

HERSTELLUNG UND  
CHARAKTERISIERUNG FUNKTIONALER  
PROTEIN-GRENZFLÄCHEN

---

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

(DR. RER. NAT.)

VORGELEGT VON

SÜLEYMAN ÇINAR

AUS SALIHLI (TÜRKEI)

EINGEREICHT AN DER

FAKULTÄT FÜR CHEMIE UND CHEMISCHE BIOLOGIE  
DER TECHNISCHEN UNIVERSITÄT DORTMUND

DORTMUND

OKTOBER 2017



Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Februar 2014 bis Oktober 2017 am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I der Technischen Universität Dortmund unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Claus Czeslik durchgeführt.

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Januar 2018

Prüfungskommission:

Erstgutachter:	Prof. Dr. Claus Czeslik
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Heinz Rehage
Vorsitzender:	Prof. Dr. Norbert Krause



*Für meine Familie*



*“Ernst zu nehmende Forschung erkennt man daran, dass plötzlich zwei Probleme existieren, wo es vorher nur eines gegeben hat.”*

THORSTEIN BUNDE VEBLEN



---

# Danksagung

Mein spezieller Dank gilt **Herrn Prof. Dr. Claus Czeslik** für das interessante und vielfältige Thema, die fortwährende Unterstützung, sowie die Betreuung und den Freiraum, der mir gelassen wurde.

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

Bei **Frau Andrea Jeworrek** danke ich für die Hilfe bei allen organisatorischen und administrativen Tätigkeiten.

Bei meinen Bürokollegen **Paul Schummel** bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ein besonderer Dank geht an meine Freunde **Samy Al-Ayoubi** und **Artem Levin** für unsere gemeinsame Zeit, beruflich sowie privat. **Samy Al-Ayoubi** möchte ich weiterhin für die Korrektur dieser Arbeit danken.

**Simone Möbitz** danke ich für die große Hilfe bei der Proteinexpression und Aufreinigung.

An dieser Stelle nutze ich die Gelegenheit um mich **bei allen Mitarbeitern** sowie **ehemaligen Mitarbeitern** des Lehrstuhls Physikalische Chemie I für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre zu bedanken.

Vom ganzen Herzen bedanke ich mich bei meiner Frau **Patricia Çınar** für die Unterstützung in allen Lebenslagen.

Als letztes möchte ich mich bei **meiner Familie** und besonders bei **meinen Eltern** dafür bedanken, dass sie immer für mich da sind.



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Experimentelle Methoden</b>	<b>7</b>
2.1	Chemikalien und Proteine . . . . .	7
2.2	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie . . . . .	9
2.2.1	Grundlagen . . . . .	9
2.2.2	Experimentelles . . . . .	18
2.3	Neutronen- und Röntgenreflektometrie . . . . .	22
2.3.1	Grundlagen . . . . .	22
2.3.2	Experimentelles . . . . .	25
2.3.2.1	Röntgenreflektometrie . . . . .	25
2.3.2.2	Neutronenreflektometrie . . . . .	26
2.4	Röntgen-Kleinwinkelstreuung (SAXS) . . . . .	27
2.4.1	Grundlagen . . . . .	27
2.4.2	Experimentelles . . . . .	31
2.4.2.1	Messungen am SAXSess mc <sup>2</sup> - Diffraktometer . . . . .	31
2.4.2.2	Messungen am DELTA-Synchrotron . . . . .	31
2.5	Elastische Inkohärente Neutronenstreuung (EINS) . . . . .	32
2.5.1	Grundlagen . . . . .	32
2.5.2	Experimentelles . . . . .	32
2.6	Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) . . . . .	33
2.6.1	Grundlagen . . . . .	33
2.6.2	Experimentelles . . . . .	35
2.7	Fluoreszenzspektroskopie . . . . .	35
2.7.1	Grundlagen . . . . .	35

2.7.2	Experimentelles . . . . .	38
<b>3</b>	<b>Sekundärstruktur und Faltungstabilität von adsorbierten Proteinen</b>	<b>41</b>
3.1	Einleitung . . . . .	41
3.2	Probenpräparation . . . . .	46
3.2.1	Überführung von Ludox AM Silica-Partikel in D <sub>2</sub> O . . . . .	46
3.2.2	Bestimmung des Protein-Adsorptionsgrades auf Silica-Partikel	46
3.2.3	FTIR-Experimente . . . . .	48
3.3	Ergebnisse . . . . .	49
3.3.1	Temperaturabhängige Messungen von RNase A und Lysozym in Lösung und adsorbiert auf Ludox AM . . . . .	49
3.3.2	Druckabhängige Messungen von RNase A und Lysozym in Lösung und adsorbiert auf Ludox AM . . . . .	56
3.3.3	Druck- und Temperaturstabilität von RNase A und Lysozym .	60
3.4	Zusammenfassung von Kapitel 3 . . . . .	65
<b>4</b>	<b>Wechselwirkung von Calmodulin mit Liganden</b>	<b>67</b>
4.1	Einleitung . . . . .	67
4.2	Probenpräparation . . . . .	72
4.2.1	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	72
4.2.1.1	Transformation . . . . .	72
4.2.1.2	Proteinexpression von Calmodulin . . . . .	73
4.2.1.3	Zellyse und Aufreinigung von Calmodulin . . . . .	73
4.2.2	FTIR-Experimente . . . . .	75
4.2.3	Röntgen-Kleinwinkelstreuexperimente (SAXS) . . . . .	77
4.2.3.1	Messungen am SAXSess mc <sup>2</sup> -Diffraktometer . . . . .	77
4.2.3.2	Messungen am DELTA-Synchrotron . . . . .	79
4.2.4	Elastische Inkohärente Neutronenstreu (EINS) - Messungen .	80
4.2.5	Dynmatische Lichtstreuung (DLS) . . . . .	81
4.2.6	Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) . . . . .	82
4.2.7	Fluoreszenzmessungen . . . . .	84

4.3	Ergebnisse . . . . .	85
4.3.1	FTIR-Experimente . . . . .	85
4.3.2	Röntgen-Kleinwinkelstreuexperimente (SAXS) . . . . .	105
4.3.3	Elastische Inkohärente Neutronenstreuung (EINS) . . . . .	121
4.3.4	Dynamische Lichtstreuung (DLS) . . . . .	126
4.3.5	Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) - Messungen . . . . .	127
4.3.6	Fluoreszenzmessungen . . . . .	130
4.4	Zusammenfassung von Kapitel 4 . . . . .	136
<b>5</b>	<b>Biologische Schaltbarkeit einer CaM-Polyelektrolytmultischicht</b>	<b>139</b>
5.1	Einleitung . . . . .	139
5.2	Probenpräparation . . . . .	142
5.2.1	Aufbau der Polyelektrolytmultischichten . . . . .	142
5.2.2	ATR/FTIR-Messungen . . . . .	143
5.2.3	Röntgen-Kleinwinkelstreuexperimente (SAXS) . . . . .	144
5.3	Ergebnisse . . . . .	145
5.3.1	Aufbau der Polyelektrolytmultischichten . . . . .	145
5.3.2	Interaktion von Calmodulin mit TFP und PAH . . . . .	154
5.3.3	Lösungsmiteleinfluss auf die PEM-Struktur . . . . .	156
5.4	Zusammenfassung von Kapitel 5 . . . . .	161
<b>6</b>	<b>Biologische Schaltbarkeit eines CaM-PEG-Grenzflächensystems</b>	<b>163</b>
6.1	Einleitung . . . . .	163
6.2	Probenpräparation . . . . .	166
6.2.1	Aufbau einer CaM-PEG-Schicht auf Silizium . . . . .	166
6.2.2	Röntgen-Kleinwinkelstreuexperimente (SAXS) . . . . .	167
6.2.3	ATR/FTIR-Messungen . . . . .	168
6.3	Ergebnisse . . . . .	169
6.3.1	Charakterisierung von $\text{CaM}^{\text{T34C, T110C}}$ in Lösung . . . . .	169
6.3.2	Aufbau der CaM-PEG-Schicht . . . . .	174
6.4	Zusammenfassung von Kapitel 6 . . . . .	180

<b>7 Zusammenfassung</b>	<b>183</b>
<b>8 Summary</b>	<b>187</b>
<b>9 Anhang</b>	<b>191</b>
<b>10 Literaturverzeichnis</b>	<b>207</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>227</b>
<b>Publikationsliste</b>	<b>229</b>

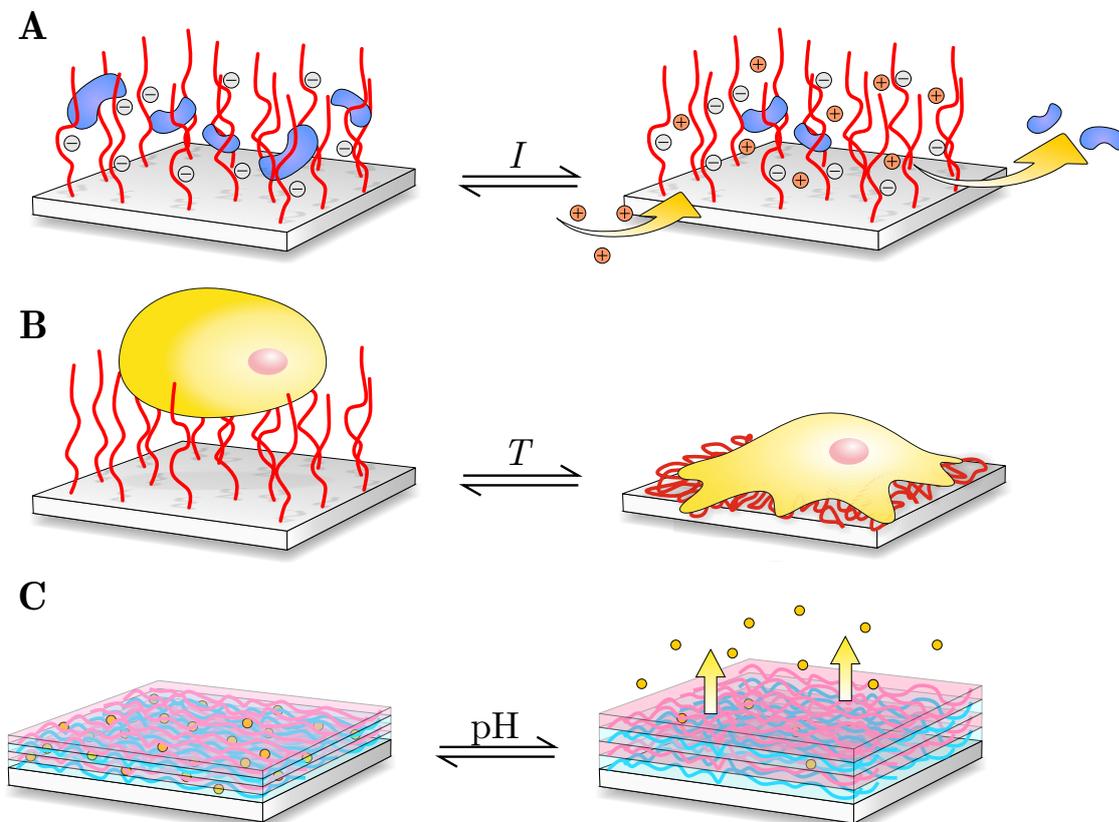
---

# 1 Einleitung

Die spontane Adsorption von Proteinen an feste Grenzflächen spielt in der Natur, Biotechnologie, Medizin, Pharmazie sowie in alltäglichen Bereichen eine wichtige Rolle. In medizinischen und technischen Anwendungen kommt es in der Regel zu beabsichtigten oder auch unbeabsichtigten Interaktionen zwischen Protein und Oberfläche.<sup>[1]</sup> Bei medizinischen Anwendungen ist die Erkenntnis über das Adsorptionsverhalten von Proteinen an Materialoberflächen überall dort von besonderer Wichtigkeit, wo eine Biokompatibilität gewährleistet sein muss, wie es bei künstlichen Implantaten der Fall ist. Die Adsorption auf künstlichen Implantaten kann Blutgerinnungskaskaden auslösen, was Thrombenbildung zur Folge haben kann. Unerwünscht ist ebenfalls die Ablagerung von Lysozym auf Kontaktlinsen, die bereits kurze Zeit nach Einsetzen in das Auge auftritt und zur Bildung eines Biofilms führt. Dies kann einerseits die Qualität und Transparenz der Kontaktlinsen beeinträchtigen und andererseits Entzündungsreaktionen hervorrufen.<sup>[1]</sup> In biotechnologischen Anwendungen werden Proteine oft an Träger-Partikel immobilisiert.<sup>[2,3]</sup> Diese erlauben es auf einem einfachen Weg, die Proteine wieder aus der Reaktionslösung durch Zentrifugation, Sedimentation, Filtration oder auch durch magnetische Anziehung zu entfernen.<sup>[4]</sup> So können z.B. teure Enzyme nach einer enzymatischen Reaktion für weitere Reaktionszyklen wiedergewonnen und verwendet werden.<sup>[1]</sup>

Die biologische Aktivität von Proteinen ist nur in ihrer nativen Konformation gegeben, die jedoch nur marginal gegen Entfaltung stabil ist. Jede Abweichung von der natürlichen Umgebung, die meist eine neutrale wässrige Lösung bei Atmosphärendruck ist, kann zu einer partiellen oder vollständigen Entfaltung führen. Zum Beispiel können Proteine durch Erhöhung oder Erniedrigung der Temperatur, durch Druck, durch Zugabe von Cosolventien oder bei Oberflächenexposition ent-

fallen.<sup>[5-7]</sup> Daher kann auch eine Immobilisierung von einem Protein z.B. auf einem Trägerteilchen zum Verlust der biologischen Aktivität führen. Bei der Proteinadsorption ist es wichtig zu erkennen, dass die meisten Proteine große amphipathische Moleküle sind. Diese Eigenschaft macht sie zu oberflächenaktiven Molekülen. Das Problem ist somit nicht, wie oder ob Proteine an eine Oberfläche adsorbieren, sondern wie die Adsorption an eine Grenzfläche kontrollierbar und die native Struktur der Proteine erhalten werden kann.



**Abbildung 1.1:** Beispiele für modifizierte Oberflächen, deren Eigenschaften durch Variation der Temperatur  $T$ , der Ionenstärke  $I$  oder des pH-Werts gesteuert werden können.

Es gibt eine Reihe von Möglichkeiten, die Proteinadsorption durch Modifikation der Oberfläche mit Polymeren zu kontrollieren und zu steuern (Abbildung 1.1). Die Kontrolle basiert hierbei auf der Variation der Polymerzusammensetzung oder auf der Veränderungen der Eigenschaften der Polymere durch Variation von pH-Wert, Ionenstärke oder auch der Temperatur.<sup>[8-23]</sup> Bezüglich dieser Parameter sind Po-

---

lyelektrolytmultischichten (PEM) gut charakterisiert. PEM sind Polymerfilme im Nanometer-Bereich, die durch abwechselndes Abscheiden von Polyelektrolyten gebildet werden. Polyelektrolyte sind Polymere, deren Monomere eine Ladung tragen. Als Polyelektrolyt können z.B. Polystyrolsulfonat, Polyacryl- und Polymethacrylsäuren, DNA und andere Polysäuren und Polybasen verwendet werden.<sup>[24]</sup> Der Aufbau erfolgt auf Grund der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen entgegengesetzt geladenen Polyelektrolyten. Daher ist es möglich, gezielt Proteine in oder auf PEM durch entgegengesetzte Ladungen zu immobilisieren und somit die Adsorption zu steuern.

Ein weiteres Beispiel für Grenzflächenstrukturen ist eine Polymerbürste.<sup>[25]</sup> Es werden hier lange Polymerketten dicht auf der Oberfläche verankert. Werden Polyelektrolyte verwendet, ist es möglich, durch Variation des pH-Werts oder der Ionenstärke eine Enzymimmobilisierung zu steuern (Abbildung 1.1A).<sup>[20,21,26]</sup> Wird eine Oberfläche hingegen mit Poly(*N*-isopropylacrylamid) modifiziert, lässt sich durch Variation der Temperatur die Hydrophobizität der Oberfläche beeinflussen und dadurch die Zelladhäsion regulieren (Abbildung 1.1B).<sup>[15]</sup> In der Literatur sind eine Reihe unterschiedlicher Polymere zu finden, die auf Variation physikalisch-chemischer Parameter wie Temperatur, Ionenstärke oder auch pH-Wert ansprechen.

Ein wichtiger Forschungsbereich ist die Nutzung von Grenzflächenstrukturen als Depotschicht für Wirkstoffe, die freigesetzt werden können. Hierfür muss die Oberfläche durch geeignete Parameter veränderbar sein. Es gibt zahlreiche Studien, die sich mit dieser Thematik beschäftigen, jedoch basiert die Freisetzung überwiegend auf Variation von physikalisch-chemischen Parametern.<sup>[8,9,27-30]</sup> Ein Beispiel ist die Einlagerung von Wirkstoffen in PEM. Durch Variation des pH-Wertes lässt sich ein Aufquellen oder gar ein Abbau der PEM bewirken, wodurch der Wirkstoff freigesetzt werden kann (Abbildung 1.1C).<sup>[31]</sup> Hinsichtlich biologisch kompatibler Systeme, welche z.B. in der Medizin eingesetzt werden sollen, ist die Variation von physikalisch-chemischen Parametern jedoch nur begrenzt möglich. Die Entwicklung biokompatibler Grenzflächenbeschichtungen, die mittels biologischer Komponenten reguliert werden können, scheint daher zukunftsweisend.

In der Literatur gibt es bereits zahlreiche Studien, die sich intensiv mit der Bestim-

mung des Protein-Adsorptionsgrades auf unterschiedlichen Materialoberflächen in Abhängigkeit der Proteinkonzentration, des pH-Wertes, der Temperatur und des Drucks beschäftigen. Weiterhin findet man Untersuchungen der Enzymaktivität an verschiedenen Oberflächen, wie auch Entwicklungen proteinresistenter Oberflächen. Ebenso sind Untersuchungen der Sekundärstruktur von Proteinen an Grenzflächen mittels CD- und FTIR-Spektroskopie zu finden, die jedoch häufig nur beschreibend sind. Weitgehend unerforscht ist dagegen die konformelle Beweglichkeit von Proteinen an Grenzflächen und wie diese in potenziellen Anwendungen genutzt werden kann. Dies ist daher die zentrale Fragestellung dieser Arbeit. Unter Ausnutzung der Schaltbarkeit definierter Konformationen des Calmodulins sollen so schließlich funktionale Proteingrenzflächen aufgebaut und charakterisiert werden.

In der vorliegenden Arbeit werden zunächst die Grundlagen der angewandten biophysikalischen Methoden kurz erklärt. Ab Kapitel 3 werden dann die neuen Ergebnisse vorgestellt.

In Kapitel 3 steht die Frage im Vordergrund, ob die an einer Grenzfläche ausgebildeten Sekundärstrukturen mit denen, die im Verlauf der Proteinfaltung in Lösung auftreten, in Zusammenhang stehen. Man wird sehen, dass sich zumindest an einer hydrophilen Silica-Grenzfläche Proteine auf dem konformellen Pfad gelöster Proteine bewegen und keine neuen unerwarteten Sekundärstrukturen zeigen.

Darauf aufbauend folgen Untersuchungen der Konformation des Calmodulins, das unter Ligandenbindung von einer offenen hantelförmigen in eine geschlossene globuläre Form übergeht. In Kapitel 4 wird diese Liganden-induzierte Konformationsumwandlung zunächst in Lösung in Abhängigkeit des Drucks untersucht, um auf diese Weise die Stärke und Art der Protein-Ligand-Wechselwirkung zu analysieren. Offensichtlich kann Druck dazu genutzt werden, um die Stärke der Ligandenbindung an Calmodulin zu manipulieren.

Hieran schließen sich in Kapitel 5 und 6 zwei Studien an, in denen Calmodulin in Polymergrenzflächenfilme eingebaut wurde. Es wird untersucht, inwieweit das so immobilisierte Calmodulin durch Ligandenbindung seine Konformation weiterhin

---

ändert und dabei die Strukturen des Polymerfilms verändert. Auf diese Weise sind letztlich biologisch-schaltbare Grenzflächen realisierbar. Man wird sehen, dass Polyelektrolytmultischichten die Konformationsfreiheit des Calmodulins unterdrücken, während Polyethylenglycol-beschichtete Grenzflächen durch eingebautes Calmodulin bei Ligandenbindung biologisch-schaltbar sind. Dies stellt ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit dar.

Detaillierte Einführungen in die jeweiligen Teilprojekte sind zu Beginn der Kapitel 3-6 zu finden.



---

## 2 Experimentelle Methoden

### 2.1 Chemikalien und Proteine

In der Tabelle 2.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Proteine aufgelistet.

**Tabelle 2.1:** Chemikalien und Proteine.

Bezeichnung	Reinheit / Konzentration	Bezugsquelle
Ammoniumhydroxid	28-30 % NH <sub>3</sub> in H <sub>2</sub> O, ACS Reagenz	Sigma-Aldrich
BisTris	ACS Reagenz ( $\geq 98\%$ )	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid	ACS Reagenz ( $\geq 96\%$ )	VWR
EGTA	unbestimmt	Sigma-Aldrich
Deuteriumchlorid in D <sub>2</sub> O, 36 %	99 % Deuterierungsgrad	Sigma-Aldrich
Deuteriumoxid	99 % Deuterierungsgrad	Sigma-Aldrich
DL-Dithiothreitol	$\geq 99\%$	Sigma-Aldrich
HEPES	$\geq 99.5\%$	Sigma-Aldrich
Ludox AM-30	30 Gew.% in H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich
Lysozym aus Hühnereiweiß	$\geq 95\%$	Roche
Melittin	nicht angegeben	SERVA
3-( <i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure	$\geq 95\%$	Sigma-Aldrich
(3-Mercaptopropyl)trimethoxysilan	95 %	Sigma-Aldrich
K-Ras4B(HVR)	95 %	AnaSpec
Natriumdeuteriumoxid	99.5 % Deuterierungsgrad	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	$\geq 98\%$	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	$\geq 99\%$	Sigma-Aldrich
Polyallylamin	Mw 58000 Da	Sigma-Aldrich
Polystyrolsulfonat	Mw 70000 Da	Sigma-Aldrich

## 2 Experimentelle Methoden

---

Bezeichnung	Reinheit	Bezugsquelle
Polyethylenimin	Mw 750000 Da	Sigma-Aldrich
4-Arm-Poly(ethylenglycol)Acrylat	unbestimmt	Creative PEGWorks
Ribonuklease A aus Rinder-Pankreas	$\geq 90\%$	Sigma-Aldrich
Schwefelsäure	95–98 %	Sigma-Aldrich
Tris(2-carboxyethyl)phosphin	$\geq 98\%$	Sigma-Aldrich
Trifluoperazin	$\geq 99\%$	Sigma-Aldrich
Toluol	ACS Reagenz ( $\geq 99.5\%$ )	Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxid in H <sub>2</sub> O 29–32 %	ACS Reagenz ( $\geq 99.9\%$ )	Sigma-Aldrich

Weiterhin wurde das Protein Calmodulin als Wildtyp und in Form verschiedener Mutanten molekularbiologisch produziert (siehe Unterabschnitt 4.2.1).

## 2.2 Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie<sup>[32]</sup>

### 2.2.1 Grundlagen

Bei der IR-Spektroskopie werden aufgrund der zu geringen Energie der IR-Strahlen nicht Elektronenübergänge wie bei der UV/VIS-Spektroskopie angeregt, sondern Molekülschwingungen und Rotationen. Voraussetzung für eine Absorption der IR-Strahlung ist, dass die Moleküle entweder ein veränderbares oder ein induzierbares Dipolmoment besitzen. Solche Schwingungen werden als IR-aktiv bezeichnet. Zweiatomige homonukleare Atome wie  $O_2$  besitzen kein Dipolmoment und können prinzipiell nicht durch IR-Strahlung zur Schwingung angeregt werden. Solche Moleküle sind IR-inaktiv. Um die Bewegungsvorgänge im Molekül zu beschreiben, geht man vom einfachsten physikalischen Modell, dem harmonischen Oszillator aus. Hierbei kann die Schwingung eines Moleküls mit zwei Atomen bzw. Atomgruppen mit der Schwingung zweier Massepunkte  $m_1$  und  $m_2$ , die durch eine masselose elastische Feder verbunden sind, verglichen werden. Die Feder wird hierbei durch die Kraftkonstante  $k$  charakterisiert, die ein Maß für die Stärke der chemischen Bindung (Bindungsstärke) zwischen den beiden Atomen darstellt. Wird der Gleichgewichtsabstand durch Streckung oder Stauchung verändert, so erfährt das System eine rücktreibende Kraft  $F_{\text{rück}}$ , die die beiden Atome wieder in den Gleichgewichtszustand bringt. Die Auslenkung  $\Delta r = r - r_0$  wird durch das HOOKE'sche Gesetz beschrieben (Gleichung 2.1).

$$F_{\text{rück}} = -k \cdot \Delta r \quad (2.1)$$

Die rücktreibende Kraft  $F_{\text{rück}}$  ist hierbei proportional zur Auslenkung  $\Delta r$  und zur Federkonstanten  $k$ . Wie bei einem Pendel werden beim Schwingungsvorgang potentielle und kinetische Energie ineinander umgewandelt. Die Summe beider Energieformen ist konstant. Die potentielle Energie  $E_{\text{pot}}$  der Schwingung ist eine Funktion des Kernabstandes und steigt bei Auslenkung aus der Gleichgewichtslage parabolisch um  $r_0$  herum an (Gleichung 2.2).

$$E_{\text{pot}} = \frac{1}{2} \cdot k \cdot \Delta r^2 \quad (2.2)$$

Demnach ist  $E_{\text{pot}}$  bei maximaler Auslenkung maximal, wohingegen die kinetische Energie  $E_{\text{kin}}$  beim Durchschwingen durch die Gleichgewichtslage maximal ist. Die quantenmechanische Betrachtung für ein solches zweiatomiges System durch Lösen der SCHRÖDINGER-Gleichung zeigt, dass nur ganz bestimmte Energiewerte angenommen werden können:

$$E_\nu = h \cdot \nu_0 \cdot \left(v + \frac{1}{2}\right) \quad \text{mit} \quad \nu_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2} \quad (2.3)$$

Die Größe  $v$  ist die Schwingungsquantenzahl und kann alle ganzzahligen positiven Werte und null annehmen.  $\nu_0$  ist die Eigenschwingung des Systems und  $\mu$  die reduzierte Masse des Moleküls. Die möglichen Energieniveaus sind demnach äquidistant, sodass zur Anregung auf ein höheres Niveau immer der gleiche Betrag  $h\nu_0$  nötig ist. Der Schwingungsübergang zwischen zwei Niveaus unterliegt jedoch einer Auswahlregel ( $\Delta v \pm 1$ ), sodass die einzigen erlaubten Übergänge die zwischen zwei benachbarten Energieniveaus sind. Des Weiteren gibt es eine Nullpunktsenergie mit  $E_\nu = 0.5 \cdot \nu_0 \cdot h$ , wodurch auch im kleinstmöglichen Zustand ( $v = 0$ ) eine Schwingung um die Ruhelage erfolgt.

