für die Druck-Perturbations-Kalorimetrie eine Proteinkonzentration von 0.5 Gew.-% verwendet, jeweils in Abwesenheit und Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 mit einer Konzentration von 30 Gew.-%.

2.3 N-Ras HD/Far GppNHp und DOPC

Das doppelt-lipidierte Protein Neuroblastoma-*ras* (N-Ras) mit dem Hexadecyl- und Farnesylankermotiven (HD/Far) in der nicht-hydrolysierbaren, aktiven Form (GppNHp) wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. H. Waldmann (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Details der Synthese, Aufreinigung und posttranslationalen Proteinmodifikationen können in den Referenzen^[99,100] nachgelesen werden.

Die verwendeten Chemikalien (Deuteriumoxid (D_2O), Deuteriumchlorid (DCl), Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan (BisTris), 6-Dodecanoyl-N,N-dimethyl-2-naphthylamin (LAURDAN)) wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Schnellendorf, Deutschland) und das verwendete Phospholipid 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC) wurde von der Firma Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, Al, USA) erworben und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Der für die Neutronenreflektivitätsmessungen verwendete Silizium-Wafer (Siliziumverarbeitung Andrea Holm, Tann, Deutschland) wurde mit einer Mischung aus Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Ammoniak (NH_3) und Wasser (1:1:4) bei 70 °C für 15 min gereinigt und anschließend intensiv mit destilliertem Wasser abgespült. Die Kleinteile der inneren Probenzelle, die in Kontakt mit der Probenlösung sind, wurden mithilfe einer 2 vol.-%igen Hellmanex II-Lösung (Hellma Analytics, Müllheim, Deutschland) von Verunreinigungen befreit.

3.5 mg DOPC wurden in 1 mL Chloroform gelöst, intensiv durchmischt und mit Inertgas getrocknet, so dass sich ein dünner Lipidfilm am Rand des Probengefäßes gebildet hat. Der entstandene DOPC-Film wurde in 1 mL D_2O aufgenommen. Durch intensives Durchmischen und 15-minütiger Ultraschallbehandlung wurden Vesikel hergestellt. Anschließend wurde die Lösung auf eine Konzentration von 0.5 mg mL⁻¹ durch Zugabe von weiteren 6 mL D_2O eingestellt. Zur Herstellung von kleinen, unilamellaren Vesikeln (engl.: small unilamellar vesicles; SUV) wurde die Lösung jeweils zweimal intensiv durchmischt und mit Ultraschall behandelt (je 15 min).^[101–103] Die innere Probenzelle der Hochdruck-Neutronenreflektivitätszelle wurde mit 6 mL der DOPC-Lösung befüllt und anschließend für 90 min bei 40 °C im Wasserbad inkubiert. Die auf dem Silizium-

Wafer gespreitete DOPC-Doppelschicht wurde anschließend von nicht adsorbierten Vesikeln durch zweimaliges Spülen mit je 6 mL D₂O befreit. Für die Druckmessungen wurde die Messzelle mit 6 mL Pufferlösung (20 mM BisTris, 5 mM MgCl₂, pD 7.5) befüllt. BisTris weist ein sehr geringes Reaktionsvolumen auf, so dass eine druckinduzierte pH-Wertveränderung vernachlässigt werden kann.^[104]

Die verwendete N-Ras HD/Far GppNHp-Lösung wurde mit einer finalen Konzentration von 0.01 mg mL⁻¹ hergestellt. Hierzu wurde das Protein (Stammlösung: $c = 19.59$ mg mL⁻¹) langsam auf Eis aufgetaut und anschließend 3.1 μ L der Stammlösung mit 5996.9 μ L Pufferlösung vermischt. Die resultierende Lösung wurde bei Raumtemperatur über die adsorbierte DOPC-Doppelschicht im Inneren der Probenkammer gefüllt. Die Inkubationszeit betrug 2 h.

Die Probenpräparation für die Messung der internen Totalreflexionsfluoreszenz (TIRF) wurde analog zur Neutronenreflektivität durchgeführt. Das verwendete Quarzprisma wurde analog zum Silizium-Wafer gereinigt. Zur Charakterisierung der Lipidmembran wurde der extrinsische Fluorophor LAURDAN in einem molaren Verhältnis von 1:50 hinzugegeben. Das Protein wurde mit dem extrinsischen Fluorophor BODIPY markiert. Das molare Verhältnis zwischen Protein und Fluorophor betrug hierbei 1:2.

2.4 Lipidmembran der Archaeen

Die untersuchte Lipidmembran der Archaeen, die sogenannte polare Lipidfraktion E (engl.: polar lipid fraction E; PLFE), wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. P. L.-G. Chong (Department of Biochemistry, Temple University School of Medicine, Philadelphia, PA, USA) zur Verfügung gestellt. Die PLFE wurden aus Zellen des *Sulfolobus acidocaldarius* (ATCC No. 49426; American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) unter aeroben und heterotrophen Bedingungen bei einer Wachstumstemperatur T_g von 80 °C und einem pH-Wert von ungefähr 2.5 extrahiert. Details der Synthese und Aufreinigung können in den Referenzen^[73,105] nachgelesen werden.

Für die Messungen wurden 1 mg lyophilisiertes PLFE ($T_g = 80$ °C) in 1 mL Wasser dispergiert, anschließend bei einer Temperatur von 65 °C gelöst und intensiv durchmischt.

Zur Homogenisierung und Ausbildung von multilamellaren Vesikeln (MLV) wurde die Probe für 15 min mit Ultraschall behandelt, gefolgt von fünf Gefrier-Tau-Zyklen. Die Extrusion bei 65 °C durch eine Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von 100 nm wandelte die MLV in kleine, unilamellare Vesikel (SUV) um. Die Ausbildung der Lipidmembran an der Oberfläche des Silizium-Wafers erfolgte durch Aufbrechen der adsorbierten Vesikel (engl.: vesicle rupture). Hierzu wurde die SUV-Lösung auf den Wafer gespreitet und in einer Hydratationskammer bei 70 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100 % für 2 h inkubiert. Anschließend wurde die Probe vorsichtig mit Wasser abgespült, um überschüssiges Lipid und nicht gespreitete Vesikel zu entfernen. Bis zur Messung wurde die fertige Probe gefriergetrocknet.

Für Neutronenreflektivitätsmessungen wurde die auf dem Silizium-Wafer gespreitete Lipidmembran mit 6 mL D₂O rehydratisiert und danach für eine 1 h äquilibriert.

Der verwendete Silizium-Wafer wurde von Siliziumverarbeitung Andrea Holm (Tann, Deutschland) erworben. Der Wafer wurde aus einem p-Typ-Siliziumkristall mit einer (111)-Oberflächenorientierung gefertigt. Die polierte Oberfläche wurde mit einer Mischung aus Schwefelsäure (H₂SO₄) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) (7:3) für 15 min bei 80 °C gereinigt und anschließend intensiv mit destilliertem Wasser abgespült.

2.5 Kakaobutter

Die verwendete Kakaobutter wurde freundlicherweise vom Deutschen Institut für Lebensmitteltechnik e.V. (Quarkenbrück, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Kakaobutter wurde in einem Becherglas für 10 min auf eine Temperatur von 50 °C erhitzt und im flüssigen Zustand direkt in einen Probenhalter (PTFE-Dichtungsring) überführt. Anschließend wurden die jeweiligen Proben bis zur Verwendung, mindestens 12 Stunden, im Kühlschrank (~7 °C) gelagert.

3 Experimentelle Methoden

3.1 Neutronenreflektometrie

Die Reflektometrie dient zur Bestimmung des Streulängendichteprofiles von dünnen Schichten senkrecht zur Oberfläche. Typischerweise werden Lipidmembranen und Proteinadsorbate an der Wasser/Luft-Grenzfläche oder, wie in dieser Arbeit durchgeführt, an der wässrig-festen Grenzfläche untersucht. Die Grundlagen und Anwendungen der Röntgen- und Neutronenreflektometrie werden ausführlich in den Referenzen^[106–109] beschrieben.

Im Reflektivitätsexperiment wird die Reflektivität R als Funktion des Streuvektorbetrags Q gemessen. Hierbei wird die Reflektivität als Quotient der reflektierten I und eingestrahnten Intensität I_0 berechnet. Typischerweise wird der Streuvektorbetrag Q

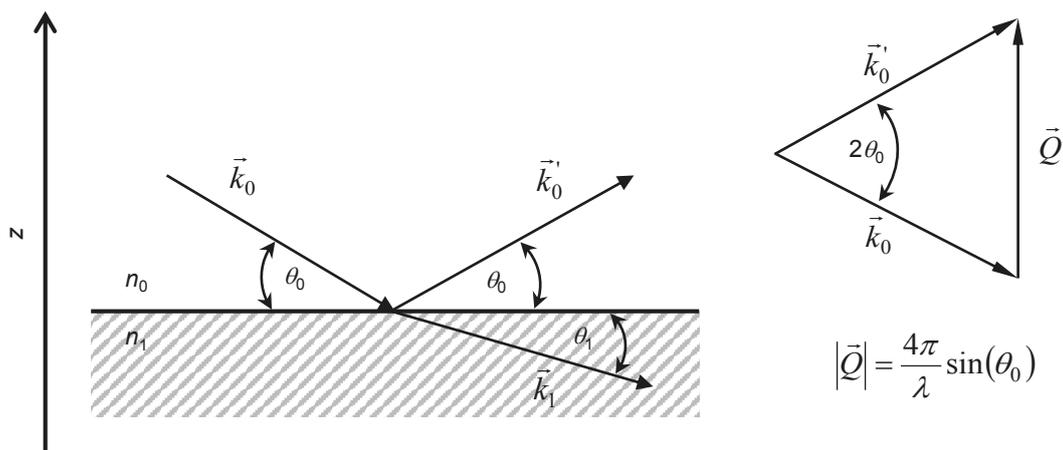


Abbildung 3.1: Streugeometrie bei Reflektivitätsmessungen. n_1 und n_2 sind die Brechungsindizes der Medien. Der Streuvektor \vec{Q} ist die Differenz der Wellenvektoren \vec{k}_0 und \vec{k}_0' des einfallenden und des reflektierten Strahls mit dem Betrag $2\pi/\lambda$. \vec{k}_1 ist der Wellenvektor des refraktierten Strahls, der unter dem Winkel θ_1 ins untere Medium eintritt.^[109]

als variable Größe verwendet, da dieser auf die Wellenlänge λ normiert ist und somit die Vergleichbarkeit der Reflektivitätskurven gegeben ist. Die Streugeometrie ist schematisch in Abbildung 3.1 dargestellt. Voraussetzung der Reflektivität ist, dass die Winkel des einfallenden und des reflektierten Strahls relativ zur Grenzfläche identisch sein müssen. Typischerweise werden Winkel kleiner 5° betrachtet. Der Brechungsindex des jeweiligen Mediums kann für Neutronenstrahlung nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$n = 1 - \delta + i\beta = 1 - \frac{\lambda^2}{2\pi}\rho_S + i\frac{\lambda}{4\pi}\mu_n \quad (3.1)$$

Die Streulängendichte (SLD) ρ_S ist die Summe aller kohärenten Streulängen b_i der Atome innerhalb eines Volumenelements ΔV . μ_n ist der Absorptionskoeffizient des Mediums für Neutronen, dessen Wert für die meisten Isotope sehr klein ist und hier vernachlässigt werden kann. Die Streulänge der Kerne variiert in einem nicht-linearem Zusammenhang innerhalb des Periodensystems. Darüber hinaus weisen sogar verschiedene Isotope eines chemischen Elements einen Unterschied in den Streulängen auf. Das bekannteste und auch wichtigste Beispiel für biologische Probensysteme ist der Unterschied der Streulängen des Wasserstoffs ($b(^1\text{H}) = -0.374 \cdot 10^{-12}$ cm) und des Deuteriums ($b(\text{D}) = b(^2\text{H}) = 0.667 \cdot 10^{-12}$ cm). In der Natur ist das Isotop ^1H mit einem Vorkommen von mehr als 99.9 % ubiquitär. Diese Tatsache wird bei der Kontrastvariation ausgenutzt, indem deuteriertes Lösungsmittel verwendet wird und somit der Kontrast (Differenz der Streulängendichten zwischen Probe und Lösungsmittel) verändert werden kann.

In dieser Arbeit wurden die Messungen an der Fest/Flüssig-Grenzfläche durchgeführt. Der Brechungsindex des verwendeten Silizium-Wafers ist für Neutronen größer als der von D_2O , so dass der Neutronenstrahl durch den Silizium-Wafer einstrahlt und an der Silizium/ D_2O -Grenzfläche reflektiert und refraktiert wird. Allgemein kann die Refraktion mithilfe des Snelliusschen Brechungsgesetzes beschrieben werden:

$$n_0 \cos(\theta_0) = n_1 \cos(\theta_1) \quad (3.2)$$

Unterhalb des kritischen Winkels θ_c wird θ_1 gleich 0 und es entsteht Totalreflexion

($R = 1$). In diesem Fall gilt nach Gleichung 3.2:

$$\cos(\theta_c) = \frac{n_1}{n_0} \quad (3.3)$$

Somit lässt sich anhand des kritischen Winkels und den daraus resultierenden Brechungsindices unter Verwendung von Gleichung 3.1 die Streulängendichte des Lösungsmittels berechnen.

Oberhalb des kritischen Winkels wird das Amplitudenverhältnis von reflektierter zu einfallender Welle mit dem Reflexionskoeffizienten r_{01} der Grenzfläche beschrieben:

$$r_{01} = \frac{Q_0 - Q_1}{Q_0 + Q_1} e^{-\frac{1}{2}Q_0 Q_1 \sigma_{01}^2} \quad (3.4)$$

Aufgrund der spekulären Reflexion wird der Streuvektorbetrag Q nur durch die z -Komponente des Wellenvektors beschrieben. Während der Messung einer Reflektivitätskurve wird Q_0 gemäß folgender Gleichung über den Einfallswinkel θ_0 geändert:

$$Q_0 = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta_0) \quad (3.5)$$

Q_1 wird hier aus Q_0 und dem Streuvektorbetrag am kritischen Winkel Q_c berechnet:

$$Q_1 = \sqrt{Q_0^2 - Q_c^2} \quad (3.6)$$

Der Parameter σ_{01} beschreibt die Grenzflächenrauigkeit. Schließlich gibt das Betragsquadrat des Reflexionskoeffizienten die Reflektivität R wieder:

$$R = |r_{01}|^2 \quad (3.7)$$

Zur Auswertung der gemessenen Reflektivitätskurven wird die berechnete Reflektivität durch Variation der Strukturparameter an die experimentell erhaltene Reflektivität angepasst.

Nach Adsorption eines Probensystems an der Oberfläche des Silizium-Wafers wird der Neutronenstrahl an der Ober- und Unterseite des Adsorbats reflektiert. Das System weist nun zwei Reflexionskoeffizienten auf, nämlich r_{01} (Silizium/Adsorbat) und r_{12}

(Adsorbat/Lösungsmittel). Aufgrund der Interferenz der beiden reflektierten Neutronenstrahlen kann der Gesamtreflexionskoeffizient mit folgenden Gleichung ausgedrückt werden:

$$r'_{01} = \frac{r_{01} + r_{12}e^{iQ_1d_1}}{1 + r_{01}r_{12}e^{iQ_1d_1}} \quad (3.8)$$

Q_1 ist der Streuvektorbetrag im Adsorbat und d_1 die Schichtdicke des Adsorbats. Durch die Anwendung von Gleichung 3.8 als Rekursionsformel kann die Reflektivität eines Multischichten-Systems berechnet werden. Nach diesem Formalismus von L. G. Parratt (1954)^[110] wird zunächst gemäß Gleichung 3.8 der Reflexionskoeffizient der beiden untersten Grenzflächen bestimmt. Anschließend wird dieser mit der darüber liegenden Grenzfläche verrechnet. Dieser Vorgang wird bis zum Erreichen der obersten Grenzfläche wiederholt. Der resultierende Reflexionskoeffizient des Multischichten-Systems wird gemäß Gleichung 3.7 in die Reflektivität umgerechnet.

3.1.1 Verwendete Hochdruckzelle

Die Messungen der Neutronenreflektometrie von Probensystemen bei hohen hydrostatischen Drücken wurden in einer Hochdruckzelle durchgeführt, die von Dr. Christoph Jeworrek im Arbeitskreis von Prof. Dr. Roland Winter (Physikalische Chemie I) konstruiert wurde.^[83] Der äußere, zylindrische Zellkörper besteht aus einer Ni-Cr-Legierung (ALLVAC 718). Die maximale Zugfestigkeit des Zellkörpers bei einem Außen-zu-Innen-Durchmesser-Verhältnis von 3.4 beträgt 6028 bar. Aufgrund des verwendeten Fenstermaterials, der Al-Legierung AlMgSi1, wurde die maximale Belastbarkeit der Zelle auf einen Druck von 2500 bar begrenzt. Die Transmission für Neutronen mit einer Wellenlänge λ von 4.66 Å beträgt bei zwei eingebauten Fenstern 68.8 %.

Die innere Probenzelle enthält einen Silizium-Wafer mit einer polierten Oberfläche von ungefähr 14 cm². Für die Messung einer Reflektivitätskurve an der Flüssig/Fest-Grenzfläche wird lediglich 6 mL Probenlösung benötigt. Die Probenlösung wird durch eine flexible Membran vom druckübertragenden Medium (meistens H₂O) getrennt.

Im Gegensatz zur Beschreibung in Referenz^[83] wurde die Kombination aus Kupferring und O-Ring zur Abdichtung der Deckelverschraubung durch einen Polyoxomethylen (POM)-Dichtungsring ersetzt und das Anzugdrehmoment der M 12-Schrauben auf 69

Nm (8 kpm) erhöht. Diese Optimierungen gewährleisten die Druckstabilität über mehrere Stunden, wie sie bei Neutronenreflektometriemessungen benötigt wird.

Die hydrodynamischen Drücke wurden mit einer Handspindelpresse der Firma Nova Swiss (Effretikon, Schweiz) realisiert. Der applizierte Druck wurde mithilfe eines Drucksensors bestimmt und über eine digitale Anzeige ausgegeben. Die Temperierung der Hochdruckzelle erfolgte über einen externen Thermostaten.

3.1.2 Messungen am Forschungsreaktor HFR in Grenoble (Frankreich)

Die Neutronenreflektometriemessungen wurden an dem Reflektometer FIGARO des „Institut Laue-Langevin“ (ILL) durchgeführt.^[111] Das ILL ist Betreiber des Forschungsreaktors „High-Flux Reactor“ (HFR), der eine Flussdichte von $1.5 \cdot 10^{10}$ Neutronen $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$ bei einer thermischen Energie von 58.3 MW erzeugt.

Das FIGARO (Fluid Interfaces Grazing Angles ReflectOmeter) verwendet die Flugzeitdetektion über einen 2-dimensionalen Neutronendetektor (^3He Rohr Aluminium-Monoblock). Der Geschwindigkeitsselektor lieferte einen Wellenlängenbereich λ von 2 Å bis 20 Å. Eine Neutronenreflektivitätskurve wurde bei zwei verschiedenen Einfallswinkeln ($\theta_1 = 0.64^\circ$; $\theta_2 = 1.98^\circ$) gemessen. Hierdurch konnte eine Detektion der Intensität über einen Bereich des Streuvektorbetrags Q von 0.007 \AA^{-1} bis 0.21 \AA^{-1} realisiert werden. Die Aufnahme einer kompletten Neutronenreflektivitätskurve dauerte ungefähr 4 h. Vor jeder Messung wurden ein Höhen- und ein Theta-Winkelscan durchgeführt, um eine optimale Lage des Si-Wafers zu gewährleisten.

Die Transformation der resultierenden 2-dimensionalen Streubilder in 1-dimensionale Reflektivitätskurven (Reflektivität als Funktion des Streuvektorbetrages) sowie das Zusammenführen der Reflektivitätskurven der verschiedenen Einfallswinkel wurde mittels der frei verfügbaren Software „LAMP“ durchgeführt.^[112] Die Analyse der Neutronenreflektivitätskurve erfolgte durch Anpassung der theoretischen Reflektivitätskurven an experimentelle Daten unter Verwendung der Software „PARRATT32“ (Version 1.6.0; Helmholtz Zentrum Berlin, Deutschland).

3.1.3 Messungen am Forschungsreaktor FRM II in Garching bei München

Die Neutronreflektometriemessungen wurden an dem Reflektometer REFSANS der Forschungs-Neutronenquelle Heinz Maier-Leibnitz, die eine zentrale wissenschaftliche Einrichtung der Technischen Universität München (TUM) ist, durchgeführt.^[113] Der „Forschungsreaktor München II“ (FRM II) erzeugt eine Flussdichte von $8 \cdot 10^{14}$ Neutronen $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$ bei einer thermischen Energie von 20 MW.

Das REFSANS verwendet die Flugzeitdetektion über einen 2-dimensionalen ^3He -Neutronendetektor. Der Geschwindigkeitsselektor lieferte einen Wellenlängenbereich λ von 2 \AA bis 20 \AA . Eine Neutronenreflektivitätskurve wurde bei vier verschiedenen Einfallswinkeln ($\theta_1 = 0.3^\circ; \theta_2 = 0.6^\circ; \theta_3 = 1.4^\circ; \theta_4 = 2.8^\circ$) gemessen. Hierdurch konnte eine Detektion der Intensität über einen Bereich des Streuvektorbetrags Q von 0.003 \AA^{-1} bis 0.3 \AA^{-1} realisiert werden. Die Aufnahme einer kompletten Neutronenreflektivitätskurve dauerte ungefähr 10 h. Vor jeder Messung wurden ein Höhen- und ein Theta-Winkelscan durchgeführt, um eine optimale Lage des Si-Wafers zu gewährleisten.

Die Transformation der resultierenden 2-dimensionalen Streubilder in 1-dimensionale Reflektivitätskurven (Reflektivität als Funktion des Streuvektorbetrages) sowie das Zusammenführen der Reflektivitätskurven der verschiedenen Einfallswinkel wurde vom Instrumentenverantwortlichen Dr. Jean-Francois Moulin mit einer selbst-programmierten Software durchgeführt. Die Analyse der Neutronenreflektivitätskurve erfolgte durch Anpassung der theoretischen Reflektivitätskurven an experimentelle Daten unter Verwendung der Software „PARRATT32“ (Version 1.6.0; Helmholtz Zentrum Berlin, Deutschland).

3.2 Röntgen-Klein- und Weitwinkelstreuung

Mithilfe der Röntgen-Klein- und Weitwinkelstreuung (engl.: small/wide angle X-ray scattering; SAXS/WAXS) kann die Struktur von Molekülen in wässriger Lösung bestimmt werden. Eine ausführliche Beschreibung der Methode ist in den folgenden Referenzen^[108,109,114–117] zu finden. Aus einer Streukurve resultieren Informationen über

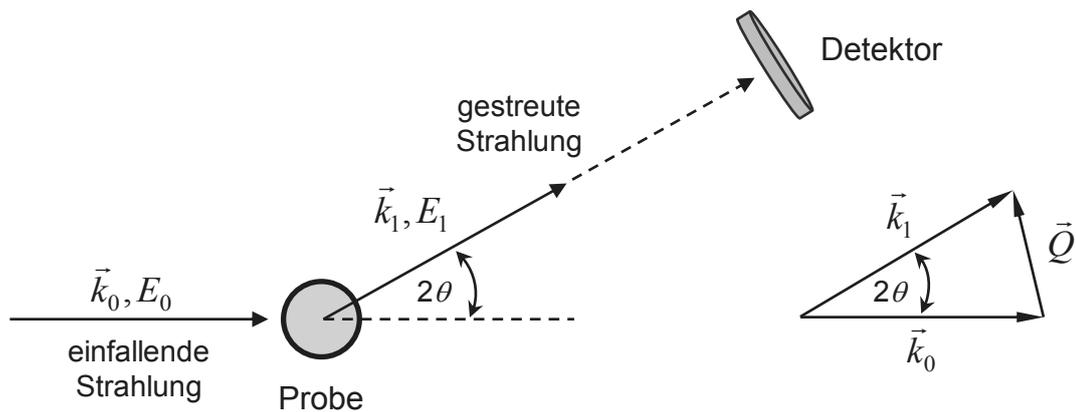


Abbildung 3.2: Links: Geometrie des Streuprozesses. Die einfallende Strahlung trifft auf die Probe. Die Intensität der gestreuten Strahlung wird in Abhängigkeit des Winkels 2θ detektiert. Rechts: Definition des Streuvektors \vec{Q} als Differenz der Wellenvektoren \vec{k}_0 der einfallenden und \vec{k}_1 der gestreuten Strahlung. Im Falle der elastischen Streuung ist der Betrag des Wellenvektors $|\vec{Q}|$ konstant, das heißt $|\vec{k}_0| = |\vec{k}_1|$.^[109]

Form, Größe und räumlichen Aufbau von streuenden Objekten in einer Größenordnung von einigen Ångström bis zu hunderten Nanometern. Im Gegensatz zur Kristallstrukturanalyse kann mithilfe der Röntgen-Klein- und Weitwinkelstreuung keine atomare Auflösung erreicht werden, dennoch besitzt die Röntgen-Klein- und Weitwinkelstreuung die Vorteile, dass keine Einkristalle gebildet werden müssen, und dass beispielsweise ein Protein in seiner natürlichen Umgebung untersucht werden kann.

Ein Streuexperiment macht intensiven Gebrauch vom Welle-Teilchen-Dualismus der Röntgenstrahlung. Während der Streuprozess und das entstehende Interferenzmuster durch Wellen beschrieben werden, operiert der Detektor im Teilchenzählmodus. Abbildung 3.2 zeigt vereinfacht die Geometrie eines Streuexperiments. Die einfallende, ebene Welle mit dem Wellenvektor \vec{k}_0 , der Energie E_0 und der Wellenlänge $\lambda = 2\pi/|\vec{k}_0|$ regt Kugelwellen an allen Positionen \vec{r} der Streuzentren innerhalb der Probe an. Es wird vorausgesetzt, dass die erste Born-Näherung gilt, das heißt, jede Welle wird nur einmal gestreut; es gibt keine Mehrfachstreuung. Des Weiteren werden nur elastische Streuprozesse betrachtet, so dass der Betrag der Streuvektoren vor und nach der Streuung gleich ist ($|\vec{k}_0| = |\vec{k}_1|$). In einem Streuexperiment wird die gestreute Intensität $I(\vec{Q})$ als Funktion des Streuvektors \vec{Q} gemessen:

$$\vec{Q} = \vec{k}_1 - \vec{k}_0 \quad (3.9)$$

Für elastische Streuung hat der Streuvektor \vec{Q} den Betrag:

$$Q = |\vec{Q}| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta) \quad (3.10)$$

Die Amplitude $A(\vec{Q})$ einer gestreuten Partialwelle wird als Integral über das Proben-
volumen berechnet :

$$A(\vec{Q}) = \int_V \rho(\vec{r}) e^{-i\vec{Q}\vec{r}} d\vec{r} \quad (3.11)$$

$\rho(\vec{r})$ ist die Elektronendichte des streuenden Teilchens an der Position \vec{r} . Der Detektor misst die Intensität $I(Q)$ die dem Betragsquadrat der Amplitude der gestreuten Partialwelle entspricht:

$$I(Q) = \left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right) = \left\langle |A(\vec{Q})|^2 \right\rangle = \left\langle \left| \int_V \rho(\vec{r}) e^{-i\vec{Q}\vec{r}} d\vec{r} \right|^2 \right\rangle \quad (3.12)$$

$\langle \dots \rangle$ beschreibt die Mittelung über alle Orientierungen. $\left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)$ ist der differentielle Streuquerschnitt. Die Streuintensität eines Teilchens mit einer konstanten Elektronendichte ρ_p in einem Lösungsmittel mit der Elektronendichte ρ_s ist durch folgende Gleichung gegeben:

$$I(Q) = (\Delta\rho)^2 \left\langle \left| \int_V e^{-i\vec{Q}\vec{r}} d\vec{r} \right|^2 \right\rangle = (\Delta\rho)^2 \left\langle |F(\vec{Q})|^2 \right\rangle \quad (3.13)$$

$\Delta\rho = \rho_p - \rho_s$ wird als Kontrast K bezeichnet und ist gegeben als Differenz der Elektronendichten des Teilchens und des Lösungsmittels. Der Formfaktor $F(\vec{Q})$ enthält Informationen über die äußere Teilchengeometrie. In einem isotropen System kann der Streuvektor durch den Streuvektorbetrag ersetzt werden.

In einem verdünnten System mit N Teilchen treten praktisch keine Wechselwirkungen zwischen den Teilchen auf. Die Positionen der Teilchen im System sind unkorreliert, und somit besitzen die gestreuten Partialwellen keine feste Phasenbeziehung zueinander, so dass die Gesamtintensität als Summe aller Intensitäten der Teilchen geschrieben werden kann.

$$I(Q) = NK^2 \left\langle |F(\vec{Q})|^2 \right\rangle \quad (3.14)$$

Eine Erhöhung der Konzentration führt zur Wechselwirkung zwischen den Teilchen. Diese werden durch den interpartikulären Strukturfaktor $S(Q)$ berücksichtigt:

$$I(Q) = NK^2 \langle |F(Q)|^2 \rangle S(Q) \quad (3.15)$$

Der interpartikuläre Strukturfaktor $S(Q)$ beschreibt die räumliche Korrelation von N individuell streuenden Teilchen mit dem Abstand r_{ij} zwischen den Teilchen i und j :

$$S(Q) = \frac{1}{N} \left\langle \sum_{i=1}^N \sum_{j \neq i}^N e^{-i\vec{Q}\vec{r}_{ij}} \right\rangle + 1 \quad (3.16)$$

Des Weiteren kann der Strukturfaktor als Fourier-Transformation der interpartikulären Paarkorrelationsfunktion $g(\vec{r})$ geschrieben werden:

$$S(\vec{Q}) = 1 + n \int [g(\vec{r}) - 1] e^{-i\vec{Q}\vec{r}} d\vec{r} \quad (3.17)$$

n gibt die Teilchenzahldichte wieder.

3.2.1 Verwendete Hochdruckzellen

Zur Messung der Röntgen-Kleinwinkelstreuung von Probensystemen bei hohen hydrostatischen Drücken wurden zwei verschiedene Hochdruck-Zellen verwendet.

Die erste Hochdruckzelle wurde von Dr. Jürgen Woenckhaus im Arbeitskreis von Prof. Dr. Roland Winter (Physikalische Chemie I) konstruiert.^[118,119] Der zylindrische Zellkörper besteht aus einer Ni-Cr-Co-Legierung (NIMONIC 90). Zwei Diamanten des Typs IIa von 1 mm Stärke und einem Durchmesser von 6 mm dienen als Fenstermaterial. Die Transmission der Hochdruckzelle mit Probe und Diamantfenstern beträgt ungefähr 30 %. Aus diesem Grund können diese Hochdruckzellen ausschließlich an Synchrotronbeamlines verwendet werden. Die Hochdruckzelle ist für Drücke bis 4 kbar und Temperaturen bis zu 80 °C ausgelegt.

Als Probenhalter dient ein PTFE-Dichtungsring mit einem Innendurchmesser von 4 mm und einer Stärke von 1 mm. Zur Abgrenzung der Probenlösung vom Druckmedium wurde der Probenhalter von beiden Seiten mit Mylar- bzw. Kaptonfolie beklebt.

Das Probenvolumen beträgt $25 \mu\text{L}$.

Die zweite Hochdruckzelle wurde von Dr. Christina Krywka im Arbeitskreis von Prof. Dr. Metin Tolan (Experimentelle Physik I) hergestellt.^[120] Der kubische Zellkörper besteht aus einer Ni-Cr-Legierung (INCONEL 718). Als Fenstermaterial dienen zwei Diamanten des Typs IIa mit einer Stärke von 1 mm und einem Durchmesser von 6 mm. Die Hochdruckzelle kann für Messungen bis 4 kbar bei einer Transmission von 30 % verwendet werden.

Der Probenhalter besteht aus rostfreiem Stahl und kann über eine separate Öffnung in der Hochdruckzelle platziert bzw. entnommen werden. Der große Vorteil der separaten Öffnung ist, dass die Position der Diamantfenster nicht verändert wird. Der Probenhalter wird auf beiden Seiten mit Mylar- bzw. Kaptonfolie beklebt, um eine Kontamination der Probe mit dem Druckmedium auszuschließen. Für eine Messung wird ein Probenvolumen von circa $55 \mu\text{L}$ benötigt.

Zur simultanen Messung der Röntgen-Klein- und Weitwinkelstreuung wurde die Hochdruck-Zelle, die von Dr. Jörg Erbes konstruiert wurde,^[121] verwendet. Der zylindrische Zellkörper besteht aus rostfreiem Stahl mit einer hohen Zugfestigkeit. Die Hochdruck-Zelle wurde bis zu einem Maximaldruck bis 2 kbar verwendet. Das ursprüngliche Fenstermaterial Beryllium wurde durch je einen Diamanten des Typs IIa mit einer Stärke von 1 mm und einem Durchmesser von 6 mm ersetzt.

Des Weiteren wurden die inneren Komponenten der Hochdruck-Zelle durch die Feinmechanikwerkstatt der Fakultät Chemie unter der Leitung von Herrn Holger Konopka so angepasst, dass PTFE-Dichtungsringe mit einer Stärke von 1 mm und einem Innendurchmesser von 4 mm als Probenhalter verwendet werden konnten. Hierdurch wird pro Messung lediglich ein Probenvolumen von $25 \mu\text{L}$ benötigt.

Die hydrodynamischen Drücke wurden bei allen drei Hochdruckzellen mit einer Handspindelpresse der Firma Nova Swiss (Effretikon, Schweiz) realisiert. Als Druckmedium wurde Wasser verwendet. Der applizierte Druck wurde mithilfe eines Drucksensors bestimmt und über eine digitale Anzeige ausgegeben. Die Temperierung der Hochdruck-

zellen erfolgte jeweils über einen externen Thermostaten.

3.2.2 Messungen am Synchrotron ESRF in Grenoble (Frankreich)

Die Röntgen-Kleinwinkelstreuexperimente wurden an der Beamline ID02 am Synchrotron „European Synchrotron Radiation Facility“ (ESRF) in Grenoble (Frankreich) durchgeführt.^[122] Die Röntgenenergie betrug 12.4 keV, was einer Wellenlänge λ von 1 Å entspricht. Zwei Undulatoren sorgten für einen Teilchenfluss von ungefähr $4 \cdot 10^{13}$ Photonen s^{-1} . Die 2-dimensionalen Streubilder der Proben wurden mit einem CCD-Detektor (engl.: charged-coupled device) aufgenommen. Der Detektor (FReLoN Kodak CCD) besaß eine Belichtungsfläche von 100 mm \times 100 mm (mit 2048×2048 Pixeln mit einer Pixelgröße von $80 \mu m^2$) und eine Bildrate von 10 Bildern pro Sekunde bei einem 4×4 Binning. Für die Experimente wurde ein Abstand zwischen Probe und Detektor von 1 m gewählt. Hierdurch konnte eine Detektion der Intensität über einen Bereich des Streuvektorbetrags Q von 0.001 \AA^{-1} bis 0.2 \AA^{-1} realisiert werden. Die Messzeit wurde zwischen 0.05 und 0.5 s variiert, so dass der Detektor vor Überbelichtung geschützt war. Um ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen, wurde vor jeder Messung jeweils dreimal der Dunkelstrom des Detektors mit zur Probenmessung analoger Messzeit detektiert.

Die resultierenden 2-dimensionalen Streubilder wurden in 1-dimensionale Streukurven (Intensität als Funktion des Streuvektorbetrages) konvertiert. Hierzu wurde eine frei verfügbare MATLAB-Software verwendet, die von Mitarbeitern der ESRF programmiert wurde. Anschließend wurden die Streukurven um den Streubeitrag des Lösungsmittels unter Berücksichtigung des spezifischen Volumens des Probensystems korrigiert.

3.2.3 Messungen am Synchrotron DESY in Hamburg

Die Röntgen-Kleinwinkelstreuexperimente wurden auch an der Beamline BW4 des Hamburger Synchrotronstrahlungslabors (HASYLAB) am Synchrotron „Deutsches Elektronen-Synchrotron“ (DESY) in Hamburg (Deutschland) durchgeführt.^[123] Diese Beamline verfügte über einen Wiggler sowie einem Silizium-(111)-Doppelkristall-Monochromator und arbeitete typischerweise mit einer Röntgenenergie von 8.98 keV,

was einer Wellenlänge λ von 1.38 \AA entspricht. Der Teilchenfluss betrug ungefähr $6.5 \cdot 10^{10}$ Photonen s^{-1} . Der verwendete CCD-Detektor (MARCCD 165) hatte eine aktive Detektionsfläche mit einem Durchmesser von 165 mm. Die Belichtungsfläche wurde mithilfe einer verjüngten Glasfaser auf eine Fläche mit 2048×2048 Pixeln ($79.1 \mu\text{m}^2$ pro Pixel) reduziert. Es wurde ein Abstand zwischen Probe und Detektor von 2.55 m gewählt, so dass eine Detektion der Intensität über einen Bereich des Streuvektorbetrags Q von 0.011 \AA^{-1} bis 0.42 \AA^{-1} möglich war. Eine typische Hochdruck-Messung dauerte 20 min. Vor jeder Messung wurde jeweils dreimal der Dunkelstrom des Detektors gemessen.

Zur Kalibrierung und Transformation der 2-dimensionalen Streubilder wurde das Softwarepaket „Fit2D“ verwendet.^[124] Anschließend wurden die 1-dimensionalen Streukurven (Intensität als Funktion des Streuvektorbetrages) um den Streubeitrag des Lösungsmittels unter Berücksichtigung des spezifischen Volumens des Probensystems korrigiert.

3.2.4 Messungen am Synchrotron DELTA in Dortmund

Röntgen-Kleinwinkelstreuexperimente wurden auch an der Beamline BL9 am Synchrotron „Dortmunder Elektronenspeicherring-Anlage“ (DELTA) in Dortmund (Deutschland) durchgeführt.^[125] Die Beamline operierte mit einem supraleitenden asymmetrischen Wiggler (SAW) und einem Silizium-(311)-Doppelkristall-Monochromator. Die verwendete Röntgenenergie betrug 10 keV, was einer Wellenlänge λ von 1.24 \AA entspricht. Der Teilchenfluss lag bei ungefähr $5 \cdot 10^9$ Photonen s^{-1} . Der eingesetzte Detektor (MAR345 image-plate scanner) war eine röntgenempfindliche Bildplatte (engl.: image plate), die über eine Belichtungsfläche mit einem Durchmesser von 34.5 cm (2048×2048 Pixel mit einer Pixelgröße von $100 \mu\text{m}^2$) verfügte. Der Abstand zwischen Probe und Detektor wurde auf 1 m eingestellt, so dass die Intensität über einen Bereich des Streuvektorbetrags Q von 0.3 \AA^{-1} bis 3.5 \AA^{-1} detektiert werden konnte. Die Messzeit betrug jeweils 20 min mit einer Hochdruckzelle.

Zur Kalibrierung und Transformation der 2-dimensionalen Streubilder wurde das Softwarepaket „Fit2D“ verwendet.^[124] Anschließend wurden die 1-dimensionalen Streukurven (Intensität als Funktion des Streuvektorbetrages) um den Streubeitrag des Lösungsmittels korrigiert.

3.2.5 Messungen am Synchrotron SOLEIL in Gif-sur-Yvette (Frankreich)

Die kombinierten Röntgen-Klein- und Weitwinkelstreuexperimente wurden an der Beamline SWING am Synchrotron SOLEIL in Gif-sur-Yvette (Frankreich) durchgeführt.^[126] Der Teilchenfluss von $8 \cdot 10^{11}$ Photonen s^{-1} bei einer Röntgenenergie von 16 keV wurde mit einem Undulator realisiert. Die Wellenlänge λ berechnet sich demnach zu 0.775 \AA . Die Detektion erfolgte über einen CCD-Detektor (Princeton Instruments) mit 2048×2048 Pixel und einer Pixelgröße von $168 \mu\text{m}^2$. Der Abstand zwischen Probe und Detektor betrug 0.6 m, somit konnte die Intensität über einen Bereich des Streuvektorbetrags Q von 0.03 \AA^{-1} bis 1.93 \AA^{-1} detektiert werden. Die Messzeit betrug 1.2 s mit einer Hochdruckzelle.

Die resultierenden 2-dimensionalen Streubilder wurden in 1-dimensionale Streukurven (Intensität als Funktion des Streuvektorbetrages) konvertiert. Hierzu wurde eine Software verwendet, die von Mitarbeitern des SOLEIL an der Beamline zur Verfügung gestellt wurde.

3.2.6 Messungen am SAXSess mc²

Röntgen-Kleinwinkelstreuexperimente wurden auch an dem Instrument SAXSess mc² der Firma Anton Paar (Graz, Österreich) durchgeführt. Das Instrument ist mit einer Röntgenröhre mit Kupfer als Anodenmaterial ausgestattet. Die Verwendung eines Bragg-Gitters führt zu einem monochromatischen Strahl mit einer Wellenlänge von 1.54 \AA . Die untersuchten Proben wurden mit Linienkollimation (20 mm Strahlbreite) in einer 1 mm-Quarzkapillare, die sich in einem temperierbaren Probenhalter (TCS 120, Anton Paar) befindet, vermessen. Eine Bildplatte (engl.: image plate) diente zur Detektion der Streustahlung. Die Intensität wurde über einen Bereich des Streuvektorbetrages Q von 0.01 \AA^{-1} bis 0.3 \AA^{-1} detektiert. Die Messzeit betrug jeweils 30 min.

Die 2-dimensionalen Streubilder wurden mittels der Software „2D-SAXSquant“ in 1-dimensionale Streukurven (Intensität als Funktion des Streuvektorbetrages) konvertiert. Die erhaltenen Rohdaten wurden auf die Primärstrahlintensität normiert und um den Streubeitrag des entsprechenden Lösungsmittels korrigiert. Die Daten wurden

mit dem gemessenen Strahlprofil entschmiert. Die Entschmierung sowie die Berechnungen der Abstandsverteilungsfunktion $p(r)$ und des Gyrationradius R_G wurden mit dem PCG Softwarepaket von O. Glatter (Universität Graz, Anton Paar, Österreich) durchgeführt.^[127]

3.3 Neutronenspinecho-Spektroskopie

Die Dynamik von Teilchen in Lösung kann mithilfe der Neutronenspinecho (engl.: neutron spin echo; NSE)-Spektroskopie detektiert werden. Eine ausführliche Beschreibung dieser Methode ist in Referenz^[128] zu finden. Die NSE-Spektroskopie ist eine hochauflösende Technik der quasielastischen Neutronenstreuung (engl.: quasi-elastic neutron scattering; QENS). Hierbei wird die zeitliche und räumliche Korrelation von Teilchen gemessen, die einen Streukontrast für Neutronen aufweisen. Eine kleine Verbreiterung der Neutronengeschwindigkeitsverteilung aufgrund der quasielastischen Streuung des Neutrons an der Probe wird als Verlust der Nettopolarisierung P der eingestrahlenen Neutronen detektiert, nachdem diese einem magnetischen Feld vor und nach der Probe ausgesetzt waren. Der größte Vorteil der NSE-Spektroskopie ist die sehr hohe Empfindlichkeit (Auflösung von Energieüberträgen im neV-Bereich) über einen großen Bereich des Streuvektorbetrags. Diese Methode nutzt die Proportionalität der gemessenen Größe (Nettopolarisation P der gestreuten Neutronen) zum Realteil der intermediären Streufunktion (engl.: intermediate scattering function; ISF) $S(Q, \tau)$:

$$P = \langle \cos(\varphi) \rangle = \int_{-\infty}^{+\infty} S(Q, \omega) \cos(\tau\omega) d\omega = S(Q, \tau) \quad (3.18)$$

Der Phasenwinkel φ beschreibt den Energieübertrag $\hbar\omega$ eines Neutrons aufgrund der quasielastischen Streuung.

$$\varphi = \gamma B_2 \frac{L_2}{m\bar{v}^3} \hbar\omega = \tau\omega \quad (3.19)$$

B_2 und L_2 sind hierbei die magnetische Flussdichte und die Länge des zweiten Magneten (siehe Abbildung 3.3). Im NSE-Experiment wird die Fourier-Zeit oder auch Spin-Echo-Zeit τ schrittweise über B_2 variiert und jeweils die Nettopolarisation durch Mittelung aller Kosinusterme der Phasenwinkel der gestreuten Neutronen bestimmt.

Die intermediäre Streufunktion $S(Q, \tau)$ ist die räumliche Fourier-Transformation der van Hove-Funktion $G(r, \tau)$:

$$S(Q, \tau) = \frac{1}{N} \sum_i \sum_j \left\langle e^{i\vec{Q}\vec{r}_i(\tau)} e^{-i\vec{Q}\vec{r}_j(0)} \right\rangle \quad (3.20)$$

$\langle \dots \rangle$ beschreibt den Ensemble-Mittelwert. $\vec{r}_i(\tau)$ und $\vec{r}_j(0)$ sind die Positionen von zwei streuenden Teilchen zur Zeit τ bzw. 0. $Q = (4\pi/\lambda) \sin(\theta)$ ist der Streuvektorbetrag mit der Wellenlänge der Neutronen λ und dem halben Streuwinkel θ . N ist die Anzahl der streuenden Teilchen in der Probe.

Die intermediäre Streufunktion kann durch zeitliche Fourier-Transformation in das Streugesetz $S(Q, \omega)$ überführt werden:

$$S(Q, \omega) = \frac{1}{\pi} \int_0^\infty S(Q, \tau) e^{-i\omega\tau} d\tau \quad (3.21)$$

In dem Fall, dass die van Hove-Funktion $G(r, \tau)$ ausschließlich durch Translationsdiffusion von Teilchen in Lösung bestimmt wird, kann die Bewegungsgleichung in erster Näherung durch die Lösung des 2. Fickschen Gesetzes beschrieben werden:

$$G(r, \tau) = \frac{1}{2\sqrt{\pi D\tau}} e^{-r^2/4D\tau} \quad (3.22)$$

Somit ergibt sich für die intermediäre Streufunktion im Falle der Translationsdiffusion eine monoexponentielle Abfallfunktion:

$$S(Q, \tau) = \int_{-\infty}^\infty \frac{1}{2\sqrt{\pi D\tau}} e^{-r^2/4D\tau} \cos(Qr) dr = e^{-DQ^2\tau} \quad (3.23)$$

Durch Anpassung der experimentellen intermediären Streufunktion mit Gleichung 3.23 kann der scheinbare (solvensvermittelt) translationale Diffusionskoeffizient D bestimmt werden.

Wie bereits beschrieben, ergibt die zeitliche Fourier-Transformation der intermediären Streufunktion das Streugesetz, das für die Translationsdiffusion folgende Gleichung ergibt:

$$S(Q, \omega) = \frac{1}{\pi} \int_0^\infty e^{-DQ^2\tau} \cos(\tau\omega) d\tau = \frac{1}{\pi} \frac{DQ^2}{\omega^2 + D^2Q^4} \quad (3.24)$$

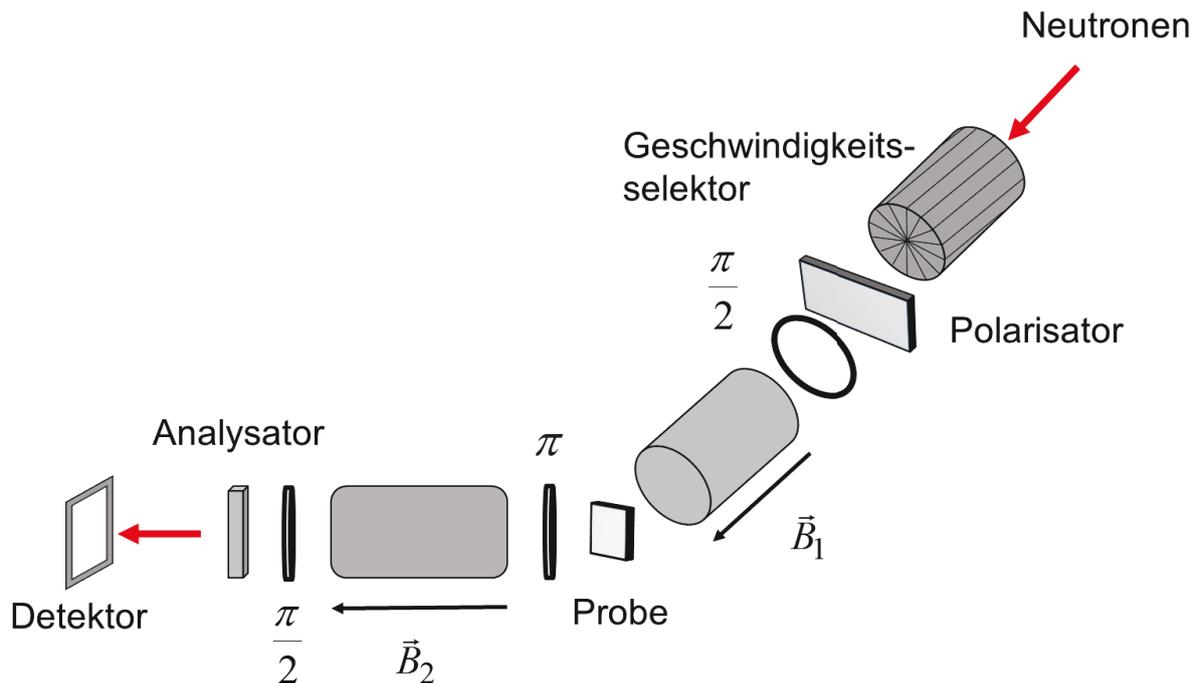


Abbildung 3.3: Schematischer Aufbau des Neutronenspinecho (NSE)-Spektrometers am NIST Center for Neutron Research (NCNR).

3.3.1 Messungen am Forschungsreaktor NCNR in Gaithersburg (USA)

Die Experimente wurden am Neutronenspinecho (NSE)-Spektrometer am NIST Center for Neutron Research (NCNR) in Gaithersburg (MD, USA) durchgeführt.^[129] Der schematische Aufbau des NSE-Spektrometers ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Der Geschwindigkeitsselektor wurde so eingestellt, dass nur Neutronen mit einer Wellenlänge λ von 6 \AA (2.27 meV) passieren konnten. Die entstehende Wellenlängenverteilung $\Delta\lambda/\lambda$ von ungefähr 17.5 % ermöglicht die Messung der Dynamik mit Fourierzeiten τ von 50 ps bis 15 ns. Jede Probe wurde bei fünf verschiedenen Detektorpositionen vermessen, wobei jedes Detektorbild ($32 \times 32 \text{ cm}^2$) wiederum in weitere fünf Abschnitte unterteilt wurde, wodurch insgesamt 25 Werte des Streuvektorbetrags definiert wurden. Auf diese Weise konnten Streuvektorbeträge im Bereich von 0.039 \AA^{-1} bis 0.195 \AA^{-1} realisiert werden. Vor jeder Messung wurde die Transmission der Probe sowie die Intensität des Primärstrahls gemessen. Die Analyse der resultierenden Daten wurde mit dem Softwarepaket „DAVE“ durchgeführt, das vom NIST zur Verfügung gestellt wurde.^[130]

Als Probenhalter diente eine Titanzelle mit zwei Quarzfenstern von 4 cm Durchmesser und 1 mm Stärke. Für jede Messung wurde ein Probenvolumen von ungefähr 5.2 mL benötigt, so dass die Neutronen 4 mm Probe mit einem Querschnitt von circa 3.5 cm durchstrahlten. Die gewünschte Temperatur wurde über einen externen Thermostaten eingestellt.

3.4 Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie

Die Infrarotspektroskopie (IR-Spektroskopie) ist eine Methode zur Analyse von Molekülschwingungen, die auf Anregung von Schwingungszuständen beruht. Eine spezielle Variante ist die Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FT-IR-Spektroskopie), die mithilfe eines Michelson-Interferometers den gesamten Wellenzahlbereich simultan vermessen kann. Der Einsatz in der biophysikalischen Chemie ermöglicht die Charakterisierung von Proteinen, indem Veränderungen der Sekundärstruktur oder Aggregationsvorgänge nachgewiesen werden. Des Weiteren werden keine extrinsischen Sonden benötigt, die zu unerwünschten Artefakten führen können. Eine ausführliche Beschreibung der Methode und dessen Anwendungsmöglichkeiten ist in den Referenzen^[109,131,132] zu finden.

