

Struktur und Stabilität von Biomolekülen in räumlich einschränkenden Geometrien

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt von
M.Sc. Marie Kahse
aus Mombasa, Kenia

eingereicht bei der
Technischen Universität Dortmund
Fakultät für Chemie und Chemische Biologie

Dortmund
09. März 2016

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2012 bis Oktober 2015 am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I (Biophysikalische Chemie) der Technischen Universität Dortmund unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. R. Winter angefertigt.

Dissertation eingereicht am: 09.03.2016

Tag der Disputation: 08.04.2016

Prüfungskommission

| | |
|--------------------|---------------------|
| Vorsitzender: | Prof. Dr. B. Ralle |
| Erster Gutachter: | Prof. Dr. R. Winter |
| Zweiter Gutachter: | Prof. Dr. H. Rehage |

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 Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, sowie die interessante Aufgabenstellung. Die Förderung besonderer Soft Skills durch die Teilnahme an lehrreiche Fluidkolloquien wird unvergessen bleiben.

Ein spezieller Dank geht an Dr. Katrin Weise und Dr. Reiner Große für die kritische Durchsicht und hilfreichen Korrekturen meiner Arbeit.

Prof. Dr. Heinz Rehage danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich möchte mich weiter bei Prof. Dr. Claus Czeslik, Andrea Kreusel, Simone Möbitz, den Schuabbs, Nelli Erwin, Mimi Gao, Süleyman Cinar, Saba Suladze und den weiteren Mitarbeitern für die freundliche Aufnahme und gute Arbeitsatmosphäre innerhalb der Arbeitsgruppe bedanken. Bertina Schuppan und Jens Beneken danke ich für die Pausen außerhalb des Büros.

Loana Arns und Melanie Berghaus bin ich sehr dankbar für die gute Stimmung, vielseitigen - sowohl fachlichen als auch nicht ganz so fachlichen - Gespräche und Kaffeepausen im gemeinsamen Büro. Melanies hervorragende Kenntnisse bei der Erstellung von Abbildungen ist es zu verdanken, dass die meisten Schemata ästhetisch ansprechend geworden sind.

Weiterhin gilt mein Dank den Mitgliedern der Forschergruppe Confine Dynamics (FOR 1583) für die gute Zusammenarbeit: Prof. Dr. Gerd Buntkowsky und Dr. Mayke Werner danke ich für das Bereitstellen der mesoporösen Silikate und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christina Thiele für das zur Verfügungstellen des Elastinpeptids. Insbesondere danke ich Dr. Kerstin Kämpf für das fruchtbare Mitwirken und ihre fortwährenden Bemühungen an der Auswertung der FTIR-Daten.

Schließlich danke ich meiner Familie, die mir in allen Lebenslagen zur Seite gestanden hat.

Zuletzt danke ich meinem Freund Michael Albers für die hilfreichen Korrekturen meiner Dissertation und noch viel mehr für seine grenzenlose Liebe und Unterstützung.

Publikationsliste

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sind folgende Publikationen entstanden:

- M. Kahse, M. Werner, S. Zhao, M. Hartmann, G. Buntkowsky, R. Winter, "Stability, Hydration, and Thermodynamic Properties of RNase A Confined in Surface-Functionalized SBA-15 Mesoporous Molecular Sieves" *J. Phys. Chem. C* (2014), **118**, 21523–21531.
-
- J. Seeliger, N. Erwin, C. Rosin, M. Kahse, K. Weise, R. Winter, "Exploring the structure and phase behavior of plasma membrane vesicles under extreme environmental conditions" *Phys. Chem. Chem. Phys.* (2015), **17**, 7507-7513.
-
- S. Suladze, M. Kahse, N. Erwin, D. Tomazic, R. Winter, "Probing volumetric properties of biomolecular systems by pressure perturbation calorimetry (PPC) – The effects of hydration, cosolvents and crowding" *Methods* (2015), **76**, 67–77.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Kurzfassung..... | i |
| Abstract | iii |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Proteine und Peptide in eingeschränkten Geometrien | 1 |
| 1.2 Das Modellprotein RNase A..... | 3 |
| 1.3 Lysozym aus Hühnereiweiß..... | 4 |
| 1.4 Elastinartige Peptide und der inverse Temperaturübergang | 5 |
| 1.5 Soft-Matter-Confinement-Systeme..... | 7 |
| 1.6 Der Effekt des ausgeschlossenen Volumens..... | 7 |
| 1.7 Soft-Matter Crowder Ficoll 70..... | 11 |
| 1.8 Hard-Matter Confinement Systeme..... | 12 |
| 1.8.1 Mesoporöse Molekularsiebe und ihre Anwendungen | 12 |
| 1.8.2 Metall-organische Gerüste..... | 16 |
| 1.8.3 Triebkräfte bei der Proteinadsorption/-einlagerung..... | 17 |
| 1.8.4 Allgemeine Faktoren bei der Einlagerung von Proteinen in MPS | 21 |
| 1.9 Kosolvenzien und deren Einflüsse auf Biomoleküle..... | 22 |
| 1.10 Zielsetzung..... | 24 |
| 2 Experimenteller Teil..... | 27 |
| 2.1 Verwendete Proteine und Chemikalien | 27 |
| 2.2 Herstellung der Puffersysteme..... | 28 |
| 2.3 Das Elastinartige Peptid..... | 28 |
| 2.4 Herstellung der Tb-mesoMOFs..... | 28 |
| 2.5 Präparation und Eigenschaften der MPS | 28 |
| 2.6 Einlagerung des Proteins in die Tb-mesoMOFs..... | 30 |
| 2.7 Einlagerung des Proteins in die MPS..... | 31 |
| 3 Methoden | 33 |
| 3.1 Differential Scanning Calorimetry (DSC)..... | 33 |
| 3.2 Fourier Transform-Infrarot -Spektroskopie (FTIR)..... | 34 |
| 3.2.1 Grundlagen der Infrarotspektroskopie an Proteinen | 34 |
| 3.2.2 Funktionsweise und Spektrenaufnahme..... | 35 |
| 3.2.3 Datenprozessierung der FTIR-Spektren und Bestimmung der Sekundärstrukturanteile | 37 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4 | Ergebnisse und Diskussion | 41 |
| 4.1 | Ergebnisse zur RNase A in MPS | 41 |
| 4.1.1 | Immobilisierung der RNase A in den MPS: Beladung bei verschiedenen pH-Werten | 41 |
| 4.1.2 | Immobilisierung der RNase A in verschiedene MPS bei pH 7 | 47 |
| 4.1.3 | DSC-Ergebnisse zur Temperaturstabilität der immobilisierten RNase A | 49 |
| 4.1.4 | Exkursion: Einlagerung von Lysozym in Tb-mesoMOFs | 56 |
| 4.1.5 | Zusammenfassung und Schlussfolgerungen (I)..... | 57 |
| 4.2 | FTIR-Ergebnisse der Temperaturabhängigkeit des elastinartigen Peptids | 60 |
| 4.2.1 | Amid-I'-Bande des 10 Gew.-%igen elastinartigen Peptids GVG(VPGVG) ₃ | 60 |
| 4.2.2 | Amid-I'-Bande des ELPs in Anwesenheit von 30 Gew.-% Ficoll | 61 |
| 4.2.3 | Vergleich der Ergebnisse in An- und Abwesenheit der Crowding-substanz Ficoll..... | 63 |
| 4.2.4 | Einfluss von Kosolventen auf das ELP..... | 65 |
| 4.2.5 | Zusammenfassung und Schlussfolgerungen (II)..... | 76 |
| 5 | Fazit | 81 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 83 |
| 7 | Anhang..... | 91 |
| 7.1 | Daten zu Messungen in eingeschränkten Geometrien..... | 91 |
| 7.2 | Ergänzende Daten zur Temperaturabhängigkeit des ELP | 93 |
| | Abkürzungsverzeichnis..... | 99 |

Kurzfassung

Struktur und Stabilität von Biomolekülen in räumlich einschränkenden Geometrien

Es besteht großes Interesse am Verständnis der Konformation und Dynamik biomolekularer Systeme im Confinement, da Biomoleküle in ihrer physiologischen Umgebung starken räumlichen Einschränkungsbedingungen unterliegen. Einerseits ist bis zu ca. 40 % des Volumens im zellulären Zytoplasma durch eine hohe Makromolekülkonzentration vereinnahmt und andererseits können geometrische Einschränkungen beispielweise durch Zelleinschlüsse vorliegen. Dadurch ergeben sich u.a. dramatische Verschiebungen des Gleichgewichts biochemischer Reaktionen, deren Produkte mehr oder weniger Volumen in Anspruch nehmen als im Ausgangszustand. Zudem bestehen die fluiden Zwischenräume nicht nur aus reinem Wasser, sondern aus einer komplexen Lösungsmittelzusammensetzung. Die physikalisch-chemischen und damit funktionellen Eigenschaften der Biomakromoleküle werden auch durch Kosolvenzien (Osmolyte) und Salze, beeinflusst.

Um den Einfluss einer solchen geometrischen Einschränkung nachzustellen, wurden im ersten Teil dieser Arbeit regelmäßig angeordnete Festkörper-Wirtsmaterialien eingesetzt, in denen die Modellproteine RNase A und Lysozym eingelagert wurden. Nach erfolgreicher Bestimmung der Immobilisierungsrate unter verschiedenen Wirts- und Lösungsmittelbedingungen wurde mittels DSC die thermische Stabilität der eingelagerten Proteinspezies untersucht. Hierbei wurde vor allem der Aspekt, dass die Oberflächen mesoporöser Silikatmaterialien (MPS) durch chemische Methoden mit funktionellen Gruppen modifiziert werden können, in den Fokus der Untersuchungen gestellt. Diese Studien sind von großer Bedeutung, da über den Einfluss einer Veränderung der chemischen Natur der Wände (Hydrophilie/Hydrophobizität) auf die Stabilität eingelagerter Proteinen noch nicht viel bekannt ist. So wurde in dieser Arbeit RNase A in mit Amino- und Carboxylatgruppen modifiziertes hexagonales SBA-15 und MCM-41 eingelagert. Zusätzlich wurde ein metallorganisches Gerüst (Tb-mesoMOF) auf seine Eignung zur Einlagerung von Lysozym untersucht. Die meisten der hier untersuchten MPS wiesen ein hohes Potential auf, RNase A zu immobilisieren (bis zu 543 mg/cm^3), und die thermische Stabilität konnte um bis zu ca. 50°C erhöht werden. Hierbei erwies sich die Modifikation der SBA-15 mit Carboxylatgruppen als am effizientesten zur Einlagerung der RNase A, was vermutlich auf erhöhte elektrostatische Wechselwirkungen zurückzuführen ist.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit dem Einfluss von Kosolventien und einschränkenden Umgebungen auf die Struktur eines elastinartigen Peptids (ELP) mit der

Sequenz GVG(VPGVG)₃, das aufgrund der hohen Anzahl hydrophober Aminosäureseitenketten einen sog. "inversen" Temperaturübergang (ITT) von einer ungeordneten in eine geordnete Konformation bei Temperaturerhöhung aufweist. Es ist bekannt, dass die Eigenschaften von Elastin essentiell mit der Hydratation der pentameren Wiederholungseinheit (VPGVG)_n zusammenhängt und bereits eine einzige solche Einheit im Experiment eine Konformationsänderung von einer gestreckten in eine Typ II β -Schleifenstruktur bei Temperaturerhöhung zeigt. Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Konformationsänderungen bei räumlicher Einschränkung des Systems (realisiert durch weiches Confinement mit Ficoll) und Lösungsmiteleinflüsse auf die Struktur des Peptids sowie auf den ITT zu ermitteln. Hierzu wurden temperaturabhängige FTIR-Messungen am Oktadekapeptid GVG(VPGVG)₃ in Anwesenheit von Ficoll durchgeführt und anschließend wurde der zusätzliche Einfluss anderer Lösungsmittel (TFE, TMAO, Harnstoff sowie eine 1:2-Mischung aus TMAO und Harnstoff) untersucht. Anhand der erhaltenen Resultate konnte gezeigt werden, dass unabhängig von der gewählten Umgebung bei allen Proben ein ITT erfolgt, d.h. dass der relative Anteil an ungeordneten Strukturen zugunsten der Bildung von Typ II β -Schleifenstrukturen bei Temperaturzunahme abnahm. Unterschiede zeigten sich allerdings in dem Temperaturbereich, in dem der inverse Temperaturübergang erfolgte. Im Falle des Elastinpeptids ohne Zusatz fand die konformationelle Umwandlung ab ca. 20 °C bis zur höchsten gemessenen Temperatur ohne Umkehr statt, wohingegen in Anwesenheit von Ficoll und TFE der inverse Übergang auch ab ~ 20°C einsetzte, aber eine Umkehr ab ~ 80 °C bzw. ~ 70 °C zu einer ungeordneten Konformation ermittelt wurde. In Anwesenheit von TMAO wurde die Temperatur des inversen Übergangs erniedrigt und die Abnahme ungeordneter Strukturen erfolgte ohne Umkehr bis ~ 94 °C. Darüber hinaus wurde in Anwesenheit von Ficoll und TFE eine Erhöhung der Konformationsunordnung bei tiefen Temperaturen ermittelt, was dem erwarteten Effekt des ausgeschlossenen Volumens bzw. einer Stabilisierung hydrophober Wechselwirkungen durch TFE widersprach. Der Osmolyt TMAO hingegen erhöhte den Anteil regulärer Sekundärstrukturen (Schleifenstrukturen) im gesamten Temperaturbereich. In Anwesenheit von Harnstoff und der 1:2-Mischung konnte keine quantitative Analyse durchgeführt werden, jedoch durch eine qualitative Auswertung die Abnahme der Konformationsunordnung und somit der inverse Temperaturübergang demonstriert werden.

Abstract

Structure and stability of biomolecules in confinement

There is great interest in understanding the conformation and dynamics of biomolecular systems in confinement because biomolecules are subject to strong spatial limitations in their physiological environment. On the one hand, high macromolecule concentrations occupy about 30% of the cellular volume and on the other hand, geometric constraints, for example within cell inclusions, limit the conformational space of biomolecules. This results in dramatic shifts of the reaction equilibria of those biochemical reactions in which products are more or less volume-consuming than in the initial state. This applies, for example, for the folding and aggregation of proteins. Consequently, supramolecular complexes *in vivo* should be more stable than in the diluted state *in vitro*. However, this is only valid if interactions with neighboring molecules, interfaces, changes in solvation and the geometric constraints of the solvent are neglected. Moreover, the fluid intracellular space does not only consist of water, but of a complex solvent composition. The physicochemical and functional properties of biological macromolecules are also influenced by cosolvents (osmolytes) and salts. Furthermore, the solvent properties themselves can be influenced by interfaces as well as the topology and surface chemistry of the confinement. For example, the first 1-2 hydration monolayers have particular physical properties.

To mimic the effect of such a geometric constraint, arrayed solid state host materials were used in the first part of this work, in which the model proteins RNase A and lysozyme were incorporated. This is of great importance in biocatalysis, because, in general, the immobilisation of enzymes causes an increase in enzyme stability and catalytic turnover. Difference scanning calorimetry (DSC) has proved to be appropriate for the investigation of physicochemical properties of the proteins embedded in the host materials. Thus, the immobilisation rate under different conditions was investigated and after successful immobilisation into the hosts the thermal stability was determined by DSC. A decisive advantage of mesoporous silicate materials (MPS) is the possibility to modify their surfaces by chemical methods with functional groups. As not much is known about the influence of a change in the chemical nature of the silicate walls (hydrophilicity / hydrophobicity) on the stability of embedded proteins, in this work hexagonal SBA-15 and MCM-41 were modified with amino and carboxylate groups. In addition, a metal-organic framework (Tb-mesoMOF) was employed in order to examine its suitability for the storage of lysozyme. Most of the mesoporous materials studied in this work had a high potential to immobilise RNase A (up to 543 mg/cm³) and the thermal stability could be increased by up to 50 °C. Here, the

modification of the SBA-15 with carboxylate groups proved to be most efficient for the storage of RNase A, which is probably due to increased electrostatic interactions.

The second part of this work deals with the influence of a cell-mimicking environment on the structure of an elastin-like peptide (ELP) with the sequence GVG(VPGVG)₃, which - due to a high number of hydrophobic amino acid side chains - exhibits an "inverse" temperature transition (ITT). This means that upon heating the peptide undergoes a conformational transition from a disordered to a more ordered conformation. It is known that the properties of elastin originate from the hydration of the pentameric repeat unit (VPGVG)_n and experiments show that only a single of such a unit undergoes a conformational change from a stretched into a type II β -loop structure with increasing temperature. The aim of this work was to characterise the conformational changes in spatial limitation of the system (realised by soft-matter confinement with Ficoll) and in different solvents to determine changes in the structure of the peptide and the ITT. To this end, temperature-dependent FTIR measurements with the octadecapeptide GVG(VPGVG)₃ were carried out in the presence of Ficoll. Additionally, the influence of other solvents such as TFE, TMAO, urea as well as a 1:2 mixture of TMAO and urea were examined. Based on the obtained results it could be shown that in all samples an ITT was observed regardless of the chosen environment. This was observed by the decrease of the relative proportion of random coil structures and the concomitant increase of type II β -loops. The analysis of the FTIR-data revealed an increase in conformational disorder in the presence of Ficoll and TFE. This observation was in contrast to the expected excluded volume effect of the crowder and a stabilisation of hydrophobic interactions by TFE. Furthermore, the results point towards other loop structures being favored besides the formation of type II β -loops in the presence of TFE. On the other hand, the presence of the osmolyte TMAO led to a decrease of the temperature of the ITT. An alternative method of spectral evaluation had to be used upon the addition of urea due to a high background signal interference caused by urea. These measurements suggested that urea and the 1:2 mixture of TMAO and urea both lead to a decrease in conformational disorder and therefore an ITT of the ELP was observed in those mixtures.

1 Einleitung

1.1 Proteine und Peptide in eingeschränkten Geometrien

Die Beteiligung von Proteinen an beinahe allen biologischen Prozessen machen diese zu einer der bedeutendsten Substanzklassen in der Biochemie. Ihre Funktion reicht von der gezielten Katalyse bestimmter Reaktionen über den selektiven Stofftransport, die mechanische Stützfunktion, die Übermittlung von Nervenimpulsen, die Kontrolle von Wachstum und Differenzierung sowie die Immunabwehr, bis hin zur Aufrechterhaltung elektrochemischer Potentiale entlang der Zellmembran ^[1]. Demnach ist das Verständnis einflussnehmender Faktoren auf die Struktur und Stabilität, die häufig mit der Funktion eines Proteins einhergeht, unabdingbar. Eines der Hauptaugenmerke dieser Arbeit liegt in der Berücksichtigung der Tatsache, dass anders als in verdünnten Lösungen, Prozesse in lebenden Systemen wie beispielsweise Zellen in einer sehr dicht gepackten Umgebung mit einer Vielzahl an unterschiedlichen Molekülen, die bis zu 40 Gew.-% des Zellvolumens vereinnahmen können ^[2-9], stattfinden. Dies ist essentiell für die Entwicklung von Therapien bestimmter Erkrankungen, die zum Beispiel durch eine Fehlfaltung, eine Störung der Balance zwischen gefaltetem und entfaltetem Zustand oder eine Aggregation von Polypeptiden verursacht werden. In letzter Zeit findet diese Tatsache verstärkt Berücksichtigung und es werden viele Untersuchungen *in vitro* durchgeführt, in denen eine Annäherung an die Bedingungen der Prozesse *in vivo* durch das Hinzufügen - idealerweise - inerter Makromoleküle zu den Reaktionslösungen erfolgt. Der Begriff des makromolekularen Crowdings bezeichnet dieses Forschungsgebiet, das sich mit den physikalisch-chemischen Auswirkungen einer verdichteten Reaktionsumgebung auf vorzugsweise biologische Moleküle befasst. Seither beschäftigt sich die Forschung mit der stetig anwachsenden Komplexität der Makromolekül-Mischungen und -Systeme, um im Experiment die Bedingungen *in vivo* nachzustellen und die für die physiologischen Konsequenzen zu Grunde liegenden Prinzipien zu verstehen ^[10].

Im Allgemeinen lässt sich eine einschränkende Geometrie (engl.: Confinement) auf zwei Arten realisieren: einerseits als weiches Confinement mit Hilfe makromolekularer Crowder (wie z.B. dem Polymer Ficoll aus Sucrose und Epichlorhydrineinheiten) und andererseits als hartes Confinement mit wohl definierten Festkörpern (z.B. mesoporösen Silikaten oder metall-organischen Hybridmaterialien). Letztere bilden den Extremfall einer geometrischen Einschränkung, so wie es beispielsweise in Zelleinschlüssen oder zwischen Grenzflächen der Fall ist. Im ersten Teil dieser Arbeit werden verschiedene harte Confinement-Systeme verwendet, um ihren Einfluss auf Modellproteine zu erforschen. Insbesondere widmet sich

die vorliegende Arbeit dieser Fragestellung anhand mesoskopischer Silikate und in einem kurzen Exkurs wird die Verwendung eines metall-organischen Gerüsts für physikochemische Untersuchungen vorgestellt. Mesoporöse Silikate (MPS) besitzen zahlreiche vorteilhafte Eigenschaften, wie z.B. große Oberflächen, gut definierte Poren, geringe Porengrößenverteilungen und variable Porendurchmesser, die durch eine Veränderung der Synthesebedingungen variierbar sind. Somit sind sie attraktive Wirtsmaterialien zum Behalten großer Gastmoleküle wie Proteine und können folglich - ähnlich wie bei Zelleinschlüssen - eine eingeschränkte geometrische Umgebung für Biomoleküle darstellen, in denen die biologische Funktion erhalten bleibt ^[7,11-14]. MPS wurden erfolgreich zur Immobilisierung von Enzymen verwendet (insbesondere zur Inkorporation in die Mesoporen) und finden Anwendung als molekulare Trennsiebe, in der Biokatalyse und als Biosensoren ^[15-21]. Als einer der wichtigsten Faktoren zur Beeinflussung der eingelagerten Proteinmenge erwies sich der pH-Wert ^[22]. Zudem kann die Beladung der MPS durch Funktionalisierung der inneren Oberflächen, die günstige Enzym-Oberflächen-Wechselwirkungen im Vergleich zu unmodifizierten MPS steigern, erhöht werden ^[18]. Die Vorteile funktionalisierter MPS liegen zum Beispiel im verminderten Herausrückdiffundieren der eingelagerten Proteine, in einer kontrollierten Abgabe von Wirkstoffen beim Heraustrreten aus den Mesoporen oder sogar höheren enzymatischen Aktivitäten im Vergleich zu den sonst kommerziell verwendeten Silikatmaterialien. Diese Vorteile werden meist auf stärkere (elektrostatische) Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und der internen Oberfläche des anorganischen Wirtes zurückgeführt ^[14,19-21]. Das Verändern elektrostatischer Wechselwirkungen kann zum einen durch die Variation des Lösungsmittel-pH-Wertes und zum anderen durch das Verändern der Oberflächenladung des Wirtsmaterials erfolgen. Letzteres lässt sich, wie auch in dieser Arbeit untersucht, durch die Funktionalisierung der Silikatoberfläche mit Amino- und Carboxylatgruppen erreichen. Diese Gruppen stellen zwei gegensätzliche Extreme dar, da sie eine positiv bzw. negativ geladene Oberfläche aufweisen und dadurch die Möglichkeit bieten, den Einfluss dieser Variable auf die Immobilisierung und Stabilisierung der Proteine zu erforschen.

Das in dieser Arbeit verwendete Modellprotein ist die Ribonuklease A (RNase A). Im ersten Teil dieser Arbeit wird Einsicht in den Einfluss harten Confinements auf die Einlagerungsmenge und Stabilität der RNase A bei Variation des pH-Wertes des Lösungsmittels (Lösungsmittelleigenschaften) und der Oberflächenfunktionalisierung des Wirtes gewährt. Die Methode der Wahl war hierbei die dynamische Differenzkalorimetrie (engl.: Differential Scanning Calorimetry, DSC), da sie die Möglichkeit bietet, physikochemische Eigenschaften der in MPS eingelagerten Proteine zu messen. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Roland Winter wurde sowohl die Eignung

mesoskopischer Silikatsysteme für kalorimetrische Untersuchungen von Proteinen im Confinement als auch eine stabilisierende Wirkung durch die räumliche Einschränkung demonstriert. Dies geschah insbesondere durch kalorimetrische Untersuchungen an eingelagerter RNase A in mesoporöse kubische Phasenmaterialien ^[7,23]. In der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus jedoch auf der Einlagerung der RNase A in die hexagonalen Poren eines Phasenmaterials, dessen Oberfläche auf zwei verschiedene Arten funktionalisiert wurde, um deren Einfluss auf den Einkapselungsvorgang zu evaluieren. Nach einer Charakterisierung der Einlagerungsrate und -menge wurde die DSC zur Untersuchung der thermischen Stabilität der in die hydrophile Mikroumgebung eingekapselten RNase A bei verschiedenen pH-Werten als auch in oberflächen-modifizierten Varianten eingesetzt.

Die Tatsache, dass viele Enzyme einen hohen Anteil an ungeordneten Peptidbereichen aufweisen, die sich durch eine hohe Flexibilität und Fluktuationen auszeichnen, führte zur Erkenntnis, dass anders als bislang angenommen, nicht nur kompakt gefaltete Proteinbereiche, sondern auch flexible ungeordnete Peptidsequenzen notwendig für die Funktion von Enzymen sind. In solchen Fällen wird von intrinsisch ungeordneten Peptiden gesprochen (engl.: intrinsically disordered peptides, IDPs), über deren entscheidende Funktion in biologischen Vorgängen zunehmend Erkenntnis gewonnen wird ^[10,24–32]. In dieser Arbeit wurde ein elastinartiges Peptid (engl.: elastin-like peptide, ELP) der Sequenz GVG(VXGVG)₃ mit X=P als ein Vertreter dieser Klasse ausgewählt, welches sich von den sonst untersuchten, hoch geladenen und polaren IDPs durch eine hohe Hydrophobizität unterscheidet. Der Einfluss einer verdichteten Umgebung als auch verschiedener Kosolvenzien auf die Struktur eines solchen kurzen und flexiblen Peptids wurde im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht, da dies - im Unterschied zu den Effekten des Crowdings und zahlreicher Additive auf globuläre und kompakte Proteine - bislang nicht intensiv erforscht wurde.

1.2 Das Modellprotein RNase A

Als Modellprotein zur Einlagerung in die MPS wurde Ribonuklease A (RNase A) verwendet. RNase A ist ein bereits sehr gut untersuchtes Protein, das als Modell zur Untersuchung der Proteinfaltung Verwendung findet, da es klein und unter moderaten pH-Bedingungen stabil ist und eine gut charakterisierte native Struktur besitzt. Darüber hinaus wurde der Einfluss verschiedener Kosolvenzien auf die volumetrischen (Expansivität, relative Volumenänderung) sowie weiteren thermodynamischen Eigenschaften (Entfaltungstemperatur, Enthalpieänderung) im Zuge einer thermischen Denaturierung der RNase A in bulk-Lösung bereits untersucht ^[33].

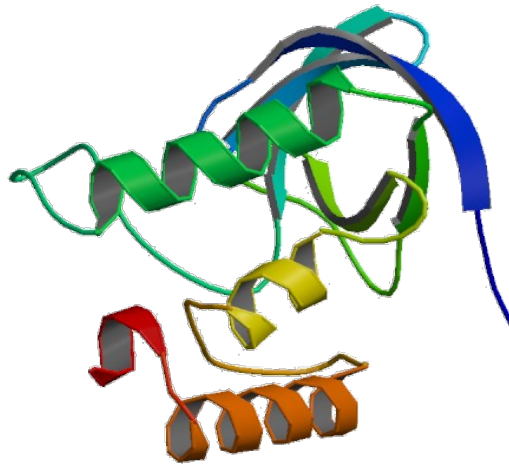


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Struktur eines RNase A-Moleküls (erstellt in PyMol auf Basis des Datensatzes 4G8V der RCSB Proteindatenbank) ^[34].

RNase A besteht aus einer einzigen Domäne und ist ein Verdauungsenzym, das die Spaltung einzelsträngiger RNA katalysiert. Es ist aus 124 Aminosäuren aufgebaut und besitzt ein Molekulargewicht von 13,7 kDa. RNase A aus dem Pankreas von Rindern ist ein nahezu sphärisches basisches Protein mit einem Gyrationradius (R_g) von ca. 1,5 nm ^[35] und mit einem isoelektrischen Punkt (pI) von 9,6. Es besitzt eine positive Nettoladung von 4 bei neutralem pH (7), resultierend aus den 10 sauren Aminosäureresten (Asp, Glu) und 18 basischen Einheiten (Lys, Arg, His) ^[36]. Der nicht-polare Anteil der für Wasser zugänglichen Oberfläche liegt im Bereich zwischen 46-50 % ^[37,38]. Eine schematische Darstellung der Proteinstruktur ist in Abbildung 1 gezeigt.

1.3 Lysozym aus Hühnereiweiß

Für Untersuchungen zur Einlagerung von Proteinen in ein metall-organisches Wirtsmaterial wurde das Modellprotein Lysozym verwendet. Lysozym aus Hühnereiweiß (engl.: hen egg-white lysozyme) besteht aus 129 Aminosäureresten und wird durch vier Disulfidbrücken und zahlreiche Wasserstoffbrücken-bindungen stabilisiert. Es ist ein sphärisches Protein mit einer ellipsoiden Gestalt von etwa 4,5 nm x 3,0 nm x 3,0 nm im gefalteten Zustand ^[39]. Strukturell lässt es sich in eine α -Domäne (Aminosäurereste (aa) 1–35, 85–129; vier α -Helices und eine kurze 3_{10} -Helix) und eine β -Domäne (aa 36–84; ein dreisträngiges antiparalleles β -Faltblatt, eine lange Schleife und eine 3_{10} -Helix) gliedern (Abbildung 2). Insgesamt bestehen die Sekundärstrukturanteile aus ca. 40 % α -Helices und 12 % β -Faltblättern ^[40,41].

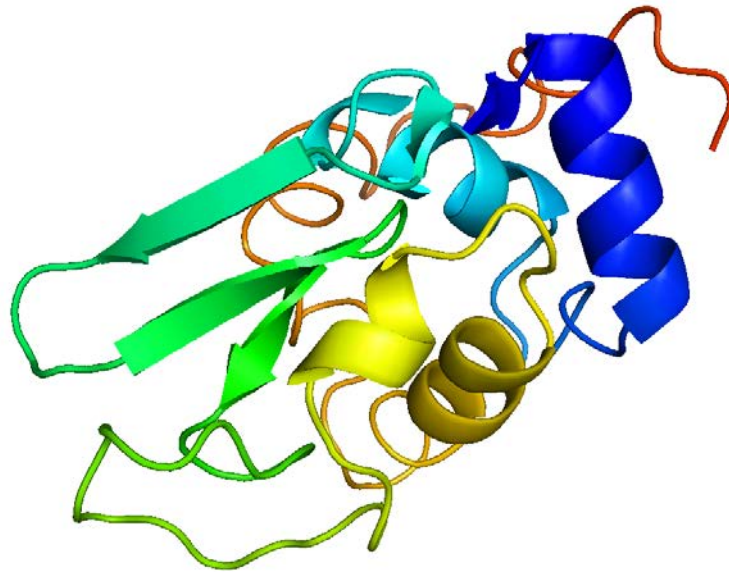


Abbildung 2 Schematische Bändermodell-Darstellung der nativen Struktur des Hühner-Lysozyms (erstellt in PyMol auf Basis des Datensatzes 1LYZ der RCSB Proteindatenbank) ^[42].

Lysozym spielt eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr durch Lyse bakterieller Zellwände. Dies erfolgt durch die enzymatische Hydrolyse von Peptidoglykanen (bestehend aus Zuckerderivaten und Peptiden), indem die β -1,4-glykosidischen Bindungen zwischen *N*-Acetylmuraminsäure- und *N*-Acetylglucosaminresten gespalten werden. Lysozyme kommen als Teil des angeborenen Immunsystems bei Tieren vor und können außerdem in Pflanzen, Pilzen, Bakterien und bei Bakteriophagen gefunden werden. Beim Menschen können Mutationen der korrespondierenden Gene z.B. zu einer Amyloidose in inneren Organen führen ^[43]. Es haben bereits zahlreiche Untersuchungen an Lysozym stattgefunden, sodass bereits diverse Kristallstrukturen verschiedener Varianten existieren ^[39,44]. Aufgrund der Tatsache, dass es eines der am meisten untersuchten Proteine ist, eignet es sich zur Analyse der thermodynamischen Eigenschaften.

1.4 Elastinartige Peptide und der inverse Temperaturübergang

Elastisches Gewebe aus Vertebraten (vaskuläre Gefäßwände, Haut, Lunge) erfordert reversible Deformationen, die meist auf zwei Proteintypen zurückgehen: faserartiges/fibröses Fibrillen und amorphes Elastin. Das unlösliche Elastin ist ein stark quervernetztes Polymer aus einem Vorläufer, der als Tropoelastin bezeichnet wird. Tropoelastin ist wiederum aus zwei Arten von Domänen zusammengesetzt: einer lysinreichen und einer aus hydrophoben Aminosäuren bestehenden, hoch repetitiven

pentameren Einheit mit der Sequenz (VPGVG)_n ^[45]. In dieser Arbeit wurde das Peptid mit der Sequenz GVG(VPGVG)₃ verwendet (Abbildung 3).

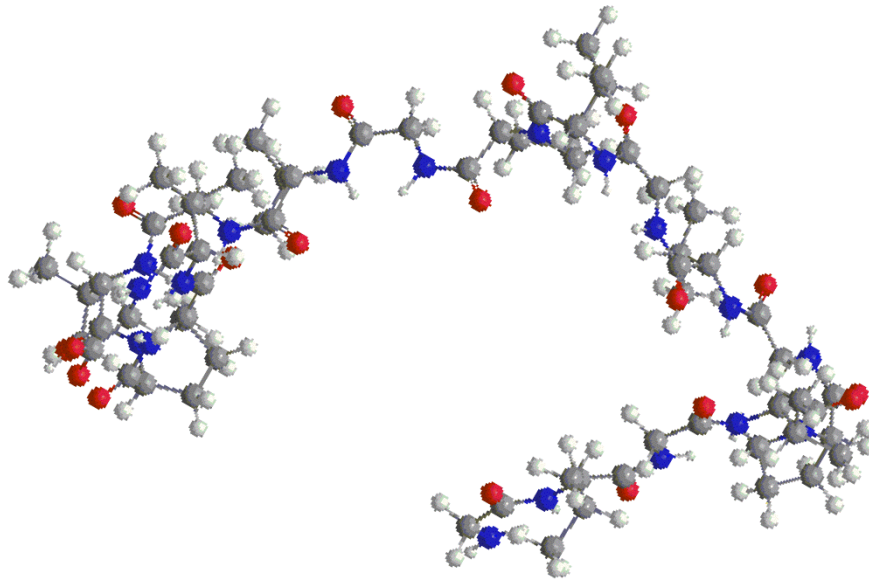


Abbildung 3 Schematische Darstellung des Peptids GVG(VPGVG)₃ (erstellt in ChemBioDraw Ultra 12.0).

Allen Elastinpeptiden liegt die gemeinsame Eigenschaft zu Grunde, einen inversen Temperaturübergang (engl.: inverse temperature transition, ITT) vollziehen zu können. Diese scheinbar paradoxe Konformationsänderung von einer ungeordneten (ausgedehnten, voluminöseren) zu einer geordneten (gefalteten) Konformation bei thermischer Erwärmung ist noch nicht vollständig verstanden. Was bisher Konsens findet, ist, dass die Faltung bei steigender Temperatur aus hydrophoben Wechselwirkungen resultiert, hauptsächlich angetrieben durch den Entropiegewinn des Wassers. Das Stabilitätsdiagramm des geordneten (gefalteten) Zustandes ist so weit verschoben, dass es nahe dem Siedepunkt des Lösungsmittels (Wasser) liegt. Der Ursprung dieses ungewöhnlichen Verhaltens wird noch immer kontrovers diskutiert. Es finden sich zahlreiche verschiedene Erklärungsansätze, wie Konzepte aus der klassischen Gummi-Elastizität (engl.: classical rubber elasticity) ^[46,47], den Librations-Entropie-Mechanismen (engl.: librational entropy mechanisms) ^[47–49], dem hydrophoben Kollaps (engl.: hydrophobic collapse), den Multiphasen-Modellen (engl.: multiphase models) ^[50,51] oder aber auch der Iceberg-/Clathrat-Bildung (engl.: iceberg/clathrate formation).

1.5 Soft-Matter-Confinement-Systeme

Im Unterschied zu Untersuchungen *in vitro*, die meist in einem hoch verdünnten Medium erfolgen, ist bei Bedingungen *in vivo* zu berücksichtigen, dass das Zellvolumen bis zu ca. 40 % durch Makromoleküle unterschiedlicher Art vereinnahmt wird ^[52]. Der sterische Volumenausschluss durch diese Makromoleküle hat energetische Konsequenzen zur Folge, die nicht vernachlässigbar sind. So sind beispielsweise Aktivitätskoeffizienten in verdichteten Medien um viele Größenordnungen größer als in verdünnten Lösungen. Die Bezeichnung verdichtet anstelle von konzentriert wird verwendet, da nicht eine einzige Makromolekülspezies in lebenden Organismen konzentriert vorkommt, sondern ein Gemisch aus Nukleotiden, Polypeptiden und Polysacchariden das Zellvolumen einnimmt ^[53]. Wie viel des intrazellulären Volumens für andere Makromoleküle zugänglich ist, hängt von der Anzahl, Größe und Form aller anwesenden Moleküle in jedem Kompartiment ab.

Um die Bedingungen in lebenden Organismen zu simulieren, werden für gewöhnlich hohe Konzentrationen an Biopolymeren, wie z.B. Ficoll 70 oder Dextran, zur Lösung hinzugefügt. Die Anforderungen, die an einen Stoff gestellt werden, um als Crowdingsubstanz ideal geeignet zu sein, sind ein molekulares Gewicht von 50-200 kDa, eine hohe Wasserlöslichkeit, keine Neigung zur Selbstaggregation und eine einfache Verfügbarkeit in hochreiner Form, um Kontaminationen vorzubeugen. Zudem ist eine globuläre Form geeigneter als eine ausgedehnte molekulare Form, was ein zu starkes Ansteigen der Viskosität der Lösung verhindert ^[54]. Die wichtigste Anforderung ist jedoch, dass die Substanz keine Interaktionen außer sterischer Abstoßung mit dem zu untersuchenden System eingeht. Daher ist es erforderlich, verschiedene Crowdingsubstanzen zu verwenden, sodass sichergestellt werden kann, dass beobachtete Effekte nicht durch spezifische Interaktionen verursacht werden ^[8,55]. Die Auswirkungen des Crowdings auf den inversen Temperaturübergang des ELPs werden im Folgenden anhand steigender Konzentrationen der Crowdingsubstanz Ficoll 70 beschrieben.

1.6 Der Effekt des ausgeschlossenen Volumens

Eine logische Konsequenz des Verdichtens eines Mediums ist das Ausschließen von Volumen (engl.: excluded volume effect), da das durch Makromoleküle eingenommene Volumen für andere Teilchen durch sterische Abstoßung nicht zugänglich ist ^[56]. Das einnehmbare, effektive Volumen, welches für Reaktionen zur Verfügung steht, wird dadurch verkleinert. Dies hat eine Veränderung der effektiven Konzentrationen und der Aktivitätskoeffizienten von bis zu drei Größenordnungen zur Folge ^[8]. Ein entscheidender Faktor ist hierbei die Größe des Biomoleküls, das in ein verdichtetes Medium eingebracht wird. Es ist zu berücksichtigen, dass das durch dieses Molekül einnehmbare Volumen als

der Anteil definiert ist, der für die Mitte des Teilchens zugänglich ist. Folglich steht für kleine Moleküle ein deutlich größeres einnehmbares Volumen zur Verfügung als für größere Moleküle, wenn sie in ein verdichtetes Medium eingebracht werden (Abbildung 4).

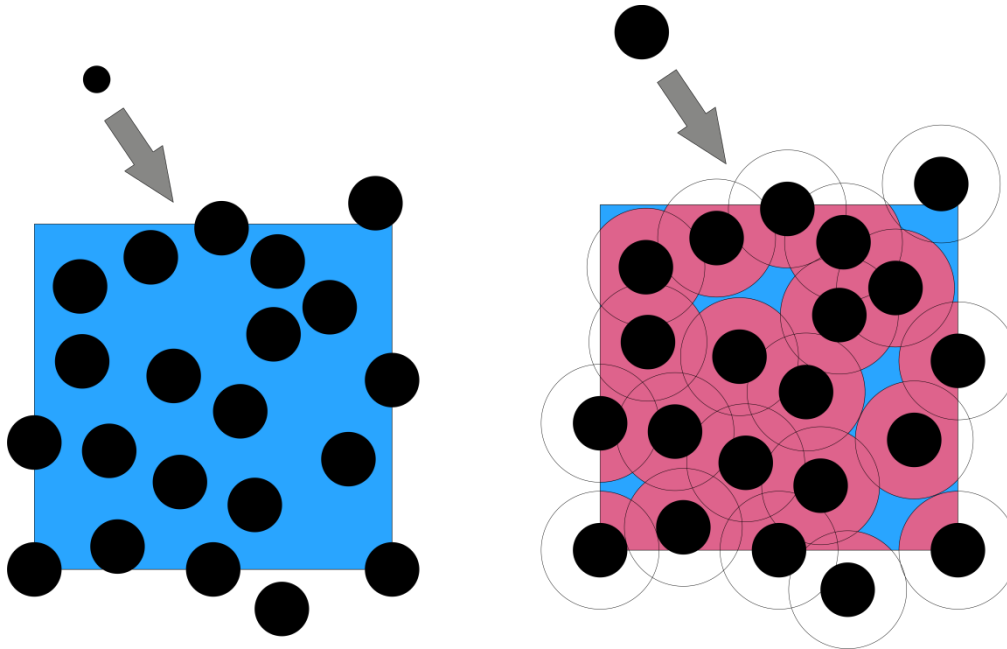


Abbildung 4 Darstellung des ausgeschlossenen Volumens (in rot) und des Volumens, welches für kleine und große Moleküle, die in eine Lösung eingebracht werden, zur Verfügung steht (in blau). Erstellt nach Referenz 50.