Das Modell des harmonischen Oszillator ist sehr vereinfacht und beschreibt daher nur sehr eingeschränkt die molekulare Schwingung realer Moleküle, da es die Abstoßung der Kerne mit zunehmender Annäherung und die Bindungsdissoziation bei Anregung in hohen Schwingungszuständen vernachlässigt. Eine unsymmetrische Potentialkurve bezüglich des Gleichgewichtsabstands entspricht eher der Wirklichkeit. Der anharmonische Oszillator bietet einen realistischeren Ansatz. Eine gute Näherungsfunktion der potentiellen Energie beim anharmonischen Oszillator ist das sogenannte MORSE-Potential. Bei kleinen Schwingungszahlen ist die Abweichung zwischen harmonischem und anharmonischem Oszillator noch gering, während das

Potential bei großen Auslenkungen aus der Ruhelage mit zunehmender Entfernung immer weiter abflacht, bis eine obere Grenze erreicht wird und das Molekül dissoziiert. Die möglichen Energien des anharmonischen Oszillators betragen:

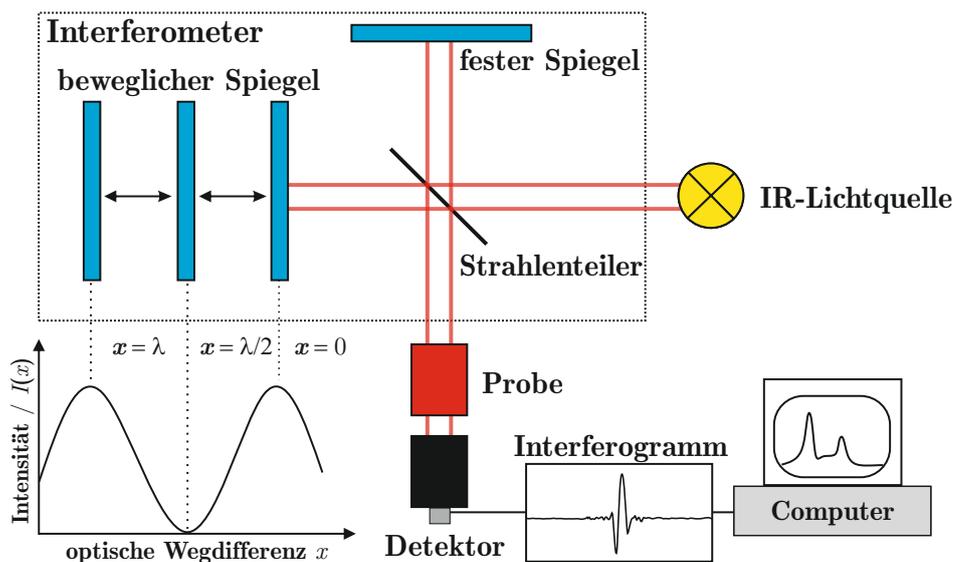
$$E_a = h \cdot \nu_a \cdot \left( v + \frac{1}{2} \right) - h \cdot \nu_a \cdot x_a \cdot \left( v + \frac{1}{2} \right)^2 \quad (2.4)$$

$\nu_a$  ist die hypothetische Schwingungsfrequenz des anharmonischen Oszillators um seine Ruhelage,  $x_a$  eine dimensionslose Anharmonizitätskonstante und  $v = 0, 1, 2, \dots, v_{\max}$  die Schwingungsquantenzahl. Die Energieniveaus sind in diesem Modell nicht mehr äquidistant, sondern konvergieren zur Dissoziationsgrenze hin gegen null. Ebenso sind nicht nur Übergänge zum nächstmöglichen Energieniveau möglich ( $\Delta v = \pm 1$ , Grundschiwingung), sondern auch Übergänge in weiter entfernte Energieniveaus ( $\Delta v = \pm 2, \pm 3, \dots$ ). Es wird unterschieden zwischen Valenz- und Deformationsschwingungen. Bei der Valenzschwingung erfolgt die Auslenkung (Schwingung) in Richtung der Bindungsachse. Ist bei der Schwingung hingegen der Bindungsabstand konstant und der Bindungswinkel ändert sich periodisch, so wird dies als Deformationsschwingung bezeichnet. Die Anzahl der Normalschwingungen eines Systems ergibt sich aus der Anzahl seiner Freiheitsgrade, die nicht für Translations- und Rotationsbewegung verbraucht sind. Auf lineare Moleküle entfallen  $3n-5$  und auf nicht lineare Moleküle  $3n-6$  Normalschwingungen.

### Funktionsweise eines FTIR-Spektrometers

Anders als bei einem herkömmlichen IR-Spektrometer wird beim FTIR-Spektrometer nicht mit einem dispersiven Element sequenziell immer nur eine Wellenlänge vermessen, sondern durch einen abgeänderten Aufbau die gleichzeitige Absorptionsanalyse des gesamten Frequenzbereichs ermöglicht. Ein wesentlicher Bestandteil des FTIR-Spektrometers ist das MICHELSON-Interferometer. Der schematische Aufbau eines FTIR-Spektrometers mit MICHELSON-Interferometer ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

Das Interferometer besteht aus einem halbdurchlässigen Strahlteiler, einem festen und



**Abbildung 2.1:** Schematische Darstellung eines FTIR-Spektrometers mit Michelson-Interferometer.<sup>[32]</sup>

einem beweglichen Spiegel. Der von der IR-Lichtquelle kommende Strahl wird an dem Strahlteiler im rechten Winkel aufgespalten. Ein Strahl trifft auf den festen Spiegel und der zweite auf einen beweglichen Spiegel. Der feste und der bewegte Spiegel reflektieren die Strahlung zurück zum Strahlteiler und von dort in den Probenraum und weiter zum Detektor. Bei gleichem Abstand von beweglichem und festem Spiegel zum Strahlteiler ist die optische Wegdifferenz  $x = 0$ . Die beiden Teilstrahlen interferieren konstruktiv am Strahlteiler und der Strahl, der das Interferometer verlässt, besitzt maximale Intensität. Sind die beiden Teilstrahlen nicht in Phase, interferieren sie destruktiv ( $x \neq n\frac{\lambda}{2}$ ). Der detektierte Strahl hat daher eine verringerte Intensität. Die Messung der Intensität der Strahlung  $I$  als Funktion der optischen Weglängendifferenz  $x$  liefert das Interferogramm  $I(x)$ . Mittels einer mathematischen Operation, der FOURIER-Transformation, wird das Interferogramm in ein Absorptionsspektrum als Funktion der Wellenzahl  $\tilde{\nu} = 1/\lambda$  umgewandelt.

### ATR-FTIR-Spektroskopie

Mittels der *Attenuated Total Reflection* (ATR) ist es möglich, IR-Absorptionen von Proben an einer Grenzfläche zu untersuchen. Ausgenutzt wird bei dieser Technik die Totalreflexion an der Grenzfläche zweier Medien mit unterschiedlicher optischer

Dichte. Hierfür wird die Probe auf ein internes Reflexionselement (IRE) mit einem hohen Brechungsindex ( $n_1$ ) aufgebracht, welches aus Silizium, Germanium oder Zinkselenid besteht. Die IR-Strahlung wird unter einem Winkel  $\theta_1$  (relativ zur Grenzflächennormalen) in den ATR-Kristall geleitet und trifft auf die Grenzfläche zum optisch dünneren Medium ( $n_2$ ). Wenn der Einfallswinkel  $\theta_1$  größer ist als der sogenannte kritische Winkel  $\theta_c$ , kommt es zur Totalreflexion innerhalb des ATR-Kristalls. Bei der Totalreflexion wird der IR-Strahl aufgrund des GOOS-HÄNCHEN-Effekts seitlich verschoben.<sup>[33]</sup> Der kritische Winkel ist durch das SNELLIUS'sche Brechungsgesetz gegeben:

$$\theta_c = \arcsin\left(\frac{n_2}{n_1}\right) \quad (2.5)$$

Bei einer Totalreflexion bildet sich senkrecht zur Grenzfläche eine so genannte evaneszente Welle, deren elektrische Feldstärke exponentiell in das optisch dünnere Medium hinein abfällt und von Molekülen an der Grenzfläche absorbiert werden kann. Der IR-Strahl wird folglich abgeschwächt und lediglich in abgeschwächter Form total reflektiert. Weitere Grundlagen sind in den angegebenen Referenzen ausführlich beschrieben.<sup>[34,35]</sup>

### **IR-Spektroskopie an Proteinen**

Proteine bestehen in der Regel aus verschiedenen Sekundärstrukturelementen (z.B.  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblätter, ungeordnete Strukturen). Die FTIR-Technik bietet die Möglichkeit die Sekundärstruktur-Zusammensetzung sowie die Anteile der einzelnen Strukturelemente innerhalb des Proteins abzuschätzen.<sup>[36]</sup>

Mit der Größe des Moleküls steigt die Anzahl der Normalschwingungen, wodurch eine sinnvolle Analyse einzelner Schwingungsmodi problematisch erscheint. Allerdings ist es möglich, bestimmte Gruppen in Proteinen und Peptiden charakteristischen Gruppenfrequenzen zuzuordnen, sodass Proteine mehrere charakteristische IR-Absorptionsbanden aufweisen. In diesem Zusammenhang spielen die Schwingungen der Peptidbindung und des Peptidrückgrats eine wichtige Rolle. Eine Zusam-

menstellung der fünf bekannten Amid-Gruppenschwingungen ist in Tabelle 2.2 zu sehen.

**Tabelle 2.2:** Amid-Gruppenschwingungen in Proteinen.<sup>[32]</sup>

Bande	$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$	Bandenbeiträge
<b>Amid-A</b>	3250–3300	N-H-Streckschwingung
<b>Amid-I</b>	1600–1700	C=O-Streckschwingung
<b>Amid-II</b>	1480–1575	N-H-Biegeschwingung, C-N-Streckschwingung
<b>Amid-III</b>	1230–1330	N-H-Biegeschwingung, C-N-Streckschwingung
<b>Amid-IV</b>	625–770	O=C-N-Deformationsschwingung

Für Sekundärstrukturuntersuchungen ist die Amid-I-Bande die aussagekräftigste und am besten untersuchte Bande. Sie setzt sich hauptsächlich aus der Valenzschwingung der C=O-Gruppe und schwachen Beiträgen der C-N-Streckschwingung und einer C-C-N-Deformationsschwingung zusammen. Die genaue Frequenzlage der Amid-I-Bande variiert mit der unterschiedlichen Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den C=O- und N-H-Gruppen in einem Protein. Unterschiedliche Sekundärstrukturen bilden charakteristische Wasserstoffbrückenbindungen aus, sodass die Frequenzlage der Amid-I-Bande von der Sekundärstruktur eines Proteins abhängig ist. Hierbei gilt, je stärker die Wasserstoffbrückenbindung ist, desto mehr Elektronendichte wird von der C=O-Bindung abgezogen, die Kraftkonstante der Carbonylschwingung wird kleiner, und somit wird auch die Schwingungsfrequenz kleiner. Die Wasserstoffbrückenbindungen in  $\beta$ -Faltblattstrukturen sind im Vergleich zu denen in einer  $\alpha$ -Helix deutlich stärker, wodurch die Carbonylgruppen bei niedrigeren Wellenzahlen absorbieren.<sup>[36]</sup> Aufgrund der H<sub>2</sub>O-Deformationsschwingung besitzt H<sub>2</sub>O eine starke Absorptionsbande bei 1645 cm<sup>-1</sup> und absorbiert somit im Bereich der Amid-I-Bande. D<sub>2</sub>O hingegen absorbiert im Bereich von 1700–1500 cm<sup>-1</sup> relativ wenig und eignet sich daher besser als Lösungsmittel. Bei Verwendung von D<sub>2</sub>O als Lösungsmittel werden die Amid-Banden mit einem Strich gekennzeichnet (z.B. Amid-I'). Empirische Studien von Proteinen und Peptiden mit definierten Sekundärstrukturen erlaubten eine Zuordnung der Sekundärstrukturen zu ganz

bestimmten Schwingungs-Wellenzahlen. Der Zusammenhang zwischen der Amid-I'-Bandenlage und den Sekundärstrukturtypen ist in Tabelle 2.3 zusammengefasst.

**Tabelle 2.3:** Zuordnung der Wellenzahlbereiche (Richtwerte) zu den Sekundärstrukturen von Proteinen und Peptiden in D<sub>2</sub>O.<sup>[36–38]</sup>

Sekundärstruktur	Amid-I'-Schwingung $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$
exponierte Seitenketten, $\beta$ -Faltblatt	1620–1640
ungeordnete Strukturen	1640–1650
$\alpha$ -Helix	1650–1658
Schleifenstrukturen	1660–1690
$\beta$ -Faltblatt, exponierte-Strangstrukturen	1675–1695

Die Zuordnungen der Wellenzahlenbereiche zu den Sekundärstrukturen in Tabelle 2.3 sind lediglich Richtwerte, die keine Allgemeingültigkeit besitzen. Normalerweise sind  $\alpha$ -Helices im Wellenzahlbereich von 1650–1658 cm<sup>-1</sup> zu finden, jedoch besitzen z.B. lösungsmittel-exponierte  $\alpha$ -Helices Bandenpositionen im Bereich von 1630 cm<sup>-1</sup>. Ein Beispiel hierfür ist Poly-L-Lysin (PLL), dessen Bandenposition bei 1638 cm<sup>-1</sup> liegt, obwohl die Sekundärstruktur ausschließlich aus  $\alpha$ -Helices besteht.<sup>[38]</sup> Ein Protein besteht gewöhnlich aus mehreren Sekundärstrukturelementen, wodurch die resultierende Amid-I'-Bande eine komplexe Überlagerung einzelner Amid-I'-Schwingungen darstellt. Methoden zur Verbesserung der Auflösung der Amid-I'-Bande in ihrer einzelnen Subbanden sind im Folgenden kurz erläutert.

### Mathematische Verbesserung der Bandenauflösung und Kurvenanpassung zur Quantifizierung der Sekundärstruktur

Aufgrund von systematischen Verfälschungen und durch deren natürliche Linienebreite können die Subbanden nicht aufgelöst werden, infolge dessen sie zu einer kontinuierlichen Bande überlappen. Aus diesen Gründen werden mathematische Verfahren angewandt, um die Positionen der einzelnen Subbanden der verschiedenen Sekundärstrukturelemente zu ermitteln. Eine Möglichkeit zur Verbesse-

rung der Auflösung der Spektren ist die FOURIER *self-deconvolution* (FOURIER-Selbstentfaltung, FSD). Sie basiert auf der Tatsache, dass das gemessene Spektrum  $A(\tilde{\nu})$  eine Faltung aus einem Spektrum mit scharfen Linien  $A_\nu(\tilde{\nu})$  und einer Bandenformfunktion  $G(\tilde{\nu})$  ist. Die Bandenformfunktion  $G(\tilde{\nu})$  fasst hierbei die entstehenden Fehler durch instrumentelle Einflüsse und Datenbehandlung zusammen und ist verantwortlich für die Verbreiterung der Linien.

$$A(\tilde{\nu}) = G(\tilde{\nu}) * A_\nu(\tilde{\nu}) \quad (2.6)$$

Das Spektrum  $A(\tilde{\nu})$  ist das Resultat einer FOURIER-Transformation eines Interferogramms  $I(x)$ . Um die Auflösung der Spektren zu erhöhen, wird  $A(\tilde{\nu})$  einer inversen FOURIER-Transformation  $F^{-1}\{\}$  unterzogen und anschließend das erhaltene Interferogramm  $I(x)$  durch die FOURIER-transformierte Bandenformfunktion  $G(\tilde{\nu})$  geteilt. Als Bandenformfunktionen werden in der Regel LORENTZ- oder GAUß-Funktionen verwendet.<sup>[37,39,40]</sup>

$$I(x) = I_\nu(x) \cdot F^{-1}\{G\} \iff I_\nu(x) = I(x) \cdot \frac{1}{F^{-1}\{G(\tilde{\nu})\}} \quad (2.7)$$

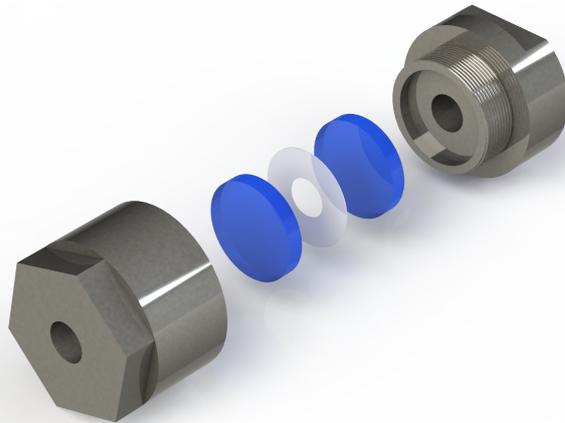
Das so optimierte Interferogramm  $I_\nu(x)$  kann dann wieder einer FOURIER-Transformation unterzogen werden, um ein bereinigtes  $A(\tilde{\nu})$  zu erhalten. Das Ergebnis der FSD ist somit ein Spektrum mit einer nachträglich verringerten Halbwertsbreite der Amid-I'-Subbanden. Jedoch ist die Anwendung einer FSD auf experimentell erhaltene Daten nur bedingt geeignet, da die Funktion für die korrekte Bandenform nur angenähert ist. Eine weitere Fehlerquelle ergibt sich aus dem spektralen Rauschen, das ebenfalls durch eine FSD verstärkt wird und zu Fehldeutungen führen kann. Um dem spektralen Rauschen entgegenzuwirken, wird während der Dekonvolution das Spektrum mit einer Glättungsfunktion multipliziert. Ein besonderer Vorteil dieser Methode ist, dass die relativen integralen Intensitäten der Subbanden nicht verändert werden und sich die FSD daher für quantitative Untersuchungen sehr gut eignet. Neben der FOURIER *self-deconvolution* können durch Bildung der zweiten

Ableitung der Spektren die Positionen von Subbanden auffindig gemacht werden. Die Bandenpositionen im Originalspektrum ergeben sich durch die Minima des zweiten Ableitungsspektrums. Im Gegensatz zur FSD sind bei der zweiten Ableitung quantitative Aussagen nur bedingt zutreffend, da die Intensitäten der Banden im zweiten abgeleiteten Spektrum stark von den Halbwertsbreiten abhängen und weniger von deren Intensitäten, wodurch schmale Banden auf Kosten von benachbarten breiten Banden verstärkt werden. So ist es möglich, dass durch die zweite Ableitung die relativen Intensitätsverhältnisse zwischen Absorptionsbanden verändert werden.<sup>[41]</sup>

Die Auffindung der Subbandenpositionen der verschiedenen Sekundärstrukturelemente erfolgt aus der Übereinstimmung der Maxima der FSD mit den Minima der zweiten Ableitung. Die übereinstimmenden Bandenpositionen liefern relativ genau die Position der Maxima der Subbanden für den Anpassungsvorgang. Zur Bestimmung der relativen Flächenanteile der einzelnen Subbanden der Amid-I'-Bande wird diese mit einer Summe der Subbanden angepasst, wobei deren Intensitäten variiert werden. Hierbei sollten die ermittelten Subbandenpositionen während des Anpassungsvorgangs nicht mehr als  $2\text{ cm}^{-1}$  von der ursprünglichen Startposition abweichen.

### 2.2.2 Experimentelles

Die temperatur- und druckabhängigen Transmissions-FTIR-Messungen wurden mithilfe eines Nicolet 6700-FTIR-Spektrometers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), das über einen stickstoffgekühlten MCT-Detektor (Quecksilber-Cadmium-Tellur) verfügt, durchgeführt. Für die temperaturabhängigen Messungen wurde die zu untersuchende Probelösung (Probenvolumen  $\sim 20 \mu\text{L}$ ) zwischen zwei runden Calciumfluoridfenstern (Durchmesser 25 mm, Dicke 4 mm, Sigma-Aldrich) pipettiert, welche durch eine 50  $\mu\text{m}$ -dicke Abstandsfolie aus Mylar separiert wurden. Die beiden Calciumfluoridfenster mit der eingeschlossenen Probelösung wurden in eine wasserflussthermostatisierte Stahlhalterung mit interner Temperaturkontrolle eingebaut. Diese temperierbare Messzelle ist in Abbildung 2.2 zu sehen.

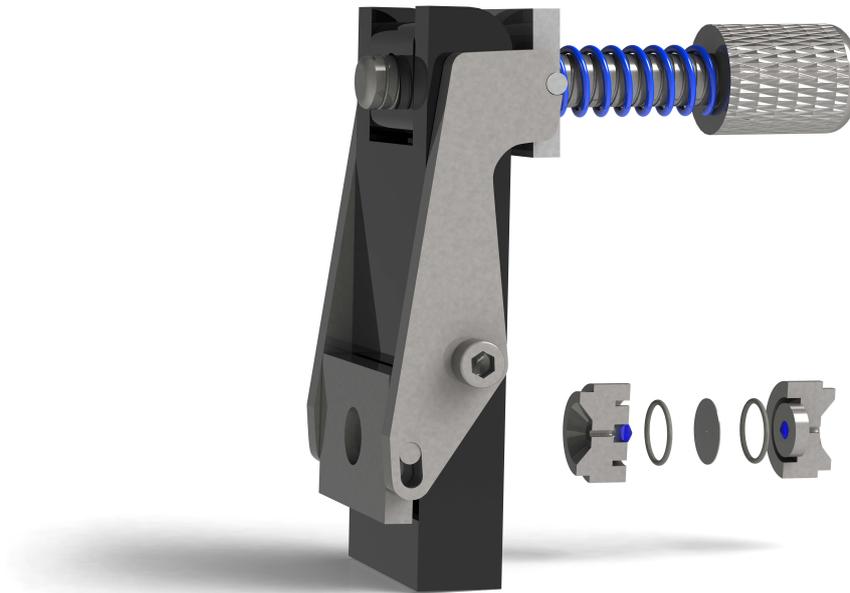


**Abbildung 2.2:** Schematische Darstellung der temperierbaren Messzelle für die FTIR-Spektroskopie. Das Probenvolumen befindet sich zwischen den zwei Calciumfluoridfenstern (blau) und wird durch einen Abstandshalter aus Mylarfolie (weiß) definiert. Erstellt mit der Software Autodesk Inventor.

Die Temperaturregulierung erfolgte über ein externes Wasserbad. Um die Wasserdampfmenge im Strahlengang gering zu halten und somit Signalrauschen entgegenzuwirken, wurde kontinuierlich mit trockener Luft gespült (Adsorptionstrockner Typ

15, Zander, Essen, Deutschland).

Die druckabhängigen Messungen erfolgten mittels einer Diamantstempelzelle (P-Series, High Pressure Diamond Optics, Tucson, USA) mit Typ IIa-Diamanten mit einem Oberflächendurchmesser von 0.6 mm (Abbildung 2.3).



**Abbildung 2.3:** Diamantstempelzelle für die Hochdruck-FTIR-Spektroskopie. Das Probenvolumen wird durch ein Metall-Gasket zwischen den beiden Diamanten definiert. Erstellt mit der Software Autodesk Inventor.

Als Abstandshalter zwischen den beiden Diamanten diente rostfreier Stahl mit einer Stärke von 50  $\mu\text{m}$ , wobei die Stärke je nach Dichte der Probe variiert werden kann. Eine zentrale Bohrung mit einem Durchmesser von 0.45 mm definiert das Probenvolumen, das bei etwa 10 nL liegt. Das pipettierte Probenvolumen beträgt zwischen 3–4  $\mu\text{L}$ . Als Druckindikator wurde Bariumsulfat ( $\text{BaSO}_4$ ) verwendet, welches eine charakteristische drucksensitive Schwingung der Sulfatgruppe bei ca.  $983\text{ cm}^{-1}$  aufweist.<sup>[42]</sup> Mit steigendem Druck verschiebt sich die Bandenlage zu höheren Wellenzahlen, wobei die Druckgenauigkeit bei ca.  $\pm 200\text{ bar}$  liegt. Die  $\text{BaSO}_4$ -Bande ist ebenfalls

temperaturabhängig und zeigt bei einer Temperaturerhöhung eine Verschiebung der Bandenlage zu größeren Wellenzahlen.

Die ATR-FTIR-Messungen wurden ebenfalls an einem Nicolet 6700 FTIR-Spektrometer durchgeführt. Es wurde eine temperierbare ATR-Durchflusszelle aus Stahl von der Firma Piketech verwendet, die durch einen Flüssigkeitskreislauf mit Hilfe eines Thermostaten temperiert wurde. Als Reflexionselement wurde ein Si-Kristall mit den Maßen  $8.0 \times 1.0 \times 0.4 \text{ cm}^3$  von der Firma Resultec (Illerkirchberg, Deutschland) verwendet. Dieser hat eine trapezförmige Form mit  $45^\circ$ -Schrägwinkeln an jedem Ende. Vor jeder Messreihe wurde die Messzelle zunächst mit einer Spülmittellösung gereinigt, anschließend exzessiv mit entionisiertem Wasser gespült und mit Druckluft getrocknet. Mittels zweier Dichtungsringe aus Viton<sup>®</sup> wurde der ATR-Kristall in die ATR-Messzelle eingebaut.

Für alle Messungen wurde eine spektrale Auflösung von  $2 \text{ cm}^{-1}$ , was einem Datenpunktabstand von  $0.964 \text{ cm}^{-1}$  entspricht, verwendet. Es wurde kein sogenanntes Zero-Filling verwendet. Die Apodisierung erfolgte mittels einer Happ-Genzel-Funktion. Vor jeder Messreihe wurde das Spektrometer mittels der Software OMNIC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) intern kalibriert. Während der Kalibrierung wurde durch Anpassung der Blendenöffnung sichergestellt, dass die maximal zulässige Intensität nicht überschritten wird. Die gewonnenen Daten wurden mit der Software GRAMS/AI 8 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) prozessiert. Hierfür wurde zunächst das jeweilige Pufferspektrum von dem Probenspektrum abgezogen und der für die Auswertung relevante Bereich des Spektrums freigestellt. Für die Amid-I'-Bande liegt dieser bei  $1600\text{--}1700 \text{ cm}^{-1}$ . Für die Vergleichbarkeit der Spektren wurde eine Basislinienkorrektur durchgeführt und die Amid-I'-Banden-Fläche auf eins normiert.