3.4.1 Messungen am FT-IR-Spektrometer Nicolet 5700

Die temperaturabhängigen FT-IR-Messungen wurden an einem Nicolet 5700-FT-IR-Spektrometer der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) durchgeführt. Hierbei wurde ein MCT (HgCdTe)-Detektor verwendet, der mit Flüssigstickstoff gekühlt wurde. Die untersuchten Proben wurden in einer Messzelle mit zwei je 4 mm starken Calciumfluorid (CaF₂)-Fenstern und einer Mylar-Folie mit 50 μ m Stärke und 10.5 mm Innendurchmesser, die als Dichtungsring fungierte, vermessen, so dass für jede Messung ungefähr 20 μ L Probenvolumen verwendet wurde. Die Temperatur innerhalb der Messzelle wurde mit einem digitalen Thermometer gemessen und durch ein externes Wasserbad mit einer Genauigkeit von ± 0.2 °C geregelt. Um ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu gewährleisten, wurde die Probenkammer des Spektrometers kontinuierlich mit trockener Luft gespült. Zusätzlich ist jedes aufgenommene FT-IR-Spektrum die

Mittelung aus 256 Einzelmessungen mit einer Wellenlängenauflösung von 1 cm^{-1} . Zur Apodisation wurde eine Happ-Genzel-Funktion verwendet. Es wurden FT-IR-Spektren im Temperaturintervall von 10 °C bis 65 °C aufgenommen, wobei in den Bereichen von 10 °C bis 40 °C sowie von 55 °C bis 65 °C ein Temperaturintervall von 5 °C und im Bereich von 40 °C bis 55 °C ein Temperaturintervall von 1 °C gewählt worden ist. Vor jeder Messung fand eine Temperaturäquilibrierung mit einer Dauer von 10 Minuten statt.

3.4.2 Messungen am FT-IR-Spektrometer Nicolet MAGNA 550

Die druckabhängigen FT-IR-Messungen wurde an einem Nicolet MAGNA 550-FT-IR-Spektrometer der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) durchgeführt. Dieses Spektrometer war mit einem Flüssigstickstoff gekühlten MCT (HgCdTe)-Detektor ausgestattet. Die druckabhängigen Messungen der Proben erfolgten mithilfe einer Diamantstempelzelle.^[95] Hierbei wurden Diamanten des Typs IIa der Firma High Pressure Diamond Optics, Inc. (Tucson, AZ, USA) verwendet. Ein $50\text{ }\mu\text{m}$ -starker Dichtungsring aus rostfreiem Stahl wurde zwischen die zwei Diamanten platziert. Dieser Dichtungsring wies einem Innendurchmesser von 0.45 mm auf, so dass ein effektives Probenvolumen von ungefähr 10 nL benötigt wurde. Die Temperatur innerhalb der Messzelle wurde mit einem digitalen Thermometer gemessen und durch ein externes Wasserbad mit einer Genauigkeit von $\pm 0.2\text{ °C}$ geregelt. Der applizierte Druck wurde durch die Zugabe des Feststoffes Bariumsulfat (BaSO_4) bestimmt. Die symmetrische Streckschwingung des Sulfats zeigt eine lineare Verschiebung der Bande mit einer Wellenzahl von ungefähr 983 cm^{-1} (bei 1 bar) mit steigendem Druck.^[133] Die Genauigkeit der Druckbestimmung beträgt $\pm 200\text{ bar}$. Um ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu gewährleisten, wurde die Probenkammer des Spektrometers kontinuierlich mit trockener Luft gespült. Zusätzlich ist jedes aufgenommene FT-IR-Spektrum die Mittelung aus 256 Einzelmessungen mit einer Wellenlängenauflösung von 1 cm^{-1} . Zur Apodisation wurde eine Happ-Genzel-Funktion verwendet.

Zur Bestimmung der Faltungskinetik von Proteinen wurde der Druck in der Diamantstempelzelle schnellstmöglich von 6 kbar auf 1 bar reduziert und eine 20-minütige Serienmessung gestartet. Die Bedingungen der Messungen sind identisch mit den vor-

her beschrieben, lediglich die Anzahl der aufsummierten Einzelmessung pro FT-IR-Spektrum wurde auf 32 herabgesetzt.

Die erhaltenen Daten wurden mit der Auswertesoftware „GRAMS/AI 9.1“ der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) bearbeitet. Zuerst wurden die resultierenden Rohspektren, sowohl der druckabhängigen als auch der temperaturabhängigen Messungen, bezüglich des Beitrags des Lösungsmittels und des Geräterauschens korrigiert. Anschließend wurden die Spektren im Bereich der Amid-I'-Bande (1600 – 1700 cm^{-1}) auf die Bandenfläche normiert. Die Amid-I'-Bande des Proteins wurde mit acht Subbanden angepasst, deren Position durch Fourier-Selbstentfaltung (engl.: Fourier self deconvolution; FSD) und Bildung der 2. Ableitung bestimmt wurde.^[134] Das spektrale Rauschen wird durch Bildung der 2. Ableitung verstärkt, so dass das resultierende Spektrum mithilfe einer Savitzky-Golay-Funktion geglättet wurde.^[135] Jede Subbande stellt hierbei ein charakteristisches Sekundärstrukturelement des Proteins (Tabelle 3.1) dar und wurde durch eine Gauss-Lorentz-Funktion idealisiert dargestellt. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Übergangsdipolmomente der verschiedenen Sekundärstrukturen näherungsweise als gleich angenommen werden. Dieser Fehler kann jedoch vernachlässigt werden, da nur relative Konformationsänderungen des Proteins im Fokus stehen. Insgesamt ergibt sich ein relativer Fehler von 3 bis 4 % für jedes Sekundärstrukturelement.

Tabelle 3.1: Zuordnung der verschiedenen Sekundärstrukturelemente zu den jeweiligen Subbanden der Amid-I'-Bande des Proteins SNase.^[95]

Subbandenposition	Sekundärstrukturelement
~1611 cm^{-1}	Seitenketten
~1627 cm^{-1}	intramolekulare β -Faltblätter
~1641 cm^{-1}	ungeordnete Strukturen
~1651 cm^{-1}	α -Helices
~1659 cm^{-1}	Schlaufen/Biegungen
~1666 cm^{-1}	Schlaufen/Biegungen
~1673 cm^{-1}	intermolekulare β -Faltblätter
~1684 cm^{-1}	Schlaufen

3.5 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenz-Spektroskopie basiert auf der Anregung von Fluorophoren durch UV- oder sichtbares Licht und deren anschließende Desaktivierung durch Aussendung von elektromagnetischer Strahlung. Die Messung der Fluoreszenz benötigt nur eine sehr geringe Probenkonzentration, da zum einen sehr empfindliche Detektionsmethoden zur Verfügung stehen und zum anderen die Frequenzen der absorbierten Strahlung nicht mit denen der Fluoreszenzstrahlung übereinstimmen. Zur Detektion bestimmter Moleküleigenschaften werden neben den intrinsischen Fluorophoren häufig auch extrinsische Fluorophore eingesetzt. Eine detaillierte Beschreibung der Methode und dessen Anwendungsgebiete ist in den Referenzen^[109,136] zu finden.

3.5.1 Messungen am Fluoreszenz-Spektrometer LS 55

Die zeitabhängigen Fluoreszenzmessungen wurden an dem Spektrometer LS 55 der Firma Perkin Elmer (Waltham MA, USA) durchgeführt. Jeweils 2 mL der untersuchten Probe wurden in einer 1 cm × 1 cm Quarzküvette mit 4 μL einer Thioflavin T (ThT; Abbildung 3.4)-Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg mL⁻¹ versetzt. Die Quarzküvetten wurden vor der Verwendung mit konzentrierter Salpetersäure (HNO₃) gereinigt. Die gewünschte Temperatur von 45 °C wurde über einen externen Thermostaten realisiert. Der Fluorophor wurde mit einer Wellenlänge von 450 nm angeregt und die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 482 nm detektiert. Thioflavin T ist ein hoch sensibler Sensor für die Detektion von Amyloidfibrillen. Die Fluoreszenzintensität steigt über mehrere Größenordnungen in der Anwesenheit von Amyloidfibrillen an.^[137]

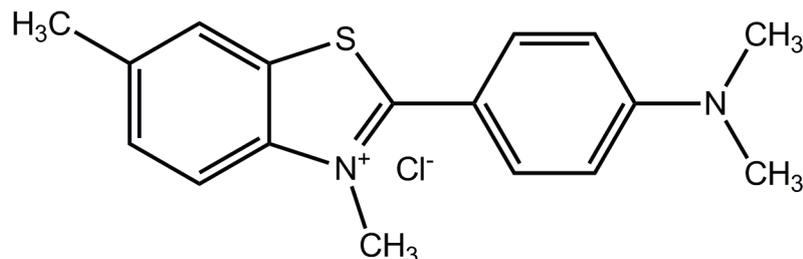


Abbildung 3.4: Strukturformel des verwendeten Fluorophors Thioflavin T (ThT).

3.6 Interne Totalreflexionsfluoreszenzspektroskopie

Die interne Totalreflexionsfluoreszenzspektroskopie (engl.: total internal reflection fluorescence spectroscopy; TIRF) ist eine oberflächensensitive Methode zur Charakterisierung der Struktur und Dynamik von Molekülen an der Flüssig/Fest-Grenzfläche. Eine detaillierte Beschreibung der Methode ist in den Referenzen^[136,138] zu finden. Wie bei der herkömmlichen Fluoreszenz-Spektroskopie werden auch bei der TIRF-Spektroskopie die Fluorophore durch UV- oder sichtbares Licht angeregt. Jedoch wird die Probenlösung nicht vom Anregungslicht durchstrahlt, sondern das Anregungslicht wird in einem optischen Quarzprisma intern reflektiert, da der Brechungsindex des Prismas höher ist als der der Flüssigkeit ($n_0 > n_1$; siehe Abbildung 3.1). Unterhalb des kritischen Winkels θ_c tritt interne Totalreflexion auf, und eine evaneszente Welle dringt in die Probenlösung ein. Diese Welle kann mit einem monoexponentiellen Abfall der Amplitude des elektrischen Feldes beschrieben werden:

$$E(z) = E_0 e^{-z/d} \quad (3.25)$$

Die Eindringtiefe d kann wie folgt bestimmt werden:

$$d = \frac{\lambda}{2\pi \sqrt{n_0^2 \cos^2(\theta_0) - n_1^2}} \quad (3.26)$$

Typischerweise liegen die Eindringtiefen für sichtbares Licht zwischen 100 und 200 nm, so dass bevorzugt Fluorophore angeregt werden, die direkt an der Flüssig/Fest-Grenzfläche adsorbiert sind.

3.6.1 Verwendete Hochdruckzelle

Die Messungen der Fluoreszenzintensität eines Adsorbats an der Flüssig/Fest-Grenzfläche bei hohen hydrostatischen Drücken wurden in einer Hochdruckzelle durchgeführt, die von Dr. Juny Koo im Arbeitskreis von Prof. Dr. Claus Czeslik konstruiert wurde.^[139] Der zylindrische Zellkörper besteht aus einer Ni-Cr-Co-Legierung (NIMONIC 90). Das Außen-zu-Innen-Durchmesser-Verhältnis beträgt 6, so dass die maximale Druckfestigkeit des Zellkörpers 4181 bar beträgt. Für die sichere Verwendung der Hochdruckzelle

wurde ein Sicherheitsfaktor von 1.5 angenommen, so dass der maximale Druck auf 2500 bar festgelegt wurde. Der Zellkörper verfügt über insgesamt 5 Öffnungen, die jeweils mit gleichen Schrauben verschlossen werden können. Drei Öffnungen befinden sich in radialer und zwei in axialer Position relativ zur Reflexionsebene. Die obere Öffnung in axialer Position dient als Zugang für die Probenküvette und als Anschluss für die Hochdruckkapillare. Die untere Öffnung dient nur der Reinigung des Zellinneren. Die drei Öffnungen in radialer Position sind mit synthetischem Quarz (12 mm Stärke und 12 mm Durchmesser) als Fenstermaterial ausgestattet. Das erste Fenster dient als Eingang für das Anregungslicht, das zweite als Ausgang für das totalreflektierte Licht und das dritte als Ausgang für das Fluoreszenzlicht.

Die Probenküvette besteht aus einem synthetischen Quarzprisma und einer Gumdichtung, die zur Druckübertragung und gleichzeitiger Separation von Probe und Druckmedium (meistens H₂O) eingesetzt wird. Für eine Messung wird ein Probenvolumen von 0.6 mL benötigt. Die verfügbare Kontaktfläche des Quarzprismas beträgt 1.5 cm².

Die hydrodynamischen Drücke wurden mit einer Handspindelpresse der Firma HiP (Erie, PA, USA) realisiert. Der applizierte Druck wurde mithilfe eines Drucksensors bestimmt und über eine analoge Anzeige ausgegeben. Die Temperierung der Hochdruckzelle erfolgte über einen externen Thermostaten.

3.6.2 Messungen am K2-Fluorometer

Die Messungen der internen Totalreflexionsfluoreszenz wurden am K2-Fluorometer der Firma ISS (Champaign, IL, USA) durchgeführt. Das Fluorometer wurde im Photonenzählmodus und mit einer Xenon-Kurzbogenlampe als Strahlungsquelle verwendet. Die Anregungswellenlänge wurde über einen Monochromator selektiert. Das gemessene Fluoreszenzspektrum wurde über einen Monochromator im gewünschten Wellenlängenbereich aufgenommen. Zur Messung der LAURDAN (Abbildung 3.5)-Fluoreszenz wurde der Fluorophor mit einer Wellenlänge von 350 nm angeregt und die Emission zwischen 390 nm und 600 nm gemessen. Die BODIPY (Abbildung 3.6)-Fluoreszenz wurde mit einer Wellenlänge von 480 nm angeregt, und die Emission wurde zwischen

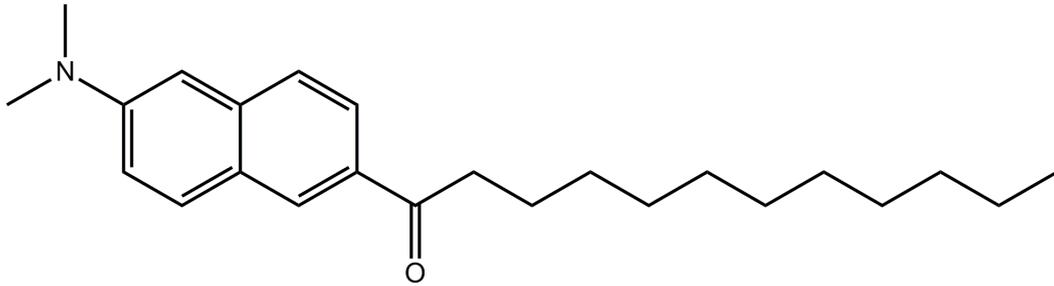


Abbildung 3.5: Strukturformel des verwendeten Fluorophors LAURDAN.

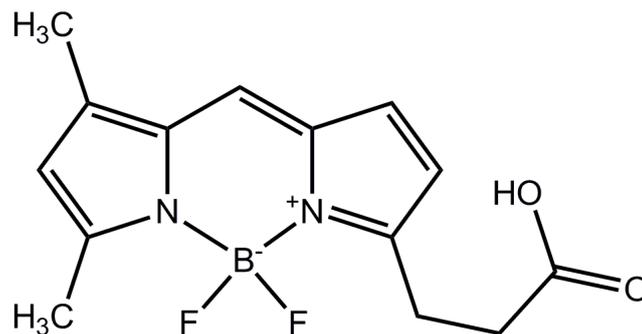


Abbildung 3.6: Strukturformel des verwendeten Fluorophors BODIPY-FL.

500 nm und 580 nm gemessen. Die Messungen wurden in einem Druckbereich zwischen 100 bar und 2000 bar in Schritten von 250 bar bei einer konstanten Temperatur von 25 °C durchgeführt. Jedes TIRF-Spektrum wurde nach einer Äquilibrationszeit von 10 min gemessen.

3.7 Kalorimetrische Methoden

Kalorimetrische Messverfahren werden eingesetzt, um thermodynamische Parameter im Verlaufe von Struktur- und Phasenumwandlungen sowie intermolekularer Wechselwirkungsprozesse zu untersuchen. Die Methode der Wahl für quantitative kalorimetrische Untersuchungen an Biomolekülen ist die dynamische Differenzkalorimetrie (engl.: differential scanning calorimetry; DSC). Bei der Leistungskompensationstechnik wird durch variable Heizleistungen dafür gesorgt, dass die Temperatur von Probe und Referenz identisch ist. Die während einer Umwandlung entstehende Differenz der Heizleistungen ΔP zwischen Probe und Referenz ist die Messgröße. Beispielsweise können aus dem resultierenden Thermogramm von Proteinen die Entfaltungstemperatur T_m , die Wärmekapazitätsänderung $\Delta C_{p,u}^\circ$, die Entfaltungsenthalpie ΔH_u° und somit auch die

Entfaltungsentropie ΔS_u° bestimmt werden. Eine detaillierte Beschreibung der Methode und dessen Anwendung ist in Referenz^[109] zu finden.

Die Druck-Perturbations-Kalorimetrie (engl.: pressure perturbation calorimetry; PPC) ist eine effiziente Methode, um volumetrische Eigenschaften von Biomolekülen in Lösung zu untersuchen. Diese Art der Kalorimetrie verwendet denselben Aufbau wie die DSC mit Leistungskompensationstechnik, gemessen wird aber die Wärmefreisetzung bzw. der Wärmeverbrauch des Probensystems nach isothermen Druckänderungen (typischerweise ± 5 bar). Im Wesentlichen kann mit dieser Methode der thermische Ausdehnungskoeffizient α des Probensystems bestimmt werden. Eine detaillierte Beschreibung der Methode und dessen Anwendung ist in den Referenzen^[96,97,109,140] zu finden.

3.7.1 Dynamische Differenzkalorimetrie am VP-DSC-Kalorimeter

Die Messungen der dynamischen Differenzkalorimetrie wurden an einem VP-DSC-Kalorimeter der Firma MicroCal (Northampton, MA, USA) durchgeführt. Die Probenzelle wurde mit circa 0.5 mL der Probenlösung befüllt und die Referenzzelle mit der entsprechenden Pufferlösung. Jede Probe wurde mit einer Heizrate von 60 °C pro Stunde vermessen. Die Auswertung der resultierenden Thermogramme erfolgte mithilfe einer Auswerterroutine der Firma MicroCal, die in die Analyse- und Darstellungssoftware „ORIGIN“ implementiert wurde. Hierbei konnten die Entfaltungstemperatur des Proteins T_m sowie die Enthalpieänderung ΔH_u° und die Wärmekapazitätsänderung $\Delta C_{p,u}^\circ$ des Proteins bei der Entfaltung für das jeweilige Probensystem bestimmt werden.

3.7.2 Druck-Perturbations-Kalorimetrie am VP-DSC-Kalorimeter

Die Druck-Perturbations-Kalorimetrie wurde ebenfalls am oben genannten Kalorimeter durchgeführt. Die Drucksprungtechnik wurde mit entsprechendem Zubehör der Firma MicroCal realisiert. Gasförmiger Stickstoff (N_2) wurde als Druckmedium verwendet und die Drucksprungamplitude betrug 5 bar. Zur Kalibrierung des Gerätes wurden jeweils Messungen mit Probe-Puffer, Puffer-Puffer, Puffer-Wasser und Wasser-Wasser durchgeführt. Aus den temperaturabhängigen Druck-Perturbations-Messungen resultierte der

jeweilige thermische Ausdehnungskoeffizient α für das Protein. Die Integration des thermischen Ausdehnungskoeffizienten über den betrachteten Temperaturbereich liefert bei bekanntem spezifischen Volumen die absolute Volumenänderung des Proteins bei der Entfaltung ΔV_u° .

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Lösungsmittelspezifische Dynamik von Insulin

Das Protein Insulin ist dafür bekannt, unter bestimmten Lösungsmittelbedingungen Aggregate auszubilden. Bei niedrigen pH-Werten, in Anwesenheit von Natriumchlorid (NaCl) und bei höheren Temperaturen beginnt Insulin zu aggregieren und bildet hierbei Amyloidfibrillen aus. Ohne Zugabe des Salzes NaCl, aber in der Anwesenheit von Ethanol, ist die Verzögerungsphase bis zum Einsetzen der temperaturinduzierten Fibrillenbildung enorm verlängert. In dieser Studie wurden die dynamischen Eigenschaften von Rinderinsulin unter den zwei genannten Lösungsmittelbedingungen mithilfe der Neutronenspin-echo (NSE)-Spektroskopie untersucht.* Die Messungen wurden am NIST Center for Neutron Research (NCNR) in Gaithersburg (MD, USA) durchgeführt. Der zeitliche Verlauf der Strukturänderungen des Insulins wurde durch ergänzende Messungen der Röntgen-Kleinwinkelstreuung und der Thioflavin T (ThT)-Fluoreszenzintensität detektiert. Bei einer Temperatur von 45 °C läuft die Fibrillenbildung einer Insulinlösung mit 100 mM NaCl bei einem pH-Wert von 2.4 über 25 h ab. Im Gegensatz hierzu konnten bei einer Insulinlösung mit 20 Vol.-% Ethanol und einem pH-Wert von 2.4 keine Amyloidfibrillen innerhalb des gleichen Zeitraums nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise zeigten die NSE-Messungen eine lösungsmittelspezifische Dynamik des Proteins Insulin. Kollektive Diffusion der Insulinmoleküle konnte für die nicht-fibrillierende Probenlösung durch einen Anstieg des Diffusionskoeffizienten bei kleinen Streuvektorbeträgen Q nachgewiesen werden. Dieser Anstieg konnte für die fibrillierende Probenlösung nicht detektiert werden, was auf eine Selbstdiffusion der Insulinmoleküle zurückzuführen ist. Die Ergebnisse der Röntgen-Kleinwinkelstreuung be-

*Die in diesem Kapitel vorgestellte Studie wurde in Referenz^[141] publiziert.

stätigen dieses dynamische Verhalten, denn nur unter Bedingungen, bei denen kollektive Diffusion beobachtet wird, zeigt die Streukurve einen ausgeprägten Korrelationspeak. Die durch NSE-Spektroskopie gefundene Dynamik von Insulin steht im Einklang mit intermolekularen Interaktionspotenzialen, die aus Messungen der Struktur Faktoren von Insulin- und Lysozymlösungen bestimmt wurden. Selbstdiffusion von Molekülen tritt dann auf, wenn kein oder ein verschwindend kleiner Konzentrationsgradient in Lösung vorhanden ist. Im Gegensatz hierzu führen starke Wechselwirkungen zwischen diffundierenden Molekülen zu größeren Konzentrationsfluktuationen, und kollektive Diffusion kann detektiert werden.

Einfluss von ausgewählten Lösungsmittelbedingungen auf die Fibrillenbildung von Insulin

Das Protein Insulin bildet bei neutralem pH-Wert vorwiegend Tetramere und Hexamere aus. Im Gegensatz hierzu liegen Insulinmoleküle bei einem pH-Wert von 2 hauptsächlich als Monomere und Dimere vor.^[17,23] Das Aufheizen einer Insulinlösung in Anwesenheit von 100 mM Natriumchlorid und einem pH-Wert von 2 auf 60 °C führt zur spontanen Aggregation der Insulinmoleküle und der Ausbildung von Amyloidfibrillen. Dieser relativ schnelle Aggregationsprozess wird zusätzlich noch durch die Konzentration der Insulinlösung bestimmt, so dauert beispielsweise die Fibrillenbildung einer 0.5 gew.-%igen Insulinlösung nur ungefähr eine Stunde.^[20] Die Anwesenheit von 20 Vol.-% Ethanol in der Lösung schiebt das Monomer/Dimer-Gleichgewicht bei einem pH-Wert von 2 auf die Seite des Monomers. Hierdurch wird die Verzögerungsphase bis zum Einsetzen der temperaturinduzierten Fibrillenbildung drastisch verlängert. Unter diesen Bedingungen und bei 60 °C beginnt die Fibrillenbildung einer 0.5 gew.-%igen Insulinlösung erst nach 4 h und benötigt weitere 2 h bis alle Insulinmoleküle als Teil der Fibrillen vorliegen.^[20] Es wurden verschiedene Aggregationsmechanismen von Insulin unter diesen unterschiedlichen Lösungsmittelbedingungen vorgeschlagen.^[20] So liegt das Insulinmonomer in Anwesenheit von Ethanol (20 Vol.-%) bei 60 °C teilentfaltet vor. Diese Monomere bilden nur sehr langsam Keime, die durch Ethanol destabilisiert werden. Die Keimbildung erfolgt über einen partiell dehydratisierten Übergangszustand, der ein negatives Aktivierungsvolumen aufweist. Demgegenüber existiert ein schneller Aggregationsvorgang zu Oligomeren mit hohem Anteil an β -Faltblättern in der Anwe-

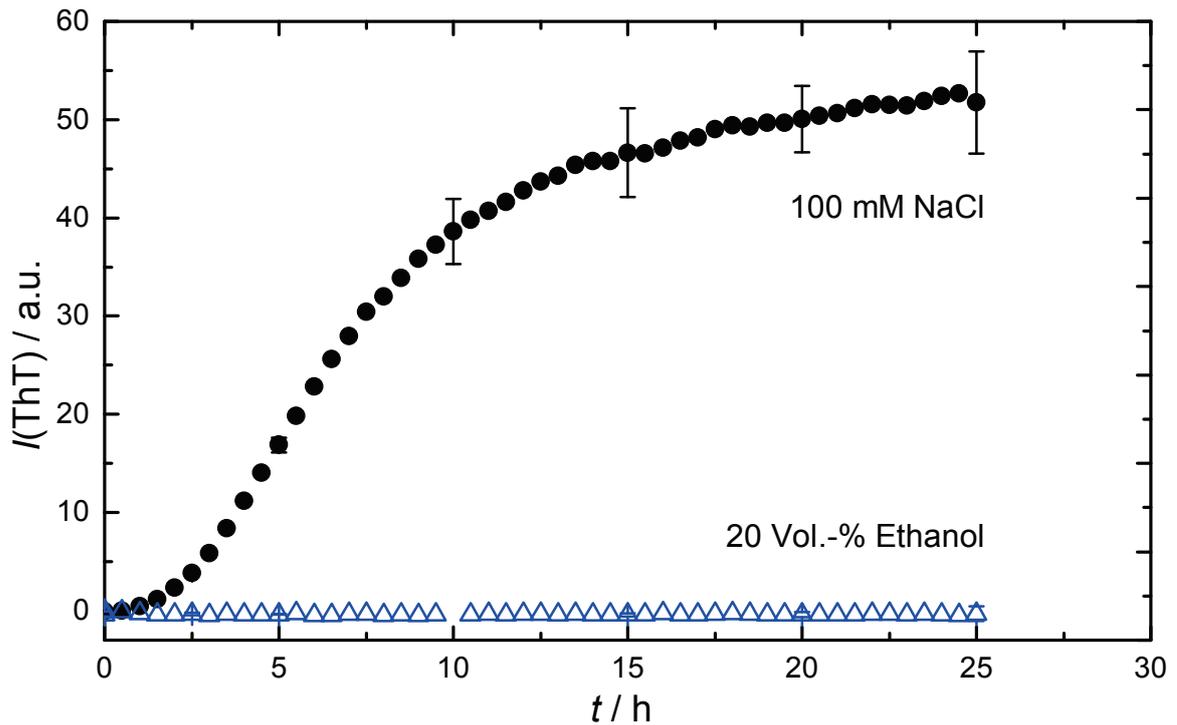


Abbildung 4.1: Thioflavin T (ThT)-Fluoreszenzintensität einer 2 gew.-%igen Insulinlösung bei einem pD-Wert von 2.4 und einer Temperatur von 45 °C mit 100 mM Natriumchlorid (●) bzw. nach Zugabe von 20 Vol.-% deuteriertem Ethanol (△). ThT ist eine hoch sensitive Fluoreszenzsonde für die Detektion von Fibrillen. Die Fehlerbalken spiegeln die Abweichung von drei unabhängigen Messungen unter den jeweiligen Lösungsmittelbedingungen wider.

senheit von 100 mM Natriumchlorid, aber ohne Zugabe von Ethanol.

Die Dynamik von Insulin bei den zwei genannten Lösungsmittelbedingungen wurde während der Präaggregationsphase und der anschließenden Fibrillenbildung mittels NSE-Spektroskopie studiert. Basierend auf den Ergebnissen des ThT-Fluoreszenz-experiments (Abbildung 4.1) wurden die NSE- und SAXS-Messungen bei einer Temperatur von 45 °C durchgeführt. Bei der gewählten Temperatur ist die Fibrillenbildung einer 2 gew.-%igen Insulinlösung mit 100 mM Natriumchlorid bei einem pD-Wert von 2.4 deutlich verlangsamt und erreicht einen Endzustand erst nach über 24 h. Im Gegensatz hierzu tritt keine Fibrillenbildung bei einer 2 gew.-%igen Insulinlösung ohne Salz, aber in Anwesenheit von 20 Vol.-% deuteriertem Ethanol, bei einem pD-Wert von 2.4 und einer Temperatur von 45 °C auf.

Abbildung 4.2 zeigt repräsentative intermediäre Streufunktionen (ISF) von Insulin bei 45 °C, die aus den NSE-Messungen resultieren. Die Zugabe von 100 mM NaCl zur Probenlösung fördert die Fibrillenbildung, indem das Salz die repulsiven Coulomb-Wechselwirkungen zwischen den Insulinspezies (nach der Probenpräparation vorwiegend Dimere) abschirmt (Abbildung 4.2, links). Eine Inhibierung der Fibrillenbildung wird durch die Zugabe von 20 Vol.-% deuteriertem Ethanol (C₂D₅OD) erreicht (Abbildung 4.2, rechts). Zudem wird durch Ethanol das Monomer/Dimer-Gleichgewicht auf die Seite des Monomers verschoben. Jede intermediäre Streufunktion wurde mit Gleichung 3.23 angepasst, um den scheinbaren Translationsdiffusionskoeffizienten D zu bestimmen. Hierdurch konnte der Diffusionskoeffizient in Abhängigkeit des Streuvektorbetrags Q , der Datenerfassungszeit t und des Lösungsmittels ermittelt werden. Rotationsdiffusion und interne Dynamiken von Insulin werden auf Längenskalen von 1 bis 10 Å erwartet. Dies entspricht einem Streuvektorbetrag zwischen 0.6 und 6 Å⁻¹. Sie können daher vernachlässigt werden, da dieser Bereich außerhalb der betrachteten Streuvektorbeträge liegt.

Selbstdiffusion des fibrillierenden Insulins

Abbildungen 4.3 und 4.4 stellen den Diffusionskoeffizienten D von Insulin als Funktion des Streuvektorbetrags Q und der Datenerfassungszeit t für die Lösungsbedingungen, die die Fibrillenbildung fördern (pD \approx 2.4, 100 mM NaCl) dar. Eine Temperatur von 25 °C ist zu gering, um eine spontane Fibrillenbildung zu induzieren (Abbildung 4.3). Wie für ein stabiles Insulindimer zu erwarten, ist der resultierende Diffusionskoeffizient unabhängig von der Datenerfassungszeit t . Beispielsweise weisen die Diffusionskoeffizienten bei einem Q -Wert von 0.10 Å⁻¹ nach 10 min und 4611 min einen nahezu identischen Wert auf. Des Weiteren kann keine signifikante Änderung des Diffusionskoeffizienten im betrachteten Q -Bereich festgestellt werden, was bedeutet, dass die Diffusionsgeschwindigkeit auf den verschiedenen Längenskalen konstant ist. Dieses Ergebnis spricht für die Selbstdiffusion von starren Partikeln. Obwohl der Diffusionskoeffizient in dieser Studie aus der kohärenten Neutronenstreuung bestimmt worden ist, kann die intermediäre Streufunktion bei relativ großen Q -Werten auf die Beiträge einzelner Moleküle ($i = j$) reduziert werden, da der Strukturfaktor $S(Q)$ hier annähernd 1 beträgt.^[142] Somit kann der resultierende Diffusionskoeffizient als Selbst-

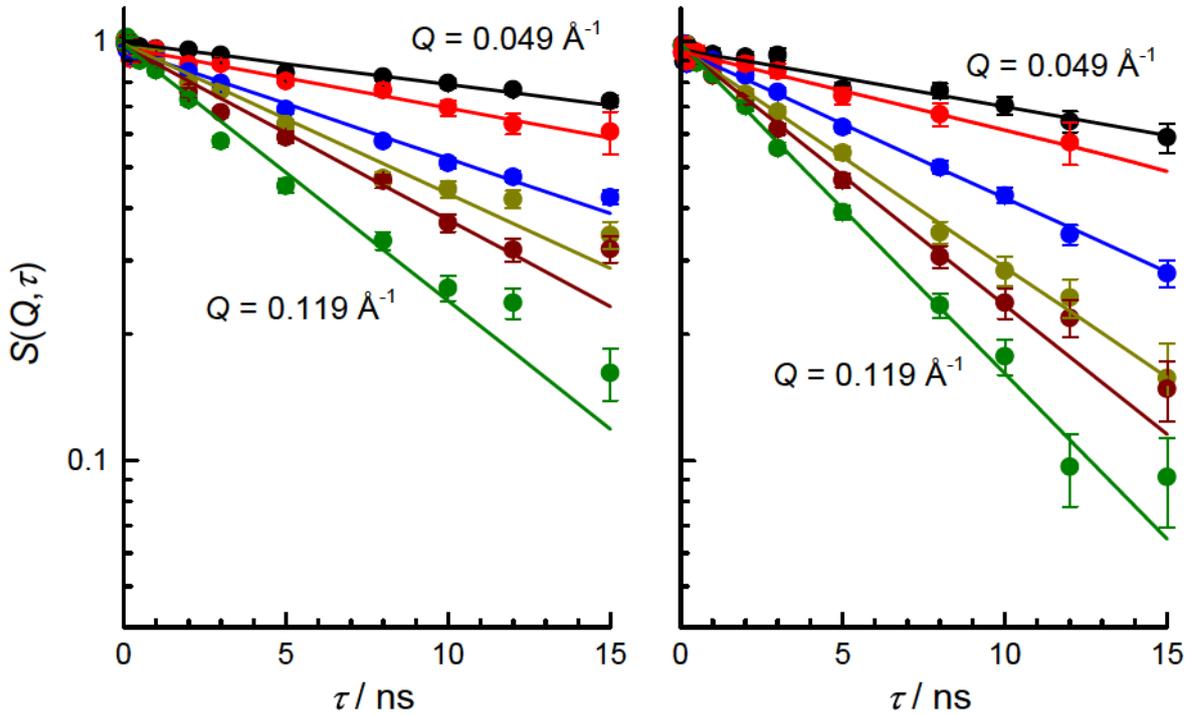


Abbildung 4.2: Repräsentative intermediäre Streufunktionen (ISF) einer 2 gew.-%igen Insulinlösung bei 45 °C und einem pD-Wert von 2.3. Das Hinzufügen von 100 mM Natriumchlorid zur Probenlösung fördert die spontane Fibrillenbildung (links). Durch die Anwesenheit von 20 Vol.-% deuteriertem Ethanol wird die Fibrillenbildung von Insulin unterdrückt (rechts). Die Linien entsprechen der Datenanpassung mit einer monoexponentiellen Abfallfunktion. Die Fehlerbalken spiegeln eine Standardabweichung wider.

diffusionskoeffizient interpretiert werden.^[142,143]

Abbildung 4.4 zeigt den zeitabhängigen Verlauf des Diffusionskoeffizienten während der Aggregation und Fibrillenbildung einer 2 gew.-%igen Insulinlösung bei einem pD-Wert von 2.3 und einer Temperatur von 45 °C in Anwesenheit von 100 mM NaCl. Der Diffusionskoeffizient startet mit einem Wert von $1.3 \cdot 10^{10} \text{ \AA}^2 \text{ s}^{-1}$ und fällt nach ungefähr 10 h auf einen Wert von $0.8 \cdot 10^{10} \text{ \AA}^2 \text{ s}^{-1}$, bis nach ungefähr 30 h ein Plateauwert von $0.5 \cdot 10^{10} \text{ \AA}^2 \text{ s}^{-1}$ erreicht wird. Der zeitliche Verlauf des Diffusionskoeffizienten im Bereich des Streuvektorbetrags von 0.039 \AA^{-1} bis 0.127 \AA^{-1} ist im Rahmen des experimentellen Fehlers gleich, was ebenfalls auf die Selbstdiffusion von starren Partikeln zurückzuführen ist. Zudem kann die zeitliche Abnahme des Diffusionskoeffizienten durch die zunehmende Größe der diffundierenden Insulinaggregate während der Fibrillenbildung beschrieben werden. Die nicht-sphärische Form der Amyloidfibrillen sowie

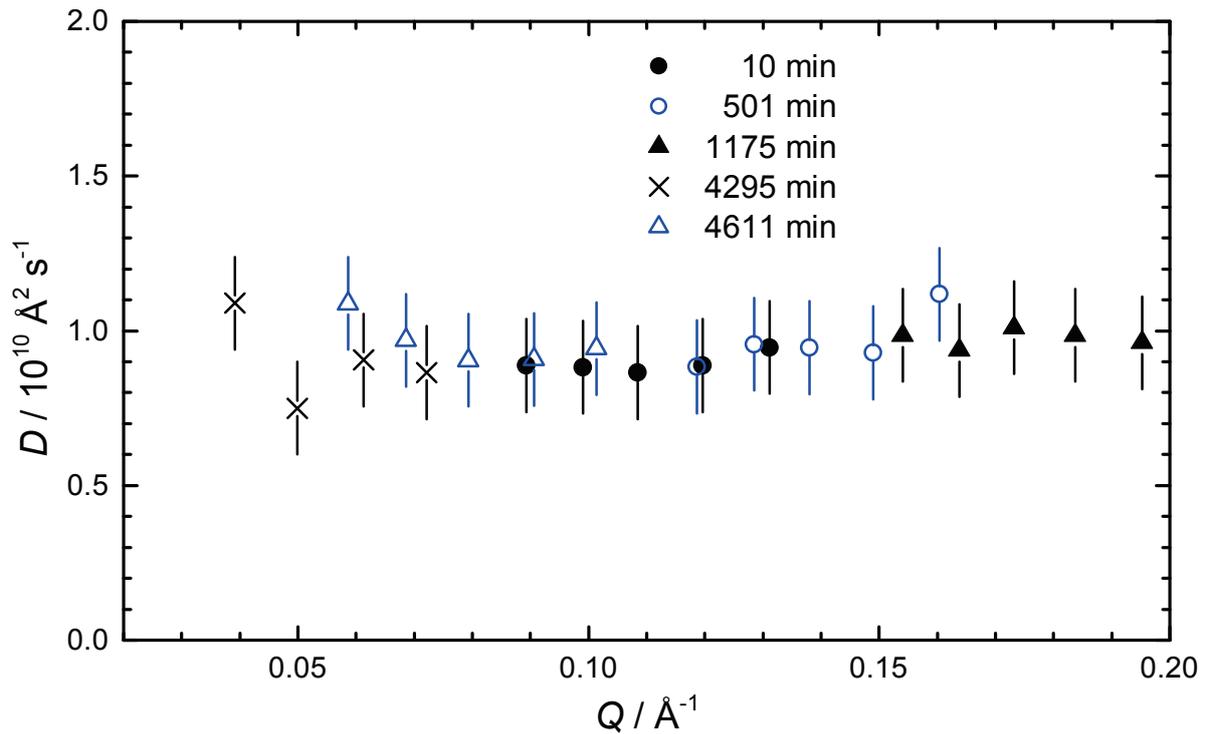


Abbildung 4.3: Diffusionskoeffizienten D aus NSE-Messungen einer 1 gew.-%igen Insulinlösung bei einem pD-Wert von 2.5 und einer Temperatur von 25 °C in Anwesenheit von 100 mM NaCl als Funktion des Streuvektorbetrags Q . In der Legende ist die jeweilige Startzeit der Datenerfassung t angegeben. Die zugehörigen Daten stammen aus der Aufteilung des Flächendetektors bei einer konstanten Position. Die Fehlerbalken repräsentieren den maximalen Fehler der Steigung aus der Datenanpassung der intermediären Streufunktion.

die Polydispersität der Aggregate beeinflussen den Diffusionskoeffizienten, so dass eine Berechnung des hydrodynamischen Radius nach dem Gesetz von Stokes-Einstein keine sinnvollen Ergebnisse liefert.

Die zunehmende Größe der Insulinaggregate während der Fibrillenbildung in der Anwesenheit von 100 mM NaCl konnte mittels Röntgen-Kleinwinkelstreuung verfolgt werden (Abbildung 4.5). Mit fortschreitender Datenerfassungszeit kann eine starke Zunahme der Streuintensität bei kleinen Q -Werten beobachtet werden. Durch Anwendung der folgenden zwei Beziehungen können die Abstandsverteilungsfunktion $p(r)$ und der Gyrationradius R_G aus den erhaltenen Streudaten bestimmt werden.

$$p(r) = \frac{r^2}{(2\pi)^3} \int_0^\infty I(Q) \frac{\sin(Qr)}{Qr} \cdot 4\pi Q^2 dQ \quad (4.1)$$

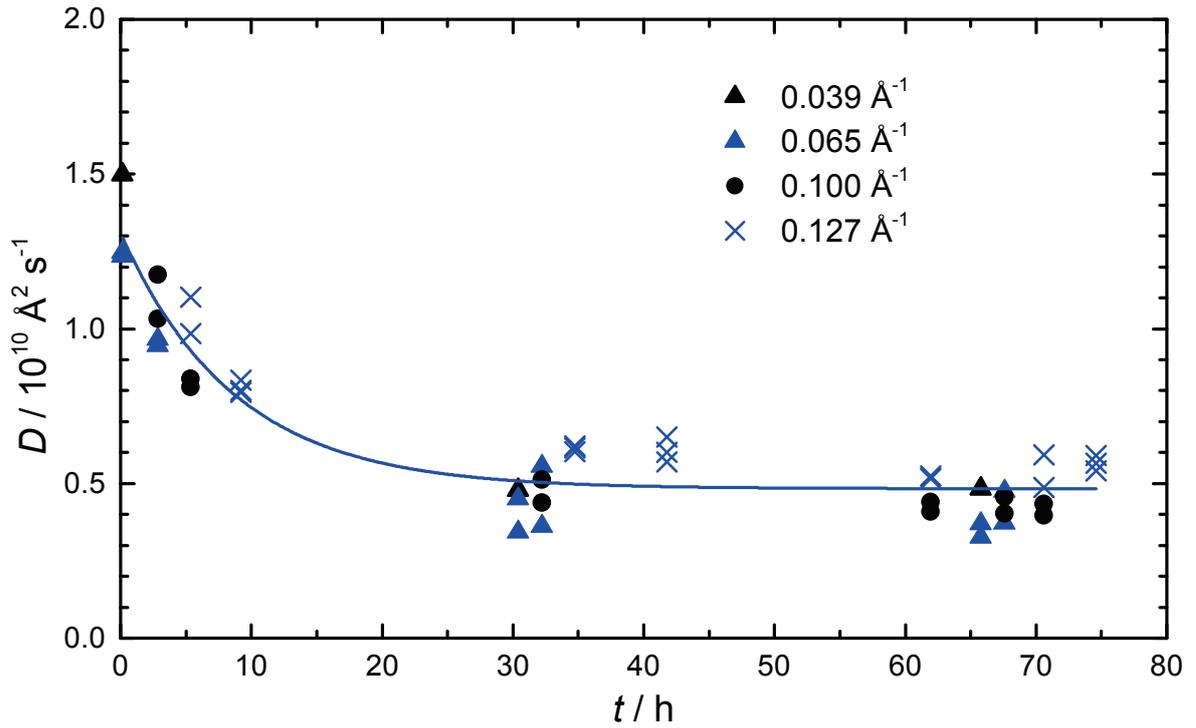


Abbildung 4.4: Zeitabhängiger Verlauf des Diffusionskoeffizienten aus NSE-Messungen während der Aggregation und Fibrillenbildung einer 2 gew.-%igen Insulinlösung bei einem pD-Wert von 2.3 und einer Temperatur von 45 °C in Anwesenheit von 100 mM NaCl. In der Legende ist der jeweilige Streuvektorbetrag Q angegeben. Die Linie dient der optischen Führung.

$$R_G^2 = \frac{\int_0^\infty r^2 p(r) dr}{2 \int_0^\infty p(r) dr} \quad (4.2)$$

Abbildung 4.6 zeigt die Abstandsverteilungsfunktion $p(r)$ mit fortschreitender Datenerfassungszeit. Eine deutliche Zunahme des maximalen Teilchendurchmessers von 40 Å auf 160 Å ist zu erkennen. Die untere Grenze von 40 Å wurde ebenfalls mit Neutronen-Kleinwinkelstreuung gefunden.^[16] Ein anfänglicher Gyrationradius R_G von 16.5 Å (Abbildung 4.7) ist in guter Übereinstimmung mit einer in der Literatur beschriebenen Guinieranalyse von Neutronen-Kleinwinkelstreudaten und dem berechneten R_G -Wert von 14.4 Å für ein Insulindimer mit einer zylindrischen Form.^[11] Mithilfe der Stokes-Einstein-Beziehung (Gleichung 4.3) und dem Partikelradius $R = \sqrt{5/3}R_G$ kann der Diffusionskoeffizient zu Beginn der Fibrillenbildung abgeschätzt werden:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad (4.3)$$

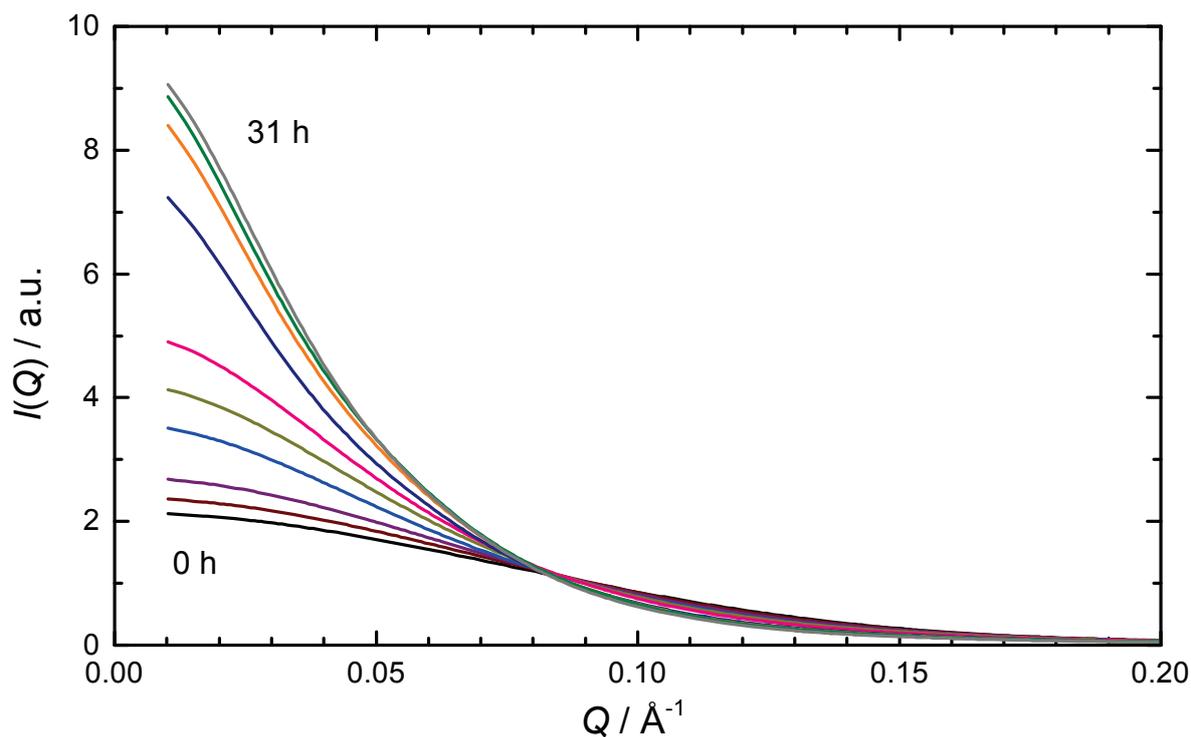


Abbildung 4.5: Zeitabhängiger Verlauf ausgewählter Röntgen-Kleinwinkelstreu曲ven einer 2 gew.-%igen Insulinlösung bei einem pD-Wert von 2.4 und einer Temperatur von 45 °C in der Anwesenheit von 100 mM NaCl.

Mit einem hydrodynamischen Radius R von 21.3 Å resultiert bei einer Temperatur von 45 °C ein Diffusionskoeffizient D von $1.2 \cdot 10^{10} \text{ Å}^2 \text{ s}^{-1}$. Dieser Wert ist fast identisch mit dem aus der NSE-Spektroskopie erhaltenen Wert am Anfang der Datenerfassung ($t = 0$). Diese Übereinstimmung ist ein Nachweis für die unabhängige Diffusion von Insulinmolekülen bei Lösungsmittelbedingungen, die die Fibrillenbildung fördern. Für die weitere Analyse in dieser Studie ist es zudem wichtig festzustellen, dass die Röntgen-Kleinwinkelstreu曲ven in Abbildung 4.5 keinen Korrelationspeak enthalten.

Das komplexe Aggregationsverhalten von Proteinen, die zu Fibrillenbildung neigen, wurde bereits ausführlich studiert und in der Literatur diskutiert.^[1-5,9-14] Nachdem das native Insulin destabilisiert wurde, startet die Keimbildung durch hochenergetische Insulinspezies. Der Elongationsprozess beinhaltet die Anlagerung weiterer (teil-)entfalteter Monomere oder Oligomere. Jedoch können die gebildeten Fibrillen jederzeit in Fragmente zerfallen. Des Weiteren kann die Keimbildung an der Fibrilloberfläche sogar zu einer Verzweigung der Fibrille führen. Aus den genannten Gründen

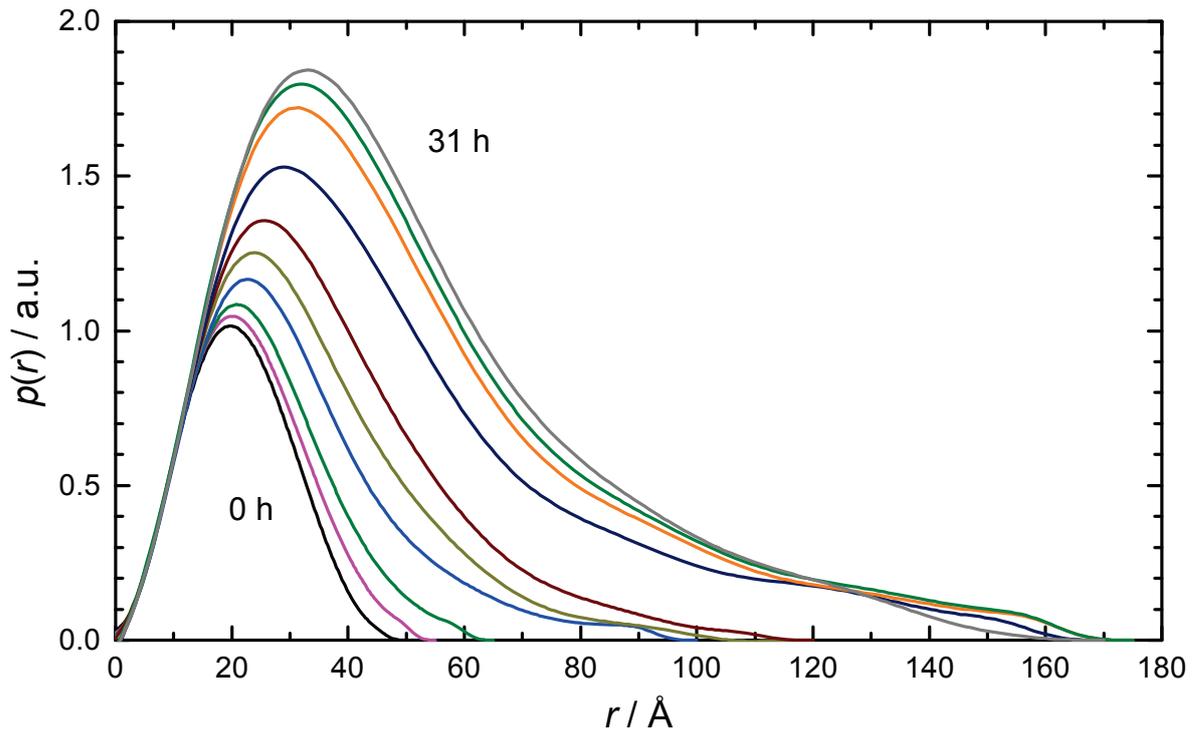


Abbildung 4.6: Zeitlicher Verlauf der Abstandsverteilungsfunktion $p(r)$ einer 2 gew.-%igen Insulinlösung bei einem pD-Wert von 2.4 und einer Temperatur von 45 °C in der Anwesenheit von 100 mM NaCl.

weisen Insulinfibrillen sowohl einen mikro- als auch makroskopischen Polymorphismus auf.^[13] Durch Neutronen-Kleinwinkelstreuexperimente wurde herausgefunden, dass ein Keim aus drei Dimeren aufgebaut ist, und die weitere Anlagerung über Seite-an-Seite-Kontakte erfolgt.^[11] Unter der Annahme, dass der gemessene Diffusionskoeffizient (Abbildung 4.4) umgekehrt proportional zur Größe der Insulinaggregate ist, bedeutet der Abfall des Diffusionskoeffizienten von $1.3 \cdot 10^{10} \text{ \AA}^2 \text{ s}^{-1}$ auf $0.5 \cdot 10^{10} \text{ \AA}^2 \text{ s}^{-1}$ eine Zunahme des Gyrationradius um den Faktor 2.6. Somit sollte bei einem anfänglichen Gyrationradius von 16.5 Å ein Gyrationradius von 43 Å resultieren, was durch die Röntgen-Kleinwinkelstreuexperimente bestätigt werden konnte (Abbildung 4.7).