Um den gravierenden Unterschied von den oftmals bei Berechnungen angenommenen idealen Bedingungen im Vergleich zu denen in biologischen Systemen aufzuzeigen, wird im Folgenden der Einfluss des ausgeschlossenen Volumens auf die thermodynamische Aktivität diskutiert. Das chemische Potential einer gelösten Spezies i oder die differentielle Änderung in der freien Enthalpie der Lösung, die durch das Einführen einer infinitesimalen Menge dieser gelösten Spezies in die Lösung hervorgerufen wird, kann in einen idealen (μ_i^{ideal}) und nicht idealen ($\mu_i^{\text{nicht ideal}}$) Beitrag zerlegt werden:

$$\mu_i = \mu_i^{\text{ideal}} + \mu_i^{\text{nicht ideal}}. \quad (1)$$

Der ideale Beitrag zur Änderung der freien Enthalpie, der in Abwesenheit von Wechselwirkungen zwischen den gelösten Teilchen erwartet wird, ergibt sich aus:

$$\mu_i^{\text{ideal}} = \mu_i^0 + k_B T \ln c_i. \quad (2)$$

Hierbei ist μ_i^0 das chemische Potential der Spezies i unter Standardbedingungen, k_B die Boltzmannkonstante, T die absolute Temperatur und c_i die Konzentration in Einheiten proportional zur Dichte der Moleküle (z. B. molare oder w/v Einheiten).

Der nicht ideale Beitrag ist die Änderung der freien Enthalpie $\langle f_i \rangle$, die im Zusammenhang mit der freien Enthalpie der Interaktionen im Gleichgewicht zwischen einem Molekül der gelösten Spezies i und allen anderen gelösten Molekülen in der Lösung steht:

$$\mu_i^{\text{nicht ideal}} = kT \ln \gamma_i. \quad (3)$$

Mit γ_i als Aktivitätskoeffizienten, der als $\gamma_i = e^{\langle f_i \rangle / kT}$ definiert ist, lassen sich die Gleichungen (1)-(3) zusammenfassen zu:

$$\mu_i = \mu_i^0 + RT \ln a_i \quad (4)$$

mit $a_i = \gamma_i c_i$ als effektive Konzentration bzw. thermodynamische Aktivität. Da die Theorie des chemischen Gleichgewichts sich auf die Verwendung von Aktivitäten anstelle von Konzentrationen stützt, sollten alle Gleichgewichtsbeziehungen als Funktion der Aktivitäten der verschiedenen Spezies formuliert werden. Durch zunehmende Verdünnung werden Wechselwirkungen zwischen gelösten Molekülen verringert, somit folglich auch der nicht ideale Beitrag zum chemischen Potential, sodass $a_i \approx c_i$ für alle gelösten Teilchen gilt. Unter diesen Bedingungen verhält sich die Lösung ideal. Wenn hingegen die Konzentrationen an gelösten Molekülen so groß sind, dass Wechselwirkungen nicht vernachlässigbar sind, ist die Näherung $a_i \approx c_i$ unangemessen. Durch Volumenausschluss in verdichteten Lösungen kann der Wert der Aktivität den der Konzentration um eine oder mehrere Größenordnungen übersteigen ^[8].

Im Hinblick auf die Kinetik erscheint es logisch, dass die molekularen Diffusionsraten sowohl kleiner als auch großer Moleküle in verdichteten Medien verringert sind, mehr jedoch jene großer Moleküle. Beispielsweise wurde der laterale Diffusionskoeffizient des Ratten-Insel-Amyloid-Polypeptids ($D = 138 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) in Anwesenheit des Crowders Ficoll (30 Gew.-%) um den Faktor 16 verringert ^[57]. Die durchschnittliche Zeit, die ein Molekül benötigt, um eine bestimmte Strecke zurückzulegen, ist antiproportional zum Diffusionskoeffizienten D . Ist D um einen bestimmten Faktor verringert, nimmt die benötigte Zeit für dieselbe Strecke um denselben Faktor zu. Folglich werden schnelle Reaktionen, die durch die Diffusionsstoßrate beschränkt werden, durch erschwerte Diffusion verlangsamt. Die Geschwindigkeit langsamer Reaktionen, die unabhängig von der Stoßrate reagierender Moleküle ist, wird hingegen beschleunigt ^[55].

Das Nettoergebnis der gegensätzlichen Effekte, nämlich der Verringerung der Diffusion (eine hydrodynamische Konsequenz) und Erhöhung der thermodynamischen

Aktivitätskoeffizienten, ist abhängig von der genauen Art der zu untersuchenden Reaktion ^[8]. Ein thermodynamisches Modell für die Vorhersage von Einflüssen des Effektes des ausgeschlossenen Volumens ist das Modell der effektiven harten Partikel (engl.: effective hard particle model). Es ist ein einfaches Modell, das eine starre globuläre Struktur der Makromoleküle und Proteine voraussetzt, die nur durch räumliche Abstoßung miteinander interagieren und zeichnet sich dadurch aus, dass experimentell gemessene Aktivitätskoeffizienten erstaunlich korrekt abgeschätzt werden können ^[58].

Während der Proteinentfaltung vergrößert sich der Gyrationradius R_g und führt zu einem Volumenausschluss gegenüber anderen Molekülen in der Lösung (Abbildung 5). Folglich nimmt das ausgeschlossene Volumen zu. Der Einfluss des ausgeschlossenen Volumens auf die Thermodynamik der Proteinentfaltung führt zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes auf die Seite des maximalen Assoziationszustandes. Das bedeutet, dass Reaktionen, die zur Minimierung des ausgeschlossenen Volumens und somit auch der freien Energie führen, unter verdichteten Bedingungen bevorzugt sind. Folglich wird beim Vorliegen des entfaltenen Zustandes die Bildung von Aggregaten bzw. im nativen Zustand eine Stabilisierung desselben favorisiert ^[59].

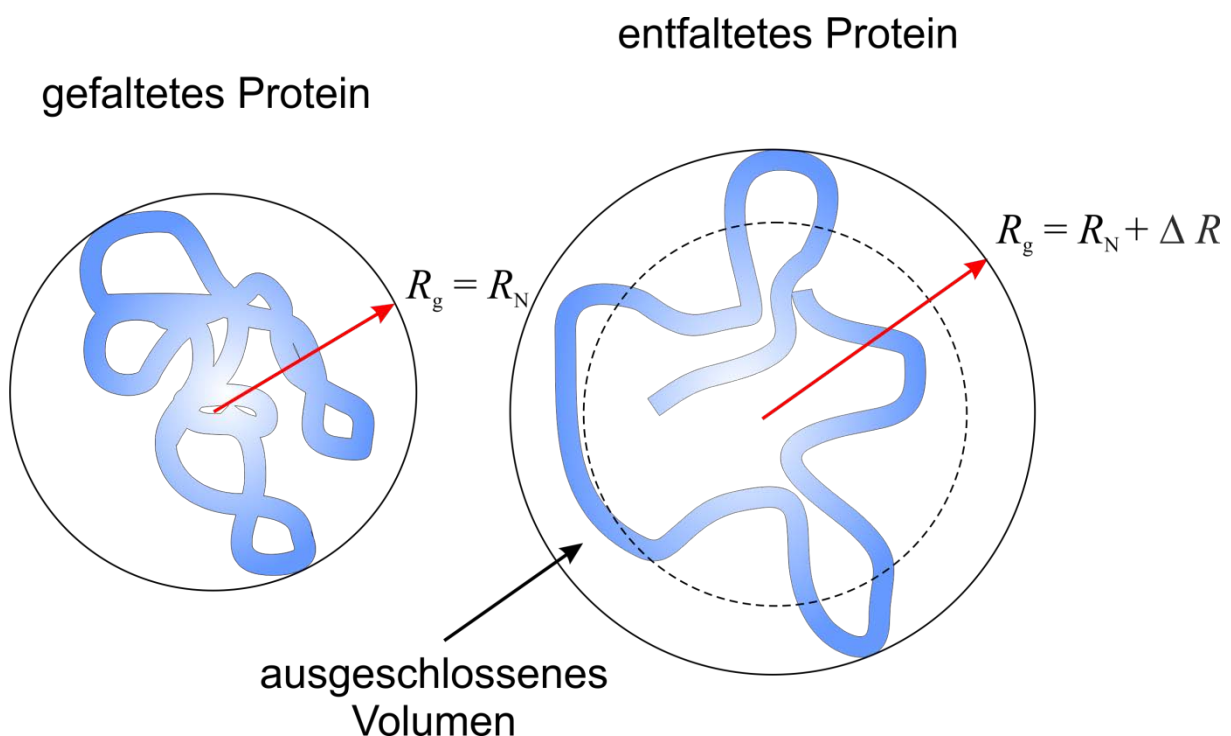


Abbildung 5 Unterschied in der Kompaktheit einer Proteinstruktur im nativen und entfaltenen Zustand. Der Gyrationradius R_g entspricht im nativen Zustand dem Radius R_N . Bei einer Entfaltung vergrößert sich R_g um ΔR und führt somit zu einem Volumenausschluss gegenüber anderen Molekülen.

1.7 Soft-Matter Crowder Ficoll 70

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss eines weichen Confinements mittels eines Crowders auf den inversen Temperaturübergang des Elastinpeptids GVG(VPGVG)₃ untersucht. Ein Beispiel für einen weichen Crowder zum Verdichten von Lösungen stellt Ficoll PM[®] 70 dar. Ficoll ist ein kompaktes, stark kreuzverlinktes und verzweigtes Copolymer aus Sucrose- und Epichlorhydrineinheiten (Abbildung 6). Seine räumliche Struktur gleicht einer halb-rigiden Sphäre mit einem hydrodynamischen Radius von ca. 55 Å. Es hat eine relativ geringe Viskosität in Wasser, ein durchschnittliches Molekulargewicht von 74 kDa und verhält sich eher wie eine relativ offene Struktur als wie eine kompakte Sphäre ^[8]. Ficollösungen sind stabil im basischen pH-Bereich, aber bei niedrigen pH-Werten (pH 3) findet eine rasche Hydrolyse des Polymers, vor allem bei hohen Temperaturen, statt ^[60].

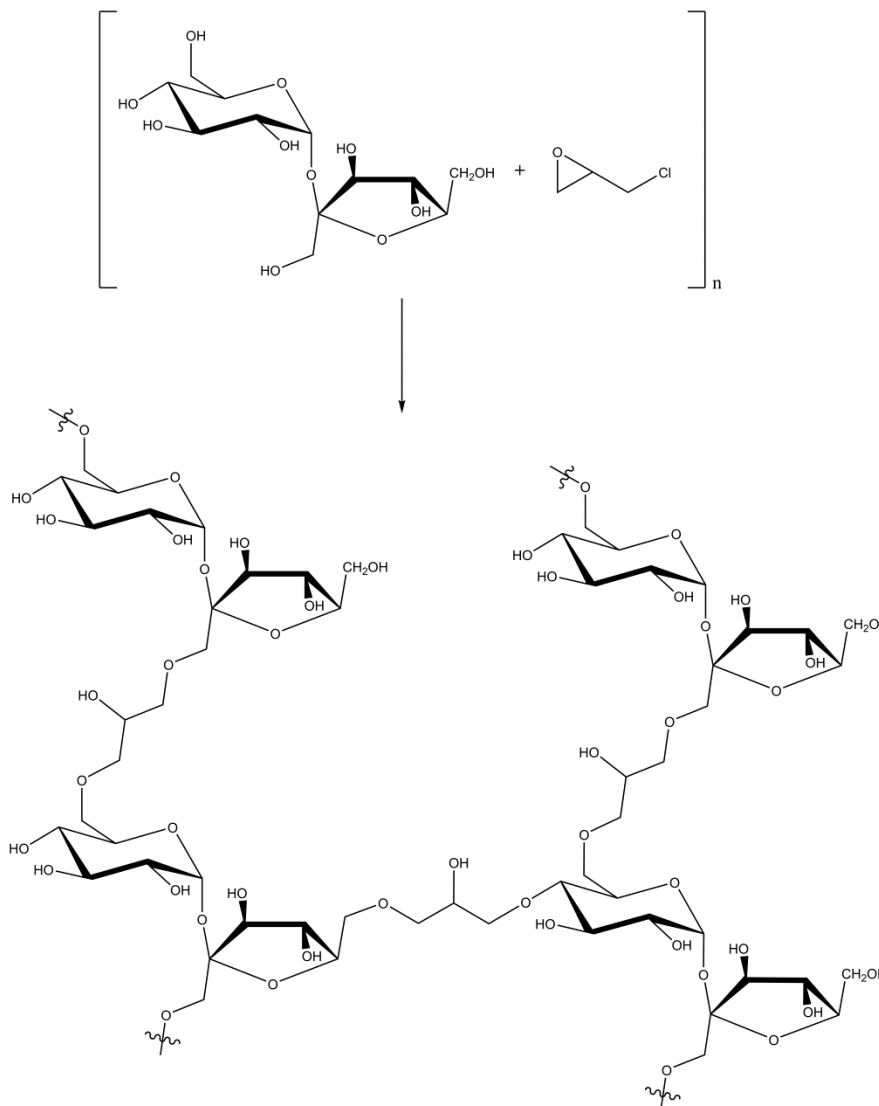


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Struktur des Ficollpolymers. Die Verknüpfung der Sucroseeinheiten erfolgt durch Epichlorhydrin.

1.8 Hard-Matter Confinement Systeme

1.8.1 Mesoporöse Molekularsiebe und ihre Anwendungen

Die Adsorption von Proteinen an anorganischen Festkörpern und Grenzflächen ist nicht nur von großem wissenschaftlichem Interesse, sondern findet darüber hinaus Anwendung in zahlreichen Gebieten. In der Medizin und der Lebensmittelindustrie stellen Adsorptionsprozesse ein Problem dar und müssen verhindert werden, da sich sonst sehr einfach an kleinsten Mengen immobilisierten Proteins weitere fibröse Proteinspezies anlagern können und zu unerwünschten biologischen Folgen führen können. So kann Proteinadsorption zum Beispiel zu Blutgerinnung und Herzerkrankungen beitragen. Die Adsorption (oder auch Einlagerung/Immobilisierung) von Proteinen an/in anorganische Wirtsmaterialien ist aufgrund der Tatsache, dass die Enzymstabilität unter extremen Bedingungen gewährleistet bleibt, von großer Bedeutung ^[61]. Folglich ist die Kontrolle des Adsorptionsprozesses ein wichtiger Forschungsbereich in der Enzymkatalyse, auf dem Gebiet der Biosensoren und der Krankheitsdiagnostik.

Die Entdeckung mesoporöser Molekularsiebe (nachfolgend als MPS abgekürzt) eröffnete neue Möglichkeiten in vielen Bereichen der Chemie und den Materialwissenschaften ^[62-64]. Die mesoporösen anorganischen Wirtsmaterialien werden mittlerweile durch standardisierte hydrothermische Synthesen erhalten und zeichnen sich durch eine regelmäßige Anordnung der Mesoporen mit geringer Porengrößenverteilung aus. Entsprechend der IUPAC Definition werden Poren mit Durchmessern zwischen 2 und 50 nm als Mesoporen bezeichnet. Weitere vorteilhafte Eigenschaften mesoporöser Materialien sind hohe spezifische Oberflächen (bis zu ca. 1500 m²/g) und hohe spezifische Porenvolumina (bis zu ca. 1,5 cm³/g), was sie zu idealen Kandidaten für die Beherrschung von Biomolekülen macht. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, durch Veränderung der Synthesebedingungen und postpräparative Methoden die Eigenschaften der MPS maßgeschneidert zu modifizieren. So kann die Geometrie der Poren als auch die Funktionalisierung der Oberflächengruppen vorgenommen werden, um beispielsweise die Einlagerung zahlreicher Proteine, Enzyme oder anderer Biomoleküle zu begünstigen oder zu optimieren. MPS erfüllen zudem weitere Anforderungen an Wirtsmaterialien zur Einlagerung von Biomolekülen, wie ausreichend vorhandene funktionelle Gruppen für die Wechselwirkung mit Enzymen, hydrophiler/hydrophober Charakter, Wasserunlöslichkeit, chemische und thermische Stabilität, mechanische Festigkeit, passende Partikelform, Wiederverwertbarkeit und toxikologische Sicherheit. MPS werden demnach gegenüber mikroporösen Zeolithen und zeotypischen Sieben bei der Adsorption und Umwandlung großer organischer Moleküle bevorzugt ^[65].

Die Beobachtung, dass einige in regelmäßig angeordneten mesoporösen Festkörpern eingelagerte Enzyme ihre Funktion bewahren, erweckte großes Interesse an dieser Materialklasse, sodass die Erforschung der Einkapselung zahlreicher Enzyme und anderer bioaktiver Substanzen schnell voranschritt. Viele der verwendeten Biomaterialien zur Einlagerung in MPS und kohlenstoffbasierten Materialien wurden mittlerweile in diversen Reviews zusammengefasst ^[66–68].

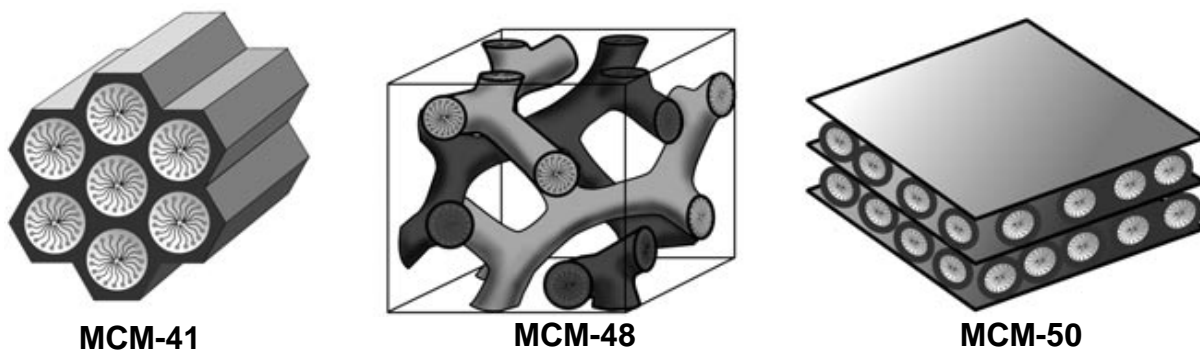


Abbildung 7 Schematische Strukturen mesoporöser M41S Materialien. Nach Referenz 68. ^[69]

Der Ausgangspunkt intensiver Forschung auf dem Gebiet der mesoporösen Materialien war die Veröffentlichung der M41S Familie aus Silikat-/Aluminiumsilikat-basierten mesoporösen Molekularsieben durch Wissenschaftler der Firma Mobil. In Abhängigkeit von der Art und Form des verwendeten supramolekularen Templats wurde eine hexagonale (MCM-41 = Mobil Composition of Matter No. 41 ^[62,70]), kubische (MCM-48 ^[71]) oder lamellare/schichtartige (MCM-50 ^[72]) Phase erhalten (Abbildung 7). Für die Entstehung dieser Materialien wird ein flüssig-kristalliner Templatmechanismus angenommen, bei dem das Silikat anorganische Wände/Strukturen um und zwischen geordneten Tensidmizellen bildet. Huo et al. synthetisierten eine neue Klasse von MPS mit einer dreidimensionalen kubischen Struktur unter stark sauren Bedingungen und benannten diese SBA-1 (Santa Barbara Material No. 1) ^[73]. SBA-1 besitzt eine käfigartige Struktur mit fensterartigen Öffnungen. Im Jahr 1998 wurde das MPS SBA-15 mit stark geordneten großen Poren, dicken Porenwänden (ca. 3 nm) und einer zweidimensionalen Tunnelstruktur bestehend aus einer hexagonalen Anordnung von Mesoporen mit Durchmessern zwischen 8 und 30 nm, die untereinander durch Mikroporen verbunden sind, synthetisiert ^[63,74]. MCM-41 besitzt eine honigwabenartige Anordnung einheitlich großer Kanäle, die nicht untereinander (wie zum Beispiel durch Mikrokanäle) verbunden sind. Die Poren dieses MPS haben in Abhängigkeit vom verwendeten Templat während der Synthese Durchmesser zwischen 1,5 und 10 nm. Weitere, die Morphologie beeinflussende Faktoren sind die Zugabe von Coblockpolymeren als strukturdirigierende Agentien, die Veränderung der Synthesebedingungen, wie beispielsweise der Reaktionszeit oder -temperatur und eine postsynthetische Behandlung ^[62,70]. In

der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Funktionalisierungen an den SBA-15 realisiert. Diese Funktionalisierungen bestanden zum einen aus durch Kokondensationen eingeführten Carboxylatgruppen und zum anderen aus postpräparativen Umsetzungen zu Aminogruppen, wobei MCM-41 nur durch letzteres umgesetzt werden konnte (Abbildung 8).

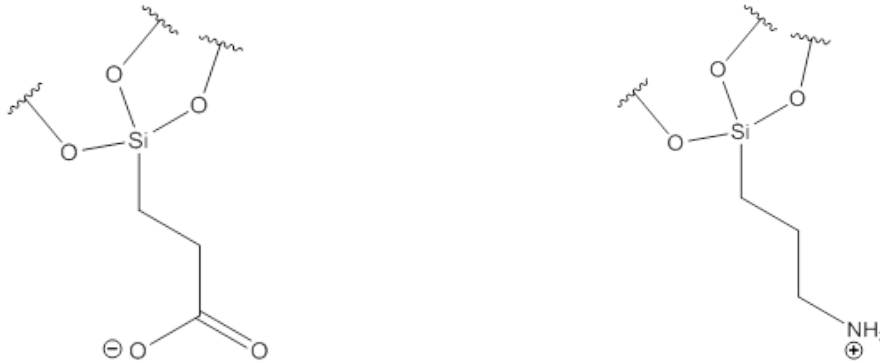


Abbildung 8 Schematische Darstellung der Silikatoberflächen nach Funktionalisierung der MPS mit Carboxylat- (links) und Aminogruppen (rechts) bei pH 7.

MCM-48 ist ein kubisches Phasenmaterial mit einer $Ia\bar{3}d$ -Symmetrie, bestehend aus einem enantiomeren Paar an nicht-verknüpften dreidimensionalen Tunnelsystemen, die ineinander verdreht/verzweigt sind. Das kubische Phasenmaterial MCM-48 ist durch die Arbeitsgruppe von Prof. Roland Winter intensiv untersucht worden und dient in dieser Arbeit zum Vergleich des Einflusses der Morphologie verschiedener MPS auf den Einlagerungsvorgang ^[75,76]. SBA-15 besitzt ein ungünstiges Verhältnis von Porendurchmesser zu Wanddicke, welches vergleichsweise besser bei MCM-41 ist, trotz dessen geringerer Wanddicke ^[77]. Die allgemeinen Eigenschaften der am häufigsten eingesetzten MPS sind in Tabelle 1 aufgelistet und jene explizit in dieser Arbeit verwendeten MPS sind in Tabelle 3 (Abschnitt 2.5) aufgeführt.

Tabelle 1 Eigenschaften einiger ausgewählter MPS.

| | MCM-41 ^[62,70] | MCM-48 ^[71] | SBA-15 ^[63] |
|---------------------------------|--|--|--|
| Porenstruktur | hexagonal, unverbunden, unidirektional | kubisch, unverbunden, umeinander verdreht | hexagonal, einheitlich, tubulär (verbunden durch Mikroporen) |
| Templat | kationische Tenside aus Alkylketten der Länge C8-C22 | kationische Tenside aus Alkylketten der Länge C8-C22 | amphiphile Triblock Kopolymere P123 |
| Synthesebedingung | alkalisch | alkalisch | sauer |
| Raumgruppe | $P6mm$ | $Ia\bar{3}d$ | $P6mm$ |
| Porendurchmesser | 2-5 nm | 1,5-3 nm | 5-10 nm |
| Porengrößenverteilung | eng | eng | eng, bimodal |
| Partikelmorphologie | sphärisch | sphärisch | stäbchenartig |
| Kinetik des Massentransports | ungünstig | günstig | ungünstig |

1.8.2 Metall-organische Gerüste

Die Synthese und Anwendung metall-organischer Wirtsmaterialien (engl.: metal-organic frameworks, MOFs) zog in den letzten zwei Jahrzehnten große Aufmerksamkeit auf sich, vor allem aufgrund der vielseitigen Möglichkeiten, zahlreiche verschiedene Strukturen für diverse Anwendungen im Bereich poröser Materialien zu generieren ^[78,79]. Das Konzept des MOF-Engineering beruht auf der Selbstorganisation von kationischen Metallionen als Knoten mit organischen Liganden als Verbindungsgliedern (Abbildung 9). Einige vorteilhafte Charakteristika, die sie mit den mesoporösen Silikaten gemein haben, sind beispielsweise regelmäßig angeordnete Strukturen, eine geringe Porengrößenverteilung, hohe Porosität bei geringer Dichte und ihre strukturelle Modifizierbarkeit. Die größte Schwäche von MOFs liegt in ihrer im Vergleich zu Oxiden (Zeolithen) geringeren thermischen, hydrothermalen und chemischen Stabilität ^[80], wobei jedoch die schwerwiegendste Limitatierung bei der Anwendung mit biologischen Molekülen ihre Instabilität gegenüber wässrigen Lösungen darstellt. Die traditionellen Anwendungsgebiete betreffen die Einlagerung kleinerer Gastmoleküle, Separationen und die immer mehr an Bedeutung gewinnende Verwendung in der (Bio-)Katalyse, in der die Porengröße und -form sowie die Gast-Wirt-Interaktionen eine entscheidende Rolle spielen. Darüber hinaus werden MOFs hinsichtlich ihres vielversprechenden Potentials zur Anwendung in der Biomedizin oder als Sensoren intensiv erforscht.

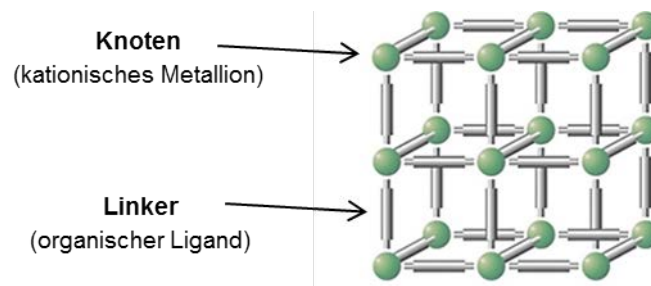


Abbildung 9 Schematische Darstellung zum Bauprinzip der MOFs.

Seit der Veröffentlichung der Synthese und Charakterisierung neuer Lanthanoid-organischer Materialien mit Öffnungen im Mesoporenmaßstab erfolgte die intensive Erforschung für ihren Einsatz in der Biokatalyse. Wie nach einem Baukastenprinzip entstehen in einer solvothermalen Reaktion aus Terbiumnitrat ($\text{Tb}(\text{NO}_3)_3$) und dem organischen Linker 4,4',4''-S-triazine-2,4,6-triyl-tribenzoat (H_3TATB) optisch transparente Tb-mesoMOF-Kristalle ^[79]. Diese bestehen aus 3,9 und 4,7 nm großen Käfigen (Öffnungsdurchmesser betragen 1,3 und 1,7 nm), zeichnen sich durch eine außerordentlich hohe thermische Stabilität aus und weisen darüber hinaus die nötige Biokompatibilität zur Inkorporation von Proteinen in wässrigen Puffersystemen auf. Bisher wurde von der erfolgreichen Beherbergung

verschiedener Enzyme wie Cytochrom C, MP-11 und Myoglobin in Tb-mesoMOFs unter Erhalt ihrer katalytischen Funktion berichtet ^[81–83].

In dieser Arbeit sollte die Eignung dieser Wirtsklasse - zusätzlich zu den mesoporösen Silikaten - als harte geometrische Einschränkung für physikochemische Untersuchungen erprobt werden. Eine Durchlichtmikroskopie-Aufnahme der zu diesem Zweck synthetisierten Tb-mesoMOF-Kristalle ist in Abbildung 10 gezeigt.



Abbildung 10 Durchlichtmikroskopie-Aufnahme mit vierfacher Vergrößerung der synthetisierten Tb-mesoMOF-Kristalle in Methanol.

1.8.3 Triebkräfte bei der Proteinadsorption/-einlagerung

Liegt ein Protein in seiner nativen gefalteten Form vor, besitzt die kompakte Form eine verringerte Konformationsentropie (verglichen mit der flexiblen ungefalteten und ungeordneten Struktur), die durch einen entropischen und enthalpischen Beitrag zahlreicher strukturbestimmender inter- und intramolekularer Wechselwirkungen ausgeglichen wird. So beträgt die Gibbs-Energiedifferenz, die zur Entfaltung eines Proteins benötigt wird, gerade einmal 30 kJ/mol und zeigt, wie empfindlich das Gleichgewicht zwischen nativem und denaturiertem Zustand eines Proteins ist. Die Kräfte, die hierbei von Bedeutung sind, sind elektrostatische, hydrophobe und van der Waals (Dispersions)-Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen. Das Zusammenspiel all dieser Beiträge zur Proteinstabilität ist die Ursache dafür, dass die native dreidimensionale Struktur eines (globulären) Proteins nur geringfügig stabiler als der entfaltete Zustand ist ^[84]. In Anwesenheit eines Adsorbats/einer adsorbierenden Fläche, die geladen und oder hydrophil/hydrophob ist, wird das empfindliche Wechselwirkungskräfte-Gleichgewicht gestört, was schließlich zu einer spontanen Anlagerung/Adsorption führen kann, die jedoch mit strukturellen Konformationsänderungen des Proteins einhergehen kann ^[85]. Unabhängig vom Mechanismus, dem dieser Prozess zu Grunde liegt, steht fest, dass für eine spontane Adsorption bei konstanter Temperatur T und konstantem Druck p bei thermodynamischer Betrachtung die Änderung der Gibbs-Energie ΔG negativ sein muss. Dies kann nach folgender Gleichung 5 nur

realisiert werden, wenn die Enthalpie H abnimmt und/oder die Entropie S des Systems steigt:

$$\Delta_{\text{ads}}G = \Delta_{\text{ads}}H - T \Delta_{\text{ads}}S. \quad (5)$$

Hierbei können G , H , und S als spezifische Werte angegeben werden (pro Mol des Proteins) und Δ_{ads} steht für eine Änderung im Zuge eines Adsorptionsvorgangs. Zur Erklärung des Mechanismus der Adsorption eines Proteins müssen die verschiedenen, zu $\Delta_{\text{ads}}G$ beitragenden Interaktionen einbezogen werden. Zu diesen zählen die Veränderung der Hydratation, Umverteilung geladener Gruppen (elektrostatische Wechselwirkungen) und die strukturellen Neuordnungen innerhalb des Proteins. Die Anwesenheit einer Grenzfläche stellt einen Bereich dar, an dem das Protein entfalten kann, ohne hydrophobe Bereiche zur wässrigen Phase hin zu exponieren. Dies geschieht auf Kosten der intramolekularen hydrophoben Wechselwirkungen, die maßgeblich an der Bildung der Sekundärstruktur wie beispielsweise α -Helices und β -Faltblättern eines Proteins beteiligt sind. Folglich kann eine Reduktion der regulären Sekundärstrukturen zu einem maßgeblichen Anstieg der Konformationsentropie des adsorbierenden Proteins führen.

Falls die Adsorbat- und Adsorbensoberflächen polar sind, ist ihre Hydratation begünstigt, sodass im Umkehrschluss ein Abbau dieser Hydratschicht einem Adsorptionsprozess entgegenwirkt und angenommen werden kann, dass einige Hydratmoleküle zwischen der Adsorbat- und Proteinoberfläche bestehen bleiben. Ist jedoch eine von den beiden angrenzenden (Kontakt-)Oberflächen hydrophob, würde eine Dehydratation eine Adsorption begünstigen/fördern. Die Verringerung der Gibbs-Energie durch Dehydratation einer hydrophoben Oberfläche wird zu $5\text{-}12 \text{ mJ/m}^2$ abgeschätzt und hat hauptsächlich eine Entropieminimierung als Ursache. So kann beispielsweise ein Protein mit einem Molekulargewicht von 15 kDa und einem Adsorptionsvermögen von $\text{ca. } 1 \text{ mg/m}^2$ zu einer Verminderung der Gibbs-Energie (im Zuge einer Adsorption) zwischen -30 und $-75 RT$ pro Mol des Proteins beitragen ^[86,87]. Dies verdeutlicht die große Bedeutung, die der hydrophoben Dehydratation bei spontanen Anlagerungsprozessen zukommt.

In der Regel sind sowohl Proteinoberfläche als auch das Adsorbat elektrisch geladen und in wässriger Umgebung sind diese Ladungen durch entsprechende Gegenionen abgeschirmt, sodass insgesamt eine sogenannte elektrische Doppelschicht gebildet wird. Bei Annäherung der Schichten überlagern diese sich und es findet folglich eine Umverteilung der Ionen statt. Besitzt eine der Schichten einen großen Überschuss an Ladungen, würde dies im Zuge eines Adsorptionsvorgangs in eine beträchtliche Nettoladung in der Kontaktregion der

Protein- und Adsorbatgrenzschicht resultieren. Eine solche nicht-wässrige und proteinhaltige Umgebung besitzt eine geringe dielektrische Permittivität relativ zum bulk-Wasser, sodass eine Ladungsakkumulation in diesem Bereich energetisch sehr ungünstig ist. Bei gleichem Ladungsvorzeichen der wechselwirkenden Grenzflächen entstünde eine ähnliche energetisch ungünstige Situation. Dennoch adsorbieren Proteine unter solch elektrostatisch nachteiligen Bedingungen spontan. Ein Erklärungsansatz beschreibt, dass zeitgleich mit der Adsorption niedermolekulare Ionen zwischen den angrenzenden Schichten übertragen werden, um Ladungsanhäufungen entgegenzuwirken ^[88]. Dieser Ansatz konnte experimentell bestätigt werden ^[89] und folglich kann eine Assoziation und Paarung der Ionen in diesem Bereich vorkommen. Jedoch trägt Ionenpaarbildung in der Protein-Adsorbat-Kontaktschicht kaum zu $\Delta_{\text{ads}}G$ bei ^[86]. Sollten jedoch aus anderen Gründen, wie beispielsweise im Falle einer hydrophoben Dehydratation, ionische Gruppen in dieser geringen dielektrischen Umgebung lokalisiert sein, wäre die Ionenpaarbildung stark begünstigt.

Es wird angenommen, dass Beiträge durch Wasserstoffbrückenbindungen (die nicht an dem hydrophoben Effekt beteiligt sind) und dipolare Interaktionen nur geringfügigen Einfluss auf die Adsorptionsaffinität besitzen. Die Ursache hierfür ist, dass H-Brücken und polare Wechselwirkungen zwischen Gruppen an der Protein- und Adsorbatoberfläche auf Kosten der Wechselwirkungen zwischen jenen Gruppen und den Wassermolekülen erfolgen. Da die Hamakerkonstante für Proteine nur geringfügig größer als die des Wassers ist ^[90], spielen dispersive (London-van der Waals) Kräfte kaum eine Rolle bei der Proteinadsorption aus wässriger Lösung.

Die adsorbierte Proteinmenge ist abhängig von den elektrischen Ladungen, der Hydrophobizität und Stabilität der Proteinstruktur. Im Falle einer Dominanz globaler elektrostatischer Wechselwirkungen der interagierenden Spezies beim Adsorptionsvorgang ist die adsorbierte Proteinmenge eine monotone Funktion des pH-Wertes, die entweder abnimmt bei Vorliegen einer negativ geladenen Oberfläche oder umgekehrt zunimmt bei einer positiv geladenen Oberfläche.

Im Allgemeinen wird bei der Adsorption auf Festkörpern ein Erreichen eines Maximums der adsorbierten Menge nahe des isoelektrischen Punktes (pI-Wertes) des Proteins beobachtet. Dies lässt sich anhand lateraler Abstoßungskräfte zwischen geladenen Proteinmolekülen verstehen, was der Bildung dichtgepackter Monoschichten entgegenwirkt. Darüber hinaus übt der pH-Wert einen Einfluss auf die strukturelle Stabilität der Proteine aus. Es ist bewiesen, dass eine Veränderung des pHs das Ausmaß der strukturellen Veränderung, die

ein Protein beim Adsorptionsprozess erfährt, beeinflusst ^[85]: strukturelle Umstrukturierungen sind umso ausgeprägter, je weiter der pH-Wert vom pI abweicht. Eine Sättigung der Adsorptionskurve spiegelt die gesamten elektrostatischen Wechselwirkungskräfte zwischen dem Adsorbens und dem Adsorbat wieder und es ist festzuhalten, dass Ladungsveränderungen (und somit auch die strukturelle Stabilität) des Proteins einen größeren Einfluss auf die Adsorptionskapazität haben als eine Modifikation der Ladungsdichte des Adsorbens ^[86].

Eine Einschätzung des Einflusses der Hydrophobizität ist im Allgemeinen schwierig, da eine Veränderung der hydrophoben Eigenschaften mit einer Veränderung in der chemischen Zusammensetzung einhergeht, und folglich oftmals auch mit der Ladungsdichte der Oberfläche. Generell wurde ein Anstieg der Adsorptionsaffinität mit steigender Oberflächenhydrophobizität festgestellt und es ist im Allgemeinen zu beobachten, dass strukturelle Änderungen an hydrophoben Grenzflächen stärker ausgeprägt sind. Neben einigen hydrophoben Bereichen an der Proteinoberfläche trägt vermutlich auch die Gesamthydrophobizität eines Proteinmoleküls zum Adsorptionsverhalten bei. Diese beeinflusst die strukturelle Stabilität eines Proteins und kann demnach durch mehr oder weniger starke Umstrukturierung beim Adsorptionsprozess die Affinität dieses Vorgangs beeinflussen. Die Beobachtung zahlreicher verschiedener einflussnehmender Faktoren, wie Temperatur, pH, Ionenstärke etc., auf die adsorbierte Proteinmenge ^[85] und das Auftreten einer verminderten biologischen Aktivität lassen auf einen umstrukturierten Zustand des adsorbierten Proteins deuten. So wurde mittels Transmissions-Zirkulardichroismus (CD) eine Abnahme des α -helikalen Gehalts adsorbierter Proteine auf ultrafeinen Silikapartikeln beobachtet ^[91], wobei das Ausmaß der Helixreduktion mit abnehmender Stabilität des nativen Zustandes des Proteins und abnehmender Bedeckung der Adsorbatoberfläche anstieg. Eine Störung der geordneten Sekundärstruktur hat eine höhere Konformationsentropie des Proteins zur Folge. Eine Untersuchung mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) an demselben System zeigte, dass die Adsorption ein endothermer Vorgang ist, getrieben durch einen Anstieg der Entropie ^[91]. Folglich würde die Zunahme der Konformationsentropie genügen, um eine ungünstige Enthalpieänderung, die durch die Adsorption hervorgerufen wird, zu kompensieren. Aus DSC-Untersuchungen ^[86,92] wurde geschlossen, dass Proteine an hydrophoben Oberflächen viel von ihrer geordneten Struktur verlieren, wohingegen an hydrophilen Oberflächen in Proteinen, die eine stärkere interne Kohärenz in Lösung aufweisen, weitestgehend eine geordnete Struktur aufrecht erhalten bleibt und im Gegensatz hierzu weniger stabile Proteine ihre Ordnung fast vollständig verlieren. Demzufolge lässt sich sagen, dass der Einfluss der Proteinestabilität auf das Adsorptionsverhalten am stärksten an hydrophilen Oberflächen zum Vorschein kommt.