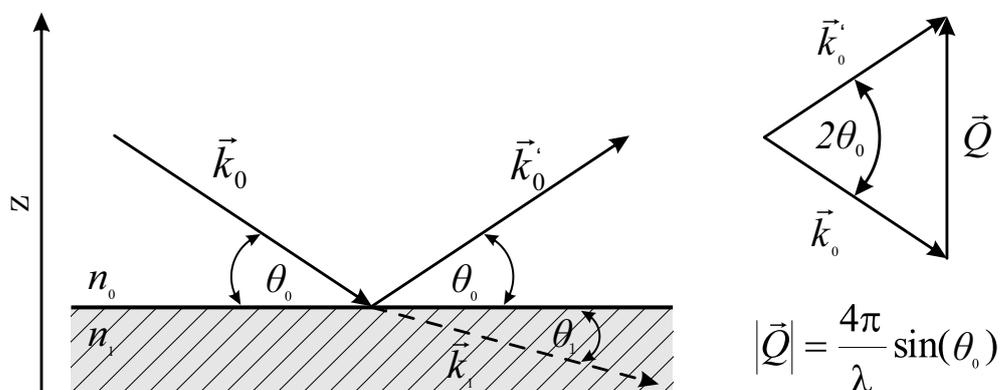
Für die anschließende Sekundärstrukturanalyse wurden zunächst die Maxima der Subbanden ermittelt. Hierzu wurde eine FSD auf die Spektren angewandt. Die verwendeten Parameter liegen im Bereich eines  $\gamma$ -Faktors von 13 bei 70 % Glättung. Außerdem wurde über eine Funktion sechsten Grades mit im Schnitt 21 Datenpunkten die zweite Ableitung der Spektren gebildet. Die Position der Bandenmaxima der

Subbanden ergibt sich aus den übereinstimmenden Wellenzahlen der Minima der zweiten Ableitung und der Maxima der FSD-behandelten Spektren. Anschließend wurden die Startparameter Anzahl, Position und Halbwertsbreite der Subbanden festgelegt. Die Bandenanpassung erfolgte mit gemischten Gauß-Lorentz-Funktionen, die an die Amid-I'-Bande angepasst wurden. Die Subbanden durften ausschließlich positive Werte annehmen. Außerdem wurde die Variation einer Subbandenposition auf  $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$  beschränkt. Die Fläche jeder Subbande entspricht dem prozentualen Anteil an der Gesamtsekundärstruktur des Proteins.

## 2.3 Neutronen- und Röntgenreflektometrie<sup>[32]</sup>

### 2.3.1 Grundlagen

Röntgen- und Neutronenreflektometrie sind leistungsstarke Werkzeuge für Untersuchungen an Oberflächen- und Grenzflächenstrukturen und basieren auf der Reflexion von Röntgen- oder Neutronenstrahlung an einer planaren Oberfläche. Sie erlauben es, das Elektronendichteprofil einer Probe senkrecht zur Grenzfläche mit Å-Auflösung zu messen. Ausführliche Erläuterungen zu den Grundlagen und Anwendungen der Neutronen- und Röntgenreflektometrie sind in den Referenzen beschrieben.<sup>[43,44]</sup>



**Abbildung 2.4:** Streugeometrie bei Reflektivitätsmessungen. Der Streuvektor  $\vec{Q}$  ist die Differenz vom einfallenden Wellenvektor  $\vec{k}_0$  und reflektiertem Wellenvektor  $\vec{k}_0'$  mit dem Betrag  $2\pi/\lambda$ .<sup>[32]</sup>

Die Neutronen und Röntgenreflektometrie sind in ihrem experimentellen Aufbau wie in der Theorie sehr ähnlich. In Reflektivitätsexperimenten wird die Reflektivität  $R$  als Funktion des Einfallswinkels  $\theta_0$  der Röntgenstrahlung gemessen (Abbildung 2.4). Die Reflektivität  $R$  ist definiert durch den Quotienten der reflektierten Intensität  $I$  und der eingestrahlten Intensität  $I_0$ . Typischerweise wird die Reflektivität  $R$  als Funktion des Wellenvektorübertrags  $Q$  aufgetragen.  $Q$  ist auf die Wellenlänge  $\lambda$  normiert und ermöglicht daher eine Vergleichbarkeit der Reflektivitätskurven. Die aus der Auftragung gewonnene Reflektivitätskurve wird durch Anpassung einer berechneten Kurve analysiert. Da bei der Neutronen- und Röntgenreflektometrie kleine Einfallswinkel  $\theta_0$  relativ zur Grenzfläche vermessen werden, können strukturelle Details einer Schicht

vernachlässigt und die Schicht einfach durch einen Brechungsindex dargestellt werden. Dieser ergibt sich durch die Streulängendichte  $\rho_n$  für Neutronenreflektometrie oder die Elektronendichte  $\rho_e$  für Röntgenreflektometrie. Der Brechungsindex  $n$  der zu untersuchenden Schichten wird durch Gleichung 2.8 für Neutronenreflektivität und Gleichung 2.9 für Röntgenreflektivität beschrieben.

$$n = 1 - \frac{\lambda^2}{2\pi}\rho_n + i\frac{\lambda}{4\pi}\mu_{\text{Neutronen}} \quad (2.8)$$

$$n = 1 - \frac{\lambda^2}{2\pi}\rho_e r_e + i\frac{\lambda}{4\pi}\mu_{\text{Röntgen}} \quad (2.9)$$

Hierbei ist  $\lambda$  die Wellenlänge der einfallenden Strahlung,  $r_e = 2.818 \times 10^{-15}$  m ist der klassische Elektronenradius und  $\mu_{\text{Neutronen}}$  und  $\mu_{\text{Röntgen}}$  sind die linearen Absorptionskoeffizienten für Neutronen und Röntgenstrahlen.  $\mu_{\text{Neutronen}}$  ist sehr klein und kann für die meisten Isotope vernachlässigt werden. Aus den Gleichungen 2.8 und 2.9 ist zu erkennen, dass der Realteil  $n$  kleiner als 1 ist, wonach es bei einem genügend kleinem Einfallswinkel extern an einer Luft-Probe-Grenzfläche zu einer Totalreflexion kommen kann. Hierfür muss der Einfallswinkel kleiner als der kritische Winkel  $\theta_c$  sein, der in Luft ( $n_0 = 1$ ) durch  $\cos \theta_c = n_1$  gegeben ist. Für die einfallende und gebrochene Strahlung gilt das SNELLIUS'sche Brechungsgesetz, wobei nicht zwischen Röntgen- und Neutronenstrahlung unterschieden wird:

$$n_i \cos \theta_i = n_{i+1} \cos \theta_{i+1} \quad (2.10)$$

Unterhalb des kritischen Winkels  $\theta_c$  kommt es zu einer Totalreflexion. Oberhalb des kritischen Winkels wird der Strahl teilweise in das untere Medium gebrochen und teilweise reflektiert. Der sogenannte Reflexionskoeffizient  $r$  der Grenzfläche wird als Amplitudenverhältnis von reflektierter und einfallender Welle beschrieben:

$$r_{i,i+1} = \frac{Q_i - Q_{i+1}}{Q_i + Q_{i+1}} \exp\left(-\frac{1}{2}Q_i Q_{i+1} \sigma_{i,i+1}^2\right) \quad (2.11)$$

Die Exponentialfunktion dient hierbei dazu die Rauigkeit  $\sigma_{i,i+1}$  zwischen den benachbarten Schichten  $i$  und  $i + 1$  zu beschreiben. Die  $z$ -Komponenten der Wellenvektoren stehen senkrecht zur Grenzfläche. Der Betrag der Wellenvektordifferenz beträgt:

$$Q_i = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta_i \quad (2.12)$$

$Q_i$  wird aus  $Q_0$  und der Elektronendichte  $\rho_{e,i}$  berechnet:

$$Q_i = \sqrt{Q_0^2 - 16\pi r_e \rho_{e,i}} \quad (2.13)$$

Die Reflektivität  $R$  ergibt sich als Betragsquadrat des Reflexionskoeffizienten  $r$ :

$$R = |r_{01}|^2 \quad (2.14)$$

Zur Auswertung einer gemessenen Reflektivitätskurve  $R(Q)$  wird die berechnete Reflektivität durch Variation der Strukturparameter an die gemessenen Reflektivitätsdaten angepasst. Wird die Oberfläche z.B. eines Silizium-Wafers mit einem Film beschichtet, wird der Röntgen- bzw. Neutronenstrahl an der Ober- und Unterseite des Films reflektiert. Es ergeben sich folglich zwei Reflexionskoeffizienten  $r_{01}$  (Silizium/Film) und  $r_{12}$  (Film/Lösungsmittel). Verlässt der Strahl den Film, kommt es zur Interferenz beider reflektierten Strahlen. Ausgedrückt wird dies mit einem Gesamtreflexionskoeffizienten  $r'_{01}$ :

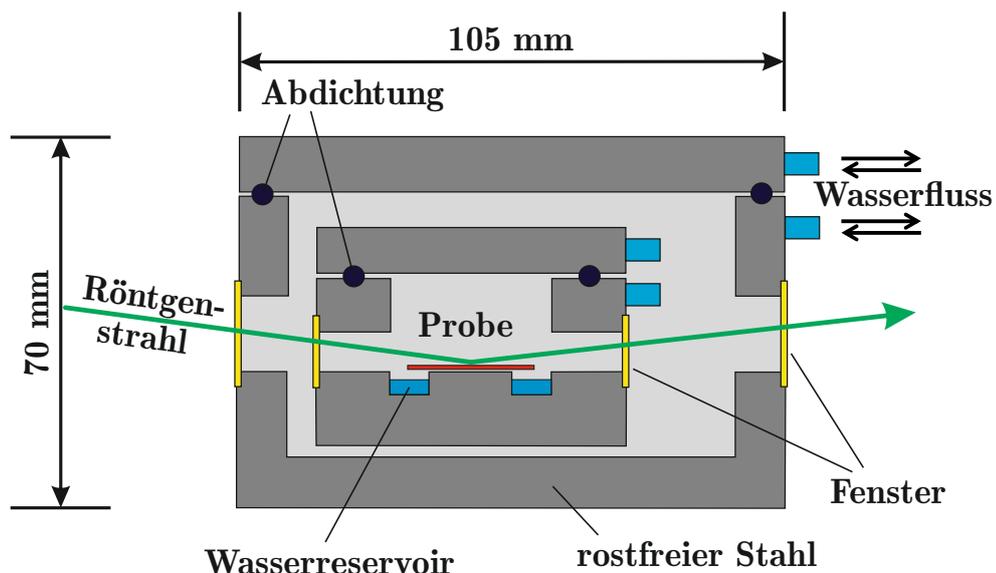
$$r'_{01} = \frac{r_{01} + r_{12} \exp(iQ_1 d_1)}{1 + r_{01} r_{12} \exp(iQ_1 d_1)} \quad (2.15)$$

$Q_1$  ist der Streuvektorbetrag im Film und  $d_1$  ist die Filmdicke. Analog zu Gleichung 2.14 lässt sich die Reflektivität aus  $r'_{01}$  berechnen. Für die Anpassung der berechneten Reflektivitätskurve in einem Mehrschichten-System kann nach L. G. Parratt die Gleichung 2.15 als Rekursionsformel verwendet werden. Zunächst wird der Gesamreflexionskoeffizient der beiden untersten Grenzflächen berechnet. Anschließend wird aus diesem und dem der darüber liegenden Grenzfläche der Gesamreflexionskoeffizient berechnet. Der Vorgang wird solange wiederholt, bis die oberste Grenzschicht erreicht ist. Anschließend wird der resultierende Reflexionskoeffizient aller Grenzschichten, gemäß der Gleichung 2.14, in die Reflektivität  $R$  umgerechnet.

## 2.3.2 Experimentelles

### 2.3.2.1 Röntgenreflektometrie

Zur Bestimmung der Schichtdicke der beschichteten Si-Wafer wurden diese in eine selbstgebaute Hydratationskammer gelegt, die von Prof. Dr. Claus Czeslik konstruiert wurde (Abbildung 2.5). Der Boden der Hydratationskammer wurde mit entionisiertem Wasser beschichtet, und die Kammer wurde luftdicht verschlossen, sodass die relative Luftfeuchtigkeit in der Kammer konstant nahezu 100 % betrug. Alle Messungen



**Abbildung 2.5:** Hydratationskammer, bestehend aus zwei temperierbaren Ummantelungen, wie sie für die Röntgenreflektivitätsmessungen verwendet wurde.

wurden bei 25 °C durchgeführt. Die Messungen erfolgten an einem Seifert XRD 3000 TT-Reflektometer von GE Inspection Technologies (Ahrensburg, Deutschland), das mit einer Molybdän-Anode ausgestattet ist und Röntgenstrahlung mit einer Wellenlänge von 0.71 Å (Mo-K $\alpha$ ) generiert. Vor jeder Messung wurde die Probe etwa für 10 min in dieser Kammer äquilibriert, um eine vollständige Hydratation zu gewährleisten. Die Rohdaten wurden in Reflektivitätskurven umgerechnet, indem die reflektierte Intensität auf die jeweilige eingestrahlte Intensität normiert wurde. Bei kleinen Einfallswinkeln übersteigt die beleuchtete Fläche des Röntgenstrahls die der Probe, sodass eine Korrektur bei kleinen Winkeln vorgenommen wurde. Die Reflektivität  $R$  wurde als Funktion des Wellenvektorübertrags  $Q$  aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mittels der Software Motofit,<sup>[45]</sup> in dem die Reflektivitätskurven durch Variation des Schichtdicke  $d$ , Rauigkeit  $\sigma$  und Streulängendichte  $\rho_e r_e$  angepasst wurden.

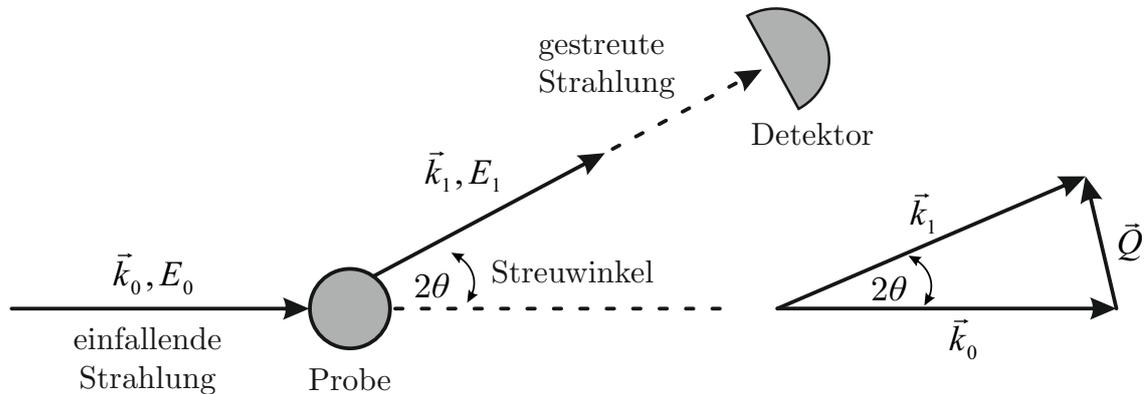
### 2.3.2.2 Neutronenreflektometrie

Die Neutronenreflektivitätsmessungen wurden am Helmholtz-Zentrum Berlin an dem Instrument V6 durchgeführt. Die Probenzelle besteht aus einem mit der Probe beschichteten Si-Block, der von einem mit D<sub>2</sub>O gefüllten Teflon-Trog bedeckt ist. Die Neutronenwellenlänge, die durch einen Graphitmonochromator selektiert wird, betrug 4.66 Å. Neutronenreflexionen wurde in  $\theta$ -2 $\theta$ -Geometrie unter Verwendung eines <sup>3</sup>He-Detektors aufgezeichnet. Alle Messungen wurden bei 23 °C durchgeführt. Der  $\theta$ -Bereich lag bei 0° bis 3.0°. Die Neutronenreflektivität  $R$  wurde als Funktion des Wellenvektorübertrags  $Q$  aufgetragen und mit Hilfe der Software Motofit<sup>[45]</sup> ausgewertet.

## 2.4 Röntgen-Kleinwinkelstreuung (SAXS)<sup>[32]</sup>

### 2.4.1 Grundlagen

Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS) ist eine physikalische Methode, um die strukturellen Eigenschaften wie Form, Größe und räumlicher Aufbau, von Objekten im Nanometer-Bereich zu untersuchen. Ein typischer Streuprozess ist in Abbildung 2.6 dargestellt.



**Abbildung 2.6:** Schematische Darstellung des Streuprozesses. Die einfallende Strahlung wird unter den Winkel  $2\theta$  gestreut. Die Änderung der Strahlrichtung wird mit dem Streuvektor  $\vec{Q}$  angegeben.<sup>[32]</sup>

Der als ebene Welle einfallende monochromatische Röntgenstrahl  $\vec{k}_0$  mit der Energie  $E_0$  trifft auf die Probe und die gestreute Strahlung breitet sich als Kugelwelle aus. Der Betrag des Wellenvektors  $\vec{k}_0$  wird definiert als:

$$|\vec{k}_0| = \frac{2\pi}{\lambda_0} \quad (2.16)$$

Für die Energie  $E_0$  ergibt sich

$$E_0 = \frac{hc}{\lambda_0} \quad (2.17)$$

$c$  ist die Lichtgeschwindigkeit und  $h$  das PLANCK'sche Wirkungsquantum. Die Intensität der gestreuten Strahlung mit dem Wellenvektor  $\vec{k}_1$  und der Energie  $E_1$

wird unter dem Streuwinkel  $2\theta$  im Raumwinkelement  $\Delta\Omega$  detektiert. Für den Wellenvektorübertrag  $\vec{Q}$  gilt somit:

$$\vec{Q} = \vec{k}_1 - \vec{k}_0 \quad (2.18)$$

Unter der Annahme, dass es sich um einen elastischen Streuprozess mit  $\Delta E = 0$ ,  $|\vec{k}_0| = |\vec{k}_1|$  und  $\lambda_0 = \lambda_1 = \lambda$  handelt, ergibt sich für den Betrag des Wellenvektorübertrags:

$$Q = |\vec{Q}| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta \quad (2.19)$$

In verdünnten Lösungen ist der Abstand zwischen den Teilchen so groß, dass keine Interferenzen von Streuwellen, die von verschiedenen Objekten ausgehen, vorhanden sind. Die Streuintensität ist hierbei die Summe der Streuintensitäten der einzelnen Teilchen. Die Orientierung aller Teilchen unterscheidet sich jedoch aufgrund der BROWN'schen Molekularbewegung, sodass für die Berechnung der Streuintensität über alle Orientierungen gemittelt werden muss. Die resultierende Partikelkurve ist wie folgt gegeben:

$$I(Q) = N_p \left\langle \left| \int \rho_e(\vec{r}) e^{i\vec{Q}\vec{r}} d\vec{r} \right|^2 \right\rangle \quad (2.20)$$

$N_p$  ist die Zahl der Teilchen, die am Streusignal beteiligt sind,  $\langle \dots \rangle$  die Mittelung über alle Orientierung eines Teilchens,  $|\dots|^2$  das Betragsquadrat der Streuwelle und  $\rho_e(\vec{r})$  die Elektronendichte des Teilchens am Ort  $\vec{r}$ . Eine atomare Auflösung ist mittels der Kleinwinkelstreuung nicht möglich, sodass die Elektronendichte des Teilchens  $\rho_e(\vec{r})$  durch einen konstantem Wert  $\rho_{e,p}$  ersetzt werden kann. Die Elektronendichte  $\rho_{e,s}$  des umgebenden Lösungsmittels muss jedoch unterschiedlich zu  $\rho_{e,p}$  sein. Wären  $\rho_{e,p}$  und  $\rho_{e,s}$  gleich groß, so würde der Röntgenstrahl beim Übergang vom Lösungsmittel in das Teilchen keine Änderung in der Elektronendichte erfahren. Die Konsequenz wäre, dass der Röntgenstrahl nicht gestreut werden würde. Beschreiben lässt sich

dieser Umstand durch:

$$I(Q) = N_p(\rho_{e,p} - \rho_{e,s})^2 \left\langle \left| \int e^{i\vec{Q}\vec{r}} d\vec{r} \right|^2 \right\rangle \quad (2.21)$$

Wie man erkennen kann, wird die Streuintensität  $I(Q)$  mit steigender Differenz  $\rho_{e,p} - \rho_{e,s}$  größer. Es kommt also auf den Unterschied in den Elektronendichten von Lösungsmittel und Teilchen an. Der Kontrastfaktor  $K$  wird hierbei wie folgt definiert:

$$K = V_p(\rho_{e,p} - \rho_{e,s}) \quad (2.22)$$

$V_p$  ist das Volumen eines Teilchens. Für den Formfaktor  $F(\vec{Q})$ , der lediglich von der äußeren Teilchengestalt abhängt, gilt:

$$F(\vec{Q}) = \frac{1}{V_p} \int e^{i\vec{Q}\vec{r}} d\vec{r} \quad (2.23)$$

Durch Einsetzen von Gleichung 2.22 und Gleichung 2.23 in Gleichung 2.21 folgt:

$$I(Q) = N_p K^2 \left\langle \left| F(\vec{Q}) \right|^2 \right\rangle \quad (2.24)$$

Bei höheren Konzentrationen treten Wechselwirkungen zwischen den Teilchen auf, die durch den interpartikulären Strukturfaktor  $S(Q)$  berücksichtigt werden:

$$I(Q) = N_p K^2 \left\langle \left| F(\vec{Q}) \right|^2 \right\rangle S(Q) \quad (2.25)$$

$S(Q)$  hängt von dem Abstand  $r_{nm}$  der streuenden Teilchen  $m$  und  $n$  zueinander ab und wird berechnet gemäß:

$$S(Q) = \frac{1}{N_p} \left\langle \sum_n \sum_m e^{i\vec{Q}(\vec{r}_m - \vec{r}_n)} \right\rangle \quad (2.26)$$

Wesentliche Informationen über Form und Größe eines Teilchens lassen sich aus dem mittleren  $Q$ -Bereich einer Kleinwinkelstreu Kurve gewinnen. Aus der FOURIER-Transformation der gemessenen Streuintensität  $I(Q)$  ergibt sich die Abstandsverteilungsfunktion  $p(r)$ :

$$p(r) = \frac{r^2}{(2\pi)^3} \cdot \int_0^\infty I(Q) \frac{\sin(Qr)}{Qr} 4\pi Q^2 dQ \quad (2.27)$$

Sie gibt die Häufigkeit an, wie oft Abstände im Molekül zwischen  $r$  und  $r+dr$  zu finden sind. Hierfür muss die Inhomogenität im Teilchen klein sein. Die Auftragung von  $p(r)$  als Funktion von  $r$  liefert am Schnittpunkt mit der  $r$ -Achse den maximalen Durchmesser  $D_{\max}$  der streuenden Teilchen. Mittels der Abstandsverteilungsfunktion lässt sich der Streumassenradius  $R_G$  berechnen.

$$R_G^2 = \frac{\int_0^\infty r^2 p(r) dr}{2 \int_0^\infty p(r) dr} \quad (2.28)$$

Verschiedene geometrische Körper weisen charakteristische Abstandsverteilungsfunktionen auf, sodass aus dem Verlauf des Graphen Rückschlüsse auf die Form der Teilchen geschlossen werden können.

## 2.4.2 Experimentelles

### 2.4.2.1 Messungen am SAXSess mc<sup>2</sup> - Diffraktometer

Die Kleinwinkelstreuexperimente wurden an dem Instrument SAXSess mc<sup>2</sup> der Firma Anton Paar (Graz, Österreich) durchgeführt, das mit einer Kupfer-Anode betrieben wird und eine Röntgenstrahlung mit einer Wellenlänge von 1.54 Å (Cu-K<sub>α</sub>) selektiert. Die Proben wurden mit Linienkollimation (20 nm Strahlbreite) in einer 20 mm Quarzkapillare, die in einen temperierbaren Probenhalter (TCS, Anton Paar) eingeführt wird, vermessen. Zur Detektion der Streustrahlung diente eine Röntgenstrahlempfindliche Bildplatte. Ausgelesen wurde die Bildplatte mithilfe des Bildplattenlesegeräts Cyclone Plus von der Firma PerkinElmer. Die zweidimensionalen Streubilder wurden mittels der Software SAXSquant 2D von Anton Paar in ein-dimensionale Streukurven konvertiert, auf die Primärstrahlintensität normiert und um den entsprechenden Lösungsmittel-Streubeitrag korrigiert. Mithilfe der Software GIFT, welche ein Bestandteil des Softwarepakets PCG (Universität Graz, Anton Paar, Österreich) ist, wurden die Daten mit dem gemessenen Strahlprofil entschmiert, sowie die Abstandsverteilungsfunktion  $p(r)$  und der Gyrationradius  $R_G$  ermittelt.

### 2.4.2.2 Messungen am DELTA-Synchrotron

Die SAXS-Messungen am Synchrotron DELTA (Dortmunder Elektronenspeicherring-Anlage, Dortmund, Deutschland) wurden an der Beamline BL9 durchgeführt. Die verwendete Wellenlänge  $\lambda$  betrug 1.24 Å und die Belichtungszeit für jede Messung 15 min. Die Prozessierung der zwei-dimensionalen Streubilder in ein-dimensionale Streukurven erfolgte mittels der Software Fit2D.<sup>[46]</sup> Die verwendete Hochdruckzelle wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Tolan (Lehrstuhl für Experimentelle Physik I, Technische Universität Dortmund) von Dr. Christina Krywka konstruiert. Der Zellkörper mit den Maßen  $9 \times 9 \times 8$  cm<sup>3</sup> basiert auf rostfreiem Stahl mit einer Ni-Cr-Legierung (INCONEL 718). Mit der Zelle sind Drücke bis zu 7 kbar zu realisieren. Der Probenträger besteht ebenfalls aus rostfreiem Edelstahl mit einem Probenvolumen von etwa 55  $\mu$ L.<sup>[47]</sup> Der Druckaufbau erfolgte mit einer Handspindelpresse (NovaSwiss, Effretikon, Schweiz).

## 2.5 Elastische Inkohärente Neutronenstreuung (EINS)

### 2.5.1 Grundlagen

Die inkohärente Neutronenstreuung ist eine Methode, die sich besonders gut für Untersuchungen von Konformationsfluktuationen von Makromolekülen eignet. In biologischen Systemen wird die inkohärente Streuung vor allem durch das Signal der Wasserstoffatome dominiert, weil ihr inkohärenter Streuquerschnitt deutlich größer ist als der anderen Elemente in der Probe. Ebenso ist der inkohärente Streuquerschnitt von Wasserstoff um eine Größenordnung größer als der von Deuterium, wodurch bei Verwendung von D<sub>2</sub>O als Lösungsmittel das erhaltene Signal hauptsächlich den Wasserstoffatomen des Makromoleküls zugeschrieben werden kann. Die Wasserstoffatome spiegeln in der Zeitskala der Neutronenexperimente die Bewegung der chemischen Gruppen, an die sie gebunden sind, wider. Aufgrund der relativ homogenen Verteilung der Wasserstoffatome in einem Protein ist ein Rückschluss auf die mittlere interne makromolekulare Bewegung möglich. Aus der elastischen inkohärenten Neutronenstreuung lässt sich die mittlere quadratische Verschiebung (*mean squared displacement*, MSD) als Funktion der Temperatur oder des Drucks gewinnen. Die MSD beschreibt hierbei die Flexibilität der Proteinstruktur im Å<sup>2</sup>-Bereich. Eine detaillierte Beschreibung der Methode ist in der Referenz zu finden.<sup>[48]</sup>

### 2.5.2 Experimentelles

Die EINS-Experimente wurden am Institut Laue-Langevin (ILL, Grenoble, Frankreich) am Instrument IN13 durchgeführt. Dieses thermische Rückstreuenspektrometer hat eine Energieauflösung von 8 µeV und deckt den  $Q$ -Bereich von 0.2–4.9 Å<sup>-1</sup> ab. Die für die elastische Streuung verwendete Wellenlänge beträgt 2.23 Å. Die detektierbare Zeitskala liegt bei bis zu 0.1 ns, sodass vor allem interne, nicht-globale Bewegungen abgedeckt werden.