Kollektive Diffusion des nicht-fibrillierenden Insulins

Die Struktur und Dynamik von Insulin zeigen bei Lösungsmittelbedingungen, die die Fibrillenbildung verhindern, und bei Bedingungen, die die Fibrillenbildung fördern einen grundlegenden Unterschied. Die Hinzugabe von deuteriertem Ethanol, in Abwesenheit von Natriumchlorid, führt bei einer Insulinlösung mit einem pD-Wert von

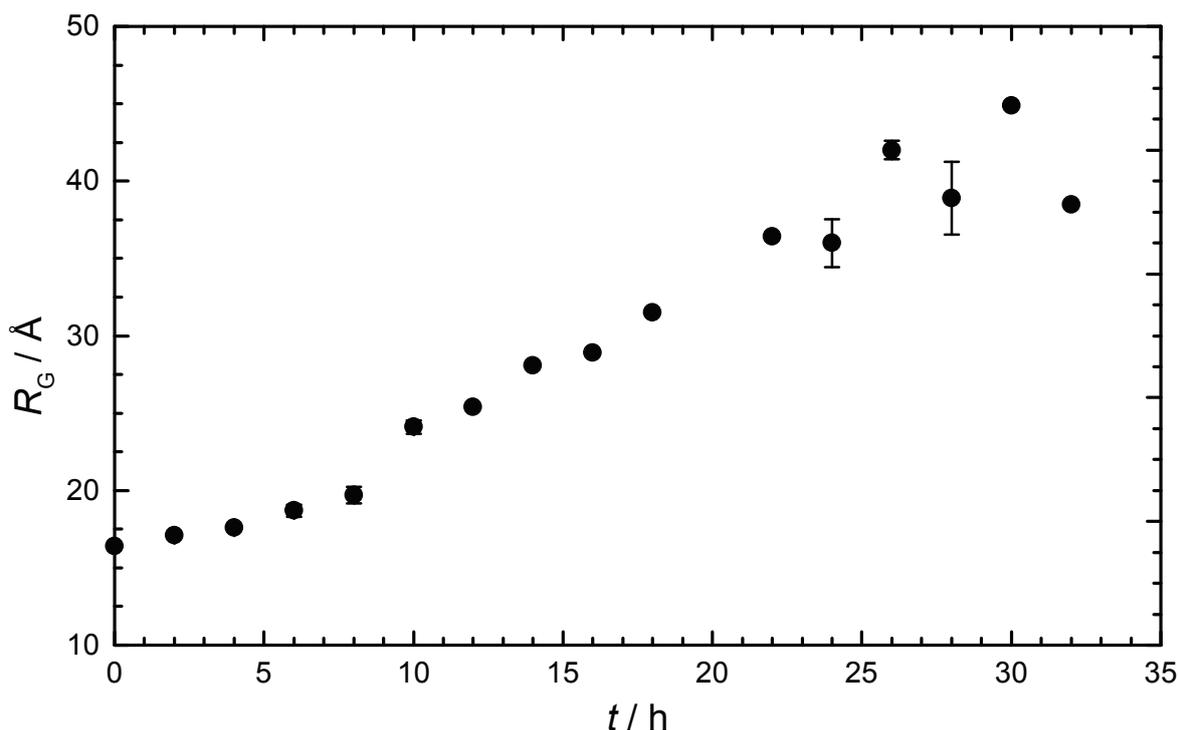


Abbildung 4.7: Zeitlicher Verlauf des Gyrationradius R_G einer 2 gew.-%igen Insulinlösung bei einem pD-Wert von 2.4 und einer Temperatur von 45 °C in der Anwesenheit von 100 mM NaCl. Die Fehlerbalken repräsentieren den maximalen Fehler aus zwei unabhängigen Messungen.

2.4 zu einer Verschiebung des Monomer/Dimer-Gleichgewichts auf die Seite des Monomers. Bei Temperaturen von 60 °C setzt zwar nach einer langen Verzögerungszeit die Oligomerisierung ein, aber die Bildung von geordneten Fibrillen wird durch eine hohe Ethanolkonzentration unterdrückt.^[144] Das Ausbleiben der Fibrillenbildung in Anwesenheit von 20 Vol.-% deuteriertem Ethanol bei einem pD-Wert von 2.4 und einer Temperatur von 45 °C konnte über einen Zeitraum von mehr als 25 h durch Messung der Thioflavin T-Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden (Abbildung 4.1). Die NSE-Messungen wurden ebenfalls unter den genannten Bedingungen durchgeführt. Hierbei wurde eine ausgeprägte Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten vom Streuvektorbetrag festgestellt (Abbildung 4.8). Je kleiner der Streuvektorbetrag wird, desto größer wird der Diffusionskoeffizient.

Des Weiteren entsteht bei einer 2 gew.-%igen Insulinlösung bei einem pD-Wert von 2.4 und einer Temperatur von 45 °C ein Korrelationspeak bei einem Streuvektorbetrag von 0.07 \AA^{-1} in der Röntgen-Kleinwinkelstreu Kurve (Abbildung 4.10). Dieser Korrelati-

onspeak beschreibt starke, repulsive Wechselwirkungen zwischen den Insulinmolekülen. Der isoelektrische Punkt von Insulin liegt bei einem pH-Wert von 5.3, so dass Insulin bei einem pD-Wert von 2.4 positiv geladen ist. Die berechnete Nettoladung bei einem pH-Wert von 2 beträgt +6.^[145] Daher wird in Abwesenheit von Salzen die intermolekulare Wechselwirkung zwischen Insulinmolekülen hauptsächlich durch die Coulombabstoßung bestimmt, und der Abstand der Moleküle wird maximal. Der Korrelationspeak bei einem Streuvektorbetrag von 0.07 \AA^{-1} entspricht einem intermolekularen Abstand von ungefähr $2\pi/0.07 \text{ \AA}^{-1} = 90 \text{ \AA}$. Eine theoretische Berechnung, unter der Annahme einer homogenen Verteilung von Insulinmonomeren in einer 2 gew.-%igen Lösung, ergibt einen intermolekularen Abstand von rund 80 \AA . Dieser Wert steht in sehr guter Übereinstimmung mit dem gefundenen Korrelationspeak. Ein „Gitter“ mit räumlich korrelierten Insulinmolekülen kann kollektiv diffundieren, was zu einem Anstieg des Diffusionskoeffizienten bei Q -Werten führt, die kleiner sind als der Q -Wert des Korrelationspeaks.^[142,143] Die Position des Korrelationspeaks bei einem Q -Wert von 0.07 \AA^{-1} in Abbildung 4.10 und die obere Q -Wertgrenze des erhöhten Diffusionskoeffizienten in Abbildung 4.8 bestätigen diese kollektive Dynamik einer nicht-fibrillierenden Insulinlösung.

Ein Diffusionskoeffizient kann durch folgende Gleichung berechnet werden:^[142]

$$D(Q) = D(\infty) \cdot \frac{H(Q)}{S(Q)} \quad (4.4)$$

Aus Abbildung 4.9 ist abzulesen, dass $D(0.04 \text{ \AA}^{-1}) = 1.9 \cdot 10^{10} \text{ \AA}^2 \text{ s}^{-1}$ und $D(\infty) = 1.3 \cdot 10^{10} \text{ \AA}^2 \text{ s}^{-1}$ ist. Der kleinste gemessene Diffusionskoeffizient wird hier näherungsweise für $D(\infty)$ verwendet. Die hydrodynamische Funktion $H(Q)$ beschreibt solvensvermittelte Wechselwirkungen zwischen bewegten Teilchen und wird vereinfacht als 1 angenommen. Gemäß Gleichung 4.4 resultiert dann ein Strukturfaktor von $S(0.04 \text{ \AA}^{-1}) = 0.68$, während der experimentelle Strukturfaktor $S(0.04 \text{ \AA}^{-1}) \approx 0.8$ beträgt.^[146] Dieser Strukturfaktor für Insulin wurde aus konzentrationsabhängigen Messungen der Röntgen-Kleinwinkelstreuung erhalten. Der erhaltene Unterschied ist auf den experimentellen Fehler des gemessenen Diffusionskoeffizienten, den experimentellen Fehler des gemessenen Strukturfaktors und auf die unbekannt hydrodynamische Funktion

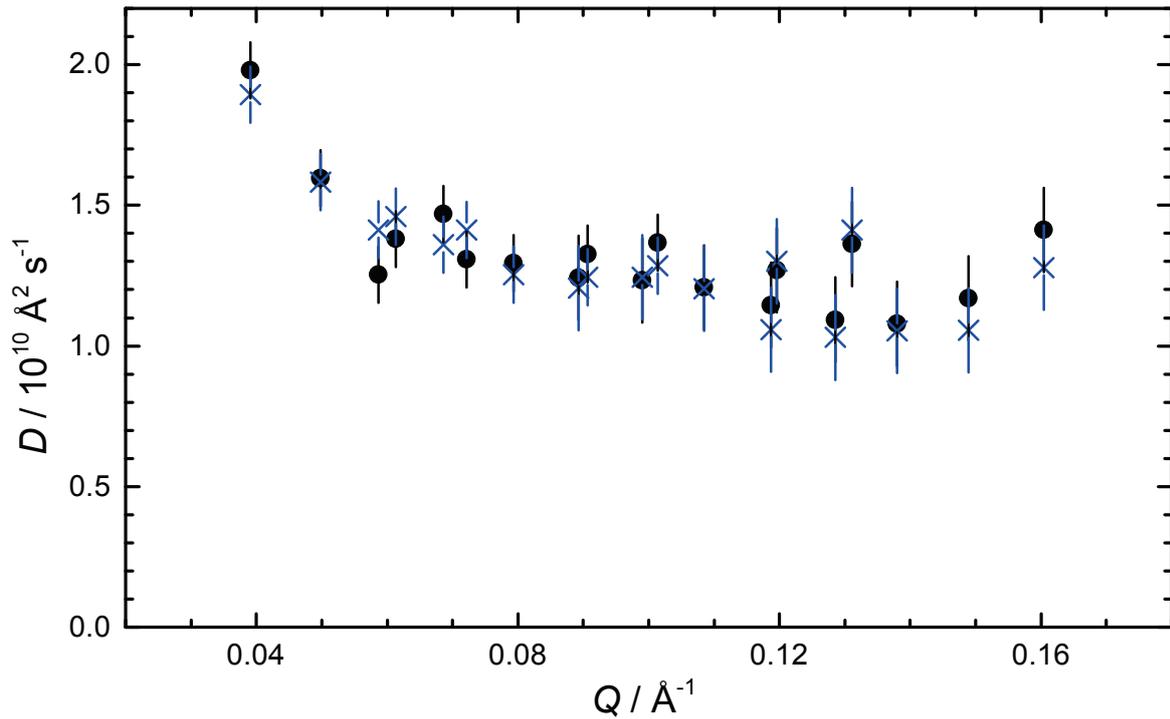


Abbildung 4.8: Diffusionskoeffizienten D aus NSE-Messungen einer 2 gew.-%igen Insulinlösung bei einem pD-Wert von 2.4 und einer Temperatur von 45 °C in Anwesenheit von 20 Vol.-% deuteriertem Ethanol ($\text{C}_2\text{D}_5\text{OD}$) als Funktion des Streuvektorbetrags Q . Die Datenpunkte, dargestellt als \bullet und \times , repräsentieren zwei unabhängige Messungen mit individueller Probenpräparation.

zurückzuführen. In einer Studie über das Proteins Myoglobin wurde herausgefunden, dass die hydrodynamische Funktion sowohl vom Streuvektorbetrag Q als auch von der Konzentration des Proteins abhängt.^[142]

Am Maximum des Struktur factors bei $Q = 0.07 \text{\AA}^{-1}$ (Abbildung 4.10) konnte in dieser Studie keine verringerte Halbwertsbreite des quasielastischen Peaks in der Frequenzdomäne, das heißt ein kleinerer Diffusionskoeffizient, beobachtet werden. Das sogenannte „de Gennes narrowing“ wurde für einfache Flüssigkeiten vorhergesagt und nachgewiesen.^[147] Im Gegensatz zu einfachen Flüssigkeiten, die ein eher scharfes Maximum im Struktur factor aufweisen, ist das Maximum, das durch Wechselwirkungen zwischen Proteinen hervorgerufen wird, eher breit und kann somit den Effekt eventuell unsichtbar machen. Zudem kann der Effekt vom steigenden Diffusionskoeffizienten bei kleinen Q -Werten überdeckt werden. Der Diffusionskoeffizient für kollektive Diffusion ist größer als der Selbstdiffusionskoeffizient, da dieser eine andere Art der Bewegung

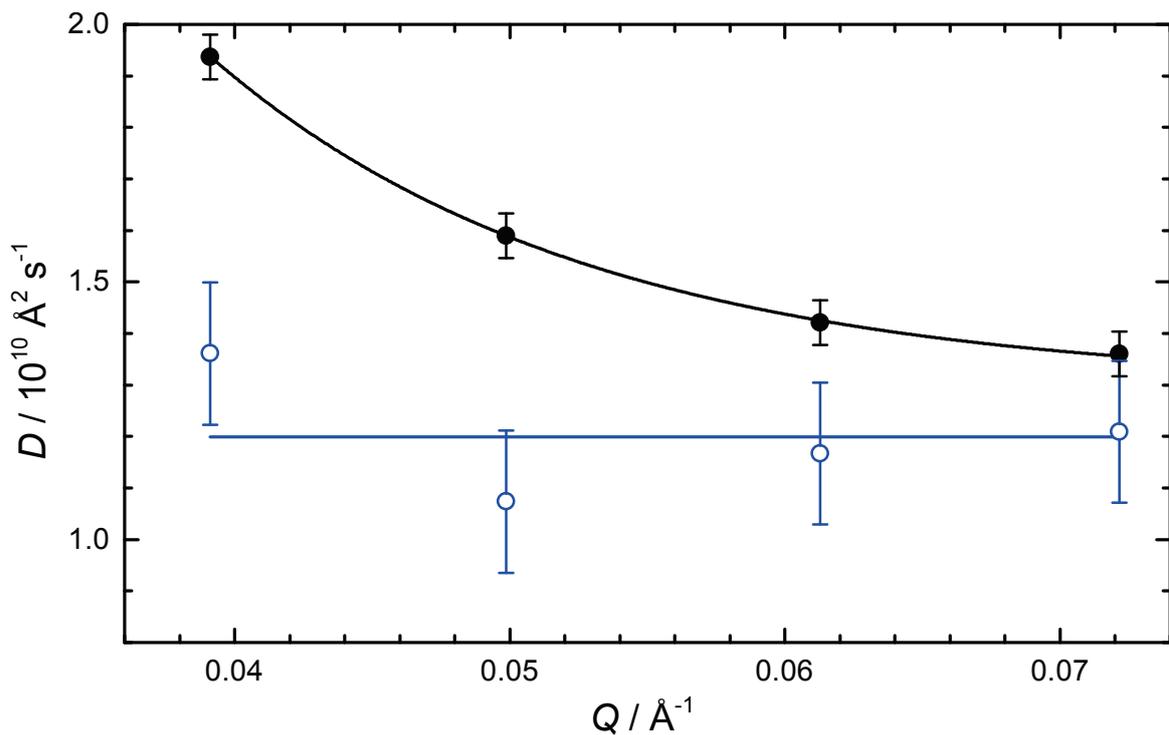


Abbildung 4.9: Lösungsmittelabhängiger Verlauf des Diffusionskoeffizienten D von Insulin bei kleinen Q -Werten innerhalb der ersten 3 Stunden bei 45 °C und einem pD-Wert von 2.4. Die Datenpunkte repräsentieren die Dynamik einer 2 gew.-%igen Insulinlösung mit 20 Vol.-% deuteriertem Ethanol (●) bzw. mit 100 mM NaCl (○). Alle vier Datenpunkte der jeweiligen Messung wurden simultan bei einer Detektorposition bestimmt. Die Linie dient der optischen Führung. Die Fehlerbalken spiegeln die maximalen Fehler aus zwei unabhängigen Bestimmungen des Diffusionskoeffizienten wider.

wiedergibt. In diesem Fall beschreibt er keine Bewegung einzelner Moleküle, sondern den Abbau ausgeprägter Konzentrationsfluktuationen in der Insulinlösung.

Das stabile, nicht-aggregierende und nicht-fibrillierende Protein Lysozym weist bei hohen Konzentrationen eine ähnliche Dynamik auf.^[148,149] In diesen Studien wurde die kollektive Diffusion der Proteinmoleküle ebenfalls durch einen Korrelationspeak in der Neutronen-Kleinwinkelstreuung und einer schnellen Diffusion bei kleinen Q -Werten beschrieben. Hieraus kann gefolgert werden, dass das Protein Insulin unter nicht-fibrillierenden Lösungsmittelbedingungen ein ähnliches Verhalten in Bezug auf die kollektive Diffusion aufweist wie das nicht-fibrillierende Protein Lysozym.

Die NSE-Messungen an Insulin, dessen elektrische Ladung durch die Zugabe von 100 mM Natriumchlorid abgeschirmt wird, bei 25 °C (Abbildung 4.3) und 45 °C (Abbildung

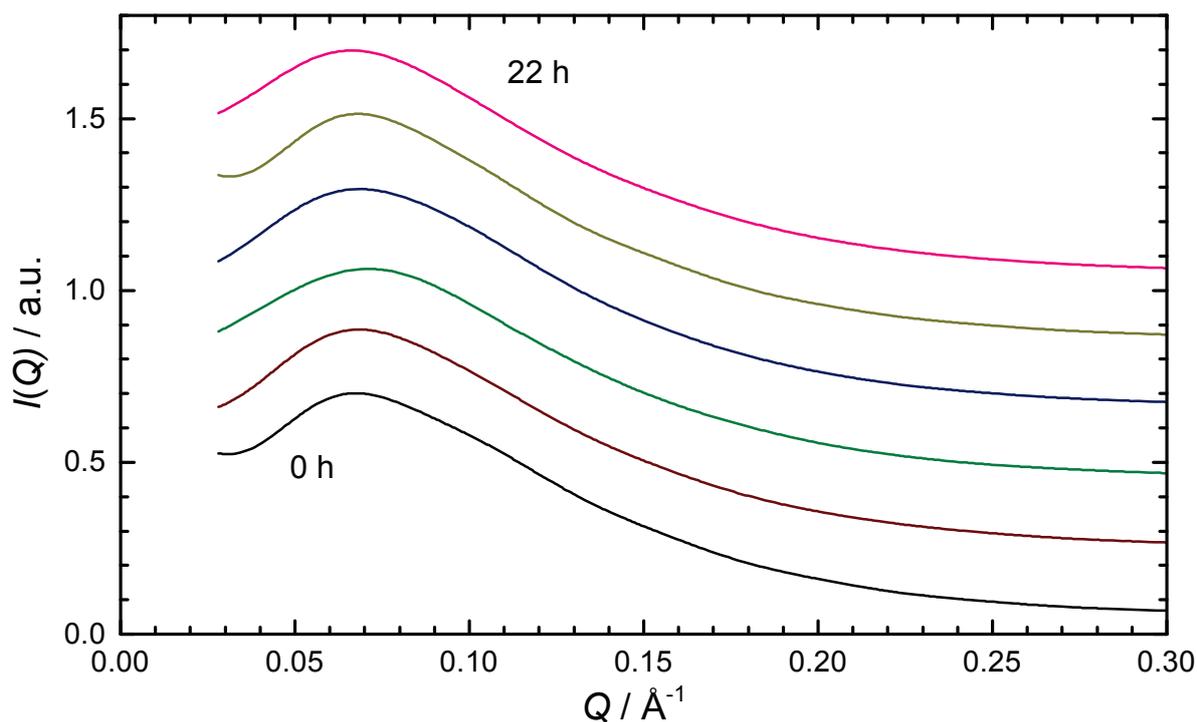


Abbildung 4.10: Zeitabhängiger Verlauf ausgewählter Röntgen-Kleinwinkelstreukurven einer 2 gew.-%igen Insulinlösung bei einem pD-Wert von 2.4 und einer Temperatur von 45 °C in der Anwesenheit 20 Vol.-% deuteriertem Ethanol. Zur besseren Übersicht wurden die Streukurven vertikal gegeneinander verschoben. Ein Korrelationspeak bei $Q = 0.07 \text{ \AA}^{-1}$ ist deutlich erkennbar.

4.9) weisen für kleine Q -Werte einen Q -unabhängigen Diffusionskoeffizienten auf. Somit ist die Dynamik von Insulin unter Lösungsmittelbedingungen, die die Fibrillenbildung fördern, unterschiedlich zu der von nicht-fibrillierenden Proteinen, wie beispielsweise Lysozym. Offensichtlich hat das Wechselwirkungspotenzial von Insulinmolekülen, das durch das Lösungsmittel kontrolliert werden kann, einen ausgeprägten Einfluss auf die Dynamik der Insulinlösung.

Die in dieser Studie gefundene lösungsmittelabhängige Dynamik von Insulin steht im Einklang mit den Unterschieden im intermolekularen Interaktionspotenzial von Insulin- und Lysozymbösungen, das mittels Röntgen-Kleinwinkelstreuung bestimmt worden ist.^[146] Der Form- und Strukturfaktor einer Insulinlösung bei einem pH-Wert von 2 wurde sowohl in Anwesenheit von 100 mM NaCl als auch nach Zugabe von 20 Vol.-% Ethanol aus konzentrationsabhängigen Messungen der Röntgen-Kleinwinkelstreuung ermittelt. Die gemessenen Strukturfaktoren wurden mit einem Protein-Protein-Wechsel-

wirkungspotenzial $V(r)$ modelliert.^[146] Im attraktiven Teil des Wechselwirkungspotenzials zeigt Insulin unter aggregierenden und fibrillierenden Lösungsmittelbedingungen ein deutliches Minimum, wohingegen dieses Minimum für das nicht-aggregierende Lysozym viel schwächer ausgeprägt ist. Der deutliche Unterschied in der Dynamik von Insulin in Abhängigkeit der zwei untersuchten Lösungsmittelbedingungen kann auf die unterschiedlichen Wechselwirkungen von stabilen und zur Aggregation neigenden Proteinen zurückgeführt werden. Die genaue Kenntnis dieser Wechselwirkungen und der damit verbundenen Dynamik ermöglicht die Kontrolle oder Feinregulierung der Selbstassoziation von Proteinen.

4.2 Einfluss des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 auf die Stabilität des Proteins *Staphylokokken-Nuklease*

In dieser Studie wurde die thermische und druckinduzierte Entfaltung des Proteins *Staphylokokken-Nuklease* (SNase) in Anwesenheit und Abwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 untersucht.[†] Hierzu wurden die FT-IR-Spektroskopie sowie kalorimetrische Messmethoden verwendet. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit theoretischen Vorhersagen verglichen. Zusätzlich wurde die Faltungskinetik des Proteins anhand von Drucksprungexperimenten ermittelt. Der Einfluss hochkonzentrierter Makromoleküllösungen auf die Entfaltung von Proteinen erlaubt erste Rückschlüsse auf die Proteinestabilität und -faltung in zellähnlichem, dicht-gepacktem Medium. Die Eignung des verwendeten makromolekularen Crowders im untersuchten Druck- und Temperaturbereich wurde mittels Röntgen-Kleinwinkelstreuung an der Beamline ID02 des Synchrotrons ESRF und der Beamline BW4 des Synchrotrons DESY geprüft. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Entfaltungstemperatur als auch der Entfaltungsdruck des Proteins in einer 30 gew.-%igen Ficolllösung deutlich zu höheren Temperaturen bzw. Drücken verschoben werden. Die Struktur des entfalteten Zustands wird jedoch nicht durch die verdichtete Lösung beeinflusst. Eine Proteinkonzentration von mehr als 10 Gew.-% führt zu weniger starken, aber dennoch erhöhten Entfaltungstemperaturen und -drücken, so dass hier von einem „self-crowding“-Effekt auszugehen ist. Die kinetischen Untersuchungen zeigen, dass die Anwesenheit einer hochkonzentrierten Ficolllösung zu einer deutlichen Verlangsamung der Faltungsgeschwindigkeit des Proteins führt. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass neben dem normalerweise angenommenen Effekt des Ausschlussvolumens noch andere Faktoren in Betracht gezogen werden müssen, um die Änderung der Faltungsgeschwindigkeit in Anwesenheit des makromolekularen Crowders zu erklären. Ein möglicher Ansatz ist die Zunahme der Viskosität des Lösungsmittels.

[†]Die in diesem Kapitel vorgestellte Studie wurde in Referenz^[150] publiziert.

Strukturelle Charakterisierung des makromolekularen Crowders

Um den Einfluss eines makromolekularen Crowders auf das p,T -Stabilitätsdiagramm von Proteinen verstehen zu können, ist es zunächst erforderlich, das temperatur- und druckabhängige Strukturverhalten der makromolekularen Crowdermoleküle zu kennen. In dieser Studie wurde das stark verzweigte und leicht wasserlösliche Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer, Ficoll PM 70, verwendet. Die Änderung der Struktur des Crowdermoleküls in Abhängigkeit der Temperatur und des Drucks wurde mittels Röntgen-Kleinwinkelstreuung untersucht. Hierzu wurde eine 1 gew.-%ige makromolekulare Crowderlösung hergestellt, da bei dieser Konzentration weitgehend keine intermolekulare Wechselwirkung auftreten. Abbildung 4.11 zeigt repräsentative Streukurven von Ficoll PM 70 (1 Gew.-%) in Abhängigkeit des Drucks bei 25 °C. Die gezeigten Streukurven sind um den Streubeitrag des Lösungsmittels unter Berücksichtigung des spezifischen Volumens von Ficoll PM 70 ($v = 0.680 \text{ mL g}^{-1}$ ^[151]) korrigiert. Die leichte Zunahme der Streuintensität bei kleinen Q -Werten kann jedoch auch bei dieser geringen Konzentration auf geringfügige attraktive Wechselwirkungen zwischen verzweigten Ketten hindeuten.

Aus der Fourier-Transformation der Streukurven resultiert die Abstandsverteilungsfunktion $p(r)$. Sie wird durch die folgende Gleichung berechnet^[152]:

$$p(r) = \frac{r^2}{(2\pi)^3} \int_0^\infty I(Q) \frac{\sin(Qr)}{Qr} \cdot 4\pi Q^2 dQ \quad (4.5)$$

Abbildung 4.12 zeigt repräsentative Abstandsverteilungsfunktionen $p(r)$ von Ficoll PM 70 (1 Gew.-%) in Abhängigkeit des Drucks bei 25 °C, die mithilfe der Auswertesoftware „GNOM“^[153] aus den entsprechenden Streukurven berechnet worden sind. Weiterhin kann der Gyrationradius R_G aus der Abstandsverteilungsfunktion berechnet werden:

$$R_G^2 = \frac{\int_0^\infty r^2 p(r) dr}{2 \int_0^\infty p(r) dr} \quad (4.6)$$

Der Gyrationradius R_G , auch Streumassenradius genannt, ist der quadratisch gemittelte Abstand aller Streuzentren zum Schwerpunkt des untersuchten Moleküls. Das druckabhängige Verhalten des Gyrationradius im Bereich zwischen 1 bar und 2500 bar ist in Abbildung 4.13 für 25 °C und 57 °C gezeigt. Das makromolekulare Crowder-

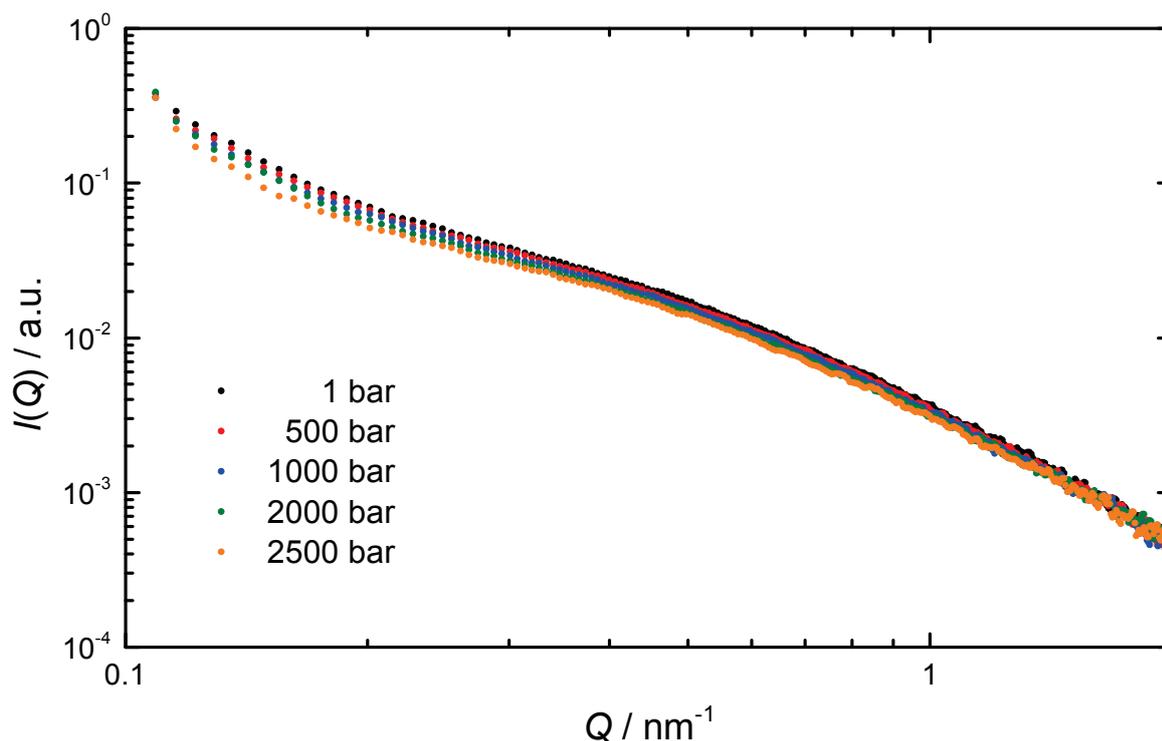


Abbildung 4.11: Repräsentative Röntgen-Kleinwinkelstreu曲ven von Ficoll PM 70 (1 Gew.-%) in Abhängigkeit des Drucks bei 25 °C.

molekül zeigt innerhalb des Fehlers keine Änderung der Größe durch eine Temperaturerhöhung von 25 °C auf 57 °C. Bei 25 °C und 1 bar beträgt der Gyrationradius für Ficoll PM 70 4.15 ± 0.2 nm und bei 57 °C und 1 bar 4.20 ± 0.2 nm. Unter der Annahme eines kugelförmigen Teilchens entspricht der gemessene Gyrationradius von 4.15 nm bei 25 °C einem Teilchenradius von 5.36 nm. Der gefundene Wert ist somit in guter Übereinstimmung mit der Literatur.^[154] Anhand der Abstandsverteilungsfunktion in Abbildung 4.12 kann jedoch geschlossen werden, dass Ficoll PM 70 eine eher leicht elongierte Teilchenform einnimmt.

Des Weiteren konnte bei 25 °C keine Änderung im Gyrationradius des Crowdermoleküls durch Druckerhöhung bis 2500 bar festgestellt werden. Lediglich bei erhöhter Temperatur ($T = 57$ °C) konnte ab einem Druck von 1 kbar ein leicht vergrößerter Gyrationradius festgestellt werden, der sich jedoch bei weiterer Druckerhöhung auf 2 kbar wieder auf den Ausgangswert reduziert hat. Dieser leicht erhöhte Wert zwischen 1 und 2 kbar kann auf ein zwischenzeitliches Aufquellen des Crowdermoleküls durch Wasser zurückgeführt werden.

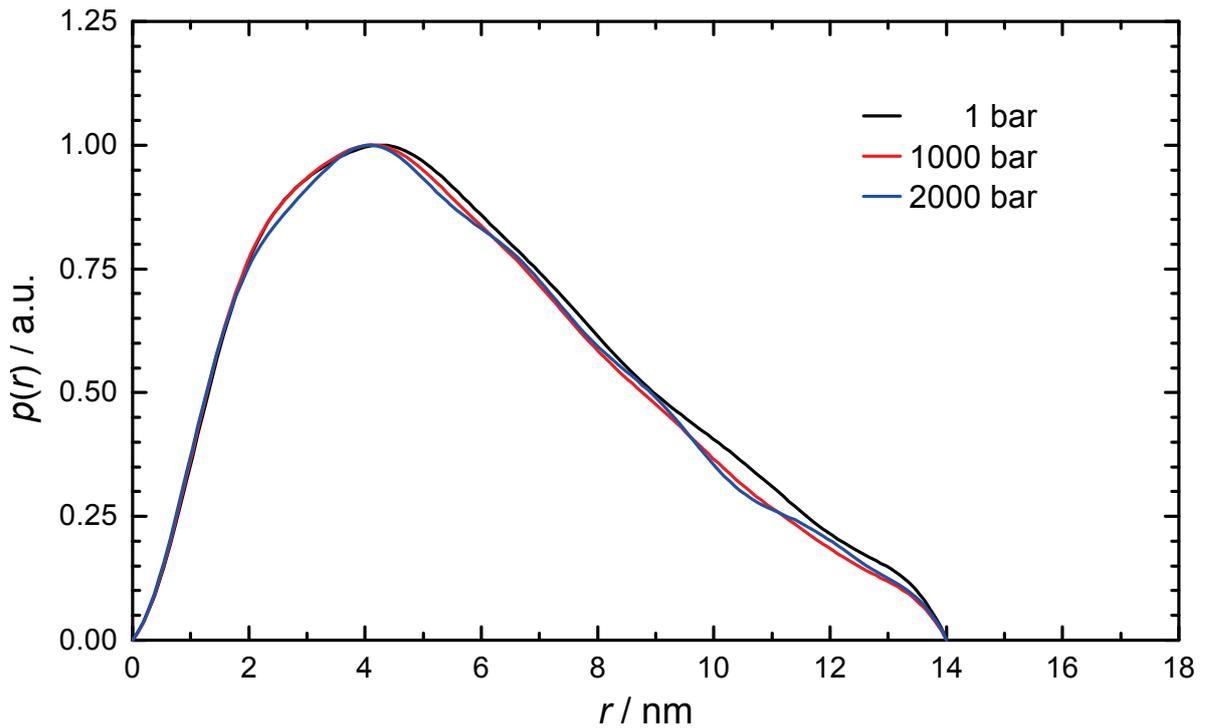


Abbildung 4.12: Repräsentative Abstandsverteilungsfunktionen $p(r)$ von Ficoll PM 70 (1 Gew.-%) in Abhängigkeit des Drucks bei 25 °C.

Globale Informationen über die Netzwerkstruktur von Polymeren oder polymer-ähnlichen Molekülen resultieren aus einer Auftragung von $Q^2I(Q)$ gegen Q , der sogenannten Kratky-Auftragung. Diese Auftragung hilft, zwischen verschiedenen Netzwerkstrukturen des makromolekularen Systems zu unterscheiden.^[116] Die Kratky-Auftragung des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 mit einer Konzentration von 15 Gew.-% (links) und 30 Gew.-% (rechts) ist in Abbildung 4.14 dargestellt.

Die Streukurve einer 15 gew.-%igen Ficoll PM 70 Lösung weist ein breites Maximum bei mittleren Q -Werten auf, was ein charakteristisches Merkmal für stark verzweigte Polymere mit einer hohen Segmentdichte ist.^[155] Eine Druckapplikation von 2.5 kbar führt zu einem weniger ausgeprägten Maximum. Die druckinduzierte Änderung der Kurvenform ist wahrscheinlich auf die Ausbildung einer stärker verknäuelten Netzwerkstruktur zurückzuführen. Diese verknäuelten Netzwerkstrukturen können ebenfalls durch eine Erhöhung der Crowderkonzentration auf 30 Gew.-% erreicht werden. Bei diesen Konzentrationen liegen die Crowdermoleküle nur noch schwach verdünnt vor, und intermolekulare Wechselwirkungen steigen merklich an. Im Gegensatz zu verdünnten Lösungen

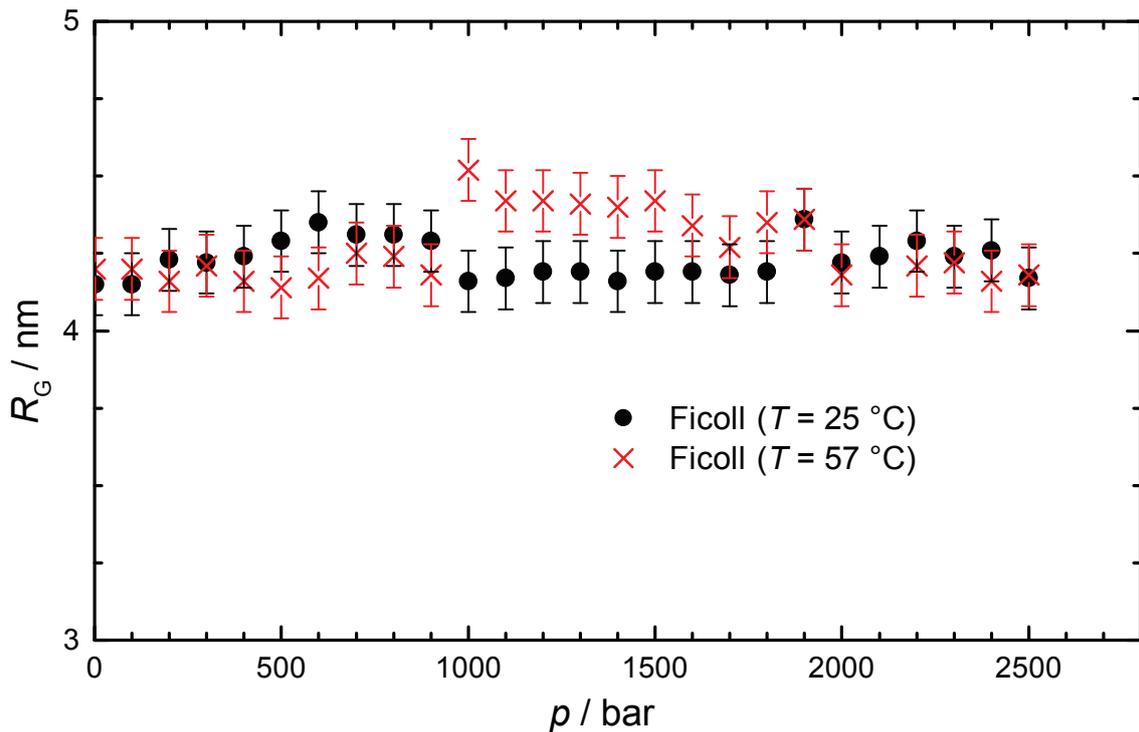


Abbildung 4.13: Gyrationradius R_G von Ficoll PM 70 (1 Gew.-%) im Druckbereich zwischen 1 bar und 2500 bar bei 25 °C (●) und bei 57 °C (×).

tritt bei hochkonzentrierten Lösungen aufgrund der Ausbildung von verknäulten Netzwerkstrukturen eine weitere charakteristische Größe auf, die sogenannte Maschenweite oder auch Korrelationslänge. Bei hochkonzentrierten makromolekularen Crowderlösung kann eine Ornstein-Zernike-Analyse groben Aufschluss über die Netzwerkstruktur geben. In diesem Fall gilt für die Streuintensität $I(Q)$ eine Lorentz-Gleichung:

$$I(Q) = \frac{I(0)}{1 + \xi^2 Q^2} \quad (4.7)$$

mit $\xi Q < 1$, wobei ξ die Korrelationslänge wiedergibt.^[116] Der Wert der Korrelationslänge, die den mittleren Abstand zwischen Vernetzungspunkten beschreibt, kann aus der entsprechenden Ornstein-Zernike-Auftragung ($I(Q)^{-1}$ gegen Q^2) gewonnen werden. Für eine 15 gew.-%ige Ficolllösung ergibt sich ein Wert von 4.9 ± 0.1 nm und für eine 30 gew.-%ige Ficolllösung ein Wert von 3.2 ± 0.1 nm. Beide Konzentrationen zeigten keine Veränderung der Korrelationslänge infolge einer Druckapplikation bis 2.5 kbar. Insgesamt weisen alle untersuchten Parameter des makromolekularen Crowders Fi-

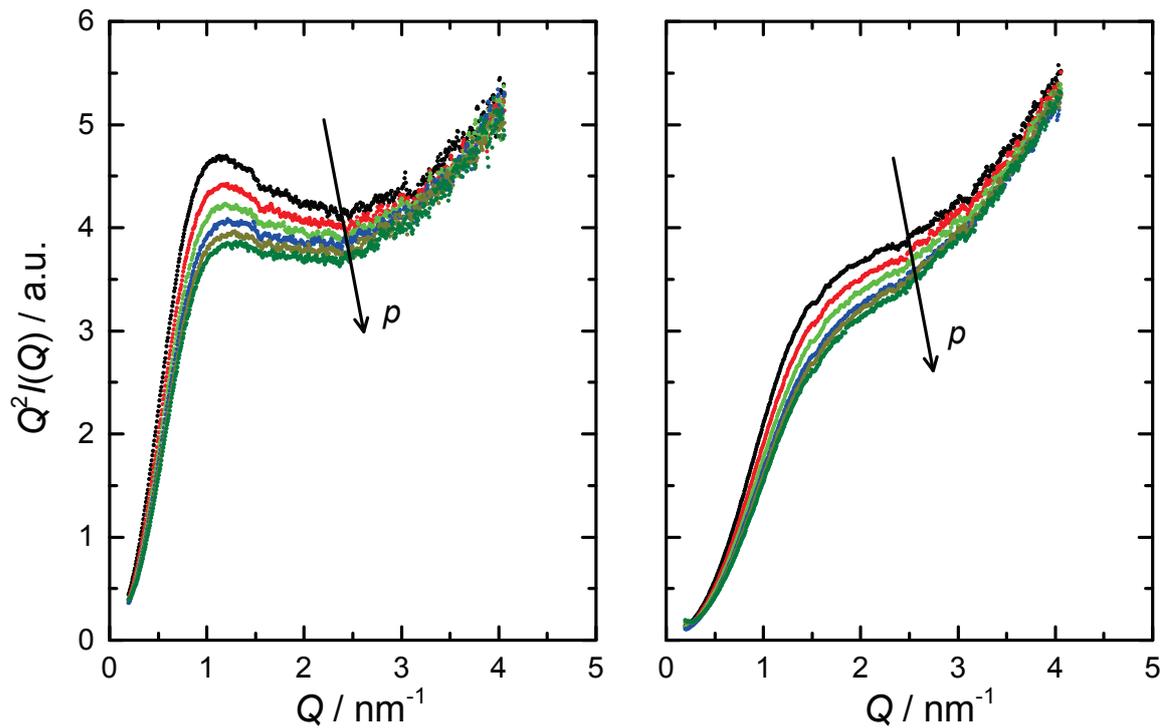


Abbildung 4.14: Kratky-Auftragung des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 mit einer Konzentration von 15 Gew.-% (links) und 30 Gew.-% (rechts). Der Effekt der Druckapplikation (von 1 bar bis 2500 bar) auf die Streukurven wird durch den schwarzen Pfeil verdeutlicht.

coll PM 70, wie der Gyrationradius R_G für verdünnte Lösungen sowie die Kontur der Kratky-Auftragung und die Ornstein-Zernike-Analyse für hochkonzentrierte Lösungen, nur geringe strukturelle Änderungen durch Druckapplikation auf. Des Weiteren wurde keine Aggregation oder Entmischung beobachtet. Somit kann dieser inerte makromolekulare Crowder verwendet werden, um die hochkonzentrierte Lösung innerhalb einer biologischen Zelle zu imitieren, sowohl bei hohen Temperaturen als auch bei hohen Drücken.

Analoge Strukturuntersuchungen mittels Röntgen-Kleinwinkelstreuung wurden ebenfalls mit dem makromolekularen Crowder Dextran 70 durchgeführt. Die entsprechenden Abbildungen sind im Anhang (siehe Kapitel 6.1) zu finden.

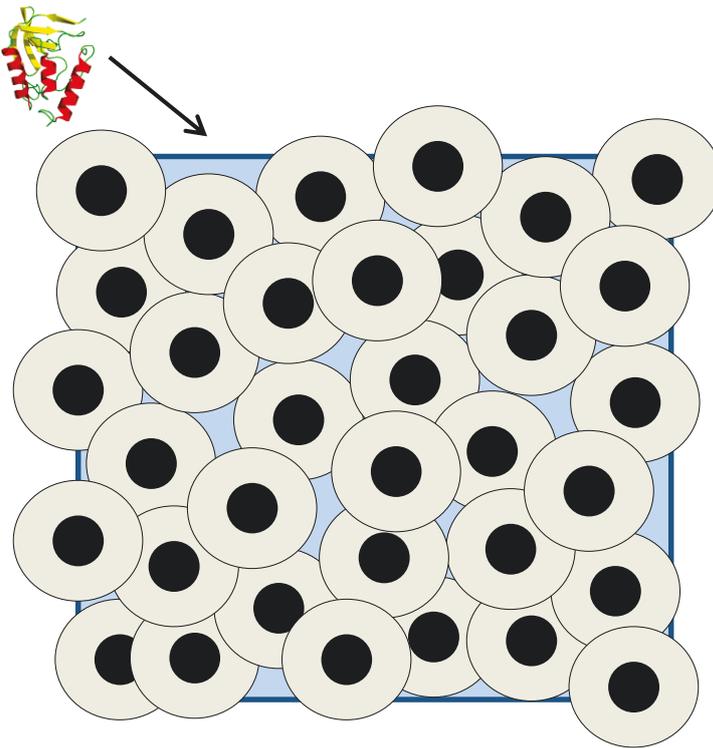


Abbildung 4.15: Schematische Darstellung des verfügbaren Volumens (hellblau) für das Protein in Anwesenheit einer hochkonzentrierten Makromoleküllösung. Modifizierte Darstellung nach A. P. Minton.^[30]

Theoretische Vorhersage des Einflusses von makromolekularen Crowdern auf die Stabilität von Proteinen

Im Allgemeinen wird die Erhöhung der Proteinstabilität durch den Effekt des Ausschlussvolumens erklärt. Wie Abbildung 4.15 zeigt, steht dem Protein in Anwesenheit hochkonzentrierter Makromoleküllösungen weniger Platz zu Verfügung als in verdünnten Lösungen.

Aufgrund der Volumeneinschränkung („excluded volume“-Effekt) ist es für das Protein thermodynamisch ungünstiger, eine weniger kompakte Form, wie es der entfalteten Zustand darstellt, einzunehmen. Daher wird der native, gefaltete Zustand in verdichteten Lösungen begünstigt. Erste theoretische Berechnungen wurden von Zhou et al.^[33,34] veröffentlicht und werden im Nachfolgenden auf das untersuchte System übertragen. In einer einfachen Näherung wird das gefaltete Protein als Kugel mit dem Radius r_f und das entfaltete als Gaußsches Zufallsknäuel betrachtet. Der Fadenendenabstand des

Knäuels mit $N + 1$ Segmenten (hier Anzahl der Aminosäuren) ist gegeben als:

$$\langle R_N^2 \rangle^{1/2} = \tilde{R}_N = bN^{1/2} \quad (4.8)$$

mit b , der effektiven Bindungslänge des Knäuels. Unter Berücksichtigung des Ausweichens der einzelnen Segmente im entfalteten Protein, reduziert sich der Fadenendenabstand zu $\tilde{R}_N = 5.31N^{0.6}$, wobei \tilde{R}_N in Å angegeben wird.^[34,156]

Nach Hinzugabe des makromolekularen Crowders können mehrere Konformationen des entfalteten Proteins nicht mehr realisiert werden. Der Faktor f_u beschreibt die Abnahme der Anzahl an realisierbaren Mikrozuständen des entfalteten Proteins. Somit bezieht sich nach Boltzmann der Term $-\ln(f_u)$ auf die Entropieabnahme des entfalteten Proteins. Unter der Annahme, dass die makromolekularen Crowdermoleküle Kugeln mit dem Radius r_c sind, nehmen diese einen Volumenanteil von $\phi_C = (4\pi/3)r_c^3 c_N$ ein. Die Konzentration c_N ist hierbei die Teilchenzahldichte. Der reduzierte statische Anteil des entfalteten Proteins in Anwesenheit der makromolekularen Crowdermoleküle ergibt sich dann zu:^[34]

$$-\ln(f_u) = 3\phi_C y^2 + 6\pi^{-1/2}\phi_C y^{1/2} - \ln(1 - \phi_C) - 9\phi_C^2 y^2 \ln(y) \quad (4.9)$$

mit $y = \tilde{R}_N / (6^{1/2}r_c)$.

Ebenfalls wird der statistische Anteil des gefalteten Proteins in verdichteten Lösungen reduziert, da das verfügbare Volumen durch die Anwesenheit von makromolekularen Crowdermolekülen herabgesetzt wird. Unter der Annahme, dass das gefaltete Protein als ideale Kugel mit einem effektiven (hydrodynamischen) Radius r_f angenommen wird, resultiert basierend auf der Theorie der skalierten Teilchen, einem analytischen Modell zur Berechnung des zugänglichen Volumens in teilgefüllten Lösungen, folgender Zusammenhang für den Abnahmefaktor $-\ln(f_f)$:

$$-\ln(f_f) = (3z + 3z^2 + z^3)\rho + (9z^2/2 + 3z^3)\rho^2 + 3z^3\rho^3 - \ln(1 - \phi) \quad (4.10)$$

mit $z = r_f/r_c$ und $\rho = \phi_C / (1 - \phi_C)$.

Hieraus resultiert für die Gibbs-Energie der Proteinfaltung, unter Vernachlässigung

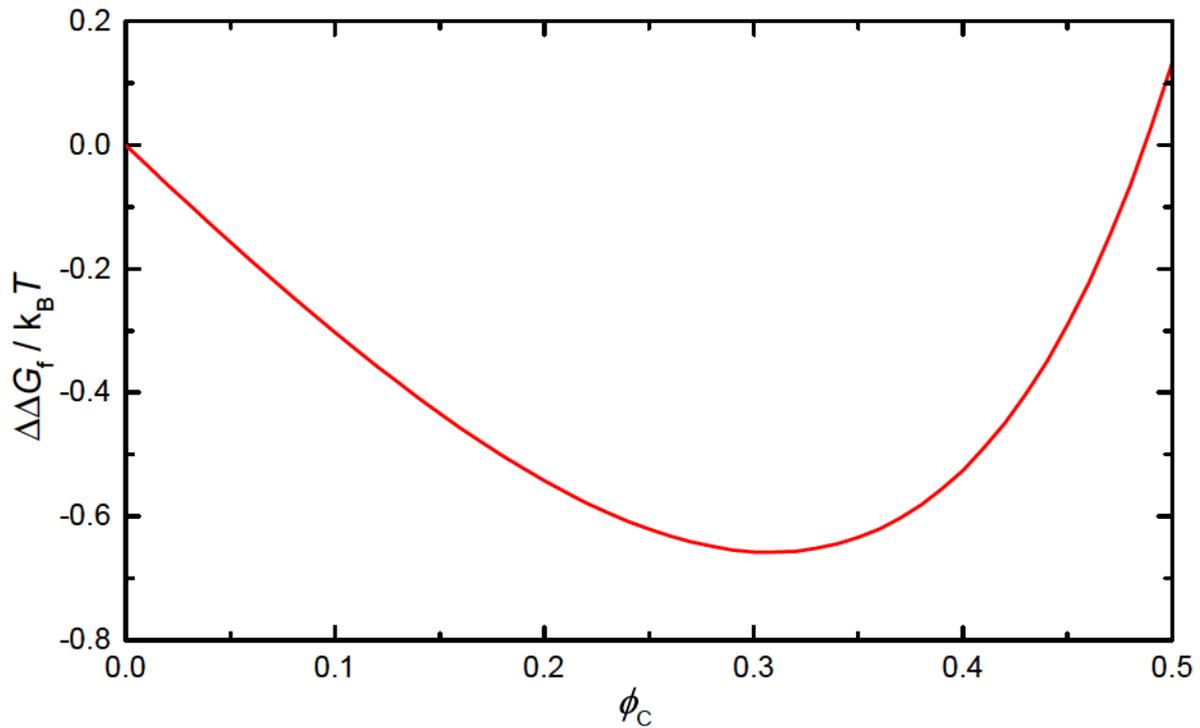


Abbildung 4.16: Theoretische Berechnung der Änderung der Gibbs-Energie der Proteinfaltung $\Delta\Delta G_f$ des Proteins SNase als Funktion des Volumenanteils ϕ_C des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70.

enthalpischer Beiträge, folgender Term:

$$\Delta\Delta G_f = -k_B T \ln \left(\frac{f_f}{f_u} \right) \quad (4.11)$$

mit $k_B T$ als thermische Energie.