1.8.4 Allgemeine Faktoren bei der Einlagerung von Proteinen in MPS

Die Einlagerung von Proteinen in hexagonale MPS ist ein komplexer Vorgang aufgrund vielfältiger Wechselwirkungsmöglichkeiten und beeinflussender Faktoren, sodass zahlreiche grundlegende Gesichtspunkte Berücksichtigung finden müssen ^[93]. Zu nennen sind hier vor allem folgende Szenarien, die sich während der Inkubation ereignen können und in Abbildung 11 veranschaulicht sind. Zum einen kann es zu einer externen Adsorption, d.h. auf der äußeren Silikatoberfläche, kommen und zum anderen ist ein Verstopfen der Poreneingänge möglich. Die Lokalisation der Proteine ist abhängig von der relativen Größe der Mesoporen und des Proteins, der Partikelgröße und Morphologie, der Stabilität des MPS und des Proteins, dem isoelektrischen Punkt (pI) der verwendeten Proteinspezies bzw. des pH-Wertes der Lösung an dem die MPS keine Nettoladung besitzen (point of zero charge = PZC) und den funktionellen Gruppen an den Oberflächen. Um optimale Bedingungen für die Immobilisierung zu schaffen, sind viele Faktoren zu berücksichtigen. Hierbei sind die Faktoren, die den Einlagerungsprozess beeinflussen, der pH-Wert, die Ionenstärke, die Porengröße und das Porenvolumen, die Oberflächengröße, die Oberflächenladungsdichte und -ladungsverteilung und letztlich auch die Inkubationsbedingungen. Ein großes Problem stellt zudem das wieder Herausdiffundieren eingelagerter Proteine dar, was v.a. bei der Anwendung in der Biokatalyse ein wichtiger Faktor ist.

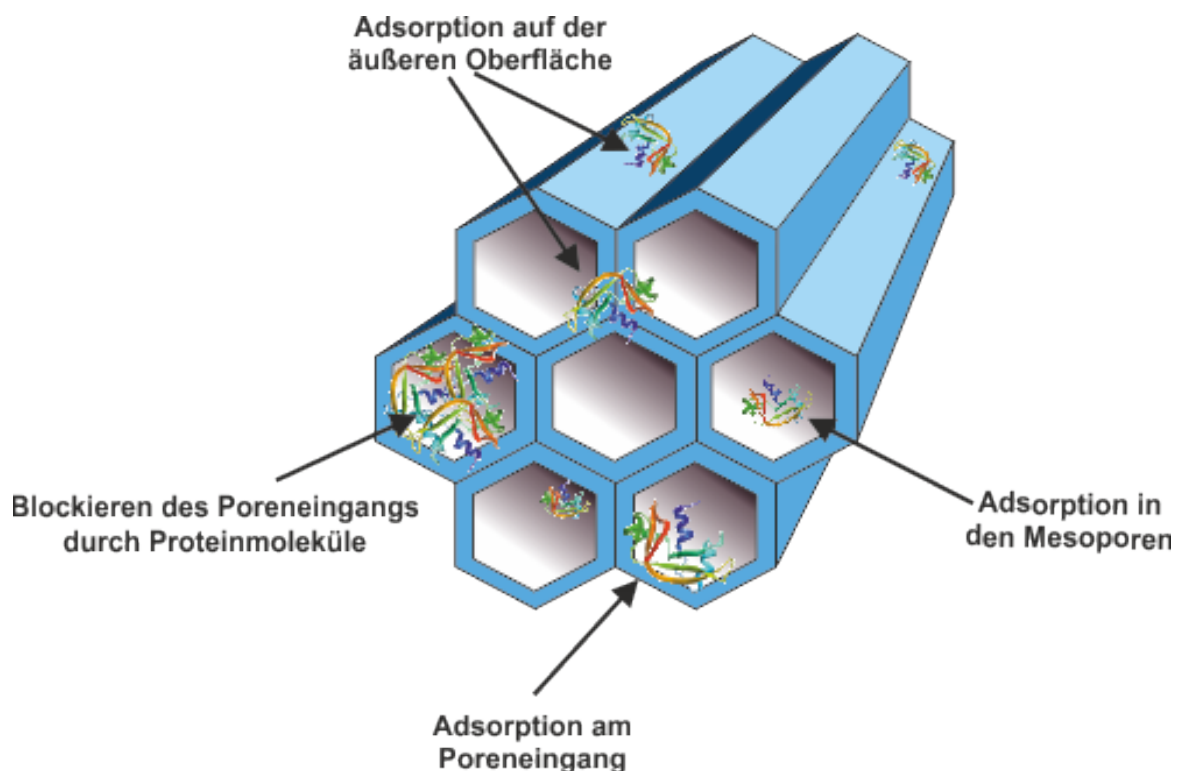


Abbildung 11 Schematische Darstellung der verschiedenen Lokalisationsoptionen von Proteinen bei der Adsorption an hexagonalen MPS.

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf dem Einfluss der einschränkenden Geometrien auf physikochemische Eigenschaften des Modellproteins RNase A. In Vorarbeiten wurde bereits eine drastische Temperaturstabilitätserhöhung in unfunktionalisierten SBA-15 und MCM-41 ermittelt ^[7,23,75,76], sodass in der vorliegenden Arbeit im Wesentlichen auf den Einfluss von funktionalisierten Silikaten eingegangen wird.

1.9 Kosolvenzien und deren Einflüsse auf Biomoleküle

Bei Betrachtung der Umgebung eines Proteins *in vivo*, in der viele weitere Komponenten wie andere Proteine, Nukleinsäuren, Polysaccharide, Lipide und eine Vielzahl kleiner anorganischer und organischer Moleküle vorkommen, wird deutlich, dass die Einbeziehung derselben bei der Untersuchung physikalisch-chemischer Eigenschaften unabdingbar ist ^[94–96]. Aber auch die Solvenseigenschaften selbst werden sowohl durch Grenzflächen als auch durch die Topologie und der chemischen Oberflächenbeschaffenheit des Confinements beeinflusst. So besitzen beispielsweise die ersten 1-2 Hydratwasser-Monolagen besondere physikalische Eigenschaften ^[97–107]. Eine Einteilung der zahlreichen verschiedenen Kosolvenzien erfolgt üblicherweise nach ihrem Vermögen, die native Proteinstruktur zu stabilisieren oder zu destabilisieren.

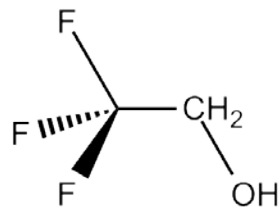
Um diese gegensätzlichen Effekte zu verstehen, kann ein einfaches Modell, bestehend aus dem hydratisierten Protein (Pr) und einem Liganden (L), herangezogen werden. Ist die Bindung des Liganden an das Protein energetisch günstiger als die Bindung von Wassermolekülen, ist von präferentieller Bindung die Rede. Im umgekehrten Fall, d.h. wenn Wasser bevorzugt gebunden wird, spricht man von präferentieller Exklusion (engl.: preferential exclusion) bzw. einer präferentiellen Hydratisierung ^[108–111].

Im Falle einer Proteinfaltung liegt ein Gleichgewicht zwischen nativem und denaturiertem Zustand vor, was durch die Anwesenheit und Art der vorliegenden Kosolvenzien beeinflusst werden kann.

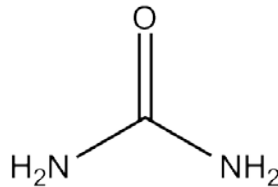
$$\Delta\Delta G_{\text{unf.}}^0 = \Delta G_{\text{unf.,L}}^0 - \Delta G_{\text{unf.,H}_2\text{O}}^0 = \Delta\mu_{\text{Pr,trans.}}^{\text{D}} - \Delta\mu_{\text{Pr,trans.}}^{\text{N}} \quad (6)$$

Unter der Annahme, dass der Einfluss eines Kosolvens auf die Gibbs-Energie der Entfaltung der Differenz der freien Transferenergien von denaturiertem ($\Delta\mu_{\text{Pr,trans.}}^{\text{D}}$) und nativem ($\Delta\mu_{\text{Pr,trans.}}^{\text{N}}$) Zustand $\Delta\Delta G_{\text{unf.}}^0$ entspricht (Gleichung 6), lassen sich die beiden möglichen Szenarien folgendermaßen nachvollziehen: Binden Moleküle bevorzugt an das Protein, führt dies zu einer Destabilisierung durch eine Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung des entfalteten Zustandes, da das entfaltete Protein eine größere Oberfläche bzw. mehr exponierte Aminosäureseitengruppen für Wechselwirkungen mit dem Kosolvens zur

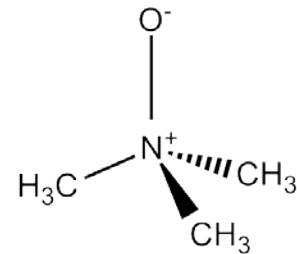
Verfügung stellt und folglich mehr Liganden an das Protein binden können. Im umgekehrten Fall der präferentiellen Hydratisierung wird der native Zustand des Proteins stabilisiert, da die kompakte Proteinstruktur weniger Hydratmoleküle bindet, die folglich mit den Kosolvenzien interagieren können.



2,2,2-Trifluorethanol
(TFE)



Harnstoff



Trimethylamin-N-oxid
(TMAO)

Abbildung 12 Molekulare Strukturen der Kosolvenzien TFE, Harnstoff und TMAO.

In Abbildung 12 sind die chemischen Strukturen der in dieser Arbeit untersuchten Kosolvenzien dargestellt. In den 1990er-Jahren wurden zahlreiche Untersuchungen an dem organischen Lösungsmittel 2,2,2-Trifluorethanol (TFE) gemacht und bis heute ist der Wirkmechanismus der Einflussnahme des TFE auf Proteine/Peptide aufgrund einer Vielzahl verschiedener Ergebnisse noch nicht vollständig verstanden. Einerseits ist bekannt, dass es als ein indirektes Chaotrop wirkt, welches α -Helices stabilisiert ^[112,113]. Andererseits kann es als ein Kosmotrop agieren, welches durch Desolvatation den ungefalteten Zustand eines Proteins destabilisiert ^[114,115]. Bezüglich des Einflusses von TFE auf Peptide und Proteine finden sich kontroverse Meinungen in der Literatur. Es gibt jedoch einen Konsens über eine Stärkung lokaler hydrophober Wechselwirkungen in α -Helices ^[116,117], β -Schleifen und β -Haarnadelschleifenstrukturen ^[118]. Weiterhin konnte die Annahme, dass TFE tatsächlich an hydrophobe Gruppen bindet ^[114], durch experimentelle Daten belegt werden ^[24,119–122]. Zusätzlich wurde ermittelt, dass TFE die tertiäre Struktur unter Erhalt der Sekundärstruktur bewahren kann ^[113]. Ein Strukturmodell von Reiersen et al. zur Erklärung der verschiedenen Effekte dieses Kosolvens wurde anhand eines Elastinpeptids in Lösungen mit steigendem TFE-Gehalt und bei unterschiedlichen Temperaturen entwickelt ^[118]. Maßgeblich war hierbei die Kenntnis der Bildung von Clustern bei TFE-Konzentrationen unterhalb von 50 % (v/v), in denen die Bildung von Sekundärstrukturen gefördert wird. Durch das Aufbrechen von Bindungen des Peptids mit dem Wasser an der Grenzfläche wird somit eine Umgebung geschaffen, in der Seitenketteninteraktionen begünstigt sind. Darüberhinaus bieten die konzentrationsabhängigen Unterschiede in der Größe der Cluster einen Erklärungsansatz der zum Teil konträren und vielfältigen Wechselwirkungsmodi ^[123].

Unter biologischen Gesichtspunkten ist eine Akkumulation biokompatibler Kosolvenzien innerhalb der Zelle vor allem bei extremophilen Mikroorganismen, die beispielsweise in der Tiefsee vorkommen, zu finden. In diesen haben sie die Funktion, osmotischem und/oder anderem umweltbedingten Stress entgegen zu wirken ^[96,124,125]. Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) ist ein natürlich vorkommender Osmolyt, der Proteine stabilisiert und den destabilisierenden Einfluss von Chaotropen, wie Harnstoff, *in vivo* unterdrücken kann und somit ein sog. "chemisches Chaperon" darstellt. Es stabilisiert die native Proteinkonformation durch unspezifische Wechselwirkungen ^[108,126,127], wohingegen Harnstoff durch spezifische Wechselwirkungen mit dem Peptidrückgrat zu einer Destabilisierung führt. Sowohl Harnstoff als auch TMAO wurden in hohen Konzentrationen in einigen Meerestieren, wie beispielsweise Elasmobranchii (Haie und Rochen), gefunden. Es zeigte sich, dass diese beiden Kosolvenzien von diesen Organismen zur Regulation der Proteinstabilität bei variierenden Umgebungsbedingungen eingesetzt werden, wobei die maximale kompensatorische Wirkung bei einem Mischungsverhältnis des TMAO zu Harnstoff von etwa 1:2 vorliegt ^[96,125,128].

In dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Kosolvenzien (TFE, ¹³C-Harnstoff, TMAO und eine Mischung aus TMAO:Harnstoff in einem Verhältnis von 1:2) auf die temperaturabhängige Peptidkonformationsumwandlung und den inversen Temperaturübergang eines ELPs mittels FTIR-Spektroskopie untersucht. Für die Messungen wurde Harnstoff mit dem Isotop ¹³C verwendet, da andernfalls die Carbonylstreckschwingung des ¹²C-Harnstoffs mit ihrer maximalen Intensität bei ~1618 cm⁻¹ in D₂O aufgrund der hohen verwendeten Konzentrationen die Amid-I'-Bande des ELPs überlagern würde. Das ¹³C-Isotop führt dabei aufgrund seiner höheren Masse zur Verschiebung des Maximums der Carbonylschwingung des Harnstoffs zu einer geringeren Wellenzahl von ~1562 cm⁻¹, die außerhalb des Bereichs der Amid-I'-Bande liegt.

1.10 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von einschränkenden Geometrien und des ausgeschlossenen Volumens auf die Stabilität und Konformation von Proteinen und Peptiden zu untersuchen. Des Weiteren wurde der Effekt von verschiedenen Kosolvenzien analysiert. Hierzu wurde im ersten Teil der Arbeit das Modellprotein RNase A in mesoporöse Silikate mit unterschiedlichen Oberflächenfunktionalisierungen eingelagert. Die verwendeten Molekularsiebe waren Silikate des Typs MCM-41 und SBA-15. Diese Materialien besitzen zahlreiche vorteilhafte Charakteristika, wie homogene gutdefinierte Poren, deren Oberflächen durch verschiedene chemische Verfahren mit zahlreichen funktionellen

Gruppen modifiziert werden können. Folglich kann eine hydrophile oder hydrophobe Mikroumgebung der eingelagerten Proteine geschaffen werden. In dieser Arbeit wurde der Einfluss des Lösungsmittel-pH-Wertes und verschiedener Oberflächenfunktionalisierungen auf die Immobilisierung der RNase A untersucht. Des Weiteren wurde der Einfluss einer Veränderung der chemischen Natur der Wände (Hydrophilie/Hydrophobizität) auf die Stabilität des immobilisierten Proteins durch die Verwendung funktionalisierter Organosilikate erforscht. Da es sich bei den Silikaten um unlösliche Festkörper handelt, ist die Wahl der Untersuchungsmethoden physikalisch-chemischer Eigenschaften biologischer Moleküle, die in diese Silikate eingelagert wurden, auf wenige Techniken, wie die der Kalorimetrie, beschränkt ^[11,12,14,16,17,129,130]. Demzufolge wurde die dynamische Leistungskompensations-Differenz-Kalorimetrie (engl.: Difference Scanning Calorimetry, DSC) verwendet, um die Stabilität der eingelagerten Proteine zu untersuchen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss eines makromolekularen Crowders (Soft-Matter-Confinement) sowie der Zugabe einiger Kosolvenzien auf die Konformation eines elastinartigen Peptids mittels der FTIR-Spektroskopie untersucht. Da Kosolvenzien auch die Konformation und transiente Faltung kleiner ungeordneter Peptide beeinträchtigen, könnten sie auch eine wichtige Rolle bei dem inversen Temperaturübergang eines ELPs spielen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit sowohl der Einfluss stabilisierender (TFE, TMAO) und destabilisierender (Harnstoff) Kosolvenzien, als auch einer 1:2-Mischung von TMAO:Harnstoff auf den inversen Temperaturübergang (ITT) des elastinartigen Oktadekamers GVG(VPGVG)₃ untersucht.



2 Experimenteller Teil

2.1 Verwendete Proteine und Chemikalien

In der nachfolgenden Tabelle 2 sind alle verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquelle aufgelistet. Alle Chemikalien und Proteine (Ribonuklease A und Lysozym) wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Tabelle 2 Verwendete Chemikalien und ihre Bezugsquelle.

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|--|---------------|
| Deuteriumoxid | Fluka |
| Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) | Sigma-Aldrich |
| Dimethylacetamid (DMA) | Sigma-Aldrich |
| Ficoll [®] PM 70 | Sigma-Aldrich |
| 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES) | Sigma-Aldrich |
| Lysozym (Katalognummer L6876) | Sigma-Aldrich |
| Methanol | Merck |
| Natriumphosphat monobasisch Dihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) | Sigma-Aldrich |
| Ribonuklease A (Katalognummer R5503) | Sigma-Aldrich |
| Trifluorethanol (TFE) | Fluka |
| Trimethylamin- <i>N</i> -Oxid (TMAO) | Merck |
| Terbiumnitrat Pentahydrat ($\text{Tb}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) | Sigma-Aldrich |
| ¹³ C- Harnstoff | Sigma-Aldrich |
| 4,4',4''- <i>S</i> -Triazine-2,4,6-Triyl-Tribenzoat (H ₃ TATB) | Sigma-Aldrich |
| QuantiPro [™] BCA Assay Kit | Sigma-Aldrich |

2.2 Herstellung der Puffersysteme

Die verwendeten Chemikalien (Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4) zur Herstellung der 10 mM Phosphatpuffer wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Die Einstellung des pH-Wertes auf 5,5, 7 oder 9 erfolgte anhand der Henderson-Hasselbalch-Gleichung aus jeweils 0,2 M Stocklösungen der beiden Salze. Für die FTIR-Messungen wurde D_2O als Lösungsmittel verwendet und der pH-Wert betrug unter Berücksichtigung des Isotopeneffektes 6,65.

Aufgrund einer Inkompatibilität der MOF-Kristalle mit dem Phosphatpuffer, wurden die Experimente zur Einlagerung von Lysozym in Tb-meso-MOFs in einem 50 mM HEPES-Puffer durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine 0,25 M Stammlösung hergestellt und der pH-Wert wurde mittels 1 M NaOH auf 7,5 eingestellt.

2.3 Das Elastinartige Peptid

Die Festphasensynthese, Aufreinigung (vor allem zur Beseitigung des Abspaltungsreagenz Trifluoracetat) und Charakterisierung des elastinartigen Peptides mit der Sequenz GVG(VPGVG)₃ wurde in Darmstadt von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Thiele durchgeführt und im Rahmen der Forschergruppe 1583 zur Verfügung gestellt.

2.4 Herstellung der Tb-mesoMOFs

Bei Raumtemperatur wurden $\text{Tb}(\text{NO}_3)_3$ (30 mg, $6,9 \cdot 10^{-2}$ mmol) und H_3TATB (10 mg, $2,3 \cdot 10^{-2}$ mmol) in einem Gemisch aus DMA/Methanol/ H_2O (2,0/0,4/0,1 mL) in einem luftdichten 25 mL Glasgefäß gelöst ^[131,132]. Die Mischung wurde in verschlossenen Reaktionsgefäßen für 48 h in einem Ofen bei 105 °C zur Reaktion gebracht. Die so entstandenen Kristalle wurden dreimal mit Methanol gewaschen und in Methanol aufbewahrt.

2.5 Präparation und Eigenschaften der MPS

Die Synthese, Funktionalisierung und Charakterisierung aller Silikatmaterialien erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Prof. Buntkowsky in Darmstadt. Die mesoporösen Molekularsiebe SBA-15 mit einem durchschnittlichen Porendurchmesser von 4,9 nm wurden durch standardisierte hydrothermische Synthesen und Calcinierungsmethoden hergestellt, mit denen typischerweise eine regelmäßige Anordnung der Mesoporen mit einer geringen

Porengrößenverteilung erzielt wird ^[63,74]. Die Charakterisierung der Silikate erfolgte mittels der Stickstoff-Physisorption bei 77 K. Hierbei wurde die Porengröße aus dem Adsorptionszweig der Stickstoffadsorptionsisothermen mit dem Modell von Barrett-Joyner-Halenda (BJH) ermittelt ^[133]. Stäbchenartige SBA-15 besitzen eine regelmäßige längliche Morphologie mit einheitlichen Längen um ca. 2–9 μm ^[134], während konventionelle SBA-15 eine fibröse Makrostruktur bestehend aus der Zusammenlagerung vieler stäbchenartiger SBA-15 aufweisen, die eine Länge von 10 μm weit übersteigt. Die bessere Zugänglichkeit der stäbchenartigen SBA-15 führt zur schnelleren (< 10 min bis zur Gleichgewichtseinstellung) und effizienteren (bis zu 533 mg/g) Proteinimmobilisierung ^[135]. In dieser Arbeit wurden folglich nur stäbchenartige SBA-15 verwendet, um eine optimale Immobilisierung zu gewährleisten.

In Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Buntkowsky wurden die Oberflächenmodifikationen hexagonaler MPS via Cokondensation zur Einführung von Carboxylatgruppen bzw. durch postpräparative Aminofunktionalisierung (Propfung/grafting) realisiert. Durch Propfung der reinen Silikate wurde das Amino-funktionalisierte Silikat SBA-15-NH₂ mit einer durchschnittlichen Porengröße von 4,7 nm erhalten ^[136]. Zu diesem Zweck wurden 3 g voraktiviertes MPS in 50 mL abs. Toluol mit 3 g APTES ((3-Aminopropyl)-triethoxysilan) unter Rückfluss für 3 Stunden erhitzt. Der so erhaltene Feststoff wurde mit Diethylether gewaschen und mittels einer Soxhlett-Extraktion mit Dichlormethan aufbereitet.

Die Synthese der Carboxylat-funktionalisierten SBA-15 (SBA-15-COOH) erfolgte mittels der Cokondensationsmethode ^[137,138]. 0,1 Äq. oder 0,9 Äq. des 2-Cyanoethyltriethoxy-Silans (CETES) wurden zu der sauren (7,0 Äq. HCl konz.) wässrigen Lösung des Pluronic® (0,017 Äq. in 193 Äq. dest. Wasser) bei 40 °C unter Rühren hinzugegeben. Anschließend wurden 0,9 Äq. oder 0,1 Äq. TEOS (Tetraethylorthosilicat) hinzugefügt und für weitere 24 h bei 40 °C gerührt. Im Anschluss wurde Material mit einem Verhältnis von CETES:TEOS von 0,9:1 vorbereitet. Die resultierende Dispersion wurde in einen Teflontrog überführt und bei 100 °C für 48 h inkubiert. Die synthetisierten Materialien wurden gefiltert, mit destilliertem Wasser gewaschen, getrocknet und in halb-konzentrierter Schwefelsäure hydrolysiert. Die Hydrolysierung wurde für 24 h bei 95 °C durchgeführt. Das so erhaltene SBA-15-COOH wurde bis zur Neutralisation mit Wasser und anschließend mit Aceton gewaschen. Der Trocknungsprozess erfolgte im Vakuum bei Raumtemperatur.

Die Arbeitsgruppe von Prof. Buntkowsky stellte verschiedene Chargen modifizierter MPS zur Verfügung. Die Carboxylat-funktionalisierten SBA-15 sind hierbei mit E1, E2 und E3 gekennzeichnet und die Amino-funktionalisierten mit N1 und N2.

Die Charakterisierung der MPS erfolgte mit Hilfe der Barrett-Joyner-Halenda (BJH) Methode. Die von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Buntkowsky mittels Adsorptionsmessungen ermittelten Eigenschaften aller MPS sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3 Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten mesoporösen Silikate (MPS).

| MPS | Porendurchmesser / nm | Porenvolumen / $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ | Oberfläche / $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ |
|-----------------------------|-----------------------|--|---|
| SBA-15 | 4,9 | 0,544 | 475,1 |
| SBA-15-COOH (E1) | 4,0 | 0,139 | 98,6 |
| SBA-15-COOH (E2) | 6,5 | 0,858 | 452,0 |
| SBA-15-COOH (E3) | 9,9 | 0,829 | 155,0 |
| SBA-15-NH ₂ (N1) | 5,9 | 1,829 | 400,0 |
| SBA-15-NH ₂ (N2) | 4,7 | 0,694 | 302,1 |
| MCM-41 | 3,8 | 0,886 | 984,8 |
| MCM-41-NH ₂ | 2,8 | 0,279 | 645,7 |

2.6 Einlagerung des Proteins in die Tb-mesoMOFs

Vor den kalorimetrischen Messungen wurden die MOF-Kristalle aus der Methanollösung entnommen und dreimal mit HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,5) gewaschen. 5 mg Lysozym wurde in 1 mL HEPES-Puffer gelöst und für mindestens 96 h bei 37 °C mit 10 mg der MOF-Kristalle inkubiert. Zur Bestimmung der eingelagerten Proteinmenge wurde ein Bicinchoninsäure (BCA)-Assay verwendet, welches ein kolorimetrisches Nachweisverfahren zur quantitativen Proteinkonzentrationsbestimmung bei 562 nm ist. Um die immobilisierte Lysozymmenge nach entsprechender Inkubationszeit zu ermitteln, wurde der Überstand nach Zentrifugation entnommen und die Bestimmung erfolgte durch eine Differenzbildung der Konzentration des Überstandes von der anfänglichen Proteinkonzentration.

2.7 Einlagerung des Proteins in die MPS

Für jedes Experiment wurden 10 mg/mL zuvor getrocknetes Silikat mit einer Lösung, die 3,0 oder 4,0 mg/mL RNase A in 10 mM Phosphatpuffer bei entsprechendem pH enthielt, vermischt. Die Dispersion wurde für 96 h bei 25 °C unter kontrolliertem Mischen an einem Rotator gelagert, sodass gewährleistet wurde, dass in dieser Zeit die Gleichgewichtseinstellung des Einlagerungsprozesses bei allen Proben erfolgen konnte. Die immobilisierte Menge der RNase A wurde mittels UV-Absorption bei 278 nm ermittelt, indem die Differenz der Konzentration des Überstandes der Lösung nach Zentrifugation von der initialen Proteinkonzentration gebildet wurde.



3 Methoden

3.1 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Die Ermittlung der thermodynamischen Eigenschaften im Zuge der thermischen Entfaltung, hier insbesondere der Entfaltungstemperatur T_m , der eingekapselten Proteine wurden mittels eines Hochpräzisions VP-DSC Mikrokalorimeters (MicroCal, Northampton, MA, USA) mit einem Proben- und Referenzzellvolumen von jeweils 0,514 mL durchgeführt. Die DSC-Methode ist eine sehr sensitive Methode und liefert aussagekräftige Ergebnisse bis zu einer Proteinkonzentration von ca. 1 mg/mL ^[139,140].

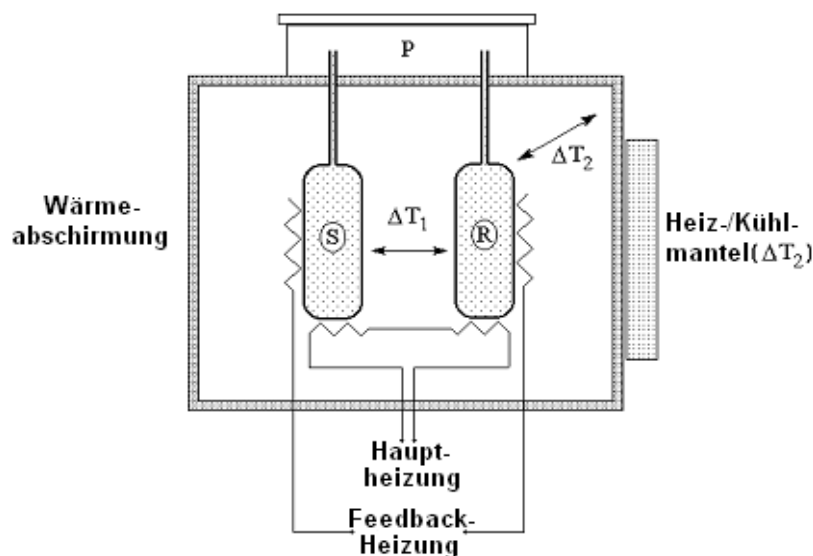


Abbildung 13 Schematischer Aufbau einer DSC-Apparatur. S: Probenzelle, R: Referenzzelle, P: Druckverschlusskappe ($\sim 1,8$ bar), um Blasenbildung beim Aufheizen zu unterdrücken. Die Temperatur des Heizmantels wird der Temperatur der Zellen (S und R) angepasst (ΔT_2). Temperaturdifferenzen (ΔT_1) zwischen beiden Zellen, die bei der Erwärmung durch die Hauptheizung auftreten, werden durch die Feedback-Heizung kompensiert ^[140,141].

Das Messprinzip beruht auf einer Leistungskompensation zwischen der zu messenden Probe und der Referenz (in diesem Kapitel stehen die Indizes S und R für Probe bzw. Referenz). Ein Mantel aus einem temperierbaren Metall umschließt beide Zellen und sorgt für eine isoperibole Betriebsart (Abbildung 13). Dies bedeutet, dass die Umgebungstemperatur, die Temperatur der Probe und die der Referenz konstant gehalten werden ($T_{\text{Umgebung}} = T_S = T_R$), um eine hohe Messgenauigkeit zu gewährleisten. Gibt die Probe aufgrund einer Reaktion oder Phasenumwandlung einen Wärmestrom ab (zum Beispiel während der Proteinfaltung), so wird durch einen Regler die elektrische Leistung um denjenigen Betrag kompensiert, sodass die Temperaturdifferenz beider Lösungen aufgehoben wird. Detektiert wird demnach die Heizleistungsdifferenz $\Delta P = P_S - P_R$, die

während der Reaktion entsteht ^[142]. Diese Differenz ist proportional zum Unterschied der Wärmekapazitäten ($\Delta C(T)$) der Probe (C_S) und der Referenz (C_R):

$$\Delta C(T) = C_S(T) - C_R(T) = \frac{\Delta P(T)}{\beta} \quad (8)$$

mit der Heizrate $\beta = \frac{\Delta T}{\Delta t}$, die vor der Messung festgelegt wird. Weiterhin lässt sich die Umwandlungsenthalpie ΔH_u durch Integration der Fläche unter der basislinienkorrigierten DSC- bzw. $C_u(T)$ -Kurve zwischen Anfangs- (T_1) und Endtemperatur (T_2) bestimmen:

$$\Delta H_u = \int_{T_1}^{T_2} C_u(T) dT. \quad (9)$$

Die Entfaltungstemperatur T_m ist definiert als diejenige Temperatur, bei der 50 % aller Proteinmoleküle entfaltet vorliegen und ist am Maximum der DSC-Kurve ablesbar. Sie ist ein Maß für die thermische Stabilität eines Proteins unter definierten Bedingungen (je höher T_m , desto stabiler das Protein) ^[142]. Für jede Messung wurde die Referenzzelle mit dem entsprechenden Puffer und den reinen MPS korrespondierender Menge befüllt und vor jeder Messung eine Äquilibrierphase von 15 min eingehalten, um eine Gleichgewichtseinstellung des thermischen Mantels des Geräts zu gewährleisten. Die benötigte Wärme für den gewünschten Temperaturanstieg wurde für alle Proben bei einer konstanten Heizrate von 40 °C/h zugeführt und es wurde im hohen Kompensationsmodus (high gain mode) mit einer Filterperiode von 16 s gescannt. Sowohl die Basislinienkorrektur (reiner Puffer bzw. Puffer/MPS) als auch die Normierung auf die Proteinkonzentration erfolgte mittels der Gerätesoftware Origin 7, sodass die temperaturabhängige apparente molare Wärmekapazität des Proteins, C_p , bezüglich der Referenz erhalten wurde. Weiterführende Informationen zum Funktionsprinzip, der Durchführung und Auswertung der DSC-Experimente können anderweitiger Literatur entnommen werden ^[33,140,143–149].

3.2 Fourier Transform-Infrarot -Spektroskopie (FTIR)

3.2.1 Grundlagen der Infrarotspektroskopie an Proteinen

Die Infrarot (IR)-Spektroskopie umfasst im elektromagnetischen Spektrum im Wesentlichen den Wellenlängenbereich zwischen 800 und 10^6 nm. Das Schwingungsspektrum wird in Abhängigkeit der schwingenden Spezies in drei Teilbereiche eingeteilt. Im nahen Infrarot (NIR), welcher im Bereich von $\lambda = 780$ nm – 3 μ m liegt, treten hauptsächlich Oberschwingungen auf ^[150]. Im mittleren Infrarot (MIR), welches im Bereich von $\lambda = 3$ – 50 μ m liegt, treten Grundschiebungen auf. Bei Wellenlängen von $\lambda = 50$ – 1000 μ m liegen im

fernen Infrarot (FIR) Gerüstschwingungen vor. Die für die Untersuchung von Proteinen und Peptiden beobachteten Schwingungen liegen im mittleren Infrarotbereich und sind im Wesentlichen auf Schwingungen des Peptidrückgrats zurückzuführen. In dieser Arbeit wird die Amid-I-Bande im Wellenzahlbereich von 1600 cm^{-1} bis 1700 cm^{-1} für die Konformationsanalyse herangezogen. Bei komplexen und nativ gefalteten Proteinen setzt sie sich zum größten Teil aus den Carbonylschwingungen des Peptidrückgrats (83 %), sowie CCN-Deformationsschwingungen und CN-Streckschwingungen zusammen. Da in Sekundärstrukturelementen, wie z.B. α -Helices und β -Faltblättern, die H-Brückenbindungen unterschiedlich stark sind, korreliert die Lage der Amid-I-Bande mit der vorliegenden Sekundärstruktur. Bei Verwendung von D_2O als Lösungsmittel wird die Bande als Amid-I' bezeichnet. Ein H/D-Austausch in Gegenwart von D_2O führt zu einem Intensitätsverlust der NH-Biegeschwingung (Amid-II-Bande bei $1480\text{-}1575\text{ cm}^{-1}$) zu Gunsten der ND-Biegeschwingung, die bei tieferen Wellenzahlen absorbiert, sodass die Amid-I-Bande unwesentlich von dem Austausch beeinflusst wird. In Tabelle 4 ist die Zuordnung der Wellenzahlen der Amid-I'-Bande zu den verschiedenen Sekundärstrukturen dargestellt.

Tabelle 4 Zuordnung der Sekundärstrukturen der Amid-I'-Bande zu den korrespondierenden Wellenzahlen.

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

3.2.2 Funktionsweise und Spektrenaufnahme

Anders als bei der gewöhnlichen IR-Spektroskopie, bei der Spektrometer mit dispersiven Elementen, die einzelne Wellenlängen sequentiell ausblenden und vermessen, verwendet werden, wird in der FTIR-Spektroskopie der gesamte zu untersuchende Frequenzbereich gleichzeitig detektiert. Nach Modulation aller Wellenlängen mit einer charakteristischen

Frequenz erreichen diese den Detektor zur selben Zeit. Diese Funktionsweise ist der entscheidende Bestandteil von FTIR-Spektrometern und wird erst durch das Michelson-Interferometer ermöglicht. In Abbildung 14 ist der schematische Aufbau eines solchen Elements dargestellt. Das Interferometer setzt sich aus drei Hauptelementen zusammen. Zum einen besteht es aus einem halbdurchlässigen Strahlteiler, der den von der Lichtquelle kommenden Strahl im rechten Winkel aufspaltet. Zum anderen ist ein fester Spiegel vorhanden, der den Teilstrahl zum Strahlteiler zurückreflektiert und zuletzt führt ein im 90° -Winkel zum festen Spiegel angeordneter beweglicher Spiegel zur Reflexion des anderen Teilstrahls. Eine rechtwinklige Ausrichtung der beiden Spiegel zueinander bewirkt, dass die beiden Strahlen am Strahlteiler rekombinieren und von dort aus dem Interferometer austreten und zur Probe geleitet werden. Ist der Abstand des beweglichen Spiegels und des festen Spiegels zum Strahlenteiler gleich, so beträgt die optische Wegdifferenz $x = 0$. Dies hat zur Folge, dass die beiden Teilstrahlen am Strahlteiler konstruktiv interferieren und somit die Intensität des austretenden Strahls maximal wird. Ist $x \neq n\lambda$, mit n als ganzzahliges Vielfaches, so befinden sich die Teilstrahlen außer Phase und es kommt zur destruktiven Interferenz, die zu einer Intensitätsverminderung führt.

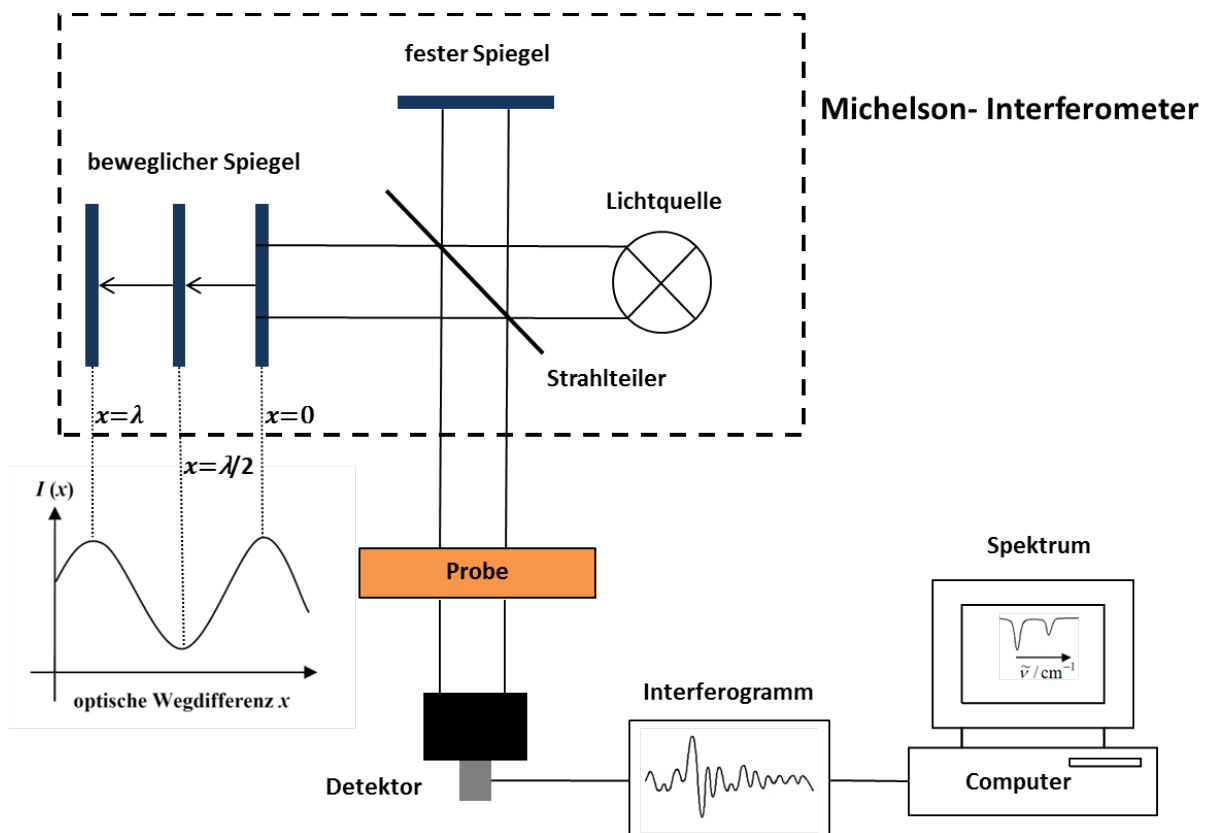


Abbildung 14 Schematische Darstellung des Aufbaus eines FTIR-Spektrometers mit einem Michelson-Interferometer.

Die FTIR-Spektren in dieser Arbeit wurden an einem Nicolet MAGNA 550 Spektrometer aufgenommen, welches mit einem von flüssigem Stickstoff gekühlten MCT (HgCdTe) Detektor ausgestattet ist. Jedes Spektrum wurde aus 256 Scans bei einer spektralen Auflösung von 2 cm^{-1} erhalten und mit einer Happ-Genzel-Funktion apodisiert. Die Probenkammer wurde mit trockenem Kohlenstoffdioxid umspült und die temperaturabhängigen Messungen wurden in einer Zelle bestehend aus CaF_2 -Fenstern, die durch $25\text{ }\mu\text{m}$ Capton-Abstandshalter voneinander getrennt wurden, durchgeführt. Ein externes Thermostat ermöglichte die Temperaturkontrolle mit einer Genauigkeit von $0,1\text{ }^\circ\text{C}$. Es wurde eine Äquilibrierzeit vor Aufnahme der Spektren bei entsprechenden Temperaturen von 10 Minuten vor jeder Messung eingehalten.

3.2.3 Datenprozessierung der FTIR-Spektren und Bestimmung der Sekundärstrukturanteile

Nach Aufnahme der Spektren wie im vorherigen Abschnitt 3.2.2 beschrieben, erfolgte die Subtraktion des Hintergrundes (reiner Puffer bzw. mit Kosolvenzien oder Crowdingsubstanz) und eine Basislinienkorrektur im Bereich der Amid-I'-Bande bei $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$. Anschließend wurden die Spektren in diesem Bereich normiert um die weitere quantitative Analyse via Bandenanpassung zu ermöglichen.