Die verwendete Hochdruck-Zelle wurde vom ILL entwickelt. Die Hochdruck-Probenzelle hat eine zylindrische Geometrie und besteht aus einer Aluminiumlegierung mit hoher

Zugfestigkeit (7075-T6). Um das Probenvolumen auf etwa 1.5 mL zu reduzieren, wird ein kleiner Aluminiumzylinder in die Zelle eingeführt. Fluoriniert wird als Druckübertragungsmedium verwendet, das durch einen beweglichen Kolben von der Probe separiert wird. Nähere Angaben sind in der Referenz<sup>[49]</sup> zu finden. Um ein ausreichendes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten, wurde jeder Druckpunkt für mindestens 7 h gemessen. Um die von der Probe gestreute Intensität zu erhalten, wurde auch die Streuintensität von der leeren Zelle und vom Puffer beim jeweiligen Druck aufgenommen und unter Berücksichtigung der Volumenanteile des Proteins in Lösung subtrahiert, gefolgt von einer Normierung auf den ausschließlich inkohärent streuenden Standard Vanadium. Die Berechnung der mittleren quadratischen Verschiebung  $\langle u^2 \rangle$  (*mean squared displacement, MSD*) erfolgte auf der Grundlage der GAUß-Näherung (Gleichung 2.29). Die Auswertung erfolgte mit der Software LAMP.<sup>[50]</sup>

$$\langle u^2 \rangle = \frac{-3 \cdot \text{dln}I(Q)}{\text{d}Q^2} \quad (2.29)$$

## 2.6 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

### 2.6.1 Grundlagen

Die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) ist eine vielseitige Methode, um physikalische Grundlagen der molekularen Wechselwirkungen z.B. zwischen Proteinen, Lipiden und DNA sowie die Interaktionen von Makromolekülen mit festen Oberflächen zu untersuchen.<sup>[51–54]</sup> Wie z.B. bei der DSC lassen sich mit einem einzigen Experiment mehrere thermodynamische Daten gewinnen. Es ist unter anderem möglich, die Bindungsstöchiometrie, die Änderungen der Entropie und Enthalpie zu ermitteln. Die Grundlagen der isothermen Titrationskalorimetrie werden ausführlich in der Literatur beschrieben.<sup>[55–58]</sup>

Die ITC beruht auf der Voraussetzung, dass es bei einer Wechselwirkung zu einer Enthalpieänderung kommt. Hierbei wird je nach Reaktion Wärme aus der Umgebung

aufgenommen (endotherm) oder an die Umgebung abgegeben (exotherm). Die Gibbs-Helmholtz-Gleichung (Gleichung 2.30) liefert die physikalisch-chemische Grundlage für ITC-Messungen und deren Auswertung.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2.30)$$

Die freie Enthalpieänderung ist weiterhin über die Assoziationskonstante mit der Komplexbildungsreaktion verknüpft.

$$\Delta G^\circ = -RT\ln K_{\text{ass}} \quad (2.31)$$

Die Änderung der freien Enthalpie korreliert direkt mit der Assoziationskonstante, da die Gaskonstante  $R$  sowie  $T$  als absolute Temperatur in dieser Beziehung konstant sind. So lassen sich mit nur einem ITC-Experiment die Enthalpieänderung  $\Delta H$  und die Assoziationskonstante  $K_{\text{ass}}$  bestimmen. Die Entropieänderung  $\Delta S$  sowie die freie Enthalpieänderung  $\Delta G$  lassen sich entsprechend der beiden Gleichungen 2.30 und 2.31 berechnen. Durch die Zugabe eines Reaktanden in die Messzelle kommt es aufgrund von physikalischen oder chemischen Prozessen zu einem Wärmefluss. Die Temperaturdifferenz zwischen der Mess- und Referenzzelle wird hierbei konstant gehalten. Bei einer endothermen Reaktion ist die Temperatur in der Messzelle zunächst erniedrigt, und die Leistung des Heizelements der Messzelle wird erhöht, um die Temperaturdifferenz zur Referenzzelle wieder auf Null zu bringen. Liegt eine exotherme Reaktion vor, steigt die Temperatur der Messzelle, wodurch eine Erniedrigung der Heizleistung erforderlich wird. Bei der ITC ist die Messgröße demnach die erforderliche Heizleistung, um die Temperatur zwischen Referenz- und Messzelle konstant zu halten. Diese Leistungsänderung bei jeder Injektion eines definierten Lösungsvolumens entspricht dem Signal, das als Peak in einem Heizleistung-Zeit-Diagramm aufgetragen wird. Die Fläche unter jedem Peak entspricht der Wärme, die während der Assoziation nach jeder Injektion freigesetzt oder absorbiert wird. Aus der Auftragung der Peakflächen als Funktion des Molverhältnisses ergibt sich

eine charakteristische Titrationskurve.

### 2.6.2 Experimentelles

Die ITC-Experimente wurden an dem Gerät MicroCal VP-ITC (GE Healthcare Life Sciences) durchgeführt. Zum Entgasen der Proben wurde ein MicroCal ThermoVac (GE Healthcare Life Sciences) verwendet. Das Kalorimeter besteht hauptsächlich aus zwei identischen münzförmigen Zellen, einer Referenz- und einer Probenzelle, die in einem zylindrischen adiabatischen Mantel eingebettet sind und über separate Heizelemente verfügen. Die Probenzelle umfasst ein Probenvolumen von etwa 2 mL. In die Messzelle taucht eine Hochpräzisionspipette ein, die den zweiten Reaktionspartner enthält. Die ITC-Spritze kann ein Gesamtvolumen von 250  $\mu\text{L}$  aufnehmen und eine Injektion von exakt 0.1  $\mu\text{L}$  durchführen. Zusätzlich ist sie mit einem Drehmotor und einem Röhrenpaddel ausgestattet, sodass eine Durchmischung der Probe während der Messung möglich ist und die Entstehung von möglichen Konzentrationsgradienten verhindert wird. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Microcal Origin.

## 2.7 Fluoreszenzspektroskopie<sup>[32]</sup>

### 2.7.1 Grundlagen

Die Fluoreszenzspektroskopie kann verwendet werden, um die Dynamik und Struktur von Proteinen zu untersuchen. Aufgrund der hohen Sensitivität ist nur eine geringe Probenkonzentration nötig. Die Zeitauflösung reicht bis in den Nanosekundenbereich. Untersucht werden kann einerseits die eigene Fluoreszenz von biologischen Makromolekülen, die man als intrinsische Fluoreszenz bezeichnet, und andererseits die Fluoreszenz von künstlichen, fluoreszierenden Gruppen, den sogenannten extrinsischen Fluorophoren, die zu einer Probe zur Markierung des eigentlichen Zielmoleküls zugegeben werden. Zu den extrinsischen Fluorophoren zählen unter anderem Dansylchlorid und Thioflavin T. Die Einsatzmöglichkeiten von intrinsischen Fluorophoren sind im Wesentlichen auf die Fluoreszenz von aromatischen Aminosäuren wie Tryptophan und Kofaktoren wie NADH (Nicotinamidadeninucleotid), Flavinen und

Derivaten von Pyridoxal begrenzt.

Die Fluoreszenzspektroskopie basiert auf der Anregung von Fluorophoren durch UV- oder sichtbares Licht und der anschließenden Emission von elektromagnetischer Strahlung. Die mittlere Zeit, die sich ein Fluorophor im angeregten Zustand befindet, bevor er unter Aussendung eines Photons in den Grundzustand relaxiert, wird als Fluoreszenzlebensdauer bezeichnet und liegt etwa bei einigen  $10^{-9}$  s. Im Vergleich zum Prozess der Absorption, der innerhalb von etwa  $10^{-15}$  s erfolgt, ist dieser Prozess relativ lang, sodass im angeregten Zustand verschiedene Prozesse mit der Umgebung, wie Fluoreszenzlöschung oder Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), ablaufen können. Eine detaillierte Beschreibung der Methode ist in den Referenzen zu finden.<sup>[32,59,60]</sup>

### **Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)**

Die Methode des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) wird in biophysikalischen Studien zur Untersuchung von Konformationsänderungen und Protein-Protein-Interaktionen genutzt. Es ist ein photophysikalischer Prozess, bei dem ein anfänglich elektronisch angeregter Fluorophor (Donor) seine Anregungsenergie zu einem anderen Chromophor (Akzeptor) überträgt. Der Akzeptor, der sich zunächst im elektronischem Grundzustand befindet, wird beim Übertragen angeregt und kann selbst fluoreszieren. FRET beinhaltet weder Photonenübertragung, noch molekularen Kontakt zwischen den beiden Spezies, sondern hängt stark von der Distanz zwischen ihnen ab. Daher findet nur dann ein Energietransfer statt, wenn sich die beiden Fluorophore in räumlicher Nähe befinden, wobei die Anregungsenergie durch elektrische Dipol-Dipol-Kopplung vom Donor- auf das Akzeptormolekül in einem Abstand bis zu 8 nm übertragen wird. Ebenso muss das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. In dem sogenannten Jablonski-Termschema lässt sich das Prinzip veranschaulichen (Abbildung 2.7).

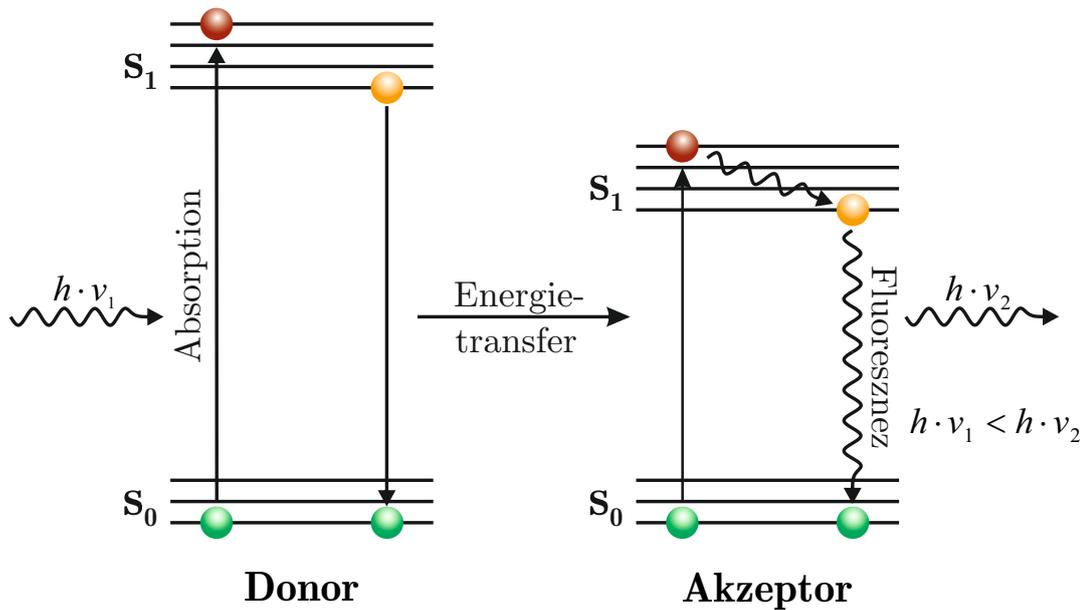


Abbildung 2.7: Jablonski-Diagramm des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET).

Wird ein Fluorophor angeregt, so besteht die Möglichkeit, die Energie als Fluoreszenz zu emittieren oder sie unter der bereits genannten Bedingung auf einen Akzeptor zu übertragen. Durch die Übertragung erfolgt eine Anregung des Akzeptors, welcher wiederum beim Rückfall in den Grundzustand Licht emittiert. Es wird also mit der Emission des Akzeptors ein Energietransfer vom Donor- zum Akzeptor-Fluorophor beobachtet. Der Energietransfer ist somit ein Konkurrenzprozess zur Fluoreszenz des Donors, dessen Energietransfereffizienz mit zunehmendem Abstand zwischen Donor und Akzeptor sinkt. Die Effizienz  $E$  lässt sich mit der Gleichung 2.32 berechnen.

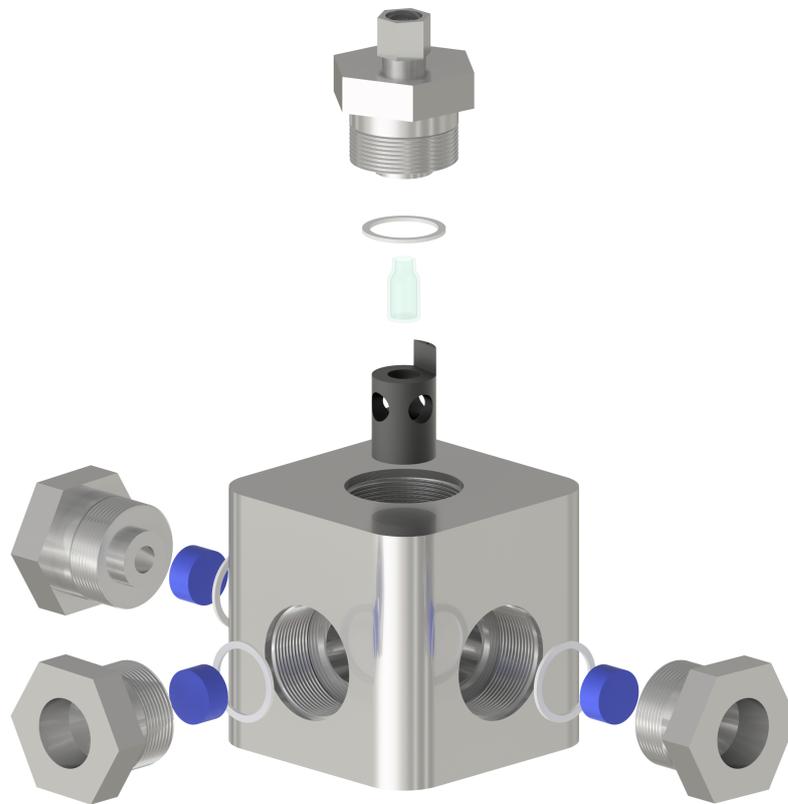
$$E = \frac{1}{1 + (R/R_0)^6} \quad (2.32)$$

$R_0$ , der sogenannte Försterabstand, beschreibt den Abstand zwischen den beiden Fluorophoren, bei dem die Energietransfereffizienz 50 % beträgt. Ist  $R_0$  bekannt, lässt sich im Umkehrschluss aus dem Verhältnis der Fluoreszenz des Donors bei An- und Abwesenheit des Akzeptors auf den mittleren Abstand  $R$  von Akzeptor und Donor schließen. Die Wahrscheinlichkeit eines Energietransfers ist jedoch auch vom Grad

der Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors sowie von der relativen Orientierung der Übergangsdipolmomente vom Donor und Akzeptor abhängig.

### 2.7.2 Experimentelles

Die druckabhängigen Fluoreszenzmessungen wurden an einem K2-Fluoreszenz-Spektrometer der Firma ISS (Champaign, Illinois, USA) im *photon-counting*-Modus durchgeführt. Die verwendete Hochdruckzelle wurde ebenfalls von der Firma ISS kommerziell erworben (Abbildung 2.8). Es wurden Saphir-Fenster verwendet, die für einen Druck bis mindestens 3000 bar ausgelegt sind. Das Temperieren der Hochdruckzelle erfolgte über einen externen Thermostaten. Die Proben wurden in ein Quarzglasfläschchen mit einer Volumenkapazität von etwa 1 mL pipettiert und zur Abgrenzung zum Druckmedium mit einer reißfesten Dura-Seal-Folie und einem Gummi-O-Ring luftblasenfrei verschlossen. Das Quarzglasfläschchen wurde in einen Halter eingelegt und in die Hochdruckzelle positioniert. Als Druckmedium wurde Wasser verwendet. Die hydrostatischen Drücke wurden mittels einer Handspindel-*press* der Firma Hip (High Pressure Equipment Company, Erie, PA, USA) realisiert und mit Hilfe einer Stahlkapillare in die Hochdruckzelle übertragen. Der übertragene Druck wurde mittels eines Drucksensors (Burster Präzisionsmesstechnik, Gernsbach, Deutschland) bestimmt und über eine digitale Anzeige ausgegeben.



**Abbildung 2.8:** Explosionsdarstellung der verwendeten Fluoreszenz-Hochdruckzelle. Erstellt mit der Software Autodesk Inventor.



---

# 3 Sekundärstruktur und Faltungstabilität von adsorbierten Proteinen\*

## 3.1 Einleitung

Proteine besitzen eine hohe Grenzflächenaktivität wodurch sie starke Wechselwirkungen mit verschiedenen Grenzflächen eingehen. Sie weisen in wässrigen Lösungen aufgrund ihrer komplexen Struktur unterschiedliche Wechselwirkungen mit Grenzflächen auf. Die bedeutsamsten sind hierbei hydrophobe, van der Waals- und elektrostatische Wechselwirkungen. Welche von diesen für die Adsorption am wichtigsten ist, hängt neben dem Protein auch von der Beschaffenheit der Grenzfläche ab. Studien mit  $\alpha$ -Chymotrypsin ( $\alpha$ -CT) und Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) zeigten, dass das enzymatische Aktivierungsvolumen stark von der Art der Materialoberfläche abhängt, die für die Immobilisierung verwendet wurde.<sup>[62]</sup> Die Adsorption kann jedoch auch aufgrund von oberflächeninduzierten Konformationsänderungen zu einem Verlust der funktionellen oder enzymatischen Eigenschaften der Proteine führen.

Aus Sicht der Thermodynamik ist die Stabilität der nativen Konformation durch die Standard-Entfaltung-Gibbsenergie  $\Delta G^\circ$  gegeben.  $\Delta G^\circ$  charakterisiert ein Zwei-

---

\*Die in diesem Kapitel vorgestellte Studie wurde in folgender Referenz publiziert:

S. Cinar, C. Czeslik, Secondary structure and folding stability of proteins adsorbed on silica particles – Pressure versus temperature denaturation, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2015**, 129, 161–168.<sup>[61]</sup>

Zustandsmodell der gefalteten Konformation, die sich im Gleichgewicht mit dem entfalteten Zustand befindet. Beschreiben lässt sie sich durch<sup>[6]</sup>

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (3.1)$$

hierbei ist  $K = c_{\text{Entfaltet}}/c_{\text{Gefaltet}}$  die Gleichgewichtskonstante. Durch Erhöhung der Temperatur entfaltet das Protein, wenn  $\Delta G^\circ$  negativ wird. Die temperaturabhängige Entfaltung lässt sich mit der Gleichung 3.2 beschreiben.<sup>[63]</sup>

$$\begin{aligned} \Delta G^\circ(T) &= \Delta G^\circ(T_{\text{Entfaltet}}) + \left( \frac{\partial \Delta G^\circ}{\partial T} \right)_p \times (T - T_{\text{Entfaltet}}) \\ &= -\Delta S(T_{\text{Entfaltet}}) \times (T - T_{\text{Entfaltet}}) \text{ mit } \Delta G^\circ(T_{\text{Entfaltet}}) = 0 \end{aligned} \quad (3.2)$$

Hier wird die zweite Ableitung von  $\Delta G^\circ(T)$ , die proportional zur Wärmekapazität ist, vernachlässigt.  $\Delta S$  ist die Entropieänderung der Entfaltung. Sie lässt sich aus  $\Delta H = T_{\text{Entfaltet}} \Delta S$  gewinnen und besitzt einen positiven Wert.  $T_{\text{Entfaltet}}$  stellt die Temperatur dar, bei der 50 % aller Proteine entfaltet vorliegen. Auf gleiche Art und Weise lässt sich die Druckabhängigkeit von  $\Delta G^\circ$  beschreiben.<sup>[63]</sup>

$$\begin{aligned} \Delta G^\circ(p) &= \Delta G^\circ(p_{\text{Entfaltet}}) + \left( \frac{\partial \Delta G^\circ}{\partial p} \right)_T \times (p - p_{\text{Entfaltet}}) \\ &= \Delta V(p_{\text{Entfaltet}}) \times (p - p_{\text{Entfaltet}}) \text{ mit } \Delta G^\circ(p_{\text{Entfaltet}}) = 0 \end{aligned} \quad (3.3)$$

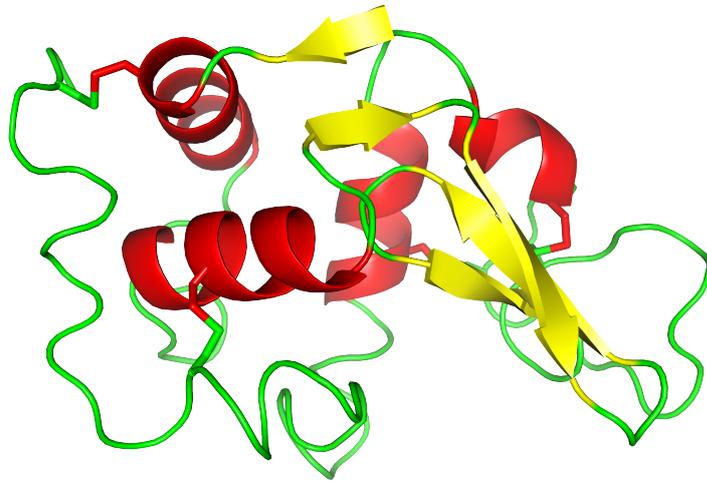
Hierbei ist  $p_{\text{Entfaltet}}$  der Entfaltungsdruck.  $\Delta V$  ist die Volumenänderung der Entfaltung. Sie nimmt in der Regel einen negativen Wert an. Es gibt mehrere Beiträge, aus denen  $\Delta V$  zusammengesetzt ist. Den größten Beitrag liefern die Kavitäten im nativen Protein, die nach der Entfaltung mit Wassermolekülen besetzt werden, wodurch das Gesamtvolumen des Systems erniedrigt wird. Weitere Beiträge für  $\Delta V$  liefern einerseits die Solvatisierung von hydrophoben Gruppen und die Elektrostriktion von geladenen und polaren Gruppen, die mit einer Volumenverkleinerung einhergeht und

daher durch Druck begünstigt wird.<sup>[64-67]</sup>

Es gibt zahlreiche Studien, die sich mit der Änderung der Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen durch Adsorption auf festen Oberflächen beschäftigen.<sup>[68-77]</sup> Das Ausmaß der Konformationsänderung und der partiellen Entfaltung ist von der Faltungsstabilität des Proteins sowie von der Stärke der Protein-Oberflächen-Wechselwirkung abhängig. Jedoch scheint es noch kein einheitliches Bild dafür zu geben, welche Sekundärstruktur an wässrig-festen Grenzflächen gebildet wird. Einige Studien deuten darauf hin, dass durch die Adsorption an eine wässrig-feste Grenzfläche der Temperaturbereich der Entfaltung verbreitert und zu niedrigeren Temperaturen verschoben wird.<sup>[62,75,78]</sup> Ebenfalls konnte durch Adsorption eine Erniedrigung und Verbreiterung des Entfaltungsdrucks beobachtet werden.<sup>[68]</sup> Daher könnte eine adsorptionsinduzierte Konformationsänderung eines Proteins einfach als Beginn der Protein-Entfaltung angesehen werden, die bereits bei Umgebungsbedingungen auftritt.

Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob die Konformation eines adsorbierten Proteins mit der Konformation eines freien Proteins unter denaturierenden Bedingungen in Zusammenhang steht. Hierzu wurden systematisch zwei Proteine untersucht, die sich einerseits frei in Lösung befinden und andererseits auf Silica-Partikel adsorbiert sind. Hierbei wurden ihre Sekundärstrukturen im Verlauf der Entfaltung unter hohem Druck und hoher Temperatur untersucht.

Als erstes Modellprotein wurde Lysozym verwendet. Lysozym ist ein in Pflanzen und Tieren weit verbreitetes Enzym und kommt beim Menschen überwiegend in den Sekreten der Nasenschleimhaut und der Tränenflüssigkeit vor.<sup>[79]</sup> Es trägt vor allem zum Schutz vor bakteriellen Infektionen bei, wodurch es als natürliches Antibiotikum dient. Die antibakterielle Wirkung basiert auf der Fähigkeit von Lysozym, durch Katalyse der hydrolytischen Spaltung der 1,4-glykosidischen Bindung zwischen *N*-Acetylglucosamin und *N*-Acetylmuraminsäure bakterielle Zellwände zu lysieren.<sup>[80]</sup> Lysozym aus Hühnereiweiß, dessen erste Kristallstruktur 1965 von David Phillips gelöst wurde, ist das am gründlichsten untersuchte Lysozym (Abbildung 3.1).<sup>[79]</sup> Mit einem Molekulargewicht von 14.6 kDa ist Lysozym ein relativ kleines Protein. Es

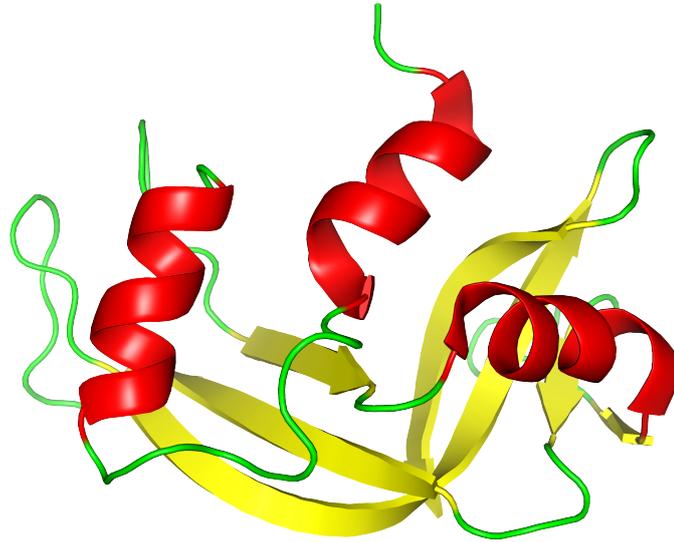


**Abbildung 3.1:** Dreidimensionale Struktur von Lysozym. Die Abbildung wurde mit der Software PyMOL<sup>[84]</sup> unter Verwendung der PDB-ID 1DPX<sup>[85]</sup> erstellt.

besteht aus einer einzigen Polypeptidkette mit 129 Aminosäuren und hat eine nahezu ellipsoide kompakte Form mit den Maßen  $4.5 \times 3 \times 3 \text{ nm}^3$ .<sup>[81]</sup> Aufgrund der hohen Standard-Entfaltungs-Gibbsenergie von ca.  $65 \text{ kJ mol}^{-1}$  liegt die Entfaltungstemperatur bei etwa  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  und der Entfaltungsdruck bei etwa 7 kbar. Die Stabilität wird unter anderem durch vier intramolekulare quervernetzte Disulfidbrücken und zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen gewährleistet.<sup>[80]</sup> Der isoelektrische Punkt liegt bei  $\text{pH}=11$ , sodass bei neutralem pH-Wert eine positive Nettoladung vorliegt.<sup>[82,83]</sup>

Als zweites Modellprotein wurde Ribonuklease A (RNase A) aus dem Rinderpankreas verwendet (Abbildung 3.2). RNase A ist ein Verdauungsenzym, das in einer hohen Konzentration im Rinderpankreas vorkommt. RNase A gehört zu der Gruppe der Endonukleasen und katalysiert die Hydrolyse von Ribonukleinsäure (RNA), indem sie die beiden Pyridine Uracil und Cytosin erkennt und die Phosphodiesterbindung des darauffolgenden Nukleotids spaltet. Sie besteht aus 124 Aminosäureresten und hat ein Molekulargewicht von 13.7 kDa.<sup>[79]</sup> Die Entfaltungstemperatur liegt bei etwa  $66 \text{ }^\circ\text{C}$  und der Entfaltungsdruck bei 7.7 kbar, wobei die Druck- und Temperaturentfaltung vollständig reversibel sind.<sup>[61,86]</sup> Der isoelektrische Punkt von RNase A liegt bei  $\text{pH}=9.4$ , sodass es bei neutralem pH-Wert eine positive Nettoladung besitzt.<sup>[82,87]</sup> RNase A gehört aufgrund ihrer leichten Isolierung und ihrer reversiblen Entfaltung

zu einem der am besten erforschten Enzyme und dient in der Grundlagenforschung als eines der wichtigsten Modellproteine.