Abbildung 4.16 zeigt die Änderung der Gibbs-Energie der Proteinfaltung als Funktion des Volumenanteils des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70. Der Effekt der makromolekularen Verdichtung kann im Fall von Ficoll PM 70 fast ausschließlich durch das Modell des Ausschlussvolumens beschrieben werden, da die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen Ficoll PM 70 und Proteinen vernachlässigbar gering sind.^[157] Analog zur theoretischen Beschreibung wurde auch in dieser Studie das entfaltete Protein als Zufallsknäuel und das gefaltete Protein als Kugel mit einem hydrodynamischen Radius von 21.9 Å angenommen.^[46] Der Fadenendenabstand des entfaltenen Proteins wurde, wie oben beschrieben, berechnet. Als molekularer Crowder wurde Ficoll PM 70 mit einer molaren Masse von 70 kg mol⁻¹ und einem hydrodynamischen Radius von

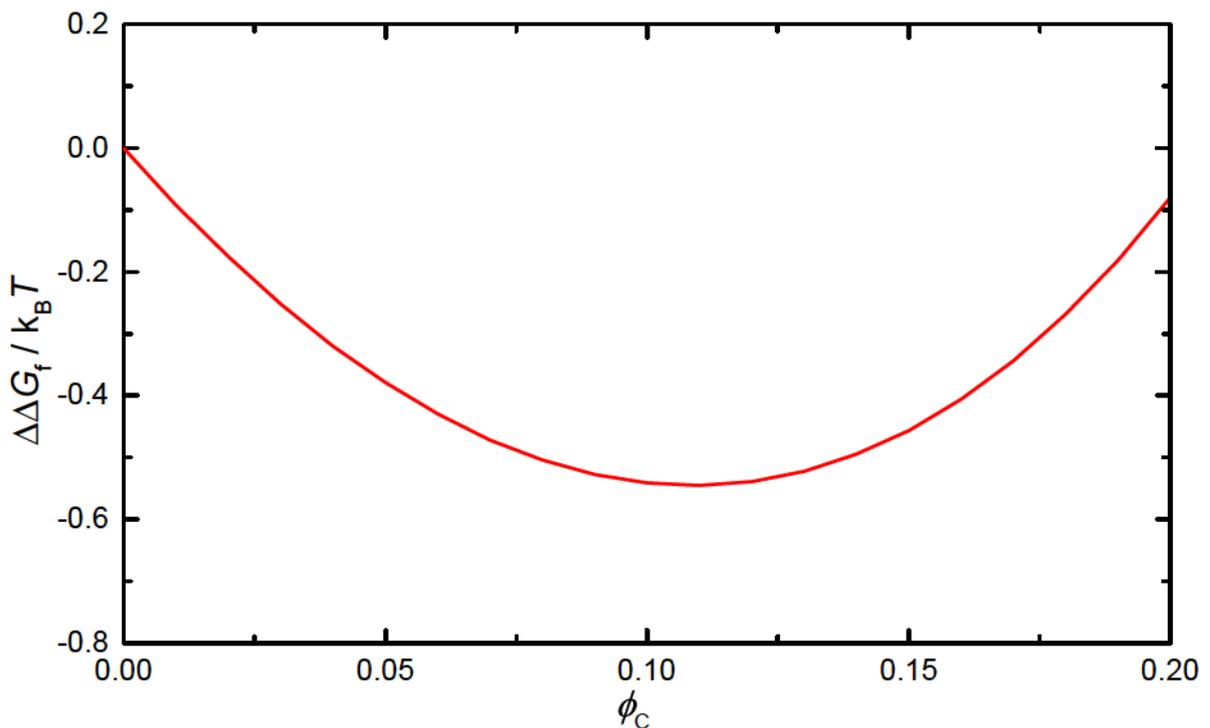


Abbildung 4.17: Theoretische Berechnung der Änderung der Gibbs-Energie der Proteinfaltung $\Delta\Delta G_f$ des Proteins SNase als Funktion des Volumenanteils ϕ_C in der „self-crowding“-Situation ($r_C = r_f$).

ungefähr 53.6 \AA verwendet. Der hydrodynamische Radius wurde aus dem Gyrationradius R_G berechnet, der durch Röntgen-Kleinwinkelstreuexperimente bestimmt wurde. Der Effekt der molekularen Verdichtung ist zwar sehr klein, jedoch für Konzentrationen, wie sie intrazellulär vorkommen, signifikant. Für eine 30 gew.-%ige Ficolllösung (entspricht einem Volumenanteil von 0.29) wird das gefaltete Protein um einen Wert $0.65 k_B T$ (ungefähr 1.61 kJ mol^{-1}) stabilisiert. Dieser Wert entspricht gleichzeitig dem maximalen Wert der Proteinstabilisierung durch Ficoll PM 70.

Derselbe Formalismus wurde auf die „self-crowding“-Situation angewandt, das heißt, das Protein selbst stellt das Crowdermolekül dar. Somit wird bei den Berechnungen für das makromolekulare Crowdermolekül und das gefaltete Protein dieselbe Kugelgröße von 21.9 \AA angenommen ($r_C = r_f$). Eine weniger ausgeprägte Stabilisierung des nativen Zustands wird in der „self-crowding“-Situation erreicht. Wie Abbildung 4.17 zeigt, erfährt das gefaltete Protein eine Stabilisierung von $0.52 k_B T$ (ungefähr 1.29 kJ mol^{-1}) in einer 15 gew.-%igen Proteinlösung (entspricht einem Volumenanteil von 0.1).

Dynamische Differenzkalorimetrie und Druck-Perturbations-Kalorimetrie

Zur Bestimmung thermodynamischer Größen des Proteins SNase in Anwesenheit und Abwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) wurden kalorimetrische Messungen durchgeführt. Aus der dynamischen Differenzkalorimetrie konnte für die Entfaltungstemperatur T_m des reinen Proteins SNase ein Wert von 51.4 ± 0.6 °C bestimmt werden, der mit vorherigen Messdaten übereinstimmt.^[95–98] In Anwesenheit einer 30 gew.-%igen Ficoll PM 70 Lösung erhöht sich die Entfaltungstemperatur um 3.9 °C auf 54.7 ± 0.7 °C. Unter Verwendung der gemessenen Werte für die Enthalpieänderung $\Delta H_u^\circ(T_m)$ von 188 kJ mol^{-1} und der Wärmekapazitätsänderung $\Delta C_{p,u}^\circ(T_m)$ des Proteins bei der Entfaltung von $5.2 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ kann die Änderung der Standard-Gibbs-Entfaltungsenergie $\Delta G_u^\circ(T)$ unter Verwendung der folgenden Gleichung berechnet werden:

$$\Delta G_u^\circ(T) = \Delta H_u^\circ(T_m) \left[1 - \frac{T}{T_m} \right] + \Delta C_{p,u}^\circ [T - T_m] - \Delta C_{p,u}^\circ T \ln \left[\frac{T_m}{T} \right] \quad (4.12)$$

Hieraus resultiert nach Gleichung 4.12 bei $T = 25$ °C ein Wert von $\Delta G_u^\circ(25 \text{ °C}) = 9.50 \text{ kJ mol}^{-1}$ für das reine Protein SNase in Pufferlösung. In Anwesenheit einer 30 gew.-%igen Ficolllösung erhöht sich die Entfaltungstemperatur des Proteins um 3.3 °C, infolgedessen steigt der Wert für $\Delta G_u^\circ(25 \text{ °C})$ auf 9.83 kJ mol^{-1} an. Hieraus resultiert eine Stabilitätserhöhung des Proteins, $+\Delta\Delta G_u^\circ = -\Delta\Delta G_f^\circ$, um 0.33 kJ mol^{-1} . Dieser berechnete Wert ist ungefähr fünfmal kleiner im Vergleich zum Ergebnis des theoretischen Modells aus dem vorherigen Abschnitt. Da das theoretische Modell lediglich den Beitrag des Ausschlussvolumens beschreibt, muss der Unterschied zwischen dem experimentellen und theoretischen Wert auf schwache intermolekulare Wechselwirkungen zwischen dem Protein und den makromolekularen Crowdermolekülen zurückgeführt werden, das heißt auf einen kompensierenden enthalpischen Beitrag (typische Beiträge liegen in der Größenordnung von 10 kJ mol^{-1} und höher).

Der thermische Ausdehnungskoeffizient α für das Protein SNase in Abwesenheit und Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) als Funktion der Temperatur ist in Abbildung 4.18 dargestellt. Das Ergebnis der Druck-Perturbations-

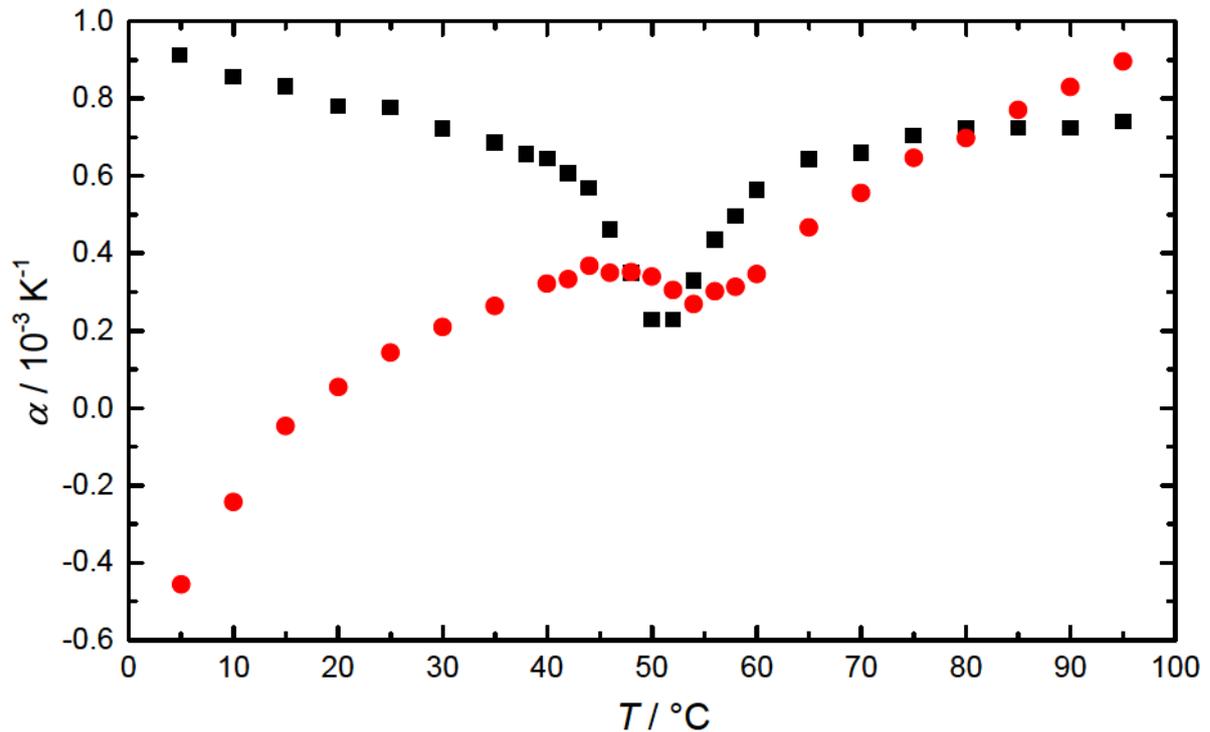


Abbildung 4.18: Thermischer Ausdehnungskoeffizient α für das Protein SNase in Abwesenheit (■) und Anwesenheit (●) des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) als Funktion der Temperatur.

Kalorimetrie zeigt eine ähnliche Erhöhung der Entfaltungstemperatur des Proteins in Anwesenheit des makromolekularen Crowders. Durch Integration der temperaturabhängigen Kurve des thermischen Ausdehnungskoeffizienten und bei Verwendung eines spezifischen Volumens v für SNase von 0.754 mL g^{-1} ,^[158] errechnet sich die absolute Volumenänderung des Proteins bei der Entfaltung ΔV_u° zu $-56 \pm 20 \text{ mL mol}^{-1}$ in Abwesenheit und zu $-32 \pm 20 \text{ mL mol}^{-1}$ in Anwesenheit einer 30 gew.-%igen Ficolllösung. Die Volumenänderung ist sehr sensitiv in Bezug auf die Temperatur, so dass es zu berücksichtigen gilt, dass sich die jeweiligen Werte auf die Entfaltungstemperatur unter den gegebenen Bedingungen beziehen und die Entfaltungstemperatur des Proteins in Anwesenheit des makromolekularen Crowders deutlich höher ist. Im Allgemeinen bedeutet dies, dass ein bei geringen Temperaturen negatives ΔV_u° mit steigender Temperatur vom Betrag her kleiner wird und eventuell sogar einen positiven Wert einnehmen kann. Vorausgesetzt wird hierbei ein größerer thermischer Ausdehnungskoeffizient für den denaturierten Zustand im Vergleich zum nativen.^[97,159]

Der Effekt des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 auf die thermische Entfaltung des Proteins SNase

In diesem Teil der Studie wurden temperaturabhängige FT-IR-Messungen durchgeführt, um die relative Änderung der Sekundärstrukturanteile des Proteins SNase während der thermischen Entfaltung in Abwesenheit und Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) zu studieren. Repräsentativ sind in Abbildung 4.19 die normierten FT-IR-Spektren im Bereich der Amid-I'-Bande (1600 – 1700 cm^{-1}) einer 3 gew.-%igen SNase-Lösung in Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) während der thermischen Entfaltung bei 1 bar und pD 5.5 gezeigt. Temperaturinduzierte Änderungen von 10 °C bis 65 °C werden durch den schwarzen Pfeil verdeutlicht. Die Minima in den resultierenden Spektren der 2. Ableitung (Abbildung 4.20) wurden für die Lokalisierung der verschiedenen Sekundärstrukturelemente als Subbande der Amid-I'-Bande des Proteins SNase verwendet (Tabelle 3.1).

Die temperaturabhängigen Änderungen der prozentualen Anteile ausgewählter Sekundärstrukturelemente einer 3 gew.-%igen SNase-Lösung in Abwesenheit und Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) zeigen die Abbildungen 4.21 und 4.22. Im Bereich von 10 °C bis 35 °C weist das Protein innerhalb des Fehlers von 3 – 4 % keine Änderung der Sekundärstruktur auf. Eine schrittweise Erhöhung der Temperatur auf 65 °C führt zu einer Abnahme des Anteils an α -Helices und β -Faltblättern, einhergehend mit einer Zunahme des Anteils an ungeordneten Strukturen. Diese Beobachtung spiegelt die thermische Entfaltung des Proteins wider.

Der sigmoidale Kurvenverlauf kann, unter der Annahme eines 2-Zustands-Modells ($f \rightleftharpoons u$) für das Protein, mit einer Boltzmann-Funktion angepasst werden. Für den Fall der thermischen Entfaltung gilt für die Intensität der Infrarot-Absorption folgende Gleichung:

$$I = \frac{I_f - I_u}{1 + e^{-(1/T_m - 1/T) \cdot (\Delta H_{u,vH}^\circ / R)}} + I_u \quad (4.13)$$

I_f und I_u sind in dieser Gleichung die Absorptionswerte des Plateaus für den gefalteten bzw. entfalteten Zustand des Proteins. Des Weiteren stellt T_m den Mittelpunkt des Übergangs und somit die Entfaltungstemperatur dar. Diese Gleichung basiert auf der Annahme, dass der Stoffmengenanteil des gefalteten Zustands proportional zu $I_u - I$

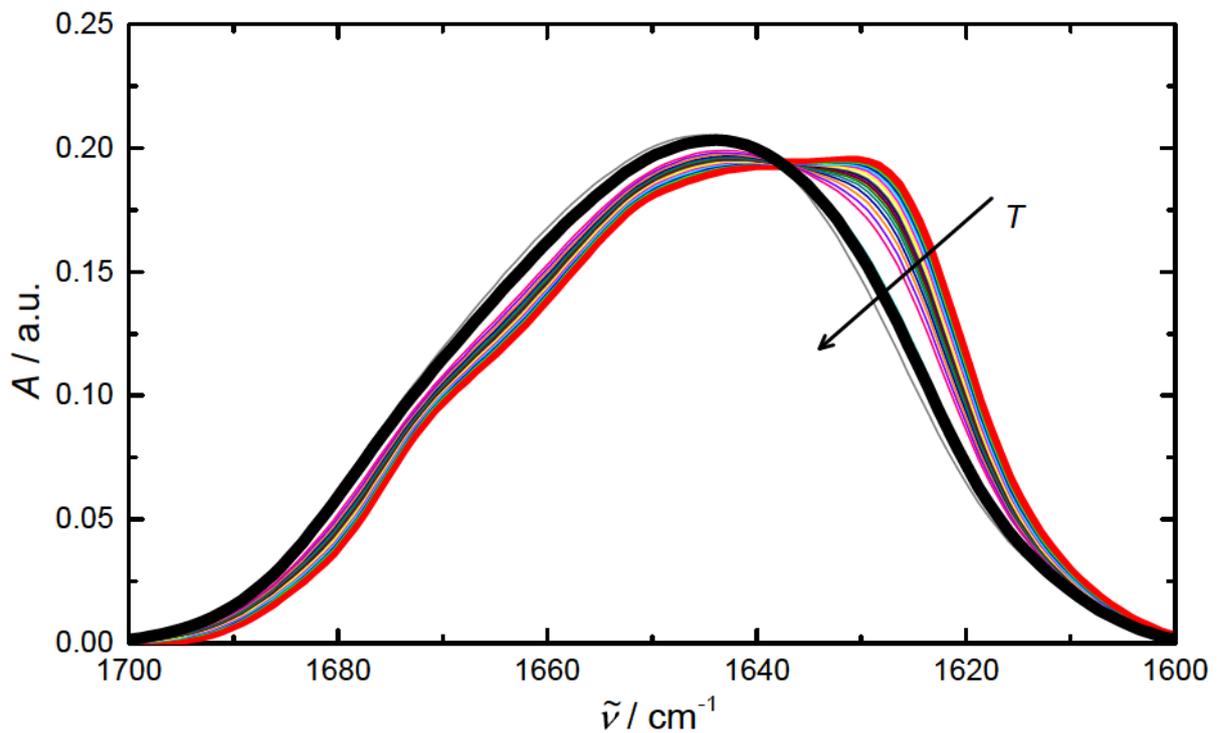


Abbildung 4.19: Normierte FT-IR-Spektren im Bereich der Amid-I'-Bande ($1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$) einer 3 gew.-%igen SNase-Lösung in Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) während der thermischen Entfaltung bei 1 bar und pD 5.5. Temperaturinduzierte Änderungen von $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$ werden durch den schwarzen Pfeil verdeutlicht.

und der des entfalteten Zustands proportional zu $I - I_f$ ist. Die Entfaltungstemperatur des Proteins SNase (3 Gew.-%) beträgt $47.8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und ist somit in guter Übereinstimmung mit vorherigen Messungen.^[95] Die Zugabe des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) führt zu einer Stabilisierung des nativen Proteins. Die Entfaltungstemperatur steigt um ungefähr $1.4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ von $47.8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ auf $49.2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Im Vergleich zu den Ergebnissen der kalorimetrischen Untersuchungen sind die gefundenen Entfaltungstemperaturen etwas geringer, was auf die deutlich höhere Proteinkonzentration (Faktor 10) zurückgeführt werden kann. Aufgrund der Verwendung einer Diamantstempelzelle war es nicht möglich, die Proteinkonzentration für die FT-IR-Experimente zu verringern. Im weiteren Verlauf der Studie werden daher die genaueren Werte der kalorimetrischen Messungen verwendet. Ein Vergleich der prozentualen Anteile der einzelnen Sekundärstrukturelemente des Proteins im entfalteten Zustand zeigt innerhalb des Fehlers gleiche Werte in Abwesenheit und Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll

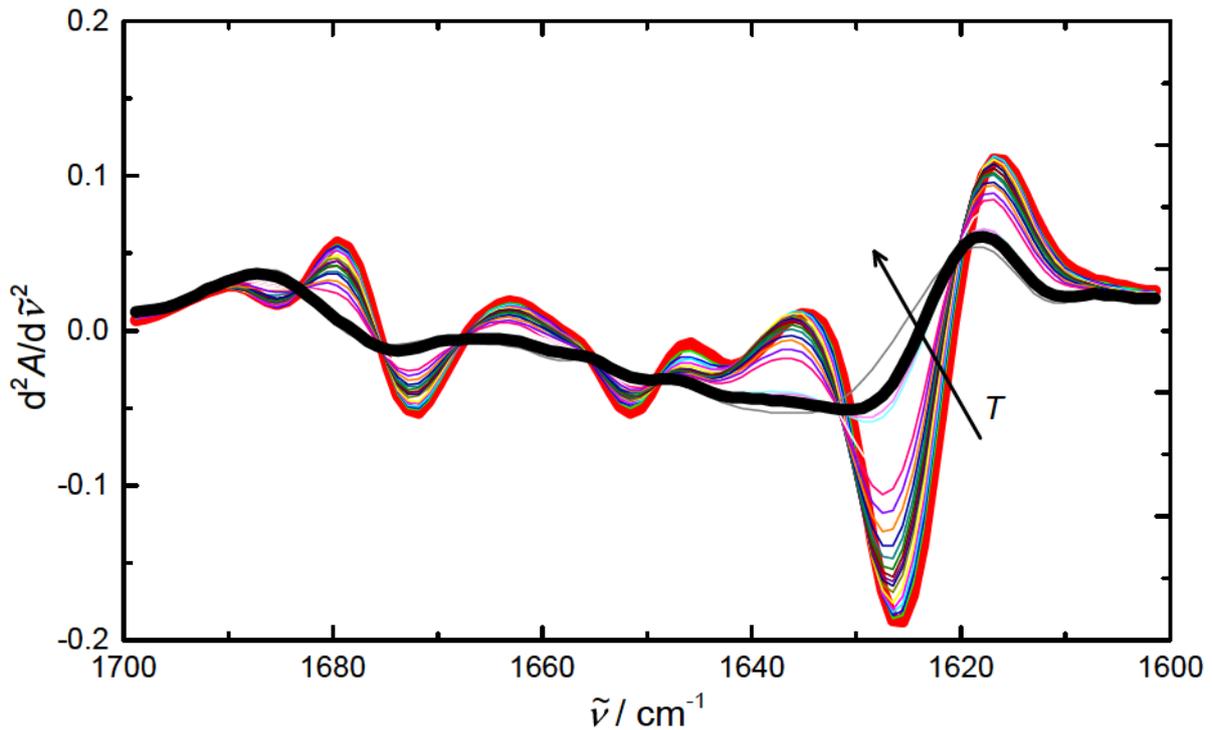


Abbildung 4.20: 2. Ableitung der normierten FT-IR-Spektren im Bereich der Amid-I'-Bande ($1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$) einer 3 gew.-%igen SNase-Lösung in Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) während der thermischen Entfaltung bei 1 bar und pD 5.5. Temperaturinduzierte Änderungen von $10 \text{ }^\circ\text{C}$ bis $65 \text{ }^\circ\text{C}$ werden durch den schwarzen Pfeil verdeutlicht.

PM 70 (30 Gew.-%).

Eine Stabilisierung von Proteinen in Anwesenheit von makromolekularen Crowdern wurde ebenfalls für die Proteine RNase A und Lysozym gefunden.^[39,160] Hierbei konnte eine Erhöhung der Entfaltungstemperatur von RNase A um $5 \text{ }^\circ\text{C}$ nach Zugabe des makromolekularen Crowders Dextran detektiert werden.^[39] Auch Sasahara, McPhie und Minton konnten zeigen, dass die Zugabe des makromolekularen Crowders Dextran eine Erhöhung der Entfaltungstemperatur von Lysozym um $3 \text{ }^\circ\text{C}$ bewirkt.^[160]

Die Van't-Hoff-Entfaltungsenthalpie $\Delta H_{\text{u,vH}}^\circ$ ist direkt aus der Steigung einer Intensitätskurve berechenbar. Die Beziehung zwischen der Änderung der Standard-Gibbs-Energie $\Delta G_{\text{u}}^\circ$ und der Gleichgewichtskonstanten $K_{\text{eq,u}}$ der Proteinentfaltung kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$\Delta G_{\text{u}}^\circ = -RT \ln (K_{\text{eq,u}}) = -RT \ln [(I - I_{\text{f}}) / (I_{\text{u}} - I)] \quad (4.14)$$

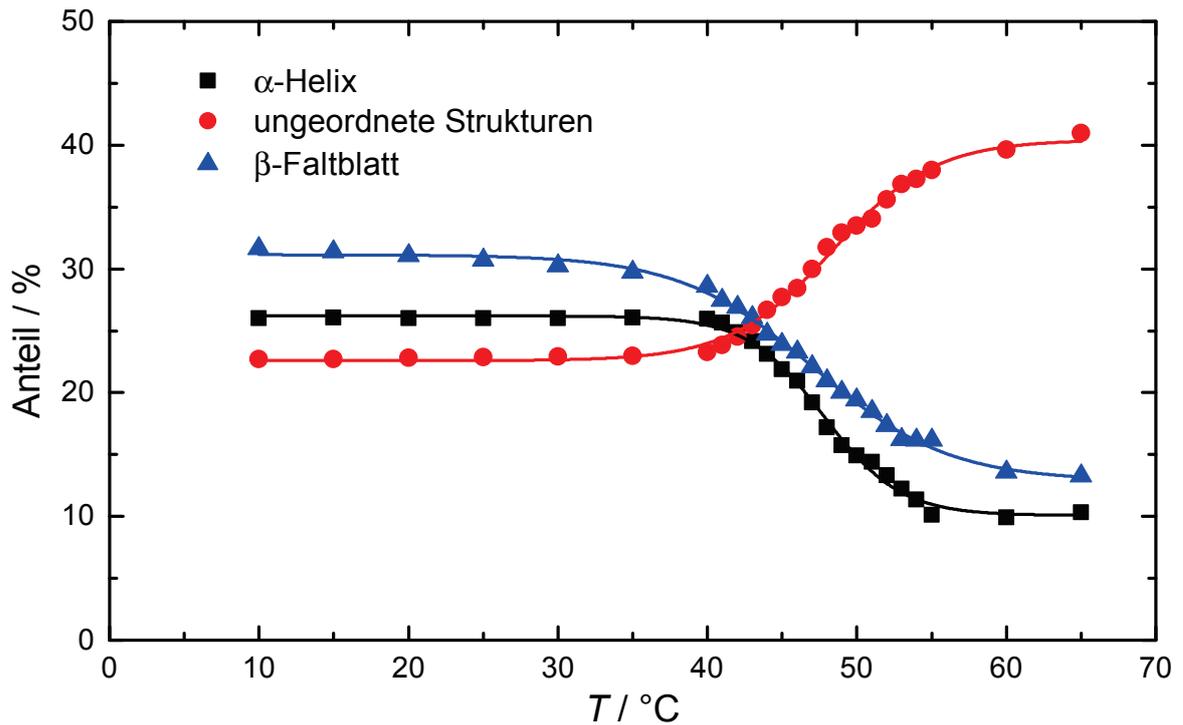


Abbildung 4.21: Temperaturabhängige Änderung des prozentualen Anteils ausgewählter Sekundärstrukturelemente einer 3 gew.-%igen SNase-Lösung bei 1 bar und pH 5.5.

Im Gleichgewicht der Entfaltung ist $\Delta G_u^\circ = 0$ und somit kann die Entfaltungsentropie ΔS_u° wie folgt berechnet werden:

$$\Delta S_u^\circ = \Delta H_{u,vH}^\circ / T_m \quad (4.15)$$

Unter Verwendung von Gleichung 4.13 beträgt die Van't-Hoff-Entfaltungsenthalpie $\Delta H_{u,vH}^\circ$ für das Protein SNase $275 \pm 70 \text{ kJ mol}^{-1}$ in Abwesenheit und $309 \pm 60 \text{ kJ mol}^{-1}$ in Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%). Die resultierenden Werte sind innerhalb des experimentellen Fehlers für beide Bedingungen gleich (ein leicht höherer Wert in Anwesenheit des makromolekularen Crowders kann eventuell auf den Beitrag von intermolekularen Wechselwirkungen zurückgeführt werden) und stimmen mit den Werten der kalorimetrischen Messungen überein. Der Quotient der Entfaltungsenthalpie aus kalorimetrischen Messungen ΔH_u° und der Van't-Hoff-Entfaltungsenthalpie $\Delta H_{u,vH}^\circ$ aus FT-IR-Messungen beschreibt die Kooperativität des Proteins. In dieser Studie ergibt sich ein Wert von 1, so dass die SNase hochkoope-

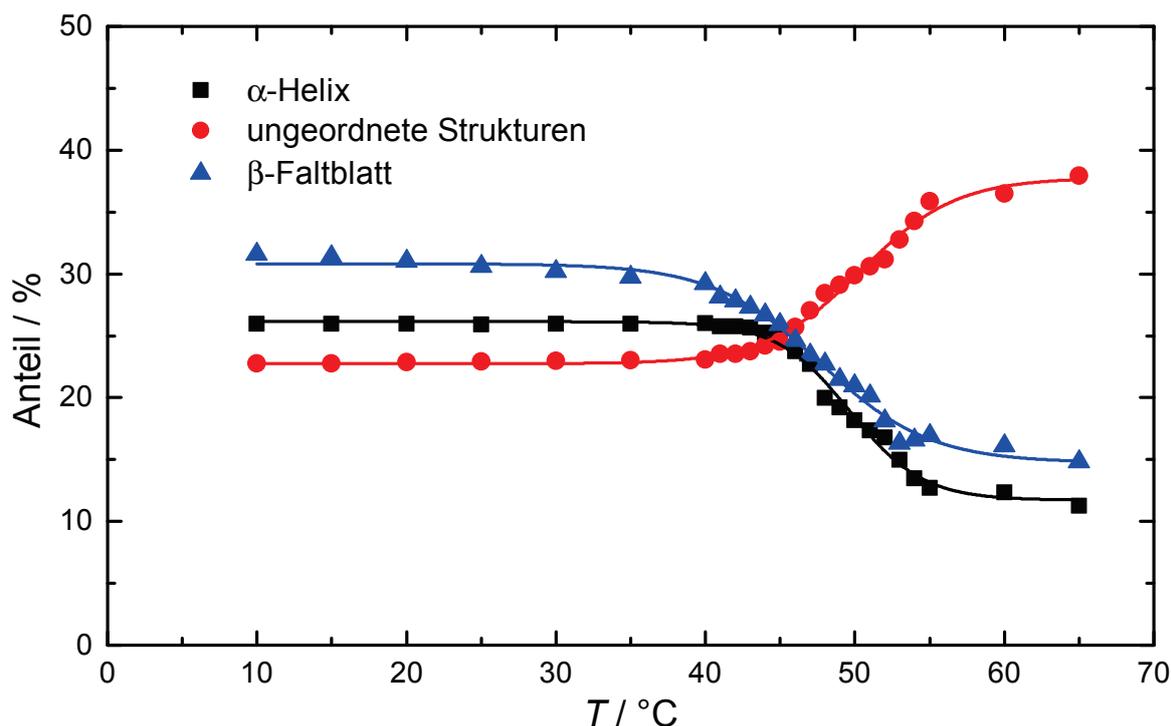


Abbildung 4.22: Temperaturabhängige Änderung des prozentualen Anteils ausgewählter Sekundärstrukturelemente einer 3 gew.-%igen SNase-Lösung in Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) bei 1 bar und pD 5.5.

rativ entfaltet und der Entfaltungsprozess einem 2-Zustands-Modell ($f \rightleftharpoons u$) entspricht. Hierbei wird der entfaltete Zustand als Ensemble der möglichen Konformationen des entfaltenen Zustands angenommen. Die Berechnung der Entfaltungsentropie ΔS_u° nach Gleichung 4.15 ergibt einen Wert für das Protein SNase von $854 \pm 214 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ und $954 \pm 214 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ in Abwesenheit bzw. Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%).

Der Effekt des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 auf die druckinduzierte Entfaltung des Proteins SNase

Die druckinduzierte Proteinentfaltung in Anwesenheit und Abwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 wurde mit einer Diamantstempelzelle mittels FT-IR-Spektroskopie bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Die repräsentative Abbildung 4.23 zeigt normierte FT-IR-Spektren im Bereich der Amid-I'-Bande ($1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$) einer 3 gew.-%igen SNase-Lösung in Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) während der druckinduzierten Entfaltung

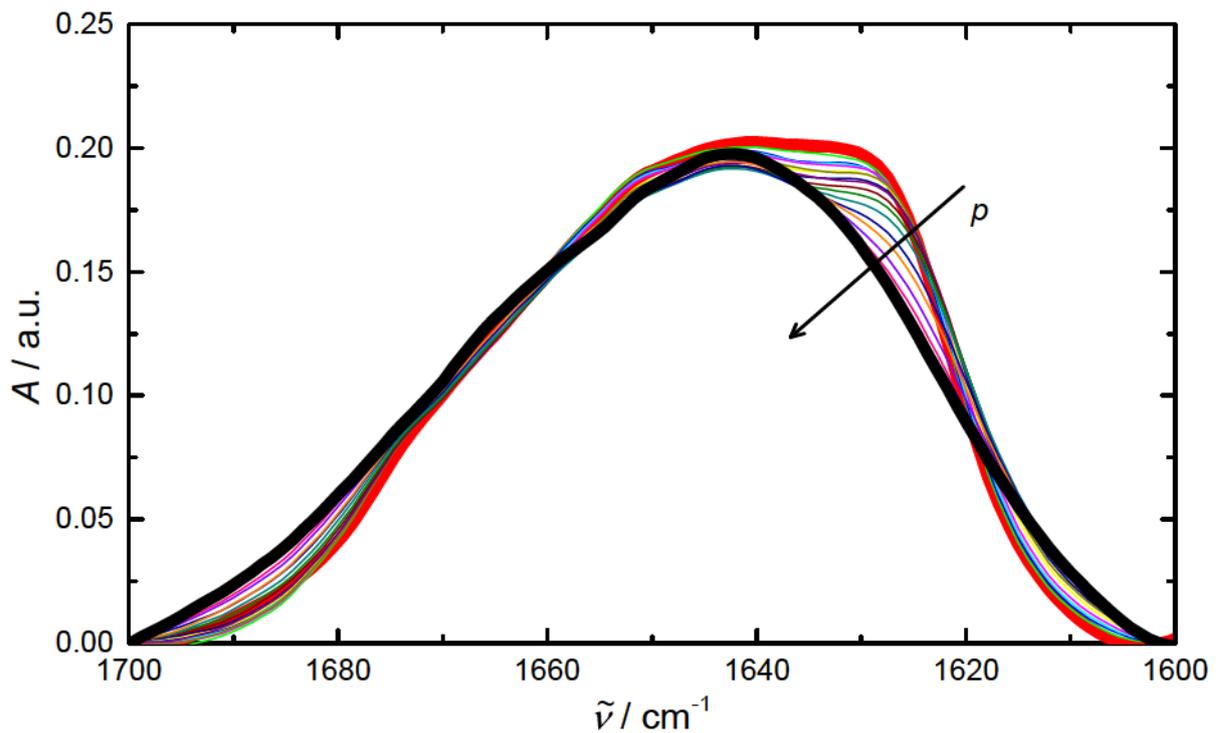


Abbildung 4.23: Normierte FT-IR-Spektren im Bereich der Amid-I'-Bande ($1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$) einer 3 gew.-%igen SNase-Lösung in Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) während der druckinduzierten Entfaltung bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und pD 5.5. Druckinduzierte Änderungen von 1 bar bis 6000 bar werden durch den schwarzen Pfeil verdeutlicht.

bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und pD 5.5. Der schwarze Pfeil verdeutlicht die druckinduzierten Änderungen von 1 bar bis 6000 bar. Nach Bildung der 2. Ableitung (Abbildung 4.24) wurden die auftretenden Minima für die Zuordnung der verschiedenen Sekundärstrukturelemente zu den jeweiligen Subbanden der Amid-I'-Bande des Proteins SNase verwendet (Tabelle 3.1).

Die drei folgenden Abbildungen zeigen die Änderungen der prozentualen Anteile ausgewählter Sekundärstrukturelemente des Proteins SNase bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und pD 5.5 unter verschiedenen Bedingungen. Die druckinduzierte Entfaltung einer 3 gew.-%igen SNase-Lösung ist in Abbildung 4.25 dargestellt. Eine Erhöhung der Proteinkonzentration von 3 auf 15 Gew.-% führt zu einer Situation, in der das sogenannte „self-crowding“ auftritt (Abbildung 4.26), was hauptsächlich auf den Effekt des Ausschlussvolumens zurückzuführen ist. Zusätzlich wird der Einfluss der Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) auf das Protein SNase (3 Gew.-%) in Abbildung

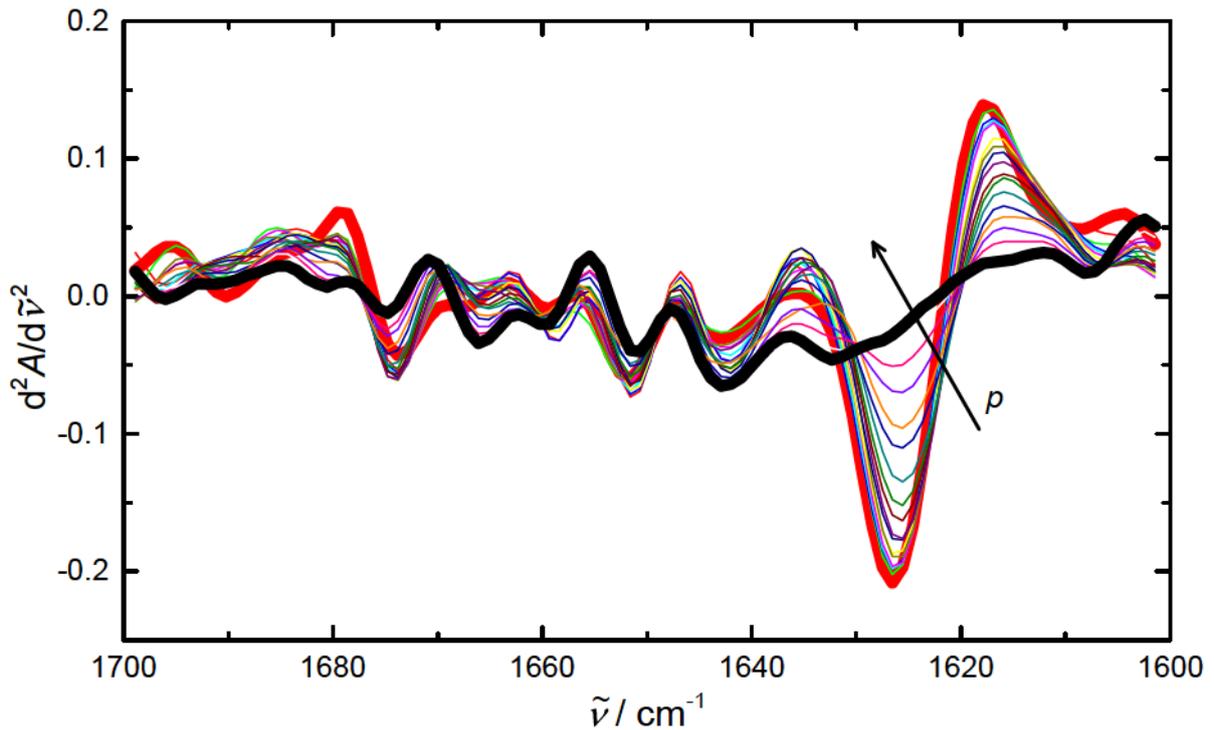


Abbildung 4.24: 2. Ableitung der normierten FT-IR-Spektren im Bereich der Amid-I'-Bande ($1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$) einer 3 gew.-%igen SNase-Lösung in Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) während der druckinduzierten Entfaltung bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und pD 5.5. Druckinduzierte Änderungen von 1 bar bis 6000 bar werden durch den schwarzen Pfeil verdeutlicht.

4.27 präsentiert.

Analog zur thermischen Entfaltung (siehe Gleichung 4.13) kann der sigmoidale Kurvenverlauf der Sekundärstrukturanteile durch eine Boltzmann-Funktion angepasst werden. Die druckinduzierte Entfaltung kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$I = \frac{I_f - I_u}{1 + e^{-(p-p_u) \cdot (\Delta V_u^\circ / RT)}} + I_u \quad (4.16)$$

Die Auswertung nach Gleichung 4.16 ergibt einen Entfaltungsdruck p_u von 2.6 kbar für eine 3 gew.-%ige SNase-Lösung bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und pD 5.5. In der „self-crowding“-Situation (15 gew.-%ige SNase-Lösung) wird eine Stabilisierung des Proteins um 0.8 kbar von 2.6 kbar auf 3.4 kbar erreicht. Durch die Zugabe des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) steigt der Entfaltungsdruck des Proteins auf einen Wert von 4.3 kbar. Eine ähnlich ausgeprägte Stabilisierung wurde für alle untersuchten Temperaturen gefunden (Abbildung 4.29). Im Vergleich zur thermischen Entfaltung weist das

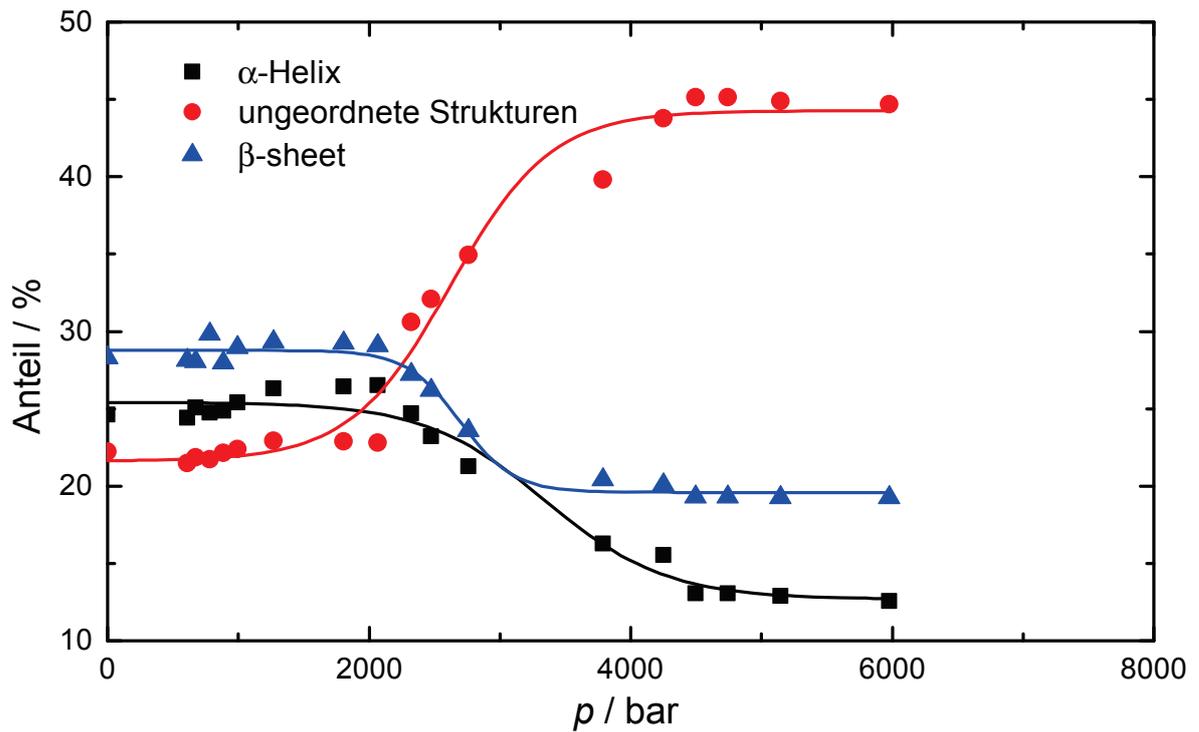


Abbildung 4.25: Druckabhängige Änderung des prozentualen Anteils ausgewählter Sekundärstrukturelemente einer 3 gew.-%igen SNase-Lösung bei 25 °C und pD 5.5.

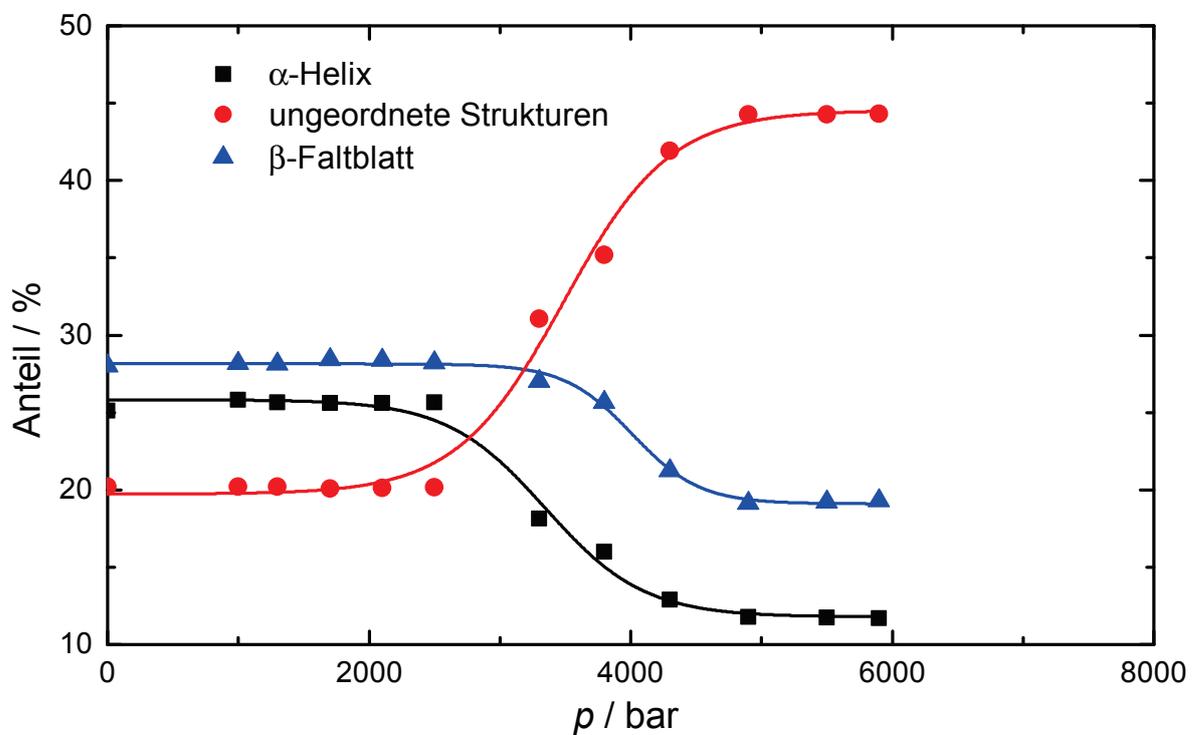


Abbildung 4.26: Druckabhängige Änderung des prozentualen Anteils ausgewählter Sekundärstrukturelemente einer 15 gew.-%igen SNase-Lösung in der sogenannten „self-crowding“-Situation bei 25 °C und pD 5.5.

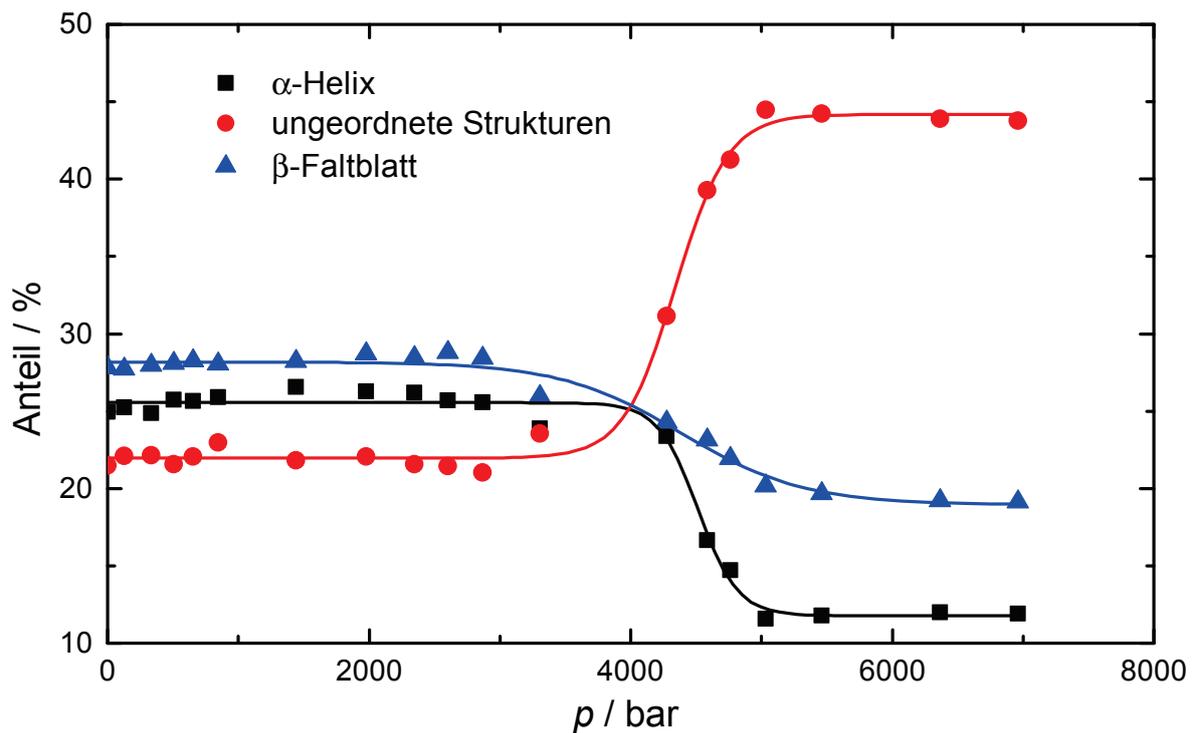


Abbildung 4.27: Druckabhängige Änderung des prozentualen Anteils ausgewählter Sekundärstrukturelemente einer 3 gew.-%igen SNase-Lösung in Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) bei 25 °C und pD 5.5.

Protein nach der Druckentfaltung ebenfalls ähnliche prozentualen Anteile der einzelnen Sekundärstrukturelemente in Abwesenheit und Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) auf.