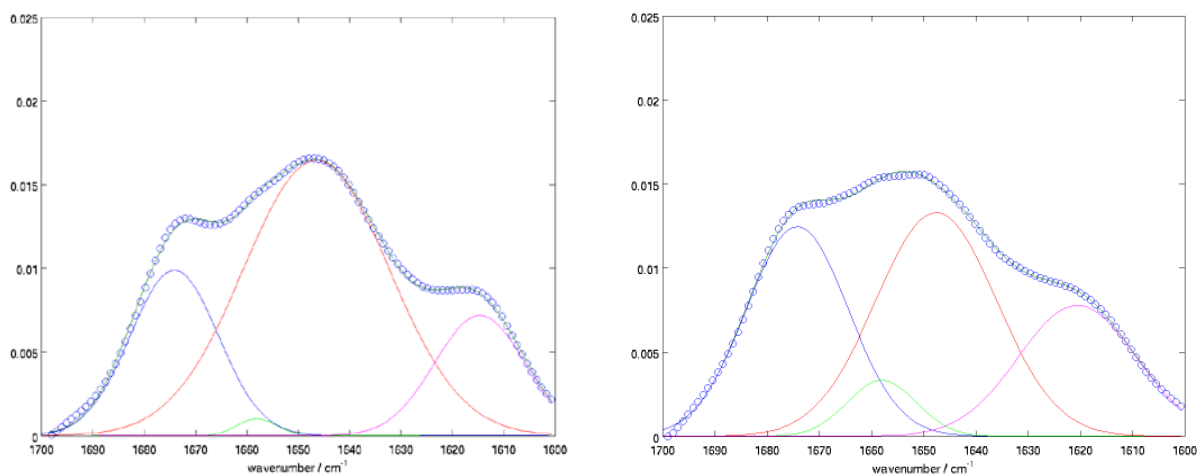


Abbildung 15 Repräsentative Darstellung der Bandenanpassung zweier flächennormierter Amid-I'-Banden des ELPs (10 Gew.-%) bei $T = 14\text{ }^\circ\text{C}$ (links) und $T = 84\text{ }^\circ\text{C}$ (rechts).

Zur Bestimmung der Bandenpositionen und -anzahl überlappender Komponenten der Amid-I'-Bande erfolgte die Bildung der zweiten Ableitung und die Fourier-Selbstentfaltung (engl.: Fourier self-deconvolution, FSD) aus den normierten Spektren. Durch die Bildung der

zweiten Ableitung konnte eine Anzahl von nur drei Minima ermittelt werden, jedoch erwies sich die Verwendung einer weiteren vierten Subbande bei ca. 1660 cm^{-1} als essentiell zur deutlichen Verbesserung der Fitqualität. Darüber hinaus konnten die Positionen der vier Subbanden in Übereinstimmung mit den FSD-Spektren verifiziert werden. Die Verwendung einer so geringen Anzahl an Subbanden ist gerechtfertigt, da im Allgemeinen bekannt ist, dass Peptide im Vergleich zu Proteinen aus wenigen Sekundärstrukturelementen bestehen und folglich eine geringe Anzahl an Minima der zweiten Ableitung aufweisen. Insofern erfolgte die Sekundärstrukturanalyse durch Anpassung aller Spektren mit vier Subbanden an den entsprechenden Positionen, was in Abbildung 15 exemplarisch für eine niedrige und eine hohe Temperatur veranschaulicht ist.

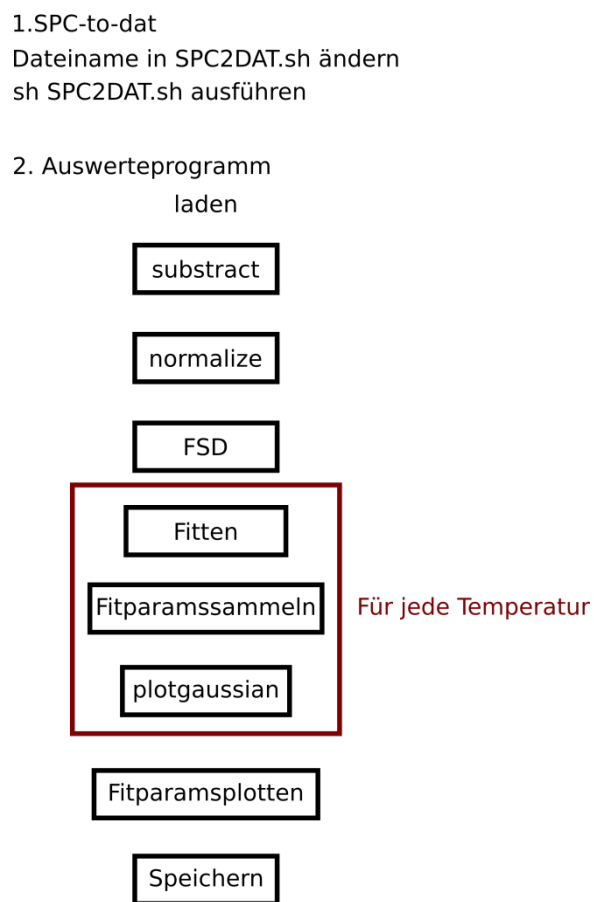


Abbildung 16 Schema der FTIR-Datenprozessierung in Matlab R2012b. Nach Konvertierung der Daten in ein für Matlab geeignetes Datenformat erfolgte die Subtraktion des Hintergrundes (Puffer in An- oder Abwesenheit der Additive/Kosolventien). Mit diesen Daten wurde anschließend eine Normierung und Fourier-Selbstentfaltung im Bereich der Amid-I'-Bande durchgeführt. Die Bandenanpassung (Fitten) erfolgte für die einzelnen normierten Spektren für jede gemessene Temperatur mit vier Gaußkurven in Übereinstimmung mit den Positionen der Minima der zweiten Ableitung der entsprechenden Spektren.

Die Subbanden der Amid-I'-Region wurden entsprechend den bekannten Sekundärstrukturelementen von Elastinpeptiden zugeordnet^[151] und sind in Tabelle 5

aufgelistet. Die Auswertung erfolgte anhand der Software Matlab R2012b mit Hilfe eines von Dr. Kerstin Kämpf geschriebenen Programms. Ein Schema mit allen vorgenommenen Auswertungsschritten ist in Abbildung 16 dargestellt.

Tabelle 5 Zuordnung der Position der Sekundärstrukturen der Amid-I'-Bande bei Elastinpeptiden mit der pentameren Sequenz (VPGVG)_n nach Referenz 151.

| Sekundärstruktur | Wellenzahl $\tilde{\nu}$ / cm⁻¹ |
|--|--|
| Superposition von β -Aggregaten, regulären antiparallelen β -Faltblättern und Typ II- β -Schleifenstrukturen | 1675 |
| Ungeordnete Strukturen, Schleifenstrukturen (β - und γ -Schleifen) | 1656 |
| Summe aus ungeordneten Strukturen, β -Faltblättern und β -Schleifen | 1645 |
| β -Aggregate | 1615 |



4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Ergebnisse zur RNase A in MPS

4.1.1 Immobilisierung der RNase A in den MPS: Beladung bei verschiedenen pH-Werten

Als Modellprotein zur Einlagerung in die mesoporösen Silikatmaterialien wurde Ribonuklease A (RNase A), wie in Abschnitt 2.7 beschrieben, verwendet. Für die Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Immobilisierungsrate wurden ausgewählte Substrate mit den folgenden Eigenschaften verwendet: unveränderte SBA-15 mit einer durchschnittlichen Porengröße von 4,9 nm sowie amino- und carboxylatfunktionalisierte SBA-15 mit 4,7 nm (Charge N2) und 4,0 nm (Charge E1) Porendurchmesser. Die spezifischen Porenvolumina betragen $0,54 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ (SBA-15), $0,69 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ (SBA-15-NH₂, N2) bzw. $0,14 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ (SBA-15-COOH, E1) (vgl. Kapitel 2.5, Tabelle 3).

Die Einlagerung des Proteins in die MPS hängt von Faktoren wie beispielsweise der Beschaffenheit und Ladungsdichte der Silikatoberfläche des porösen Materials und des Proteins ab. Weiterhin spielen geometrische Faktoren beider Wechselwirkungspartner eine wichtige Rolle bei dem Einkapselungsvorgang, wie zum Beispiel die Größe und das Volumen der Poren sowie die Größe und Form des Proteins. Alle untersuchten mesoporösen Molekularsiebe weisen ein hohes Potential auf, Proteine schnell zu immobilisieren (Abbildung 17 - Abbildung 21). Unterhalb seines isoelektrischen Punktes ($pI = 9,6$) weist RNase A eine positive Nettoladung auf, wohingegen die unveränderte Silikatoberfläche oberhalb von pH 3 negativ geladen ist. Im Falle der amino- bzw. carboxylatfunktionalisierten MPS besitzt die Oberfläche positive bzw. negative Ladungen, sodass repulsive bzw. attraktive Interaktionen zwischen Protein und Oberfläche zu erwarten sind. Durch Variation des pH-Wertes und somit folglich auch der Oberflächenladungen von Protein und Silikatoberfläche zeigte sich ein analoger Trend: je größer die Poren und das spezifische Porenvolumen des hexagonalen Phasenmaterials SBA-15 und seiner Modifikationen, umso größer die Menge immobilisierten Proteins. Die geometrischen Faktoren scheinen hierbei elektrostatische Wechselwirkungen zu überlagern, sodass die Porengröße den größten Einfluss auf die Immobilisierung hat. Erfolgt jedoch eine Normierung auf die spezifischen Porenvolumina der entsprechenden Silikatmaterialien, so zeigt sich, dass die carboxylatfunktionalisierten SBA-15 das größte Potential aufweisen, RNase A einzulagern (Abbildung 17, unten).

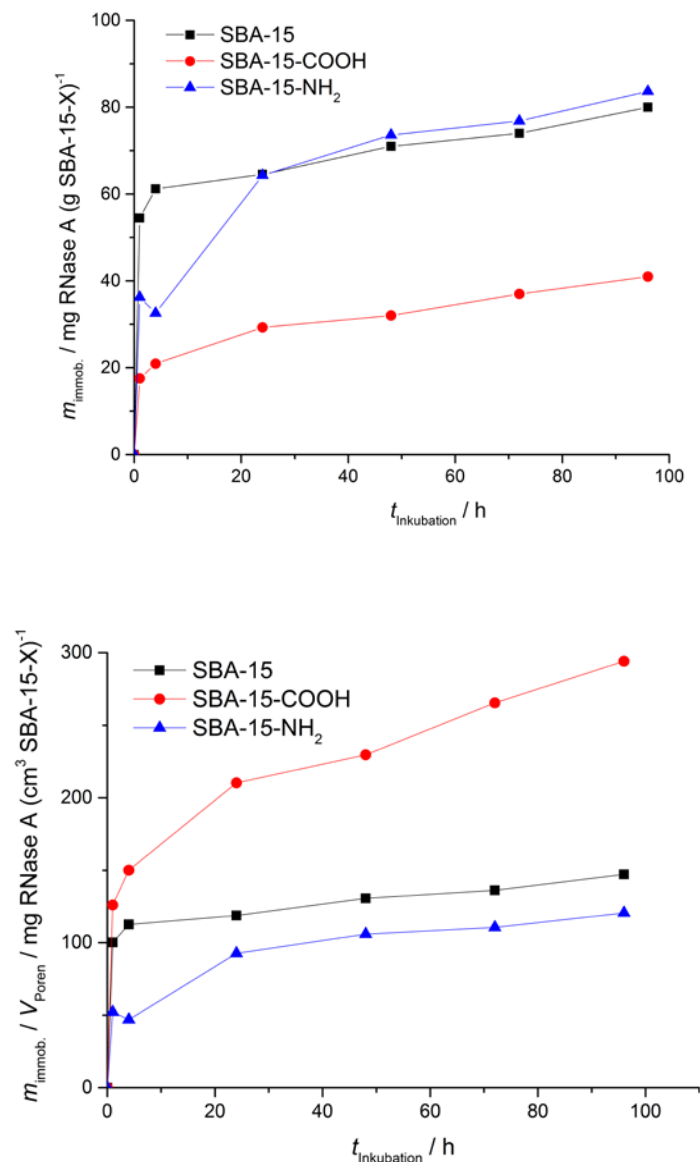


Abbildung 17 Immobilisierte Menge des Proteins RNase A (10 mM Phosphatpuffer, pH 5,5) in MPS als Funktion der Zeit (oben) und auf das Porenvolumen der MPS normiert (unten). Die Inkubation erfolgte an einem Rotator bei RT in einem Protein zu Silikat-Verhältnis von 3:10. Nach Referenz 76.

Bei Verwendung eines Massenverhältnisses der RNase A zu SBA-15 von 3:10 und einem pH von 5,5 weist die zeitliche Verfolgung der in die MPS immobilisierten Menge an RNase A einen Langmuir-artigen Verlauf auf. In den hexagonalen Poren des unveränderten SBA-15 mit einem Porenvolumen von 0,54 cm³/g bei einem Porendurchmesser von 4,9 nm wird das Immobilisierungsgleichgewicht innerhalb von ~96 h erreicht und die maximale Beladung beträgt 147 mg/cm³ (Abbildung 17, unten). Zum Vergleich konnte unter analogen Bedingungen (Massenverhältnis RNase A:SBA-15 von 3:10, pH 5,5) bei SBA-15 mit einem Porenvolumen von ca. 1,25 cm³/g und einem Porendurchmesser von 5,8 nm das Gleichgewicht bereits nach 4 h mit einem Maximalwert von 114 mg/cm³ erreicht werden ^[76],

was eine 24-fach höhere Einlagerungsgeschwindigkeit bei nur 1 nm größeren Poren darstellt. Zudem ist in den größeren Poren (Porendurchmesser von 5,8 nm, Porenvolumen von 1,25 cm³/g) die eingelagerte Proteinmenge um 10 % (entspricht 48 % der gesamten Proteinmenge) verglichen zu den 38 % in den hier untersuchten SBA-15 (Porendurchmesser 4,9 nm, Porenvolumen 0,54 cm³/g) erhöht (siehe Tabelle 6). Dies verdeutlicht die außerordentliche Rolle der geometrischen Faktoren für die Kinetik und Kapazität der einlagerbaren Proteinmenge. Im Vergleich zu den dreidimensionalen kubischen mesoporösen MCM-48 (Porendurchmesser nur ca. 2,5 nm, Porenvolumen 0,93 cm³/g) konnte bei gleichen Bedingungen (~4 h zur Gleichgewichtseinstellung) eine ähnliche Proteinmenge eingelagert werden (ca. 116 mg/cm³), was die Annahme bestätigt, dass trotz der kleinen Porendurchmesser ein kubisches System vorteilhafter für die Einlagerung von RNase A zu sein scheint ^[23]. Dies ist in guter Übereinstimmung zu der von Vinu et al. gemachten Beobachtung und der daraus gezogenen Schlussfolgerung, dass die in Silikate immobilisierte Proteinmenge nur eine Funktion des spezifischen Porenvolumens zu sein scheint ^[152].

Tabelle 6 Anhand der UV-Absorption des Überstandes ermittelte maximale Anteile der immobilisierten Proteinfraktion (nach 96 h) an der gesamten zur Verfügung stehenden Proteinmenge.

| Anteil der immobilisierten Proteine / % | | | |
|--|---------------|-------------|-------------|
| MPS | pH 5,5 | pH 7 | pH 9 |
| SBA-15 | 38 | 53 | 55 |
| SBA-15-COOH (E1) | 19 | 29 | 34 |
| SBA-15-NH₂ (N2) | 24 | 27 | 28 |

Die oberflächenfunktionalisierten SBA-15 Silikate weisen eine signifikant geringere absolute eingelagerte Proteinmenge auf. Die auf das Porenvolumen normierten Daten offenbaren jedoch, dass das SBA-15-COOH die größte Menge RNase A beherbergen konnte, was sich durch eine erhöhte elektrostatische Anziehung verstehen lässt (Abbildung 17 - Abbildung 20). Ca. 50 % der gesamten zur Verfügung stehenden Proteinmenge und sogar mehr als 90 % der maximal eingelagerten Proteinmenge wurden innerhalb von 1 h in die größten Poren eingebaut. Dies weist auf eine hohe Affinität zwischen der carboxylatfunktionalisierten Oberfläche des SBA-15-COOH bei allen pH-Werten und der RNase A hin und die Immobilisierungsrate ist vergleichsweise ähnlich der des kubischen Wirtsmaterials MCM-48 mit einem Porendurchmesser von 2,5 nm ^[23]. Obwohl die kubische Struktur vorteilhafter für den Proteintransport in die Mesoporen ist, was demnach als geschwindigkeitsbestimmender

Schritt des ganzen Einlagerungsprozesses betrachtet wird ^[153], wird auch angenommen, dass große Porendurchmesser zu einer schnellen und effizienten Einlagerung von Proteinen beitragen ^[153]. Der Porendurchmesser der SBA-15 (4,9 nm) ist viel größer als der des kubischen MCM-48 (2,5 nm), was zu einem gewissen Anteil die ungünstigere hexagonale Porenstruktur zu kompensieren scheint. Die maximale Beladung mit Protein bei pH 5,5 beträgt jedoch lediglich 14 % des Porenvolumens der MPS. Es wurde gezeigt, dass die Adsorptionsisothermen von Lysozym in SBA-15 in einem pH-Bereich von 6,5 bis 10,5 (alle unterhalb des pI von Lysozym) auch einen starken anfänglichen Anstieg aufweisen. Dies lässt auf eine hohe Affinität zwischen Lysozym und dem Adsorbat schließen. Letztendlich erreichen die Isothermen einen Plateauwert, der für einen langmuirartigen Adsorptionsverlauf typisch ist ^[154]. Zudem wurde geschlossen, dass die Proteine dicht gepackt in den Mesoporen des SBA-15 vorliegen müssten ^[155].

Der isoelektrische Punkt der RNase A liegt bei 9,6, sodass die Proteinmoleküle unterhalb dieses pH-Wertes eine positive Nettoladung aufweisen, wie beispielsweise eine Nettoladung von +4 bei pH 7 ^[36]. Der pH an dem die Silikatoberfläche neutral erscheint (engl. point of zero charge, PZC) liegt unterhalb von pH 3. Folglich besitzt die Oberfläche des unveränderten MPS eine negative Ladung bei pH-Werten oberhalb von 3, sodass hieraus zumindest teilweise die elektrostatische Potenzialdifferenz als Triebkraft der Proteinmigration in die Mesoporen dienen könnte (siehe Schema in Abbildung 18).

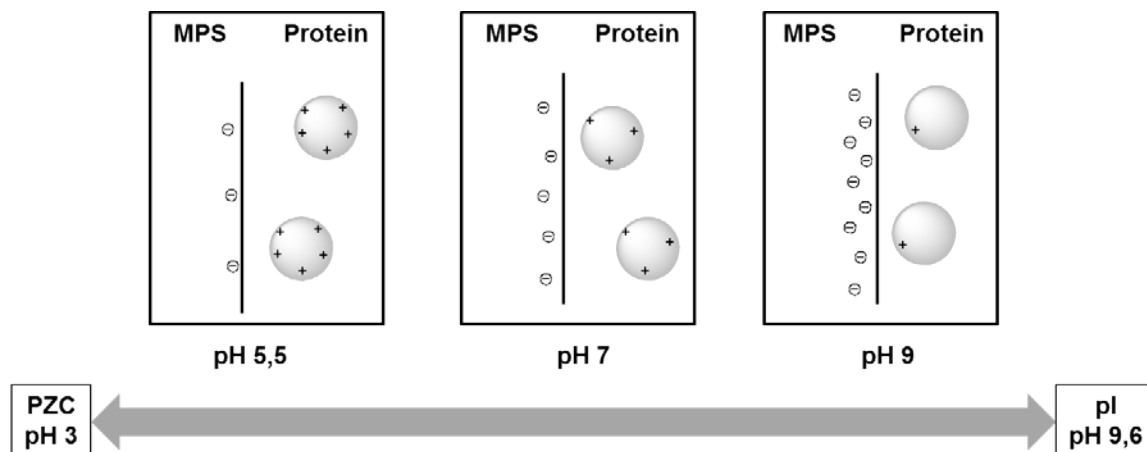


Abbildung 18 Schematische Darstellung der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem Wirtmaterial (MPS) und den Gastmolekülen (Protein) bei verschiedenen pH-Werten.

Die Migration und fortschreitende Einlagerung weiterer Proteinmoleküle erfordert das Aufbrechen Coulombscher Wechselwirkungen zwischen dem mesoporösen Wirt und dem bereits eingelagerten Protein, was einen endothermen Prozess darstellt ^[156]. Hiermit übereinstimmend wurde berichtet, dass sich eine Erhöhung der immobilisierten Menge bei höheren Temperaturen, sofern das Protein stabil bleibt, erzielen lässt ^[157]. Die Silanol-

Gruppen in den Mesoporen können durch Wasserstoffbrückenbindungen mit den hydrophilen Seitengruppen des Proteins die Einlagerung fördern. Sowohl die Silanolgruppen des unveränderten SBA-15 als auch die des carboxylat-funktionalisierten SBA-15-COOH weisen eine negative Ladung bei pH 7 auf, sodass hieraus resultierend die Proteinmigration in die Silikatporen durch die elektrostatische Potenzialdifferenz gefördert würde. Die Wechselwirkungen zwischen dem positiv geladenen Protein und der negativ geladenen MPS-Oberfläche sind relativ schwach und führen zu keiner starken Adsorption oder gar Destabilisierung des Proteins, was größtenteils durch die elektrostatische Abschirmung der Pufferlösung bedingt wird. Überraschenderweise verhindern repulsive Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Wechselwirkungspartnern keineswegs die Inkorporation der RNase A in die Poren des SBA-15-NH₂, da im Falle der aminofunktionalisierten Silikate eine positiv geladene Oberfläche unterhalb von pH 11 vorliegt. Dies ist ein klares Indiz, dass nicht ausschließlich elektrostatische Wechselwirkungen den Einlagerungsprozess steuern. So wurde in der Tat bereits berichtet, dass andere Triebkräfte neben der Elektrostatik eine Schlüsselrolle bei der Immobilisierung von Lysozym in aminomodifizierte SBA-15 spielen^[158]. Dies können hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Siloxan-Brücken der Adsorbatoberfläche, exponierten unpolaren Aminosäure-Seitenketten des Proteins und hydrophoben Methylgruppen in den durch die Propfung auf die Oberflächen aufgetragenen Ketten R₃-Si-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂ sein^[21].

Tabelle 7 Maximale Proteinbeladung in SBA-15-X bei verschiedenen pH-Werten nach Normierung auf die korrespondierenden spezifischen Porenvolumina der MPS.

| pH | SBA-15 | SBA-15-COOH | SBA-15-NH ₂ |
|-----|-------------------------------------|-------------|------------------------|
| | Max. Beladung / mg cm ⁻³ | | |
| 5,5 | 147 | 294 | 120 |
| 7 | 210 | 445 | 134 |
| 9 | 224 | 543 | 141 |

Die maximale Beladung der MPS mit dem Protein wurde bei allen Materialien nahe des pI erreicht (vgl. Tabelle 7 und Tabelle A1 im Anhang). Wurde der pH von 5,5 auf 7 bei gleich bleibendem Massenverhältnis des Proteins zu den MPS von 3:10 erhöht, stieg die maximale Beladung drastisch von ca. 147 mg/cm³ auf ca. 209 mg/cm³ an, was jedoch auch eine wesentlich längere Zeit zum Erreichen des Gleichgewichts in Anspruch nahm (Äquilibrierzeit ~96 h). Die Beladungsmenge, die 98 % des gesamten Proteins in der Lösung beträgt, entspricht jedoch nur 30 % des gesamten Porenvolumens der MPS. Demnach ließe sich, sollte ein Verstopfen der Poren kein Hindernis darstellen, eventuell mehr Protein bei Verwendung höherer Anfangskonzentrationen des Proteins in Lösung in die MPS einlagern.

Verglichen zum unveränderten SBA-15 war der Anstieg der eingelagerten Proteinmenge bei pH-Erhöhung von 5,5 auf 7 größer bei Verwendung von SBA-15-COOH (von 294 mg/cm³ auf 445 mg/cm³) und deutlich geringer bei SBA-15-NH₂ (von 120 mg/cm³ auf 134 mg/cm³). Diese Beobachtung lässt sich anhand der elektrostatischen Interaktionen zwischen negativ geladenem MPS und Protein verstehen (vgl. Abbildung 18). Diese sollten bei SBA-15-COOH durch eine erhöhte Potentialdifferenz stärker sein, wohingegen die Aminogruppen auf der Oberfläche der SBA-15-NH₂ kaum durch den pH-Anstieg beeinflusst werden.

Bei einer weiteren Erhöhung des pH-Wertes auf 9 konnte die maximale Beladung in allen MPS weiter gesteigert werden, beispielsweise auf bis zu ca. 224 mg/cm³ in SBA-15 (Abbildung 20 und Tabelle 7). Die höchste eingelagerte Proteinmenge wurde in allen MPS nahe des pI des Proteins erzielt, was wahrscheinlich auf eine dichtere Packung der RNase A in den Poren durch verminderte laterale Abstoßung der Proteinmoleküle untereinander zurückzuführen sein könnte. Am geringsten beeinflusste eine Veränderung des pHs den Einlagerungsprozess in die aminofunktionalisierten MPS (maximal 141 mg/cm³ bei pH 9), was vermutlich daran lag, dass hierbei keinerlei elektrostatische Triebkraft eine Rolle spielen sollte. Der größte Einfluss ist bei den SBA-15-COOH festzustellen (maximal 543 mg/cm³ bei pH 9), in denen offenbar die elektrostatische Wechselwirkung die kleinen Porendurchmesser und somit ungünstigeren geometrischen Dimensionen kompensiert.

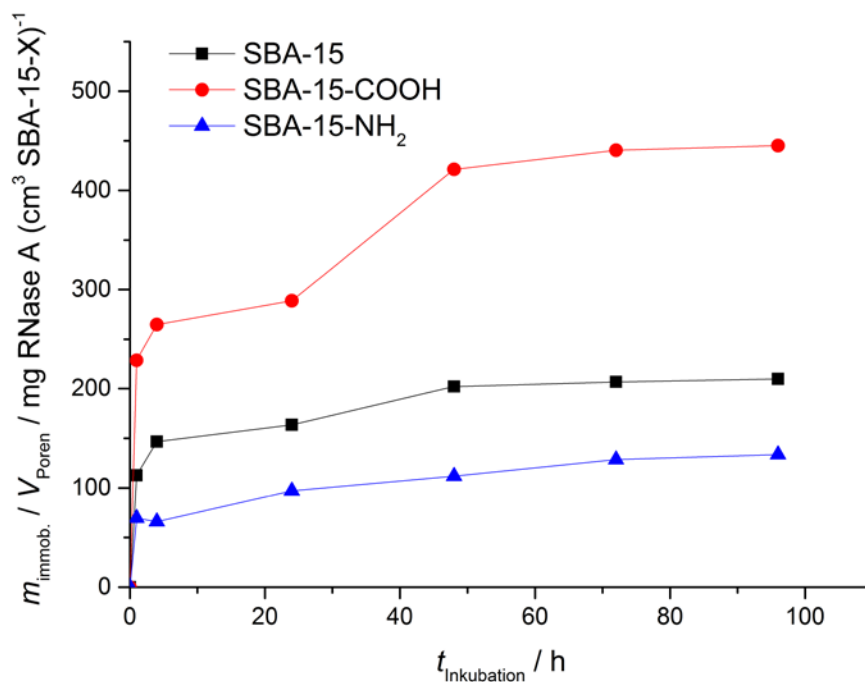


Abbildung 19 Immobilisierte Menge des Proteins RNase A (10 mM Phosphatpuffer, pH 7) an MPS als Funktion der Zeit. Die Inkubation erfolgte an einem Rotator bei RT in einem Protein zu Silikat-Verhältnis von 3:10.

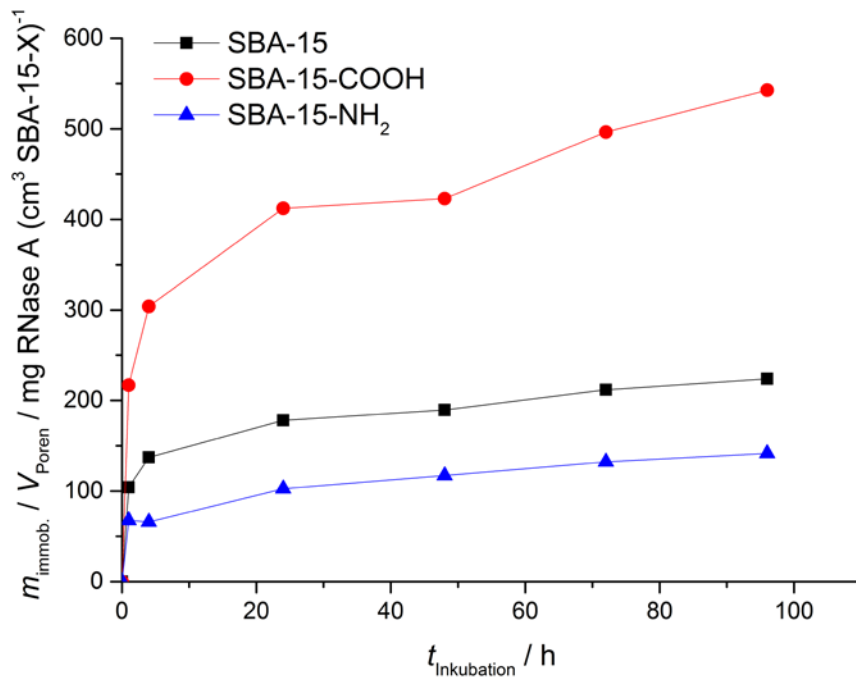


Abbildung 20 Immobilisierte Menge des Proteins RNase A (10 mM Phosphatpuffer, pH 9) an MPS als Funktion der Zeit. Die Inkubation erfolgte an einem Rotator bei RT in einem Protein zu Silikat-Verhältnis von 3:10.

Neben den Unterschieden in Porengröße und -form verglichen mit anderen mesoporösen Materialien, wie zum Beispiel MCM-48 und MCM-41, besitzt das SBA-15 die einzigartige Eigenschaft, dass seine Mesoporen durch mikroporöse Kanäle verbunden sind^[63,74]. Diese Mikrokanäle wirken zwar nicht direkt beim Proteintransport in die MPS hinein und auch nicht innerhalb der Poren mit, könnten aber die Diffusion kleiner Substrate zu den aktiven Zentren eines immobilisierten Enzyms und den Abtransport aus diesen erleichtern, was ihnen eine tragende Rolle als Wirte in der Anwendung als Biokatalysatoren beimisst^[67,77].

4.1.2 Immobilisierung der RNase A in verschiedene MPS bei pH 7

In Abschnitt 4.1.1 konnte die Rolle des pH-Wertes auf das Immobilisierungsgleichgewicht demonstriert werden. Anhand eines Vergleiches der SBA-15 mit den funktionalisierten Analoga SBA-15-COOH und SBA-15-NH₂ wurden die Oberflächenfunktionalisierung und damit einhergehende elektrostatische Überlegungen bezüglich förderlicher Wechselwirkungen zur Proteineinlagerung diskutiert. Einen weiteren relevanten Faktor stellt darüber hinaus der Erfolg der Funktionalisierung nach oder während der Synthese dar. Hierzu wurden drei verschiedene Chargen an carboxylatfunktionalisierten SBA-15 (E1, E2, E3) mit unterschiedlichen Porengeometrien (siehe Abschnitt 2.5) und zwei verschiedene

aminofunktionalisierte SBA-15-Materialien (N1, N2) hinsichtlich der Immobilisierungsrate bei pH 7 betrachtet.

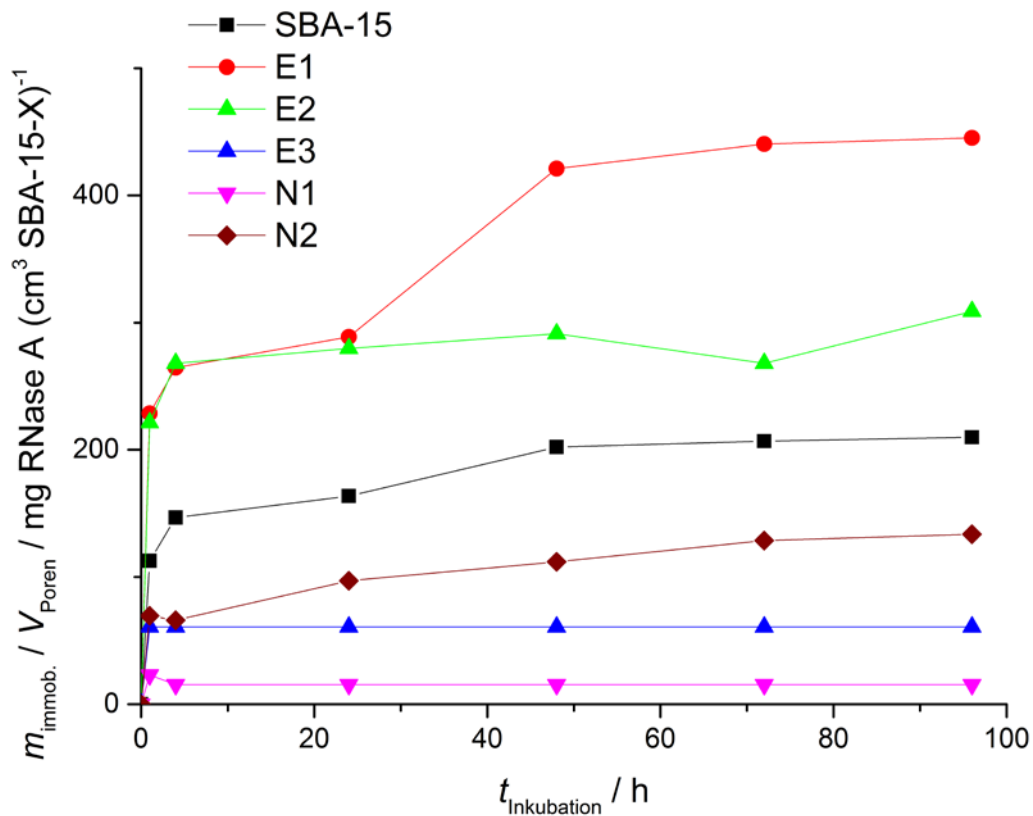


Abbildung 21 Immobilisierte Menge (normiert auf das Porenvolumen) der RNase A in allen verschiedenen MPS bei pH 7 als Funktion der Inkubationszeit. Das Verhältnis von Protein:MPS betrug 3:10.

Wie aus den auf das Porenvolumen normierten Daten in Abbildung 21 hervorgeht, variiert die immobilisierte Menge an RNase A sehr stark in folgender absteigender Reihenfolge: E1 > E2 > SBA-15 > N2 > E3 > N1. Durch die Normierung auf das Porenvolumen kann nur der Porendurchmesser entscheidend sein. Hierbei liegt folgende Abfolge der Porendurchmesser vor: E3 (9,9 nm) > E2 (6,5 nm) > N1 (5,9 nm) > SBA-15 (4,9 nm) > N2 (4,7 nm) > E1 (4,0 nm). Die größten Proteinmengen wurden in den carboxylat-funktionalisierten MPS E1 und E2 eingelagert, wobei das Material E3 (trotz gleicher Funktionalisierung) mit dem größten Porendurchmesser von 9,9 nm sehr wenig Protein beherbergen konnte. Dies wies darauf hin, dass das Material nicht mehr intakt war, was durch SAXS-Messungen bestätigt werden konnte, da in diesen das Fehlen einer hexagonalen Struktur gezeigt werden konnte (Daten s. Anhang, Abbildung A2). Unmodifiziertes SBA-15 liegt mit einem Maximum von ca. 200 mg/cm³ im mittleren Bereich und die geringste Menge konnte in den aminofunktionalisierten N1 und N2 vorgefunden werden. Hierbei fällt - ähnlich wie bei den carboxylatmodifizierten MPS - auf, dass trotz des

größeren Porendurchmessers der N1 im Vergleich zu N2 keine größere Proteinmenge aufgenommen werden konnte. SAXS-Messungen zur Überprüfung der hexagonalen Anordnung des N2 deuteten zudem auf eine zerstörte Struktur hin (Daten siehe Anhang, Abbildung A2). Auch hier liegt die Ursache vermutlich in der postsynthetischen Modifikation. Die sehr unterschiedlichen immobilisierten Mengen in den verschiedenen Chargen der gleichen MPS veranschaulichen die große Bedeutung der Synthese und der Funktionalisierung dieser Materialien auf ihre Qualität. So wurden nachfolgend nur die bei der Immobilisierung als effizienteste MPS detektierten modifizierten Silikate verwendet, d.h. E1, E2 und N2. Die Einlagerung bei pH 7 wurde als Bedingung zur Untersuchung der thermischen Stabilität mit den ausgewählten MPS festgesetzt, da hierbei sowohl eine genügend große Menge des Proteins eingelagert werden konnte als auch moderate elektrostatische Wechselwirkungen als Triebkraft erwartet werden konnten.

4.1.3 DSC-Ergebnisse zur Temperaturstabilität der immobilisierten RNase A

4.1.3.1 SBA-15, SBA-15-COOH (E1 und E2) und SBA-15-NH₂ (N2)

Die dynamische Differenzkalorimetrie wurde verwendet, um den Einfluss der verschiedenen Oberflächenmodifikationen auf die thermische Stabilität des eingelagerten Proteins zu ermitteln (Abbildung 22-Abbildung 24). Im nachfolgenden Abschnitt 4.1.3.2 wird detailliert auf die Ergebnisse bezüglich der thermischen Stabilität der RNase A in unfunktionalisierten MPS eingegangen. Im darauffolgenden Abschnitt 4.1.3.4 liegt der Fokus auf dem Einfluss der Oberflächenmodifikation des SBA-15 sowohl mit Amino- (N2) als auch Carboxylatgruppen (E1).

Allgemein lässt sich im Vorfeld sagen, dass die Anwesenheit einer sich frei in Lösung befindender Proteinspezies (Peak 2 = P2 in Abbildung 22), welche wie bei der Probe mit reiner RNase A bei einer Entfaltungstemperatur (T_m) von 62 °C entfaltet, bei allen MPS beobachtet werden kann. Lediglich bei unverändertem SBA-15 mit dem größten Porendurchmesser kann eine eingelagerte Proteinspezies, die bei höheren Temperaturen entfaltet, beim ersten Scanvorgang nachgewiesen werden (Peak 3 = P3 in Abbildung 22). Des Weiteren scheint bei Anwesenheit der Carboxylat-MPS (E1) eine Adsorption des entfalteten Proteins an die externe Oberfläche des Silikats und/oder die Aggregation des Proteins unterdrückt zu sein. In einem konsekutiven Aufheischritt konnte jedoch die Rückfaltung einer eingekapselten Proteinfraction und deren Entfaltung bei höheren Temperaturen (~ 95 °C, P3) ermittelt werden (vgl. Abbildung 23).

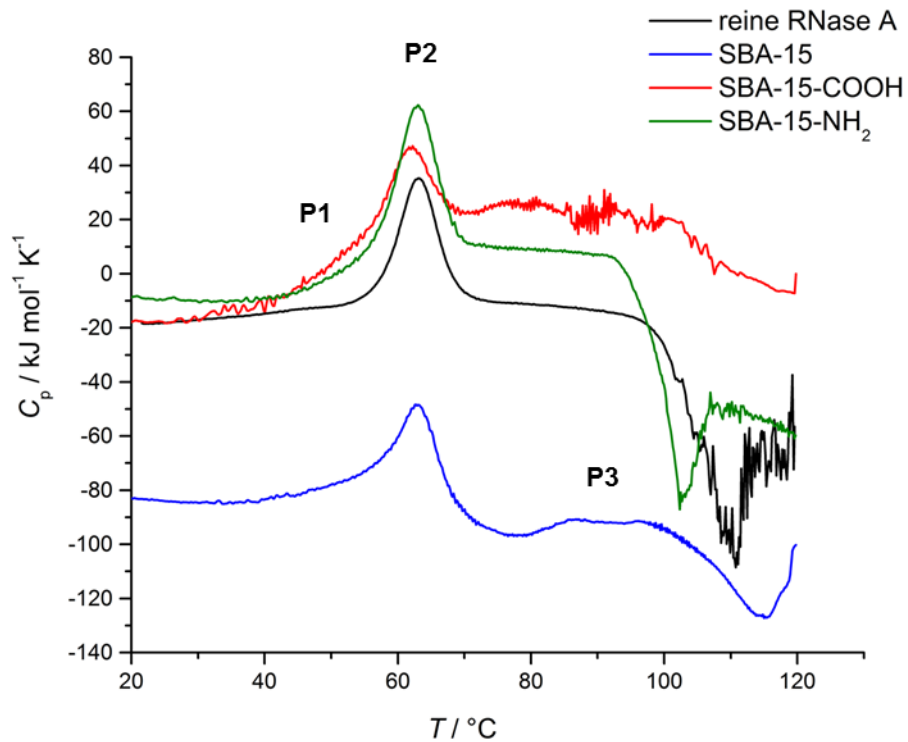


Abbildung 22 DSC-Entfaltungsspek des Proteins RNase A (10 mM Phosphatpuffer, pH 7) in unverändertem und funktionalisiertem Hard-Matter-Confinement. Das Verhältnis von Protein zu MPS betrug 3:10.