**Abbildung 3.2:** Dreidimensionale Struktur von Ribonuklease A. Die Abbildung wurde mit der Software PyMOL<sup>[84]</sup> unter Verwendung der PDB-ID 1FS3<sup>[88]</sup> erstellt.

Als Trägerpartikel wurde Ludox AM verwendet. Die Ludox AM-Dispersion besitzt eine Dichte von  $1.2 \text{ g mL}^{-1}$  mit 30 Gew.-% Silica-Partikel, die einen Radius von ca. 6 nm aufweisen und eine spezifische Oberfläche von etwa  $220 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  haben. Einige Si-Atome sind durch Al-Atome ersetzt, sodass die Silica-Partikel eine stärkere negative Ladung aufweisen als normale Silica-Teilchen.

Zur Entfaltung eines Proteins durch Druck sind Drücke im kbar-Bereich erforderlich. Hierfür wurde eine Diamantstempelzelle verwendet. Mithilfe der FTIR-Technik wurden die Sekundärstrukturänderungen im adsorbierten Zustand sowie frei im Verlauf der Druck- und Temperaturentfaltung bestimmt.

## 3.2 Probenpräparation

### 3.2.1 Überführung von Ludox AM Silica-Partikel in D<sub>2</sub>O

Die verwendete Silica-Ludox-AM-Dispersion, besteht aus in H<sub>2</sub>O suspendierten kolloidalen SiO<sub>2</sub>-Teilchen. Die H<sub>2</sub>O-Absorptionsbande liegt jedoch im Bereich der Amid-I'-Bande, wodurch die in H<sub>2</sub>O suspendierten Silica-Partikel in D<sub>2</sub>O überführt werden mussten.

Die Ludox AM-Dispersion wurde zunächst mit dem gleichem Volumenanteil an D<sub>2</sub>O (10 mM MOPS-Puffer, pD=7.4) gemischt und 500 µL dieser Suspension in den Proteinkonzentrationsfilter Amicon Ultra (0.5 mM; 10 K) pipettiert. Nach der Zentrifugation bei 10 000 g für 10 min verbleiben etwa 300 µL Probenlösung mit den Silica-Partikeln im Filter. Der Lösungsmittelverlust wurde durch Zugabe von 200 µL D<sub>2</sub>O-Pufferlösung ausgeglichen und erneut für 10 min bei 10 000 g zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde achtmal wiederholt. Anschließend wurde das Konzentrat auf das ursprüngliche Volumen verdünnt. Der erfolgreiche Austausch von H<sub>2</sub>O durch D<sub>2</sub>O wurde durch die Aufnahme von FTIR-Spektren im Bereich von 4000–1000 cm<sup>-1</sup> vor und nach dem Austausch bestätigt. Die Spektren in Abbildung 9.2 (Anhang) zeigen einen kompletten Austausch von H<sub>2</sub>O durch D<sub>2</sub>O.

### 3.2.2 Bestimmung des Protein-Adsorptionsgrades auf Silica-Partikel

Eine vollständige Adsorption der Proteine musste für die FTIR-Messungen sichergestellt werden, weil sich sonst die gemessenen FTIR-Spektren aus Beiträgen von adsorbierten und nicht-adsorbierten Proteinen zusammensetzen würden. Zur Bestimmung des Adsorptionsgrades wurden zwei verschiedene Verfahren angewandt.

#### depletion method

Das Prinzip beruht darauf, Silica-Partikel mit adsorbierten Proteinen von nicht-adsorbierten Proteinen in der Lösung durch Zentrifugation zu trennen. Aufgrund der

geringen Dichte von nicht-adsorbierten Proteinen verbleiben sie nach einer Zentrifugation weiterhin in der Lösung. Es wurde eine  $20 \text{ mg mL}^{-1}$  Protein-Lösung mit einer Ludox AM-Dispersion mit einem pH-Wert von 7.4 vermischt und für 15 min inkubiert. Eine  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  Protein-Lösung (pH=7.4) ohne Ludox AM-Dispersion diente als Referenz. Jeweils 2 mL der Probenlösung wurden in ein Zentrifugenröhrchen gefüllt und bei  $60\,000 \text{ g}$  für 60 min zentrifugiert. Anschließend wurde jeweils der Überstand der Proben vorsichtig entnommen und UV-Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich von 250–320 nm aufgenommen. Für den Nullabgleich der UV-Messung wurde eine reine Ludox AM-Lösung bei pH=7.4 zentrifugiert und der Überstand genutzt. Bei der verwendeten Protein-Konzentration von  $20 \text{ mg mL}^{-1}$  konnte im Überstand keine Absorption detektiert werden. Somit ist von einer kompletten Protein-Adsorption auf die Silica-Teilchen auszugehen.

#### Proteinkonzentrationsfilter

Bei dieser Methode wird ein Proteinkonzentrationsfilter gewählt, dessen Poren so klein sind, dass Ludox AM-Silica-Partikel zurückgehalten werden, jedoch nicht-adsorbierte Proteine den Filter passieren können. Dadurch lassen sich nicht-adsorbierte Proteine aus der Probenlösung entfernen. Hierfür wurde eine  $20 \text{ mg mL}^{-1}$  Protein-Lösung mit der gleichen Menge einer Ludox AM-Dispersion (pH=7.4) vermischt und für 15 min inkubiert. 500  $\mu\text{L}$  der Probenlösung wurde in einen Proteinkonzentrationsfilter Amicon Ultra (0.5 mL; 50 K) pipettiert und für 15 min bei  $10\,000 \text{ g}$  zentrifugiert. Anschließend wurden vom Filtrat und Konzentrat UV-Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich von 250–320 nm aufgenommen. Für den Nullabgleich der UV-Messung wurde ebenfalls eine reine Ludox AM-Lösung (pH=7.4) zentrifugiert und der Überstand verwendet. Bei einer Konzentration von  $20 \text{ mg mL}^{-1}$  konnte im Überstand keine Absorption detektiert werden. Somit ist von einer kompletten Protein-Adsorption auf die Silica-Teilchen auszugehen.

### 3.2.3 FTIR-Experimente

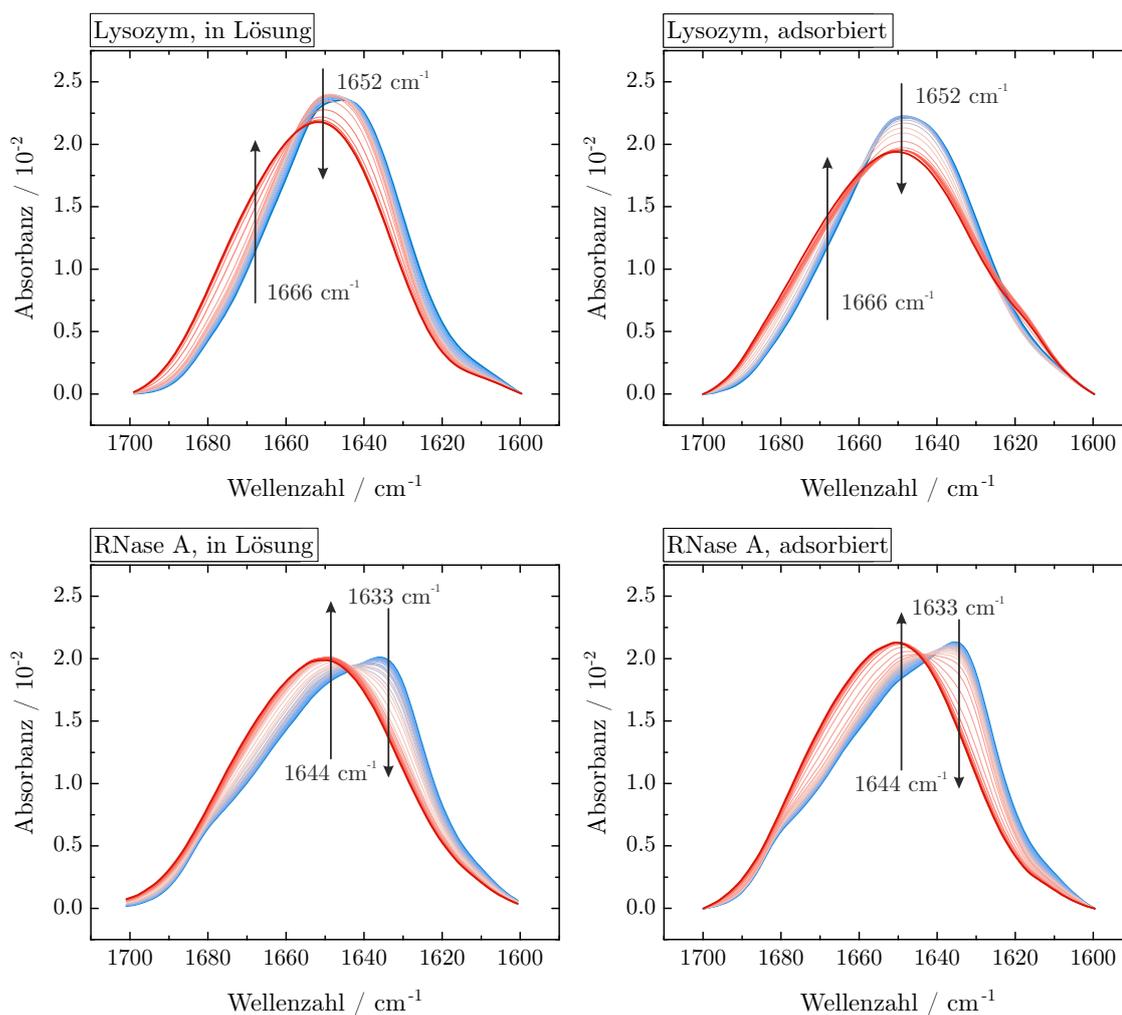
Aufgrund der Überlagerung der H<sub>2</sub>O-Deformationsschwingung mit der Amid-I'-Bande wurden alle Messungen in D<sub>2</sub>O durchgeführt. Für die temperatur- und druckabhängigen Messungen wurde ein 10 mL Phosphat-D<sub>2</sub>O-Puffer mit pD=7.8 (pD = pH-Meter-Anzeige + 0.4)<sup>[89]</sup> bzw. ein 10 mL Tris-D<sub>2</sub>O-Puffer mit pD=7.8 verwendet.

Die Herstellung der Proteinlösungen erfolgte durch Zugabe von 2 mg Lysozym oder RNase A in 200 µL D<sub>2</sub>O-Puffer und anschließendes Erwärmen auf 63 °C (RNase A) bzw. 68 °C (Lysozym) für 15 min. Das Erwärmen der Proben bis knapp unter der Entfaltungstemperatur war nötig, weil während der Temperatur- und Druckentfaltung ein H/D-Austausch stattfindet. Durch das Erwärmen bis knapp vor der Entfaltungstemperatur erfolgt ein Austausch der H-Atome innerhalb des Proteins durch D-Atome, wodurch eine Änderung der Amid-I'-Bande während der Entfaltung durch einen H/D-Austausch ausgeschlossen werden kann. Nach dem Lyophilisieren der Lösung wurden die Proben in 100 µL D<sub>2</sub>O-Puffer (Tris oder Phosphat) gelöst, sodass eine Proteinendkonzentration von 2 Gew.-% vorlag. Für die Untersuchung der adsorbierten Proteine wurde zunächst auf demselben Weg eine 10 Gew.-% Proteinlösung vorgelegt und mit einer Silica-D<sub>2</sub>O-Dispersion in einem Volumenverhältnis 4:1 gemischt, sodass wiederum eine Proteinkonzentration von 2 Gew.-% vorlag. Die Silica-Teilchen besitzen eine negativ geladene Oberfläche, während Lysozym und RNase A bei neutralem pD-Wert positiv geladen sind (Isoelektrischer Punkt bei pH=11 (Lysozym) und bei pH=9.4 (RNase A)).<sup>[82,90]</sup> Diese elektrostatische Anziehung führt zu einer vollständigen Adsorption.

## 3.3 Ergebnisse

### 3.3.1 Temperaturabhängige Messungen von RNase A und Lysozym in Lösung und adsorbiert auf Ludox AM

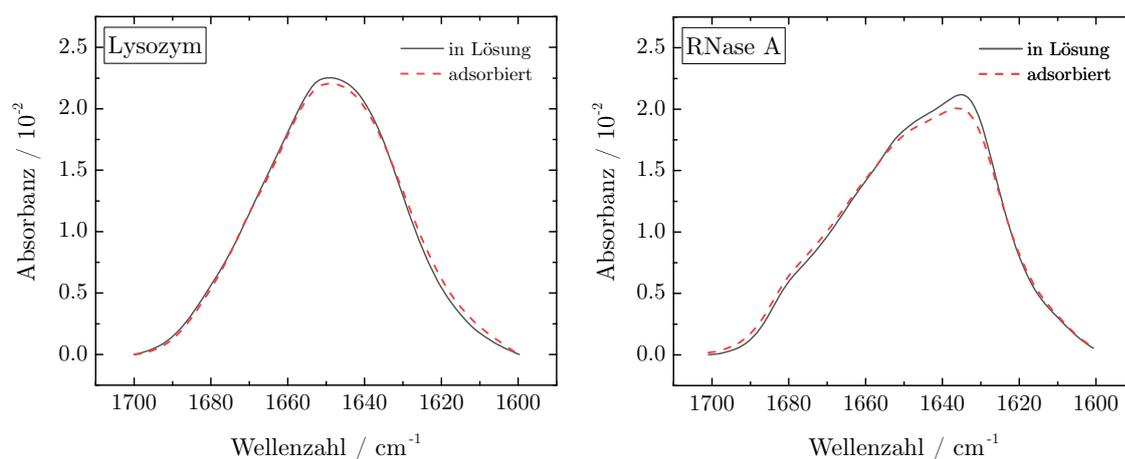
In folgender Abbildung 3.3 sind die temperaturabhängigen FTIR-Messungen von Lysozym und RNase A in Lösung und adsorbiert auf Silica-Teilchen gezeigt.



**Abbildung 3.3:** Im Bereich von 1700–1600 cm<sup>-1</sup> flächennormierte FTIR-Spektren der temperaturabhängigen Amid-I'-Banden von RNase A und Lysozym in Lösung und adsorbiert auf Silica-Teilchen. Vermessen wurde der Temperaturbereich 20–80 °C. Die Messungen wurden dreimal reproduziert.

Die Amid-I'-Bande repräsentiert die Summe aller Sekundärstrukturbanden des entsprechenden Proteins. Das Maximum der Amid-I'-Bande gibt einen Hinweis auf die

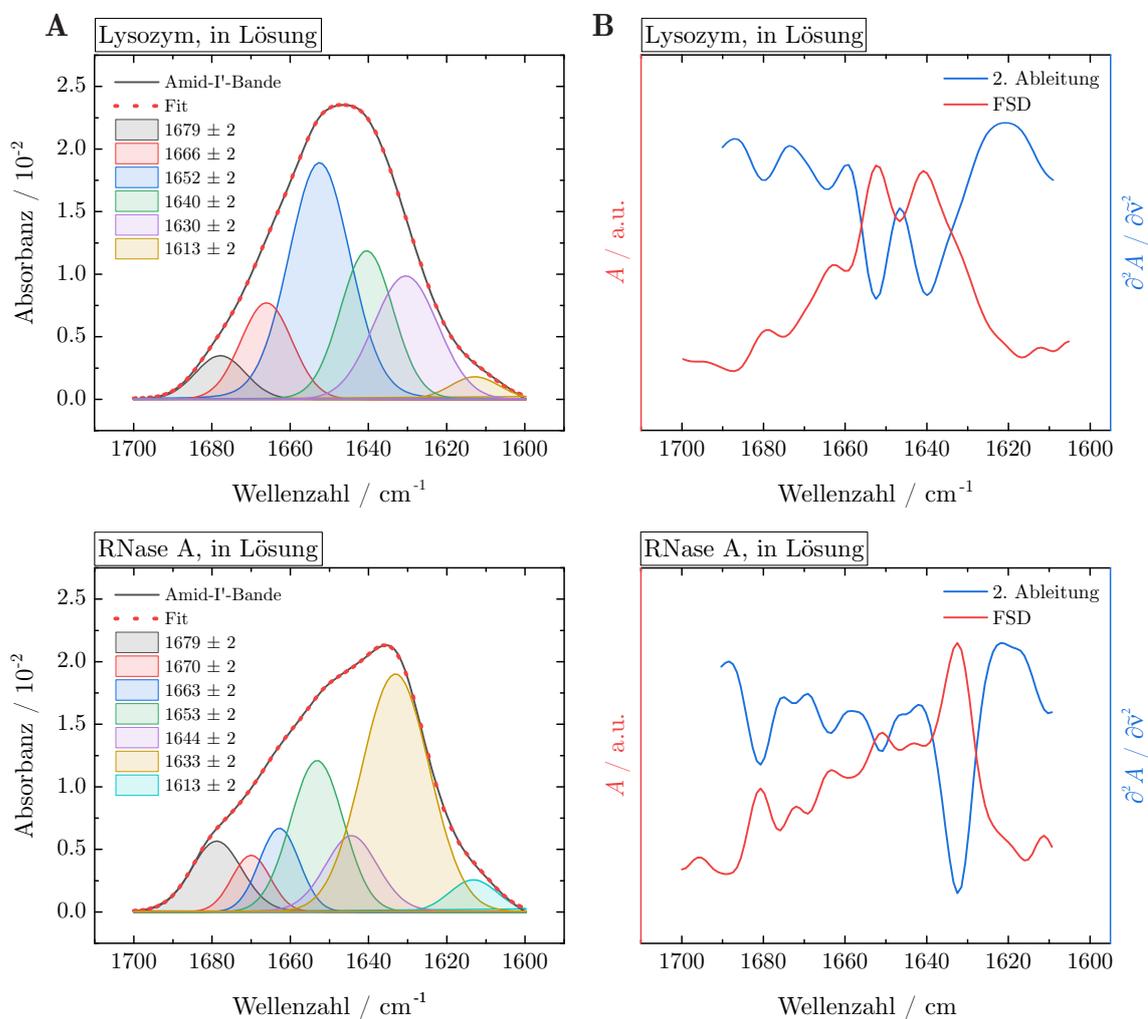
Verteilung der Sekundärstrukturelemente innerhalb des Proteins. Das Maximum der Amid-I'-Bande von Lysozym befindet sich im adsorbierten Zustand, wie auch frei in Lösung, bei  $1654\text{ cm}^{-1}$  (Abbildung 3.4). Bei RNase A ist das Maximum in beiden Fällen bei  $1633\text{ cm}^{-1}$  zu finden (Abbildung 3.4). Reine  $\alpha$ -Helices weisen ein Bandenmaximum bei  $1650\text{--}1654\text{ cm}^{-1}$  auf, während  $\beta$ -Faltblätter ein Bandenmaximum bei  $1620\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$  besitzen.<sup>[39]</sup>



**Abbildung 3.4:** Vergleich der im Bereich  $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$  flächennormierten Amid-I'-Banden von Lysozym und RNase A in Lösung und adsorbiert auf Silica-Teilchen.

Der Vergleich der Amid-I'-Banden von Lysozym und RNase A, in Lösung und adsorbiert, zeigt keine signifikanten Unterschiede, was auf eine ähnliche Sekundärstruktur nach der Adsorption auf den Silica-Teilchen hindeutet. Die Silica-Teilchen haben eine hydrophile Oberfläche und begünstigen somit die native Proteinkonformation. Darüber hinaus sind beide Proteine mit einer Entfaltungstemperatur von  $70\text{--}72\text{ °C}$  für Lysozym<sup>[91–93]</sup> und  $62\text{--}65\text{ °C}$  für RNase A<sup>[94,95]</sup> eher stabil. Geringfügige oder keine Änderungen der Sekundärstruktur von Lysozym<sup>[96,97]</sup> und RNase A<sup>[77]</sup> durch Adsorption auf Silica-Teilchen werden ebenfalls in der Literatur beschrieben. Es wurde eine Blauverschiebung der Tryptophanbande durch Adsorption von Lysozym auf Silica-Teilchen beobachtet.<sup>[62,96]</sup> Diese Verschiebung könnte jedoch aus der Protein-Silica-Wechselwirkung, und somit der neuen Umgebung des Tryptophans, resultieren. Unter anderem zeigten bereits früherer Studien, dass die Adsorption von Lysozym auf Silica-Teilchen keinen Einfluss auf dessen Tertiärstruktur hat.<sup>[97,98]</sup> Darüber hinaus kann die Größe der Silica-Teilchen einen Einfluss auf die Konforma-

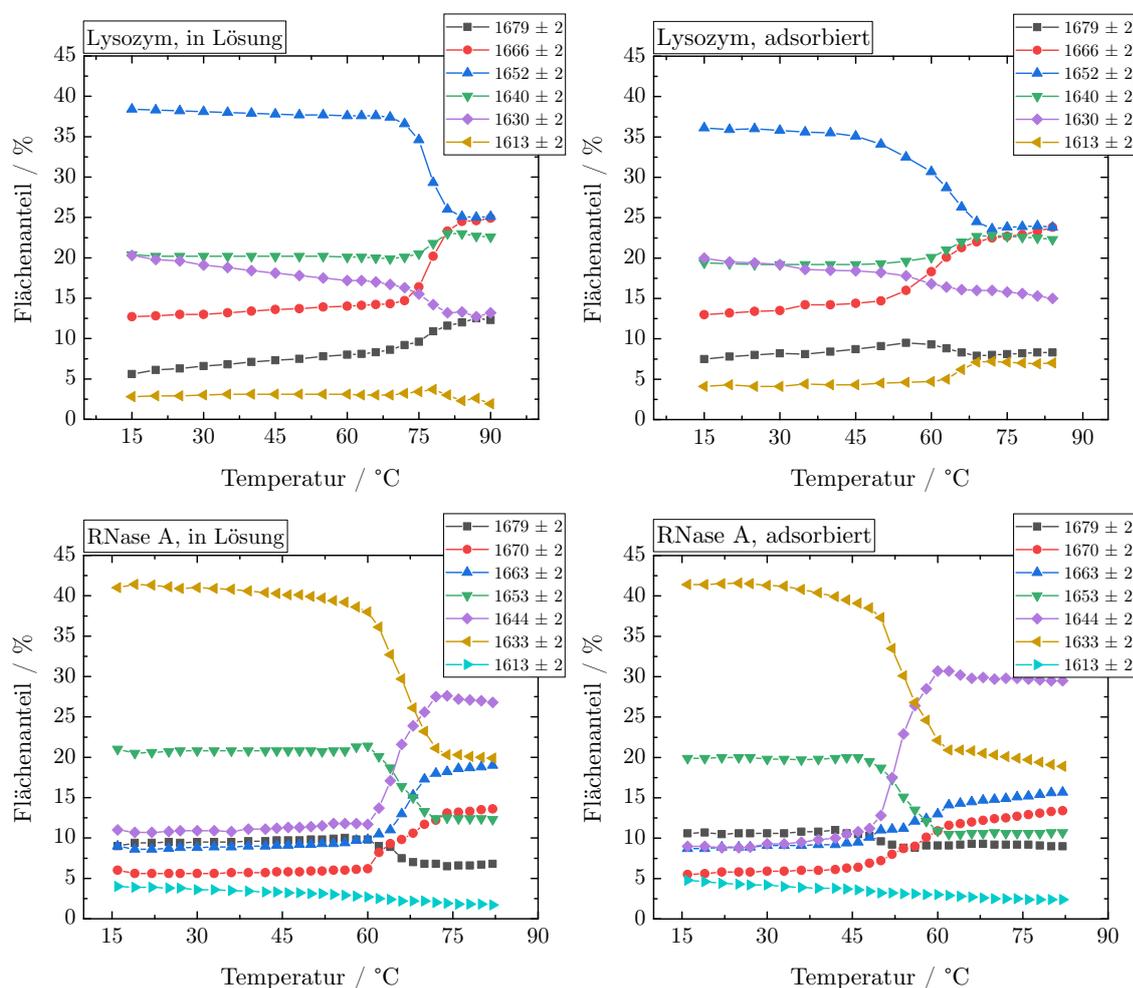
tion der adsorbierten Proteinmoleküle haben.<sup>[99,100]</sup> Es wurde gezeigt, dass lediglich Konformationsänderungen bei der Adsorption von Rinderserumalbumin (BSA, *bovine serum albumin*) und Myoglobin beobachtet wurden, wenn die Partikel einen Durchmesser  $>150$  nm besitzen.<sup>[99]</sup> Die in dieser Arbeit verwendeten Silica-Teilchen (Ludox AM) besitzen einen durchschnittlichen Durchmesser von etwa 12 nm. Darüber hinaus können laterale Protein-Protein-Wechselwirkungen aufgrund der geringeren Oberflächenbedeckung der Silica-Teilchen von lediglich 7% vernachlässigt werden. Einige Studien belegen allerdings, dass durch die Adsorption von Lysozym die enzymatische Aktivität erniedrigt wird.<sup>[73,96]</sup> Eine Abnahme der enzymatischen Aktivität



**Abbildung 3.5:** **A)** Flächennormierte Amid-I'-Bande bei 1 bar und 20 °C von Lysozym und RNase A in Lösung mit angepassten Subbanden. **B)** FSD behandelten Spektren und die zweite Ableitung, anhand derer die Subbandenpositionen bestimmt wurden ( $A$  ist die Absorbanz).

ist aber auch dann zu erwarten, wenn die native Struktur erhalten bleibt, da durch die Protein-Oberflächen-Wechselwirkung die Proteindynamik verlangsamt wird. Außerdem kann durch die Adsorption das aktive Zentrum komplett oder teilweise blockiert werden, was zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität führen kann.