Die Änderung des Entfaltungsvolumen ΔV_u° kann unter Verwendung von Gleichung 4.16 direkt aus der Steigung der Intensitätskurve bestimmt werden. Normalerweise wird die Volumenänderung zwischen gefalteten und entfaltetem Zustand des Proteins durch 3 Faktoren beschrieben.^[161,162] Der erste Beitrag und gleichzeitig auch der Hauptbeitrag ist die Behebung von Packungsdefekten im Protein. Hierbei werden Hohlräume während der Entfaltung mit Wasser gefüllt, was schließlich zu einer Reduzierung des Gesamtvolumens des Proteins führt. Elektrostriktion der geladenen und polaren Gruppen, die vor der Entfaltung im Proteininneren lokalisiert waren, ist ein weiterer Beitrag der Volumenänderung. Die meisten geladenen Proteinseitenketten des Proteins sind bereits im gefalteten Zustand an der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche lokalisiert, so dass dieser Beitrag von geringer Bedeutung ist. Die Exposition von hydrophoben

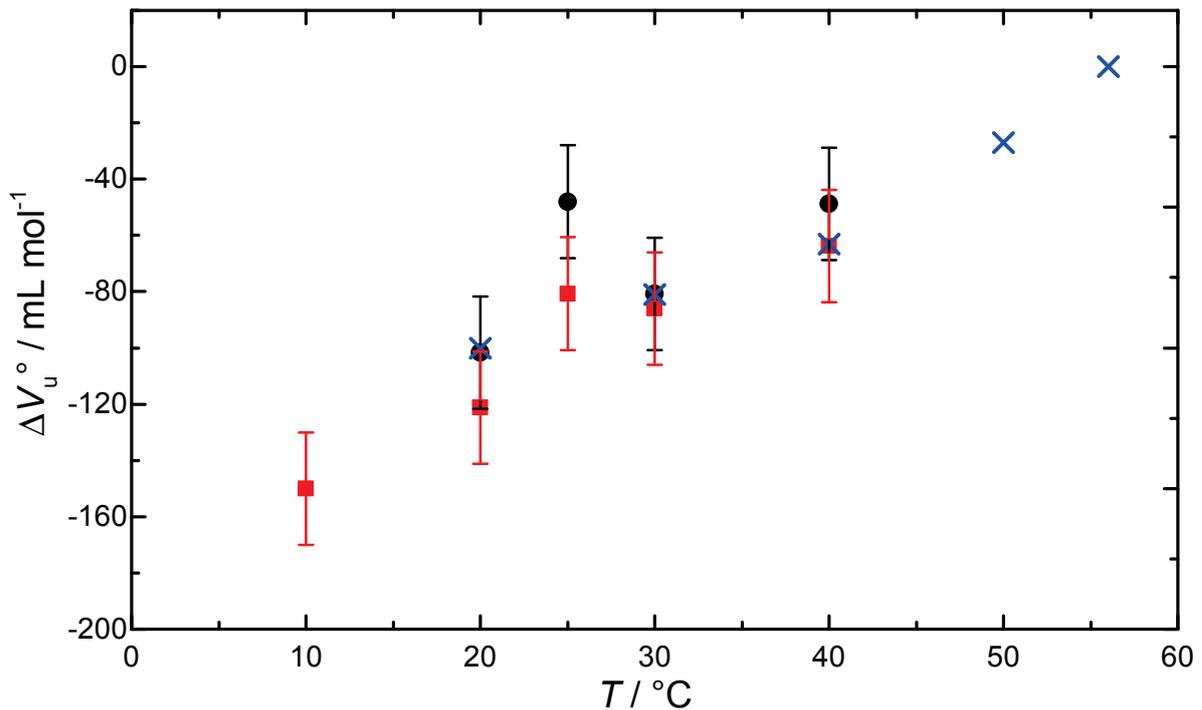


Abbildung 4.28: Temperaturabhängigkeit des Entfaltungsvolumen ΔV_u^0 des Proteins SNase in Anwesenheit und Abwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%). ● SNase (3 Gew.-%); ■ SNase (3 Gew.-%) in Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%); × Literaturdaten für SNase in Pufferlösung. [95,97,98]

Seitenketten aus dem Proteininneren zum Wasser bilden den dritten Beitrag der Volumenänderung. In dieser Studie zeigt das Entfaltungsvolumen ΔV_u^0 des Proteins SNase bei der jeweilige Temperatur innerhalb des experimentellen Fehlers ähnliche Werte in Anwesenheit und Abwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%). Abbildung 4.28 stellt einen Vergleich der erhaltenen Werte für ΔV_u^0 als Funktion der Temperatur mit Literaturdaten dar. [95,97,98]

Resultierendes p,T -Stabilitätsdiagramm des Proteins SNase

Abbildung 4.29 stellt das resultierende p,T -Stabilitätsdiagramm des Proteins SNase bei pD 5.5 in Abwesenheit und Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) sowie in der „self-crowding“-Situation (15 gew.-%ige SNase-Lösung) dar. Die Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) führt zu einer Stabilisierung des Proteins gegenüber der Druckentfaltung von ungefähr 1.8 kbar für alle untersuchten Temperaturen und zu einer Erhöhung der Entfaltungstem-

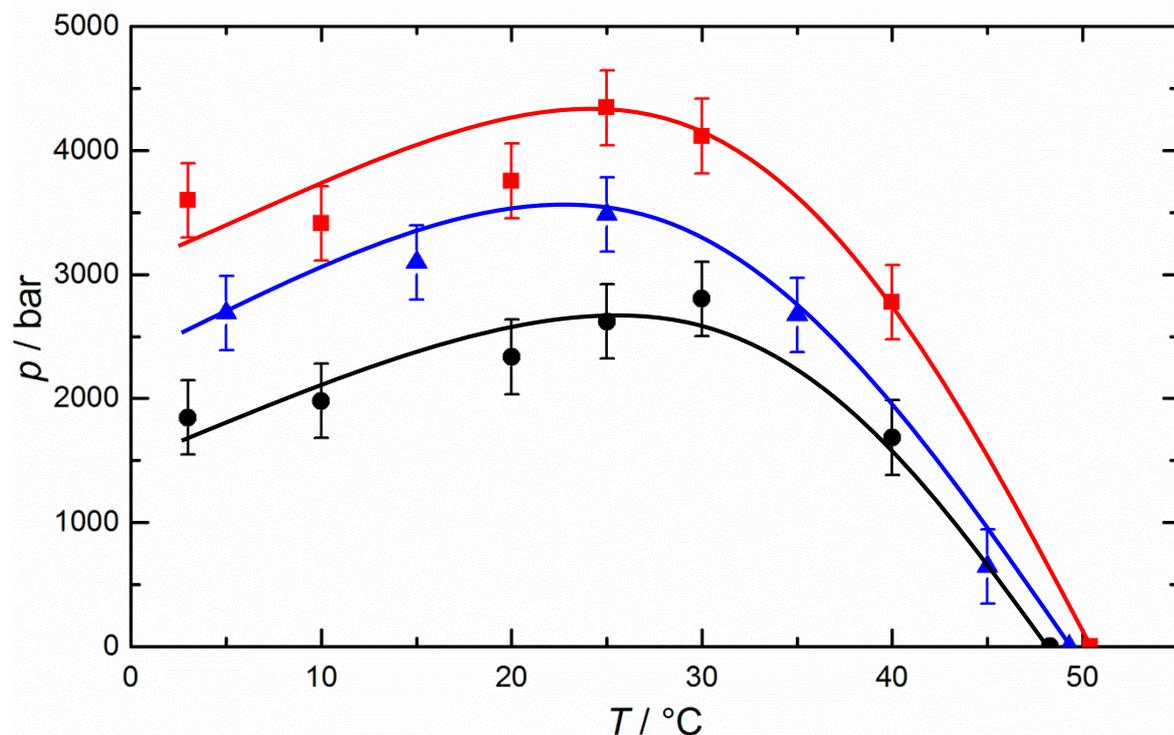


Abbildung 4.29: p,T -Stabilitätsdiagramm des Proteins SNase bei pD 5.5 in Abwesenheit und Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) sowie in der „self-crowding“-Situation (15 gew.-%ige SNase-Lösung). Die Linien dienen der optischen Führung. ● SNase (3 Gew.-%); ▲ SNase in der „self-crowding“-Situation (15 gew.-%ige SNase-Lösung); ■ SNase (3 Gew.-%) in Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%).

peratur um 1.4 °C bei 1 bar. Eine Erhöhung der Proteinkonzentration führt zur „self-crowding“-Situation. Allerdings wurde für eine 10 gew.-%ige SNase-Lösung keine signifikante Proteinstabilisierung festgestellt. Erst ab einer Konzentration von 15 Gew.-% wurde eine Erhöhung der Stabilität gegenüber Druckentfaltung von ungefähr 800 bar detektiert.

Theoretische Berechnung des p,T -Stabilitätsdiagramm des Proteins SNase in Abwesenheit und Anwesenheit von makromolekularen Crowdern

In einem einfachen 2-Zustands-Modell ($f \rightleftharpoons u$) für ein Protein ist die Änderung der Gibbs-Energie ΔG_u zwischen dem gefalteten und dem entfalteten Zustand wie folgt definiert:

$$\Delta G_u = G_{\text{entfaltet}} - G_{\text{gefaltet}} \quad (4.17)$$

Diese Größe kann mithilfe thermodynamischer Parameter theoretisch näherungsweise

berechnet werden. Eine Taylor-Entwicklung von ΔG_u an den Entwicklungsstellen p_0 und T_0 bis zum zweiten Taylorpolynom liefert Gleichung 4.18. Die Entwicklungsparameter sind hierbei der Druck p und die Temperatur T :^[37,96]

$$\begin{aligned} \Delta G_u(T, p) = & \Delta G_{u,0} - \Delta S_u \cdot (T - T_0) + \Delta V_u \cdot (p - p_0) \\ & - \frac{1}{2} \frac{\Delta C_{p,u}}{T} \cdot (T - T_0)^2 + \frac{1}{2} \Delta \kappa'_u \cdot (p - p_0)^2 \\ & + \Delta \alpha'_u \cdot (T - T_0) (p - p_0) \end{aligned} \quad (4.18)$$

Δ beschreibt hierbei die Änderung des entsprechenden Parameters aufgrund der Proteinentfaltung, das heißt, den Wert des gefalteten Zustands subtrahiert von dem des entfalteten Zustands. κ' ist die isotherme Kompressibilität, in Gleichung 4.18 definiert als:

$$\kappa' = \left(\frac{\partial V}{\partial p} \right)_T = -V \kappa \quad (4.19)$$

κ ist der isotherme Kompressibilitätskoeffizient. Analog wird die thermische Ausdehnung α' in Gleichung 4.18 wie folgt definiert:

$$\alpha' = \left(\frac{\partial V}{\partial T} \right)_p = - \left(\frac{\partial S}{\partial p} \right)_T = V \alpha \quad (4.20)$$

Des Weiteren gilt für die Wärmekapazität C_p bei konstantem Druck:

$$C_p = \left(\frac{\partial H}{\partial T} \right)_p \quad (4.21)$$

Die Kontur der elliptischen Phasengrenze wird somit durch sechs thermodynamische Parameter beschrieben, nämlich $\Delta C_{p,u}$, ΔV_u , ΔS_u , $\Delta \kappa'_u$, $\Delta \alpha'_u$ und die Änderung der Gibbs-Energie durch die Proteinentfaltung im Referenzzustand $\Delta G_{u,0}$. Die partiellen molaren Größen werden hierbei durch die gemessenen thermodynamischen Werte angenähert und der partielle molare Wert des Lösungsmittels Wasser wird hier gleich dem Wert des verwendeten Puffers gesetzt. Der Abbruch der Taylor-Entwicklung nach dem 2. Taylorpolynom vernachlässigt die temperatur- und druckabhängigkeit der Terme $\Delta C_{p,u}$, $\Delta \kappa'_u$ und $\Delta \alpha'_u$. Als Referenzwerte zur Berechnung der Phasengrenzlinie des reinen Proteins SNase wurden der Atmosphärendruck $p_0 = 1$ bar und die entsprechen-

de Entfaltungstemperatur $T_0 = T_m = 51 \text{ }^\circ\text{C}$ verwendet. Weiterhin wurden folgende Werte eingesetzt, um die Kontur der Phasengrenzlinie ($\Delta G_u = 0$) in Abbildung 4.30 zu berechnen:

$$\Delta H_u = 202 \text{ kJ mol}^{-1}$$

$$\Delta C_{p,u} = 5 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$$

$$\Delta V_u = -18.8 \text{ mL mol}^{-1}$$

$$\Delta \alpha_u = 0.8 \cdot 10^{-4} \text{ K}^{-1}$$

$$\Delta \kappa_u = 0.3 \cdot 10^{-6} \text{ bar}^{-1}$$

Diese Werte sind in guter Übereinstimmung mit den gemessenen Werten und den Literaturdaten.^[96,98,159]

Zur Berechnung der Phasengrenzlinie des Proteins in Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) wurden alle verwendeten Parameter konstant gehalten, bis auf die stark temperaturabhängige Volumenänderung der Proteinentfaltung. Der eingesetzte Wert von -2 mL mol^{-1} wurde aus einer Extrapolation der Steigung der Datenpunkte in Abbildung 4.28 auf die Entfaltungstemperatur von SNase in Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) erhalten.^[56] In Abbildung 4.30 wurden die berechneten Phasengrenzlinien aus thermodynamischen Parametern mit den aus kalorimetrischen und FT-IR-Messungen resultierenden Daten sowie Literaturdaten zu SNase in reiner Pufferlösung überlagert.^[96–98,159,163]

Es wird deutlich, dass die experimentellen Messdaten relativ gut durch das verwendete Modell beschrieben werden können. Eine genauere theoretischen Berechnung der Phasengrenzlinie würde die Berücksichtigung der Temperatur- und Druckabhängigkeit der Parameter $\Delta C_{p,u}$, $\Delta \kappa'_u$ und $\Delta \alpha'_u$ sowie die Verwendung höherer Taylorpolynome erzielen. Diese experimentellen Daten sind bisher nicht verfügbar. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die temperaturabhängige Volumenänderung der Proteinentfaltung einen entscheidenden Einfluss auf die Beschreibung der Phasengrenzlinie des Proteins in Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) hat.

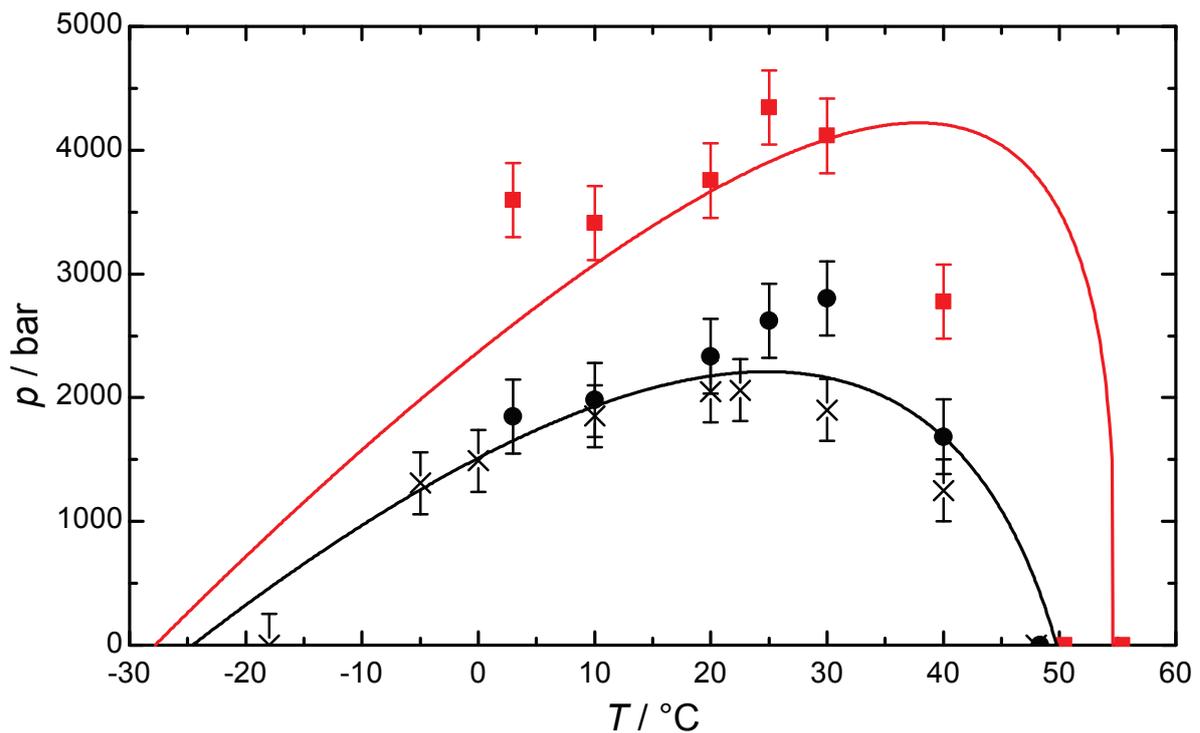


Abbildung 4.30: Überlagerung der berechneten Phasengrenzlinien aus thermodynamischen Parametern für $\Delta G_u = 0$ mit dem resultierenden p, T -Stabilitätsdiagramm aus kalorimetrischen und FT-IR-Messungen sowie aus Literaturdaten zu SNase in reiner Pufferlösung.^[96–98,159,163] ● bzw. × repräsentieren die Entfaltung von SNase in Abwesenheit und ■ die Entfaltung in Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%).

Faltungskinetik des Proteins SNase in Anwesenheit und Abwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70

In diesem Teil der Studie wurde die Faltungskinetik des Proteins SNase bei verschiedenen Temperaturen in Anwesenheit und Abwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) mittels FT-IR-Spektroskopie untersucht. Zur Bestimmung der Faltungskinetik des Proteins wurde ein Drucksprung von 6 kbar, wo das Protein vollständig entfaltet vorliegt, auf 1 bar durchgeführt, und simultan wurde eine zeitabhängige Serienmessung gestartet. Die Anwesenheit von Makromolekülen in der unmittelbaren Umgebung von Proteinen hat, allein schon aufgrund des Ausschlussvolumens, einen Einfluss auf die Energiehyperfläche der Proteinfaltung. Dies gilt, wenn die Proteinfaltung zu einer kompakteren Form der Polypeptidketten führt. Da Druck direkt mit einer Volumenänderung verknüpft ist (Gleichung 4.22), stellt er einen idealen Pa-

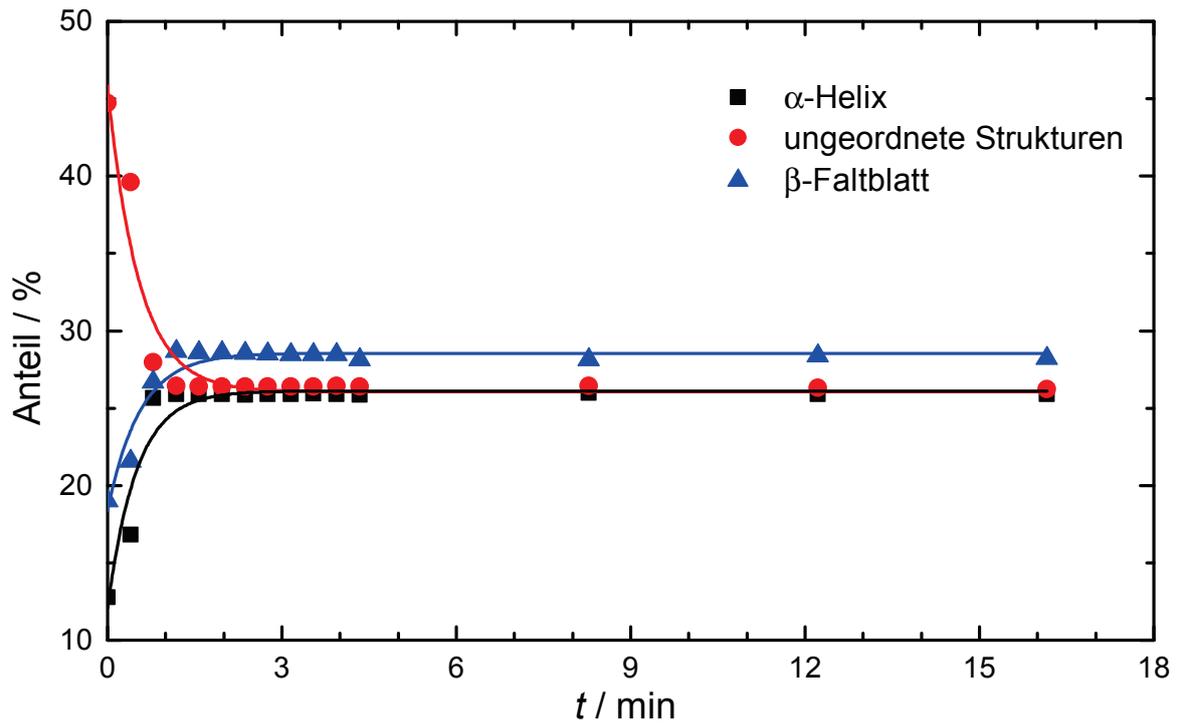


Abbildung 4.31: Zeitabhängige Änderung des prozentualen Anteils ausgewählter Sekundärstrukturelemente einer 3 gew.-%igen SNase-Lösung nach einem Drucksprung von 6 kbar auf 1 bar bei 40 °C und pD 5.5.

parameter zum Studium des Einflusses von Volumeneffekten auf die Faltungskinetik von Proteinen unter unterschiedlichen Lösungsmittelbedingungen dar.

$$\Delta V_u = \left(\frac{\partial \Delta G_u^\circ}{\partial p} \right)_T \quad (4.22)$$

Die Faltungskinetik von Proteinen wird sehr gut durch die konformative Umverteilung der Sekundärstrukturelemente beschrieben. Die limitierte zeitliche Auflösung des Drucksprungexperiments erlaubt jedoch nur eine Anpassung der Faltungskinetik mit einer monoexponentiellen Abfallfunktion. Abbildung 4.31 und Abbildung 4.32 zeigen exemplarisch den zeitliche Verlauf der prozentualen Änderung ausgewählter Sekundärstrukturelemente des Proteins SNase in Abwesenheit und in Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) nach Drucksprung bei 40 °C und pD 5.5. Aus der Anpassung der Daten resultiert eine Relaxationszeit τ von 0.5 min für die Faltung des reinen Proteins SNase. Die Anwesenheit des makromolekularen Crowders führt zu einer enormen Erhöhung der Relaxationszeit τ von 0.5 auf 1.9 min.

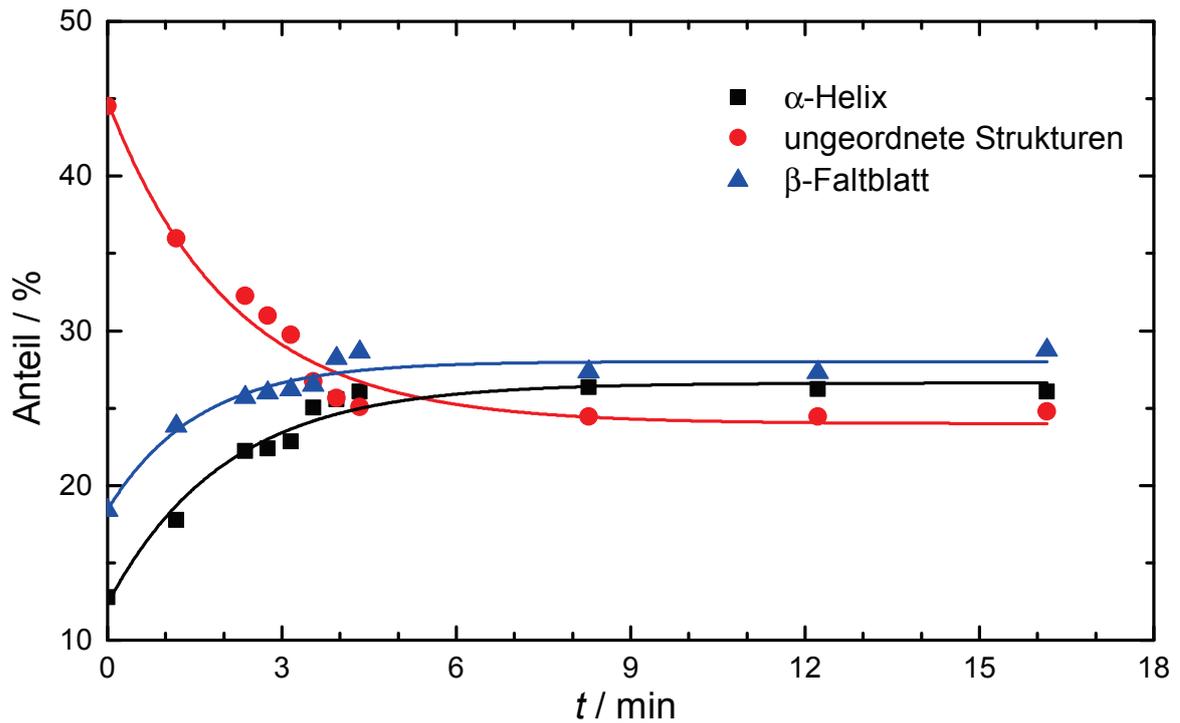


Abbildung 4.32: Zeitabhängige Änderung des prozentualen Anteils ausgewählter Sekundärstrukturelemente einer 3 gew.-%igen SNase-Lösung in Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) nach einem Drucksprung von 6 kbar auf 1 bar bei 40 °C und pD 5.5.

Zusammenfassend sind in Abbildung 4.33 die Relaxationszeiten τ für alle untersuchten Temperaturen in Anwesenheit und Abwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) dargestellt. Ohne makromolekularen Crowder sinkt die Relaxationszeit τ des Faltungsprozesses des Proteins SNase von 1.2 min bei 2 °C auf 0.5 min bei 40 °C, das heißt um einen Faktor von 2.4. Durch die Hinzugabe des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) kommt es zu einer drastischen Änderung der Relaxationszeit τ des Faltungsprozesses; beispielsweise resultierte bei 2 °C eine Zunahme um den Faktor 3.9. Jedoch weist die Temperaturabhängigkeit der Relaxationszeit ein ähnliches Verhalten auf. Bei einer Temperatur von 2 °C beträgt die Relaxationszeit 3.9 min und reduziert sich um den Faktor 2.5 auf 4.7 min bei 40 °C. Innerhalb des experimentellen Fehlers kann der Verlauf der Temperaturabhängigkeit der Relaxationszeit τ des Faltungsprozesses jedoch nicht eindeutig bestimmt werden.

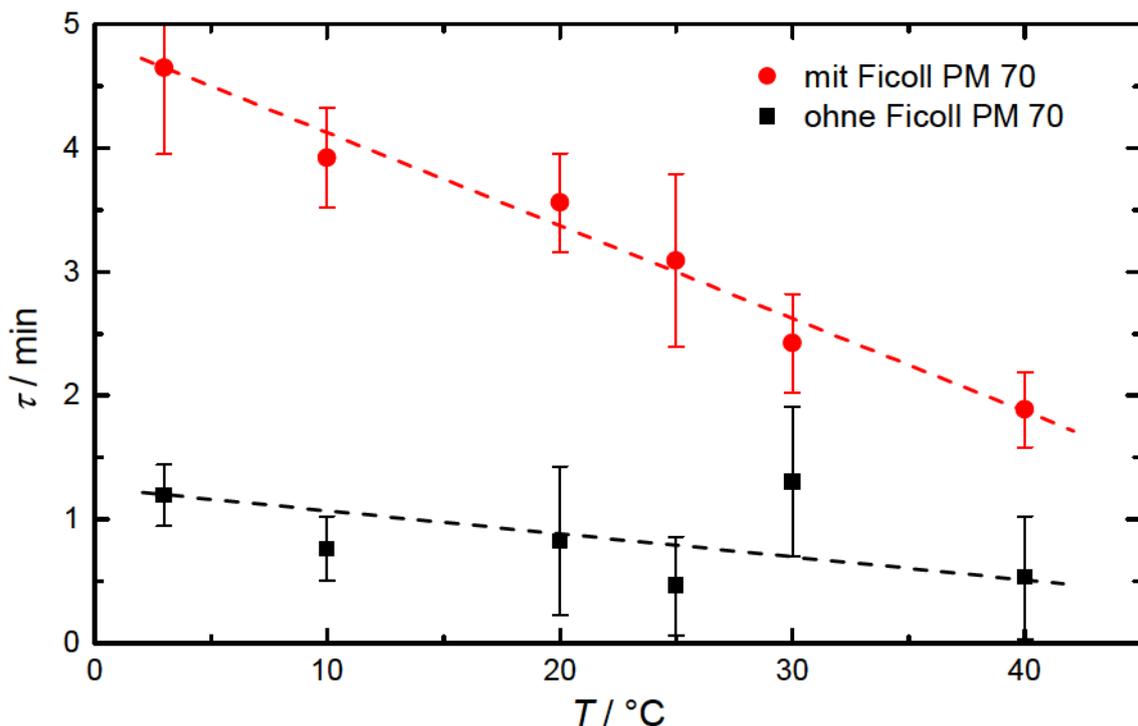


Abbildung 4.33: Temperaturabhängigkeit der Relaxationszeit τ des Faltungsprozesses des Proteins SNase (3 Gew.-%) in Anwesenheit und Abwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) nach einem Drucksprung von 6 kbar auf 1 bar.

Im Allgemeinen kann die Geschwindigkeitskonstante k des Entfaltungs- bzw. Faltungsprozesses durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$k = A e^{-\Delta G^\ddagger / (k_B T)} \quad (4.23)$$

ΔG^\ddagger beschreibt die Aktivierungs-Gibbs-Energie, das heißt, die Differenz des chemischen Potentials des Übergangszustandes zum Eduktzustand. A ist ein präexponentieller Faktor, der durch die Dynamik des Faltungs- bzw. Entfaltungsprozesses bestimmt wird. Der Hauptbeitrag dieser Dynamik wird der Diffusion zugeschrieben, wobei interne Umorientierungsdynamiken und die Mikroviskosität des Lösungsmittels von Wichtigkeit sind.^[164–167] Makromolekulares Crowding kann sowohl ΔG^\ddagger , das heißt, die Energiehyperfläche als auch A beeinflussen. Wenn zum Beispiel während des Faltungs- bzw. Entfaltungsprozesses ein Übergangszustand auftritt, in dem nur einzelne Aminosäuren durch Makromoleküle abgeschirmt werden, sollte der präexponentielle Faktor relativ

unabhängig von der Einschränkung durch Makromoleküle sein. Sollten jedoch Bewegungen auf größeren Längenskalen zwischen einzelnen Proteindomänen an der Bildung des Übergangszustand beteiligt sein, muss davon ausgegangen werden, dass die Anwesenheit des makromolekularen Crowders die Mikroviskosität und damit den präexponentieller Faktor ändert. Eine Änderung der Mikroviskosität ist gleichbedeutend mit einer Änderung des Reibungswiderstands in unmittelbaren Nachbarschaft der Ent-/Faltungsdomäne.^[164–167]

Es wird angenommen, dass der Übergangszustand, der während des Faltungsprozesses des Proteins auftritt, eine kompaktere Form annimmt als der entfaltete Zustand. Die Anwesenheit des makromolekularen Crowders führt zu einer Verringerung des verfügbaren Volumens des Proteins (Ausschlussvolumen, siehe Abbildung 4.15), was den Übergangszustand stabilisiert und somit die Faltungsgeschwindigkeit erhöhen sollte. Wird also durch makromolekulares Crowding eine Erhöhung der Faltungsgeschwindigkeit bzw. eine kleinere Relaxationszeit beobachtet, kann dieser Effekt auf das Ausschlussvolumen zurückgeführt werden. Dennoch kann die Kinetik ebenfalls durch dynamische Prozesse beeinflusst werden. Eine Veränderung des Reibungswiderstands durch konformative Änderungen während des Faltungsprozesses des Proteins wäre denkbar. Makromolekulare Crowder könnten in diesen Prozess eingreifen, indem sie die Mikroviskosität ändern und somit den translatorischen Diffusionskoeffizienten des Proteins verringern. Ein makromolekularer Crowder mit hoher molekularer Masse, wie es Ficoll PM 70 ist, ändert somit nicht nur die dynamische Viskosität sondern auch die Mikroviskosität der Proteinumgebung und hat daher Einfluss auf den Faltungsprozess. Vor allem durch eine Störung der zugrundeliegenden Dynamik der Polypeptidketten. Somit ist die Abhängigkeit der Faltungsgeschwindigkeit von der Mikroviskosität auf die Polypeptidkettendiffusion zur Ausbildung stabilisierender nativer Kontakte zurückzuführen.

Die dynamische Viskosität einer 30 gew.-%igen Ficolllösung (428.6 mg mL^{-1}) ist 28 mal größer als die von reinem Wasser (siehe Amersham Biosciences, data file 18-1158-27 AA, 2001-11). Die Viskosität, die für die Diffusion von Proteinen durch ein poröses Netzwerk von makromolekularen Crowdermolekülen bestimmt wird, ist jedoch signifikant kleiner als die dynamische Viskosität des Lösungsmittels. Somit ist es wichtig,

die Mikroviskosität des makromolekularen Crowders zu kennen, um den Effekt auf die Faltungsgeschwindigkeit eines Proteins zu verstehen. Die Mikroviskosität des Lösungsmittels ist umgekehrt proportional zum translatorischen Diffusionskoeffizienten und kann aus Diffusionsmessungen von Proteinen mit verschiedenen Größen mittels der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (engl.: fluorescence correlation spectroscopy; FCS) bestimmt werden.^[167,168] Diese Messungen zeigten, dass die Mikroviskosität von Ficoll PM 70 nur um einen Faktor 4-6 größer ist als die von reinem Wasser.^[167]

Ist der gemessene Diffusionskoeffizient des Proteins in Anwesenheit des makromolekularen Crowder in derselben Größenordnung wie der in reinem Wasser, kann davon ausgegangen werden, dass die diffundierenden Partikel eine kürzere Distanz zurücklegen als die Porengröße des Polymernetzwerks aufweist. Das heißt, das Protein kommt kaum in Kontakt mit den Polymerketten des makromolekularen Crowders. Dies gilt beispielsweise für die Bildung von α -Helices, aber nicht für die Bildung von β -Faltblättern, denn diese benötigen eine relativ großräumige Polypeptidkettendiffusion zur Faltung. Ein anderes Szenario tritt bei der Verwendung kleiner Crowdermoleküle, wie beispielsweise Glukose oder Xylose, auf. Die resultierende Viskosität des Lösungsmittels ist mikroskopisch homogen und der erhöhte Reibungswiderstand ist selbst für kleinste Längenskalen signifikant.^[167,169] Das verwendete Protein SNase ist ein $\alpha\beta$ -Protein, so dass davon auszugehen ist, dass großräumige Polypeptidkettendiffusion während des Entfaltungs- bzw. Faltungsprozesses auftritt. Aus diesem Grund kann der Effekt der Viskosität auf die Proteinfaltung und -entfaltung nicht vernachlässigt werden. Somit muss Gleichung 4.23 durch die hydrodynamische Näherung der Kramers-Gleichung ersetzt werden:^[166,167]

$$k = \frac{A}{\eta(T)^\beta} e^{-\Delta G^\ddagger / (k_B T)} \quad (4.24)$$

$\eta(T)$ ist die effektive Viskosität des Lösungsmittels bei der Temperatur T . β ist in den meisten Fällen gleich eins. Alle anderen Variablen sind analog zu denen in Gleichung 4.23 definiert. Somit kann in Anwesenheit von makromolekularen Crowdern die Geschwindigkeitskonstante k durch Änderung von η , ΔG^\ddagger oder beiden Parametern beeinflusst werden. Für das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten der Proteinfaltung

in Abwesenheit k_f^o und in Anwesenheit k_f^c des makromolekularen Crowders resultiert:

$$\frac{k_f^c}{k_f^o} = \left(\frac{\eta_o}{\eta_c} \right)^\beta e^{-\Delta\Delta G_f^\ddagger / (k_B T)} \quad (4.25)$$

mit $\Delta\Delta G_f^\ddagger = \Delta G_{f,c}^\ddagger - \Delta G_{f,o}^\ddagger$. Wenn der Quotient η_o/η_c bekannt ist, ist es möglich, die thermodynamischen und dynamischen Beiträge des makromolekularen Crowdings zur Faltung des Proteins zu separieren. Die Ergebnisse der Messung der Faltungskinetik des Proteins SNase zeigen eine Abnahme der Faltungsgeschwindigkeit ($k_f \approx 1/\tau$) um einen Faktor von ungefähr 4 in der Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%). Dieser Wert ist in derselben Größenordnung wie der aus FCS-Messungen abgeschätzte Wert der Zunahme der Mikroviskosität durch die Anwesenheit des makromolekularen Crowders. Des Weiteren steigt die Faltungsgeschwindigkeit in einem Temperaturintervall von 2 °C bis 40 °C um einen Faktor von 2.5 an. Im Vergleich hierzu fällt die dynamische Viskosität von D₂O in diesem Temperaturbereich um einen Faktor von 2.5 ab. Nämlich von $2.45 \cdot 10^{-3}$ Pa s bei 2 °C auf $0.96 \cdot 10^{-3}$ Pa s bei 40 °C.^[170] Somit kann die Erhöhung der Faltungsgeschwindigkeit mit steigender Temperatur hauptsächlich mit der temperaturabhängigen Änderung der dynamischen Viskosität des Lösungsmittels beschrieben werden.

Insgesamt kann die veränderte Faltungskinetik des Proteins SNase in Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) auf die lösungsmittelbedingte Änderung der Dynamik der Polypeptidketten zurückgeführt werden. Unter Verwendung von Gleichung 4.25 und den Verhältnissen $k_f^c/k_f^o = 1/4$ und $\eta_o/\eta_c = 1/5$ errechnet sich $\Delta\Delta G_f^\ddagger$ zu 0.55 kJ mol^{-1} bei 20 °C für den Faltungsprozess des Proteins SNase in Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%). Die verringerte Faltungsgeschwindigkeit kann durch kurzzeitige Wechselwirkungen zwischen den Polypeptidketten und den hoch dynamischen Polymerketten des makromolekularen Crowders beschrieben werden, wodurch eine spontane Faltung des Proteins behindert wird und die Rauigkeit der Energiehyperfläche zunimmt. Eine Erhöhung der Temperatur führt zu einer höheren Dynamik des Polymernetzwerks, so dass der Übergangszustand der Proteinfaltung leichter realisiert werden kann, da die genannten Wechselwirkungen geringer werden.

4.3 Einfluss des doppelt-lipidierten N-Ras-Proteins auf das drucksensitive Verhalten der Modellbiomembran DOPC

Die durchgeführte Studie gibt einen ersten strukturellen Einblick in den Einbau des Proteins N-Ras mit zwei hydrophoben Ankerkettenmotiven (Hexadecyl/Farnesyl) in eine Lipiddoppelschicht. Hierzu wurde das Phospholipid DOPC auf ein festes Trägermaterial adsorbiert und das Protein in Lösung über die Lipiddoppelschicht gegeben. Vorangegangene Arbeiten zeigten, dass sich N-Ras mit zwei hydrophoben Ankern bevorzugt in die flüssig-ungeordnete Phase l_d einer „raft“-Membran einbaut,^[60] daher wurde das Phospholipid DOPC ($T_m = -17\text{ °C}$) für dieses Experiment verwendet. Zusätzlich wurde der Einfluss von hohen hydrostatischen Drücken bis 1500 bar auf das zu untersuchende System getestet. Zur Charakterisierung der Lipiddoppelschicht in Anwesenheit und Abwesenheit des Proteins wurden die Neutronenreflektometrie (NR) und die interne Totalreflexionsfluoreszenzspektroskopie (TIRF) verwendet.

Die resultierenden Streulängendichteprofile der Neutronenreflektometrie zeigen, dass der Einbau der zwei hydrophoben Ankerketten des Proteins zu einer größeren Planarität der Lipiddoppelschicht führt und somit zu einer weniger diffusen polar/unpolar-Grenzschicht. Eine Verstärkung dieses Effektes wird durch die Applikation von hohen hydrostatischen Drücken erzielt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den resultierenden *GP*-Werten der TIRF-Messungen. Zusätzlich konnte die TIRF-Spektroskopie verdeutlichen, dass der Adsorptionsgrad des Proteins über den kompletten Druckbereich konstant bleibt.

Neutronenreflektivitätsuntersuchungen der Modellbiomembran DOPC in Anwesenheit und Abwesenheit des Proteins N-Ras HD/Far bei verschiedenen Drücken und 25 °C

Das durchgeführte Hochdruck-Neutronenreflektivitätsexperiment wurde am Reflektometer REFSANS der Forschungs-Neutronenquelle Heinz Maier-Leibnitz durchgeführt. Die Abbildungen 4.34 und 4.35 zeigen die Neutronenreflektivitätskurven der DOPC-Doppelschicht an der Silizium/Wasser-Grenzfläche vor und nach Zugabe des Prote-

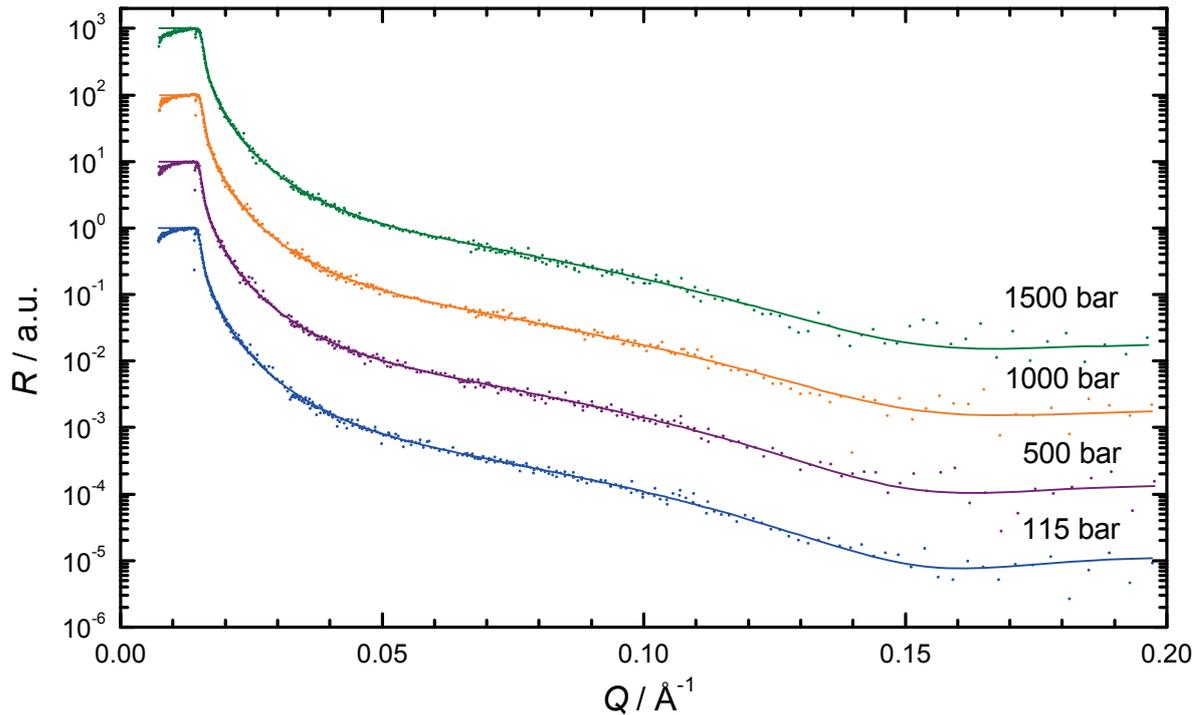


Abbildung 4.34: Neutronenreflektivitätskurven der Grenzfläche Si/SiO₂/DOPC-Doppelschicht/Pufferlösung bei verschiedenen Drücken und 25 °C. Die Symbole beschreiben die experimentellen Daten und die Linien die Anpassung des Schichtmodells. Die Messung der Kurven erfolgte sukzessive mit steigendem Druck. Die vertikale Verschiebung der Kurven dient der besseren Übersicht.

ins N-Ras HD/Far bei 25 °C und verschiedenen Drücken. Nach Charakterisierung der reinen DOPC-Doppelschicht bei verschiedenen Drücken wurde das Protein N-Ras HD/Far mit einer Konzentration von 0.01 mg mL⁻¹ für 2 h bei 25 °C mit der DOPC-Doppelschicht in Kontakt gebracht. Die Punkte stellen die experimentellen Daten dar, und die Linien sind das Ergebnis der Datenanpassung mit der Rekursionsmethode nach L. G. Parratt (siehe Abschnitt 3.1).^[110] Als physikalisch sinnvolles Anpassungsmodell für die Lipiddoppelschicht wurde ein Drei-Schicht-Modell verwendet, bestehend aus hydrophiler Kopfgruppe-hydrophober Kettenregion-hydrophiler Kopfgruppe.

Bei der Anpassung der experimentellen Daten wurde folgende iterative Vorgehensweise verwendet. Die Streulängendichten für Silizium und Siliziumdioxid wurden unter Verwendung des Streulängendichterechners des NIST (<http://www.ncnr.nist.gov/resources/sldcalc.html>; Stand: 09.02.2014) ermittelt und konstant gehalten. Die Streulängendichte des Lösungsmittels wurde für jeden Druck aus dem kritischen Winkel be-

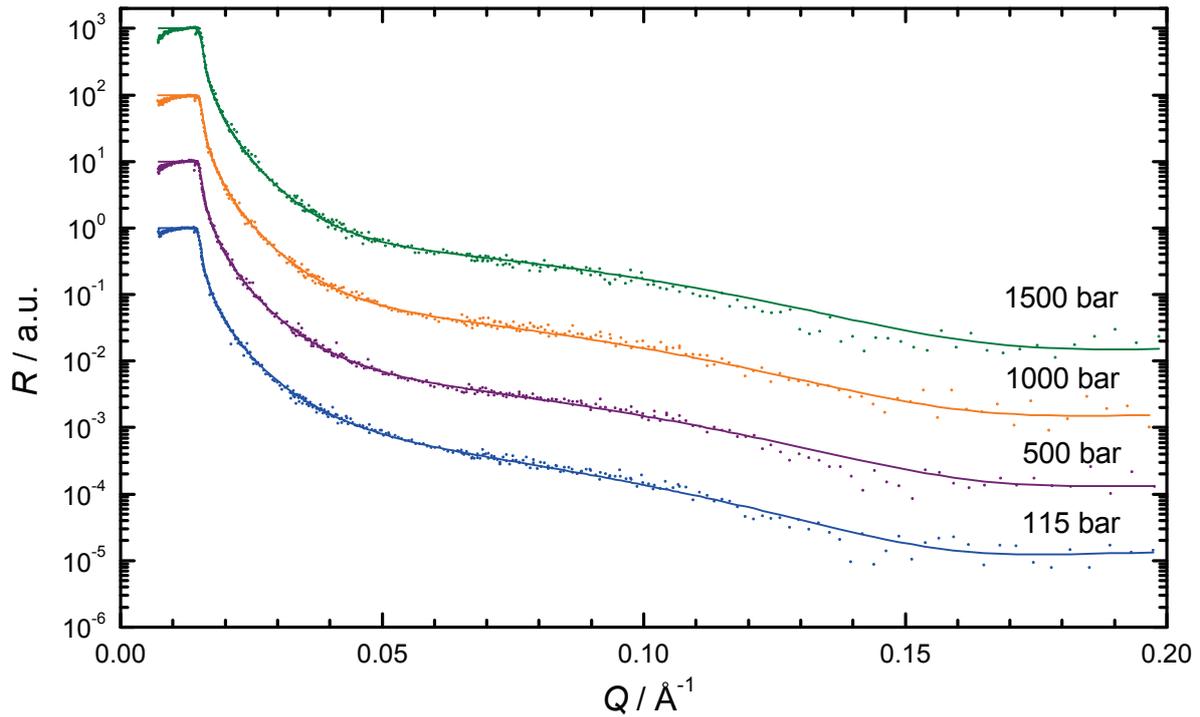


Abbildung 4.35: Neutronenreflektivitätskurven der Grenzfläche Si/SiO₂/DOPC-Doppelschicht/Proteinlösung bei verschiedenen Drücken und 25 °C. Das Protein N-Ras HD/Far wurde mit einer Konzentration 0.01 mg mL⁻¹ für 2 h bei 25 °C mit der DOPC-Doppelschicht in Kontakt gebracht. Die Symbole beschreiben die experimentellen Daten und die Linien die Anpassung des Schichtmodells. Die Messung der Kurven erfolgte sukzessive mit steigendem Druck. Die vertikale Verschiebung der Kurven dient der besseren Übersicht.

stimmt und in anschließenden Anpassungen konstant gehalten. Die Schichtdicken des Siliziumdioxids sowie der Kopfgruppen wurde durch intensives Austesten verschiedener Schicht-Modelle zu 16 Å bzw. 7 Å bestimmt und in der endgültigen Anpassung konstant gehalten. Diese Werte sind in guter Übereinstimmung mit Literaturwerten.^[102,171] Aufgrund der geringen Filmdicke resultierte im zugänglichen Q -Bereich lediglich eine ausgeprägte Kiessig-Oszillation.^[172] Infolgedessen wurde zur Anpassung ein sehr einfaches Drei-Schicht-Modell (Kopfgruppe-Ketten-Kopfgruppe) verwendet, wodurch möglichst wenig Anpassungsparameter variiert werden mussten. Die Streulängendichte der Kopfgruppenregion wurde schrittweise um $0.5 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ geändert, und die Werte für die Streulängendichte und die Schichtdicke der Kettenregion wurden jeweils durch die Anpassung ermittelt.

Tabelle 4.1: Ergebnisse der Anpassung eines einfachen Schichtmodells (Si/SiO₂/Kopfgruppe/Kettenregion/Kopfgruppe/D₂O) an die gemessenen Reflektivitätskurven der DOPC-Doppelschicht auf einer Siliziumoberfläche in Abwesenheit des Proteins N-Ras HD/Far ($c = 0.01 \text{ mg mL}^{-1}$) als Funktion des Drucks bei 25 °C.

DOPC-	115 bar		500 bar		1000 bar		1500 bar	
Schicht	$d^{(a)}$	$\rho^{(b)}$	$d^{(a)}$	$\rho^{(b)}$	$d^{(a)}$	$\rho^{(b)}$	$d^{(a)}$	$\rho^{(b)}$
Si	∞	2.07	∞	2.07	∞	2.07	∞	2.07
SiO ₂	16.00	3.48	16.00	3.48	16.00	3.48	16.00	3.48
Kopfgruppe	7.00	1.50	7.00	2.50	7.00	3.00	7.00	3.00
Kettenregion	27.95	1.03	31.31	0.52	31.52	0.24	31.61	0.26
Kopfgruppe	7.00	1.50	7.00	2.50	7.00	3.00	7.00	3.00
D ₂ O	∞	6.52	∞	6.59	∞	6.79	∞	6.79

^(a)Schichtdicke d in Å; ^(b)Streulängendichte ρ in 10^{-6} Å^{-2}

Tabelle 4.2: Ergebnisse der Anpassung eines einfachen Schichtmodells (Si/SiO₂/Kopfgruppe/Kettenregion/Kopfgruppe/D₂O) an die gemessenen Reflektivitätskurven der DOPC-Doppelschicht auf einer Siliziumoberfläche in Anwesenheit des Proteins N-Ras HD/Far ($c = 0.01 \text{ mg mL}^{-1}$) als Funktion des Drucks bei 25 °C.

DOPC/N-Ras-	115 bar		500 bar		1000 bar		1500 bar	
Schicht	$d^{(a)}$	$\rho^{(b)}$	$d^{(a)}$	$\rho^{(b)}$	$d^{(a)}$	$\rho^{(b)}$	$d^{(a)}$	$\rho^{(b)}$
Si	∞	2.07	∞	2.07	∞	2.07	∞	2.07
SiO ₂	16.00	3.48	16.00	3.48	16.00	3.48	16.00	3.48
Kopfgruppe	7.00	2.50	7.00	4.00	7.00	4.50	7.00	5.50
Kettenregion	27.65	0.68	29.50	0.77	31.28	0.87	32.53	0.90
Kopfgruppe	7.00	2.50	7.00	4.00	7.00	4.50	7.00	5.50
D ₂ O	∞	6.52	∞	6.64	∞	6.79	∞	6.70

^(a)Schichtdicke d in Å; ^(b)Streulängendichte ρ in 10^{-6} Å^{-2}

Die resultierenden Strukturparameter Schichtdicken d und Streulängendichten ρ der Lipiddoppelschicht mit und ohne Protein sind in Tabelle 4.1 und 4.2 zusammengefasst.

Aus den angepassten Strukturparametern resultieren die Streulängendichteprofile für die DOPC-Doppelschicht vor (Abbildung 4.36) und nach (Abbildung 4.37) Zugabe des Proteins N-Ras HD/Far für die verschiedenen Drücke bei 25 °C.