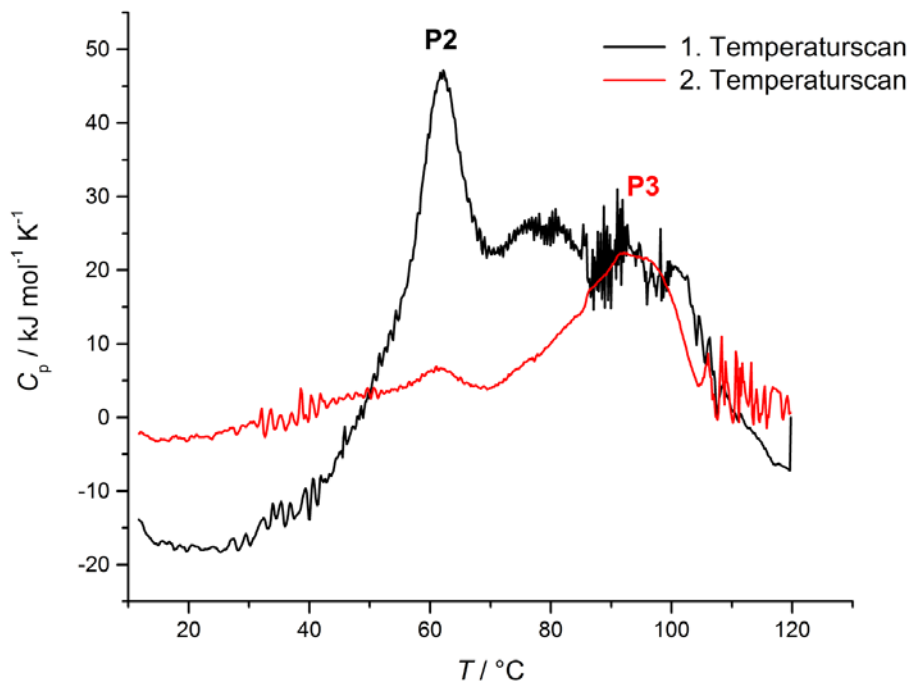


Abbildung 23 DSC-Entfaltungsspek zweier aufeinanderfolgender Scans von RNase A in carboxylat-funktionalisiertem SBA-15 (E1).

Aus den Untersuchungen des Immobilisierungsgleichgewichts konnte eine andere Charge SBA-15-COOH (E2) als vielversprechend für die Proteineinlagerung identifiziert werden und durch SAXS-Messungen konnte der Erhalt einer hexagonalen Struktur bei E2 bestätigt werden (Daten s. Anhang, Abbildung A2). In weiteren kalorimetrischen Messungen mit dieser Charge der SBA-15-COOH (E2) konnte das hohe Potential der Carboxylatfunktionalisierung validiert werden (Abbildung 24), indem bereits beim ersten Aufheisschritt eine stabilisierte Proteinfraction, die erst bei ca. 100 °C entfaltet, sichtbar wurde. In Reproduktionsmessungen mit den E2-MPS (Daten siehe Anhang, Abbildung A1) konnte die erfolgreiche thermische Stabilisierung demonstriert werden. Zusätzlich traten aber auch sehr unterschiedliche Thermogramme ohne eine eindeutige Reproduktion einer bei höheren T entfaltenden Proteinspezies (P3) auf, vermutlich aufgrund einer hohen Inhomogenität in der Porengrößenverteilung, was sich auch in dem breiten Peak in Abbildung 24 widerspiegelt. Die hier anhand der E2-MPS erhaltenen DSC-Ergebnisse unterstreichen die große Bedeutung der modifizierenden Synthese und Eignung der Charakterisierungsmethode für die Validierung der mesoporösen Wirtsmaterialien für Proteine.

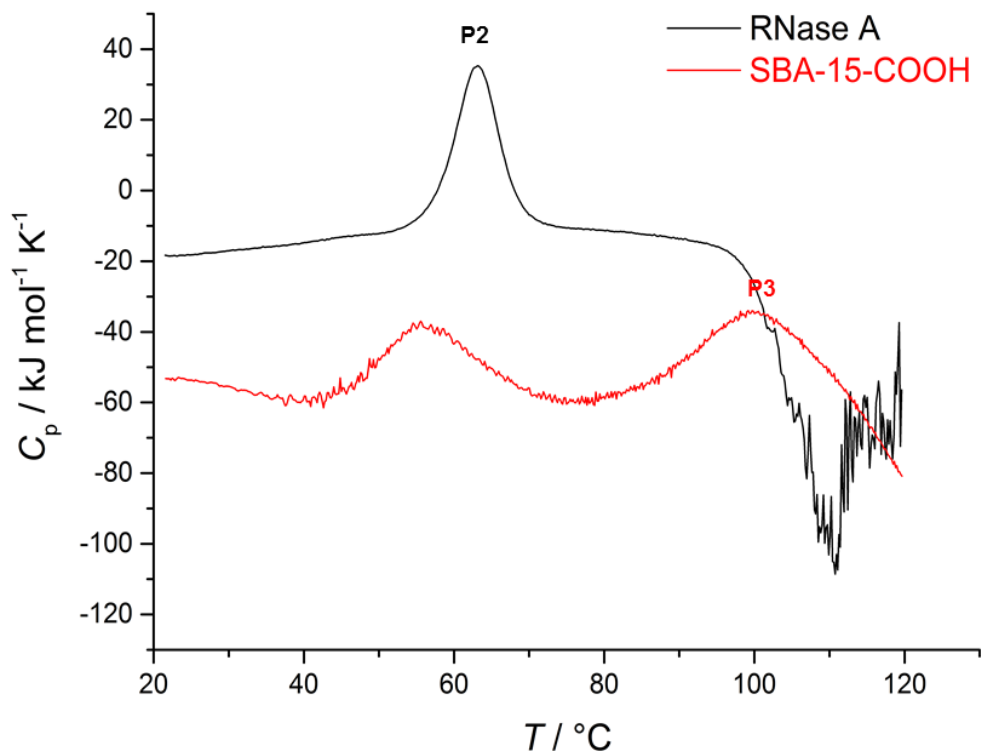


Abbildung 24 DSC-Entfaltungsspektrum des Proteins RNase A (10 mM Phosphatpuffer, pH 7) in carboxylatfunktionalisiertem SBA-15 (SBA-15-COOH, Charge E2). Das Verhältnis von Protein zu MPS beträgt 4:10.

4.1.3.2 MCM-41 und MCM-41-NH₂

In dieser Versuchsreihe wurde die Einlagerungsrate der RNase A in eine weitere MPS-Familie unter gleichen Bedingungen untersucht. MCM-41 und die aminofunktionalisierte Variante MCM-41-NH₂ sollen im Vergleich zu den SBA-15 unter anderem ein besseres Verhältnis von Porendurchmesser zur Porenwanddicke besitzen und folglich eine höhere mechanische Stabilität aufweisen^[77]. Es war jedoch vermutlich aufgrund von Rückständen aus der Synthese nicht möglich, das Immobilisierungsgleichgewicht anhand der UV-Spektroskopie zu bestimmen. Daher lassen sich keine Aussagen bezüglich der Immobilisierungsrate treffen und es wurde die Inkubationsdauer anhand der in der Literatur für vergleichbare Porendimensionen gefundenen Werte gewählt^[75]. Die DSC-Thermogramme nach 96 h Inkubation sind in Abbildung 25 gezeigt.

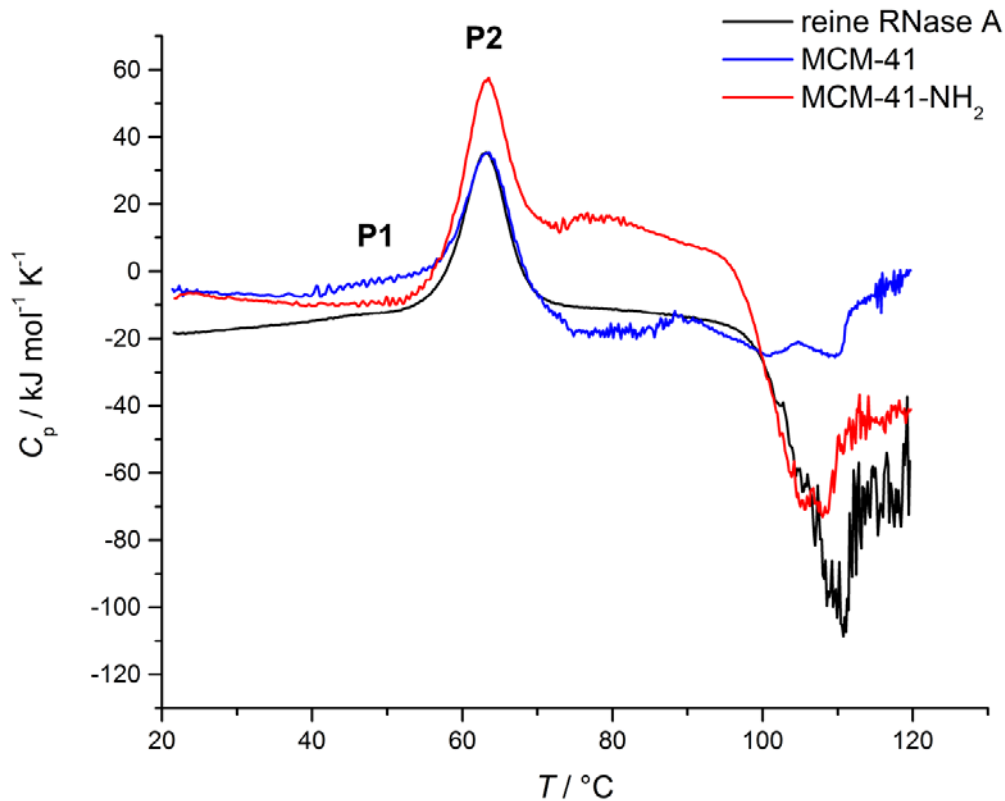


Abbildung 25 DSC-Entfaltungsspek des Proteins RNase A (10 mM Phosphatpuffer, pH 7) in unverändertem und funktionalisiertem Hard-Matter-Confinement. Das Verhältnis von Protein zu MPS betrug 3:10.

Alle Thermogramme weisen einen signifikanten Entfaltungsspek bei ca. 62 $^{\circ}\text{C}$ auf, was auf freies Protein in Lösung zurückzuführen ist (P2). Einen Hinweis auf destabilisiertes Protein aufgrund von Adsorptionsvorgängen an der Außenwand der MPS bei niedrigeren Temperaturen (P1), lassen sich minimal bei der Probe mit MCM-41 bei 40 bis 60 $^{\circ}\text{C}$

erkennen. Mit steigender Temperatur deutet ein exothermer Abfall der C_p -Werte auf eine irreversible Aggregation der RNase A-Moleküle hin. Diese scheint beim unfunktionalisierten MCM-41 (Porendurchmesser 3,8 nm, Porenvolumen 0,886 cm³/g) im Vergleich zur reinen Proteinlösung unterdrückt zu sein, wohingegen die Aggregation beim MCM-41-NH₂ (Porendurchmesser 2,8 nm, Porenvolumen 0,279 cm³/g) ähnlich zur reinen Proteinlösung beobachtet werden kann. Dies lässt vermuten, dass keine oder nur sehr wenig RNase A in die kleineren Poren des MCM-41-NH₂ eindringen konnte und zudem mit steigender Temperatur an den externen Oberflächen keine Adsorptionen erfolgte, weder durch vollständig noch partiell entfaltete Moleküle. Stattdessen fand ähnlich wie bei der reinen Proteinprobe eine Aggregation der frei in Lösung befindlichen Proteine statt.

4.1.3.3 Thermische Stabilität von RNase A eingelagert in mesoporösen Systemen

In Abbildung 22 sind die DSC-Thermogramme von RNase A in unverändertem (Porendurchmesser $d_p = 4,9$ nm, Porenvolumen $V_p = 0,54$ cm³/g) und funktionalisiertem SBA-15 in 10 mM Phosphatpuffer bei pH 7 dargestellt. Das Verhältnis von Protein zu MPS betrug 3:10. Die Immobilisierung war bei allen hier untersuchten pH-Werten erfolgreich, wenn während des Einlagerungsvorganges die Dispersion nur leicht geschüttelt und nicht gerührt wurde. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass das Verwenden eines Magnetrührers die MPS-Struktur durch Zermahlen teilweise zerstört. Eine Destruktion sollte bei den MPS-Materialien wie MCM-48 und MCM-41 nicht erfolgen^[75], da diese im Vergleich zu den SBA-15 eine höhere mechanische Stabilität besitzen. SBA-15 hat ein ungünstiges Verhältnis von Porendurchmesser zu Wanddicke, wohingegen dieses bei MCM-41 mit dünneren Wänden günstiger ist^[77]. Jedoch konnte in dieser Arbeit keine gesteigerte Effizienz der Einlagerung von RNase A in MCM-41 gezeigt werden, was vermutlich an einer mangelnden Qualität des Materials bzw. an den zu geringen Porendurchmessern des MPS für eine genügend hohe Inkorporation von RNase A lag (Abbildung 25 in Abschnitt 4.1.3.2). Der Einlagerungsprozess wurde bis zum Erreichen eines Gleichgewichts vollzogen, was ~96 h bei allen MPS dauerte (SBA-15, SBA-15-COOH und SBA-15-NH₂).

Die DSC-Thermogramme der MPS-Protein-Dispersionen weisen mehrere Entfaltungspeaks auf. Neben einem des freien Proteins ($T_m = 61,9$ °C, DSC-Peak P2), existiert noch ein zweiter Peak bei wesentlich höheren Temperaturen (P3), welcher breiter ist. Der T_m -Wert der in SBA-15 eingelagerten Proteinspezies ist etwas geringer verglichen zu dem in MCM-48, deren Porendurchmesser kleiner und vergleichbar mit dem Durchmesser eines RNase A-Moleküls (~3 nm) ist. Dies ist in Übereinstimmung mit der Annahme, dass die thermische Stabilität eines Proteins maximal sein sollte, wenn der Porendurchmesser des

Wirtes mit der Proteingröße übereinstimmt ^[66]. Im Allgemeinen kann während des Immobilisierungsprozesses das Protein an die externe Oberfläche des Silikats adsorbieren, in die Poren hinein diffundieren oder frei in Lösung verbleiben (bulk-artiges Verhalten). Die DSC-Thermogramme deuten jedoch auf keinen signifikanten Beitrag durch die Existenz adsorbierter Proteinspezies hin, da dies durch partielle Destabilisierung des Proteins bei geringeren Temperaturen als der Entfaltungstemperatur des freien Proteins sichtbar sein sollte, was beispielsweise für den Wirt MCM-48 beobachtet wurde (DSC-Peak P1, typischerweise bei ~ 53 °C) ^[75,129]. Dies reflektiert den Aspekt, dass das Verhältnis der äußeren Oberfläche zur inneren des SBA-15 geringer ist als bei MCM-48, was bei einer Betrachtung der Partikelmorphologie offensichtlich erscheint. Genauer bedeutet dies, dass die äußere Fläche der sphärischen und kubischen MCM-48 größer als bei den stäbchenartigen SBA-15 ist, was demnach eine höhere externe Adsorption ermöglicht, die sich in einem vorgelagerten Peak (P1) äußert.

Die Ursache des breiteren DSC-Peaks bei der Entfaltung der eingelagerten Proteine liegt möglicherweise in Unterschieden in der Packung der Proteinmoleküle innerhalb der Poren und/oder einer inhomogenen Porengrößenverteilung des Wirtsmaterials (Abbildung 22). Nach der Entfaltung eingelagerter Proteinspezies (DSC-Peak P3) sinkt der C_p -Wert, was auf die Aggregation eingelagerter und nur in geringem Ausmaß auf freie Proteinspezies zurückzuführen ist. Dies konnte in MCM-48, deren Porendurchmesser mit der Proteingröße vergleichbar war und somit die Aggregation effektiv unterdrücken kann, zu einem wesentlich geringeren Ausmaß beobachtet werden, was die Annahme einer Aggregation in den hexagonalen Poren stützt ^[7,75].

4.1.3.4 Der Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung

Die dynamische Differenzkalorimetrie wurde verwendet, um den Einfluss der zwei unterschiedlichen Oberflächenfunktionalisierungen auf die thermische Stabilität des Proteins zu ermitteln. Hierfür wurden Thermogramme bei pH 7 für SBA-15 ($d_p = 4,9$ nm, $V_p = 0,54$ cm³/g) und die modifizierten Analoga SBA-15-COOH ($d_p = 4,0$ nm, $V_p = 0,14$ cm³/g) und SBA-15-NH₂ ($d_p = 4,7$ nm, $V_p = 0,69$ cm³/g) aufgenommen (Abbildung 22). Die Anwesenheit freier Proteinspezies kann bei allen MPS beobachtet werden (P2). Lediglich bei unverändertem SBA-15 mit dem größten Porendurchmesser lässt sich eine eingelagerte Proteinspezies, die bei höheren Temperaturen entfaltet, beim ersten Scanvorgang erkennen (P3). In Abbildung 22 bis Abbildung 24 ist zu erkennen, dass adsorbierte Proteine, die bei ca. 53 °C entfalten (DSC-Peak P1), nur einen kleineren Beitrag liefern. Hieraus lässt sich schließen, dass nur wenige Proteinmoleküle an die externe Oberfläche adsorbieren.

Die Entfaltung der freien Proteinspezies findet bei ca. 62 °C statt. Ein signifikanter DSC-Peak (P2) bei dieser Temperatur weist auf eine hohe Exzess-Menge an freiem Protein in der Lösung hin. Lediglich das DSC-Thermogramm des SBA-15-COOH (E1) weist eine geringere Menge freier Proteinspezies auf (DSC-Peak P2), was darauf hindeutet, dass die meisten Proteinmoleküle in den Poren des E1 eingelagert vorliegen. Dies steht in guter Übereinstimmung mit den spektroskopisch ermittelten Daten zur Immobilisierung (Abschnitt 4.1.1).

Nur das Thermogramm des unmodifizierten SBA-15, welches den größten Porendurchmesser der drei MPS besitzt, und des SBA-15-COOH (E2) in Abbildung 24 weisen einen signifikanten Entfaltungspeak eingelagerter Proteine auf. Der breite DSC-Peak P3 des unveränderten SBA-15 besitzt sein Maximum bei ca. 90 °C ($\Delta T_m \approx 30$ °C) bzw. bei ca. 100 °C bei E2 und hat eine Halb-Peakbreite von ~20 °C, was vermutlich auf eine heterogene Porendurchmesserverteilung und Proteinpäckung innerhalb der länglichen Mesoporen hinweist. Eine sequentielle Entfaltung verschiedener Domänen der RNase A könnte einen zusätzlichen Beitrag zur Peakverbreiterung liefern ^[21]. Es lässt sich deutlich erkennen, dass die Temperaturstabilität der in MPS eingelagerten Proteinfraction im Vergleich zu der Proteinspezies in Bulklösung signifikant erhöht ist. Die hier beobachtete Stabilitätszunahme ist in guter Übereinstimmung zu theoretisch geschätzten statistisch-mechanischen Berechnungen der Stabilität (Gibbs-Energie) und thermischen Entfaltung in einer einschränkenden Geometrie, die doppelt so groß wie das darin eingelagerte Biopolymer ist. Diese sagt eine Stabilisierung von ca. $10 k_B T$ bzw. ~20 °C vorher ^[159,160].

Im aminofunktionalisierten SBA-15 eingelagerte RNase A weist ein zu dem in reinem Puffer ähnliches Thermogramm auf. Jedoch zeigt sich eine aggregationsassoziierte exotherme Abnahme der C_p -Werte ab ~95 °C, die somit um ~5 °C unterhalb einer reinen Proteinlösung einsetzt. Ein fehlender DSC-Peak P3, der eine endotherme Entfaltung eingelagerter Proteinspezies bei höheren Temperaturen darstellen würde, lässt vermuten, dass eine zu geringe Menge an RNase A eingelagert worden ist, um detektiert werden zu können. Die spektroskopischen Daten stützen diese Annahme, da aus diesen hervorgeht, dass die Aminomodifikation die geringste Menge RNase A einlagern konnte (vgl. Abbildung 19). Da die unnormierten Daten auf eine hohe Menge immobilisierten Proteins hindeuten, jedoch keine destabilisierte Proteinfraction P1 in den Thermogrammen zu sehen ist und gar eine frühere Aggregation einsetzt, legt das den Schluss nahe, dass im Zuge der thermischen Entfaltung immer mehr RNase A sich extern anlagern kann und somit die Aggregation bei tieferen Temperaturen durch Vorhandensein der Silikat-Grenzfläche beschleunigt wird. Darüber hinaus ist dies ein Indiz dafür, dass das MPS nicht ganz intakt vorlag. Diese Beobachtung konnte auch bei dem durch postsynthetische Propfung veränderten MCM-41

gemacht werden. Bei MCM-41-NH₂ setzt allerdings die Aggregation so wie in freier Bulklösung ein. Somit lässt sich - alternativ zur Vermutung, dass das MPS zerstört sei - zusätzlich annehmen, dass ein Mangel an eingelagertem Protein durch ein Verstopfen der Poren im Zuge des Funktionalisierungsprozesses (auch unter Erhalt der hexagonalen Struktur) bedingt sein konnte. Die günstigsten elektrostatischen Wechselwirkungen (z.B. zwischen einer negativ geladenen Oberfläche des anorganischen Wirts und positiv geladenen, exponierten Arginin- und Lysinseitenketten) wurden für SBA-15-COOH erwartet. Der sehr breite Peak bei diesem funktionalisierten Material weist auf eine stark inhomogene Packung der RNase A Moleküle innerhalb der Mesoporen hin. Ein konsekutiver zweiter Scanvorgang (vgl. Abbildung 23) gibt Anlass zur Annahme, dass sich eingelagertes Protein nach dem Abkühlen wieder zurückfalten kann. Hingegen liefert freies Protein keinen Beitrag mehr zum Thermogramm, sodass deutlich ein Anstieg des T_m -Wertes um bis zu 30 °C in einem einzigen Peak resultiert. Darüber hinaus ist es nicht ausgeschlossen, dass im Zuge der Entfaltung freier Proteinspezies eine weitere Einlagerung in die engen Poren stattgefunden hat, was auf eine stärkere Affinität zwischen den Oberflächengruppen des Wirts und entfaltetem Protein hindeutet. Zudem ist anzunehmen, dass keine Aggregation nach der Entfaltung innerhalb der carboxylatfunktionalisierten SBA-15-COOH - anders als bei dem SBA-15-NH₂ Material - stattgefunden hat, da keine exotherme Abnahme der C_p -Werte aus dem Thermogramm erkennbar ist.

4.1.4 Exkursion: Einlagerung von Lysozym in Tb-mesoMOFs

Eine weitere in dieser Arbeit - jedoch lediglich explorativ - untersuchte Klasse an Festkörpern zur Proteinimmobilisierung waren Tb-mesoMOFs. Nach erfolgreicher Synthese erfolgte die Einlagerung des Lysozyms wie unter Abschnitt 2.6 beschrieben und anschließend wurde mittels DSC die Existenz thermisch stabilisierten Lysozyms überprüft. Die quantitative Bestimmung der eingelagerten Menge an Lysozym anhand eines Bicinchoninsäure (BCA)-Assays ergab, dass ca. 28 % der Gesamtproteinmenge an bzw. in den MOFs immobilisiert vorlag.

Die DSC-Thermogramme von zwei verschiedenen Messungen sind in Abbildung 26 dargestellt. Bei gleichen Bedingungen entfaltet Lysozym in Lösung ohne einschränkende Geometrien bei 72,6 °C (Daten siehe Anhang, Abbildung A3). Folglich kann auch nach einer Inkubationszeit von 144 h noch ein hoher Anteil an destabilisierter (P1 bei ca. 62 °C) und freier Proteinspezies (P2 bei ca. 72 °C) identifiziert werden. Ähnlich wie bei den MPS weist das Thermogramm stabilisierte Proteinspezies bei höheren Temperaturen auf (P3), wobei aufgrund der zwei verschiedenen Käfigstrukturen des Wirtsmaterials und einer vermutlich

hohen Inhomogenität in der Morphologie der erhaltenen Kristalle sehr breite und nicht klar voneinander abgrenzbare Peaks resultieren. Es lässt sich schlussfolgern, dass die Einlagerung von Lysozym erfolgt ist, jedoch für eine eindeutige Charakterisierung die hier synthetisierten MOFs ungeeignet sind. Darüber hinaus wurde die Eignung der MOFs für dynamische Messungen nach einer Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin untersucht. Hierbei konnte eine sehr starke Adsorption dieses Farbstoffes an den Wirt nachgewiesen werden, weshalb sich eine Untersuchung der Dynamik beispielsweise mittels Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS) ebenfalls als ungeeignet erwies (Daten hier nicht gezeigt).

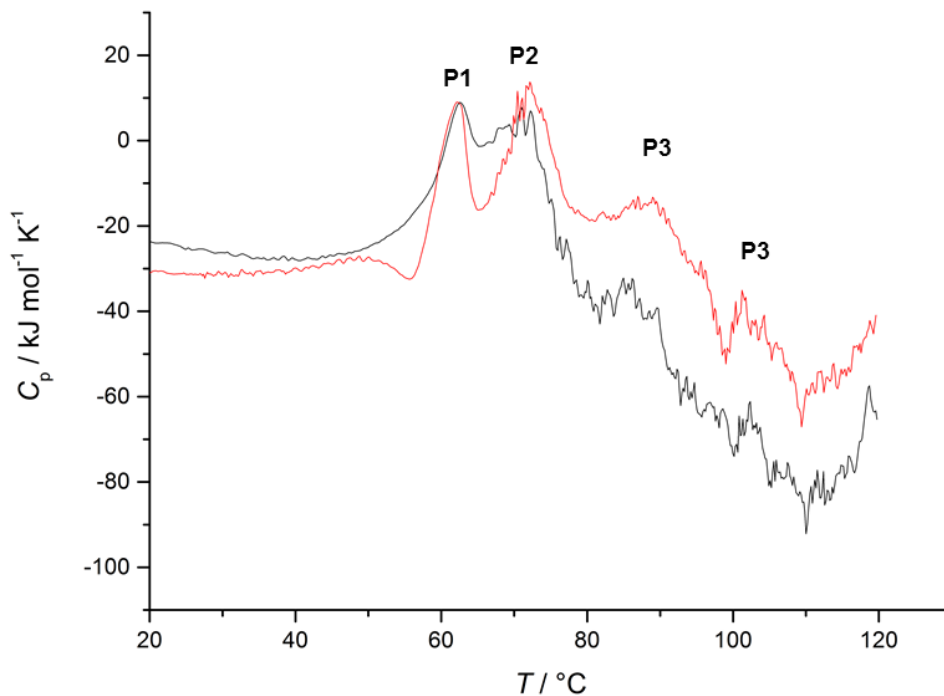


Abbildung 26 Zwei verschiedene DSC-Messungen mit 5,3 mg/mL Lysozym in HEPES (50 mM, pH 7,5) nach Inkubation mit ca. 10 mg Tb-mesoMOF (144 h, 37 °C).

4.1.5 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen (I)

Die hexagonalen mesoporösen Molekularsiebe des Typs SBA-15 weisen ein hohes Potential zur schnellen und effizienten Einlagerung eines Proteins der Größe von RNase A auf (hydrodynamischer Radius des Proteins $R_h \approx 1,7$ nm). Es konnte gezeigt werden, dass SBA-15 mit einem Porendurchmesser von 4,9 nm die größte Menge an Protein einlagern konnte. Dies liegt im vergleichsweise großen Porendurchmesser von 4,9 nm begründet, welcher einen schnellen Proteintransfer in und eine Migration innerhalb der Mesoporen

ermöglicht. Zusätzlich zum Einfluss des tubulären Durchmessers konnte die Einlagerung und Immobilisierung effektiv durch den pH der Proteinlösung und die Funktionalisierung des Wirtsmaterials beeinflusst werden. Die maximale Beladung wurde bei pH 9 für die SBA-15 mit einem Porendurchmesser von 4,9 nm erzielt. Demzufolge wurden die höchsten eingelagerten Proteinmengen nahe dem pI des Proteins beobachtet, da dieser für RNase A bei 9,6 liegt. In diesem Bereich ist die laterale Abstoßung der RNase A Moleküle minimiert, sodass eine dichtere Packung mittels einer single-file-Diffusion innerhalb der Poren möglich ist. Obwohl das funktionalisierte SBA-15-COOH die kleinsten Poren besaß, konnte hierfür die höchste Immobilisierungskapazität und schnellste Immobilisierungsrate detektiert werden. Dies lässt auf eine erhöhte Affinität durch günstige elektrostatische Wechselwirkungen schließen. Im Gegensatz hierzu war die Einlagerung in SBA-15-NH₂ drastisch vermindert, da in diesem Fall gleich geladene Wechselwirkungspartner aufeinandertreffen. Am geringsten war der Einfluss des pH-Wertes auf den Einlagerungsvorgang bei Verwendung der aminomodifizierten MPS, da hier keine elektrostatische Triebkraft erwartet werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte der pH-Wert für SBA-15-COOH/-COO⁻, die aus den kleineren Porengeometrien resultierenden Nachteile kompensieren. Ein ähnlicher Effekt ist bei der Einführung von Aluminium in MPS bekannt ^[161].

Nach einer erfolgreichen Einlagerung des Proteins in die MPS erfolgten die kalorimetrischen Messungen. Wie aus den DSC-Ergebnissen ersichtlich, ist die thermische Stabilität der RNase A in allen hier verwendeten MPS drastisch erhöht und liegt in der Größenordnung $\Delta T_m \approx 30 \pm 10$ °C. Dies ermöglicht zum Beispiel Enzymreaktionen bei höheren Temperaturen und hat somit einen höheren katalytischen Umsatz zur Folge. Zusätzlich führt die Stabilisierung von Enzymen meist zu einer gesteigerten Wiederverwendbarkeit in mehreren katalytischen Zyklen.

Im Zuge der thermischen Entfaltung vergrößert sich die zum Lösungsmittel exponierte Oberfläche des Proteins (engl.: solvent accessible surface area, SASA), was eine erhöhte Neigung zur Adsorption des Proteins an die Silikatoberfläche zur Folge hat und demnach größtenteils einer irreversiblen Proteinaggregation entgegenwirkt. Anders als bei den aminofunktionalisierten MPS ist die fehlende exotherme Abnahme der C_p -Werte ein klares Indiz dafür, dass keine merkliche Aggregation im Zuge der thermischen Entfaltung bei Verwendung der carboxylatfunktionalisierten SBA-15 stattfindet.

Die erhöhte Temperaturstabilität lässt sich vermutlich nicht nur auf den entropie-bedingten Effekt des ausgeschlossenen Volumens, d.h. die Einschränkung des

Konformationsspielraumes im entfalteten Zustand und folglich eine Bevorzugung des nativen Faltungszustandes, zurückführen. Daten aus Druckperturbationskalorimetrie (PPC)-Messungen weisen darauf hin, dass eine erhöhte Hydratisierung des Proteins innerhalb der engen hydrophilen Poren auch zur Stabilisierung beitragen könnte. In den PPC-Messungen wird das durch einen deutlich erhöhten Anstieg des hydrationsabhängigen partiellen thermischen Expansionskoeffizienten des Proteins sichtbar. Dieser Effekt könnte durch den wasser-strukturbildenden Einfluss der Silanolgruppen auf der MPS-Oberfläche erzeugt worden sein, die in enger Nähe zur hydratisierten Proteinoberfläche stehen und sich folglich wie kompatible Additive (wie beispielsweise Zucker oder Glycerol) verhalten, die bekanntermaßen von der Proteingrenzfläche ausgeschlossen werden und somit eine bevorzugte Hydratisierung des Proteins bedingen. Es wurde berichtet, dass nach einer thermischen Entfaltung kein Expansivitätsanstieg stattfand und somit offenbar keine oder nur eine unvollständige Entfaltung des Proteins in den Poren erfolgte ^[76].

Die Verwendung weiterer Festkörper-Confinement-Systeme, d.h. MCM-41 und Tb-mesoMOFs, neben den SBA-15-Silikaten verdeutlicht das komplexe Zusammenspiel der Wechselwirkung von zahlreichen Faktoren für die Eignung und den Erfolg bei der Immobilisierung von Biomolekülen. In dieser Arbeit konnte mit den MCM-41 keine erfolgreiche Inkorporation demonstriert werden, was zum einen einem Misserfolg der Synthese und/oder der Funktionalisierung bei den MCM-41-NH₂ geschuldet sein konnte und zum anderen an zu geringen Porendurchmessern gelegen haben könnte. Diese Ursachen spielen vor allem bei hexagonalen Porenstrukturen eine große Rolle, da eine direkte Weitergabe ins Innere für eine fortschreitende Einlagerung erforderlich ist, sodass bei einem Verstopfen der Poren - sei es durch den Funktionalisierungsvorgang oder durch Proteinmoleküle an den engen Poreneingängen - die Migration ins Poreninnere verhindert wird.

Eine erfolgreiche Inkorporation von Proteinen in MOFs konnte anhand der DSC-Thermogramme für Lysozym demonstriert werden. Der Einlagerungsvorgang dauerte jedoch sehr lange (ca. 120 h), was vermutlich der hohen Hydrophobizität der MOFs geschuldet ist, die es nativ gefalteten und somit hydratisierten Proteinen erschwert, sich einzulagern. Ein kontinuierlicher Abfall der C_p -Werte deutete zudem auf eine fortschreitende Adsorption der Proteine an die Tb-mesoMOFs bei Temperaturerhöhung hin. Darüber hinaus waren mehrere Entfaltungsspeaks mit steigender Temperatur zu sehen, was sich auf das Vorhandensein zweier unterschiedlich großer Käfigstrukturen (3,9 nm und 4,7 nm) zurückführen lässt. Trotz dieser Inhomogenität und Hydrophobizität des Wirtsmaterials konnte eine erhöhte thermische Stabilität eingelagerter Lysozymmoleküle ermittelt werden. Letztendlich ist die

Anwendung dieser Materialklasse vor allem hinsichtlich einer Erhöhung der katalytischen Umsätze und häufigeren Verwendbarkeit bestimmter Enzyme in mehreren Zyklen beliebt geworden. In dieser Arbeit konnte ergänzend zur bereits bekannten verbesserten katalytischen Effizienz eine erhöhte thermische Stabilität der eingelagerten Proteine demonstriert werden.

4.2 FTIR-Ergebnisse der Temperaturabhängigkeit des elastinartigen Peptids

4.2.1 Amid-I'-Bande des 10 Gew.-%igen elastinartigen Peptids GVG(VPGVG)₃

Das elastinartige Peptid (ELP) GVG(VPGVG)₃ weist - wie auch viele intrinsisch ungeordnete Peptide - einen inversen Temperaturübergang (ITT) auf ^[162-166]. Dies bedeutet, dass die Konformation des ELPs mit steigender Temperatur von einem ungeordneten zu einem geordneteren Zustand übergeht. Um detaillierte Kenntnisse über die strukturellen Änderungen des Peptids in Abhängigkeit von der Temperatur zu gewinnen, wurden FTIR-Messungen, wie im Abschnitt 3.2 beschrieben, in einem 10 mM Phosphatpuffer in D₂O bei pH 7 in einem Temperaturbereich von 4 bis 88 °C durchgeführt. In Abbildung 27 sind oben die hintergrundkorrigierten, normierten Spektren und unten die korrespondierenden Differenzspektren des ELPs bezogen auf die tiefste gemessene Temperatur (4 °C) dargestellt. Die Kurvenform (bei allen Temperaturen) ist charakteristisch für elastinartige Peptide, die die pentamere Sequenz (VPGVG)_n enthalten ^[162,167,168]. Allen Spektren ist ein Maximum bei der Wellenzahl 1645 cm⁻¹ gemeinsam, was der Absorption ungeordneter Strukturen zugeordnet werden kann. Zwei weitere deutlich erkennbare Absorptionsbanden befinden sich bei 1675 cm⁻¹ und 1615 cm⁻¹. Die Bande bei 1675 cm⁻¹ ist für Typ II β-Schleifen charakteristisch, wohingegen die niederfrequente Bande bei 1615 cm⁻¹ einerseits Carboxylatgruppen zugeordnet werden kann, andererseits aber auch dem H-Brückenmuster innerhalb einer Prolinverzweigung geschuldet sein könnte ^[169]. Bei Betrachtung der Differenzspektren mit steigender Temperatur lässt sich ein vierter Bereich bei 1660 cm⁻¹ identifizieren, der jedoch nicht als ein Minimum in der zweiten Ableitung erkennbar ist (Abbildung A6 im Anhang). Dieser Bereich kann Schleifenstrukturen zugeschrieben werden. Mit steigender Temperatur ist eindeutig eine Zunahme der Typ II β-Schleifen und der anderen Schleifenstrukturen zu sehen, wohingegen eine Abnahme ungeordneter Strukturen bei 1645 cm⁻¹ stattfindet. Dieser Trend ist charakteristisch für den inversen Temperaturübergang elastinartiger Peptide und kann im gesamten gemessenen Temperaturbereich bis zur höchsten Temperatur von ca. 88 °C ohne Umkehrung dieser Entwicklung beobachtet werden.

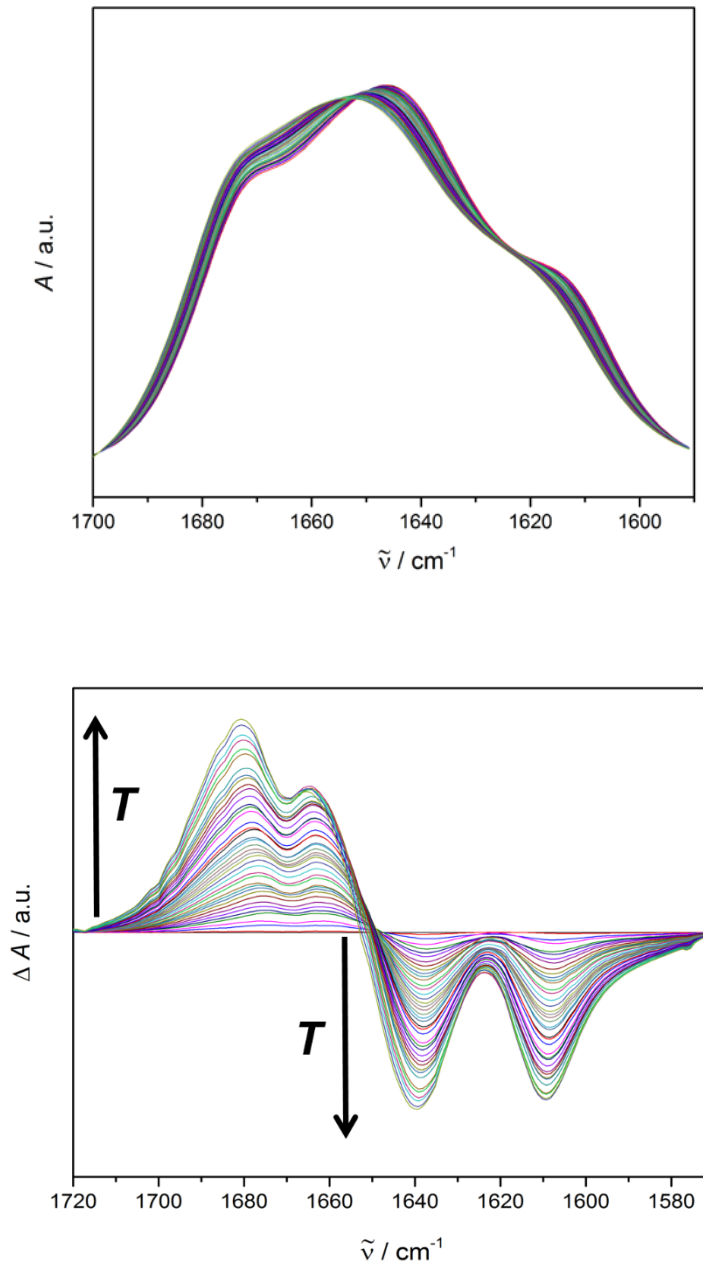


Abbildung 27 Temperaturabhängige, normierte FTIR-Spektren im Bereich der Amid-I'-Bande von 10 Gew.-% ELP (oben). Zur besseren Visualisierung der Änderungen mit steigender Temperatur sind unten korrespondierende Differenzspektren gezeigt. Die Pfeile symbolisieren die Intensitätszunahme der Banden mit steigender Temperatur.

4.2.2 Amid-I'-Bande des ELPs in Anwesenheit von 30 Gew.-% Ficoll

Es gibt zahlreiche Untersuchungen zum Einfluss des makromolekularen Crowdings unter Verwendung von Ficoll und vielen anderen Polysaccharidpolymeren sowohl auf die Kinetik als auch die Thermodynamik verschiedener zumeist nativ gefalteter Proteine mit wohl definierten regulären Sekundärstrukturen. Dagegen ist zu den Auswirkungen des Crowders

Ficoll auf die temperaturabhängige Strukturänderung eines in Vergleich zu den IDPs hydrophoben und flexiblen Peptids relativ wenig bekannt. Die Konsequenzen einer durch Ficoll verdichteten Lösung auf den inversen Temperaturübergang des ELPs werden im Folgenden aufgezeigt.