Zur Bestimmung der Zusammensetzung der Sekundärstrukturelemente wurde eine Sekundärstrukturanalyse durchgeführt. Hierzu wurde, wie in Abschnitt 2.2 beschrieben, die zweite Ableitung der Amid-I'-Bande gebildet und eine FSD durchgeführt.



**Abbildung 3.6:** Sekundärstrukturanalyse von Lysozym und RNase A in Lösung und adsorbiert auf Ludox AM. Die Sekundärstrukturanteile in % sind als Funktion der Temperatur aufgetragen.

Die übereinstimmenden Minima der zweiten Ableitung mit den Maxima der FSD-behandelten Spektren ergaben die Bandenpositionen der entsprechenden Subbanden.

Die Amid-I'-Banden mit den angepassten Subbanden bei 25 °C und 1 bar für Lysozym und RNase A sind in Abbildung 3.5 dargestellt. Für Lysozym konnten sechs und für RNase A sieben Subbanden ermittelt werden. Die Zuordnung der entsprechenden Sekundärstrukturelemente erfolgte gemäß der Literatur.<sup>[39]</sup> Bei 20 °C stimmen die Sekundärstrukturanteile für Lysozym wie auch für RNase A gut mit der Literatur überein. Eine detaillierte Sekundärstrukturanalyse als Funktion der Temperatur für das adsorbierte und freie Lysozym sowie für RNase A ist in Abbildung 3.6 gezeigt. Der  $\alpha$ -Helix-Anteil von Lysozym liegt bei 38 %, in der Literatur sind Anteile von 40–41 % angegeben.<sup>[39,71,73]</sup> Der  $\beta$ -Faltblatt Anteil, der den größten Anteil in RNase A ausmacht, beträgt etwa 40 %, wie auch in früheren Studien ermittelt wurde.<sup>[39,86]</sup> Wie bereits der Vergleich der Amid-I'-Banden von adsorbiertem und freiem Lysozym und freier RNase A andeutet, sind die Sekundärstrukturanteile im Rahmen des Fehlers nahezu identisch. Aus der Sekundärstrukturanalyse ist ersichtlich, dass beide Proteine mit steigender Temperatur und damit thermischer Entfaltung einen Großteil ihrer geordneten Struktur verlieren, während gleichzeitig die Anteile von ungeordneten und Schleifenstrukturen ansteigen (Tabelle 3.1 und 3.2).

**Tabelle 3.1:** Sekundärstrukturanteile von Lysozym in Lösung und adsorbiert auf Silica-Teilchen vor und nach der Temperaturentfaltung.<sup>a</sup>

	1679 cm <sup>-1b</sup> Schleifen <sup>c</sup>	1666 cm <sup>-1b</sup> Schleifen	1652 cm <sup>-1b</sup> $\alpha$ -Helix	1640 cm <sup>-1b</sup> ungeordnet	1630 cm <sup>-1b</sup> $\beta$ -Faltblatt
<b>in Lösung</b>					
20 °C	6	13	38	20	20
90 °C	12	25	25	23	13
Änderung	6	12	-13	3	-7
<b>adsorbiert</b>					
20 °C	8	13	36	19	20
90 °C	8	24	24	22	15
Änderung	0	11	-12	3	-5

<sup>a</sup> Die Sekundärstrukturanteile sind in % angegeben und besitzen ein Fehler von  $\pm 2\%$ .

<sup>b</sup> Startwerte bei der Anpassung mit der Vorgabe  $\pm 2\text{ cm}^{-1}$ .

<sup>c</sup> Dieser Subbande werden ebenfalls  $\beta$ -Faltblattstrukturen zugeordnet.

Freies Lysozym verliert durch die thermische Entfaltung etwa 13 % seiner  $\alpha$ -Helix-Anteile. Gleichermaßen steigen die Schleifenstrukturen um etwa 12 % an. Nahezu identische Werte sind für die adsorbierte Form zu finden. Die  $\alpha$ -Helix-Strukturen sinken

für das adsorbierte Lysozym um 12 %. Die Schleifenstrukturen steigen hingegen um 11 % an. RNase A besitzt bei 20 °C, in der freien sowie in der adsorbierten Form, etwa 41 %  $\beta$ -Faltblattanteile. Durch die thermische Entfaltung sinkt der  $\beta$ -Faltblattanteil für die frei Form um 21 % und für die adsorbierte Form um 23 %. Gleichmaßen steigen die ungeordneten Strukturen um 15 % bzw. 22 % an. Die im Rahmen des Fehlers nahezu identischen Änderungen der Sekundärstruktur für die adsorbierten und freien Formen deuten darauf hin, dass die Protein-Silica-Wechselwirkung keinen signifikanten Einfluss auf den Entfaltungsweg von Lysozym und RNase A hat.

**Tabelle 3.2:** Sekundärstrukturanteile von RNase A in Lösung und adsorbiert auf Silica-Teilchen vor und nach der Temperaturentfaltung.<sup>a</sup>

	1679 cm <sup>-1b</sup> $\beta$ -Faltblatt <sup>c</sup>	1670 cm <sup>-1b</sup> Schleifen	1663 cm <sup>-1b</sup> Schleifen	1653 cm <sup>-1b</sup> $\alpha$ -Helix	1644 cm <sup>-1b</sup> ungeordnet	1633 cm <sup>-1b</sup> $\beta$ -Faltblatt
<b>in Lösung</b>						
20 °C	9	6	8	21	11	41
80 °C	7	14	19	12	26	20
Änderung	-2	8	11	-9	15	-21
<b>adsorbiert</b>						
20 °C	11	6	8	20	8	42
80 °C	9	13	16	11	30	19
Änderung	-2	7	8	-9	22	-23

<sup>a</sup> Die Sekundärstrukturanteile sind in % angegeben und besitzen ein Fehler von  $\pm 2$  %.

<sup>b</sup> Startwerte bei der Anpassung mit der Vorgabe  $\pm 2$  cm<sup>-1</sup>.

<sup>c</sup> Dieser Subbande werden ebenfalls  $\beta$ -Faltblattstrukturen zugeordnet.

Zur Quantifizierung der Gesamtänderung der Sekundärstrukturelemente in Folge thermischer Entfaltung wurde die mittlere quadratische Abweichung gebildet:

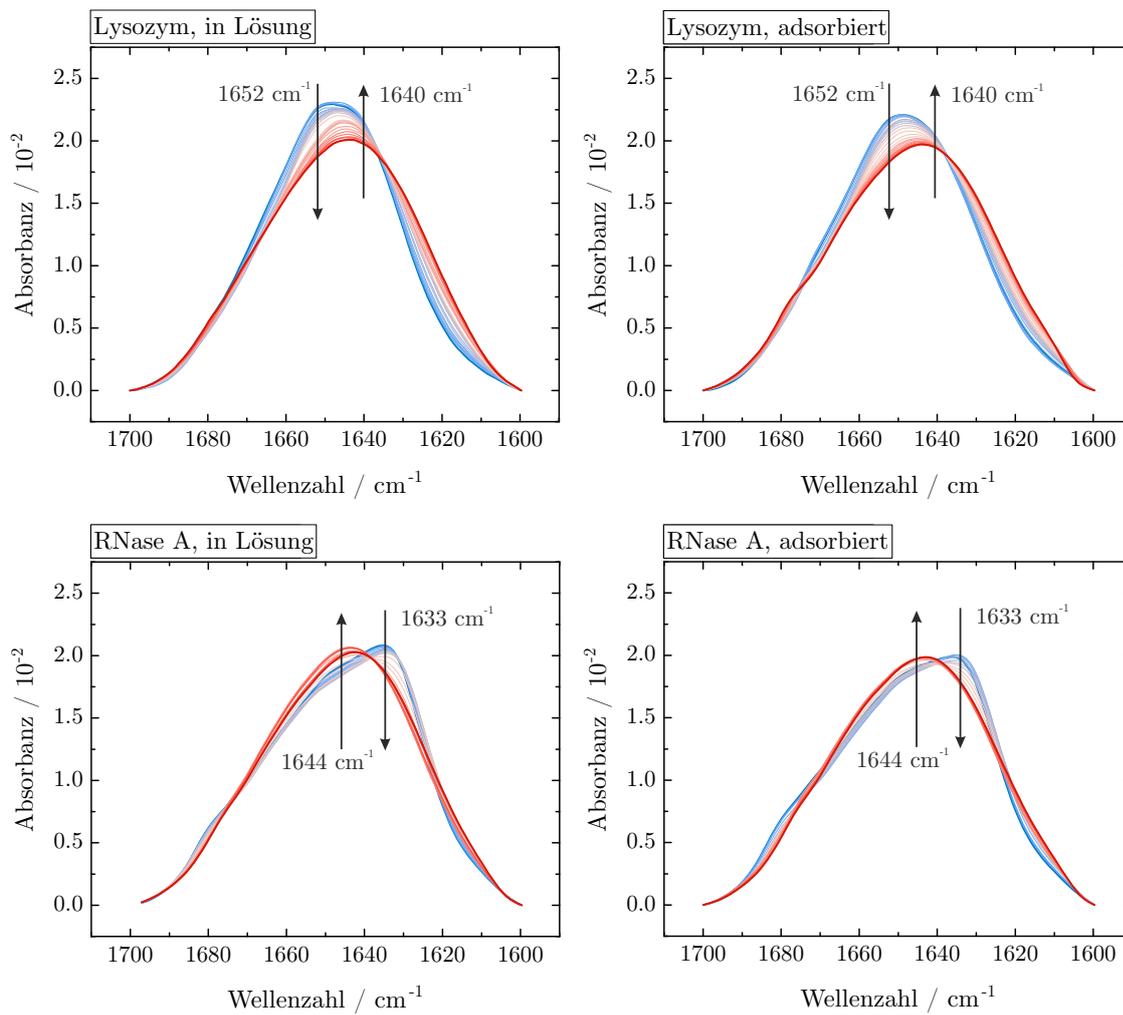
$$\overline{\Delta f^2} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \Delta f_i^2 \quad (3.4)$$

Hierbei ist  $\overline{\Delta f^2}$  die Änderung des Sekundärstrukturelements  $i$  in %, wie in Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2 gezeigt. Für freies und adsorbiertes Lysozym konnten  $\overline{\Delta f^2}$ -Werte von 68 und 51 ermittelt werden und für freie und adsorbierte RNase A Werte von 134 und 174. Im Vergleich zu RNase A ist die mittlere quadratische Abweichung der Sekundärstrukturänderung von Lysozym durch die thermische Entfaltung klei-

ner. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da Lysozym im nativen Zustand durch vier Disulfidbrücken stabilisiert wird. Bei einem physiologischen pH-Wert liegt  $\Delta G^\circ$  von Lysozym bei  $65 \text{ kJ mol}^{-1}$ , von RNase A bei  $38 \text{ kJ mol}^{-1}$ .<sup>[101]</sup> Die mittlere quadratische Abweichung der Sekundärstrukturänderung sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

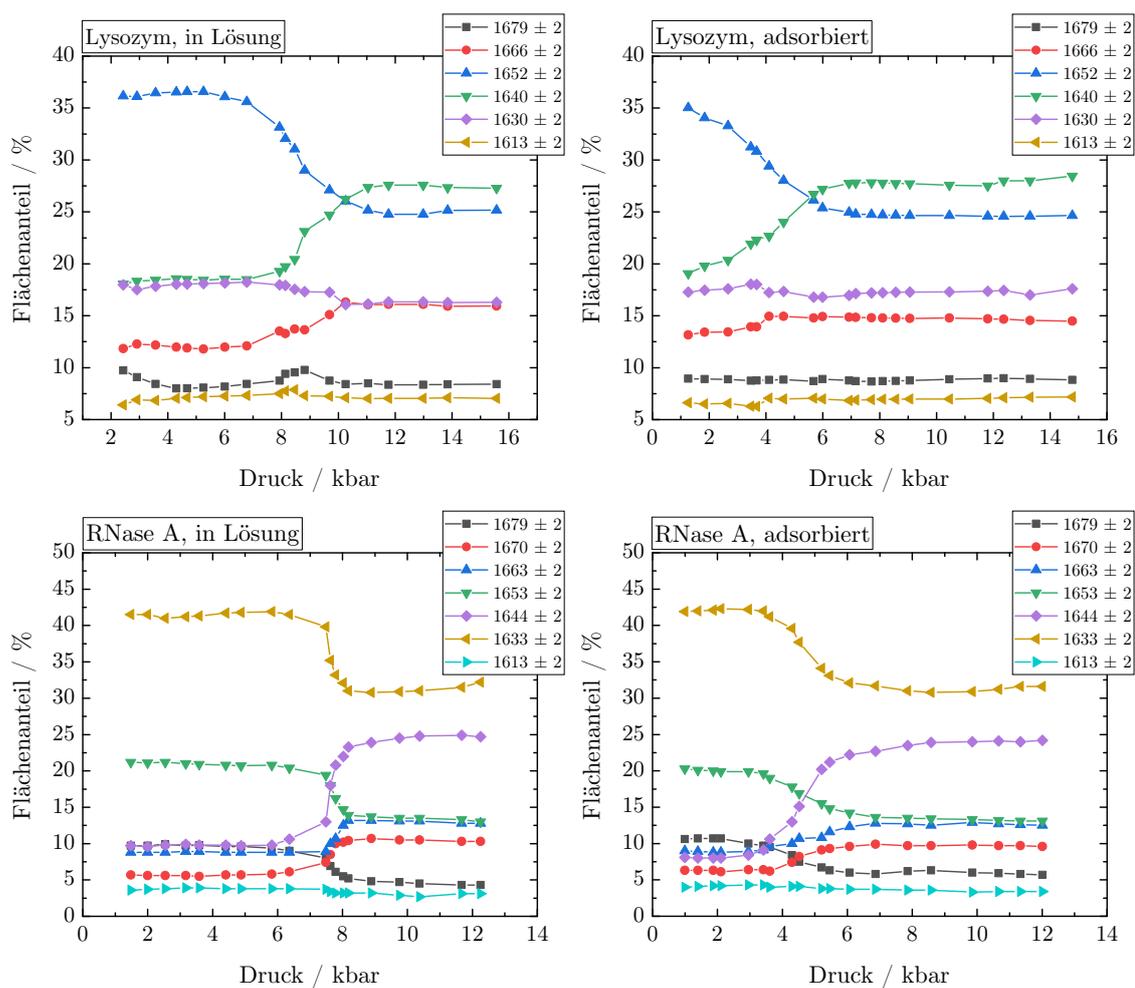
### 3.3.2 Druckabhängige Messungen von RNase A und Lysozym in Lösung und adsorbiert auf Ludox AM

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der druckabhängigen FTIR-Studien gezeigt. Die Analyse der Amid-I'-Bande erfolgte auf demselben Weg wie die Analyse der temperaturabhängigen Messungen. In Abbildung 3.7 sind die druckabhängigen Messungen der Amid-I'-Bande von Lysozym und RNase A dargestellt.



**Abbildung 3.7:** Im Bereich von 1700–1600 cm<sup>-1</sup> flächennormierte FTIR-Spektren der druckabhängigen Messung der Amid-I'-Bande von RNase A und Lysozym in Lösung und adsorbiert auf Ludox AM. Vermessen wurde der Druckbereich 1–16 kbar. Die Messungen wurden drei- bis viermal reproduziert.

Mit zunehmendem Druck verschiebt sich das Bandenmaximum von RNase A von  $1633\text{ cm}^{-1}$  nach  $1644\text{ cm}^{-1}$ , was auf eine Abnahme von  $\beta$ -Faltblattanteilen und eine Zunahme von ungeordneten Strukturen hindeutet. Bei Lysozym bewirkt die Druckzunahme eine Verschiebung der Bande von etwa  $1652\text{ cm}^{-1}$ , die charakteristisch für  $\alpha$ -Helices ist, in Richtung  $1640\text{ cm}^{-1}$ , wo in der Regel ungeordnete Strukturen dominieren. Eine detaillierte Sekundärstrukturanalyse ist in Abbildung 3.8 gezeigt.



**Abbildung 3.8:** Sekundärstrukturanalyse von Lysozym und RNase A in Lösung und adsorbiert auf Ludox AM. Die Sekundärstrukturanteile in % sind als Funktion des Drucks aufgetragen.

Bei Lysozym sinkt der Anteil der  $\alpha$ -Helices im Laufe der Druckentfaltung für die adsorbierte Form um  $-11\%$  und für die in Lösung um  $-12\%$  (Tabelle 3.3). Die Werte entsprechen denen der temperaturabhängigen Entfaltung. Jedoch scheint die Druckentfaltung im Gegensatz zur Temperaturentfaltung die Ausbildung von ungeordneten Strukturen zu begünstigen, die für adsorbiertes Lysozym um  $9\%$  und für freies um  $10\%$  ansteigen. Eine Erhöhung der Temperatur führt zu einem Intensitätsanstieg der Amid-I'-Bande bei höheren Wellenzahlen, während ein Druckanstieg eine Intensitätszunahme bei kleineren Wellenzahlen zur Folge hat. Die unterschiedlichen Triebkräfte der Druck- und Temperaturentfaltung lassen sich den Gleichungen 3.2 und 3.3 entnehmen. Proteine entfalten bei hohen Temperaturen, da der entfaltete Zustand eine höhere Entropie als der gefaltete Zustand besitzt. Mit steigender Temperatur steigt  $T\Delta S$  des hydratisierten Proteins, wodurch  $\Delta G^\circ < 0$  für  $T < T_{\text{Entfaltet}}$  wird.  $\Delta H$  steigt unter Berücksichtigung der Wärmekapazitätsänderung ebenfalls mit der Temperatur an, jedoch mit einer geringeren Steigung als  $T\Delta S$ . Die Temperaturentfaltung ist demnach ein entropie-getriebener Prozess. Bei der Druckentfaltung hingegen wird die entfaltete Konformation mit dem geringeren Volumen, nach dem Prinzip von LE CHÂTELIER, bevorzugt.

**Tabelle 3.3:** Sekundärstrukturanteile von Lysozym in Lösung und adsorbiert auf Silica-Teilchen vor und nach der Druckentfaltung.<sup>a</sup>

	1679 cm <sup>-1b</sup> Schleifen <sup>c</sup>	1666 cm <sup>-1b</sup> Schleifen	1652 cm <sup>-1b</sup> $\alpha$ -Helix	1640 cm <sup>-1b</sup> ungeordnet	1630 cm <sup>-1b</sup> $\beta$ -Faltblatt
<b>in Lösung</b>					
5 kbar	8	12	37	18	18
12 kbar	8	16	25	28	16
Änderung	0	4	-12	10	-2
<b>adsorbiert</b>					
1 kbar	9	13	35	19	17
8 kbar	9	15	24	28	17
Änderung	0	2	-11	9	0

<sup>a</sup> Die Sekundärstrukturanteile sind in % angegeben und besitzen ein Fehler von  $\pm 2\%$ .

<sup>b</sup> Startwerte bei der Anpassung mit der Vorgabe  $\pm 2\text{ cm}^{-1}$ .

<sup>c</sup> Dieser Subbande werden ebenfalls  $\beta$ -Faltblattstrukturen zugeordnet.

Bei Lysozym führt die Bildung von Schleifenstrukturen vermutlich zu einer Erhöhung der Entropie, wobei eine Verringerung des Volumens nicht möglich ist. Es zeigt sich, dass die temperaturinduzierte Entfaltung von Lysozym einen anderen Entfaltungsweg besitzt als die druckinduzierte Entfaltung. Hingegen verläuft die Entfaltung für das freie und das adsorbierte Lysozym auf demselben Weg. Wie bei der Temperaturentfaltung zeigen die Daten, dass Lysozym-Silica-Wechselwirkungen keinen Einfluss auf den druckinduzierten Entfaltungsweg haben.

Die druckinduzierte Änderung der Sekundärstruktur für adsorbierte und freie RNase A ist sehr ähnlich. Der  $\beta$ -Faltblattanteil sinkt für die freie RNase A um 10 % und für die adsorbierte Form um 11 %, während der Anteil für ungeordnete Strukturen um 15 % für die freie Form und um 16 % für die adsorbierte Form steigen (Tabelle 3.4). Die Änderungen der restlichen Sekundärstrukturelemente stimmen weitestgehend mit denen der temperaturinduzierten Entfaltung überein. Wie auch bei Lysozym weisen die Ergebnisse darauf hin, dass der Entfaltungsweg von RNase A unter Hochdruck unabhängig von der Adsorption auf Silica-Teilchen zu sein scheint.

**Tabelle 3.4:** Sekundärstrukturanteile von RNase A in Lösung und adsorbiert auf Silica-Teilchen vor und nach Druckentfaltung.<sup>a</sup>

	1679 cm <sup>-1b</sup>	1670 cm <sup>-1b</sup>	1663 cm <sup>-1b</sup>	1653 cm <sup>-1b</sup>	1644 cm <sup>-1b</sup>	1633 cm <sup>-1b</sup>
	$\beta$ -Faltblatt <sup>c</sup>	Schleifen	Schleifen	$\alpha$ -Helix	ungeordnet	$\beta$ -Faltblatt
<b>in Lösung</b>						
5 kbar	10	6	8	21	10	42
12 kbar	4	10	13	13	25	32
Änderung	-6	4	5	-8	15	-10
<b>adsorbiert</b>						
1 kbar	11	6	9	20	8	42
8 kbar	6	10	13	13	24	31
Änderung	-5	4	4	-7	16	-11

<sup>a</sup> Die Sekundärstrukturanteile sind in % angegeben und besitzen ein Fehler von  $\pm 2$  %.

<sup>b</sup> Startwerte bei der Anpassung mit der Vorgabe  $\pm 2$  cm<sup>-1</sup>.

<sup>c</sup> Dieser Subbande werden ebenfalls  $\beta$ -Faltblattstrukturen zugeordnet.

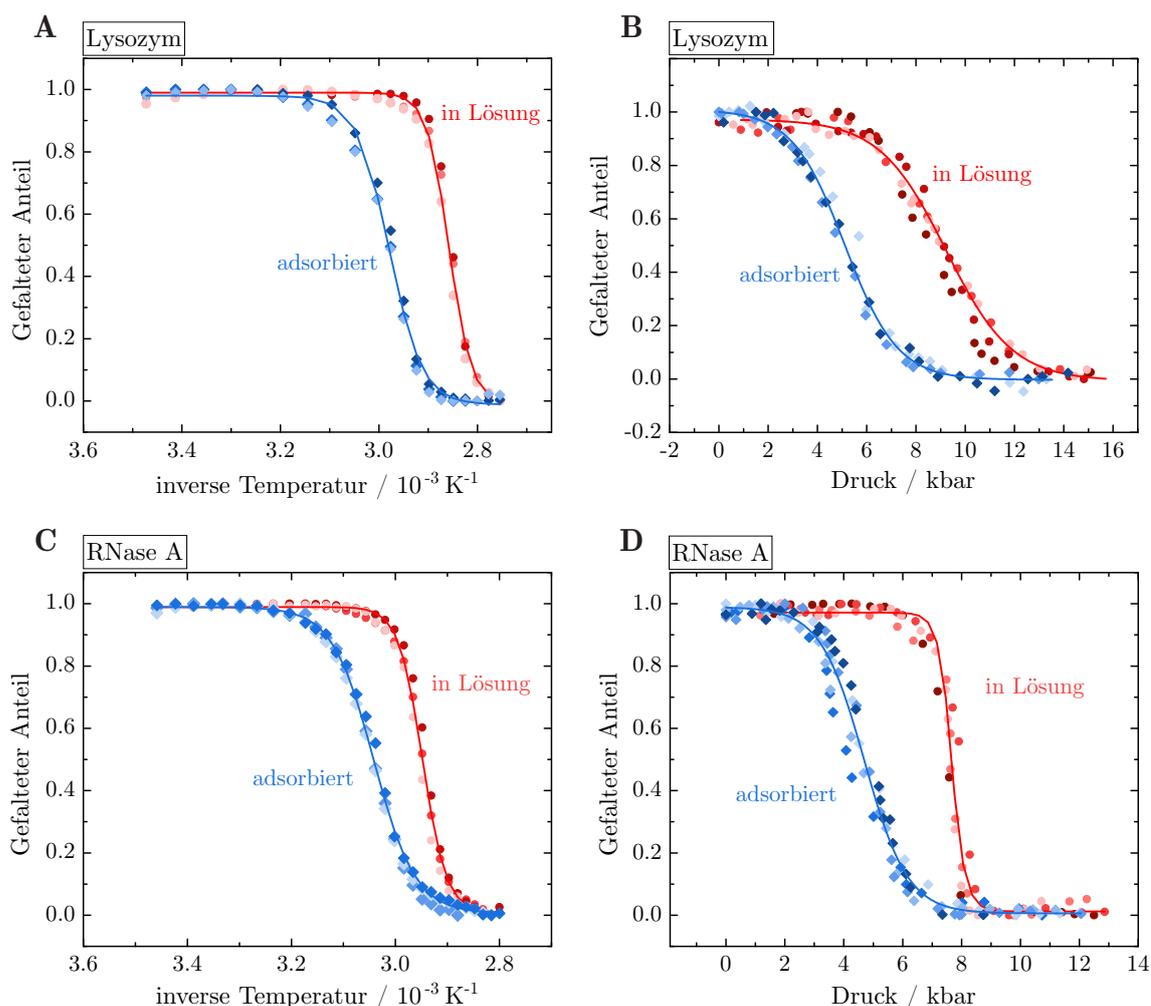
Mit Hilfe der Gleichung 3.4 lässt sich ein genereller Unterschied zwischen dem Temperatur- und Druckeffekt auf Proteine beobachten.<sup>[86,102]</sup> Die Druckentfaltung ist eine eher milde Entfaltungsform, bei der nur kleine strukturelle Änderungen erfolgen. Die mittlere quadratische Abweichung der Sekundärstrukturänderung von RNase A durch Druck und Temperatur veranschaulicht dies deutlich. RNase A in Lösung besitzt bei hohen Temperaturen einen  $\overline{\Delta f^2}$ -Wert von 143 und bei hohen Drücken einen Wert von nur 67, im adsorbierten Zustand liegt der Wert bei 174 und 69 (Tabelle 3.5). Daraus folgt, dass die Druckentfaltung von RNase A wie auch von Lysozym im Vergleich zur Temperaturentfaltung eine deutlich geringere Strukturänderung zur Folge hat. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen weiterhin, dass diese Beobachtung ebenfalls für Proteine gilt, die auf einer Silica-Oberfläche adsorbiert sind.