Das verwendete Drei-Schicht-Modell zeigt für das Streulängendichteprofil in der Kettenregion eine Abnahme der Streulängendichte (SLD) bei gleichzeitiger Zunahme der Schichtdicke mit Druckerhöhung. Ebenfalls erhöht sich die SLD in der Kopfgruppen-

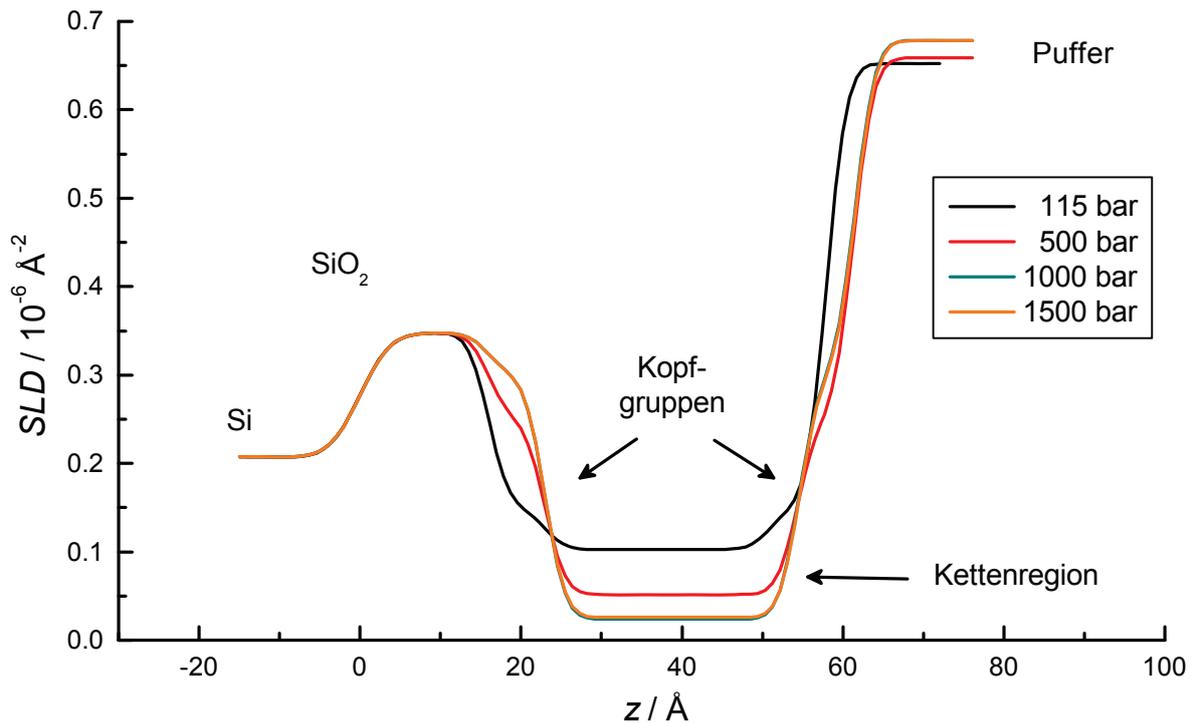


Abbildung 4.36: Resultierendes Streulängendichteprofil der Si/SiO₂/DOPC-Doppelschicht/Pufferlösung-Grenzfläche aus der Anpassung der Neutronenreflektivitätskurven mit einem einfachen Schichtmodell bei verschiedenen Drücken und 25 °C.

region. Dieser Trend ist damit zu erklären, dass der Druck die Ordnung sowie die Homogenität der Lipiddoppelschicht erhöht und es somit zu einer weniger diffusen polar/unpolar-Grenzschicht kommt. Zudem wird eine gestrecktere Form (mehr all-trans-Konformationen) der Ketten durch Druck induziert, was zu einer Zunahme der Kettenschichtdicke von 27.95 Å bei 115 bar auf 31.64 Å bei 1500 bar führt. Nach Druckentlastung und Zugabe des Proteins verringert sich die Kettenlänge wieder auf 27.65 Å, so dass die Streckung der Ketten als reversibel angenommen werden kann. Zusätzlich erzeugt die Zugabe des Proteins N-Ras HD/Far eine Erhöhung der SLD in der Kopfgruppenregion. Diese Erhöhung wird mit steigendem Druck immer ausgeprägter. Die etwas geringere SLD der Kettenregion bei 115 bar in Anwesenheit von N-Ras HD/Far im Vergleich zur SLD in Abwesenheit (Tabelle 4.1 und 4.2) kann auf den vorangegangenen Druckzyklus zurückgeführt werden. Im Gegensatz zur Lipidmembran ohne N-Ras HD/Far nimmt die SLD im Kettenbereich in Anwesenheit des Proteins durch Druck ein wenig zu.

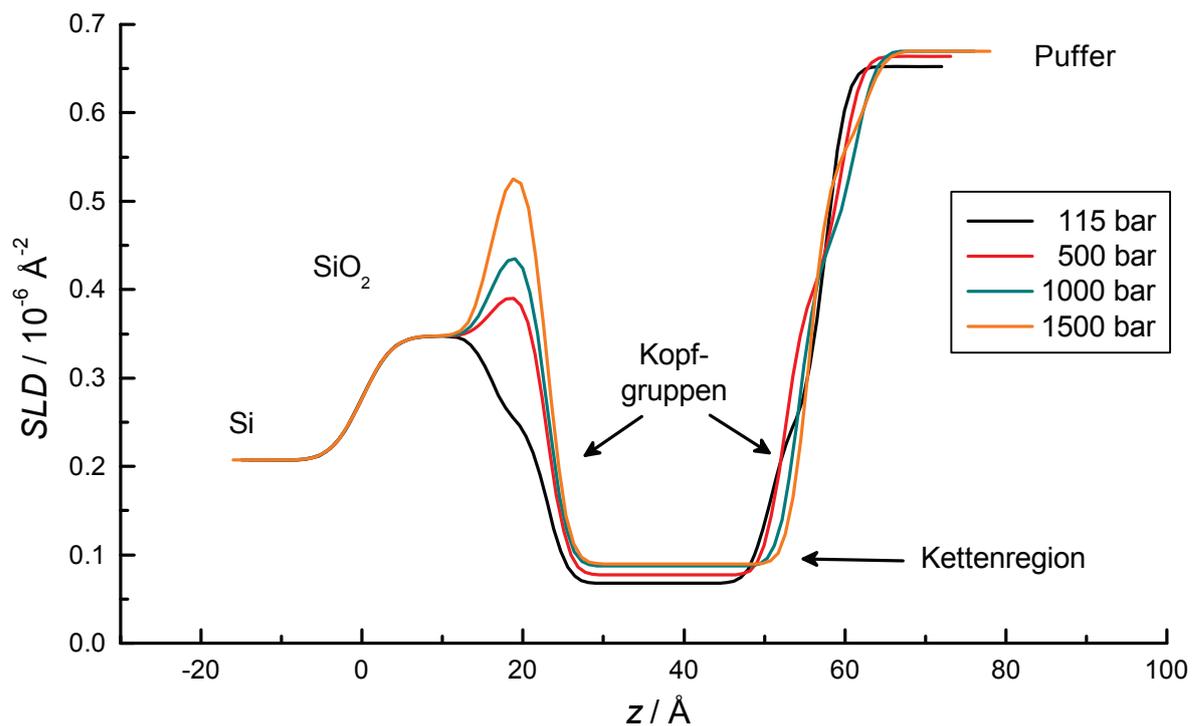


Abbildung 4.37: Resultierendes Streulängendichteprofil der Si/SiO₂/DOPC-Doppelschicht/Proteinlösung-Grenzfläche aus der Anpassung der Neutronenreflektivitätskurven mit einem einfachen Schichtmodell bei verschiedenen Drücken und 25 °C. Die Konzentration der Proteinlösung N-Ras HD/Far betrug 0.01 mg mL⁻¹.

Schließlich soll Abbildung 4.38 den Unterschied zwischen den Reflektivitätskurven mit und ohne Protein beim jeweiligen Druck verdeutlichen und somit die Aussagekraft der beschriebenen Ergebnisse unterstreichen. Je höher der applizierte Druck, desto größer sind die Unterschiede zwischen den beiden betrachteten Proben. Diesen Trend spiegeln auch die SLD-Profile wider.

In einem ähnlichen Experiment von Bringezu et al. wurde der Einbau des Proteins N-Ras Pal/Far in die Lipidmonoschicht des Phospholipids 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC) an der Wasser/Luft-Grenzfläche mittels Röntgenreflektometrie und Röntgendiffraktometrie mit streifendem Einfall (engl.: grazing incidence X-ray diffraction; GIXD) untersucht.^[173] Ein Vergleich der Experimente ist nur bedingt möglich, da das Phospholipid DPPC in dieser Studie lediglich als Lipidmonoschicht vorlag während in dieser Studie eine DOPC-Lipiddoppelschicht untersucht wurde. Allerdings konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass der Einbau des Proteins den Spreitungsdruck der Lipidmonoschicht leicht erhöht, ohne dabei den Neigungswinkel

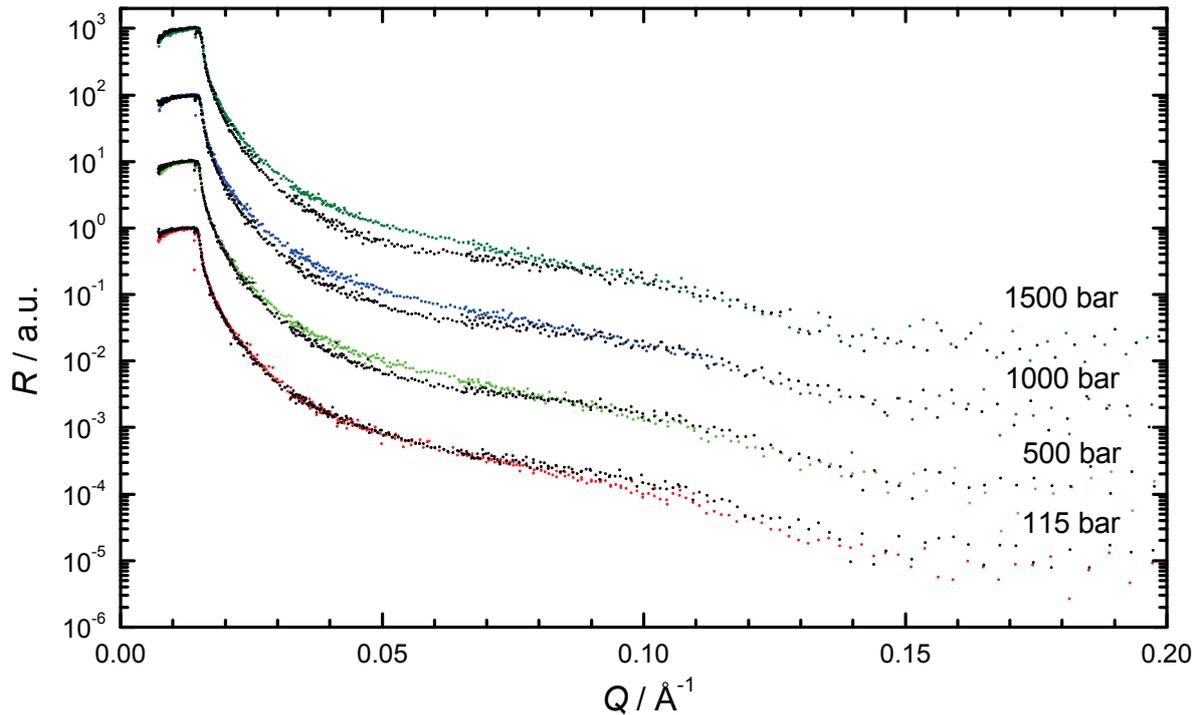


Abbildung 4.38: Direkter Vergleich der Neutronenreflektivitätskurven der Si/SiO₂/DOPC-Doppelschicht/Pufferlösung-Grenzfläche in Abwesenheit (115 bar: ●; 500 bar: ●; 1000 bar: ●; 1500 bar: ●) und in Anwesenheit (●) des Proteins N-Ras HD/Far bei verschiedenen Drücken und 25 °C. Die Symbole beschreiben die experimentellen Daten.

oder die Struktur der Lipidmoleküle an der Wasser/Luft-Grenzfläche zu ändern. Dennoch wurde eine Veränderung des Streulängendichteprofiles in Anwesenheit des Protein N-Ras Pal/Far gefunden. Huster et al. verwendete ebenfalls die Neutronenreflektometrie zur Aufklärung des Insertionsverhaltens der hydrophoben Ankermotive.^[174] Diese Arbeitsgruppe studierte den Einbau von N-Ras Pal/HD und HD-d₃₃/HD-d₃₃ in eine Lipidmultischicht an der Quarz/Luft-Grenzfläche bei 98 % Luftfeuchtigkeit. 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DMPC), das bei 30 °C in der fluiden Phase vorliegt, diente dabei als Lipidmembran. Das resultierende SLD-Profil wurde aus wenigen Bragg-Reflexen berechnet und besitzt daher keine hohe Auflösung. Allerdings konnte der Einbau von lipidierten N-Ras-Proteinen in die Lipidmembran nachgewiesen werden. Mittels Kontrastvariation wurde gefunden, dass die hydrophoben Ankermotive des Proteins im hydrophoben Teil der Lipidmembran vorliegen.

Untersuchung der Modellbiomembran DOPC in Anwesenheit und Abwesenheit des Proteins N-Ras HD/Far mittels interner Totalreflexionsfluoreszenzspektroskopie (TIRF) bei verschiedenen Drücken und 25 °C

Um die aus den HP-NR-Daten erhaltenen Schlussfolgerungen zu bestätigen, wurden analoge HP-TIRF-Messungen durchgeführt. Zuerst wurde die DOPC-Doppelschicht durch Zugabe des extrinsischen Fluorophors LAURDAN in einem Druckbereich von 100 bar bis 2000 bar und einer Temperatur von 25 °C charakterisiert. Hierzu wurde der *GP*-Wert (engl.: generalized polarization) bestimmt. Anschließend wurde das Protein N-Ras HD/Far, das mit dem Fluorophor BODIPY markiert wurde, über die Lipidmembran gespült. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurde die LAURDAN- und BODIPY-Fluoreszenz bestimmt. Bei der Anregung der LAURDAN-Fluoreszenz mit einer Wellenlänge von 350 nm konnte jedoch keine charakteristische LAURDAN-Fluoreszenzbande im Bereich von 390 nm bis 600 nm detektiert werden. Dagegen konnte eine stark ausgeprägte BODIPY-Fluoreszenzbande mit einem Intensitätsmaximum bei 520 nm detektiert werden. Da die Anregungswellenlänge von BODIPY bei 480 nm mit der Bande der LAURDAN-Fluoreszenz von 400 nm bis 550 nm überlappt, ist das Ausbleiben der LAURDAN-Fluoreszenz auf einen Resonanzenergietransfer (FRET) zurückzuführen (Abbildung 4.39).

Somit wurde zur Charakterisierung der Lipidmembran in Anwesenheit des Proteins nicht fluoreszenzmarkiertes N-Ras HD/Far verwendet. Die Abbildungen 4.40 und 4.41 zeigen die druckabhängigen TIRF-Spektren einer DOPC-Doppelschicht in Abwesenheit bzw. Anwesenheit des Proteins bei 25 °C und Drücken bis 2000 bar.

Eine Änderung der Fluorophorumgebung von apolar nach polar führt zu einer bathochromen Verschiebung der LAURDAN-Fluoreszenz. LAURDAN fungiert somit als Indikator zur Bestimmung der molekularen Packungsdichte in Lipiddoppelschichten.^[136,175] Eine weniger dichte Packung ermöglicht Wassermolekülen in die Kopfgruppenregion der Lipidmoleküle einzudringen und erzeugt somit eine polarere Fluorophorumgebung. Die hierdurch erzeugte bathochrome Verschiebung kann durch den *GP*-Wert quantifiziert werden:^[175,176]

$$GP = \frac{I_{\text{blau}} - I_{\text{rot}}}{I_{\text{blau}} + I_{\text{rot}}} \quad (4.26)$$

Für den Fluorophor LAURDAN ist I_{blau} die Intensität der Fluoreszenz bei 440 nm

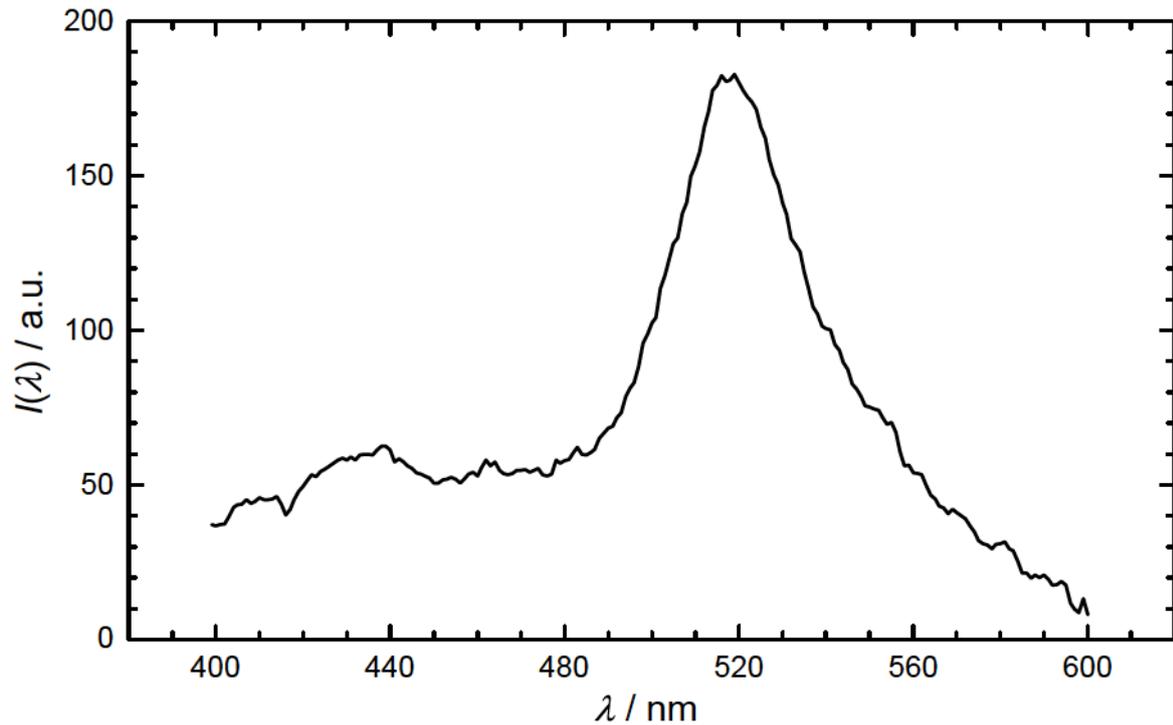


Abbildung 4.39: TIRF-Spektrum der DOPC-Doppelschicht mit eingebautem Protein N-Ras HD/Far ($c = 0.01 \text{ mg mL}^{-1}$) an der Quarz/Puffer-Grenzfläche bei 100 bar und 25 °C. Die Lipidmembran wurde mit dem extrinsischen Fluorophor LAURDAN (Mischungsverhältnis 1:50) und das Protein N-Ras HD/Far mit dem Fluorophor BODIPY (Mischungsverhältnis 1:2) markiert. Die Anregungswellenlänge betrug 350 nm.

und I_{rot} die Intensität der Fluoreszenz bei 490 nm. Die GP -Werte der adsorbierten DOPC-Doppelschicht in Anwesenheit und Abwesenheit des Proteins N-Ras HD/Far werden in Abhängigkeit des Drucks in Abbildung 4.42 dargestellt.

DOPC ($T_m = -17 \text{ °C}$ bei 1 bar) befindet sich bei 25 °C im untersuchten Druckbereich (bis 2000 bar) in der fluiden Phase. Trotzdem konnte ein Anstieg des GP -Wertes mit steigendem Druck detektiert werden. Dies ist auf eine verstärkte Ausrichtung (mehr trans-Konformationen) der hydrophoben Ketten innerhalb Lipiddoppelschicht zurückzuführen. Die Lipidmembran nimmt somit eine dichtere Packung an und die Hydratisierung der Kopfgruppe nimmt ab. Der Einbau der Ankerketten des Proteins in die Lipiddoppelschicht zeigt bei kleinen Drücken einen größeren GP -Wert. Die hydrophoben Ankerketten verschieben offenbar das Gleichgewicht zwischen trans- und gauche-Konformeren auf die Seite der trans-Konformere. Jedoch ist anzumerken, dass die Änderung des GP -Wertes mit zunehmenden Druck in Anwesenheit des Proteins

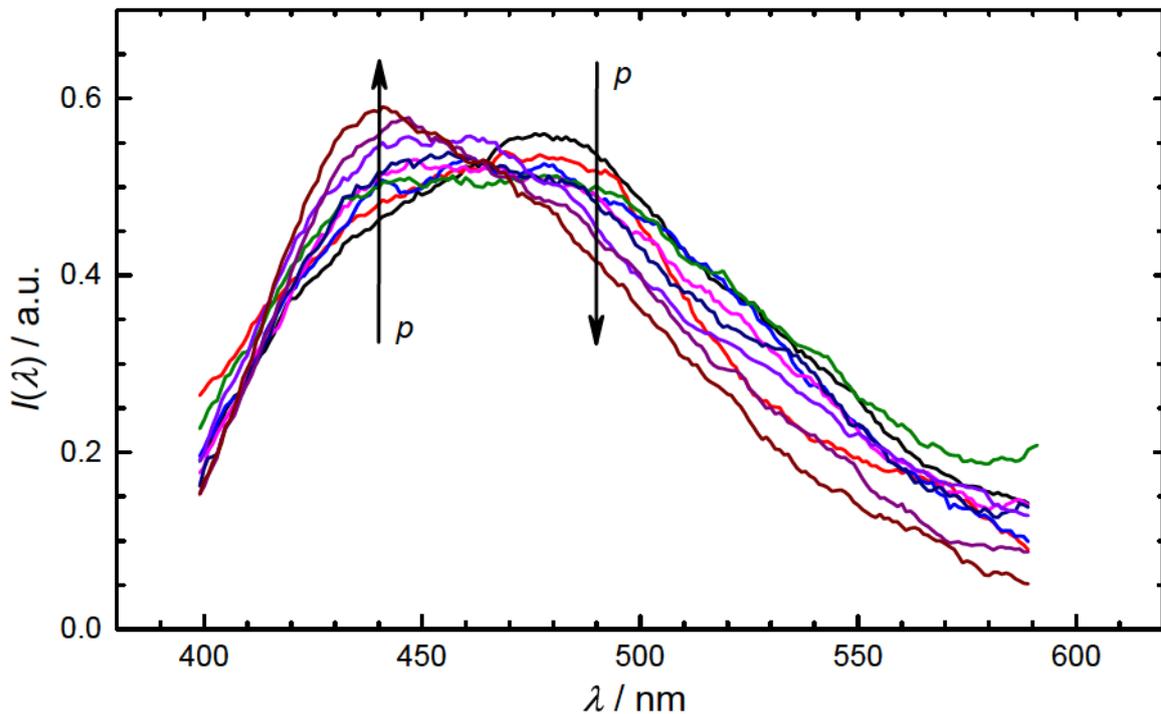


Abbildung 4.40: Normierte TIRF-Spektren einer DOPC-Doppelschicht adsorbiert an der Quarz/Puffer-Grenzfläche in der Abwesenheit des Proteins N-Ras HD/Far bei 25 °C und Drücken bis 2000 bar (Schrittweite: 250 bar). Die Lipidmembran war mit dem Fluorophor LAURDAN (Mischungsverhältnis 1:50) markiert. Die Anregungswellenlänge betrug 350 nm. Die schwarzen Pfeile verdeutlichen die druckabhängigen Intensitätsänderungen bei einer Wellenlänge von 440 bzw. 490 nm.

etwas geringer ist. Der druckinduzierte Anstieg des *GP*-Wertes (Abbildung 4.42) steht im Einklang mit den druckinduzierten Änderungen der Streulängendichteprofile der DOPC-Lipidmembran (Abbildungen 4.36 und 4.37). Durch Druck werden die Lipidketten dichter gepackt (weniger gauche-Konformere), wodurch auch die Lipidkopfgruppen sich dicht und nahe der polar/unpolar-Grenzfläche anordnen. Die Bewegungen einzelner Lipidmoleküle senkrecht zu dieser Ebene werden eingeschränkt. Einerseits wird hierdurch die Hydratisierung der Kopfgruppen vermindert (*GP*-Wert steigt), andererseits verschärft sich der Kopfgruppen-Peak im Streulängendichteprofil. Beide Effekte sind in Anwesenheit des Proteins stärker ausgeprägt. N-Ras HD/Far bewirkt offenbar eine dichtere Packung und Glättung der DOPC-Lipidmembran.

Zusätzlich wurde die Fluoreszenzbande des BODIPY-markierten N-Ras HD/Far druckabhängig bis 2000 bar bei 25 °C vermessen. Diese Messreihe erfolgte in Abwesenheit des

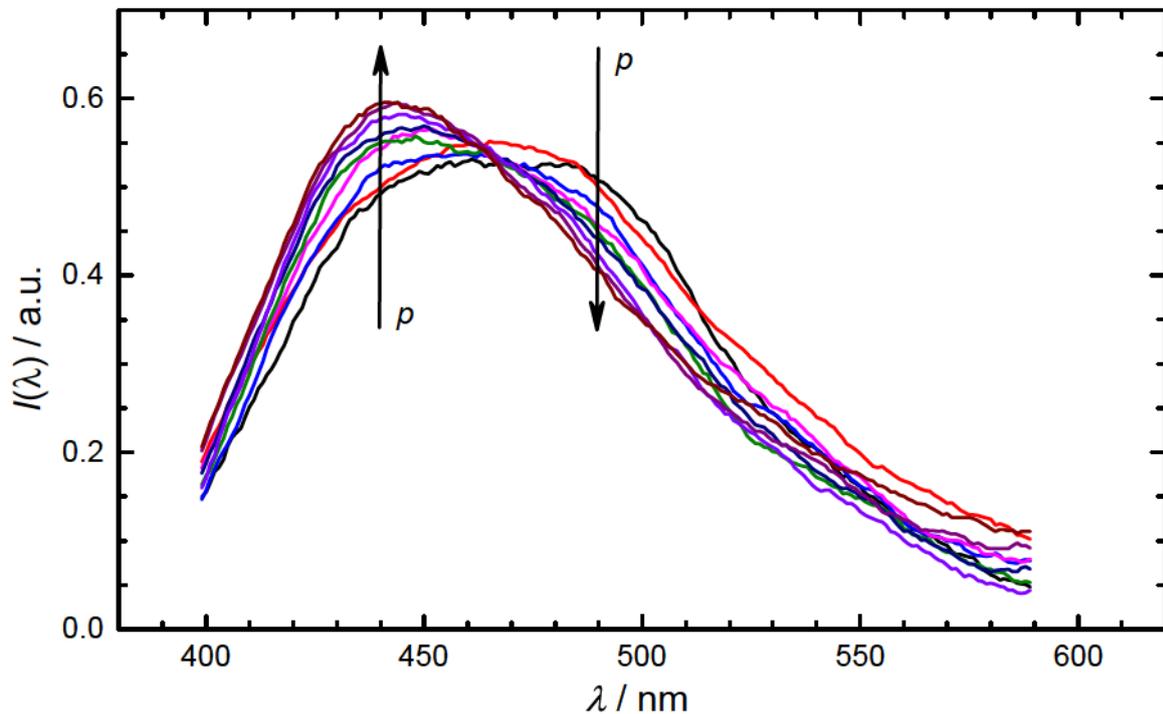


Abbildung 4.41: Normierte TIRF-Spektren einer DOPC-Doppelschicht adsorbiert an der Quarz/Puffer-Grenzfläche in der Anwesenheit des Proteins N-Ras HD/Far ($c = 0.01 \text{ mg mL}^{-1}$) bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und Drücken bis 2000 bar (Schrittweite: 250 bar). Die Lipidmembran ist mit dem Fluorophor LAURDAN (Mischungsverhältnis 1:50) markiert. Die Anregungswellenlänge betrug 350 nm. Die schwarzen Pfeile verdeutlichen die druckabhängigen Intensitätsänderungen bei einer Wellenlänge von 440 bzw. 490 nm.

Fluorophors LAURDAN, um einen Energieaustausch der Fluorophore auszuschließen. Die druckabhängigen TIRF-Spektren in Abbildung 4.43 zeigen deutlich, dass keine signifikante Änderung der Fluoreszenzintensität im untersuchten Druckbereich auftritt. Dies bedeutet, dass der Adsorptionsgrad des Proteins an der DOPC-Doppelschicht im untersuchten Druckbereich bis 2000 bar konstant ist.

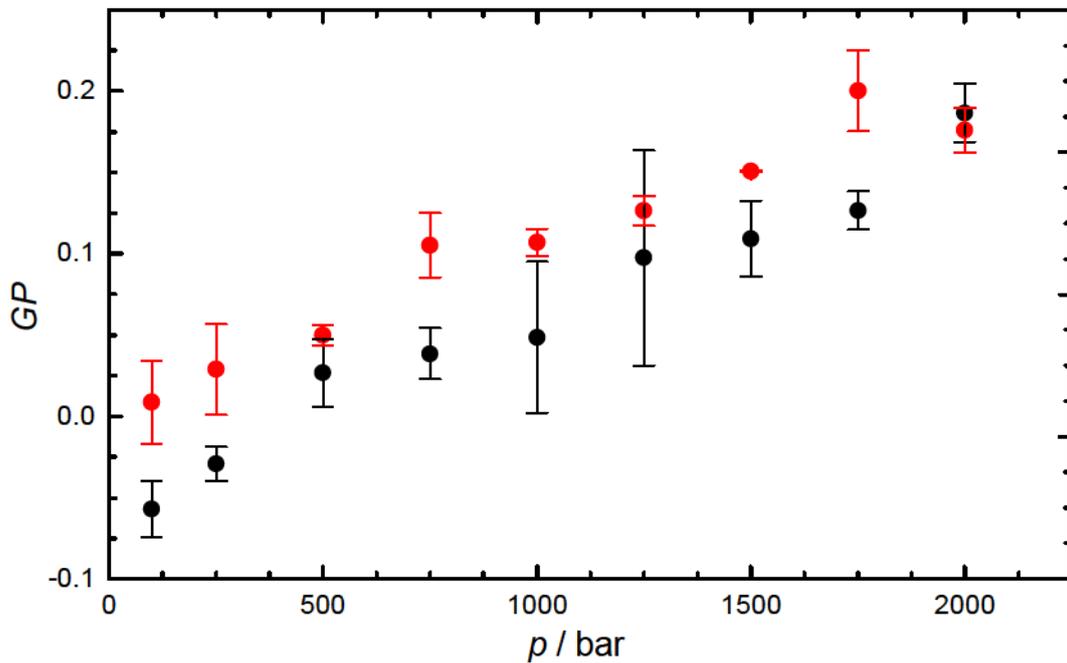


Abbildung 4.42: Druckabhängige GP -Werte der adsorbierten DOPC-Doppelschicht in Abwesenheit (●) und Anwesenheit (●) des Proteins N-Ras HD/Far ($c = 0.01 \text{ mg mL}^{-1}$) bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

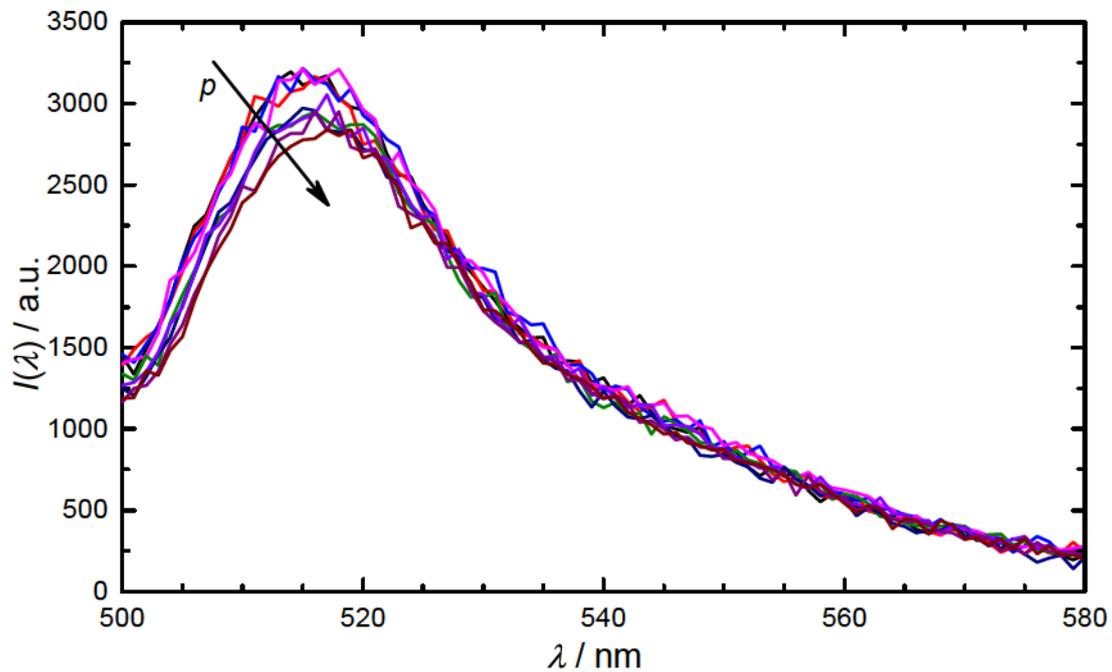


Abbildung 4.43: Druckabhängige TIRF-Spektren des BODIPY-markierten N-Ras HD/Far ($c = 0.01 \text{ mg mL}^{-1}$) bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Das Protein verfügte über zwei Lipidkettenanker-motive, die in die adsorbierte DOPC-Doppelschicht inkorporieren. Das Mischungsverhältnis zwischen Protein und dem Fluorophor BODIPY betrug 2:1. Die Anregung erfolgte mit einer Wellenlänge von 480 nm .

4.4 Strukturelle Charakterisierung der Lipidmembran von Archaeen

Die strukturelle Charakterisierung der Lipidmembran von Archaeen an der Flüssig/Fest-Grenzfläche mittels Hochdruck-Neutronenreflektometrie ist Teil einer Studie zur Aufklärung der physikalischen Eigenschaften dieses speziellen Lipidtyps.[‡] Bevor in diesem Kapitel auf die Messungen der Neutronenreflektivität eingegangen wird, werden die wesentlichen Ergebnisse der Gesamtstudie kurz zusammengefasst:

Die polare Lipidfraktion E (engl.: polar lipid fraction E; PLFE) enthält den größten Anteil an bipolaren Tetraetherlipiden in dem thermoacidophilen Archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. Mittels dynamischer Differenzkalorimetrie und Druck-Perturbations-Kalorimetrie sowie Ultraschallgeschwindigkeits- und Dichtemessungen wurde herausgefunden, dass die Kompressibilität und die Volumenfluktuationen von PLFE-Liposomen abhängig von der Wachstumstemperatur T_g der Zellen sind. Die Werte der Kompressibilität und Volumenfluktuationen von PLFE-Liposomen sind zum einen erheblich unterschiedlich von denen, die für Diesterlipidmembranen, wie beispielsweise DPPC, bekannt sind, und zum anderen sind die Unterschiede der resultierenden Werte für die getesteten Wachstumstemperaturen von 68, 76, und 81 °C klein, aber signifikant. Die geringste Kompressibilität und die dichtest-gepackte PLFE-Lipidmembran wurde bei einer Wachstumstemperatur von 76 °C gefunden. Diese Temperatur liegt exakt im Bereich der optimalen Wachstumstemperaturen (75 – 80 °C) der Zellen. Es ist bekannt, dass eine geringere Wachstumstemperatur zu einer kleineren Anzahl an Cyclopentanringen in den hydrophoben Alkylketten eines bipolaren Tetraetherlipids führt. Die resultierenden Daten dieser Studie erlauben die Schlussfolgerung, dass die Packungsdichte der Lipidmembran innerhalb des PLFE-Liposoms in einem nicht-linearen Zusammenhang mit der Anzahl der Cyclopentanringe variiert. Die höchste Packungsdichte der Lipidmembran resultiert aus bipolaren Tetraetherlipiden, die bei optimalen Wachstumstemperaturen entstehen. Die durchgeführten Neutronenreflektivitätsmessungen einer PLFE-Lipidmembran ($T_g = 80$ °C), die an der Silizium/D₂O-Grenzfläche gespreitet

[‡]Die komplette Studie inklusive der in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse wurde in Referenz^[177] publiziert.

wurde, zeigen den Einfluss von hohen hydrostatischen Drücken auf die Schichtdicke d und die Neutronenstreu­längendichte ρ_n der Lipidmembran. Beide untersuchten Parameter wiesen bei einer Temperatur von 55 °C und Drücken bis 1800 bar keine großen Änderungen auf. Das nahezu druckunabhängige Verhalten der PLFE-Lipidmembran weist nur auf kleine Änderungen der Schichtdicke der hydrophoben Kettenregion und der Ausrichtung der Kopfgruppen durch Kompression hin.

Bestimmung der Struktur einer PLFE-Lipidmembran mittels Hochdruck-Neutronenreflektometrie

Die Hochdruck-Neutronenreflektometriemessungen wurden an dem Reflektometer FIGARO des „Institut Laue-Langevin“ (ILL) durchgeführt. Abbildung 4.44 zeigt die Neutronenreflektivitätskurven der PLFE-Lipidmembran, adsorbiert auf einer Siliziumoberfläche, bei verschiedenen Drücken. Die Anpassung der resultierenden Daten basiert auf einem einfachen Schichtmodell, Si/SiO₂/PLFE/D₂O. Mit der von L. G. Parratt^[110] entwickelten Rekursionsmethode (siehe Abschnitt 3.1) wurden die Schichtdicke d , die Neutronenstreu­längendichte ρ_n und die Rauigkeit σ der PLFE-Lipidmembran als Anpassungsparameter gewählt. Die entsprechenden Parameter der SiO₂-Schicht wurden auf 17 Å, $3,48 \cdot 10^{-6}$ Å⁻² und 5 Å festgelegt.^[171] Anhand des kritischen Streuvektorbetrags Q_c wurde die Neutronenstreu­längendichte des Lösungsmittels bestimmt.

Zusammenfassend sind die resultierenden Parameter der PLFE-Lipidmembran für die verschiedenen Drücke in Tabelle 4.3 dargestellt. Bei einer Temperatur von 25 °C und einem Druck von 50 bar befindet sich die PLFE-Lipidmembran in einer geordneten, lamellaren Phase, die äquivalent zur Gel-Phase einer Diesterphospholipid-Doppelschicht ist. Die gefundene Schichtdicke von 51 Å entspricht genau einer PLFE-Lipidmembran auf einer hydratisierten Siliziumoberfläche. Die Verwendung der Hochdruckzelle führt zu einem limitierten Bereich des Streuvektorbetrags, so dass keine weiteren Strukturinformationen, wie beispielsweise die Dicke der Lipid-Kopfgruppenschicht, aus den Neutronenreflektivitätskurven gewonnen werden können. Chong und Gabriel berechneten in einer molekularen Modellierung für eine GDNT-Lipidmembran eine Schichtdicke von ungefähr 45 Å.^[178] Die Untersuchung einer PLFE-Lipidmembran ($T_g = 65$ °C) mittels Rasterkraftmikroskopie (engl.: atomic force microscopy; AFM) ergab eine Schichtdicke von 50 Å, in guter Übereinstimmung mit dem hier gefundenen Wert aus der Neu-

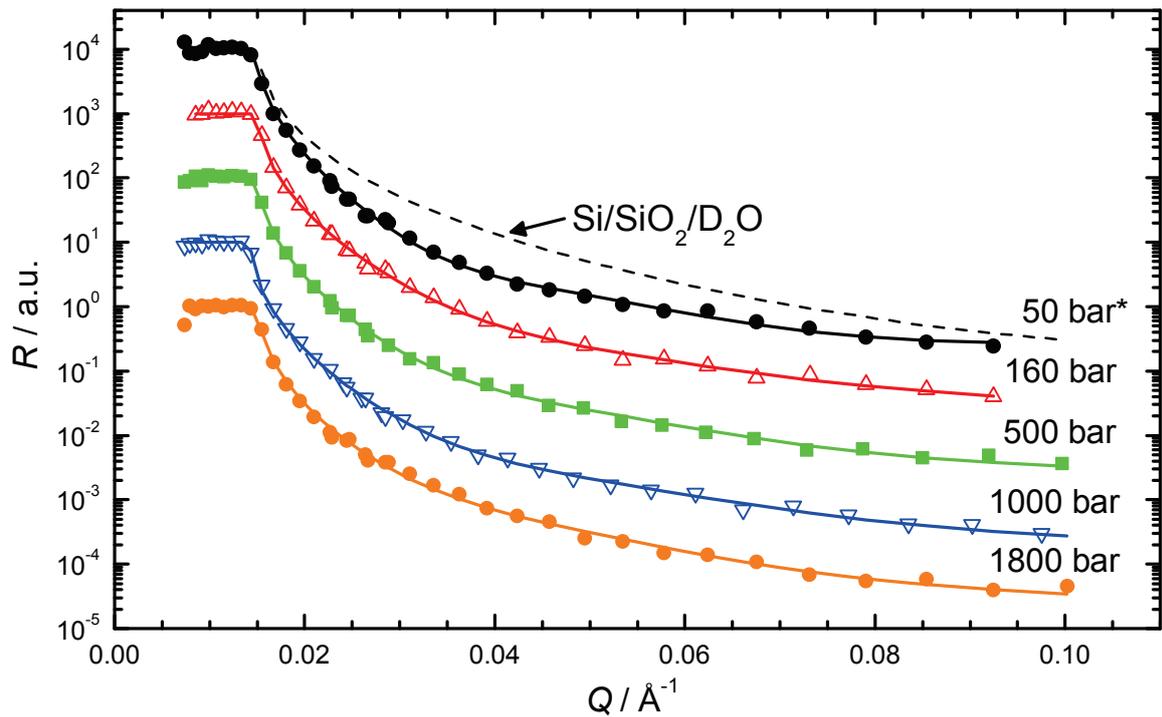


Abbildung 4.44: Neutronenreflektivitätskurven einer PLFE-Lipidmembran, adsorbiert auf einer Siliziumoberfläche (Si/SiO₂/PLFE/D₂O). Die Symbole beschreiben die experimentellen Daten und die Linien die Anpassung eines Schichtmodells. Die Messung der Kurven erfolgte sukzessive von oben nach unten. Die Fehlerbalken sind in der Größenordnung der Datenpunkte. Mit Ausnahme der obersten Kurve, die bei 25 °C gemessen worden ist (mit Sternchen gekennzeichnet), wurden alle Messungen bei 55 °C durchgeführt. Die vertikale Verschiebung der Kurven dient der besseren Übersicht. Zum Vergleich wurde eine Neutronenreflektivitätskurve in Abwesenheit der PLFE-Lipidmembran dargestellt (Si/SiO₂/D₂O).

tronenreflektivität. Zudem zeigen diese Ergebnisse, dass die Wasserschicht zwischen Siliziumoberfläche und PLFE-Lipidmembran nur ein paar Ångström dick sein kann.

Des Weiteren wurden Neutronenreflektivitätskurven der PLFE-Lipidmembran bei 55 °C und Drücken bis 1800 bar aufgenommen. In der Literatur wird beschrieben, dass PLFE-Liposome ab ungefähr 48 °C in einer fluideren Phase vorliegen.^[81] Damit die Dichtigkeit der Hochdruckzelle und die Abwesenheit von Luftblasen im Strahlengang gewährleistet werden kann, wurde bereits zu Beginn der druckabhängigen Messreihe ein kleiner Druck appliziert. Die Werte in Tabelle 4.3 weisen keine signifikanten Änderungen der Schichtdicke auf, nachdem die Temperatur auf 55 °C und der Druck auf 160 bar erhöht worden sind. Dennoch führen die veränderten Bedingungen zu einer Abnah-

Tabelle 4.3: Ergebnisse der Anpassung eines einfachen Schichtmodells (Si/SiO₂/PLFE/D₂O) an die gemessenen Reflektivitätskurven der PLFE-Lipidmembran auf einer Siliziumoberfläche als Funktion des Drucks und der Temperatur.^a

$T / ^\circ\text{C}$	p / bar	$d / \text{Å}$	$\rho_n / 10^{-6} \text{ Å}^{-2}$	$\sigma / \text{Å}$
25	50	51	2.5	14
55	160	53	1.9	25
55	500	43	1.2	38
55	1000	52	1.6	28
55	1800	44	1.7	20

^aSchichtdicke d , Neutronenstrelängendichte ρ_n und die Rauigkeit σ der PLFE-Lipidmembran. Die Fehler der Anpassungsparameter sind: $d = \pm 3 \text{ Å}$, $\rho_n = \pm 0.2 \cdot 10^{-6} \text{ Å}^{-2}$ und $\sigma = \pm 5 \text{ Å}$.

me der Neutronenstrelängendichte und zu einer leichten Zunahme der Rauigkeit der Lipid/Wasser-Grenzfläche. Diese Veränderungen können auf einen Phasenübergang in eine fluidere Phase hinweisen, was gleichbedeutend mit einer Änderung des Hydratisierungsgrads der Lipid-Kopfgruppen und einer Umorientierung der Alkylketten ist. Im Rahmen der Genauigkeit des Neutronenreflektometrieexperiments hat eine weitere Druckerhöhung bis zu 1800 bar nur geringfügigen Einfluss auf die Struktur der PLFE-Lipidmembran (siehe Tabelle 4.3). Dieses Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit den in der Gesamtstudie gefundenen kleinen Werten der Kompressibilität.^[177]

Die Neutronenstrelängendichte ρ_n der PLFE-Lipidmembran, wie sie in Tabelle 4.3 aufgelistet ist, stellt einen gewichteten Mittelwert der Neutronenstrelängendichten des Lipids $\rho_{n,L}$ und des Wassers (D₂O) $\rho_{n,W}$ dar:

$$\rho_n = (1 - \phi_W) \rho_{n,L} + \phi_W \rho_{n,W} \quad (4.27)$$

ϕ_W ist hierbei der Volumenanteil des Wassers.

Unter der Annahme einer PLFE-Dichte von 1 mg mL^{-1} resultiert eine berechnete Neutronenstrelängendichte für das Lipid $\rho_{n,L}$ von $0.7 \cdot 10^{-6} \text{ Å}^{-2}$. Hierzu wurden die Neutronenstrelängen aller Atome, die in einem PLFE-Molekül enthalten sind, addiert. Der entsprechende Wert für das Phospholipid, 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC), liegt bei $-0.37 \cdot 10^{-6} \text{ Å}^{-2}$. Dieser Unterschied in den Neutronenstrelängendichten ist im Wesentlichen auf die stark unterschiedlichen hydrophilen

Kopfgruppen zurückzuführen. Die erhaltene Neutronenstrelängendichte der PLFE-Lipidmembran deutet auf eine nicht vollständige bedeckte Siliziumoberfläche hin. Das Aufheizen der PLFE-Lipidmembran zeigt eine Abnahme der Neutronenstrelängendichte, was durch eine Abnahme des Wasseranteils im hydrophoben Lipidmembraninneren und gleichzeitige Zunahme der Unordnung und Hydratisierung der hydrophilen Kopfgruppen beschrieben werden kann.

4.5 Temperatur- und druckinduzierte Kristallphasenübergänge der Triacylglycerole in Kakaobutter

In dieser Studie wurde der Einfluss hydrostatischer Drücke bis 2000 bar auf die Kristallphasen von Kakaobutter bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Zur Charakterisierung der einzelnen Phasen unter den gegebenen Bedingungen wurden die Röntgen-Klein- und Weitwinkelstreuung verwendet. Die Experimente wurden an der Beamline SWING am Synchrotron SOLEIL durchgeführt.

Die Zuordnung der Kristallphasen erfolgte durch Vergleich der resultierenden Bragg-Reflexe mit Literaturdaten.^[91] Tabelle 4.4 gibt die charakteristischen Bragg-Reflexe der einzelnen Kristallphasen der Kakaobutter wieder. Zudem wird jeweils die relative Intensität angegeben. Die auftretenden Bragg-Reflexe im Kleinwinkelbereich ($Q \leq 1.3 \text{ \AA}^{-1}$) geben Aufschluss über den Gittertyp der Kristallphasen. Informationen über die innere Struktur der Kristallphasen resultieren aus den Reflexen im Weitwinkelbereich. Die Ergebnisse zeigen, dass die nach dem Aufschmelzen entstehende Kristallphase stark von der Kristallisationszeit und dem Abkühlprofil abhängt. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die Reinheit der vorliegenden Kristallphase den Effekt von applizierten Drücken bestimmt. Je reiner die Kristallphase, desto geringer die druckinduzierte Kristallphasenumwandlung. Bei einer Temperatur knapp oberhalb der Flüssig/Kristallin-Phasengrenze bewirkt Druck eine Phasenumwandlung in eine instabile Kristallphase. Dennoch ist der Druckeffekt auf die Kristallphasen bis 2000 bar in allen Fällen reversibel.

Effekt der Kristallisationszeit auf das Phasenverhalten der Kakaobutter

Abbildung 4.45 zeigt die Diffraktogramme der Kakaobutter im Klein- und Weitwinkelbereich für verschiedene Kristallisationszeiten bei 20 °C und 1 bar. Nach dem Aufheizen auf 50 °C wurde die jeweilige Probe im Kühlschrank (~7 °C) zur Kristallisation aufbewahrt. Das Diffraktogramm der Kakaobutter nach einer Kristallisationszeit von ~48 h weist alle Bragg-Reflexe der Kristallphase V auf. Die intensiven Bragg-Reflexe bei 0.098 \AA^{-1} und 0.196 \AA^{-1} im Kleinwinkelbereich und der intensive Bragg-Reflex bei

Tabelle 4.4: Die sechs Kristallphasen der Kakaobutter. Modifizierte Darstellung nach G. M. Chapman et al.^[91]

Kristallphase	Kleinwinkelbereich		Weitwinkelbereich	
	$d / \text{\AA}$	$Q / \text{\AA}^{-1}$	$d / \text{\AA}$	$Q / \text{\AA}^{-1}$
I	54.0	0.116 S	4.17	1.507 S
	27.0	0.233 M	3.87	1.624 M
II	51.0	0.123 VS	4.20	1.496 VS
	16.3	0.385 M		
III	51.0	0.123 VS	4.20	1.496 VW
	25.0	0.251 VW	3.87	1.624 W
	16.4	0.383 M		
IV	49.0	0.128 VS	4.32	1.454 S
	14.8	0.425 W	4.13	1.521 S
			3.88	1.619 W
			3.75	1.676 M
V	66.0	0.095 S	4.58	1.372 VS
	33.0	0.190 S	4.22	1.489 VW
	16.2	0.388 VW	3.98	1.579 MW
	12.8	0.491 M	3.87	1.624 M
	8.1	0.776 M	3.73	1.685 M
	7.1	0.885 VM	3.65	1.721 MS
	5.1	1.225 VW		
VI	63.0	0.100 S	4.53	1.387 VS
	31.0	0.203 S	4.21	1.492 VW
	15.9	0.395 VW	4.01	1.567 W
	12.7	0.495 MW	3.84	1.636 M
	8.0	0.785 MM	3.67	1.712 S
	7.0	0.898 W		
	5.4	1.170 M		
	5.1	1.234 VW		

VS = very strong; MS = medium strong; S = strong; M = medium;
 MW = medium weak; W = weak; VW = very weak

1.376 \AA^{-1} sowie die schwächeren Reflexe bei 1.584, 1.630, 1.680 und 1.720 \AA^{-1} im Weitwinkelbereich ermöglichen die genaue Zuordnung. Jedoch liegt diese Kristallphase nicht rein vor, da noch sehr schwache Bragg-Reflexe bei 0.140, 1.476 und 1.502 \AA^{-1} detektiert werden konnten, die die Kristallphase IV charakterisieren. Eine drastisch kürzere Kristallisationszeit von ~14 h hat eine Intensitätsänderung der beschriebenen Bragg-Reflexe

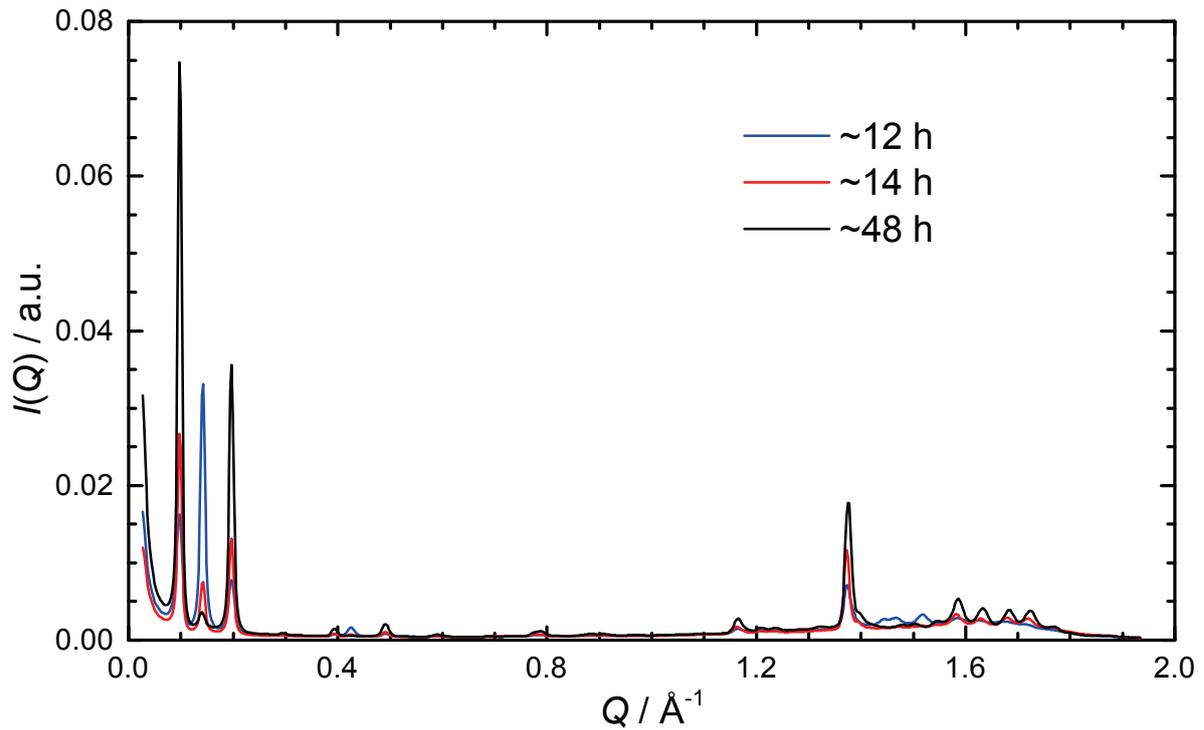


Abbildung 4.45: Diffraktogramme von Kakaobutter bei 20 °C und 1 bar nach verschiedenen Kristallisationszeiten.

zur Folge. Während die Intensität der charakteristischen Reflexe der Kristallphase V kleiner wird, steigt die Intensität der charakteristischen Reflexe der Kristallphase IV an. Zusätzlich kann ein weiterer Bragg-Reflex bei 0.425 \AA^{-1} detektiert werden, der ebenfalls der Kristallphase IV zugeordnet wird. Eine weitere Verkürzung der Kristallisationszeit um 2 h auf 12 h verschiebt den Anteil der nebeneinander vorliegenden Kristallphasen deutlich auf die Seite der Kristallphase IV. Die Diffraktogramme in Abhängigkeit der Kristallisationszeit zeigen somit eine deutliche Veränderung der Intensitäten der verschiedenen Bragg-Reflexe. Für die Schokoladenherstellung ist das Vorliegen der Kristallphase V von großer Wichtigkeit, da diese Kristallphase die gewünschten chemischen Eigenschaften besitzt.^[85] Daher ist ein definierter Abkühlprozess und eine bestimmte Kristallisationszeit von enormer Bedeutung. In diesem Teil der Studie konnte durch die gewählte Abkühlrate nach 48 h keine reine Kristallphase V detektiert werden.