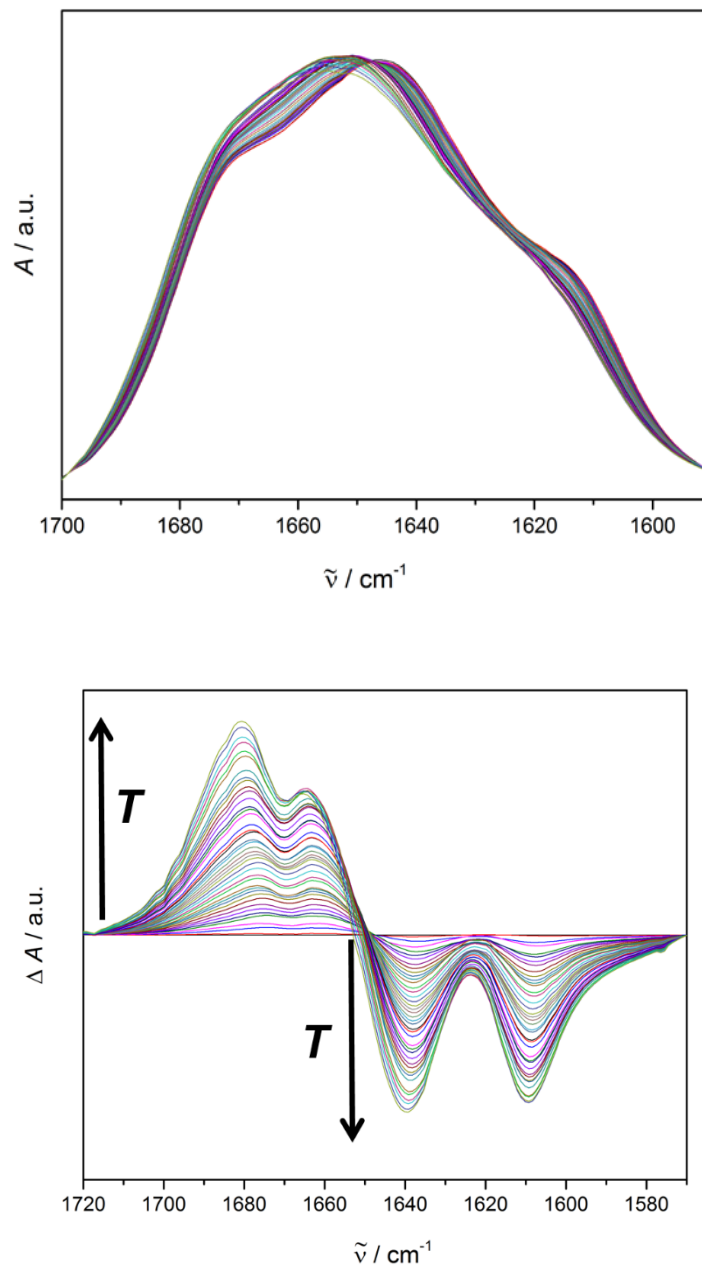


Abbildung 28 Temperaturabhängige FTIR-Spektren im Bereich der Amid-I'-Bande von 10 Gew.-% ELP mit 30 Gew.-% Ficoll. Normierte Spektren sind oben abgebildet und zur besseren Visualisierung der Änderungen mit steigender Temperatur sind unten korrespondierende Differenzspektren gezeigt.

In Abbildung 28 sind oben die hintergrundkorrigierten, normierten Spektren einer 10 Gew.-%igen Peptidlösung mit einem Anteil des Soft-Matter Crowders Ficoll von

30 Gew.-% und unten die korrespondierenden Differenzspektren bezogen auf die tiefste gemessene Temperatur (4 °C) dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass die spektrale Form im Vergleich zur reinen Peptidprobe (Abbildung 27) durch den Zusatz von Ficoll nicht verändert wird. Wie bei der Probe mit reinem ELP konnten in Anwesenheit von Ficoll nur drei Minima in der zweiten Ableitung identifiziert werden (Abbildung A7 im Anhang). Mit steigender Temperatur ereignen sich wie bei der reinen ELP-Lösung strukturelle Änderungen in den zuvor beschriebenen vier Wellenzahlbereichen (1675 cm^{-1} , 1660 cm^{-1} , 1645 cm^{-1} , 1615 cm^{-1}) und es lässt sich auch hier der ITT erkennen. Eine detaillierte Analyse des inversen Temperaturübergangs des ELPs in Anwesenheit des Crowders anhand ermittelter relativer Sekundärstrukturanteile wird in dem nachfolgenden Abschnitt 4.2.3 behandelt.

4.2.3 Vergleich der Ergebnisse in An- und Abwesenheit der Crowding-substanz Ficoll

Bei der Zugabe einer vergleichsweise geringen Crowderkonzentration (10 Gew.-% Ficoll) zur ELP-Lösung konnte im Rahmen des Fehlers (Abweichung zwischen drei Messungen) keine signifikante Veränderung der relativen Strukturanteile im Vergleich zur reinen ELP-Probe ermittelt werden, sodass diese Daten in diesem Abschnitt nicht weiter diskutiert werden (Abbildung A4 im Anhang). Um Rückschlüsse auf die Temperaturabhängigkeit der relativen Sekundärstrukturanteile der Amid-I'-Banden zu ermöglichen, wurde die Bandenanpassung mittels vier Gaußkurven wie im Abschnitt 3.2.3 beschrieben durchgeführt. Da die Banden bei 1645 cm^{-1} und 1675 cm^{-1} den Übergang von ungeordneten Strukturen zu geordneten Strukturen in Form von Typ II β -Schleifen anzeigen, sind sie für die Charakterisierung des ITT ausreichend und die anderen beiden Banden können vorerst in der nachfolgenden Diskussion vernachlässigt werden.

In Abbildung 29 ist ein exemplarischer Vergleich der gemittelten Anteile sowohl der ungeordneten Strukturen als auch der Typ II β -Schleifen zwischen der reinen 10 Gew.-%igen Peptidprobe und einer 30 Gew.-% Ficoll enthaltenden ELP-Lösung dargestellt. Hierbei entsprechen die Fehlerbalken der Standardabweichung zwischen drei Messungen. Der relative Anteil geordneter Strukturen (Typ II β -Schleifen) des ELPs steigt von 21 % bei 4 °C auf 30 % bei 84 °C an, wohingegen die ungeordneten Strukturen von ca. 58 % um ca. 20 % bis zur höchsten Temperatur abnehmen. Im Vergleich zu FTIR-Daten des kürzeren Oktamers GVG(VPGVG), in denen der Anteil ungeordneter Strukturen bis 55 °C um ~ 25 % abnahm und bis 80 °C konstant blieb ^[164], beträgt die hier ermittelte Abnahme ungeordneter Strukturen bis zu dieser Temperatur nur ~ 10 % und schreitet auch zwischen 60 und 80 °C fort. Diese Diskrepanz kann zum einen durch die zwei weiteren pentameren Einheiten des

Oktadekapeptids erklärt werden, da das längere Peptid durch eine erhöhte Anzahl an den Aminosäuren Prolin und Valin, die bei höheren Temperaturen die Ausbildung geordneter Schleifenstrukturen fördern, eine höhere konformationelle Ordnung annehmen kann ^[170]. Zum anderen unterscheiden sich die ermittelten Anteile aufgrund einer Bandenanpassung mit mehr als vier Subbanden. Groß *et al.* führten Messungen mit dem Peptid C(VPGVG)₆ durch und verwendeten eine Anpassung der Amid-I'-Bande mit vier Subbanden ^[162]. Anders als in dieser Arbeit, ermittelten sie auch eine Zunahme an geordneten Strukturen (hauptsächlich β -Faltblätter), schlossen aus einer Abnahme der Bande bei 1615 cm⁻¹ jedoch auf eine De-Aggregation des Peptids mit steigender Temperatur, wohingegen in dieser Arbeit angenommen wird, dass - aufgrund der kürzeren Sequenz des Peptids mit nur drei der pentameren Einheiten - die Absorbanz bei 1615 cm⁻¹ durch die Prolin-Resonanzfrequenz in Nachbarschaft mit Valin verursacht wurde ^[169].

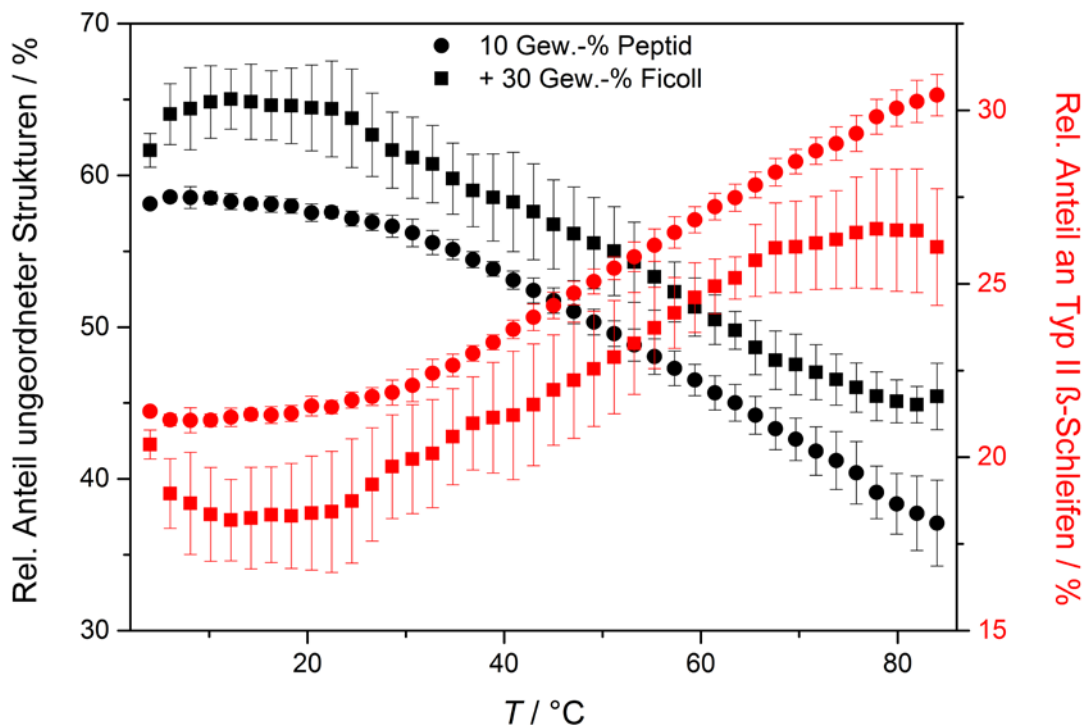


Abbildung 29 Aus der Bandenanpassung ermittelte relative Sekundärstrukturanteile der Amid-I'-Bande des 10 Gew.-%igen Elastinpeptids (runde Symbole) und des ELPs in Anwesenheit von 30 Gew.-% Ficoll (rechteckige Symbole). Der Anteil ungeordneter Strukturen ist durch die linke Achse und schwarze Symbole dargestellt; die rechte Achse und die roten Symbole repräsentieren Typ II β -Schleifenstrukturen.

Bei 4 °C ist der Anteil an geordneten Strukturen bei Zugabe der Crowdingsubstanz unwesentlich geringer (ca. 1 %) verglichen mit der reinen Peptidprobe, was folglich im Umkehrschluss bedeutet, dass der relative Anteil an ungeordneten Strukturen (Zufallsknäuel) in Anwesenheit des Crowders lediglich geringfügig erhöht ist (um ca. 4 %).

Dieser Trend setzt sich im Zuge der Temperaturerhöhung fort, sodass entgegen des erwarteten Effekts des ausgeschlossenen Volumens eine geringfügige enthalpische Destabilisierung zu beobachten ist. Darüber hinaus kann bis 12 °C eine geringfügige Abnahme bzw. Zunahme der geordneten bzw. ungeordneten Strukturen um ca. 2 % und ein Einsetzen der Umkehr des inversen Temperaturübergangs ab 80 °C in Anwesenheit der Crowdingmoleküle festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Peptid und den Hydroxylgruppen des Ficolls sein, was schließlich der Ausbildung geordneter Schleifenstrukturen entgegengewirkt haben könnte. Zusätzlich ist denkbar, dass das Zuckerpolymer Ficoll wie ein Osmolyt wirken könnte, da dieses, trotz ähnlicher Radien des Peptides (ca. 1,9 nm) und des Crowders (ca. 5,5 nm), sehr flexibel ist, sodass sich das ELP zwischen die Ficollketten einlagern könnte. Folglich würden günstige Wasserstoffbrückenbindungen den Effekt des ausgeschlossenen Volumens relativieren bzw. überwiegen.

Im Hinblick auf die beiden (hier nicht gezeigten) Subbanden bei den Wellenzahlen $\tilde{\nu} = 1660 \text{ cm}^{-1}$ (Schleifenstrukturen) und $\tilde{\nu} = 1615 \text{ cm}^{-1}$ wurde eine sehr ähnliche Temperaturabhängigkeit ermittelt. Die relativen Anteile der Schleifenstrukturen des Peptids nahmen von 1 % bei 4 °C auf 7 % bei 88 °C zu. In Anwesenheit von Ficoll fand eine Zunahme in ähnlicher Größenordnung von 1 % bei 4 °C um bis zu 4 % bei 88 °C statt. Zugleich nahm im Zuge der Temperaturerhöhung der Anteil der Subbande bei 1615 cm^{-1} insgesamt von 16 % um 6 % und von 15 % um 5 % in Ab- bzw. Anwesenheit des Crowders Ficoll zu. Somit lässt sich zusammenfassen, dass bei einem Vergleich der Änderungen in diesen Bereichen in Ab- und Anwesenheit des Ficolls diese durch den Crowder weitgehend unbeeinflusst scheinen und folglich vernachlässigt werden können. Demnach beschränken sich die maßgeblichen Änderungen auf die Anteile der ungeordneten und Typ II β -Schleifenstrukturen.

4.2.4 Einfluss von Kosolvenzien auf das ELP

4.2.4.1 Temperaturabhängigkeit der Amid-I'-Bande des ELPs in Anwesenheit von 2 M TFE

Es wurde der Einfluss des Kosolvens Trifluorethanol (TFE) auf die Konformation des ELPs mit steigender Temperatur untersucht. TFE als unpolares Solvens kann einerseits strukturinduzierend wirken, vor allem indem es hydrophobe Wechselwirkungen begünstigt^[171]. Andererseits kann es auch den hydrophoben Kern globulärer Proteine zerstören. Bei Konzentrationen von 10 bis zu 80 % TFE können TFE-Cluster in der

Größenordnung von 0,5 bis 1 nm gebildet werden^[123]. Bei den in dieser Versuchsreihe verwendeten 2 M TFE, die einer Konzentration von 12 % (v/v) entsprechen, können die vorkommenden TFE-Cluster nicht vollständig gebildet oder stabilisiert werden. Die Interaktion solcher TFE-Cluster mit der Hydrathülle des Peptids könnte die Wassermoleküle von der Peptidoberfläche entziehen und somit eine Wechselwirkung der Valin-Seitenketten begünstigen.

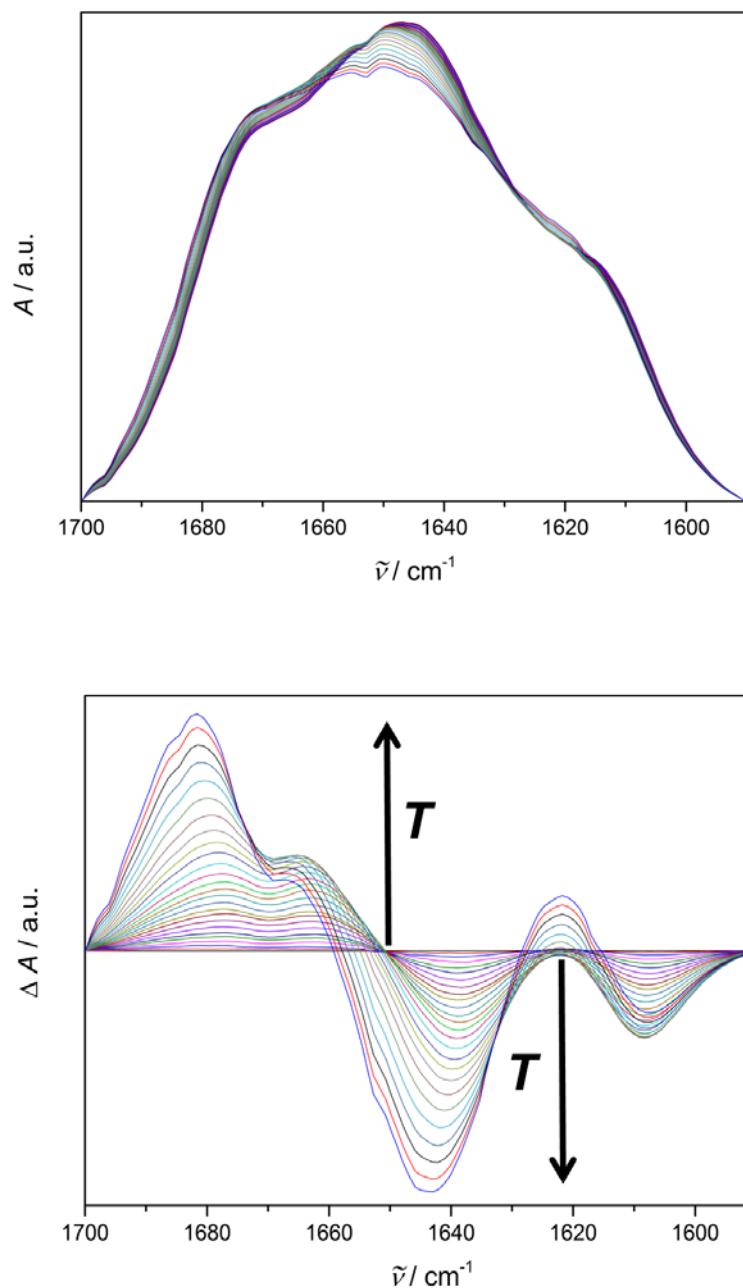


Abbildung 30 Temperaturabhängige FTIR-Spektren im Bereich der Amid-I'-Bande von 10 Gew.-% ELP mit 2 M TFE. Normierte Spektren sind oben abgebildet und zur besseren Visualisierung der Änderungen mit steigender Temperatur sind unten korrespondierende Differenzspektren gezeigt.

Weiterhin betragen die Abstände der Valin-Seitenketten in Typ II β -Schleifen des ELPs $\sim 0,4$ nm im kontrahierten und bis $\sim 0,6$ nm im expandierten Zustand^[118], sodass sich ein TFE-Cluster der entsprechenden Größe zwischen zwei Valin-Seitenketten lagern könnte. In einem solchen Fall wäre eine Umgebung geschaffen, in der hydrophobe Wechselwirkungen begünstigt wären.

Wie oben in Abbildung 30 zu sehen ist, ähnelt die Form der Amid-I'-Bande bei Zugabe des Kosolvens TFE der der reinen Peptidlösung, jedoch lassen sich die Unterschiede deutlich bei Betrachtung der Differenzspektren (unten) erkennen. Zuerst steigt der Anteil der Schleifenstrukturen (1660 cm^{-1}) und nimmt ab $\sim 62\text{ }^\circ\text{C}$ wieder ab. Zugleich kann der umgekehrte Trend für die Bande bei 1615 cm^{-1} beobachtet werden, d.h. nach einer Verminderung der Absorbanz bei dieser Wellenzahl findet die Zunahme ab einer Temperatur von ca. $60\text{ }^\circ\text{C}$ statt. Bezüglich eines inversen Temperaturübergangs lässt sich feststellen, dass eine Abnahme der ungeordneten Strukturen (1645 cm^{-1}) zu Gunsten eines Anstiegs der Typ II β -Schleifen (1675 cm^{-1}) stattfindet. Zusätzlich findet mit steigender Temperatur eine Verschiebung der Wellenzahlen um bis zu 5 cm^{-1} in Anwesenheit von 2 M TFE statt. Dies kann durch eine Anlagerung des TFEs an das Peptid verursacht worden sein, sodass bereits ein eindeutiger Hinweis aus den Differenzspektren auf einen Einfluss des TFEs auf die Struktur des ELPs erkennbar ist. Darüber hinaus entsteht ab $65\text{ }^\circ\text{C}$ eine Bande bei 1620 cm^{-1} , die eventuell auf die Entstehung von intermolekularen β -Faltblättern zurückzuführen ist und demzufolge auf eine Aggregation des ELPs bei hohen Temperaturen hinweist. Eine detaillierte Analyse der Sekundärstrukturanteile von 10 Gew.-%igem ELP in Ab- und Anwesenheit von 2 M TFE ist in Abbildung 31 dargestellt. Die durch Bandenanpassung ermittelten Sekundärstrukturanteile des ELPs ergaben 63 % für ungeordnete Strukturen bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ in einer TFE-haltigen Lösung. Mit steigender Temperatur findet zuerst eine Zunahme auf 65 % (bei $16\text{ }^\circ\text{C}$) und anschließend wieder eine Abnahme ungeordneter Strukturen auf 55 % bis zur höchsten gemessenen Temperatur von ca. $92\text{ }^\circ\text{C}$ statt. Im Gegenzug steigt der Anteil an Typ II β -Schleifen von 21 % auf 26 % und sinkt dann wieder auf 21 % ab. Bezüglich der Schleifenstrukturen bei 1660 cm^{-1} findet eine Zunahme von 1 auf 5 % statt und bei 1615 cm^{-1} eine Zunahme von 15 % auf 19 % statt. Aus der Temperaturabhängigkeit der ermittelten Sekundärstrukturanteile lässt sich in Anwesenheit von 2 M TFE auch ein ITT erkennen, jedoch deutet die generelle Erhöhung an ungeordneten Strukturen im gesamten Temperaturbereich auf eine Destabilisierung geordneter Schleifenstrukturen des Peptids in Anwesenheit des TFE hin. Dies ist in guter Übereinstimmung mit der Beobachtung einer Umkehrung des ITT ab $70\text{ }^\circ\text{C}$, was auf ein geringeres Stabilitätsfenster der geordneten Konformation in TFE schließen lässt.

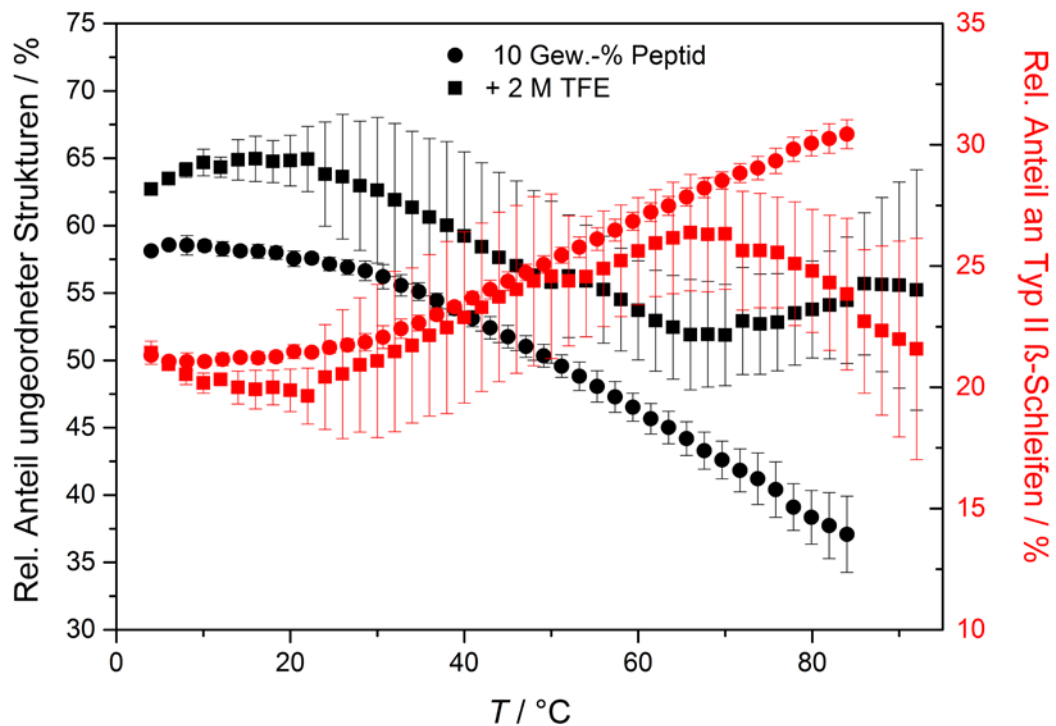


Abbildung 31 Aus der Bandenanpassung ermittelte relative Sekundärstrukturanteile der Amid-I'-Bande des 10 Gew.-%igen Elastinpeptids (runde Symbole) und des ELPs in Anwesenheit von 2 M TFE (rechteckige Symbole). Der Anteil ungeordneter Strukturen ist durch die linke Achse und schwarze Symbole dargestellt; die rechte Achse und die roten Symbole repräsentieren Typ II β -Schleifenstrukturen.

Es ist bekannt, dass TFE, wenn es in geringen Konzentrationen vorliegt, bevorzugt an Peptide bindet ^[119]. Eine entsprechende Größenzunahme des Gyrationradius (von $R_g = 1,1$ nm bis zu $R_g = 1,5$ nm) konnte durch komplementäre SAXS-Messungen bestätigt werden. Die Ergebnisse der SAXS-Messungen weisen deutlich auf eine vergrößerte Struktur des Peptids in TFE hin, womit eine direkte Bindung des Kosolvens an das ELP bestätigt werden konnte (Abbildung A12 im Anhang). Möglicherweise führt die direkte Interaktion des Additivs mit dem Peptid zur Bildung oder auch Stabilisierung verschiedener Schleifenstrukturen, sodass die hier erfolgte Zuordnung der Banden in der Amid-I'-Region aufgrund einer Überlagerung verschiedener Schwingungsfrequenzen nicht detailliert aufgelöst werden konnte. Eine eindeutige Zuordnung der einzelnen Beiträge bedarf einer Validierung mittels weiterer Methoden ^[168,172,173].

4.2.4.2 Temperaturabhängigkeit der Amid-I'-Bande des ELPs in Anwesenheit von 1 M TMAO

Zur Ermittlung des Einflusses von TMAO auf das temperaturabhängige Verhalten des ELPs wurden, wie im Abschnitt 3.2.2 beschrieben, Messungen mit 1 M TMAO in D_2O von 4 bis

94 °C durchgeführt. TMAO ist als stabilisierendes Kosolvens bekannt, welches die Struktur der Hydratmoleküle um Proteine und Peptide beeinflusst ^[126,174].

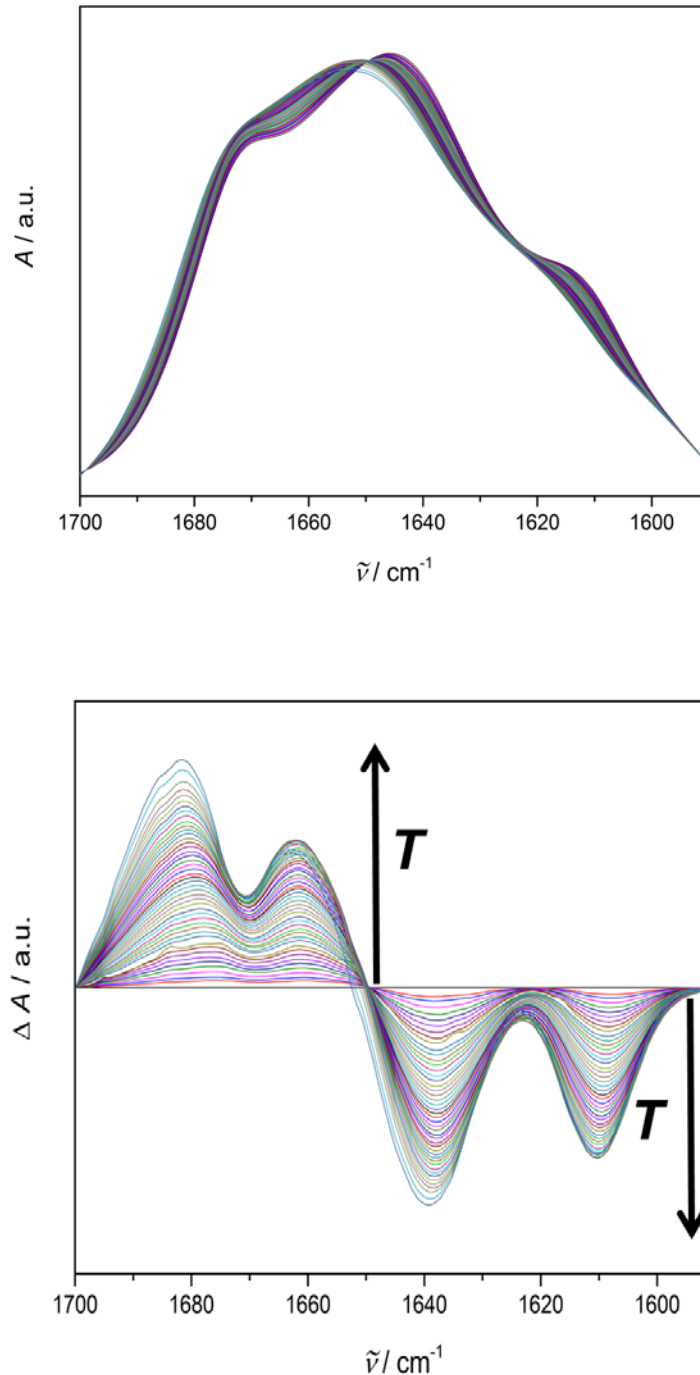


Abbildung 32 Flächennormierte Spektren der Amid-I'-Bande (oben) von 10 Gew.-% ELP mit 1 M TMAO und korrespondierende Differenzspektren (unten).

In Abbildung 32 sind oben die normierten FTIR-Spektren im Bereich der Amid-I'-Bande und unten korrespondierende Differenzspektren mit steigender Temperatur dargestellt. Die Form der Spektren und der temperaturabhängige Verlauf in Anwesenheit von 1 M TMAO ähneln

den Messungen des Peptids ohne Zusätze. Hieraus lässt sich schließen, dass die Struktur des ELPs nicht maßgeblich durch TMAO verändert wurde, sodass im Folgenden eine Betrachtung der Anteile herangezogen wird. In Abbildung 33 sind ausgewählte Anteile aus der Bandenanpassung dargestellt, die repräsentativ für den inversen Temperaturübergang sind. Bei Betrachtung der relativen Anteile der Subbanden der Amid-I'-Bande der geordneten (1675 cm^{-1}) bzw. ungeordneten Strukturen (1645 cm^{-1}) lässt sich eine rasche und kontinuierliche Abnahme des relativen Anteils an ungeordneten Strukturen bereits ab 4 °C erkennen und im Zuge der Temperaturerhöhung nimmt der Anteil ungeordneter Strukturen von 57% auf 5% (um 52%) ab. Dagegen steigt der Anteil an Typ II β -Schleifen lediglich um ca. 8% (von 24% auf 32%) an. Bei der niedrigsten Temperatur (4 °C) ist der Anteil ungeordneter Strukturen nur geringfügig niedriger im Vergleich zur reinen ELP-Probe, wobei mit steigender Temperatur die Differenz deutlich zunimmt. Bis $T \approx 80\text{ °C}$ findet eine nahezu lineare Abnahme statt und ab $T \geq 80\text{ °C}$ wird diese Abnahme verstärkt bei Temperaturerhöhung. Gleichzeitig steigt der Anteil geordneter Strukturen bis $T \approx 80\text{ °C}$ nahezu linear und nimmt ab $T \geq 80\text{ °C}$ bis 94 °C um ca. 1% wieder ab. Die stärkere und bereits bei niedrigen Temperaturen (ab 4 °C) beginnende Abnahme des Anteils ungeordneter Strukturen (größerer Betrag der negativen Steigung) lässt auf einen stabilisierenden Effekt dieses Osmolyts auf reguläre Sekundärstrukturen schließen. Zusätzlich stützt der im gesamten Temperaturbereich um ca. 10% höhere Anteil an Typ II β -Schleifen diese Annahme.

Da die Zunahme der Typ II β -Schleifen nur um wenige Prozente voranschreitet und ab 80 °C stagniert bzw. geringfügig abnimmt, geschieht die starke Abnahme des Anteils an Zufallsknäuel-Strukturen folglich verstärkt auf Kosten der beiden anderen Subbanden. So findet eine kontinuierliche Zunahme des Anteils der Schleifenstrukturen (1660 cm^{-1}) mit steigender Temperatur von 2% bis auf 18% bei der höchsten Temperatur von 94 °C statt. Zusätzlich nimmt der Anteil der Bande bei 1615 cm^{-1} von 32 auf 23% ab (Abbildung A5 im Anhang). Weder so ein hoher Anteil der durch die Prolinverzweigung verursachten Schwingungsfrequenz noch ein kontinuierlicher Anstieg der Schleifenstrukturen konnten bei den Messungen des reinen Peptids und in Anwesenheit des Crowders Ficoll oder TFE beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung ist eine Verstärkung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Peptidrückgrat an der Prolinverzweigung durch eine Interaktion mit dem Kosolvens bei tiefen Temperaturen^[169]. Folglich lässt sich sagen, dass wie erwartet die Zugabe des TMAO zu einer Erhöhung regulärer Schleifenstrukturen des Peptids im gesamten hier untersuchten Temperaturbereich geführt hat. Das Ausbleiben der Umkehrung des ITT bis zu 94 °C kann als Stabilisierung regulärer Strukturen gedeutet werden.

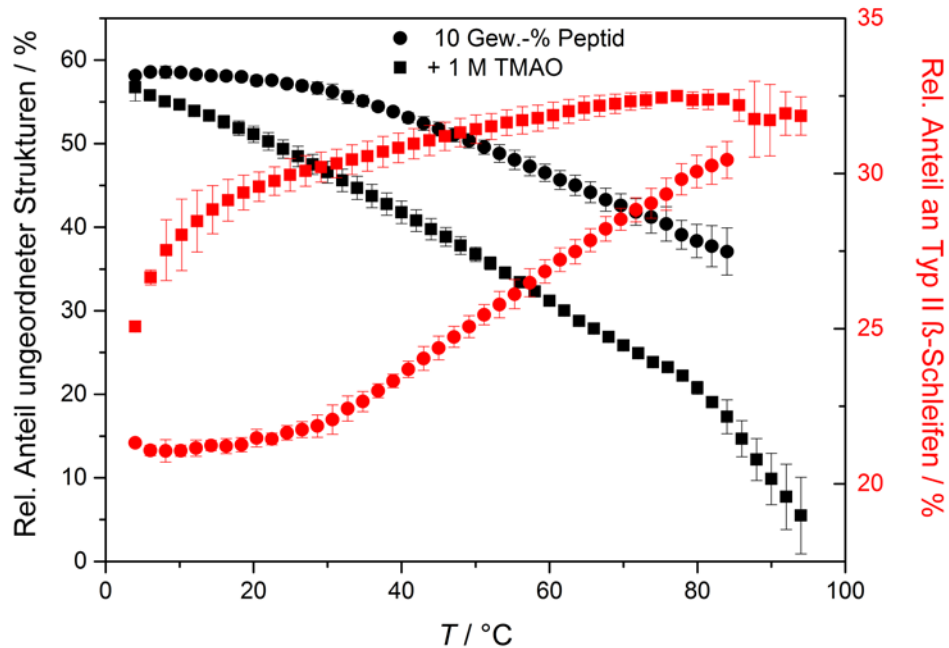


Abbildung 33 Aus der Bandenanpassung ermittelte relative Sekundärstrukturanteile der Amid-I'-Bande des 10 Gew.-%igen Elastinpeptids (runde Symbole) und des ELPs in Anwesenheit von 1 M TMAO (rechteckige Symbole). Der Anteil ungeordneter Strukturen ist durch die linke Achse und schwarze Symbole dargestellt; die rechte Achse und die roten Symbole repräsentieren Typ II β -Schleifenstrukturen.

4.2.4.3 Temperaturabhängigkeit des ELPs in Anwesenheit von 2 M ^{13}C -Harnstoff

Um den Einfluss eines chaotropen Kosolvens auf das temperaturabhängige Verhalten des ELPs zu untersuchen, wurden Messungen des 10 Gew.-%igen Peptides mit 2 M ^{13}C -Harnstoff durchgeführt. Im Hinblick auf die unbearbeiteten Spektren (Abbildung 33) ist anzumerken, dass bereits das Lösungsmittel mit dem Kosolvens, d.h. Phosphatpuffer mit 2 M ^{13}C -Harnstoff, eine sehr hohe Absorbanz ab einer Wellenzahl von 1635 cm^{-1} aufweist. Diese steigt stark an und hat ihr Maximum bei $\sim 1565\text{ cm}^{-1}$ außerhalb der Amid-I'-Bande. Aufgrund dieser Überlagerung der C=O Schwingung des Harnstoffs - trotz Verwendung des schwereren ^{13}C -Isotops - mit der Peptidschwingungsbande bei niedrigen Wellenzahlen, war es nicht möglich, die Spektren wie bei den vorherigen Datensätzen zu prozessieren und quantitativ auszuwerten.

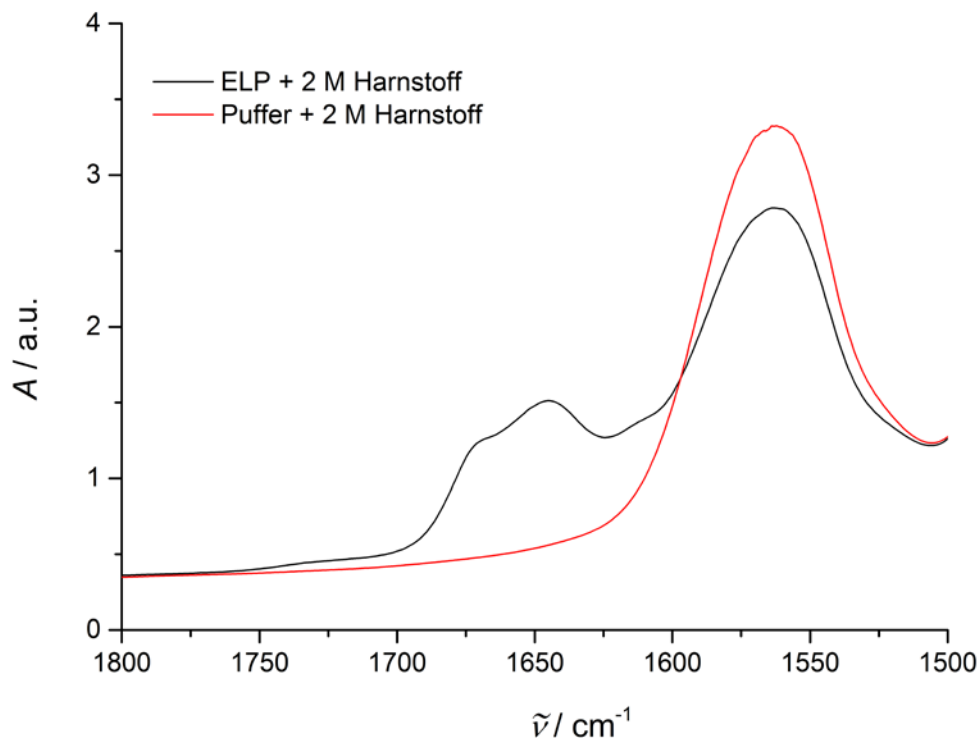


Abbildung 34 Exemplarische Darstellung der unprozessierten FTIR-Spektren des Puffers (rot) und der Peptidlösung (schwarz) mit 2 M ^{13}C -Harnstoff bei $T = 4\text{ }^\circ\text{C}$.

Bei einer Flächennormierung von 1700 cm^{-1} bis 1635 cm^{-1} , welches den Bereich ohne Überlagerung mit der Harnstoffbande darstellt, ist die spektrale Form, vor allem ersichtlich am Maximaverhältnis, dermaßen verändert (Abbildung A10 im Anhang), dass eine Bandenanpassung mit nur drei Subbanden nicht mit den Anteilen der anderen Daten vergleichbar wäre. Da jedoch die Schwingungsbanden bei 1675 cm^{-1} und 1645 cm^{-1} nicht mit dem hohen Hintergrundsignal des Harnstoffes überlagern (Abbildung 34), wurde eine alternative Darstellung anhand der Intensitätsverhältnisse der Rohdaten herangezogen, um einen qualitativen Vergleich bezüglich des Einflusses von Harnstoff auf den ITT des ELPs vornehmen zu können. In Abbildung 35 ist das Intensitätsverhältnis I_{1645} zu I_{1675} dargestellt, welches proportional zum Anteil an ungeordneten Strukturen ist. Ein höherer Wert dieses Verhältnisses im gesamten Temperaturbereich im Vergleich zur Probe ohne Kosolvens zeigt eine höhere Konformationsunordnung in Anwesenheit des Harnstoffes an, was mit dem destabilisierenden Effekt durch eine direkte Interaktion des Harnstoffes mit dem Peptidrückgrat zu erwarten war. Eine Abnahme der unstrukturierten Anteile mit steigender T in Anwesenheit des Harnstoffes bestätigt einen ITT. Zusätzlich deutet eine stärkere Abnahme der Konformationsunordnung ab ca. $55\text{ }^\circ\text{C}$ auf eine Destabilisierung der Schleifenstrukturen durch Wechselwirkungen des Harnstoffes mit dem Peptid hin.