**Tabelle 3.5:** Mittlere quadratische Abweichung der druck- und temperaturinduzierten Sekundärstrukturänderungen von RNase A und Lysozym. Zur Berechnung der mittlere quadratischen Abweichung wurden die Gleichung 3.4 und die in den Tabellen 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 aufgeführten Sekundärstrukturänderungen verwendet.

	Lysozym Temperatur	Lysozym Druck	RNase A Temperatur	RNase A Druck
in Lösung	68	44	143	67
adsorbiert	51	34	174	69

### 3.3.3 Druck- und Temperaturstabilität von RNase A und Lysozym

Aus der Auftragung der Absorbanz der normierten Amid-I'-Banden als Funktion der inversen Temperatur  $1/T$  bzw. des Drucks  $p$  lässt sich die Entfaltungstemperatur  $T_{\text{Entfaltet}}$  sowie die Entfaltungsenthalpie  $\Delta H$  bzw. der Entfaltungsdruck  $p_{\text{Entfaltet}}$  und das Entfaltungsvolumen  $\Delta V$  bestimmen. Hierfür wurde die Absorbanz bei  $1644 \text{ cm}^{-1}$  für Lysozym und  $1633 \text{ cm}^{-1}$  für RNase A gewählt, da in diesem Bereich die größte Änderung während der Entfaltung zu beobachten ist (Abbildung 3.9).



**Abbildung 3.9:** Durch Adsorption induzierte Destabilisierung der gefalteten Konformation von Lysozym und RNase A durch Druck- und Temperaturerhöhung. Für Lysozym ist die Absorption bei  $1644\text{ cm}^{-1}$  **A)** als Funktion der inversen Temperatur und **B)** als Funktion des Drucks aufgetragen, für RNase A bei  $1633\text{ cm}^{-1}$  als **C)** Funktion der inversen Temperatur und **D)** als Funktion des Drucks. Unterschiedliche Symbole geben unabhängige Messreihen wieder.

Durch die Adsorption von RNase A und Lysozym auf die Silica-Partikel sinkt der Entfaltungsdruck  $p_{\text{Entfaltet}}$  sowie die Entfaltungstemperatur  $T_{\text{Entfaltet}}$  drastisch (Abbildung 3.9). Bestimmt wurden  $T_{\text{Entfaltet}}$  und  $p_{\text{Entfaltet}}$  nach den Gleichung 3.5 und Gleichung 3.6.

$$A = \frac{A_{\text{Gefaltet}} - A_{\text{Entfaltet}}}{1 + \exp[-(\Delta H/R)(1/T - 1/T_{\text{Entfaltet}})]} \quad (3.5)$$

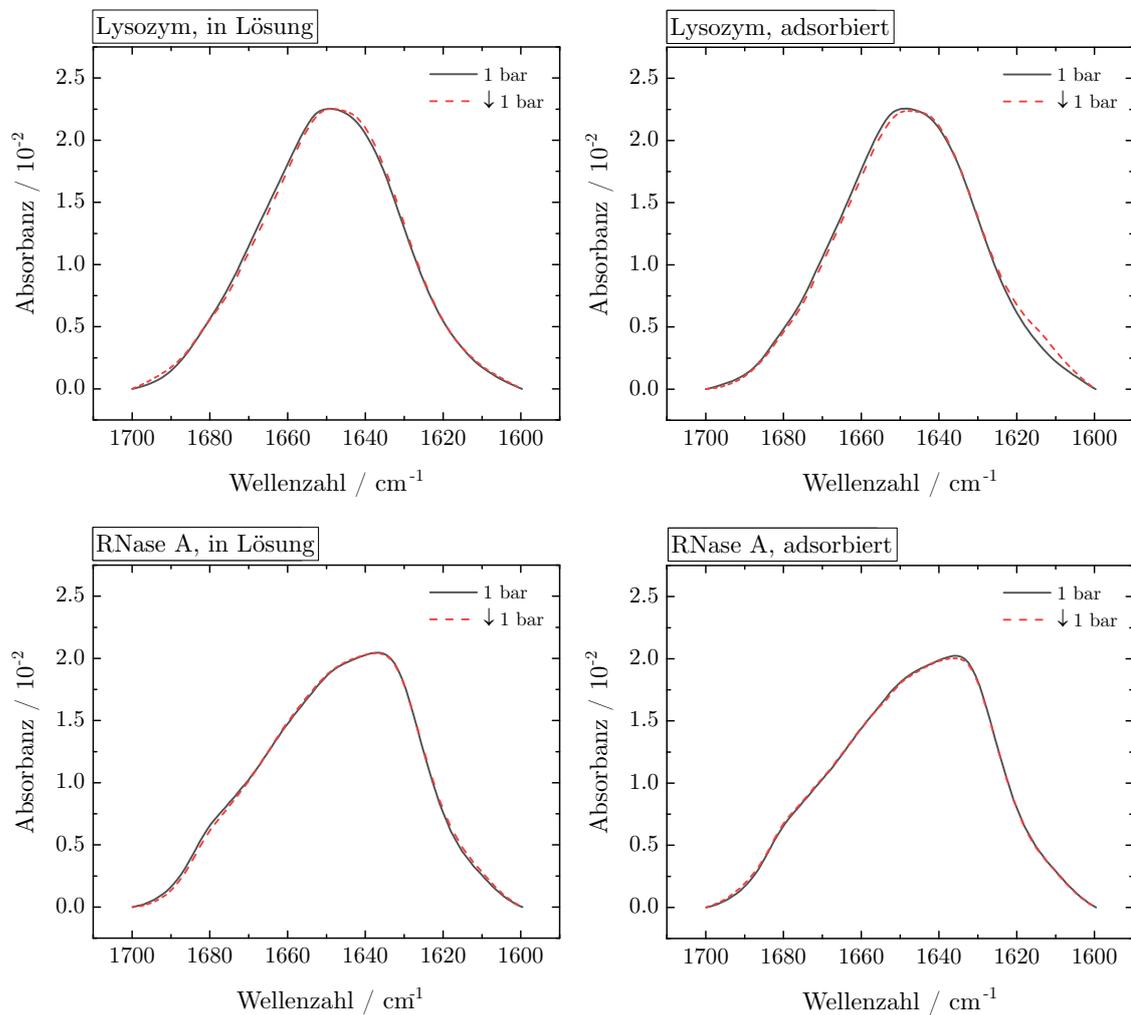
$$A = \frac{A_{\text{Gefaltet}} - A_{\text{Entfaltet}}}{1 + \exp[-(\Delta V/RT)(p - p_{\text{Entfaltet}})]} \quad (3.6)$$

$A$  ist die normierte Absorbanz bei der gewählten Wellenzahl.  $A_{\text{Gefaltet}}$  und  $A_{\text{Entfaltet}}$  sind die Plateau-Werte für den gefalteten und entfalteten Zustand.  $A$  wurde als Funktion der inversen Temperatur  $1/T$  oder des Drucks  $p$  aufgetragen und mit der Gleichung 3.5 bzw. Gleichung 3.6 für freies und adsorbiertes Lysozym bzw. RNase A angepasst. Die Verwendung der Gleichung 3.5 und Gleichung 3.6 erfordert ein Zwei-Zustandsmodell, wonach das Protein komplett entfaltet oder gefaltet vorliegt. Die druckinduzierte Entfaltung von freiem Lysozym und RNase A, wie auch bei den adsorbierten Formen beider Proteine, verläuft vollständig reversibel (Abbildung 3.10).

Die Wendepunkte der Graphen aus Abbildung 3.9 entsprechen  $T_{\text{Entfaltet}}$  und  $p_{\text{Entfaltet}}$ . Die Entfaltungstemperatur sinkt durch Adsorption von Lysozym auf Silica-Partikel von 78 °C auf 63 °C und von RNase A von 66 °C auf 56 °C. Ebenso ist auch der Entfaltungsdruck erniedrigt. Für Lysozym sinkt der Entfaltungsdruck von 9.0 kbar auf 5.1 kbar. Bei RNase A nimmt der Entfaltungsdruck durch Adsorption von 7.7 kbar auf 4.7 kbar ab. Die drastische Erniedrigung der Entfaltungstemperatur und des Entfaltungsdrucks gibt einen Hinweis darauf, dass Lysozym und RNase A durch die Adsorption auf die Silica-Teilchen weniger stabil zu sein scheinen. Die ermittelten Werte für  $T_{\text{Entfaltet}}$  und  $p_{\text{Entfaltet}}$  im Fall der freien Proteine stehen in guter Übereinstimmung mit der Literatur. Für Lysozym ist ein Entfaltungsdruck von 9.6 kbar<sup>[103]</sup> und für RNase A von 7.4 kbar<sup>[104]</sup> angegeben.

Weiterhin ist es möglich, aus der Anpassung der Graphen aus Abbildung 3.9 mit der Gleichung 3.6 und Gleichung 3.5 das Entfaltungsvolumen  $\Delta V$  bzw. die Entfaltungsenthalpie  $\Delta H$  zu bestimmen. Diese beiden thermodynamischen Größen sind proportional zur Steigung am Wendepunkt der angepassten Graphen. Durch die Adsorption sinkt die Entfaltungsenthalpie für Lysozym von 385 kJ mol<sup>-1</sup> auf 244 kJ mol<sup>-1</sup> und für RNase A von 368 kJ mol<sup>-1</sup> auf 209 kJ mol<sup>-1</sup>. Diese Erniedrigung lässt sich einfach durch die Protein-Silica-Wechselwirkung erklären.  $\Delta H$  ist die Differenz  $H_{\text{Entfaltet}} - H_{\text{Gefaltet}}$ .

Eine starke Wechselwirkung zwischen Protein und Silica-Partikel im entfalteten



**Abbildung 3.10:** Die im Bereich von 1700–1600 cm<sup>-1</sup> flächennormierte Amid-I'-Bande von freiem und adsorbiertem Lysozym bzw. RNase A, vor und nach der Druckapplikation bei 1 bar.

Zustand im Vergleich zum gefalteten Zustand führt zu einer größeren Abnahme von  $H_{\text{Entfaltet}}$  im Vergleich zu  $H_{\text{Gefaltet}}$ , was eine Erniedrigung von  $\Delta H$  zufolge hat. Die kleineren  $\Delta H$ -Werte für die adsorbierten Formen von Lysozym und RNase A sind verantwortlich für den größeren Temperaturbereich der Entfaltung. Die mithilfe der Gleichung 3.6 ermittelten  $\Delta V$ -Werte besitzen einen Fehler von mehr als 50 %, da die hier verwendete Technik mit einem relativ großen Fehler behaftet ist (etwa  $\pm 200$  bar). Für freies Lysozym konnte ein Wert von  $-21 \text{ mL mol}^{-1}$ , für adsorbiertes ein Wert von  $-24 \text{ mL mol}^{-1}$  gefunden werden.  $\Delta V$  für freie RNase A liegt bei  $-123 \text{ mL mol}^{-1}$

und für die adsorbierte Form bei  $-36 \text{ mL mol}^{-1}$ . Werte in der Literatur für freies Lysozym von  $-26 \text{ mL mol}^{-1}$ <sup>[103]</sup> und  $-55 \text{ mL mol}^{-1}$ <sup>[105]</sup> und für freie RNase A von  $-45 \text{ mL mol}^{-1}$ <sup>[102]</sup> und  $-15 \text{ mL mol}^{-1}$ <sup>[95]</sup> zeigen ebenfalls, dass  $\Delta V$  mit einem großen Fehler behaftet ist. In früheren Fluoreszenzuntersuchungen von adsorbierter SNase auf Silica-Teilchen wurde gezeigt, dass  $\Delta V$  durch die Adsorption von  $-73 \text{ mL mol}^{-1}$  (freie SNase) auf  $-14 \text{ mL mol}^{-1}$  (adsorbierte SNase) erniedrigt wird.<sup>[68]</sup> Erklärt wird die Reduktion von  $|\Delta V|$  (absolute Werte) mit einer negativen Volumenänderung durch die Proteinadsorption. Eine kleine negative Volumenänderung der Adsorption wurde ebenfalls bei der Adsorption von Lysozym an eine Silica-Wasser-Grenzfläche beobachtet.<sup>[106]</sup> Zusammengefasst scheint es einen Trend zu geben, bei dem  $|\Delta V|$  und  $\Delta H$  bei der adsorbierten Form eines Proteins kleiner sind als frei in Lösung. Ebenso sind die kleineren Werte für  $|\Delta V|$  und  $\Delta H$  im adsorbierten Zustand übereinstimmend mit den verbreiterten Temperatur- und Druckbereichen der Proteinfaltung.

### 3.4 Zusammenfassung von Kapitel 3

Das Hauptziel dieses Teilprojekts war die Untersuchung der Konformation von Proteinen an der Wasser-Siliziumoxid-Grenzfläche. Mithilfe der thermodynamischen Parameter Druck und Temperatur sollten die volumetrischen und enthalpischen Effekte auf die Proteinadsorption experimentell erfasst und mit denen von Proteinen frei in Lösung verglichen werden. Untersucht wurden die temperatur- und druckabhängigen Sekundärstrukturänderungen von Lysozym und RNase A frei in Lösung und im adsorbierten Zustand auf Silica-Teilchen im Bereich von 10–90 °C bzw. 1–16 kbar mittels FTIR-Spektroskopie. Mithilfe der Sekundärstrukturanalyse konnte gezeigt werden, dass sich die Sekundärstruktur von RNase A und Lysozym durch Adsorption auf die Silica-Teilchen nicht signifikant ändert und die native Struktur erhalten bleibt. Während der temperatur- und druckabhängige Entfaltungsweg durch die Adsorption unverändert bleibt, wird die Entfaltungstemperatur und der Entfaltungsdruck im adsorbierten Zustand signifikant reduziert. Durch Adsorption von Lysozym sinkt die Entfaltungstemperatur um etwa 15 °C und der Entfaltungsdruck um etwa 3.9 kbar, bei RNase A um 10 °C bzw. 3 kbar. Darüber hinaus werden die Temperaturbereiche, in denen Änderungen der Sekundärstruktur auftreten, aufgrund der Adsorption verbreitert, was mit den kleineren Enthalpieänderungen der Entfaltung zusammenhängt.

Für beide Proteine, frei oder adsorbiert, führt eine druckinduzierte Entfaltung zu weniger ausgeprägten Veränderungen der Sekundärstruktur als bei der temperaturinduzierten Entfaltung. Dies konnte mittels der mittleren quadratischen Abweichung der Sekundärstrukturänderung verdeutlicht werden. Im Fall von Lysozym begünstigen hohe Drücke eine andere entfaltete Konformation als bei hohen Temperaturen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass die Adsorption von Proteinen an Silica-Teilchen die Faltungsstabilität gegenüber hohen Drücken und Temperaturen zu verringern scheint, während die Entfaltungswege im adsorbierten Zustand die gleichen sind. Obwohl in dieser Arbeit dies anhand zweier verschiedener Proteine demonstriert werden konnte, beschränkt sich die Erkenntnis auf die hier verwendeten Silica-Teilchen. Die verwendeten Silica-Teilchen besitzen eine partiell negative Oberflächenladung

und sind relativ stark hydrophil, sodass die Protein-Oberflächen-Wechselwirkungen von elektrostatischen Kräften dominiert werden und die Hydratation des adsorbierten Proteins der des freien Proteins in Lösung ähnelt. Andererseits könnten Proteine, wenn sie auf hydrophoben Oberflächen adsorbieren, einen anderen Entfaltungsweg durchlaufen als die Proteine, die sich frei in Lösung befinden. Konformelle Zwischenstufen des Proteins, die in wässriger Lösung nicht begünstigt werden, könnten durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der Oberfläche und dem Protein stabilisiert werden.

---

# 4 Wechselwirkung von Calmodulin mit Liganden\*

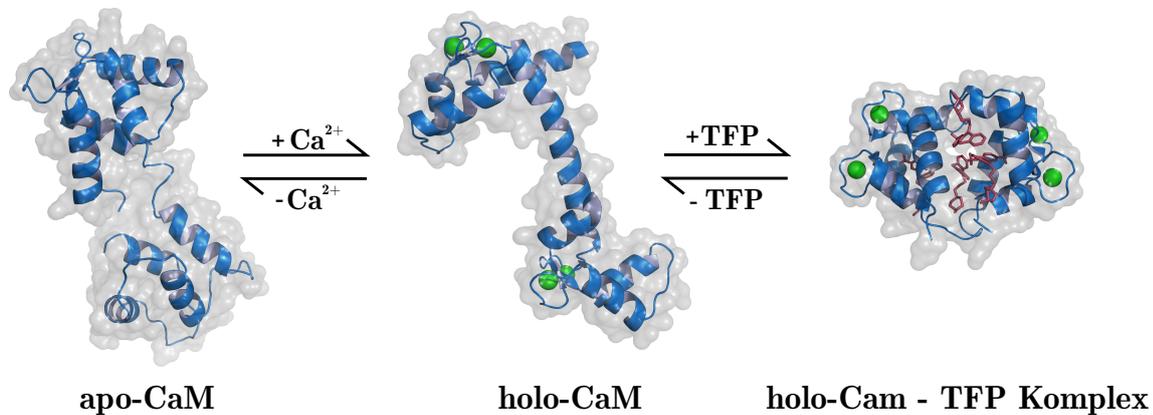
## 4.1 Einleitung

Calmodulin (CaM) ist ein ubiquitäres, hochkonserviertes, eukaryotisches Protein, das mit einer Reihe von verschiedenen Zielproteinen, die an verschiedenen Funktionen wie Muskelkontraktion, Apoptose, Stoffwechsel, Entzündungsreaktionen und Immunantwort beteiligt sind, interagiert und diese reguliert.<sup>[107]</sup> Für viele dieser zellulären Effekte wirkt Calmodulin als  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor.<sup>[108,109]</sup> Ein Beispiel ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -konzentrationsabhängige Interaktion mit dem natürlichen Bindepartner Caldesmon, der in der Aktin-Regulation eine wichtige Rolle spielt.<sup>[110]</sup> In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Calmodulin ebenfalls Proteine mit entgegengesetzten Funktionen, wie z.B. Phosphatasen und Kinasen, reguliert, wobei Calmodulin als Inhibitor oder auch als Aktivator fungieren kann.<sup>[111-113]</sup> Calmodulin besteht aus zwei globulären Domänen (N- und C-terminal), die jeweils zwei sogenannte EF-Hand- $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestellen besitzen.<sup>[114-116]</sup> Verbunden sind die beiden Domänen durch einen hochdynamischen Linker, der eine Umorientierung der beiden Domänen ermöglicht.<sup>[117-120]</sup>  $\text{Ca}^{2+}$  wird in einem kooperativen Mechanismus ( $K_D=5 \times 10^{-7}$ – $5 \times 10^{-6}$  M) gebunden, wobei die C-Domäne eine drei- bis vierfach höhere Affinität für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen besitzt als die N-Domäne.<sup>[121,122]</sup> Die Sekundärstruktur von Calm-

---

\*Teile der in diesem Kapitel vorgestellten Studie wurden in folgender Referenz publiziert:  
S. Cinar, S. Al-Ayoubi, C. Sternemann, J. Peters, R. Winter, C. Czeslik, High pressure study of calmodulin ligand interactions by small-angle X-ray and elastic incoherent neutron scattering, *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2018**, 20, 3514-3522.

odulin wird größtenteils durch  $\alpha$ -Helices dominiert. CaM hat eine Molmasse von etwa  $16\,800\text{ g mol}^{-1}$ . Bei einem neutralen pH-Wert besitzt Calmodulin in seiner  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-gebundenen Form eine starke negative Ladung von etwa  $-15$ .<sup>[120,123]</sup>



**Abbildung 4.1:** Bändermodell von apo-CaM, holo-CaM und holo-CaM gebunden mit vier TFP-Molekülen. Die Abbildungen wurden mit der Software PyMOL<sup>[84]</sup> unter Verwendung der PDB-IDs 1DMO,<sup>[124]</sup> 3CLN<sup>[125]</sup> und 1LIN<sup>[126]</sup> erzeugt. TFP ist als rotes Molekülmodell,  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sind als grüne Kugeln dargestellt.

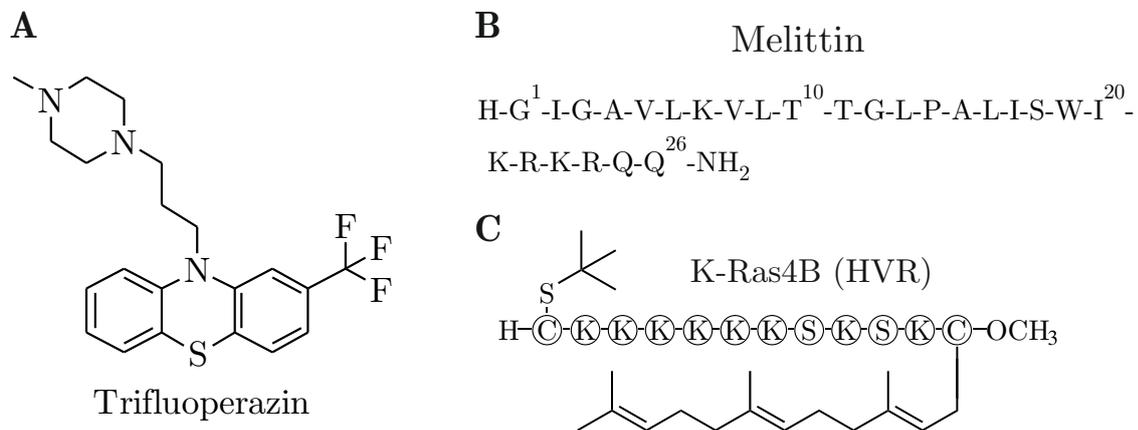
Die Art und Weise, wie Calmodulin mit seinen Liganden wechselwirkt, ist vielfältig. Typischerweise wird Calmodulin durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aktiviert, was zu einer Konformationsänderung und einer damit verbunden erhöhten Affinität ( $K_D=10^7\text{--}10^{-11}\text{ M}$ ) für Liganden wie Proteine, Peptide und kleine Moleküle führt.<sup>[108,120,127]</sup> Durch die Konformationsänderung werden hydrophobe Regionen freigelegt, an denen Wechselwirkungen mit den Zielproteinen stattfinden können. Calmodulin kann auch in seiner  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen freien Konformation (apo-CaM) Liganden binden, allerdings mit einer sehr geringen Affinität.<sup>[128–131]</sup> Die Wechselwirkungen sind stark von der umgebenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration abhängig und können reversibel oder irreversibel sein.<sup>[109,122]</sup> In der holo-Form (mit vier  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gesättigt) befindet sich Calmodulin in einer offenen, hantelförmigen Konformation. Bindet ein Ligand, wird eine geschlossene, globuläre Konformation ausgebildet (Abbildung 4.1). Die Calmodulin-Binderegionen von Proteinen, Peptiden und kleinen Molekülen besitzen mehrere charakteristische Merkmale wie eine positive Nettoladung und einen hydrophoben Rest. So sind bei einem holo-CaM/Liganden-Komplex elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen involviert. Beide Arten der Wechselwirkung hängen vom Druck ab. Druck

begünstigt die Dissoziation von Ionenbindungen bei etwa 2000 bar, da die Trennung und Hydratation der beiden Ionen zu einer dichteren Packung von hydratisierenden Wassermolekülen führt. Ebenso werden hydrophobe Wechselwirkungen bei Drücken von mehreren 1000 bar destabilisiert.<sup>[66]</sup> Somit ist der Druck ein nützlicher thermodynamischer Parameter, um die Calmodulin/Liganden-Wechselwirkung zu untersuchen.

In diesem Teil der Arbeit sollte einerseits die Wechselwirkung zwischen Calmodulin und zwei natürlichen Liganden sowie einem als Wirkstoff fungierenden Antagonisten charakterisiert, und andererseits der Einfluss der Liganden auf die Druck- und Temperaturstabilität von Calmodulin mittels verschiedener experimenteller Methoden untersucht werden. In weitergehenden Projekten (siehe Kapitel 5 und 6) wird CaM in Polymerfilmen an Grenzflächen eingebaut. Hierbei soll die große konformelle Variabilität des CaM genutzt werden, um schaltbare Grenzflächen aufzubauen. Die Schaltbarkeit soll über die Ligandenaffinität des CaM erreicht werden. Somit ist die Kenntnis über die Art und Stärke der CaM-Liganden-Wechselwirkung für die Arbeit von grundlegender Bedeutung.

Als stark bindender Antagonist wurde Trifluoperazin (TFP) gewählt (Abbildung 4.2A). TFP ist ein Antipsychotikum der Phenothiazin-Klasse und wird hauptsächlich bei der Behandlung von Schizophrenie und anderen verwandten psychischen Erkrankungen verwendet.<sup>[132]</sup> Die Bindung von TFP an Calmodulin induziert eine Konformationsänderung und verhindert dadurch die Interaktion von Calmodulin mit Target-Proteinen.<sup>[133–135]</sup> Es fungiert somit als Antagonist, wobei es häufig in Zellkulturen verwendet wird, um die Wechselwirkung zwischen Calmodulin und dessen Target-Protein zu stören und somit eine Signalkaskade zu unterbrechen.<sup>[136,137]</sup> TFP inhibiert z.B. die Bindung und Aktivität des Enzyms CaMKII.<sup>[131]</sup> Die Struktur von TFP entspricht dem Paradigma für Calmodulin-bindende Wirkstoffe, welches von Prozialeck und Weiss eingeführt wurde.<sup>[138]</sup> Studien zeigten, dass sowohl hydrophobe als auch elektrostatische Wechselwirkungen bei der Bindung eine wichtige Rolle spielen. Wichtig ist hierbei ein großer aromatischer Ring, der mit den unpolaren Regionen innerhalb von Calmodulin wechselwirkt und positiv geladene Gruppen, im Wesentlichen basische Stickstoffatome, die nicht weniger als drei Kohlenstoffatome vom hydropho-

ben Bereich entfernt sind.<sup>[139]</sup> In der Literatur sind verschiedene Stöchiometrien für den Calmodulin-TFP-Komplex bekannt. Drei Kristallstrukturen (PDB ID 1CTR,<sup>[140]</sup> 1A29,<sup>[141]</sup> 1LIN<sup>[126]</sup>) zeigen, dass TFP an das Ca<sup>2+</sup>-gesättigte Calmodulin in einem Verhältnis von 1:1, 2:1 oder 4:1 (TFP-Moleküle pro Calmodulin) bindet (Abbildung 4.1). In SAXS- und NMR-Experimenten konnte gezeigt werden, dass apo-CaM ebenfalls TFP bindet und infolgedessen eine geringfügig kompaktere Konformation ausbildet.<sup>[120,142]</sup> Zimmer und Hofmann unterteilten Calmodulin-Antagonisten in vier Gruppen. TFP gehört, neben Aprindin und Lidoflazin, zu den Antagonisten, die die Calmodulin-Aktivierung von Phosphodiesterase und Myosin-Kinase bei gleicher Konzentration kompetitiv hemmen.<sup>[143]</sup>



**Abbildung 4.2:** **A)** Struktur von Trifluoperazin, **B)** die Aminosäuresequenz von Melittin und **C)** die Aminosäuresequenz der hypervariablen Region von K-Ras4B. Am N-Terminalen Cystein befindet sich eine *S-tert*-Butyl-Gruppe (StBu) und am C-terminalen Cystein eine Farnesylgruppe.