Einfluss hydrostatischer Drücke bis 2000 bar auf die Kristallphasen der Kakaobutter

In diesem Teil der Studie wurde der Einfluss hydrostatischer Drücke bis 2000 bar auf die Kristallphasen der Kakaobutter getestet. Abbildung 4.46 zeigt die Diffraktogramme der Kakaobutter nach einer Kristallisationszeit von 12 h bei 20 °C und 1 bar bzw. 2000 bar. Wie bereits im vorherigen Abschnitt diskutiert, liegt diese Probe bei Normaldruck als Gemisch der Kristallphasen IV und V vor, wobei der Anteil der Kristallphase IV überwiegt. Eine Druckerhöhung auf 2000 bar erzwingt keine Kristallphasenumwandlung. Des Weiteren ist kein Einfluss auf die Position der Bragg-Reflexe im Kleinwinkelbereich zu erkennen, so dass der Gittertyp der Kristallphase unverändert bleibt. Dennoch erzeugt der erhöhte Druck eine Komprimierung der Netzebenenabstände innerhalb der Kristallphase. Die Bragg-Reflexe im Weitwinkelbereich verschieben sich zu größeren Q -Werten, das heißt zu kleinen Abständen. Beispielsweise verschiebt sich ein Bragg-Reflex bei einem applizierten Druck von 2000 bar von 1.374 \AA^{-1} nach 1.392 \AA^{-1} . Dies entspricht einer Veränderung von ungefähr 0.06 \AA . Eine Verschiebung dieser Größenordnung konnte ebenfalls für die anderen Bragg-Reflexe der jeweiligen Kristallphase gefunden werden.

Mit steigender Kristallisationszeit erhöht sich der Anteil der Kristallphase V durch Umwandlung der Kristallphase IV zu V. In den Abbildungen 4.47 und 4.48 wird deutlich, dass eine Druckerhöhung dieser Umwandlung entgegenwirken kann. Bei einem applizierten Druck von 2000 bar konnte, neben den zuvor für eine Kristallisationszeit von 12 h (Abbildung 4.46) beschriebenen Veränderungen, eine Intensitätszunahme des Bragg-Reflexes bei 1.526 \AA^{-1} detektiert werden. Die Intensitätszunahme unter Druck ist für die Probe mit einer Kristallisationszeit von 14 h stärker ausgeprägt als bei der Probe mit einer Kristallisationszeit von 48 h. Dieses Ergebnis zeigt, dass je reiner die Kristallphase vorliegt, desto höher der applizierte Druck sein muss, um eine Phasenumwandlung zu erreichen. Jedoch ist die druckinduzierte Kristallphasenumwandlung im untersuchten Druckbereich bis 2000 bar reversibel.

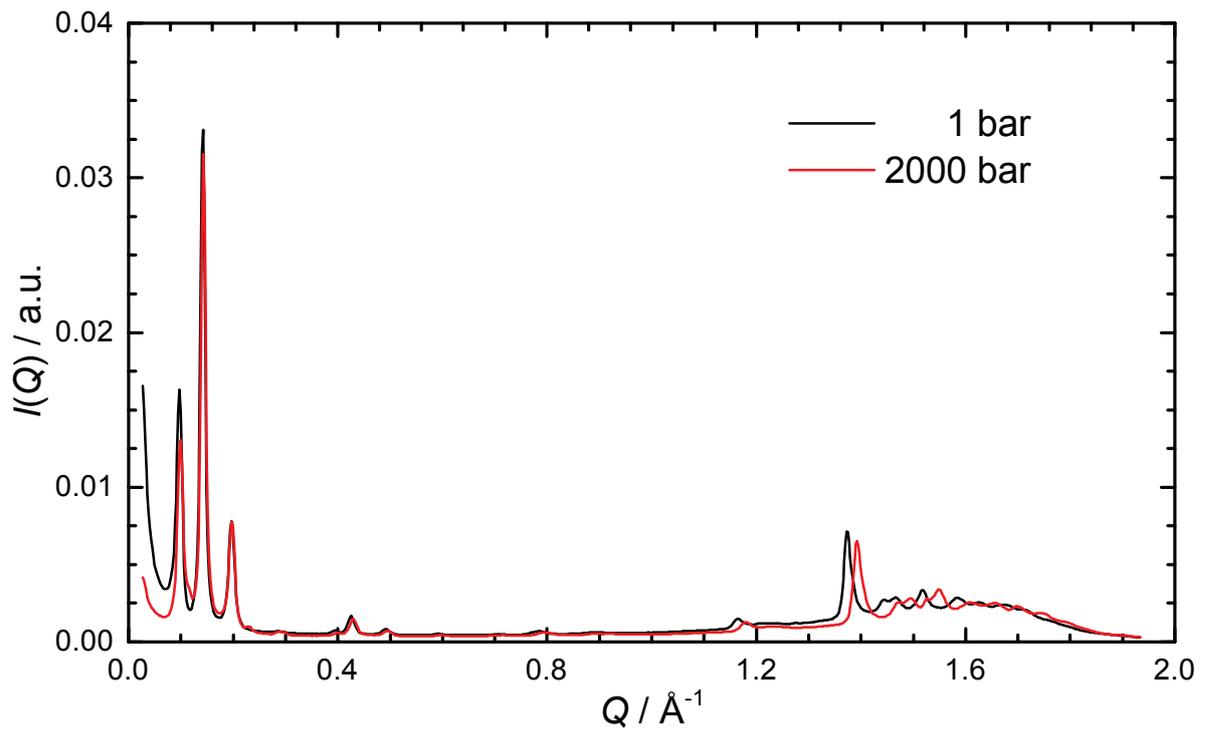


Abbildung 4.46: Druckabhängige Diffraktogramme von Kakabutter bei 20 °C nach einer Kristallisationszeit von 12 h.

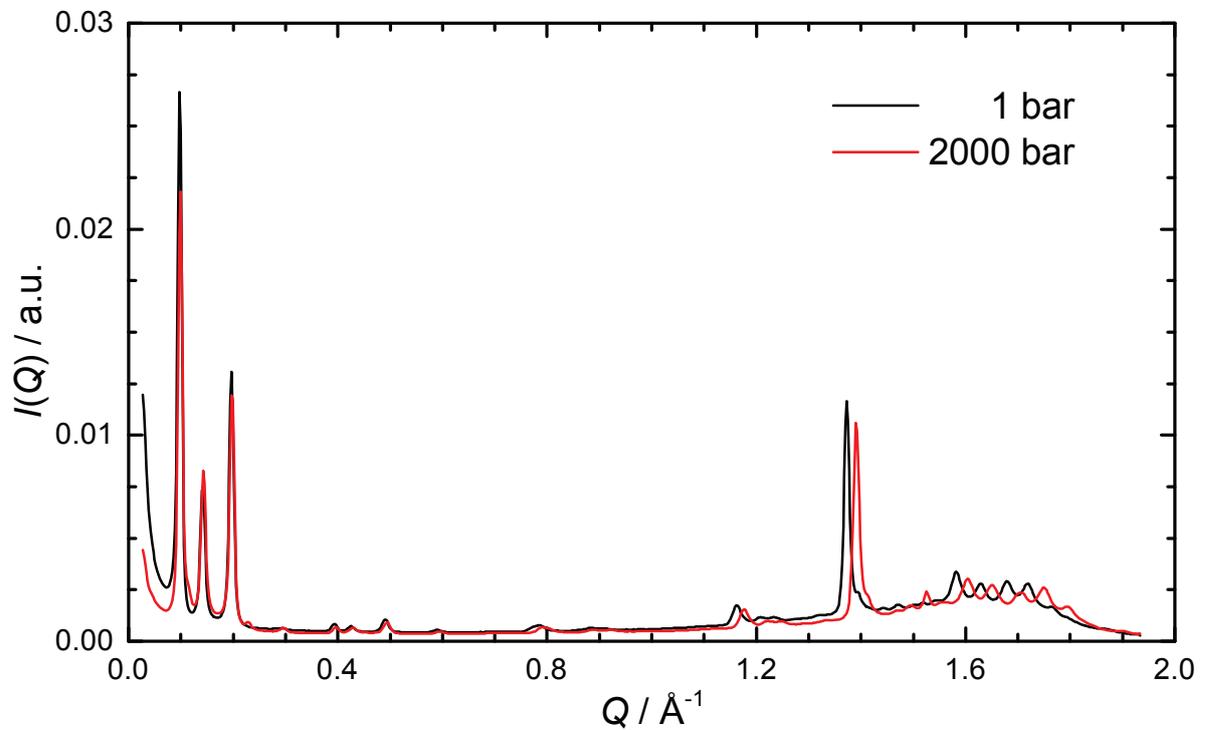


Abbildung 4.47: Druckabhängige Diffraktogramme von Kakabutter bei 20 °C nach einer Kristallisationszeit von 14 h.

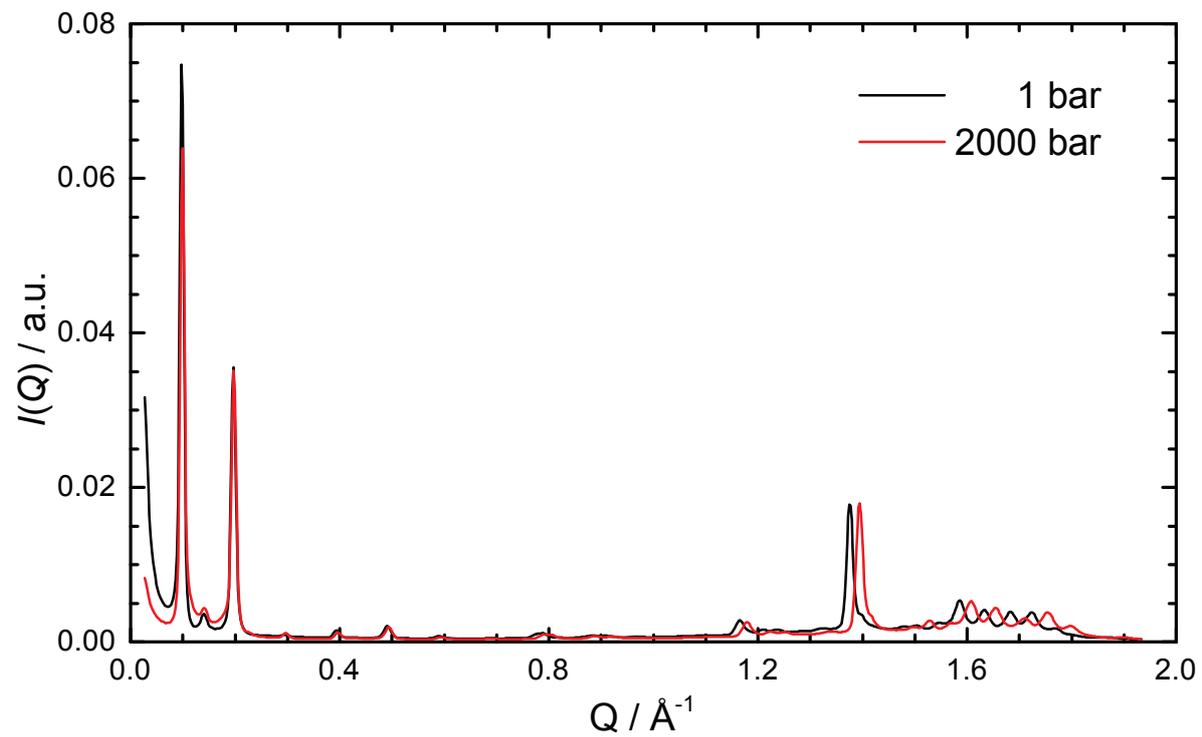


Abbildung 4.48: Druckabhängige Diffraktogramme von Kakabutter bei 20 °C nach einer Kristallisationszeit von 48 h.

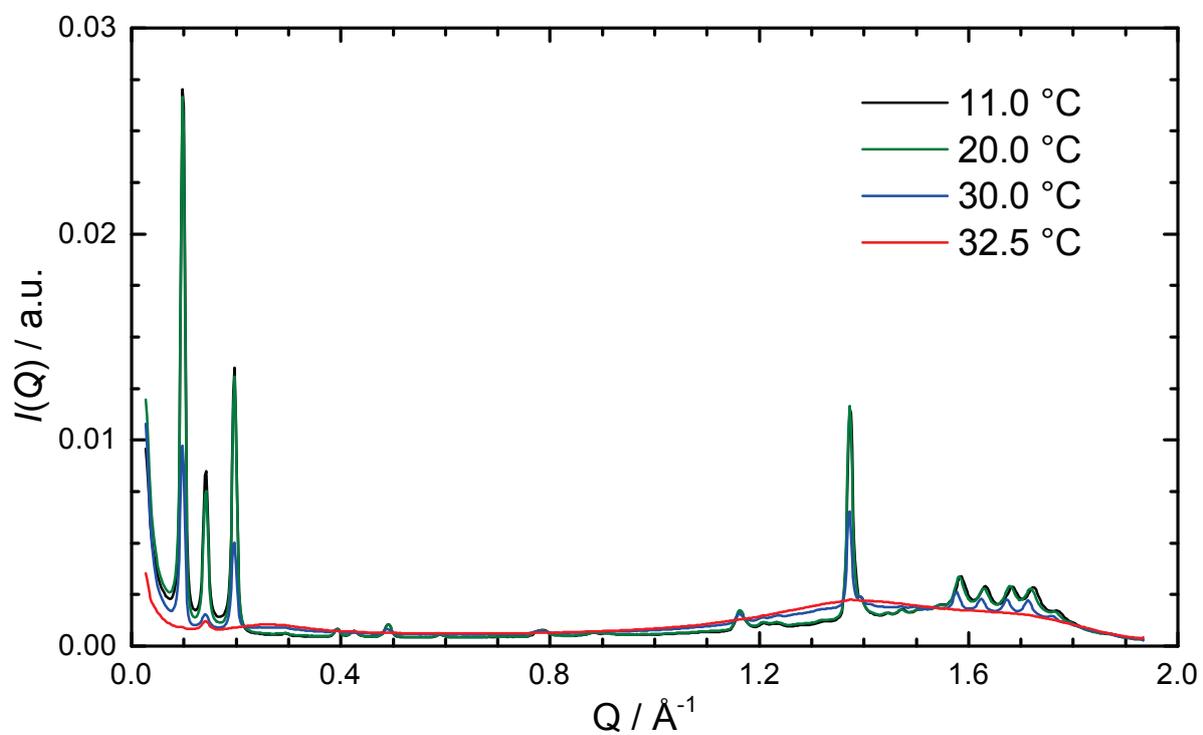


Abbildung 4.49: Temperaturabhängigkeit der Diffraktogramme von Kakaobutter.

Tabelle 4.5: Zusammenstellung der Schmelzpunkte der sechs Kristallphasen von Kakaobutter

Kristallphase	Wille & Lutton ^a [179]	Chapman et al. ^b [91]	Lovegren et al. ^b [88]
I	17.3 °C		13.5 °C
II	23.3 °C	19.5 °C	20.0 °C
III	25.5 °C	21.5 °C	23.0 °C
IV	27.5 °C	24.8 °C	25.0 °C
V	33.8 °C	28.1 °C	30.0 °C
VI	36.3 °C	32.9 °C	33.5 °C

a: Ergebnisse aus röntgendiffraktometrischen Messungen;

b: Ergebnisse aus kalorimetischen Messungen

Aufschmelzen der Kakaobutter

Die temperaturabhängigen Diffraktogramme der Kakaobutter nach einer Kristallisationszeit von 14 h zeigt Abbildung 4.49. Es wird deutlich, dass die untersuchte Probe auch bei tiefen Temperaturen (11 °C) als Mischung aus den Kristallphasen IV und V mit deutlich höherem Anteil von Kristallphase V vorliegt.

In Tabelle 4.5 sind die Schmelzpunkte der einzelnen Kristallphasen von Kakaobutter aus verschiedenen Literaturquellen zusammengestellt. Die große Abweichung in den Schmelzpunkten einer Kristallphase kann zum einen durch die unterschiedlichen Methoden erklärt werden, aber es ist auch sehr wahrscheinlich, dass die Zusammensetzung der untersuchten Kakaobutter unterschiedlich war. Es ist bekannt, dass je nach Herkunftsland der Kakaobohnen, die prozentualen Anteile der Komponenten variieren und daher die physikalischen Eigenschaften der Kakaobutter unterschiedlich sind.^[86] So enthält beispielsweise die Kakaobutter aus Brasilien 17.9 % POP, 37.1 % POS und 26.0 % SOS, während die Kakaobutter aus Malaysia 16.4 % POP, 40.0 % POS und 31.1 % SOS enthält.^[86]

Eine Messtemperatur von 11 °C liegt unterhalb der Schmelztemperatur von Kristallphase I. Dennoch können im Diffraktogramm bei 11 °C nur die Kristallphasen IV und V nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass es im Zeitraum von Tagen nicht möglich ist, eine Kristallphasenumwandlung im festen Zustand durch Abkühlung zu erreichen. Bei einer Temperatur von 30 °C liegt die untersuchte Probe ausschließlich in der Kristallphase V vor, was mit dem Schmelzpunkt der Kristallphase IV gut übereinstimmt (siehe Tabelle 4.5). Die verwendete Kakaobutter ist ab einer Temperatur

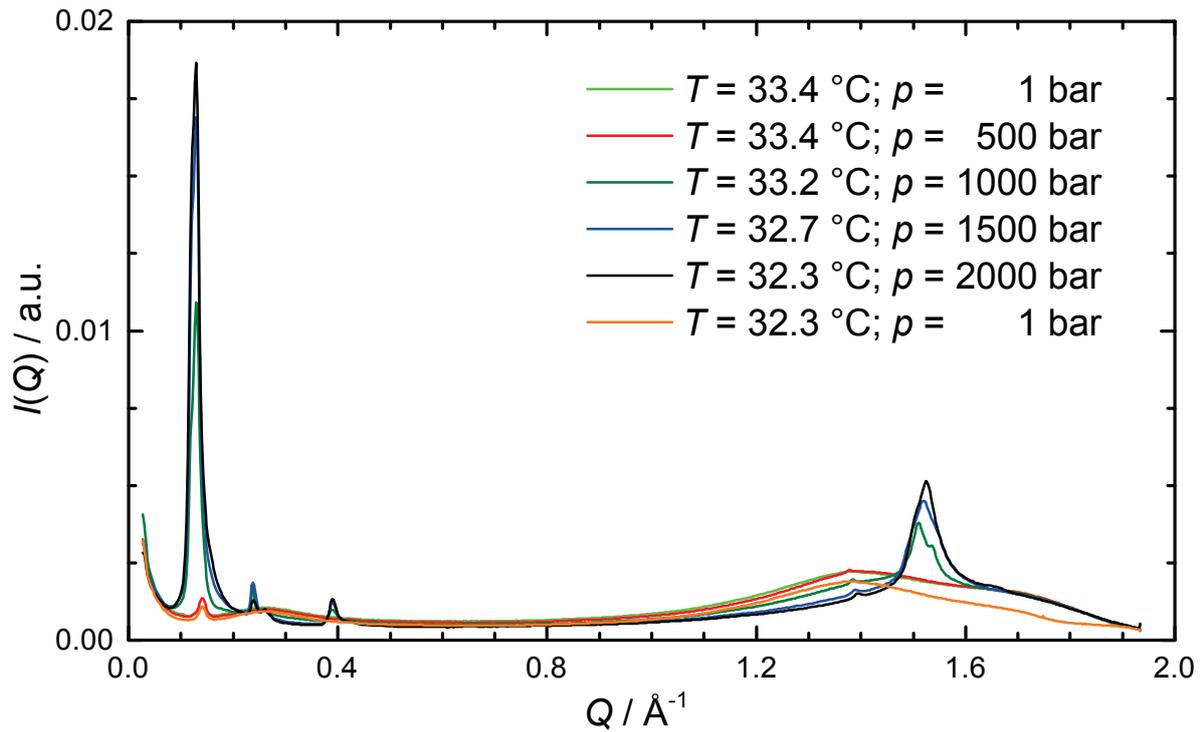


Abbildung 4.50: Druckabhängigkeit der Kristallphasen von Kakaobutter an der Flüssig/Kristallin-Phasengrenze.

von $32.5 \text{ }^\circ\text{C}$ komplett aufgeschmolzen, so dass der Schmelzpunkt der Kristallphase V zwischen $30 \text{ }^\circ\text{C}$ und $32.5 \text{ }^\circ\text{C}$ liegt.

Druckinduzierte Kristallphasenumwandlung an der Flüssig/Kristallin-Phasengrenze

In Abbildung 4.50 werden die druckabhängigen Diffraktogramme der Kakaobutter an der Flüssig/Kristallin-Phasengrenze dargestellt. Die Probe wurde aus der Kristallphase V durch Temperaturerhöhung aufgeschmolzen und befindet sich bei ungefähr $33 \text{ }^\circ\text{C}$ und 1 bar in der flüssigen Phase. Eine Druckerhöhung auf 500 bar zeigt keine Änderungen im Diffraktogramm. Ab einem Druck von 1000 bar entstehen Bragg-Reflexe, die aus einer druckinduzierten Kristallisation der Kakaobutter resultieren. Die auftretenden Bragg-Reflexe bei 0.129 \AA^{-1} , 0.235 \AA^{-1} sowie 0.389 \AA^{-1} im Kleinwinkelbereich und der Bragg-Reflex bei 1.510 \AA^{-1} charakterisieren eindeutig die Kristallphase III. Eine Umwandlung der Kristallphasen von III nach II erfolgt durch sukzessive Druckerhöhung auf schließlich 2000 bar . Diese Umwandlung mit steigendem Druck kann durch die Intensitätsabnahme des Bragg-Reflexes bei 0.235 \AA^{-1} und die simultane Intensitätszunahme

des Bragg-Reflexes bei 0.389 \AA^{-1} identifiziert werden. Allerdings ist die druckinduzierte Kristallisation nach Druckentlastung reversibel. Dennoch konnte in diesem Teil der Studie gezeigt werden, dass die Druckerwendung auf verflüssigte Kakaobutter die instabilen Kristallphasen II und III begünstigt, ohne zuvor die stabileren Kristallphasen IV und V zu bilden.

5 Zusammenfassung

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit ermöglichen ein tiefer gehendes Verständnis von spezifischen Prozessen innerhalb einer biologischen Zelle. So konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Struktur, die Wechselwirkung und die Dynamik von Insulin stark von der gewählten Lösungsmittelbedingung abhängt. Die Zugabe von 20 Vol.-% Ethanol zu einer Insulinlösung bei einem pD-Wert von 2 verhindert die Aggregation und Fibrillenbildung. In diesem Fall weist die aus NSE-Messungen resultierende Q -Abhängigkeit des scheinbaren Diffusionskoeffizienten eine ähnliche Dynamik auf wie eine konzentrierte Lysozymlösung, nämlich kollektive Diffusion. Die repulsiven Coulomb-Wechselwirkungen zwischen den Insulinmolekülen führen zu einer Maximierung des intermolekularen Abstands und somit zu einer gleichmäßigen Verteilung der Insulinmoleküle in Lösung. Die auftretende Wechselwirkung bewirkt einen Anstieg des Diffusionskoeffizienten für Q -Werte, die kleiner sind, als die Position des Korrelationspeaks im Strukturfaktor. Kollektive Diffusion der Probenlösung bedeutet eine geringe osmotische Kompressibilität des Systems, was schließlich zu einer verstärkten Relaxation der Dichte- oder Konzentrationsfluktuationen führt. Demgegenüber konnte das Ausbleiben der kollektiven Diffusion für eine Insulinlösung in Anwesenheit von 100 mM NaCl bei einem pD-Wert von 2.4 sowohl bei 25 °C als auch bei 45 °C gefunden werden. Das Salz schirmt die Coulomb-Wechselwirkungen der positiv geladenen Insulinmoleküle ab. Hierdurch wird die Aggregation und Fibrillenbildung gefördert.

Zusätzlich wurde der zeitabhängige Verlauf des Diffusionskoeffizienten D während der Fibrillenbildung von Insulin bei einer Temperatur von 45 °C und einem pD-Wert von 2 mittels NSE-Spektroskopie für verschiedene Streuvektorbeträge detektiert. Der entsprechende zeitliche Verlauf der Strukturänderungen des Insulins bzw. der entstehenden Amyloidfibrillen konnte durch fluoreszenzspektroskopische Messungen und Röntgen-

Kleinwinkelstreuexperimente aufgezeigt werden. Die zeitliche Abnahme des Diffusionskoeffizienten steht im Einklang mit dem Anwachsen der Insulinaggregate während der Fibrillenbildung. Interessanterweise ist diese Abnahme des Diffusionskoeffizienten unabhängig von der betrachteten Längenskala, das heißt, die Insulinmoleküle diffundieren unabhängig als starre Teilchen durch die Lösung.

In einem weiteren Projekt wurde die temperatur- und druckinduzierte Entfaltung des Proteins *Staphylokokken-Nuklease* (SNase) mittels FT-IR-Spektroskopie in Anwesenheit und Abwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) sowie in der „self-crowding“-Situation (SNase 15 Gew.-%) bei pD 5.5 untersucht. Zusätzliche thermodynamische Parameter des Proteins wurden aus kalorimetrischen Messungen bestimmt. Die resultierenden Ergebnisse ermöglichten die Etablierung eines p, T -Stabilitätsdiagramm von SNase für die zuvor genannten Konditionen (Abbildung 4.29). Es wird deutlich, dass eine hochkonzentrierte Makromoleküllösung zu einer deutlich erhöhten Proteinstabilität führt; so steigt die Entfaltungstemperatur T_m einer 3 gew.-%igen SNase-Lösung um 1.4 °C (FT-IR) bzw. einer 0.3 gew.-%igen SNase-Lösung um 4 °C (DSC) und der Entfaltungsdruck p_u um ungefähr 1.8 kbar im untersuchten Temperaturbereich zwischen 5 °C und 50 °C. Eine Stabilisierung des Proteins gegenüber der druckinduzierten Entfaltung um 0.8 kbar konnte für die „self-crowding“-Bedingung gefunden werden. Ein Einfluss des makromolekularen Crowders auf den prozentualen Anteil der jeweiligen Sekundärstrukturelemente des Proteins konnte hingegen nicht festgestellt werden.

Im Allgemeinen wird der Effekt makromolekularer Crowder auf Proteine häufig durch die Reduzierung des verfügbaren Volumens beschrieben (Ausschlussvolumen). Da der gefaltete Zustand kompakter als der entfaltete Zustand eines Proteins ist, führt die Hinzugabe von inerten Makromolekülen zu einer Stabilisierung des gefalteten Zustands. Eine Stabilisierung des Proteins tritt bereits auf, wenn etwa 10 Vol.-% ($\phi_C = 0.1$) der Lösung mit Makromolekülen besetzt sind. Mit steigender Konzentration steigt der Grad der Stabilisierung. Erste theoretische Berechnungen zur Beschreibung des makromolekularen Crowding wurden von Zhou et al.^[33,34] durchgeführt. Diese Berechnungen behandeln ausschließlich das Ausschlussvolumen durch Makromoleküle, also entropi-

sche Beiträge, und vernachlässigen jegliche enthalpischen Beiträge. Die Stabilisierung von SNase in einer 30 gew.-%igen Ficolllösung ($\phi_C = 0.29$) wurde nach diesem Modell zu $+0.65 k_B T$ berechnet und der Effekt des „self-crowdings“ einer 15 gew.-%igen SNase-Lösung ($\phi_C = 0.1$) mit $+0.52 k_B T$. Während gefaltete Proteine aufgrund ihrer kompakten Form nur in den Hohlräumen des porösen Netzwerks des makromolekularen Crowders Platz finden, die größer sind als das Protein selbst, können sich entfaltete Proteine auch in kleineren Hohlräumen befinden. Gleichzeitig jedoch werden die realisierbaren Konformationen der Polypeptidketten in Anwesenheit des makromolekularen Crowders verringert. Mit steigender Konzentration an Makromolekülen steigt der Beitrag des zweitgenannten Effekts schneller als der Beitrag des erstgenannten und dies führt zu einem Minimum in $\Delta\Delta G_f(\phi_C)$, also zu einer maximalen Stabilisierung des nativen Proteins.

Zusätzlich wurden die Phasengrenzlinien des p, T -Stabilitätsdiagramm des Proteins in Anwesenheit und Abwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) auf Basis von thermodynamischen Variablen berechnet. Aufgrund der vielen verwendeten Parameter und deren Fehlergrenzen bzgl. der Temperatur- und Druckabhängigkeit dürfen die resultierenden Daten nicht als quantitativ angesehen werden. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die Kontur der Phasengrenze in Anwesenheit des makromolekularen Crowders stark durch die temperaturabhängige Volumenänderung der Proteinfaltung beeinflusst wird. Die Volumenänderung der Proteinfaltung in Anwesenheit und Abwesenheit des makromolekularen Crowders ist dennoch bei gleicher Temperatur innerhalb des experimentellen Fehlers gleich.

Neben den statischen Messungen wurde auch die drucksprunginduzierte Faltungskinetik des Proteins SNase bei verschiedenen Temperaturen in Anwesenheit und Abwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) mittels FT-IR-Spektroskopie untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine Faltungsgeschwindigkeit des Proteins, die um einen Faktor 4 in Anwesenheit des makromolekularen Crowders kleiner ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Mikroviskosität des Lösungsmittels einen entscheidenden Einfluss auf die verlangsamte Faltungskinetik hat und den Beitrag des Ausschlussvolumens, der alleine eine Zunahme der Faltungsgeschwindigkeit bewirken würde, kompensiert und sogar übersteigt. Eine Änderung der Mikroviskosität ist gleich-

bedeutend mit einer Änderung des Reibungswiderstands in unmittelbaren Nachbarschaft der Faltungsdomäne. Die Porengröße des makromolekularen Crowdernetzwerks definiert das Maß der Störung der zugrundeliegenden Dynamik der Polypeptidketten. So benötigt die Faltung eines β -Faltblattes eine relativ großräumige und nicht-lokale Polypeptidkettendiffusion, was eine geringe Porengröße, wie sie eine 30 gew.-%ige Ficollösung aufweist, verhindert. Die Faltung von α -Helices ist hingegen unabhängig von der Porengröße, da nur lokale Umorientierungen eine Rolle spielen.^[167] Die Faltungsgeschwindigkeit des $\alpha\beta$ -Proteins SNase kann somit auch über die Porengröße des makromolekularen Crowdernetzwerks gesteuert werden. Die Verwendung von makromolekularen Crowdern mit geringer molarer Masse, wie Glukose oder Xylose, weist jedoch auch bei hohen Konzentrationen ein anderes Verhalten auf.^[169] Die temperaturabhängige Änderung der Faltungskinetik des Proteins in Anwesenheit und Abwesenheit des makromolekularen Crowderns Ficoll PM 70 (30 Gew.-%) kann ausschließlich über die Abnahme der dynamischen Viskosität von Wasser erklärt werden.

Im dritten Projekt konnte erstmals mit zwei oberflächensensitiven Methoden, der Neutronenreflektometrie und der internen Totalreflexionsfluoreszenzspektroskopie, der Einfluss von doppelt-lipidierten Ras-Proteinen auf die Struktur einer Lipiddoppelschicht unter hydrostatischen Drücken bis 2000 bar bei 25 °C gezeigt werden. Hierbei wurde das Protein N-Ras mit zwei Ankermotiven, einem Hexadecyl (HD)- und einem Farnesyl (Far)-Rest, in der nicht-hydrolysierbaren, aktiven Form (GppNHp) verwendet. Die Inkorporation erfolgte in eine DOPC-Lipiddoppelschicht, die bei 25 °C in der fluiden Phase vorliegt und auf einem festen Trägermaterial (Silizium und Quarz) adsorbiert war. Die Lipiddoppelschicht wurde vor der Zugabe des Proteins durch druckabhängige Messungen charakterisiert. Hierbei konnte mit beiden Messmethoden gezeigt werden, dass die Druckapplikation zu einer dichteren Packung der Lipiddoppelschicht und somit zu einer schärfer ausgeprägten polar/unpolar-Grenzschicht führt. Dieser Trend ist eindeutig im druckabhängigen Streulängendichteprofil und in der druckabhängigen Zunahme des *GP*-Wertes zuerkennen. Eine anschließende Druckentlastung des Systems führt wieder zum Ausgangszustand, so dass das druckabhängige Verhalten der Lipiddoppelschicht als reversibel angenommen werden kann. Nach Zugabe des Prote-

ins N-Ras HD/Far ($c = 0.01 \text{ mg mL}^{-1}$) zeigte sich eine erhöhte Streulängendichte im Kopfgruppenbereich (NR) und eine leichte Zunahme des GP -Wertes (TIRF) aufgrund des Einbaus der Ankerketten in die Lipiddoppelschicht. Zudem konnte durch den Einbau des Proteins, in den TIRF-spektroskopischen Untersuchungen ein Resonanzenergietransfer (FRET) gemessen werden, wenn sowohl das Protein als auch die Lipiddoppelschicht mit den extrinsischen Fluorophoren BODIPY und LAURDAN markiert waren. Die Erhöhung der Planarität und Packungsdichte der Lipiddoppelschicht mit steigendem Druck wird in Anwesenheit der doppelt-lipidierten Ras-Proteine verstärkt. Die TIRF-Messungen mit BODIPY-markiertem N-Ras HD/Far konnten zeigen, dass der Adsorptionsgrad über den gesamten Druckbereich bis 2 kbar konstant bleibt.

Weiterhin wurde die Struktur der Lipidmembran von Archaeen erforscht. Die polare Lipidfraktion E (engl.: polar lipid fraction E; PLFE) enthält den größten Anteil an bipolaren Tetraetherlipiden in dem thermoacidophilen Archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. Die PLFE ist eine Mischung aus ~90 % Glycerol-dialkyl-nonitol-tetraether (GDNT) und ~10 % Glycerol-dialkyl-glyceryl-tetraether (GDGT). Um neue Erkenntnisse über die außergewöhnliche Struktur der PLFE-Lipidmembranen zu erlangen, wurde in diesem Teil der Arbeit der Einfluss von hohen hydrostatischen Drücken auf die Membrandicke, die Rauigkeit und die Streulängendichte einer PLFE-Lipidmembran untersucht. Mithilfe der Neutronenreflektometrie wurden diese Eigenschaften der an einer Siliziumoberfläche gespreiteten PLFE-Lipidmembran bei 25 °C und 50 bar bzw. 55 °C und Drücken bis 1800 bar detektiert. Die Auswertung der Neutronenreflektometriekurve der PLFE-Lipidmembran ($T_g = 80 \text{ °C}$) bei 25 °C und 50 bar ergab eine Schichtdicke von 51 Å, in guter Übereinstimmung mit dem mittels Rasterkraftmikroskopie gefundenen Wert von 50 Å. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Wasserschicht zwischen Siliziumoberfläche und PLFE-Lipidmembran nur ein paar Ångström dick sein kann. Eine Erhöhung der Temperatur auf 55 °C führt zu einer Abnahme der Neutronenstreulängendichte und zu einer leichten Zunahme der Rauigkeit der Lipid/Wasser-Grenzfläche. Dies ist gleichbedeutend mit einer Änderung des Hydratisierungsgrads der Kopfgruppe und einer Umorientierung der Alkylketten, was einen Phasenübergang in eine fluidere Phase andeutet. Eine sukzessive Druckerhöhung bei 55 °C weist keine signifikanten Verän-

derungen der PLFE-Lipidmembran auf. Dieses Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit den, in der Gesamtstudie gefunden, kleinen Werten der Kompressibilität.^[177] Kombiniert mit den Ergebnissen der Gesamtstudie^[177] ermöglichen die erhaltenen Daten ein tiefer gehendes Verständnis der rigiden, dicht-gepackten Struktur und der außerordentlichen thermischen Stabilität der PLFE-Lipidmembran. Des Weiteren ergab die Studie neue Einblicke in den Mechanismus, wie Zellmembranen unter extremen Bedingungen, wie beispielsweise hohen Temperaturen oder Drücken, existieren können.

Der letzte Teil dieser Arbeit gewährt einen ersten Einblick in den Einfluss hydrostatischer Drücke bis 2000 bar bei verschiedenen Temperaturen auf das Phasenverhalten von Triacylglycerolen in Kakaobutter. Die Untersuchungen wurden mittels Röntgen-Klein- und Weitwinkelstreuung durchgeführt. Zur Charakterisierung der sechs möglichen Kristallphasen wurden die Bragg-Reflexe mithilfe von Literaturdaten der entsprechenden Kristallphase zugeordnet. Nach dem Aufschmelzen der Kakaobutter bei 50 °C erfolgte die anschließende Kristallisation bei ungefähr 7 °C. Zuerst wurde der Einfluss unterschiedlicher Kristallisationszeiten getestet. Hierbei zeigte sich, dass das gewählte Abkühlprofil selbst nach 48 h Kristallisationszeit keine reine Kristallphase V bei 20 °C liefert. In temperaturabhängigen Messungen konnte nachgewiesen werden, dass ab einer Temperatur von 30 °C Kristallphase V in reiner Form vorliegt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Schmelzpunkt von Kristallphase IV bei ungefähr 26 ± 1.5 °C liegt (siehe Tabelle 4.5). Eine erneute Abkühlung der Probe auf Raumtemperatur würde die gewünschte reine Kristallphase V in einem lagerfähigen Zustand erzeugen. Diese Art der Wärmebehandlung (Aufschmelzen → Kristallisation bei tiefen Temperaturen → Ausbildung instabiler Kristallphasen (II oder III) → Aufheizen bis oberhalb der Schmelztemperatur der Kristallphase IV → Abkühlung der reinen Kristallphase V auf Raumtemperatur) wird als „tempering“ bezeichnet und momentan in der Lebensmittelindustrie zur Schokoladenherstellung angewendet. Der physikalische Parameter Druck wurde in dieser Studie zum ersten Mal auf Kakaobutter angewendet. Die Applikation von hydrostatischen Drücken bis 2000 bar auf bereits auskristallisierte Kakaobutter zeigte keinen großen Einfluss auf den Polymorphismus. Dennoch konnte gezeigt werden, dass zum einen der Einfluss des Drucks umso geringer war, je reiner die Kristallphase

vorlag, und zum anderen bewirkt Druck die Verschiebung des Kristallphasengleichgewichts auf die Seite der Kristallphase mit dem niedrigeren Schmelzpunkt. Von großer Bedeutung könnte das druckabhängige Verhalten der Kakaobutter bei Temperaturen knapp oberhalb der Flüssig/Kristallin-Phasengrenze sein. Hier konnte gezeigt werden, dass die Kakaobutter ab einem Druck von circa 1000 bar direkt aus der Schmelze in die instabile Kristallphase III mit kleinen Anteilen der Kristallphase II rekristallisiert. Eine weitere Druckerhöhung auf 2000 bar verschiebt das Kristallphasengleichgewicht auf die Seite der Kristallphase II. Interessanterweise wurden diese Kristallphasen direkt gebildet ohne vorherige Ausbildung der Kristallphase IV und V, obwohl die Schmelze aus der Kristallphase V erzeugt wurde. Jedoch sind alle druckinduzierten Veränderungen unter den untersuchten Bedingungen reversibel. Möglicherweise führt eine Verringerung der Temperatur knapp unterhalb des Schmelzpunkts der Kristallphase V bei konstant bleibendem Druck von ungefähr 2000 bar zu einer temporären Kristallisation der instabilen Kristallphase III, die nach Druckentlastung zeitnah in die Kristallphase V umkristallisiert. Somit stellt die Druckapplikation eine mögliche Alternative bei der Schokoladenherstellung dar. Die Lagerfähigkeit und somit die unerwünschte Kristallphasenumwandlung von V nach IV (das sogenannte „fat bloom“) nach der Herstellung der Kristallphase V durch Druckapplikation muss noch getestet werden.

6 Anhang

6.1 Strukturelle Charakterisierung des makromolekularen Crowders Dextran 70

Zusätzlich zur strukturellen Charakterisierung des makromolekularen Crowders Ficoll PM 70 wurde auch Dextran 70 mittels Röntgen-Kleinwinkelstreuung an der Beamline ID02 des Synchrotrons ESRF und der Beamline BW4 des Synchrotrons DESY untersucht. Abbildung 6.1 zeigt repräsentative Streukurven von Dextran 70 (1 Gew.-%) in Abhängigkeit des Drucks bei 25 °C. Die gezeigten Streukurven sind um den Streubeitrag des Lösungsmittels unter Berücksichtigung des spezifischen Volumens von Dextran 70 ($v = 0.620 \text{ mL g}^{-1}$ ^[180]) korrigiert. Das druckabhängige Verhalten des Gyrationradius im Bereich zwischen 1 bar und 2500 bar ist in Abbildung 6.2 für 25 °C und 57 °C gezeigt. Bei 25 °C und 1 bar beträgt der Gyrationradius für Dextran 70 4.77 ± 0.2 nm und bei 57 °C und 1 bar 4.80 ± 0.2 nm. Unter der Annahme eines kugelförmigen Teilchens entspricht der gemessene Gyrationradius von 4.77 nm bei 25 °C einem Teilchenradius von 6.16 nm.

Der druckabhängige Verlauf des Gyrationradius bei 25 °C macht deutlich, dass Dextran 70 ab einem Druck von circa 1900 bar leicht durch das Eindringen von Wasser aufquillt. Dieser Effekt wird ab circa 2300 bar durch den applizierten Druck aufgehoben. Bei einer Erhöhung der Temperatur auf 57 °C quillt das Crowdermolekül bereits ab einem Druck von 1100 bar auf. Ab 2000 bar wird dieser Effekt wieder aufgehoben. Der stark verringerte Gyrationradius ab ungefähr 2400 bar ist auf einen Kollaps des Crowdermoleküls zurückzuführen.

Die Kratky-Auftragung des makromolekularen Crowders Dextran 70 mit einer Konzen-

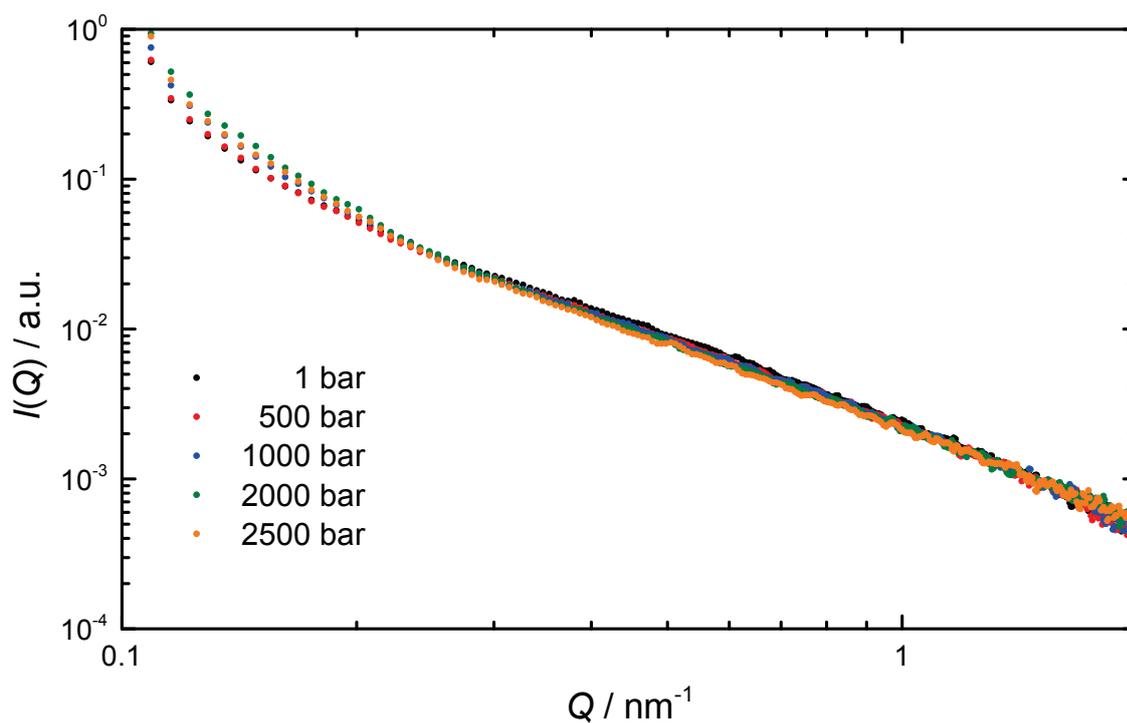


Abbildung 6.1: Repräsentative Röntgen-Kleinwinkelstreuukurven von Dextran 70 (1 Gew.-%) in Abhängigkeit des Drucks bei 25 °C.

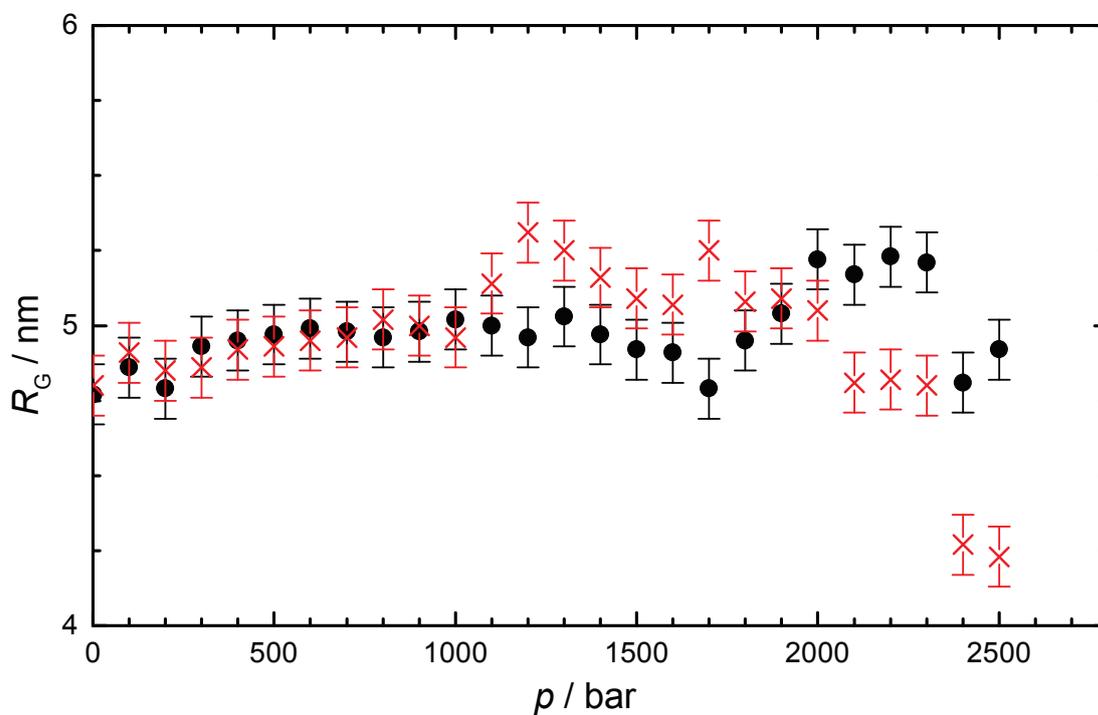


Abbildung 6.2: Gyrationradius R_G von Dextran 70 (1 Gew.-%) im Druckbereich zwischen 1 bar und 2500 bar bei 25 °C (●) und bei 57 °C (×).

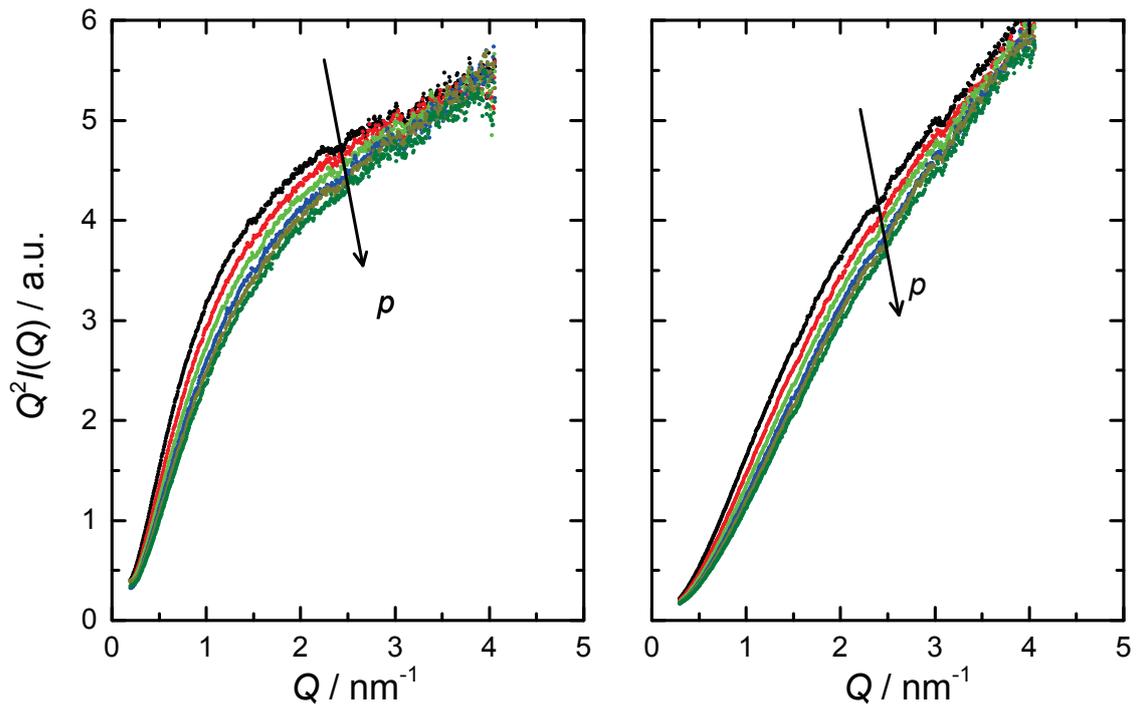


Abbildung 6.3: Kratky-Auftragung des makromolekularen Crowders Dextran 70 mit einer Konzentration von 15 Gew.-% (links) und 30 Gew.-% (rechts). Der Effekt der Druckapplikation (von 1 bar bis 2500 bar) auf die Streukurven wird durch den schwarzen Pfeil verdeutlicht.

tration von 15 Gew.-% (links) und 30 Gew.-% (rechts) ist in Abbildung 6.3 dargestellt. Wie bereits für Ficoll PM 70 erläutert, resultieren aus dem Kratky-Plot globale Informationen über die Netzwerkstruktur von Polymeren oder polymer-ähnlichen Molekülen. Im Gegensatz zu Ficoll PM 70 weist Dextran 70 bereits bei einer Konzentration von 15 Gew.-% eine stark verknäulte Netzwerkstruktur auf, die durch Druckapplikation oder Konzentrationserhöhung noch weiter verstärkt wird.