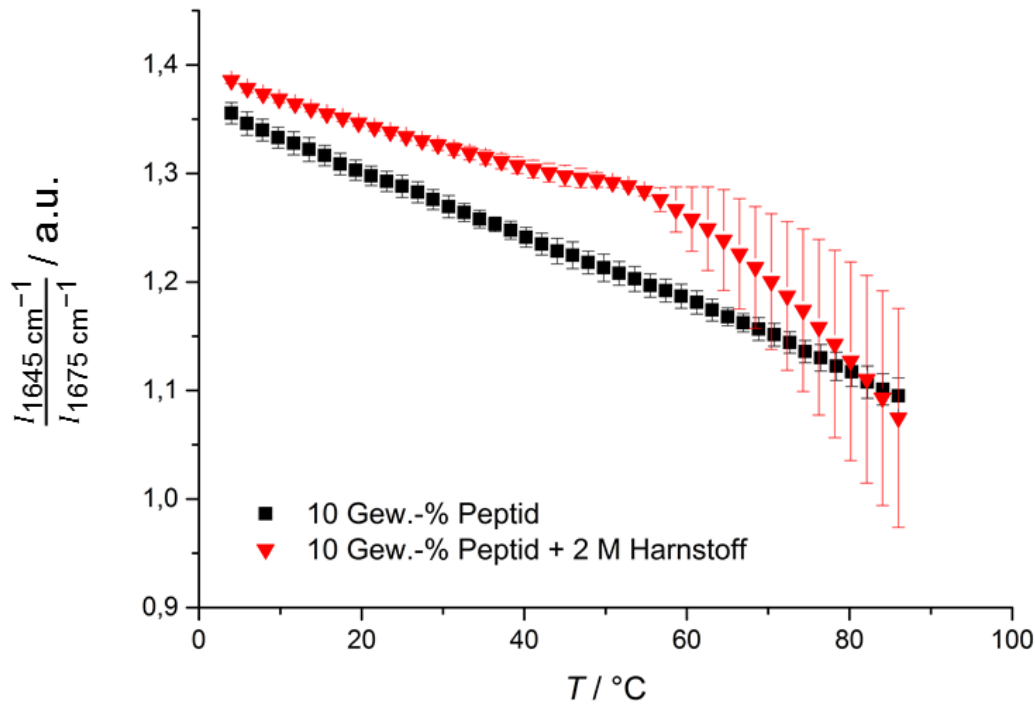


Abbildung 35 Temperaturabhängigkeit des Intensitätsverhältnisses von I_{1645} zu I_{1675} einer 10 Gew.-% ELP-Lösung (schwarz) und in Anwesenheit von 2 M ^{13}C -Harnstoff (rot).

4.2.4.4 Temperaturabhängigkeit des ELPs in Anwesenheit einer 1:2-Mischung aus TMAO und ^{13}C -Harnstoff

Bei der Verwendung eines Mischungsverhältnisses von 1:2 aus TMAO und Harnstoff tritt oft eine Kompensation des destabilisierenden Effekts von Harnstoff durch TMAO auf. Folglich wurde hier der Einfluss einer 1:2-Mischung dieser Kosolvenzien auf den ITT des ELPs untersucht. In Abbildung 36 sind beispielhaft unbearbeitete Spektren des Hintergrundes und einer peptidhaltigen Lösung bei der tiefsten gemessenen Temperatur (4 °C) dargestellt. Durch die Anwesenheit des Harnstoffs ist - so wie im vorherigen Abschnitt 4.2.4.3 beschrieben - auch hier eine starke Überlagerung des Hintergrundsignals mit dem der Probe ab 1635 cm^{-1} zu sehen. Demnach ist auch bei der Verwendung eines 1:2 Verhältnisses von TMAO und Harnstoff sowohl die spektrale Struktur bei einer Normierung von 1700 cm^{-1} bis 1635 cm^{-1} als auch das Maximaverhältnis verändert (Abbildung A10 im Anhang). Folglich wurden die Intensitäten bei den Wellenzahlen 1645 cm^{-1} (I_{1645}) und 1675 cm^{-1} (I_{1675}) aus den unprozessierten Daten ausgelesen, um Hinweise auf einen temperaturabhängigen Effekt der Mischung zu erhalten.

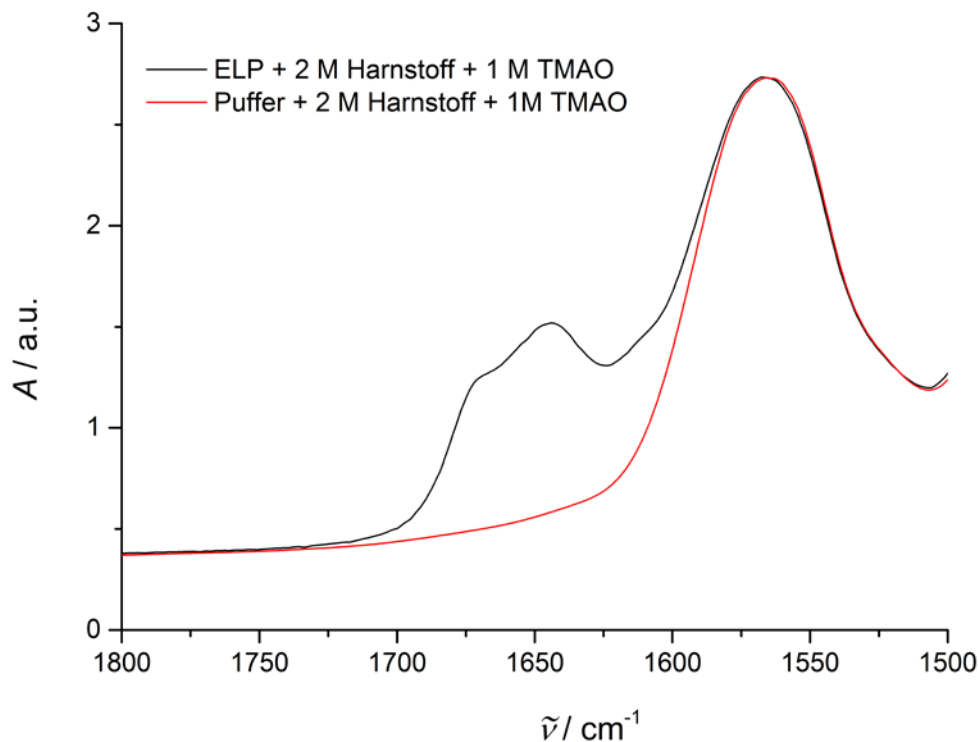


Abbildung 36 Repräsentative unprozessierte FTIR-Spektren des Puffers (rot) und der Peptidlösung (schwarz) mit einem Gemisch aus 2 M ^{13}C -Harnstoff und 1 M TMAO bei $T = 4^\circ\text{C}$.

In Abbildung 37 sind die Intensitäten der ausgewählten Wellenzahlen der jeweils einzelnen Komponenten (1 M TMAO, 2 M Harnstoff) als auch der 1:2-Mischung in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. Für alle drei Proben gilt $I_{1645} > I_{1675}$. Dies bedeutet, dass die Intensität des Anteils ungeordneter Strukturen die der geordneten im gesamten Temperaturbereich übersteigt. Der Verlauf der Intensität I_{1675} ist bis ca. 60°C für alle drei Proben ähnlich, wobei diese in Anwesenheit von Harnstoff ab $T > 60^\circ\text{C}$ stärker abnimmt und bei TMAO und der 1:2-Mischung weiterhin ähnlich abnimmt. Ein Unterschied in den I_{1645} -Werten der drei Proben ist bereits bei $T < 60^\circ\text{C}$ zu sehen, wobei TMAO die geringsten Intensität aufweist, was auf geringere Konformationsunordnung in Anwesenheit von TMAO schließen ließe. Interessanterweise nimmt I_{1645} in Anwesenheit von Harnstoff ab $T > 60^\circ\text{C}$ stärker ab. Eine Analyse des Effekts der Mischung stellt das Intensitätsverhältnis I_{1645} zu I_{1675} dar, welches in Abbildung 38 dargestellt ist. Aus diesem lässt sich direkt eine qualitative Aussage bezüglich der strukturellen Unordnung des Peptids treffen. So lässt sich erkennen, dass die Anwesenheit von TMAO einen vergleichbaren Effekt zur reinen Peptidprobe aufweist und höchstens eine minimal höhere Konformationsunordnung hervorzurufen scheint. In Anwesenheit von Harnstoff ist eine erhöhte strukturelle Unordnung im gesamten Temperaturbereich zu sehen, wobei eine starke Abnahme der Konformationsunordnung ab 50°C eintritt. Das Intensitätsverhältnis der Mischung stellt eine Überlagerung der Effekte der

jeweils reinen Komponenten dar. Sie weist den höchsten Wert auf und scheint sich additiv aus den reinen Komponenten zusammzusetzen. Zudem ist die Abnahme der Steigung erst ab ca. 70 °C zu sehen und weist in diesem Bereich eine geringere Steigung im Vergleich zum Harnstoff auf. Es scheint, als würde eine Kompensation des Effektes des Harnstoffs durch TMAO erst bei hohen Temperaturen zur Geltung kommen und bei tiefen Temperaturen dominieren Wechselwirkungen zwischen den Harnstoffmolekülen und des Peptids, die zur Destabilisierung geordneter Schleifenstrukturen des Peptids führen.

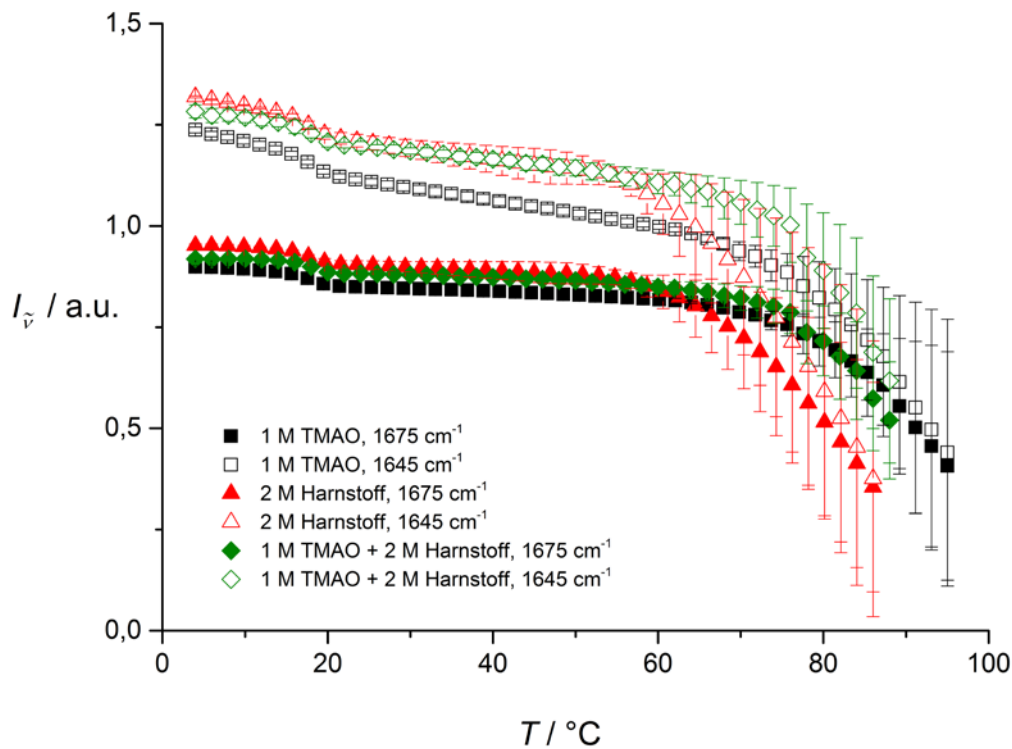


Abbildung 37 Temperaturabhängige Intensitätsverläufe der Peptidlösungen in Anwesenheit von TMAO, Harnstoff und deren Mischung bei verschiedenen Wellenzahlen. Die Intensitäten sind jeweils bei 1675 cm^{-1} (gefüllte Symbole), entsprechend Typ II β -Schleifenstrukturen, und bei 1645 cm^{-1} (offene Symbole), entsprechend ungeordneten Strukturen, dargestellt.

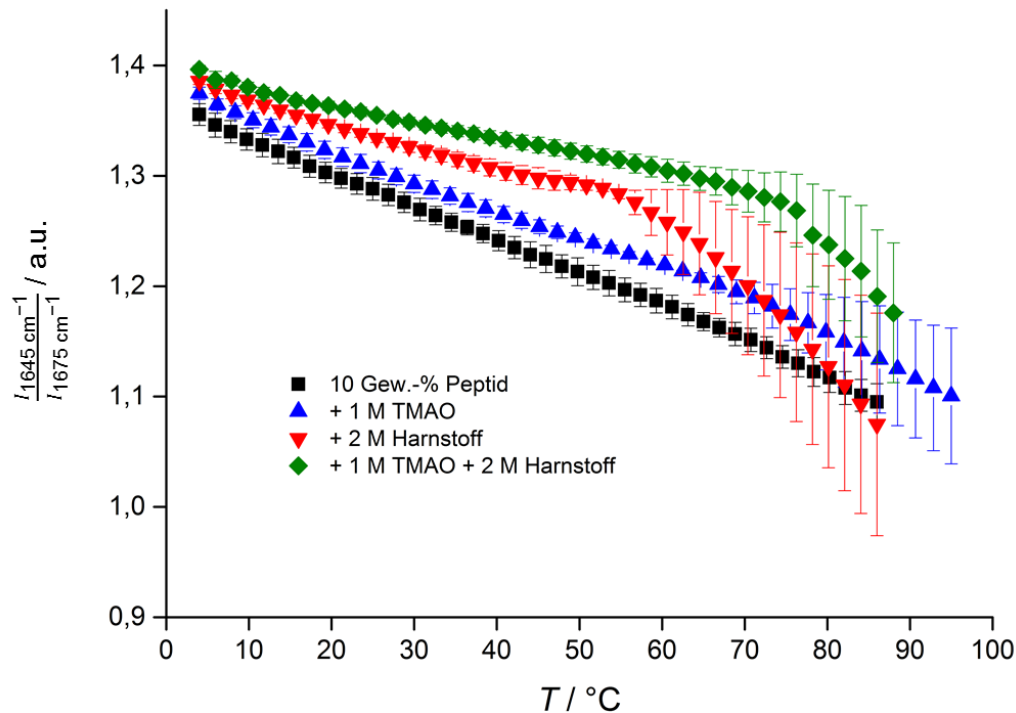


Abbildung 38 Temperaturabhängigkeit des Intensitätsverhältnisses von I_{1645} zu I_{1675} einer 10 Gew.-% ELP-Lösung (schwarz) und in Anwesenheit von 2 M ^{13}C -Harnstoff (rot).

4.2.5 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen (II)

Um einen vergleichenden Überblick über die unterschiedlichen Einflüsse der verschiedenen Additive/Kosolventien auf das temperaturabhängige Verhalten des elastinartigen Peptides zu bekommen, wurde das Intensitätsverhältnis I_{1645} zu I_{1675} für alle Datensätze gebildet und zusammenfassend in Abbildung 39 dargestellt. Aufgrund der Proportionalität des Intensitätsverhältnisses I_{1645} zu I_{1675} , welches dem Intensitätsmaximum der ungeordneten Strukturen bzw. der Typ II β -Schleifenstrukturen des Peptids entspricht, zur Konformationsunordnung des ELPs in der Lösung kann aus der Auftragung qualitativ abgeleitet werden, ob in Anwesenheit eines Additivs insgesamt die strukturelle Unordnung mit steigender Temperatur zu- oder abnimmt. Somit lässt sich aus den Auftragungen der Intensitätsverhältnisse in Abbildung 39 schlussfolgern, dass - wie auch bei der Probe ohne Zusatz - in Anwesenheit aller Kosolventien eine Abnahme der Konformationsunordnung im gesamten Temperaturbereich stattfindet. Zudem lässt sich erkennen, dass in der Harnstoffenthaltenden Probe bei hohen Temperaturen ab ~ 50 °C die Konformationsunordnung stärker mit steigender Temperatur abnimmt als bei den anderen Proben. Im Hinblick auf die Mischung mit Harnstoff und TMAO findet eine solche stärkere Abnahme der ungeordneten Strukturen erst ab ~ 70 °C statt. Dies könnte durch eine Kompensation des Osmolyts TMAO

in der Mischung verursacht sein. Anders ausgedrückt bedeutet dies, dass die Mischung ein additives Verhalten aufweist bzw. dass der Effekt des Harnstoffs in der Mischung bei $T < 70\text{ °C}$ dominiert und darüber durch TMAO kompensiert wird.

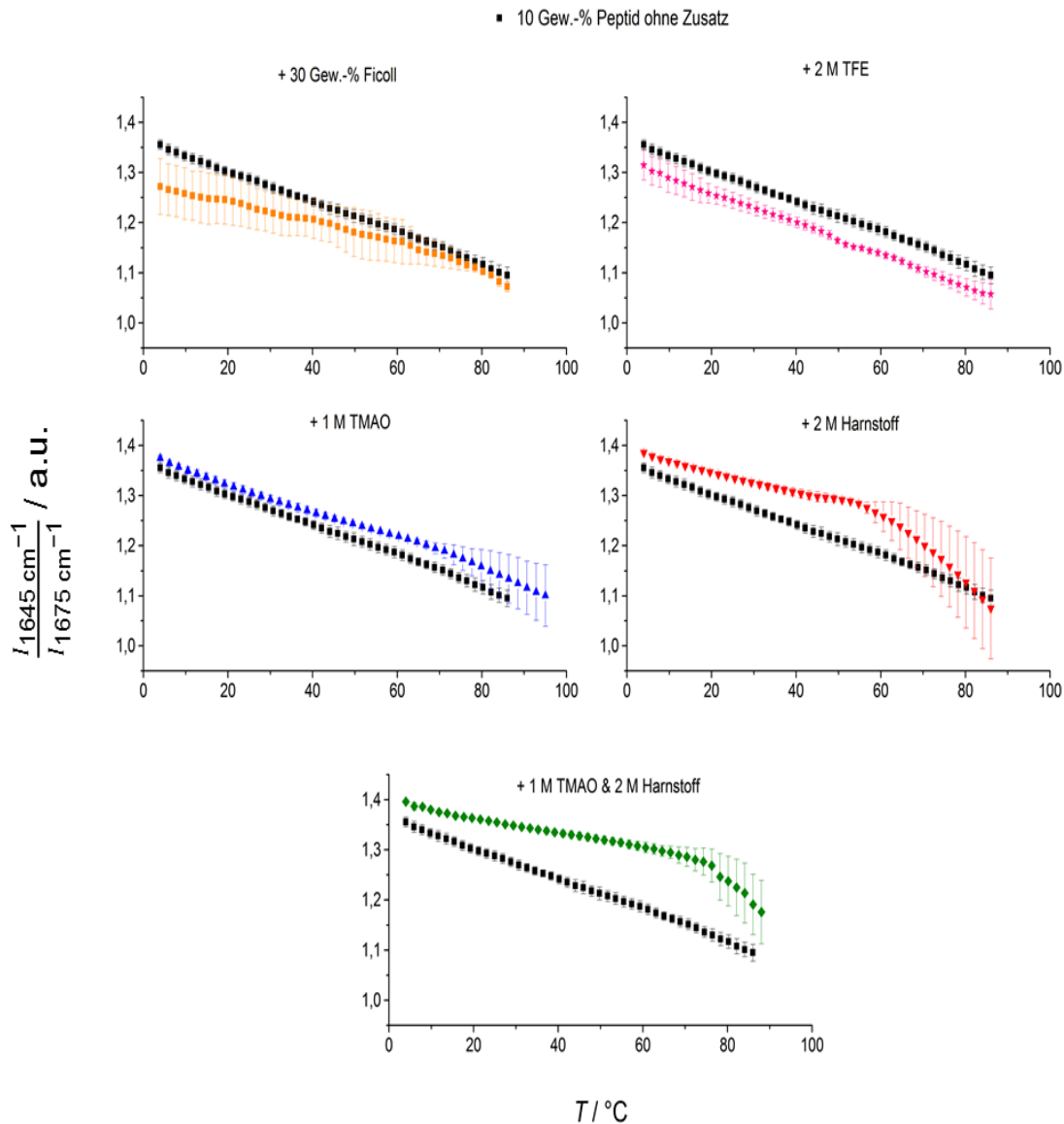


Abbildung 39 Temperaturabhängigkeit des Intensitätsverhältnisses I_{1645} zu I_{1675} einer 10 Gew.-% ELP-Lösung (schwarz) in Anwesenheit von 30 Gew.-% Ficoll (gelb), 2 M TFE (pink), 1 M TMAO (blau), 2 M ^{13}C -Harnstoff (rot) und einer 1:2-Mischung aus TMAO und ^{13}C -Harnstoff (grün).

In Anwesenheit von 1 M TMAO unterscheiden sich die Intensitätsverhältnisse verglichen zur Probe ohne Zusatz zwischen 4 und 40 °C kaum voneinander, was in guter Übereinstimmung zu Studien an intrinsisch ungeordneten Peptiden (IDPs) unter verdichteten Bedingungen und bei Zugabe von bis zu 3,6 M TMAO steht ^[25]. In diesen Untersuchungen führte die Anwesenheit von Ficoll und TMAO nur zu einer minimalen Erhöhung regulärer Sekundärstrukturen und zum Teil auch zu einer Kompaktierung, sodass die Struktur der

IDPs weitestgehend bewahrt wurde ^[25]. Aus diesen Ergebnissen wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die Funktion der IDPs maßgeblich einer hohen Flexibilität und ungeordneter Konformation bedarf. Diese Konsequenz lässt sich auch anhand der geringen strukturerhöhenden Effekte der verschiedenen Zusätze auf die Konformationsordnung des Peptids GVG(VPGVG)₃ ableiten.

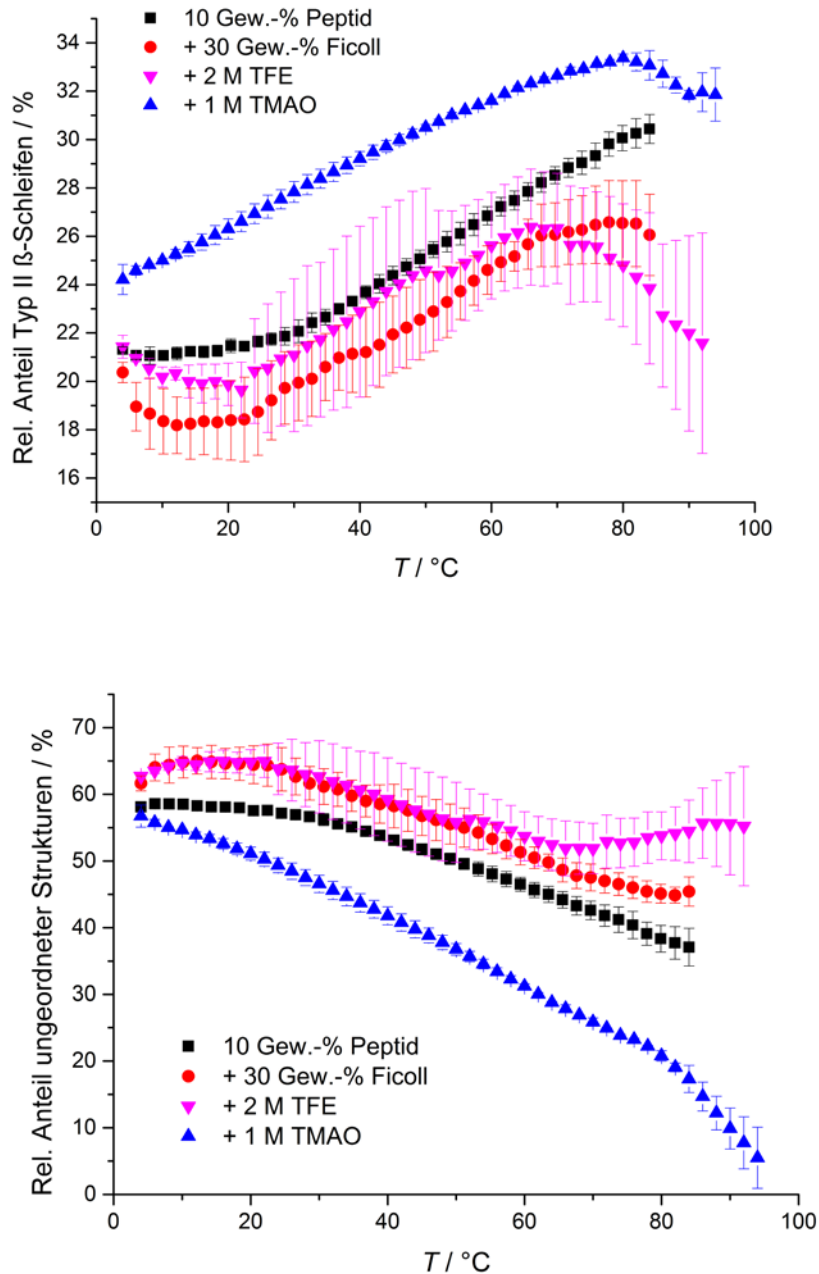


Abbildung 40 Aus der Bandenanpassung ermittelte relative Sekundärstrukturanteile der Amid-I'-Bande des 10 Gew.-%igen Elastinpeptids (schwarze Symbole) und des ELPs in Anwesenheit von 30 Gew.-% Ficoll (rote Symbole), 2 M TFE (magenta-farbene Symbole) und 1 M TMAO (blaue Symbole). Der Anteil an Typ II β-Schleifenstrukturen ist in der oberen Abbildung dargestellt und unten ist der Anteil an ungeordneten Strukturen zu sehen.

In Abbildung 40 sind die quantitativ ermittelten Anteile der Typ II β -Schleifen und der ungeordneten Strukturen zusammenfassend für die Proben ohne Interferenz des Harnstoffs mit der Amid-I'-Bande dargestellt. Wird allein die Zunahme des Anteils an Typ II β -Schleifen des ELPs mit einer Erhöhung der strukturellen Ordnung gleichgesetzt, lässt sich folgende absteigende Reihenfolge erkennen: TMAO >> reines ELP \geq TFE \geq Ficoll. Im Falle der ungeordneten Strukturen ist die Reihenfolge TFE \geq Ficoll \geq ELP >> TMAO erkennbar, d.h. maximal ist die strukturelle Unordnung in Anwesenheit von TFE. In Anwesenheit des Osmolyts TMAO ist demnach der Anteil geordneter Schleifenstrukturen des Peptids erhöht, wohingegen in Anwesenheit von TFE und Ficoll in der Lösung geordnete Schleifenstrukturen vermindert vorliegen. Zudem kann aus der kontinuierlichen Abnahme ungeordneter Strukturen in Anwesenheit von TMAO auf einen stabilisierenden Effekt von regulären Sekundärstrukturen geschlossen werden. Um die Ergebnisse der beiden verschiedenen Auswertungsmöglichkeiten vergleichend zu diskutieren, muss berücksichtigt werden, dass nur eine qualitative Analyse mit Hilfe der Intensitätsverhältnisse und keine quantitative Auswertung im Falle der Harnstoff enthaltenden Messungen erfolgen konnte. Daher dient ein Vergleich der Validierung der qualitativen Ergebnisse, die kein vollständiges Bild der vorliegenden Kosolvenseffekte auf die Konformation des ELPs liefern können. Aufgrund des abnehmenden Verlaufs aller Intensitätsverhältnisse kann darauf geschlossen werden, dass sich auch in Anwesenheit des Harnstoffs und der Mischung ein ITT ereignet. Aus den temperaturabhängigen Ergebnissen der Intensitätsverhältnisse in Abbildung 39 und der Bandenanpassung in Abbildung 40 lässt sich somit nur eine gemeinsame Aussage bezüglich des Stattfindens eines inversen Temperaturübergangs aufgrund einer Abnahme der Konformationsunordnung bei allen Proben treffen. Lediglich zur vollständigen Beschreibung der Konformationsumwandlung des elastinartigen Peptids in Anwesenheit von 1 M TMAO spielen die Anteile der Schleifenstrukturen (Bande bei 1660 cm^{-1}) und der Prolinresonanzfrequenz (1615 cm^{-1}) eine entscheidende Rolle. Wird zusätzlich der bei Temperaturzunahme steigende Anteil der Schleifenstrukturen bei 1660 cm^{-1} (s. Abschnitt 4.2.4.2) herangezogen, lässt sich feststellen, dass eine kontinuierliche Erhöhung geordneter Schleifenstrukturen in Anwesenheit von TMAO vorliegt. Der Zusatz von Ficoll führte zu einer destabilisierenden Wirkung geordneter Schleifenstrukturen vermutlich durch enthalpische Wechselwirkungen mit dem Peptid und es kann eine Umkehr des ITT ab $80\text{ }^\circ\text{C}$ beobachtet werden. In Anwesenheit von TFE ereignen sich andersartige strukturelle Veränderungen, vermutlich durch eine direkte Anbindung des fluorierten Alkohols an das Peptid ^[119,120]. Eine Bande bei 1620 cm^{-1} ab ca. $62\text{ }^\circ\text{C}$ könnte auf eine Aggregation des Peptids in Anwesenheit von TFE hindeuten.

Die hier gefundenen Daten sind in guter Übereinstimmung mit Daten der NMR-Spektroskopie und MD-Simulationen für reine ELP-Lösungen, aus denen für Peptide mit der

Sequenz (VPGVG)_n ein inverser Temperaturübergang zwischen 20 und 40 °C ermittelt wurde ^[162,165]. Je mehr pentamere Wiederholungseinheiten das Peptid aufweist, umso höher ist die Intensität bei ca. 1673 cm⁻¹, was darauf schließen lässt, dass eine höhere Population an Typ II β-Schleifenstrukturen vorliegt ^[162].

5 Fazit

In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl der Einfluss einschränkender Geometrien auf die Stabilität des Modellproteins RNase A als auch der Effekt des ausgeschlossenen Volumens und verschiedener Kosolvenzien auf die Konformation eines elastinartigen Peptids untersucht. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden Festkörper zur geometrischen Einschränkung analysiert, um Informationen hinsichtlich physikochemischer Einflussfaktoren zu erhalten. Es wurde unabhängig von dem betrachteten Festkörper- (Hard-Matter-) Confinement-System, insbesondere eine drastische Steigerung der thermischen Stabilität des eingelagerten Proteins (um bis zu ca. 50 °C) durch eine geometrische Einschränkung für alle in dieser Arbeit untersuchten Materialien beobachtet. Zudem konnte der Einfluss unterschiedlicher Oberflächenbeschaffenheiten anhand gemessener Immobilisierungsraten demonstriert werden (96 h bei den hydrophilen MPS, 120 h bei den hydrophoben MOFs). Es bedarf der Einbeziehung verschiedener Faktoren, um im Detail zu verstehen, welche Beiträge einzelne Faktoren - wie beispielsweise geometrische Dimensionen, Interaktionen der einzulagernden Gastmoleküle mit funktionellen Gruppen auf der Oberfläche des Wirts, die Einlagerungsbedingungen - zur Temperaturstabilität leisten. Gewiss ist, dass eine Überlagerung zahlreicher Faktoren berücksichtigt werden muss. Die somit aus der Grundlagenforschung gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Zusammenhänge zwischen der Stabilität immobilisierter Proteine und deren Mikroumgebung (z.B. Porenstruktur und Oberflächenbeschaffenheit) können folglich für die Entwicklung effizienter Festkörpermateriale zur Anwendung in der Industrie dienen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss eines makromolekularen Crowders (Soft-Matter-Confinement) und der Effekt einiger Kosolvenzien auf die Struktur eines elastinartigen Peptids mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie untersucht. Mittels Bandenanpassung konnte in Anwesenheit von Ficoll und TFE eine Erhöhung der strukturellen Unordnung ermittelt werden, was dem erwarteten Effekt des ausgeschlossenen Volumens bzw. einer Stabilisierung hydrophober Wechselwirkungen durch TFE widersprach. In Anwesenheit von TMAO hingegen konnte eine Erhöhung geordneter Schleifenstrukturen und ein Fortschreiten des inversen Temperaturübergangs im gesamten Temperaturbereich ermittelt werden. Um den Einfluss von Harnstoff und einer 1:2-Mischung aus TMAO und Harnstoff auf den inversen Temperaturübergang des elastinartigen Oktadecamers zu ermitteln, wurde eine qualitative Analyse mit Hilfe der Intensitätsverhältnisse I_{1645} zu I_{1675} durchgeführt. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass aus den FTIR-Ergebnissen unabhängig vom anwesenden Kosolvens ein inverser Temperaturübergang beobachtet werden konnte. Zusätzlich zu den strukturellen Informationen des elastinartigen Peptids aus den

temperaturabhängigen FTIR-Ergebnissen sind im Rahmen der Forschergruppe FOR1583 Messungen mittels NMR-Relaxometrie geplant, die Aufschluss über die Dynamik des ELPs in Anwesenheit von beispielsweise Ficoll geben können.

6 Literaturverzeichnis

- [1] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, **2007**.
- [2] A. P. Minton, *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 2863–9.
- [3] S. R. McGuffee, A. H. Elcock, *PLoS Comput. Biol.* **2010**, *6*, 1000694.
- [4] S. Gnanakaran, R. M. Hochstrasser, A. E. García, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 9229–9234.
- [5] S. Mukherjee, M. M. Waegele, P. Chowdhury, L. Guo, F. Gai, *J. Mol. Biol.* **2009**, *393*, 227–36.
- [6] H.-X. Zhou, *Arch Biochem Biophys* **2008**, *469*, 76–82.
- [7] R. Ravindra, S. Zhao, H. Gies, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12224–5.
- [8] R. J. Ellis, *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 597–604.
- [9] H.-X. Zhou, *J. Mol. Recognit.* **2004**, *17*, 368–75.
- [10] L. Breydo, A. E. Sales, L. Ferreira, O. Fedotoff, M. P. Shevelyova, S. E. Permyakov, K. G. Kroeck, E. A. Permyakov, B. Y. Zaslavsky, V. N. Uversky, *Arch. Biochem. Biophys.* **2015**, *570*, 66–74.
- [11] P. Behrens, G. D. Stucky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, *32*, 696–699.
- [12] Y. Han, G. D. Stucky, A. Butler, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9897–9898.
- [13] Z. Zhou, A. Inayat, W. Schwieger, M. Hartmann, *Microporous Mesoporous Mater.* **2012**, *154*, 133–141.
- [14] C. Lei, Y. Shin, J. Liu, E. J. Ackerman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11242–11243.
- [15] J. Deere, E. Magner, J. G. Wall, B. K. Hodnett, *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 1238–1243.
- [16] J. M. Nocek, S. L. Hatch, J. L. Seifert, G. W. Hunter, D. D. Thomas, B. M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9404–9411.
- [17] R. B. Bhatia, C. J. Brinker, A. K. Gupta, A. K. Singh, *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 2434–2441.
- [18] C. Lei, T. A. Soares, Y. Shin, J. Liu, E. J. Ackerman, *Nanotechnology* **2008**, *19*, 125102.
- [19] H. H. . Yiu, P. A. Wright, N. P. Botting, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2001**, *15*, 81–92.
- [20] S.-W. Song, K. Hidajat, S. Kawi, *Langmuir* **2005**, *21*, 9568–75.
- [21] I. Matlahov, Y. Geiger, G. Goobes, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 9031–8.
- [22] S. B. Petersen, V. Jonson, P. Fojan, R. Wimmer, S. Pedersen, *J. Biotechnol.* **2004**, *114*, 269–78.
- [23] S. Zhao, H. Gies, R. Winter, *Zeitschrift für Phys. Chemie* **2007**, *221*, 139–154.
- [24] V. N. Uversky, *Protein J.* **2009**, *28*, 305–325.
- [25] C. Szasz, A. Alexa, K. Toth, M. Rakacs, J. Langowski, P. Tompa, *Biochemistry* **2011**, *50*, 5834–5844.
- [26] M. Hundertmark, A. V Popova, S. Rausch, R. Seckler, D. K. Hincha, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *417*, 122–128.

- [27] E. A. Cino, M. Karttunen, W.-Y. Choy, *PLoS One* **2012**, 7, e49876.
- [28] S. Mittal, L. R. Singh, *PLoS One* **2013**, 8, e78936.
- [29] D. Kurzbach, W. Hassouneh, J. R. McDaniel, E. A. Jaumann, A. Chilkoti, D. Hinderberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 11299–11308.
- [30] I. Kuznetsova, K. Turoverov, V. Uversky, *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, 15, 23090–23140.
- [31] S. Roberts, M. Dzuricky, A. Chilkoti, *FEBS Lett.* **2015**, 589, 2477–2486.
- [32] D. Meral, S. Toal, R. Schweitzer-Stenner, B. Urbanc, *J. Phys. Chem. B* **2015**, 119, 13237–13251.
- [33] R. Ravindra, R. Winter, *Zeitschrift für Phys. Chemie* **2003**, 217, 1221–1243.
- [34] V. Parmenopoulou, D. Chatzileontiadou, S. Manta, S. Bougiatioti, P. Maragozidis, D. Gkaragkouni, E. Kaffesaki, A. Kantsadi, V. Skamnaki, S. Zographos, et al., *Bioorg.Med.Chem.* **2012**, 20, 7184–7193.
- [35] G. Panick, R. Winter, *Biochemistry* **2000**, 39, 1862–9.
- [36] C. Heuck, W. Daerr, W. Haberbosch, D. Horn, E. Lüddecke, *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 8317–8322.
- [37] J. R. Livingstone, R. S. Spolar, M. T. Record, *Biochemistry* **1991**, 30, 4237–4244.
- [38] A. Katti, Y.-F. Maa, C. Horváth, *Chromatographia* **1987**, 24, 646–650.
- [39] H. Schwalbe, S. B. Grimshaw, A. Spencer, M. Buck, J. Boyd, C. M. Dobson, C. Redfield, L. J. Smith, *Protein Sci.* **2001**, 10, 677–688.
- [40] S. E. Radford, C. M. Dobson, P. A. Evans, *Nature* **1992**, 358, 302–307.
- [41] F. Meersman, C. Atilgan, A. J. Miles, R. Bader, W. Shang, A. Matagne, B. a Wallace, M. H. J. Koch, *Biophys. J.* **2010**, 99, 2255–63.
- [42] R. Diamond, *J.Mol.Biol.* **1974**, 82, 371–391.
- [43] M. B. Pepys, P. N. Hawkins, *Nature* **1993**, 362, 553–557.
- [44] C. M. Dobson, P. A. Evans, S. E. Radford, *Trends Biochem. Sci.* **1994**, 19, 31–7.
- [45] D. W. Urry, *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 11007–11028.
- [46] C. A. Hoeve, P. J. Flory, *Biopolymers* **1974**, 13, 677–686.
- [47] L. Debelle, A. M. Tamburro, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1999**, 31, 261–272.
- [48] D. Urry, *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1993**, 32, 819–841.
- [49] Z. R. Wasserman, F. R. Salemme, *Biopolymers* **1990**, 29, 1613–1631.
- [50] L. Debelle, A. J. P. Alix, *Biochimie* **1999**, 81, 981–994.
- [51] B. Li, D. O. Alonso, V. Daggett, *J. Mol. Biol.* **2001**, 305, 581–92.
- [52] A. B. Fulton, *Cell* **1982**, 30, 345–347.
- [53] S. B. Zimmerman, A. P. Minton, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1993**, 22, 27–65.
- [54] J. R. Wenner, V. A. Bloomfield, *Biophys. J.* **1999**, 77, 3234–41.
- [55] D. Hall, A. P. Minton, *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, 1649, 127–139.
- [56] A. P. Minton, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 10577–80.
- [57] J. Seeliger, A. Werkmüller, R. Winter, *PLoS One* **2013**, 8, e69652–e69652.

- [58] M. S. Cheung, D. Klimov, D. Thirumalai, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 4753–4758.
- [59] F. Despa, D. P. Orgill, R. C. Lee, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2005**, *1066*, 54–66.
- [60] Amersham Biosciences, *Ficoll PM 70, Ficoll PM 400*, **2001**.
- [61] A. M. Klibanov, *Science* **1983**, *219*, 722–727.
- [62] C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli, J. S. Beck, *Nature* **1992**, *359*, 710–712.
- [63] D. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6024–6036.
- [64] P. D. Yang, D. Y. Zhao, D. I. Margolese, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, *Nature* **1998**, *396*, 152–155.
- [65] A. Corma, M. T. Navarro, J. P. Pariente, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 147–148.
- [66] M. Hartmann, *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 4577–4593.
- [67] Z. Zhou, M. Hartmann, *Top. Catal.* **2012**, DOI 10.1007/s11244-012-9905-0.
- [68] E. Magner, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6213–22.
- [69] F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell, M. Fröba, *Angew. Chemie* **2006**, *118*, 3290–3328.
- [70] J. S. Beck, J. C. Vartuli, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, C. T. Kresge, K. D. Schmitt, C. T.-W. Chu, D. H. Olson, E. W. Sheppard, S. B. McCullen, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10834–10843.
- [71] E. W. S. J. C. Vartuli, K. D. Schmitt, C. T. Kresge, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, S. B. McCullen, S. D. Hellring, J. S. Beck, J. L. Schlenker, D. H. Olson, *Chem. Mater.* **1994**, *6*, 2317–2326.
- [72] M. Dubois, T. Gulik-Krzywicki, B. Cabane, *Langmuir* **1993**, *9*, 673–680.
- [73] G. D. Huo, Q., Margolese, D. I., Ciesla, U., Feng, P., Gier, T. E., Sieger, P., Leon, R., Petroff, P. M., Schüth, F. and Stucky, *Nature* **1994**, *368*, 317–321.
- [74] D. Zhao, J. Feng, Q. Huo, N. Melosh, G. H. Fredrickson, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, *Science* **1998**, *279*, 548–552.
- [75] S. Zhao, *Differential Scanning and Pressure Perturbation Calorimetric Studies on Proteins Confined in Mesoporous Molecular Sieves*. Dissertation, TU Dortmund **2007**.
- [76] M. Kahse, M. Werner, S. Zhao, M. Hartmann, G. Buntkowsky, R. Winter, *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 21523–21531.
- [77] M. Hartmann, A. Vinu, *Langmuir* **2002**, *18*, 8010–8016.
- [78] J. L. C. Rowsell, O. M. Yaghi, *Microporous Mesoporous Mater.* **2004**, *73*, 3–14.
- [79] H. Zhang, N. Li, C. Tian, T. Liu, F. Du, P. Lin, Z. Li, S. Du, *Cryst. Growth Des.* **2012**, *12*, 670–678.
- [80] D. Farrusseng, S. Aguado, C. Pinel, *Angew. Chemie* **2009**, *121*, 7638–7649.
- [81] Y. Chen, V. Lykourinou, T. Hoang, L.-J. Ming, S. Ma, *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 9156–9158.
- [82] V. Lykourinou, Y. Chen, X. Wang, L. Meng, T. Hoang, L. Ming, R. L. Musselman, S. Ma, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10382–10385.

- [83] Y. Chen, V. Lykourinou, C. Vetromile, T. Hoang, L.-J. Ming, R. W. Larsen, S. Ma, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13188–13191.
- [84] P. L. Privalov, *Adv. Prot. Chem.* **1979**, *33*, 167–241.
- [85] C. A. Haynes, W. Norde, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **1994**, *2*, 517–566.
- [86] W. Norde, *Macromol. Symp.* **1996**, *103*, 5–18.
- [87] *Biopolymers at Interfaces, Second Edition*, CRC Press, **2003**.
- [88] W. Norde, J. Lyklema, *J. Colloid Interface Sci.* **1978**, *66*, 285–294.
- [89] P. Van Dulm, W. Norde, J. Lyklema, *J. Colloid Interface Sci.* **1981**, *82*, 77–82.
- [90] S. Nir, *Prog. Surf. Sci.* **1977**, *8*, 1–58.
- [91] W. Norde, J. P. Favier, *Colloids and Surfaces* **1992**, *64*, 87–93.
- [92] B. L. Steadman, K. C. Thompson, C. R. Middaugh, K. Matsuno, S. Vrona, E. Q. Lawson, R. V Lewis, *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, *40*, 8–15.
- [93] S. Hudson, J. Cooney, E. Magner, *Angew. Chemie* **2008**, *120*, 8710–8723.
- [94] G. Xie, S. N. Timasheff, *Protein Sci.* **1997**, *6*, 211–221.
- [95] K. D. Collins, *Methods* **2004**, *34*, 300–311.
- [96] P. H. Yancey, *J. Exp. Biol.* **2005**, *208*, 2819–30.
- [97] B. Bagchi, *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **2003**, 225, U446–U446.
- [98] C. M. and B. H. Johan Qvist, Erik Persson, *Faraday Discuss.* **2009**, *141*, 131–144.
- [99] W. Doster, S. Busch, A. M. Gaspar, M. S. Appavou, J. Wuttke, H. Scheer, *Phys. Rev. Lett.* **2010**, *104*, 098101.
- [100] H. Frauenfelder, P. W. Fenimore, G. Chen, B. H. McMahon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 15469–72.
- [101] T. Feiweier, B. Geil, E. M. Pospiech, F. Fujara, R. Winter, *Phys. Rev. E - Stat. Physics, Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.* **2000**, *62*, 8182–8194.
- [102] M. Vogel, *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *101*, 225701.
- [103] K. Kämpf, B. Kremmling, M. Vogel, *Phys. Rev. E* **2014**, *89*, 032710.
- [104] B. Jana, S. Pal, B. Bagchi, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 9112–9117.
- [105] G. Singh, I. Brovchenko, A. Oleinikova, R. Winter, *Biophys. J.* **2008**, *95*, 3208–3221.
- [106] Y. Levy, J. N. Onuchic, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2006**, *35*, 389–415.
- [107] J. Tian, A. E. Garcia, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15157–15164.
- [108] S. N. Timasheff, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1993**, *22*, 67–97.
- [109] S. N. Timasheff, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 9721–9726.
- [110] J. A. Schellman, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1987**, *16*, 115–137.
- [111] J. A. Schellman, *Biopolymers* **1987**, *26*, 549–559.
- [112] K. Shiraki, K. Nishikawa, Y. Goto, *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 180–94.
- [113] Y. Luo, R. L. Baldwin, *J. Mol. Biol.* **1998**, *279*, 49–57.
- [114] R. W. Storrs, D. Truckses, D. E. Wemmer, *Biopolymers* **1992**, *32*, 1695–1702.
- [115] A. Kentsis, T. R. Sosnick, *Biochemistry* **1998**, *37*, 14613–22.

- [116] F. D. Sonnichsen, J. E. Van Eyk, R. S. Hodges, B. D. Sykes, *Biochemistry* **1992**, *31*, 8790–8798.
- [117] F. J. Blanco, M. A. Jimenez, A. Pineda, M. Rico, J. Santoro, J. L. Nieto, *Biochemistry* **1994**, *33*, 6004–6014.
- [118] H. Reiersen, A. R. Clarke, A. R. Rees, *J. Mol. Biol.* **1998**, *283*, 255–64.
- [119] D. Roccatano, G. Colombo, M. Fioroni, A. E. Mark, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 12179–12184.
- [120] M. D. Díaz, M. Fioroni, K. Burger, S. Berger, *Chem. - A Eur. J.* **2002**, *8*, 1663–1669.
- [121] K. Gast, a. Siemer, D. Zirwer, G. Damaschun, *Eur. Biophys. J.* **2001**, *30*, 273–283.
- [122] M. Fioroni, M. D. Diaz, K. Burger, S. Berger, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7737–7744.
- [123] H. Reiersen, A. R. Rees, *Protein Eng.* **2000**, *13*, 739–743.
- [124] L. J. Rothschild, R. L. Mancinelli, *Nature* **2001**, *409*, 1092–101.
- [125] P. H. Yancey, M. E. Clark, S. C. Hand, R. D. Bowlus, G. N. Somero, *Science* **1982**, *217*, 1214–1222.
- [126] D.R. Canchi, P. Jayasimha, D. C. Rau, G. I. Makhatadze, A. E. Garcia, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 12095–12104.
- [127] D. R. Canchi, A. E. García, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2013**, *64*, 273–93.
- [128] B. J. Bennion, V. Daggett, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 6433–6438.
- [129] J. Deere, E. Magner, J. G. Wall, B. K. Hodnett, *Catal. Letters* **2003**, *85*, 19–23.
- [130] H. H. Weetall, *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11*, 327–333.
- [131] Y. K. Park, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2007**, *35*, 516–8233.
- [132] Y. K. Park, S. B. Choi, H. Kim, K. Kim, B.-H. Won, K. Choi, J.-S. Choi, W.-S. Ahn, N. Won, S. Kim, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8230–8233.
- [133] E. P. Barrett, L. G. Joyner, P. P. Halenda, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 373–380.
- [134] B. C. Yu, J. Fan, B. Tian, D. Zhao, *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 1742–1745.
- [135] J. Fan, J. Lei, L. Wang, C. Yu, B. Tu, D. Zhao, *Chem. Commun. (Camb).* **2003**, *15*, 2140–2141.
- [136] A. Adamczyk, Y. Xu, B. Walaszek, F. Roelofs, T. Pery, K. Pelzer, K. Philippot, B. Chaudret, H.-H. Limbach, H. Breitzke, et al., *Top. Catal.* **2008**, *48*, 75–83.
- [137] S. Fiorilli, B. Onida, B. Bonelli, E. Garrone, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 16725–9.
- [138] C. Yang, Y. Wang, B. Zibrowius, F. Schüth, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6*, 2461–2467.
- [139] MicroCal Publ., Northampton, MA, **2000**.
- [140] A. Cooper, C. M. Johnson, *Methods Mol. Biol.* **1994**, *22*, 125–36.
- [141] V. V Plotnikov, J. M. Brandts, L.-N. Lin, J. F. Brandts, *Anal. Biochem.* **1997**, *250*, 237–244.
- [142] R. Winter, F. Noll, C. Czeslik, *Methoden Der Biophysikalischen Chemie*, Vieweg + Teubner, **2011**.
- [143] L.-N. Lin, J. F. Brandts, J. M. Brandts, V. Plotnikov, *Anal. Biochem.* **2002**, *302*, 144–60.

- [144] H. Heerklotz, *J. Phys. Condens. Matter* **2004**, *16*, R441–R467.
- [145] R. Ravindra, R. Winter, *Chemphyschem* **2003**, *4*, 359–65.
- [146] W. Dzwolak, R. Ravindra, J. Lendermann, R. Winter, *Biochemistry* **2003**, *42*, 11347–55.
- [147] W. Dzwolak, R. Ravindra, C. Nicolini, R. Jansen, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3762–8.
- [148] P. Sasisanker, R. Ravindra, R. Winter, A. Oleinikova, H. Weingärtner, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6*, 1899–1905.
- [149] Y. Zhai, L. Okoro, A. Cooper, R. Winter, *Biophys. Chem.* **2011**, *156*, 13–23.
- [150] C. Czeslik, H. Seemann, R. Winter, *Basiswissen Physikalische Chemie*, Vieweg + Teubner, **2010**.
- [151] B. Singh, *Infrared Analysis of Peptides and Proteins*, **2000**.
- [152] A. Vinu, V. Murugesan, O. Tangermann, M. Hartmann, *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 3056–3065.
- [153] J. Fan, C. Yu, F. Gao, J. Lei, B. Tian, L. Wang, Q. Luo, B. Tu, W. Zhou, D. Zhao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3146–3150.
- [154] A. Vinu, V. Murugesan, M. Hartmann, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 7323–7330.
- [155] M. Miyahara, A. Vinu, K. Z. Hossain, T. Nakanishi, K. Ariga, *Thin Solid Films* **2006**, *499*, 13–18.
- [156] C. Czeslik, R. Winter, *PCCP* **2001**, *3*, 235–239.
- [157] T. P. B. Nguyen, J.-W. Lee, W. G. Shim, H. Moon, *Microporous Mesoporous Mater.* **2008**, *110*, 560–569.
- [158] A. Salis, M. S. Bhattacharyya, M. Monduzzi, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 7996–8001.
- [159] H. Zhou, K. A. Dill, *Biochemistry* **2001**, *40*, 11289–11293.
- [160] A. P. Minton, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 101–109.
- [161] G. Chandrasekar, M. Hartmann, V. Murugesan, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2014**, 2606–2613.
- [162] P. C. Groß, W. Possart, M. Zeppezauer, *Zeitschrift für Naturforsch.* **2003**, 873–878.
- [163] E. Schreiner, C. Nicolini, B. Ludolph, R. Ravindra, N. Otte, A. Kohlmeyer, R. Rousseau, R. Winter, D. Marx, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *92*, 148101.
- [164] C. Nicolini, R. Ravindra, B. Ludolph, R. Winter, *Biophys. J.* **2004**, *86*, 1385–92.
- [165] J. Huang, C. Sun, O. Mitchell, N. Ng, Z. N. Wang, G. S. Boutis, *J. Chem. Phys.* **2012**, *136*, 3685454.
- [166] A. Krukau, I. Brovchenko, A. Geiger, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2196–202.
- [167] V. Serrano, W. Liu, S. Franzen, *Biophys. J.* **2007**, *93*, 2429–35.
- [168] G. J. Thomas, B. Prescott, D. W. Urry, *Biopolymers* **1987**, *26*, 921–34.
- [169] J. Lessing, S. Roy, M. Reppert, M. Baer, D. Marx, T. L. C. Jansen, J. Knoester, A. Tokmakoff, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5032–5035.
- [170] H. Nuhn, H.-A. Klok, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2755–63.
- [171] D. Tintar, V. Samouillan, J. Dandurand, C. Lacabanne, A. Pepe, B. Bochicchio, A. M. Tamburro, *Biopolymers* **2009**, *91*, 943–952.

- [172] P. Moscarelli, F. Boraldi, B. Bochicchio, A. Pepe, A. M. Salvi, D. Quaglino, *Matrix Biol.* **2014**, 36, 15–27.
- [173] N. Floquet, S. Hery-Huynh, M. Dauchez, P. Derreumaux, A. M. Tamburro, A. J. P. Alix, *Biopolymers* **2004**, 76, 266–280.
- [174] T.-Y. Lin, S. N. Timasheff, *Biochemistry* **1994**, 33, 12695–12701.



7 Anhang

7.1 Daten zu Messungen in eingeschränkten Geometrien

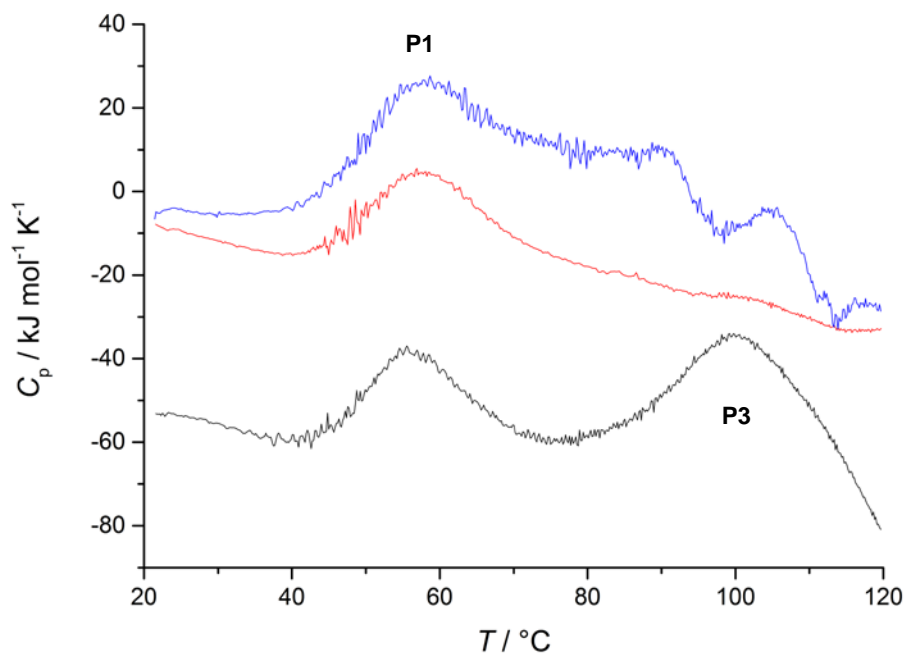


Abbildung A1 Reproduktionen der DSC-Thermogramme von in SBA-15-COOH (E2) eingelagerter RNase A in einem Verhältnis von Protein:MPS von 4:10.

Tabelle A1 Proteinbeladung in den MPS nach 96 h bei verschiedenen pH-Werten (Massenverhältnis von RNase A zum MPS beträgt 3:10).

Max. Proteinbeladung nach 96 h / mg RNase A g⁻¹ MPS

| MPS | Spezifisches Porenvolumen / cm ³ g ⁻¹ | Max. Proteinbeladung nach 96 h / mg RNase A g ⁻¹ MPS | | |
|------------------------|---|---|------|------|
| | | pH 5,5 | pH 7 | pH 9 |
| SBA-15 | 0,54 | 80 | 114 | 122 |
| SBA-15-COOH | 0,14 | 41 | 62 | 76 |
| SBA-15-NH ₂ | 0,69 | 84 | 93 | 98 |

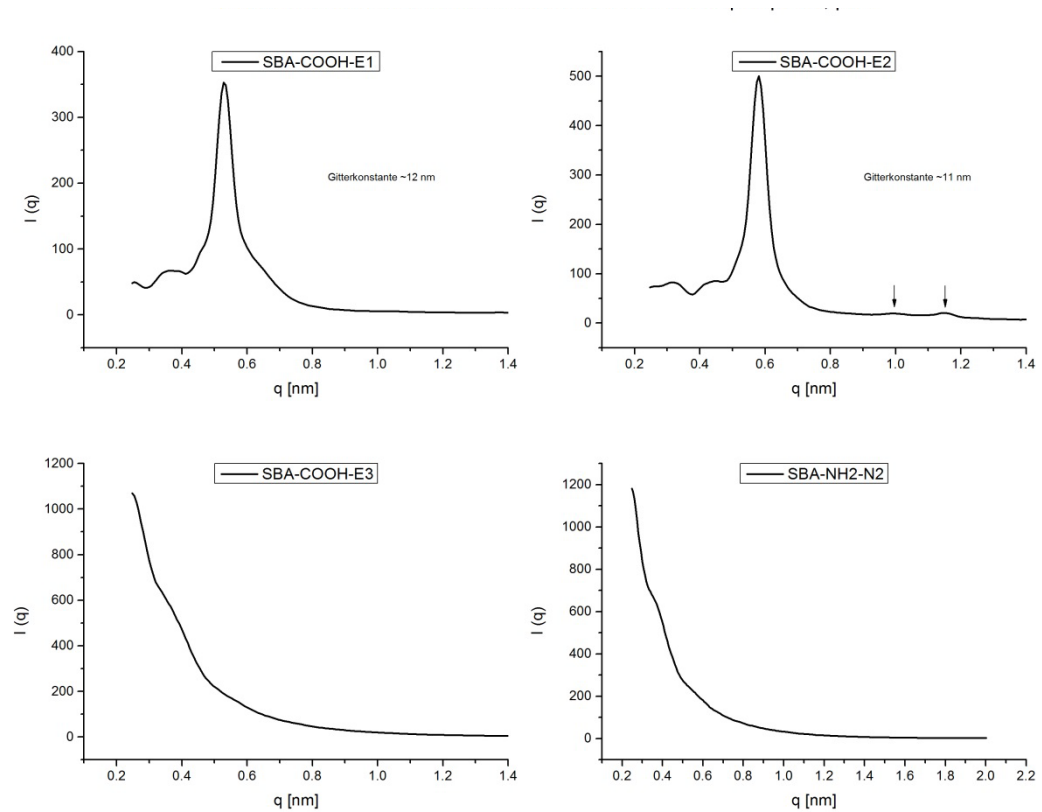


Abbildung A2 SAXS-Messungen an SBA-15 Proben zur Überprüfung auf den Erhalt der hexagonalen Struktur nach der Funktionalisierung. Die Durchführung der Messung erfolgte durch Melanie Berghaus.

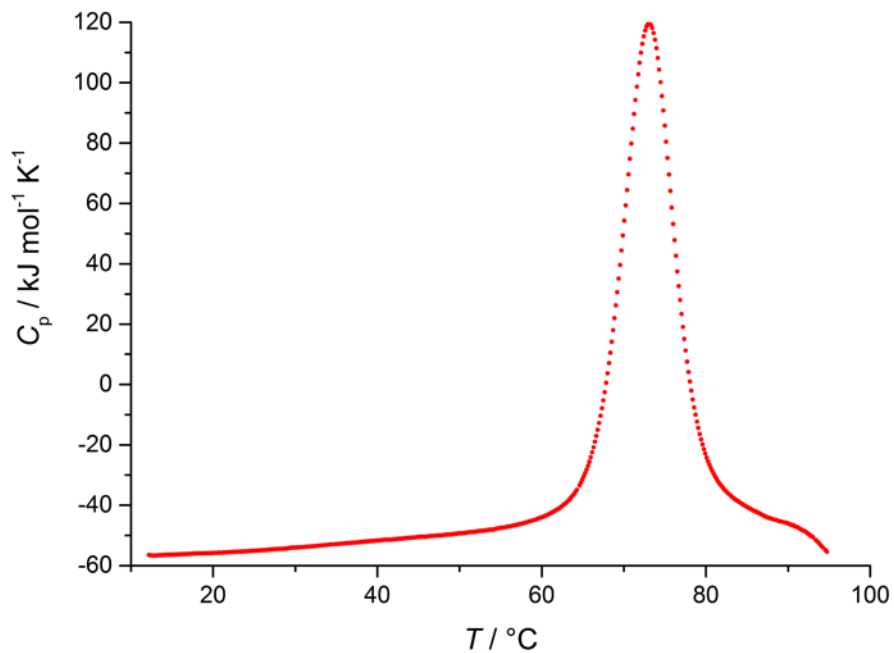


Abbildung A3 DSC-Thermogramm einer Lysozym-Lösung (5 mg/mL) in HEPES, pH 7,5.

7.2 Ergänzende Daten zur Temperaturabhängigkeit des ELP

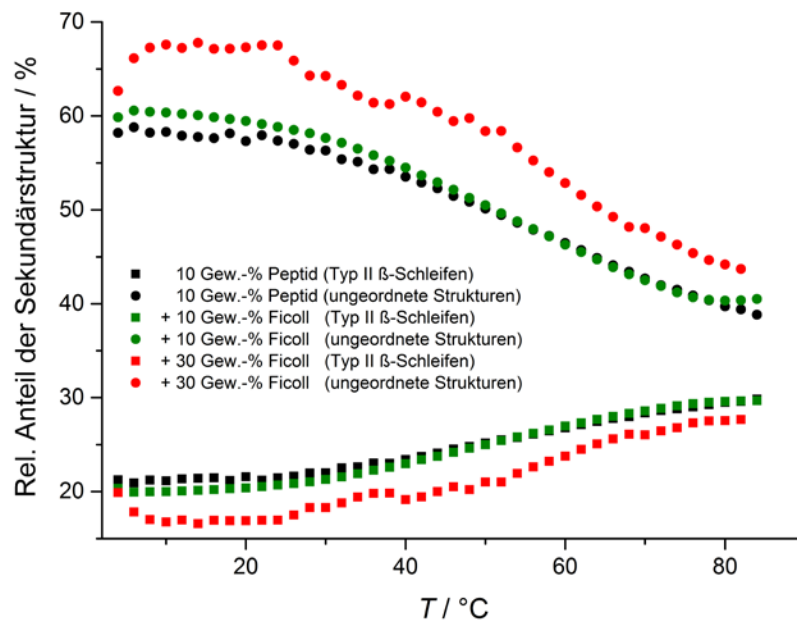


Abbildung A4 Ermittelte Sekundärstrukturanteile des elastinartigen Peptids durch Bandenanpassung mit 4 Gauß-Kurven.

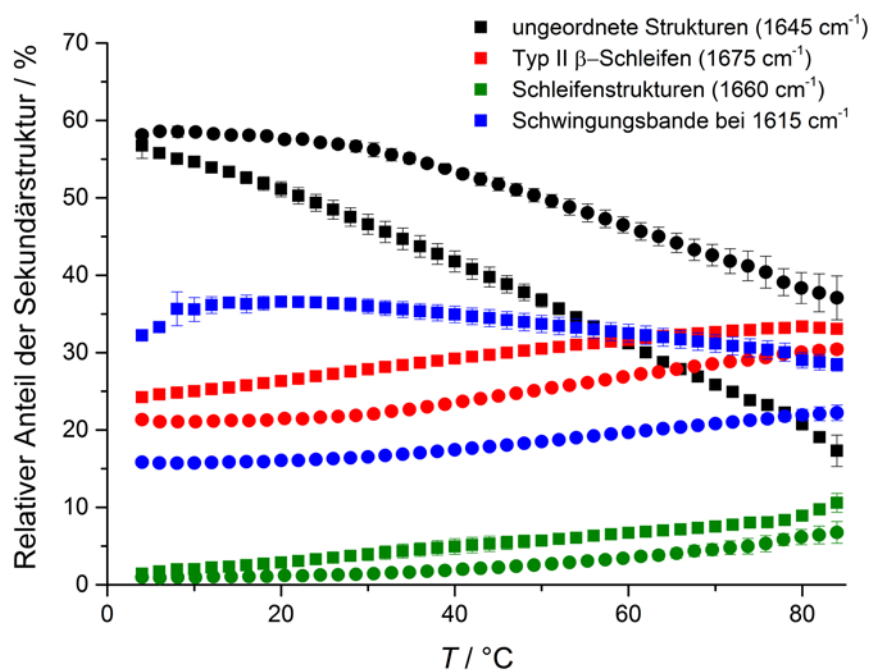


Abbildung A5 Ermittelte Sekundärstrukturanteile des elastinartigen Peptids in An- (rechteckige Symbole) und Abwesenheit von 1 M TMAO (runde Symbole) durch Bandenanpassung mit 4 Gauß-Kurven.

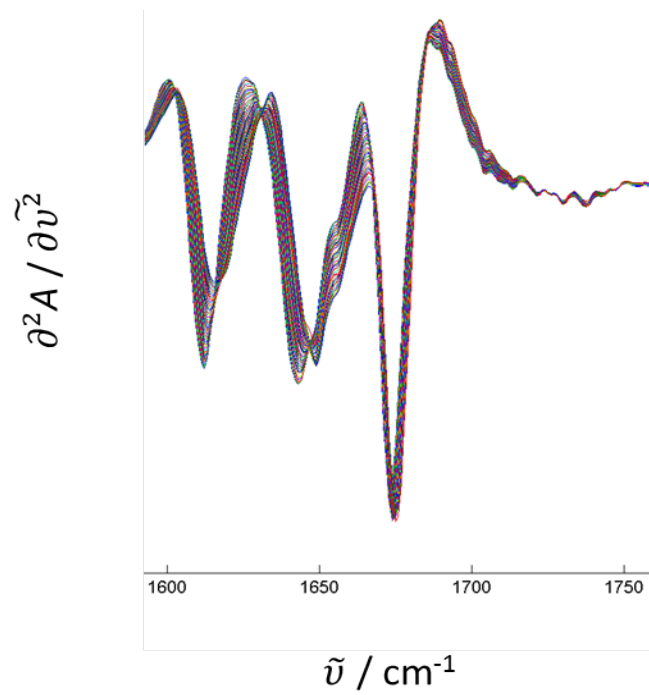


Abbildung A6 Zweite Ableitung der temperaturabhängigen Spektren einer 10 Gew.-%igen ELP-Lösung.

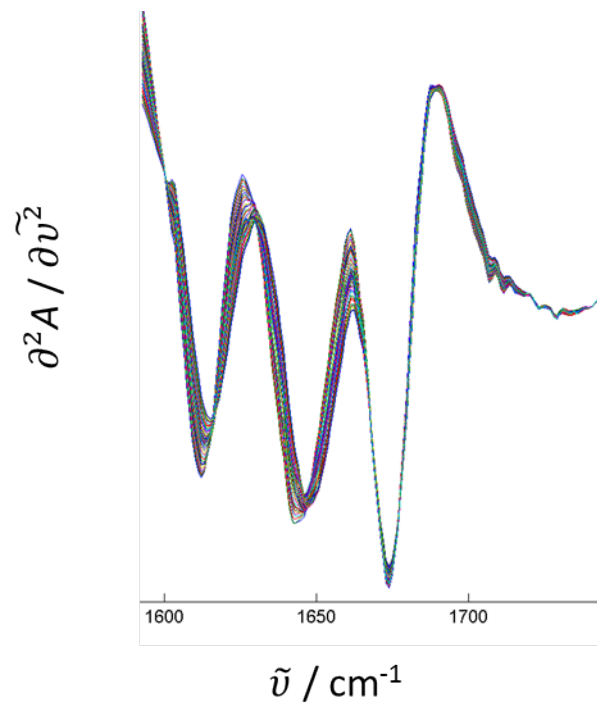


Abbildung A7 Zweite Ableitung der temperaturabhängigen Spektren von 10 Gew.-% ELP in Anwesenheit von 30 Gew.-% Ficoll.

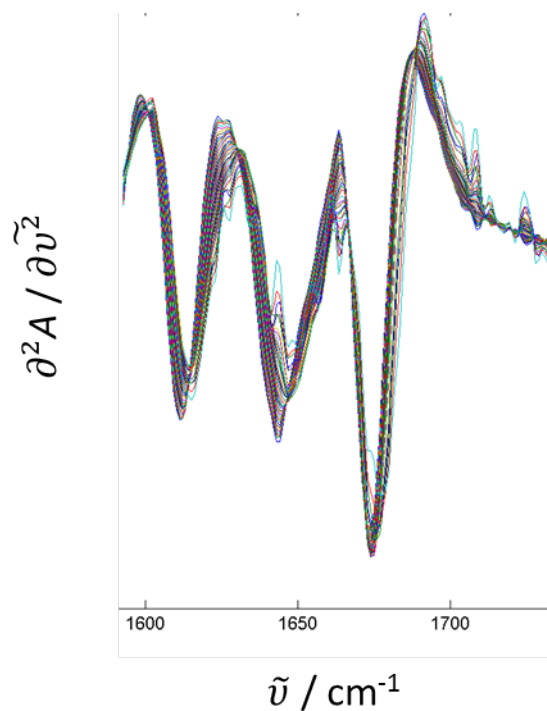


Abbildung A8 Zweite Ableitung der temperaturabhängigen Spektren von 10 Gew.-% ELP in Anwesenheit von 2 M TFE.

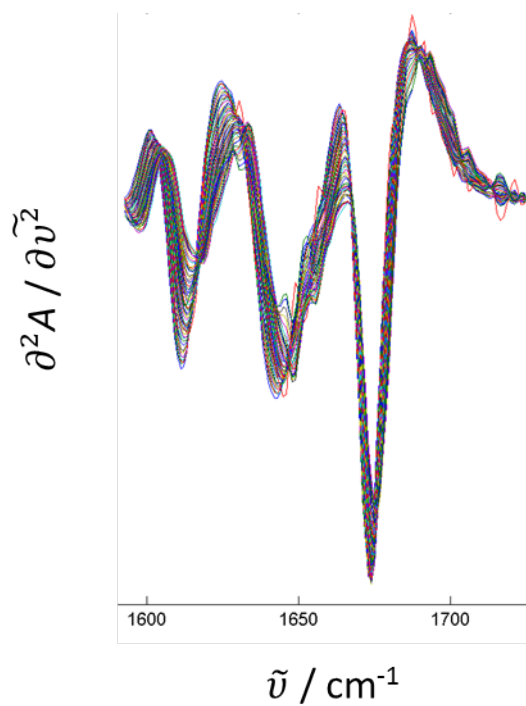


Abbildung A9 Zweite Ableitung der temperaturabhängigen Spektren von 10 Gew.-% ELP in Anwesenheit von 1 M TMAO.

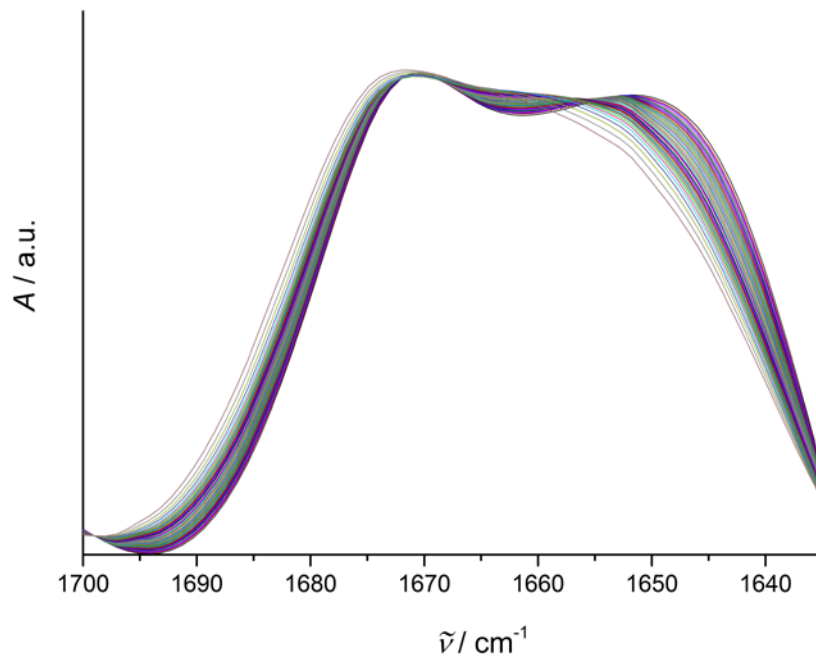


Abbildung A10 Normierte Spektren der temperaturabhängigen Absorbanz des ELP in Anwesenheit von 2 M ^{13}C -Harnstoff in Abhängigkeit der Wellenzahl.

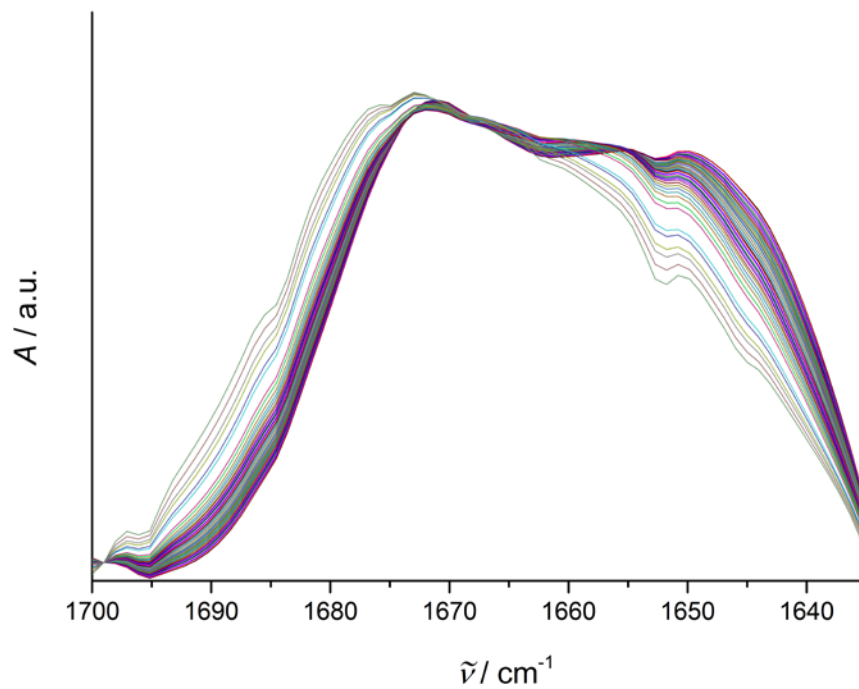


Abbildung A11 Normierte Spektren der temperaturabhängigen Absorbanz des ELP in einer Mischung aus 1 M TMAO und 2 M ^{13}C -Harnstoff in Abhängigkeit der Wellenzahl.

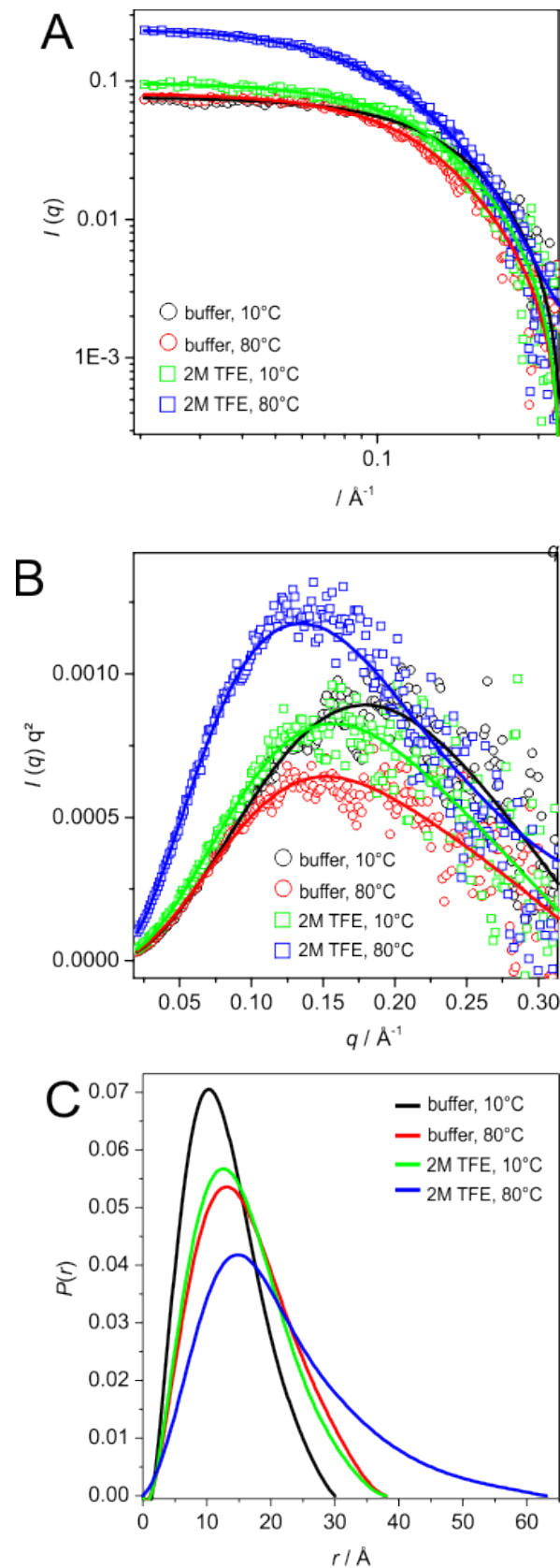


Abbildung A12 Röntgenkleinwinkelstreuungen (SAXS)-Ergebnisse zu 10 Gew.-% ELP in An- und Abwesenheit von 2 M TFE. Die Durchführung und Auswertung erfolgte durch Melanie Berghaus. A: Streuintensitätskurven; B: Kratky-Auftragung; C: Berechnete Elektronenpaarabstandsverteilungsfunktionen.



Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Bedeutung | Deutsche Übersetzung |
|-------------------|--|--|
| CD | Circular dichroism | Zirkulardichroismus |
| DSC | Differential Scanning Calorimetry | dynamische Leistungskompensations-Differenz-Kalorimetrie |
| E1, E2, E3 | Chargennummer der carboxylat-funktionalisierten SBA-15 | |
| ELP | Elastin-like peptide | Elastinartiges Peptid |
| FSD | Fourier-Self-Deconvolution | Fourier-Selbstentfaltung |
| FTIR | Fourier-Transform Infrared | Fourier-Transform Infrarot |
| G, Gly | Glycin | |
| IDP | Intrinsically disordered peptide | Intrinsisch ungeordnetes Peptid |
| ITC | Isothermal titration calorimetry | Isotherme Titrationskalorimetrie |
| ITT | Inverse temperature transition | Inverser Temperaturübergang |
| MCM-41 | Mobil Composition of Matter no. 41 | |
| MCM-48 | Mobil Composition of Matter no. 48 | |
| MOF | Metal-Organic Frameworks | Metall-organisches Gerüst |
| MPS | Mesoporous silicate | |
| N1, N2 | Chargennummer der amino-funktionalisierten SBA-15 | |
| P, Pro | Prolin | |
| P1, P2, P3 | Peak 1, Peak 2, Peak 3 | |
| PPC | Pressure Perturbation Calorimetry | Druckperturbationskalorimetrie |
| PZC | Point of Zero Charge | Punkt bei Nettoladung Null |
| RNase A | Ribonuclease A | Ribonuklease A |
| SAXS | Small Angle X-ray Scattering | Röntgenkleinwinkelstreuung |
| SBA-15 | Santa Barbara Amorphous no. 15 | |
| Tb-mesoMOF | Terbium-mesoporous MOF | |
| TFE | Trifluorethanol | |
| TMAO | Trimethylamin-N-Oxid | |
| UV | Ultraviolet | |
| V, Val | Valin | |



Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Name, Vorname
(Surname, first name)

Matrikel-Nr.
(Enrolment number)

Belehrung:

Wer vorsätzlich gegen eine die Täuschung über Prüfungsleistungen betreffende Regelung einer Hochschulprüfungsordnung verstößt, handelt ordnungswidrig. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße von bis zu 50.000,00 € geahndet werden. Zuständige Verwaltungsbehörde für die Verfolgung und Ahndung von Ordnungswidrigkeiten ist der Kanzler/die Kanzlerin der Technischen Universität Dortmund. Im Falle eines mehrfachen oder sonstigen schwerwiegenden Täuschungsversuches kann der Prüfling zudem exmatrikuliert werden, § 63 Abs. 5 Hochschulgesetz NRW.

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar.

Wer vorsätzlich eine falsche Versicherung an Eides statt abgibt, kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft werden, § 156 StGB. Die fahrlässige Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe bestraft werden, § 161 StGB.

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

Official notification:

Any person who intentionally breaches any regulation of university examination regulations relating to deception in examination performance is acting improperly. This offence can be punished with a fine of up to EUR 50,000.00. The competent administrative authority for the pursuit and prosecution of offences of this type is the chancellor of the TU Dortmund University. In the case of multiple or other serious attempts at deception, the candidate can also be unenrolled, Section 63, paragraph 5 of the Universities Act of North Rhine-Westphalia.

The submission of a false affidavit is punishable.

Any person who intentionally submits a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to three years or a fine, Section 156 of the Criminal Code. The negligent submission of a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to one year or a fine, Section 161 of the Criminal Code.

I have taken note of the above official notification.

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)

Titel der Dissertation:
(Title of the thesis):

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.
Die Arbeit hat in gegenwärtiger oder in einer anderen Fassung weder der TU Dortmund noch einer anderen Hochschule im Zusammenhang mit einer staatlichen oder akademischen Prüfung vorgelegen.

I hereby swear that I have completed the present dissertation independently and without inadmissible external support. I have not used any sources or tools other than those indicated and have identified literal and analogous quotations.

The thesis in its current version or another version has not been presented to the TU Dortmund University or another university in connection with a state or academic examination.*

***Please be aware that solely the German version of the affidavit ("Eidesstattliche Versicherung") for the PhD thesis is the official and legally binding version.**

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)