Ebenso wie Ficoll PM 70 kann auch Dextran 70 als inerter makromolekularer Crowder verwendet werden, um die hochkonzentrierte Lösung innerhalb einer biologischen Zelle, sowohl bei hohen Temperaturen als auch bei hohen Drücken, zu imitieren. Insgesamt sind die gefundenen strukturellen Veränderung von Dextran 70 unter Drücken bis 2500 bar vernachlässigbar klein.

6.2 Temperatur- und Druckstabilität von mizellarem Dodecylphosphocholin

Ungefähr 30 % aller natürlich vorkommenden Proteine sind in Zellmembranen eingelagert und spielen eine entscheidende Rolle bei zellulären Funktionen, wie beispielsweise der Signalweiterleitung oder dem Transport von Proteinen oder Ionen durch die Zellmembran.^[181,182] Trotz ihrer enormen Bedeutung sind nur weniger als 1 % der Strukturen aller Membranproteine bekannt.^[182] Die richtige Wahl des Detergens, das zum einen die native Lipiddoppelschicht imitiert und zum anderen das Protein in der nativen Form stabilisiert, stellt ein großes Problem bei der Aufklärung der Struktur von Membranproteinen dar. Kleine amphiphile Moleküle werden als Detergenzien verwendet, um Membranproteine zu lösen und dessen Struktur und Funktion zu untersuchen. Im Gegensatz zu Phospholipiden bilden Detergenzien mizellare Strukturen, die je nach chemischer Struktur in Form und Größe variieren. Es wurde bereits eine Vielzahl von Detergenzien getestet, um optimale Bedingungen für ein hochqualitatives Kernspinresonanzspektrum (engl.: Nuclear Magnetic Resonance; NMR) zu erhalten. Das Detergenz Dodecylphosphocholin (DPC oder FC-12; siehe Abbildung 6.4) ist ein geeigneter Kandidat zur Untersuchung von Membranproteinen mittels NMR. L. Columbus et al. konnten zeigen, dass die Mizellendimension perfekt mit der hydrophoben Oberfläche des Proteins übereinstimmt. Hierdurch werden Austauschprozesse verhindert, die die Vollständigkeit eines NMR-Spektrums reduzieren.^[182] DPC ist ein Phosphocholin mit einer Alkylkette aus 12 Kohlenstoffatomen und bildet aufgrund des Packungsparameters μ ab einer Konzentration von 1.1 mM (kritische Mizellenkonzentration; cmc) Mizellen in wässriger Lösung aus.

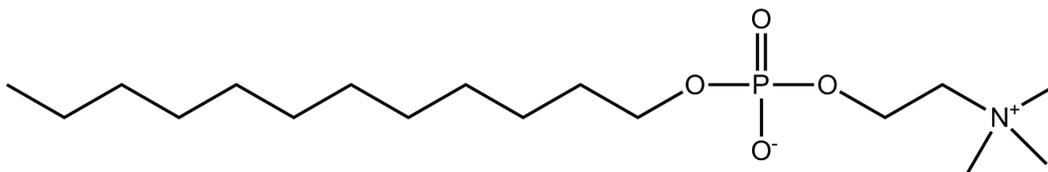


Abbildung 6.4: Strukturformel des verwendeten Dodecylphosphocholins.

Dodecylphosphocholin wurde von der Firma Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, Al, USA) und Magnesiumchlorid (MgCl_2) von der Firma Sigma-Aldrich (Schnellendorf,

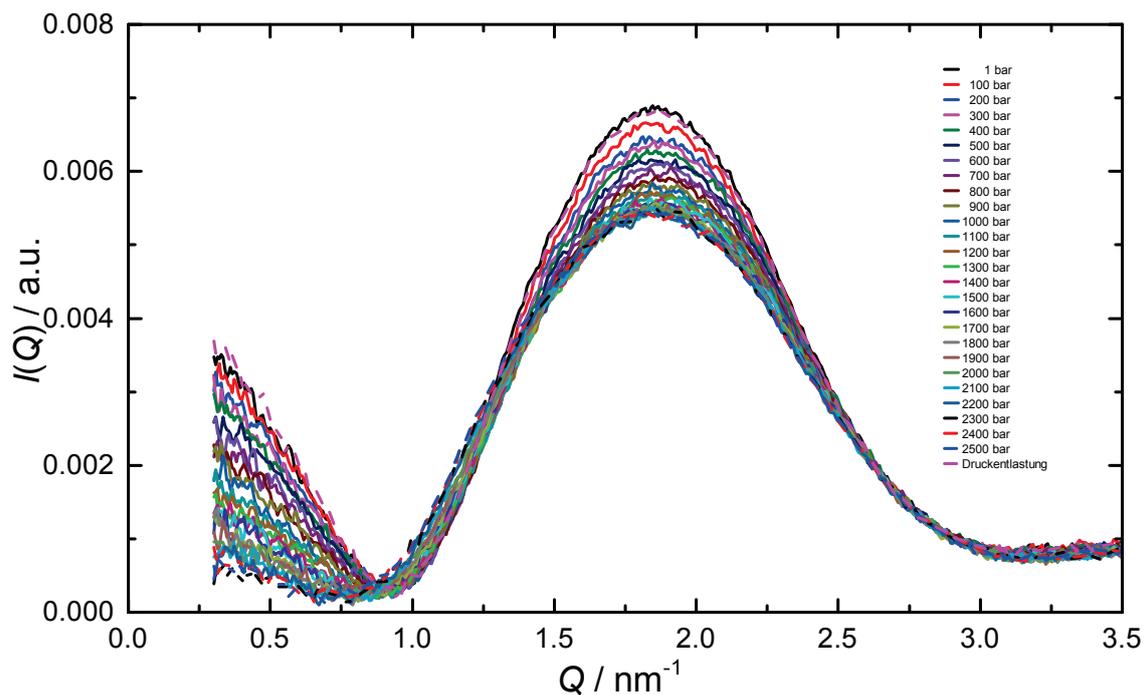


Abbildung 6.5: Druckabhängige Röntgen-Kleinwinkelstreu曲ven von mizellarem Dodecylphosphocholin ($c = 250 \text{ mM}$) bei $10 \text{ }^\circ\text{C}$ und einem Druckbereich zwischen 1 bar und 2500 bar (Schrittweite 100 bar). Zusätzlich wird die Streukurve nach Druckentlastung dargestellt.

Deutschland) erworben und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Die gewünschten Konzentrationen von 100 mM und 250 mM wurden durch Einwaage und anschließende Zugabe der entsprechenden Wasser- und Magnesiumchloridmenge erreicht. Vor der Messung wurde die Probe intensiv homogenisiert.

Die temperatur- und druckabhängige Strukturuntersuchung von mizellarem DPC wurde mittels Röntgen-Kleinwinkelstreuung an der Beamline ID02 des Synchrotrons ESRF durchgeführt. Die Abbildungen 6.5 bis 6.8 zeigen die Röntgen-Kleinwinkelstreu曲ven der Mizelle ($c = 250 \text{ mM}$) bei 10, 20, 30 und $40 \text{ }^\circ\text{C}$ in einem Druckbereich von 1 bar bis 2500 bar (Schrittweite 100 bar). Zusätzlich wird jeweils die Streukurve nach der Druckentlastung dargestellt, um die Reversibilität der Strukturänderung durch Druck zu überprüfen.

Aus einer konzentrationsabhängigen SAXS-Studie von J. Lipfert ist bekannt, dass DPC eine gestreckte, ellipsoide Form annimmt. Die Dimensionen des hydrophoben Kerns betragen $a = 2.55 - 2.75 \text{ nm}$ und $b = 1.60 - 1.65 \text{ nm}$. Die Dicke der Kopfgrup-

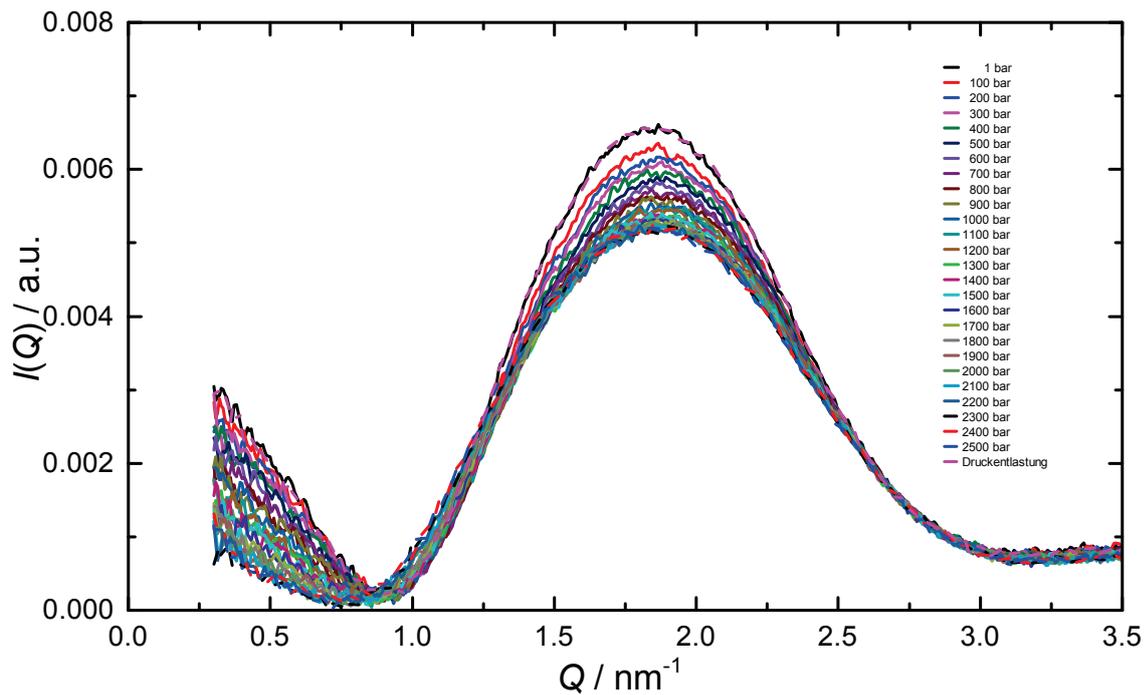


Abbildung 6.6: Druckabhängige Röntgen-Kleinwinkelstreu曲ven von mizellarem Dodecylphosphocholin ($c = 250 \text{ mM}$) bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ und einem Druckbereich zwischen 1 bar und 2500 bar (Schrittweite 100 bar). Zusätzlich wird die Streukurve nach Druckentlastung dargestellt.

pe $t_{a/b}$ beträgt circa $0.26 - 0.30 \text{ nm}$.^[183] Des Weiteren konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Q -Position des zweiten Maximums in der Streuintensität eine direkte Bestimmung des Durchmessers einer Mizelle von Kopfgruppe zu Kopfgruppe erlaubt. Bei einer elongierten Mizelle existieren zwei mögliche Abstände zwischen den Kopfgruppen, die zum einen entlang der Halbachse a und zum anderen der Halbachse b verlaufen. Die Halbachse b weist hierbei die kurze Dimension auf. Statistisch werden mehr Monomere über die Halbachse b angeordnet, so dass dies der dominante Abstand in der Streuintensität ist. Der Abstand von Schwerpunkt zu Schwerpunkt der Kopfgruppen entlang der kürzeren Dimension der Mizelle beträgt ungefähr $d = 2b + t_b$ für ein gestrecktes Ellipsoid. Dieser berechnete Abstand d beträgt für die Mizelle DPC ungefähr 3.5 nm . Die experimentellen Daten im Temperaturbereich von 10 bis $40 \text{ }^\circ\text{C}$ bei 1 bar weisen das zweite Maximum bei einem Q -Wert von ungefähr 1.87 nm^{-1} auf. Somit kann der Abstand d näherungsweise über die Beziehung $d = 2\pi/Q_{\text{max}}$ zu 3.4 nm bestimmt werden. Die Druckapplikation bis 2500 bar führt nur zu einer sehr kleinen Veränderung

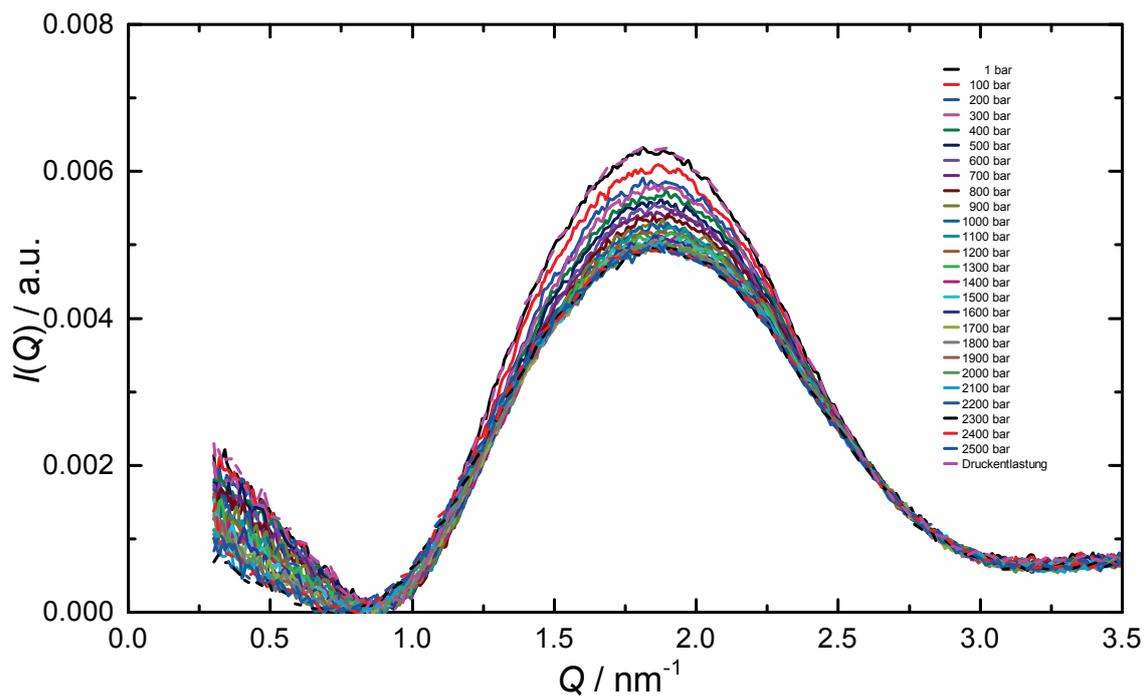


Abbildung 6.7: Druckabhängige Röntgen-Kleinwinkelstreu曲ven von mizellarem Dodecylphosphocholin ($c = 250 \text{ mM}$) bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ und einem Druckbereich zwischen 1 bar und 2500 bar (Schrittweite 100 bar). Zusätzlich wird die Streu曲ve nach Druckentlastung dargestellt.

der Position des zweiten Maximums. Der Q -Wert beträgt für einen Druck von 2500 bar ungefähr 1.90 nm^{-1} , was einem Abstand d von ungefähr 3.3 nm entspricht. Insgesamt führt Druck nur zu einer vernachlässigbaren Kompression der Mizelle, die nach Druckentlastung reversibel ist. Die verringerte Streuintensität mit steigendem Druck muss auf die veränderte Schichtdicke des Probenvolumens zurückgeführt werden. Der Einfluss der Monomerkonzentration sowie die Zugabe von 5 mM Magnesiumchlorid auf die Mizellenbildung ist in Abbildung 6.9 dargestellt. Der unveränderte Q -Wert für das zweite Maximum der Streuintensität für 100 mM DPC im Vergleich zu 250 mM verdeutlicht, dass die Konzentration keinen Einfluss auf die Größe der Mizellen hat. Des Weiteren führt auch die Zugabe von 5 mM im Rahmen des Fehlers zu keiner Änderung in der Streu曲ve.

Insgesamt konnte die durchgeführte temperatur- und druckabhängige Strukturuntersuchung von mizellarem Dodecylphosphocholin bekräftigen, dass dieser Mizellentyp ein geeigneter Kandidat für NMR-Studien von Membranproteinen ist. Die Mizelle weist

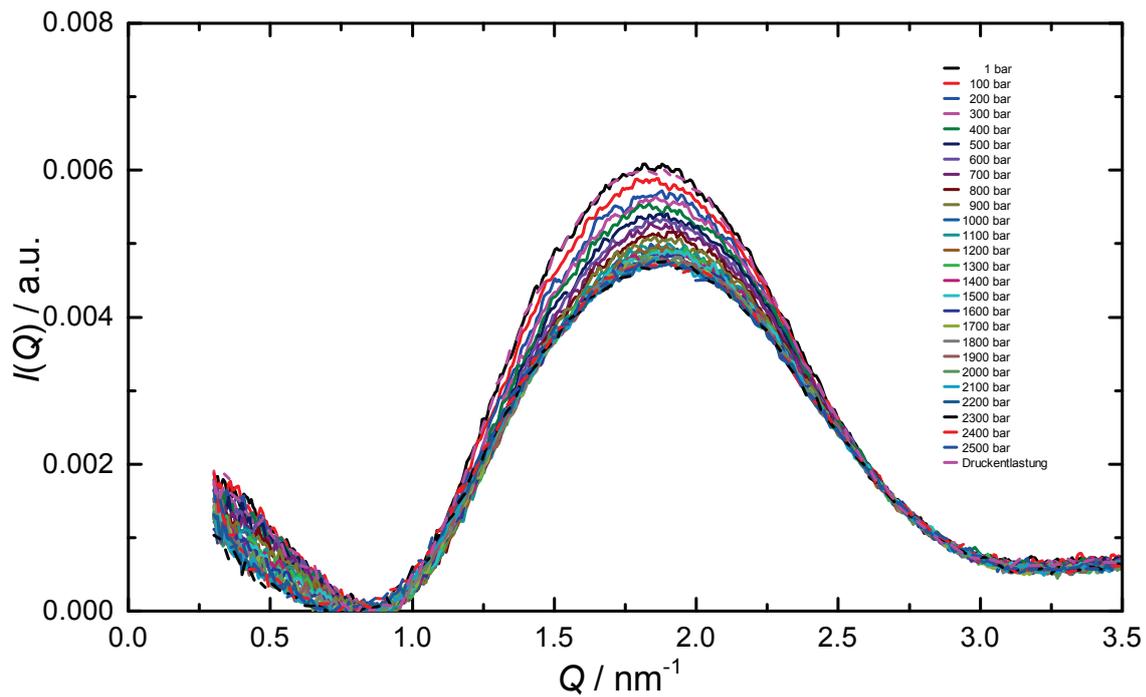


Abbildung 6.8: Druckabhängige Röntgen-Kleinwinkelstreu曲ven von mizellarem Dodecylphosphocholin ($c = 250 \text{ mM}$) bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ und einem Druckbereich zwischen 1 bar und 2500 bar (Schrittweite 100 bar). Zusätzlich wird die Streukurve nach Druckentlastung dargestellt.

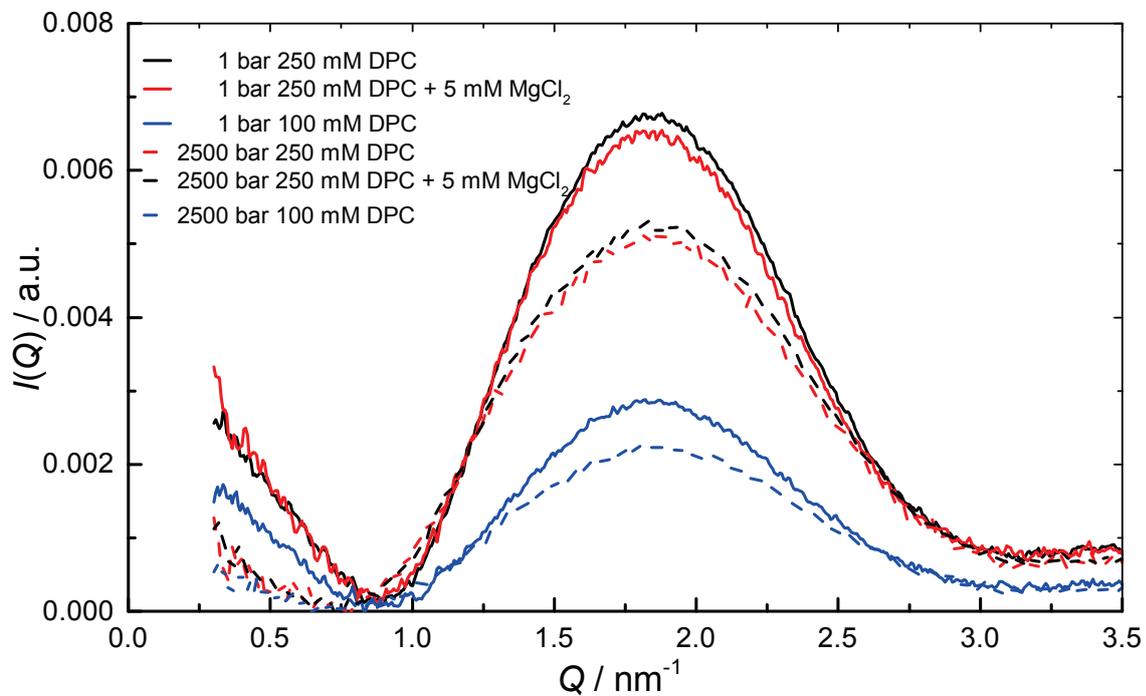


Abbildung 6.9: Vergleich der druckabhängigen Röntgen-Kleinwinkelstreu曲ven von mizellarem Dodecylphosphocholin bei einer Konzentration von 100 bzw. 250 mM sowie nach Zugabe von 5 mM Magnesiumchlorid bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

keine signifikante Strukturveränderung im untersuchten Temperatur- und Druckbereich von 10 bis 40 °C bzw. 1 bar bis 2500 bar auf. Auch eine Konzentrationsänderung bzw. die Zugabe von kleinen Mengen Salz führen nicht zu einer Strukturumwandlung. Somit kann DPC in zukünftigen Hochdruck-NMR-Studien problemlos verwendet werden.

Literaturverzeichnis

- [1] F. Chiti, C. M. Dobson, *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 333–366.
- [2] K. E. Marshall, L. C. Serpell, *Soft Matter* **2010**, *6*(10), 2110–2114.
- [3] O. G. Jones, R. Mezzenga, *Soft Matter* **2012**, *8*(4), 876–895.
- [4] W. Dzwolak, R. Ravindra, C. Nicolini, R. Jansen, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*(12), 3762–8768.
- [5] C. M. Dobson, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2004**, *15*(1), 3–16.
- [6] M. Goedert, *Nat. Rev. Neurosci.* **2001**, *2*(7), 492–501.
- [7] P. Westermark, *FEBS J.* **2005**, *272*(23), 5942–5949.
- [8] J. Seeliger, F. Evers, C. Jeworrek, S. Kapoor, K. Weise, E. Andreetto, M. Tolan, A. Kapurniotu, R. Winter, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*(3), 6796–83.
- [9] J. L. Jiménez, E. J. Nettleton, M. Bouchard, C. V. Robinson, C. M. Dobson, H. R. Saibil, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*(14), 9196–9201.
- [10] R. Jansen, W. Dzwolak, R. Winter, *Biophys. J.* **2005**, *88*(2), 1344–1353.
- [11] A. Nayak, M. Sorci, S. Krueger, G. Belfort, *Proteins* **2009**, *74*(3), 556–565.
- [12] V. Foderà, S. Cataldo, F. Librizzi, B. Pignataro, P. Spiccia, M. Leone, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*(31), 10830–10837.
- [13] V. Foderà, M. van de Weert, B. Vestergaard, *Soft Matter* **2010**, *6*(18), 4413–4419.

- [14] L. F. Pease III, M. Sorci, S. Guha, D.-H. Tsai, M. R. Zachariah, M. J. Tarlov, G. Belfort, *Biophys. J.* **2010**, *99*(12), 3979–3985.
- [15] G. Dodson, D. Steiner, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 189–194.
- [16] J. S. Pedersen, S. Hansen, R. Bauer, *Eur. Biophys. J.* **1994**, *22*(6), 379–389.
- [17] J. Brange, L. Andersen, E. D. Laursen, G. Meyn, E. Rasmussen, *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*(5), 517–525.
- [18] V. Sluzky, J. A. Tamada, A. M. Klibanov, R. Langer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*(21), 9377–9381.
- [19] L. Nielsen, R. Khurana, A. Coats, S. Frokjaer, J. Brange, S. Vyas, V. N. Uversky, A. L. Fink, *Biochemistry* **2001**, *40*(20), 6036–6046.
- [20] S. Grudzielanek, V. Smirnovas, R. Winter, *J. Mol. Biol.* **2006**, *356*(2), 497–509.
- [21] V. Smirnovas, R. Winter, *Biophys. J.* **2008**, *94*(8), 3241–3246.
- [22] M. I. Smith, V. Foderà, J. S. Sharp, C. J. Roberts, A. M. Donald, *Colloids Surfaces B* **2012**, *89*, 216–222.
- [23] J. L. Whittingham, D. J. Scott, K. Chance, A. Wilson, J. Finch, J. Brange, G. G. Dodson, *J. Mol. Biol.* **2002**, *318*(02), 479–490.
- [24] C. B. Anfinsen, *Science* **1973**, *181*(4096), 223–230.
- [25] K. A. Dill, H. S. Chan, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*(1), 10–19.
- [26] H. Frauenfelder, S. G. Sligar, P. G. Wolynes, *Science* **1991**, *254*, 1598–1603.
- [27] R. J. Ellis, *Trend Biochem. Sci.* **2001**, *26*(10), 597–604.
- [28] R. J. Ellis, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*(1), 114–119.
- [29] A. P. Minton, *Biophys. J.* **2005**, *88*(2), 971–985.
- [30] A. P. Minton, *J. Cell Sci.* **2006**, *119*(14), 2863–2869.
- [31] A. P. Minton, *Curr. Biol.* **2006**, *16*(8), R269–R271.

-
- [32] R. J. Ellis, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2007**, *594*, 1–13.
- [33] H.-X. Zhou, K. A. Dill, *Biochemistry* **2001**, *40*(38), 11289–11293.
- [34] H.-X. Zhou, *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *469*(1), 76–82.
- [35] R. Ravindra, S. Zhao, H. Gies, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*(39), 12224–12225.
- [36] S. Zhao, H. Gies, R. Winter, *Z. Phys. Chem.* **2007**, *221*(1), 139–154.
- [37] R. Winter, D. Lopes, S. Grudzielanek, K. Vogtt, *J. Non-Equilibrium Thermodyn.* **2007**, *32*(1), 41–97.
- [38] S. Wang, M. W. Tate, S. M. Gruner, *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1820*(7), 957–961.
- [39] Y. Zhai, R. Winter, *ChemPhysChem* **2013**, *14*(2), 386–393.
- [40] K. Akasaka, *Chem. Rev.* **2006**, *106*(5), 1814–1835.
- [41] I. Daniel, P. Oger, R. Winter, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*(10), 858–875.
- [42] K. Heremans, L. Smeller, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1386*(2), 353–370.
- [43] J. L. Silva, D. Foguel, C. A. Royer, *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*(10), 612–618.
- [44] R. Mishra, R. Winter, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*(35), 6518–6521.
- [45] S. Kapoor, G. Triola, I. R. Vetter, M. Erkkamp, H. Waldmann, R. Winter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*(2), 460–465.
- [46] G. Panick, R. Malessa, R. Winter, G. Rapp, K. J. Frye, C. A. Royer, *J. Mol. Biol.* **1998**, *275*(2), 389–402.
- [47] M. A. Schroer, J. Markgraf, D. C. F. Wieland, C. J. Sahle, J. Möller, M. Paulus, M. Tolan, R. Winter, *Phys. Rev. Lett.* **2011**, *106*(17), 178102.
- [48] M. A. Schroer, Y. Zhai, D. C. F. Wieland, C. J. Sahle, J. Nase, M. Paulus, M. Tolan, R. Winter, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *123*(48), 11615–11618.

- [49] M. G. Ortore, F. Spinozzi, P. Mariani, A. Paciaroni, L. R. S. Barbosa, H. Amenitsch, M. Steinhart, J. Ollivier, D. Russo, *J. R. Soc. Interface* **2009**, *6*, S619–S634.
- [50] K. Ruan, C. Xu, T. Li, J. Li, R. Lange, C. Balny, *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*(8), 1654–1661.
- [51] D. Russo, M. G. Ortore, F. Spinozzi, P. Mariani, C. Loupiac, B. Annighofer, A. Paciaroni, *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*(10), 4974–4980.
- [52] T. V. Chalikian, K. J. Breslauer, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*(5), 657–664.
- [53] L. R. S. Barbosa, M. G. Ortore, F. Spinozzi, P. Mariani, S. Bernstorff, R. Itri, *Biophys. J.* **2010**, *98*(1), 147–157.
- [54] H. Herberhold, C. A. Royer, R. Winter, *Biochemistry* **2004**, *43*(12), 3336–3345.
- [55] K. D. Collins, *Methods* **2004**, *34*(3), 300–311.
- [56] S. N. Timasheff, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*(15), 9721–9726.
- [57] T. R. Hyne, R. Fox, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1991**, *10*, 92–105.
- [58] K. Wennerberg, K. L. Rossman, C. J. Der, *J. Cell Sci.* **2005**, *118*(5), 843–846.
- [59] A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4192–4214.
- [60] K. Weise, G. Triola, L. Brunsveld, H. Waldmann, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*(4), 1557–1564.
- [61] Y.-X. Chen, S. Koch, K. Uhlenbrock, K. Weise, D. Das, L. Gremer, L. Brunsveld, A. Wittinghofer, R. Winter, G. Triola, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*(35), 6090–6095.
- [62] A. Vogel, G. Reuther, K. Weise, G. Triola, J. Nikolaus, K.-T. Tan, C. Nowak, A. Herrmann, H. Waldmann, R. Winter, D. Huster, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*(46), 8784–8787.

-
- [63] D. Abankwa, A. A. Gorfe, J. F. Hancock, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2007**, *18*(5), 599–607.
- [64] D. Abankwa, A. A. Gorfe, K. Inder, J. F. Hancock, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*(3), 1130–1135.
- [65] D. A. Zacharias, J. D. Violin, A. C. Newton, R. Y. Tsien, *Science* **2002**, *296*(5569), 913–916.
- [66] O. Rocks, A. Peyker, M. Kahms, P. J. Verveer, C. Koerner, M. Lumbierres, J. Kuhlmann, H. Waldmann, A. Wittinghofer, P. I. H. Bastiaens, *Science* **2005**, *307*(5716), 1746–1752.
- [67] K. Weise, S. Kapoor, C. Denter, J. Nikolaus, N. Opitz, S. Koch, G. Triola, A. Herrmann, H. Waldmann, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*(4), 880–887.
- [68] K. Simons, R. Ehehalt, *J. Clin. Invest.* **2002**, *110*(5), 597–603.
- [69] L. Rajendran, K. Simons, *J. Cell Sci.* **2005**, *118*(6), 1099–1102.
- [70] A. J. García-Sáez, S. Chiantia, P. Schwille, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*(46), 33537–33544.
- [71] P. I. Kuzmin, S. A. Akimov, Y. A. Chizmadzhev, J. Zimmerberg, F. S. Cohen, *Biophys. J.* **2005**, *88*(2), 1120–1133.
- [72] T. A. Langworthy, T. G. Tornabene, G. Holzer, *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, I. Abteilung, Originale, Angewandte und Ökologische Mikrobiologie* **1982**, *3*(2), 228–244.
- [73] S. L. Lo, E. L. Chang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *167*(28), 238–243.
- [74] M. De Rosa, A. Gambacorta, B. Nicolaus, B. Chappe, P. Albrecht, *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, *753*, 249–256.
- [75] E. L. Chang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *202*(2), 673–679.
- [76] L. Bagatolli, E. Gratton, T. K. Khan, P. L.-G. Chong, *Biophys. J.* **2000**, *79*(1), 416–425.

- [77] C. Jeworrek, F. Evers, M. Erilkamp, S. Grobelny, *Langmuir* **2011**, *27*(21), 13113–13121.
- [78] H. Komatsu, P. L.-G. Chong, *Biochemistry* **1998**, *37*(1), 107–115.
- [79] D. A. Brown, B. Venegas, P. H. Cooke, V. English, P. L.-G. Chong, *Chem. Phys. Lipids* **2009**, *159*, 95–103.
- [80] R. Kanichay, L. Boni, P. Cooke, T. Khan, P. L.-G. Chong, *Archaea* **2003**, *1*, 175–183.
- [81] P. L.-G. Chong, M. Zein, T. K. Khan, R. Winter, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 8694–8700.
- [82] P. L.-G. Chong, R. Ravindra, M. Khurana, V. English, R. Winter, *Biophys. J.* **2005**, *89*, 1841–1849.
- [83] C. Jeworrek, R. Steitz, C. Czeslik, R. Winter, *Rev. Sci. Instrum.* **2011**, *82*(2), 025106.
- [84] S. Paula, A. G. Volkov, A. N. Van Hoek, T. H. Haines, D. W. Deamer, *Biophys. J.* **1996**, *70*(1), 339–348.
- [85] M. E. Miquel, S. Carli, P. J. Couzens, H.-J. Wille, L. D. Hall, *Food Res. Int.* **2001**, *34*(9), 773–781.
- [86] S. Chaiseri, P. S. Dimick, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1989**, *11*(11), 1771–1776.
- [87] S. D. MacMillan, K. J. Roberts, A. Rossi, M. A. Wells, M. C. Polgreen, I. H. Smith, *Cryst. Growth Des.* **2002**, *2*(3), 221–226.
- [88] N. Lovegren, M. Gray, R. Feuge, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1976**, *53*, 83–88.
- [89] A. Langevelde, K. Malssen, R. Peschar, H. Schenk, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2001**, *78*(9), 919–925.
- [90] P. Lonchamp, R. W. Hartel, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2004**, *106*(4), 241–274.

-
- [91] G. M. Chapman, E. E. Akehurst, W. B. Wright, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1971**, *48*, 824–830.
- [92] K. Sato, *Chem. Eng. Sci.* **2001**, *56*(7), 2255–2265.
- [93] A. K. Covington, M. Paabo, R. A. Robinson, R. G. Bates, *Anal. Chem.* **1968**, *40*, 700–706.
- [94] C. A. Royer, A. P. Hinck, S. N. Loh, K. E. Prehoda, X. Peng, J. Jonas, J. L. Markley, *Biochemistry* **1993**, *32*(19), 5222–5232.
- [95] G. Panick, R. Winter, *Biochemistry* **2000**, *39*(7), 1862–1869.
- [96] R. Ravindra, R. Winter, *ChemPhysChem* **2003**, *4*(4), 359–365.
- [97] R. Ravindra, C. Royer, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6*, 1952–1961.
- [98] H. Seemann, R. Winter, C. A. Royer, *J. Mol. Biol.* **2001**, *307*(4), 1091–102.
- [99] L. Brunsveld, J. Kuhlmann, K. Alexandrov, A. Wittinghofer, R. S. Goody, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*(40), 6622–6646.
- [100] E. Nägele, M. Schelhaas, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*(28), 6889–6902.
- [101] B. W. König, S. Krueger, W. J. Orts, C. F. Majkrzak, N. F. Berk, J. V. Silverton, K. Gawrisch, *Langmuir* **1996**, *12*(5), 1343–1350.
- [102] H. P. Wacklin, R. K. Thomas, *Langmuir* **2007**, *23*(14), 7644–7651.
- [103] H. P. Wacklin, *Langmuir* **2011**, *27*(12), 7698–707.
- [104] Y. Kitamura, T. Itoh, *J. Solution Chem.* **1987**, *16*(9), 715–725.
- [105] S. L. Lo, C. E. Montague, E. L. Chang, *J. Lipid Res.* **1989**, *30*, 944–949.
- [106] T. P. Russell, *Phys. B Condens. Matter* **1996**, *221*(1-4), 267–283.
- [107] M. Tolan, W. Press, *Z. Kristallogr.* **1998**, *213*(6), 319–336.

- [108] J. Daillant, A. Gibaud, *X-ray and Neutron Reflectivity*, Bd. 770 von *Lecture Notes in Physics*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2009**.
- [109] R. Winter, F. Noll, C. Czeslik, *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, 2. Aufl., Vieweg+Teubner-Verlag, Wiesbaden, **2011**.
- [110] L. G. Parratt, *Phys. Rev.* **1954**, 95(2), 359–369.
- [111] R. A. Campbell, H. P. Wacklin, I. Sutton, R. Cubitt, G. Fragneto, *Eur. Phys. J. Plus* **2011**, 126(11), 107.
- [112] D. Richard, M. Ferrand, G. J. Kearley, *J. Neutron Res.* **1996**, 4(1), 33–39.
- [113] R. Kampmann, M. Haese-Seiller, V. Kudryashov, B. Nickel, C. Daniel, W. Fenzl, A. Schreyer, E. Sackmann, J. Rädler, *Phys. B Condens. Matter* **2006**, 385–386, 1161–1163.
- [114] A. Guinier, G. Fournet, *Small-Angle Scattering of X-Rays*, John Wiley & Sons, Inc., New York, **1955**.
- [115] O. Glatter, O. Kratky, *Small Angle X-Ray Scattering*, Academic Press, London, **1982**.
- [116] T. Zemb, P. Lindner, *Neutron, X-rays & Light*, Elsevier Science, Amsterdam, **2002**.
- [117] M. Engel, T. Spehr, B. Stühn, *Bunsen-Magazin* **2011**, 1, 4–15.
- [118] J. Woenckhaus, R. Köhling, R. Winter, P. Thiyagarajan, S. Finet, *Rev. Sci. Instrum.* **2000**, 71(10), 3895.
- [119] J. Kraineva, R. A. Narayanan, E. Kondrashkina, P. Thiyagarajan, R. Winter, *Langmuir* **2005**, 21(8), 3559–3571.
- [120] C. Krywka, C. Sternemann, M. Paulus, M. Tolan, C. Royer, R. Winter, *ChemPhysChem* **2008**, 9(18), 2809–2815.
- [121] J. Erbes, R. Winter, G. Rapp, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1996**, 100(10), 1713–1722.

-
- [122] T. Narayanan, O. Diat, P. Bösecke, *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. A Accel. Spectrometers, Detect. Assoc. Equip.* **2001**, 467-468, 1005–1009.
- [123] S. V. Roth, R. Döhrmann, M. Dommach, M. Kuhlmann, I. Kröger, R. Gehrke, H. Walter, C. Schroer, B. Lengeler, P. Müller-Buschbaum, *Rev. Sci. Instrum.* **2006**, 77(8), 085106.
- [124] A. P. Hammersley, S. O. Svensson, M. Hanfland, A. N. Fitch, D. Häusermann, *High Press. Res.* **1996**, 14(4-6), 235–248.
- [125] C. Krywka, C. Sternemann, M. Paulus, N. Javid, R. Winter, A. Al-Sawalmih, S. Yi, D. Raabe, M. Tolan, *J. Synchrotron Radiat.* **2007**, 14(Pt 3), 244–251.
- [126] G. David, J. Pérez, *J. Appl. Crystallogr.* **2009**, 42(5), 892–900.
- [127] G. Fritz, A. Bergmann, O. Glatter, *J. Chem. Phys.* **2000**, 113(21), 9733–9740.
- [128] F. Mezei, *Z. Phys.* **1972**, 255(2), 146–160.
- [129] N. Rosov, S. Rathgeber, M. Monkenbusch, *Scattering from Polymers*, Bd. 739 von *ACS Symposium Series*, (Hrsg.: P. Cebe, B. S. Hsiao, D. J. Lohse), American Chemical Society, Washington DC, **1999**, S. 103–116.
- [130] R. T. Azuah, L. R. Kneller, Y. Qui, C. M. Brown, J. R. D. Copley, R. M. Dimeo, *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* **2009**, 114(6), 341–358.
- [131] H. Günzler, H. M. Heise, *IR-Spektroskopie*, VCH-Verlag, Weinheim, **1996**.
- [132] A. Barth, *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, 1767, 1073–1101.
- [133] P. T. T. Wong, D. J. Moffat, *Appl. Spectrosc.* **1989**, 43(7), 1279–1281.
- [134] H. Mantsch, D. Moffatt, H. Casal, *J. Mol. Struct.* **1988**, 173, 285–298.
- [135] A. Savitzky, M. J. E. Golay, *Anal. Chem.* **1964**, 36(8), 1627–1639.
- [136] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3. Aufl., Springer-Verlag, **2006**.
- [137] H. Le Vine III, *Protein Sci.* **1993**, 2, 404–410.

- [138] D. Axelrod, T. P. Burghardt, N. L. Thompson, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1984**, (17), 247–268.
- [139] J. Koo, C. Czeslik, *Rev. Sci. Instrum.* **2012**, 83(8), 085109.
- [140] Y. Zhai, L. Okoro, A. Cooper, R. Winter, *Biophys. Chem.* **2011**, 156(1), 13–23.
- [141] M. Erlkamp, S. Grobelny, A. Faraone, C. Czeslik, R. Winter, *J. Phys. Chem. B* **2014**, 118(12), 3310–3316.
- [142] S. Longeville, W. Doster, G. Kali, *Chem. Phys.* **2003**, 292(2-3), 413–424.
- [143] G. Nägele, *Phys. Rep.* **1996**, 272, 215–372.
- [144] W. Dzwolak, S. Grudzielanek, V. Smirnovas, R. Ravindra, C. Nicolini, R. Jansen, A. Lokszejn, S. Porowski, R. Winter, *Biochemistry* **2005**, 44(25), 8948–8958.
- [145] O. Wintersteiner, H. A. Abramson, *J. Biol. Chem.* **1933**, 99, 741–753.
- [146] N. Javid, K. Vogtt, C. Krywka, M. Tolan, R. Winter, *Phys. Rev. Lett.* **2007**, 99(2), 028101.
- [147] P. De Gennes, *Physica* **1959**, 25(7-12), 825–839.
- [148] L. Porcar, P. Falus, W.-R. Chen, A. Faraone, E. Fratini, K. Hong, P. Baglioni, Y. Liu, *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, 1(1), 126–129.
- [149] Y. Liu, L. Porcar, J. Chen, W.-R. Chen, P. Falus, A. Faraone, E. Fratini, K. Hong, P. Baglioni, *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115(22), 7238–7247.
- [150] M. Erlkamp, S. Grobelny, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, 16(13), 5965–5976.
- [151] J. Hong, L. M. Gierasch, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132(30), 10445–10452.
- [152] D. I. Svergun, *J. Appl. Crystallogr.* **1992**, 25(4), 495–503.
- [153] A. V. Semenyuk, D. I. Svergun, *J. Appl. Crystallogr.* **1991**, 24(5), 537–540.

-
- [154] B. van den Berg, R. Wain, C. M. Dobson, R. J. Ellis, *EMBO J.* **2000**, *19*(15), 3870–3875.
- [155] E. Schuster, A. Cucheval, L. Ludin, M. A. K. Williams, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2583–2590.
- [156] J. E. Kohn, I. S. Millett, J. Jacob, B. Zagrovic, T. M. Dillon, N. Cingel, R. S. Dothager, S. Seifert, P. Thiyagarajan, T. R. Sosnick, M. Z. Hasan, V. S. Pande, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*(34), 12491–12496.
- [157] H.-X. Zhou, G. Rivas, A. P. Minton, *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 375–397.
- [158] R. Filfil, T. V. Chalikian, *J. Mol. Biol.* **2000**, *299*(3), 827–842.
- [159] C. A. Royer, R. Winter, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2011**, *16*(6), 568–571.
- [160] K. Sasahara, P. McPhie, A. P. Minton, *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*(4), 1227–1237.
- [161] K. J. Frye, C. A. Royer, *Protein Sci.* **1998**, *7*(10), 2217–2222.
- [162] J. Roche, M. Dellarole, J. A. Caro, D. R. Norberto, A. E. Garcia, B. Garcia-Moreno, C. Roumestand, C. A. Royer, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*(39), 14610–14618.
- [163] C. A. Royer, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1595*(1-2), 201–209.
- [164] S. J. Hagen, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2010**, *11*(5), 385–395.
- [165] A. Rauscher, I. Derényi, L. Gráf, A. Málnási-Csizmadia, *IUBMB Life* **2013**, *65*(1), 35–42.
- [166] H.-X. Zhou, S. Qin, *Biophys. Rev.* **2013**, *5*(2), 207–215.
- [167] S. Mukherjee, M. M. Waagele, P. Chowdhury, L. Guo, F. Gai, *J. Mol. Biol.* **2009**, *393*(1), 227–236.
- [168] J. Seeliger, A. Werkmüller, R. Winter, *PLoS One* **2013**, *8*(7), e69652.
- [169] K. J. Frye, C. A. Royer, *Protein Sci.* **1997**, *6*(4), 789–793.

- [170] R. Fernandez-Prini, A. H. Harvey, D. A. Palmer, *Aqueous Systems at Elevated Temperatures and Pressures*, Elsevier Science, **2004**.
- [171] F. Evers, R. Steitz, M. Tolan, C. Czeslik, *Langmuir* **2011**, 27(11), 6995–7001.
- [172] H. Kiessig, *Ann. Phys.* **1931**, 5(10), 769–788.
- [173] F. Bringezu, M. Majerowicz, S. Wen, G. Reuther, K.-T. Tan, J. Kuhlmann, H. Waldmann, D. Huster, *Eur. Biophys. J.* **2007**, 36(4-5), 491–498.
- [174] D. Huster, A. Vogel, C. Katzka, H. A. Scheidt, H. Binder, S. Dante, T. Gutberlet, O. Zschörnig, H. Waldmann, K. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125(14), 4070–4079.
- [175] L. A. Bagatolli, E. Gratton, *Biophys. J.* **2000**, 78(1), 290–305.
- [176] T. Parasassi, G. De Stasio, A. D’Ubaldo, E. Gratton, *Biophys. J.* **1990**, 57(6), 1179–1186.
- [177] Y. Zhai, P. L.-G. Chong, L. J.-A. Taylor, M. Erkkamp, S. Grobelny, C. Czeslik, E. Watkins, R. Winter, *Langmuir* **2012**, 28(11), 5211–5217.
- [178] J. L. Gabriel, P. L.-G. Chong, *Chem. Phys. Lipids* **2000**, 105(2), 193–200.
- [179] R. L. Wille, E. S. Lutton, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1966**, 43, 491–496.
- [180] L. Ferreira, M. M. Figueiredo, M. H. Gil, M. A. Ramos, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2006**, 77(1), 55–64.
- [181] S. Tan, H. T. Tan, M. C. M. Chung, *Proteomics* **2008**, 8(19), 3924–3932.
- [182] L. Columbus, J. Lipfert, K. Jambunathan, D. A. Fox, A. Y. L. Sim, S. Doniach, S. A. Lesley, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131(21), 7320–7326.
- [183] J. Lipfert, L. Columbus, V. B. Chu, S. A. Lesley, S. Doniach, *J. Phys. Chem. B* **2007**, 111(43), 12427–12438.

Publikationsliste

- [1] C. Jeworrek, F. Evers, M. Erilkamp, S. Grobelny, M. Tolan, P. L.-G. Chong, R. Winter, STRUCTURE AND PHASE BEHAVIOR OF ARCHAEAL LIPID MONOLAYERS, *Langmuir* **2011**, 27(21), 13113–13121.
- [2] S. Kapoor, G. Triola, I. R. Vetter, M. Erilkamp, H. Waldmann, R. Winter, REVEALING CONFORMATIONAL SUBSTATES OF LIPIDATED N-RAS PROTEIN BY PRESSURE MODULATION, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, 109(2), 460–465.
- [3] S. Kapoor, K. Weise, M. Erilkamp, G. Triola, H. Waldmann, R. Winter, THE ROLE OF G-DOMAIN ORIENTATION AND NUCLEOTIDE STATE ON THE RAS ISOFORM-SPECIFIC MEMBRANE INTERACTION *Eur. Biophys. J.* **2012**, 41(10), 801–813.
- [4] Y. Zhai, P. L.-G. Chong, L. J.-A. Taylor, M. Erilkamp, S. Grobelny, C. Czeslik, E. Watkins, R. Winter, PHYSICAL PROPERTIES OF ARCHAEAL TETRAETHER LIPID MEMBRANES AS REVEALED BY DIFFERENTIAL SCANNING AND PRESSURE PERTURBATION CALORIMETRY, MOLECULAR ACOUSTICS, AND NEUTRON REFLECTOMETRY: EFFECTS OF PRESSURE AND CELL GROWTH TEMPERATURE, *Langmuir* **2012**, 28(11), 5211–5217.
- [5] J. Möller, M. A. Schroer, M. Erilkamp, S. Grobelny, M. Paulus, S. Tiemeyer, F. J. Wirkert, M. Tolan, R. Winter, THE EFFECT OF IONIC STRENGTH, TEMPERATURE, AND PRESSURE ON THE INTERACTION POTENTIAL OF DENSE PROTEIN SOLUTIONS: FROM NONLINEAR PRESSURE RESPONSE TO PROTEIN CRYSTALLIZATION, *Biophys. J.* **2012**, 102(11), 2641–2648.
- [6] J. Koo, M. Erilkamp, S. Grobelny, R. Steitz, C. Czeslik, PRESSURE-INDUCED PROTEIN ADSORPTION AT AQUEOUS-SOLID INTERFACES, *Langmuir* **2013**,

29(25), 8025–8030.

- [7] S. Grobelny, C. H. Hofmann, M. Erilkamp, F. A. Plamper, W. Richtering, R. Winter, CONFORMATIONAL CHANGES UPON HIGH PRESSURE INDUCED HYDRATION OF POLY(N-ISOPROPYLACRYLAMIDE) MICROGELS, *Soft Matter* **2013**, *9*(25), 5862-5866.
- [8] J. Möller, S. Grobelny, J. Schulze, S. Bieder, A. Steffen, M. Erilkamp, M. Paulus, M. Tolan, R. Winter, REENTRANT LIQUID-LIQUID PHASE SEPARATION IN PROTEIN SOLUTIONS AT ELEVATED HYDROSTATIC PRESSURES, *Phys. Rev. Lett.* **2014**, *112*(2), 028101.
- [9] M. Erilkamp, S. Grobelny, R. Winter, CROWDING EFFECTS ON THE TEMPERATURE AND PRESSURE DEPENDENT STRUCTURE, STABILITY AND FOLDING KINETICS OF STAPHYLOCOCCAL NUCLEASE, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*(13), 5965–5976.
- [10] C. H. Hofmann, S. Grobelny, M. Erilkamp, R. Winter, W. Richtering, INFLUENCE OF HIGH-PRESSURE ON CONONSOLVENCY OF POLY(N-ISOPROPYLACRYLAMIDE) NANOGELS IN WATER/METHANOL MIXTURES, *Polymer* **2014**, *55*(8), 2000-2007.
- [11] M. Erilkamp, S. Grobelny, A. Faraone, C. Czeslik, R. Winter, SOLVENT EFFECTS ON THE DYNAMICS OF AMYLOIDOGENIC INSULIN REVEALED BY NEUTRON SPIN ECHO SPECTROSCOPY *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*(12), 3310-3316.

Lebenslauf

Name:	Mirko Erlkamp
Geburtsdatum:	08. Oktober 1983
Geburtsort:	Herne
1990 – 1992	Grundschule Josefschule in Herne
1992 – 1994	Grundschule an der Königstraße in Herne
1994 – 2004	Gymnasium Wanne in Herne
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Abitur)
2004 – 2005	Sozialdienst bei der Familien- und Krankenpflege Herne e.V.
2005 – 2008	Studium der Chemie an der Technischen Universität Dortmund
	Abschluss: Bachelor of Science (B.Sc.)
	Thema: <i>Herstellung und Charakterisierung biologisch modifizierter Nanopartikel</i>
2008 – 2010	Studium der Chemie an der Technischen Universität Dortmund
	Abschluss: Master of Science (M.Sc.)
	Thema: <i>Röntgenreflektometrische Untersuchungen von Modellbiomembranen</i>
seit 2010	Promotion in Physikalischer Chemie am Lehrstuhl von Prof. Dr. R. Winter an der Technischen Universität Dortmund

Eidesstattliche Versicherung

Name: Mirko Erlkamp
Hochschule: TU Dortmund
Fachbereich: Physikalische Chemie I

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

*Strukturbestimmung ausgewählter Protein- und Lipidsysteme mit nicht-typischem
Aggregations- und Phasenverhalten*

selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erbracht habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Datum, Unterschrift