Der erste natürliche Ligand von Calmodulin, der in dieser Arbeit verwendet wurde, ist das 26-Aminosäureketten-lange Peptid Melittin (Abbildung 4.2B), das ein Hauptbestandteil des Bienengifts ist und eine hoch potente hämolytische Wirkung besitzt. Durch die Aktivierung von Phospholipase A2 und durch Interaktion seines hydrophoben Teils mit Phospholipiden der Membran beeinflusst Melittin die Eigenschaften von Membranen und die Aktivitäten von Membran-assoziierten Enzymen.<sup>[144-147]</sup> Die ersten Anhaltspunkte eines Calmodulin-Melittin-Komplexes gehen auf die Arbeit von Katoh et al. (1981)<sup>[144]</sup> zurück und wurden durch Comte et al. (1982)<sup>[148]</sup> verifiziert.

Zur Zeit gibt es keine Kristallstruktur des Calmodulin/Melittin-Komplexes, jedoch ist aus Kleinwinkelstreuexperimenten bekannt, dass holo-CaM beim Binden von Melittin, vergleichbar mit der Bindung von TFP, eine große Konformationsänderung durchläuft und eine kompakte globuläre Konformation annimmt.<sup>[149]</sup> Melittin bindet mit einer sehr geringen Affinität ebenfalls an apo-CaM, was jedoch keine Konformationsänderung von Calmodulin zu einer globulären Konformation zur Folge hat.<sup>[149]</sup> Es wurde gezeigt, dass Melittin bei einer geringen Ionenstärke eine relativ ungeordnete Struktur besitzt und durch Komplexbildung mit Calmodulin  $\alpha$ -Helixstrukturen ausbildet.<sup>[148,150–152]</sup> Mit steigender Ionenstärke bildet Melittin Tetramere aus, in der die Melittin-Monomere ebenfalls eine  $\alpha$ -helikale Struktur annehmen.<sup>[153]</sup> Anders als bei TFP, ist die Bindungsstöchiometrie des Calmodulin/Melittin-Komplexes 1:1.<sup>[154]</sup>

Zudem werden in dieser Arbeit Messungen vorgestellt, bei denen als Calmodulin-Ligand die hypervariable Region (HVR) des Proteins K-Ras4B diente.<sup>†</sup> K-Ras4B gehört zur Familie der kleinen GTPasen und ist unter anderem beteiligt an Zellwachstum, Zelldifferenzierung und der Apoptose.<sup>[155]</sup> In etwa 30 % der menschlichen Tumore sind Punktmutationen an Ras-Genen zu finden, was die hohe Relevanz von K-Ras in der Forschung erklärt.<sup>[156,157]</sup> Studien zeigen, dass die Phosphorylierung von K-Ras4B durch Proteinkinase C durch CaM inhibiert wird.<sup>[158]</sup> Calmodulin bewirkt ebenso eine Dissoziation von K-Ras4B aus der Membran.<sup>[159]</sup> Für die Wechselwirkung mit Calmodulin ist vor allem die C-terminale HVR von K-Ras4B von besonderer Wichtigkeit.<sup>[160,161]</sup> Die HVR besitzt einen Farnesylrest und eine polybasische Region aus acht positiv geladenen Lysin-Resten, von denen sechs direkt aufeinander folgen (Abbildung 4.2C).

---

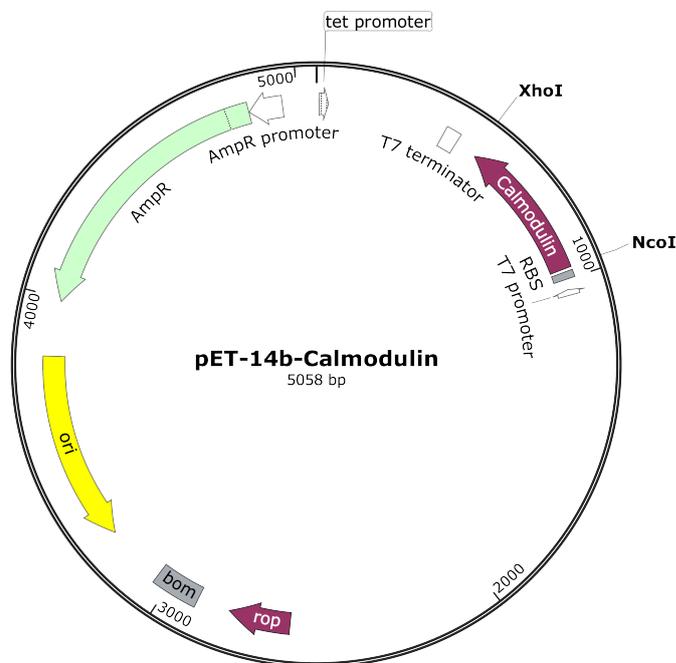
<sup>†</sup>Untersuchungen am Protein K-Ras4B sind ein Forschungsprojekt von Prof. Dr. R. Winter. Die in dieser Arbeit gezeigten Hochdruck-SAXS-EINS- und ITC-Messungen wurden parallel an Calmodulin-TFP-, und Calmodulin-K-Ras4B(HVR)-Proben in Zusammenarbeit mit Samy Al-Ayoubi durchgeführt, ausgewertet und interpretiert, wobei Samy Al-Ayoubi für die K-Ras4B(HVR)-Proben und der Autor dieser Arbeit für die TFP-Proben verantwortlich zeichnet.

## 4.2 Probenpräparation

### 4.2.1 Proteinbiochemische Methoden

#### 4.2.1.1 Transformation

Die Plasmidvektoren pET-14b mit der jeweiligen klonierten cDNA von Calmodulin aus der Ratte und den mutierten Varianten CaM<sup>T34C,T110C</sup>, CaM<sup>T26W,T34C,T110C</sup> wurden von der Firma GenScript (Piscataway, NJ, USA) erworben. Die Plasmidkarte ist in Abbildung 4.3 gezeigt. Die Aminosäuresequenzen von CaM<sup>T34C,T110C</sup>, CaM<sup>T26W,T34C,T110C</sup> sind im Anhang zu finden (Abbildung 9.1).



**Abbildung 4.3:** Schematische Darstellung des pET-14b-Vektors mit der cDNA von Calmodulin aus der Ratte. Erstellt mit der Software SnapGene.

Für die Transformation wurden zunächst 100  $\mu$ L chemisch kompetente *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL-Zellen (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) auf Eis aufgetaut, mit 1  $\mu$ L des entsprechenden Plasmids versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte die Hitzeschockbehandlung bei 42  $^{\circ}$ C für 30 s und eine 2 minütige Abkühlphase auf Eis. Danach wurden 500  $\mu$ L vorgewärmtes LB-Medium zugegeben und für 1 h bei 37  $^{\circ}$ C und 130 rpm im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden

100  $\mu$ L auf antibiotikahaltige Agarplatten ausplattiert und die Bakterien über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank wachsen gelassen.

#### 4.2.1.2 Proteinexpression von Calmodulin

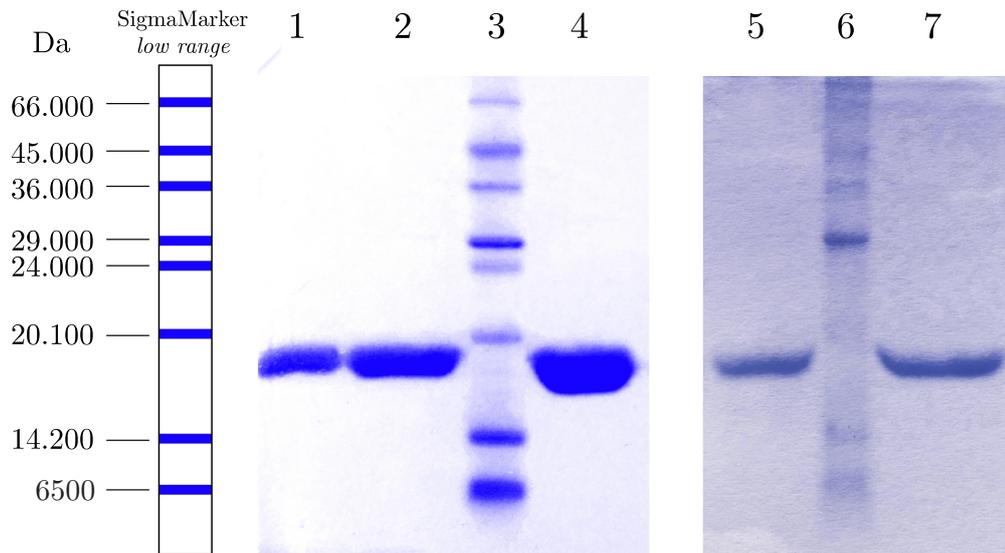
Für die Expression von CaM<sup>WT</sup>, CaM<sup>T34C,T110C</sup> und CaM<sup>T26W,T34C,T110C</sup> wurde zunächst eine Vorkultur angesetzt. Hierfür wurden 200 mL LB-Medium mit Chloramphenicol und Ampicillin versetzt und mit kompetenten *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL-Zellen, die das CaM-Plasmid tragen, angeimpft und die Vorkultur über Nacht bei 37 °C und 130 rpm inkubiert. Anschließend wurden sechs Kolben mit je 1.5 L TB-Medium mit Chloramphenicol und Ampicillin versetzt, mit 25 mL Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 130 rpm inkubiert. Beim Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0.6, wurde mit 1.5 mL IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) die Calmodulin-Expression induziert. Diese Hauptkultur wurde über Nacht bei 24 °C und 130 rpm inkubiert, die Zellen bei 4 °C und 6000 rpm abzentrifugiert und das erhaltene Zellpellet bis zur weiteren Aufreinigung bei –80 °C eingefroren.

#### 4.2.1.3 Zellyse und Aufreinigung von Calmodulin

Um das rekombinante Calmodulin zu isolieren, wurde das Zellpellet mit Lysepuffer und Ultraschallbehandlung (Branson Ultrasonics Sonifier S-450, Thermo Fisher) aufgeschlossen. Die Aufreinigung erfolgte mittels einer 20 mL-Phenyl-Sepharose-CL-4B-Säule (GE Healthcare). Zunächst wurde die Säule mit fünf Säulenvolumen Äquilibrierungspuffer äquilibriert und mit dem Protein beladen. Anschließend wurde die Säule mit zwei Säulenvolumen Waschpuffer I und anschließend mit Waschpuffer II gewaschen. Die Eluation erfolgte mit dem Eluationspuffer in Zwei-mL-Fraktionen. Die Fraktionen mit Protein wurden mittels Chromatographie-System ÄKTAprime plus (GE Healthcare) detektiert und zu einer Probe zusammengefügt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels UV-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die für die Zellyse und Aufreinigung verwendeten Lösungen und ihre Zusammensetzungen sind in Tabelle 4.1 zu finden. Die Reinheit wurde mittels SDS-Gel überprüft (Abbildung 4.4).

**Tabelle 4.1:** Für die Zellyse und Aufreinigung verwendete Lösungen und ihre Zusammensetzungen.

Lösung	Zusammensetzung
Lysepuffer	50 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, pH=7.5
Äquilibrierungspuffer	50 mM Tris/HCl, 5 mM CaCl <sub>2</sub> , 100 mM NaCl, pH=7.5
Waschpuffer I	50 mM Tris/HCl, 0.1 mM CaCl <sub>2</sub> , 100 mM NaCl, pH=7.5
Waschpuffer II	50 mM Tris/HCl, 0.1 mM CaCl <sub>2</sub> , 500 mM NaCl, pH=7.5
Elutionspuffer	100 mM Tris/HCl, 1 mM EGTA, pH=7.5



**Abbildung 4.4:** SDS-Gel nach der Aufreinigung des rekombinanten CaM<sup>T34C, T110C</sup> (Spalte 1: 5 µL, Spalte 2: 10 µL, Spalte 4: 20 µL), CaM<sup>WT</sup> (Spalte 5: 20 µL) und CaM<sup>T26W, T34C, T110C</sup> (Spalte 7: 20 µL). In Spalte 2 und 6 ist der Molekulargewichtsstandard (SigmaMarker, *low range*, M3913) aufgetragen.

### 4.2.2 FTIR-Experimente

Aufgrund der Überlagerung der H<sub>2</sub>O-Deformationsschwingung mit der Amid'-I-Bande wurden alle Messungen in D<sub>2</sub>O durchgeführt. Die verwendeten Proben und ihre Zusammensetzungen sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. Aufgrund der charakteristischen pD-Stabilität wurde für temperaturabhängige Messungen MOPS-Puffer und für druckabhängige BisTris-Puffer verwendet.<sup>[162]</sup> Alle druckabhängigen Experimente erfolgten bei 25 °C. Der pD-Wert wurde mit einer herkömmlichen pH-Elektrode, unter Berücksichtigung der Korrektur  $pD = pH\text{-Meter-Anzeige} + 0.4$  eingestellt.<sup>[89]</sup> Für einen vollständigen H/D-Austausch wurden die Proben zuvor in D<sub>2</sub>O auf 60 °C für 15 min erwärmt und nach dem Abkühlen lyophilisiert. Das Erwärmen der Proben bis knapp unter der Entfaltungstemperatur war nötig, weil während der Temperatur- und Druckentfaltung ebenfalls ein H/D-Austausch stattfinden kann. Durch das Erwärmen erfolgt ein Austausch der H-Atome innerhalb des Proteins durch D-Atome, wodurch Änderungen der Amid-I'-Bande während der Entfaltung durch einen H/D-Austausch ausgeschlossen werden können. Bei den Proben mit Ligand wurde der

entsprechende Ligand erst nach dem H/D-Austausch hinzugefügt. Für die H/D-Austauschexperimente wurden die Proben nicht erwärmt, sondern lediglich über Nacht in dem entsprechendem D<sub>2</sub>O-Puffer inkubiert.

Zur Herstellung von Ca<sup>2+</sup>-freiem Calmodulin (apo-CaM) wurde Calmodulin in einer EGTA-Lösung (5 mM EGTA, 150 mM NaCl, 20 mM MOPS-Puffer, pH=6.7) gelöst und in den Proteinkonzentrationsfilter Amicon Ultra (2 mL; 10 K) von Millipore pipettiert. Durch Zentrifugation bei 10 000 g für etwa 40 min wurde der Puffer weitestgehend entfernt. Anschließend wurde die im Filter verbliebene Lösung (etwa 100 µL) erneut mit EGTA-Puffer aufgefüllt und erneut bei 7000 g zentrifugiert. Der Vorgang wurde dreimal durchlaufen. Um das EGTA aus der Lösung zu entfernen, wurde der Vorgang dreimal mit Puffer-Lösung (150 mM NaCl, 20 mM MOPS-Puffer, pH=6.7) wiederholt. Die endgültige Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Spektrometer Nanodrop NanoVue Plus von der Firma GE Healthcare.

**Tabelle 4.2:** Für die FTIR-Experimente verwendete Proben und ihre Zusammensetzungen.

Probe	Zusammensetzung
apo-CaM	30 mg mL <sup>-1</sup> Calmodulin, 20 mM MOPS-Puffer bzw. 20 mM BisTris-Puffer, 150 mM NaCl, pD=6.8
holo-CaM	30 mg mL <sup>-1</sup> Calmodulin, 20 mM MOPS-Puffer bzw. 20 mM BisTris-Puffer, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 150 mM NaCl, pD=6.8
holo-CaM + TFP	30 mg mL <sup>-1</sup> Calmodulin, 5 äq. TFP, 20 mM MOPS-Puffer bzw. 20 mM BisTris-Puffer, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 150 mM NaCl, pD=6.8
holo-CaM + Melittin	30 mg mL <sup>-1</sup> Calmodulin, 1.2 äq. Melittin, 20 mM MOPS-Puffer bzw. 20 mM BisTris-Puffer, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 150 mM NaCl, pD=6.8

### 4.2.3 Röntgen-Kleinwinkelstreuexperimente (SAXS)

#### 4.2.3.1 Messungen am SAXSess mc<sup>2</sup>-Diffraktometer

Die Inkubationszeit von Calmodulin mit TFP bzw. Melittin vor jeder Messung betrug 30 min. Die Messzeit lag für jede Messung bei 30 min. Nach jeder Temperaturerhöhung wurde die Probe für 10 min äquilibriert. Zur Herstellung von Ca<sup>2+</sup>-freiem Calmodulin (apo-CaM) wurde Calmodulin in einer EGTA-Lösung (5 mM EGTA, 150 mM NaCl, 20 mM MOPS-Puffer, pH=6.7) gelöst und den Proteinkonzentrationsfilter Amicon Ultra (2 mL; 10 K) von Millipore pipettiert. Durch Zentrifugation bei 7000 g für etwa 40 min wurde der Puffer weitestgehend entfernt. Anschließend wurde die im Filter verbliebene Lösung (etwa 100 µL) erneut mit EGTA-Puffer aufgefüllt und bei

7000 g zentrifugiert. Der Vorgang wurde dreimal durchlaufen. Um das EGTA aus der Lösung zu entfernen, wurde der Vorgang dreimal mit Puffer-Lösung (150 mM NaCl, 20 mM MOPS-Puffer, pH=6.7) wiederholt. Die endgültige Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Spektrometers Nanodrop NanoVue Plus von der Firma GE Healthcare. Die verwendeten Proben und ihre Zusammensetzungen sind in Tabelle 4.3 aufgelistet.

**Tabelle 4.3:** Für die SAXS-Experimente am SAXSess mc<sup>2</sup>-Diffraktometer verwendeten Proben und ihre Zusammensetzungen.

---

Probe	Zusammensetzung
apo-CaM	0.6 mM Calmodulin, 20 mM MOPS-Puffer, 150 mM NaCl, pH=6.6
holo-CaM	0.6 mM Calmodulin, 20 mM MOPS-Puffer, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 150 mM NaCl, pH=6.6
holo-CaM + TFP	0.6 mM Calmodulin, 3 mM TFP, 20 mM MOPS-Puffer, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 150 mM NaCl, pH=6.6
holo-CaM + Melittin	0.6 mM Calmodulin, 0.72 mM Melittin, 20 mM MOPS-Puffer, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 150 mM NaCl, pH=6.6

---

### 4.2.3.2 Messungen am DELTA-Synchrotron

Die Inkubationszeit von Calmodulin mit TFP bzw. K-Ras4B(HVR) vor jeder Messung betrug 30 min. Die Messzeit lag für jede Messung bei 15 min. Nach jeder Druckerhöhung wurde die Probe für 10 min äquilibriert. Mit dem in der Software PRIMUS<sup>[163]</sup> integrierten Programm GNOM<sup>[164]</sup> wurde die  $p(r)$ -Funktion ermittelt. Die verwendeten Proben und ihre Zusammensetzungen sind in Tabelle 4.4 aufgelistet.

**Tabelle 4.4:** Für die SAXS-Experimente am DELTA-Synchrotron verwendete Proben und ihre Zusammensetzungen.

Probe	Zusammensetzung
apo-CaM	0.6 mM Calmodulin, 10 mM BisTris, 5 mM EGTA, 150 mM NaCl, pH=6.6
holo-CaM	0.6 mM Calmodulin, 10 mM BisTris, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 150 mM NaCl, pH=6.6
holo-CaM + TFP	0.6 mM Calmodulin, 3 mM TFP, 10 mM BisTris, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 150 mM NaCl, pH=6.6
holo-CaM + K-Ras4B(HVR)	0.6 mM Calmodulin, 0.9 mM K-Ras4B(HVR), 10 mM BisTris, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 150 mM NaCl, pH=6.6

#### 4.2.4 Elastische Inkohärente Neutronenstreu (EINS) - Messungen

Die Messungen erfolgten in D<sub>2</sub>O-Puffer bei pD=6.8 (pD = pH-Meter-Anzeige + 0.4).<sup>[89]</sup> Alle Messungen wurden bei 27 °C durchgeführt. Vor der ersten Messung der jeweiligen Probe erfolgte eine Inkubationszeit von Calmodulin mit TFP bzw. K-Ras4B(HVR) von 30 min. Die verwendeten Proben und ihre Zusammensetzungen sind in Tabelle 4.5 aufgelistet.

**Tabelle 4.5:** Für die EINS-Experimente verwendete Proben und ihre Zusammensetzungen.

Probe	Zusammensetzung
apo-CaM	6 mM Calmodulin, 50 mM BisTris, 20 mM EGTA, 150 mM NaCl, pD=6.6
holo-CaM	6 mM Calmodulin, 50 mM BisTris, 30 mM CaCl <sub>2</sub> , 150 mM NaCl, pD=6.6
holo-CaM + TFP	6 mM Calmodulin, 30 mM TFP, 50 mM Bis-Tris, 30 mM CaCl <sub>2</sub> , 150 mM NaCl, pD=6.6
holo-CaM + K-Ras4B(HVR)	6 mM Calmodulin, 9 mM K-Ras4B(HVR), 50 mM BisTris, 30 mM CaCl <sub>2</sub> , 150 mM NaCl, pD=6.6

### 4.2.5 Dynmatische Lichtstreuung (DLS)

Die DLS-Experimente wurden an einem Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Herrenberg) durchgeführt. Jeder Wert ist eine Mittelung aus drei Messungen mit jeweils zehn Einzelmessungen. Alle Proben wurden mit einem Filter der Porengröße 0.02  $\mu\text{m}$  (Anotop 25 Plus, GE Healthcare) gereinigt, um Staub und mögliche Aggregate zu entfernen. Vor jeder Messreihe erfolgte eine Inkubationszeit von Calmodulin mit den Liganden von 30 min. Die verwendeten Proben und ihre Zusammensetzung sind in Tabelle 4.6 aufgelistet.

**Tabelle 4.6:** Für die DLS-Experimente verwendete Proben und ihre Zusammensetzungen.

Probe	Zusammensetzung
holo-CaM	0.2 mM Calmodulin, 20 mM MOPS, 10 mM $\text{CaCl}_2$ , 150 mM NaCl, pH=6.6
holo-CaM + TFP	0.2 mM Calmodulin, 1 mM TFP, 10 mM $\text{CaCl}_2$ , 150 mM NaCl, pH=6.6
holo-CaM + Melittin	0.2 mM Calmodulin, 0.3 mM Melittin, 10 mM $\text{CaCl}_2$ , 150 mM NaCl, pH=6.6
holo-CaM + K-Ras4B(HVR)	0.2 mM Calmodulin, 0.26 mM K-Ras4B(HVR), 10 mM $\text{CaCl}_2$ , 150 mM NaCl, pH=6.6

### 4.2.6 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Vor Beginn jeder Messung wurden die Messzelle und die ITC-Spritze mehrfach mit 10 % Contrad<sup>®</sup> 70 Lösung und anschließend exzessiv mit Millipore-Wasser gereinigt. Jede Probe wurde vor der Messung für 5 min im Thermovac bei 15 °C entgast. Die Messzelle wurde mit 1.4 mL Calmodulin-Lösung und die ITC-Spritze mit 250 µL TFP- oder Melittin-Lösung beladen und anschließend in die Messzelle eingeführt. Die Referenzzelle wurde mit Millipore-Wasser befüllt. Vor Beginn der eigentlichen Messung wurde eine Vorkalibrierung durchgeführt und anschließend die Basislinie ermittelt. Sobald die Basislinie einen konstanten Verlauf aufzeigte, wurde die Messung im „High-gain“-Modus mit einer Referenzleistung von 11 µcal s<sup>-1</sup> gestartet. Alle Messungen erfolgten bei 25 °C. Es wurde jeweils ein Referenzexperiment durchgeführt. Hierzu wurde die Liganden-Lösung der jeweiligen Konzentration in die Messzelle mit reinem Lösungsmittel injiziert und anschließend die so gemessene Verdünnungswärme vom Gesamtexperiment abgezogen. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software Microcal Origin. Bei der TFP/holo-CaM- und K-Ras4B(HVR)/holo-CaM-Messung wurden jeweils 6 µL injiziert. Bei der Melittin/holo-CaM-Messung betragen die ersten acht Injektionen 12 µL und die restlichen 6 µL. Die verwendeten Proben und ihre Zusammensetzung sind in Tabelle 4.7 aufgelistet.

**Tabelle 4.7:** Für die ITC-Experimente verwendete Proben und ihre Zusammensetzungen.

Probe	Zusammensetzung
<b><u>TFP/holo-CaM</u></b>	
Messzelle	0.023 mM Calmodulin, 20 mM HEPES, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 150 mM NaCl, pH=6.6
ITC-Spritze	0.7 mM TFP, 20 mM HEPES, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 150 mM NaCl, pH=6.6
<b><u>Melittin/holo-CaM</u></b>	
Messzelle	0.04 mM Calmodulin, 20 mM HEPES, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 150 mM NaCl, pH=6.6
ITC-Spritze	0.333 mM Melittin, 20 mM HEPES, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 150 mM NaCl, pH=6.6
<b><u>K-Ras4B(HVR)/holo-CaM</u></b>	
Messzelle	0.04 mM Calmodulin, 20 mM HEPES, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 150 mM NaCl, pH=6.6
ITC-Spritze	0.33 mM K-Ras4B(HVR), 20 mM HEPES, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 150 mM NaCl, pH=6.6

### 4.2.7 Fluoreszenzmessungen

Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. Die Messungen der jeweiligen Spektren erfolgte nach einer Inkubationszeit von mindestens 10 min. Die verwendete Proben und ihre Zusammensetzungen sind in Tabelle 4.8 aufgelistet.

**Tabelle 4.8:** Für die Fluoreszenz-Experimente verwendeten Proben und ihre Zusammensetzungen.

---

Probe	Zusammensetzung
holo-CaM <sup>T26W</sup>	0.6 mM Calmodulin <sup>T26W</sup> , 20 mM BisTris-Puffer, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 150 mM NaCl, 0.5 mM TCEP, pH=6.6
holo-CaM <sup>T26W</sup> + TFP	0.6 mM Calmodulin <sup>T26W</sup> , 3 mM TFP, 20 mM BisTris-Puffer, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 150 mM NaCl, 0.5 mM TCEP, pH=6.6
holo-CaM <sup>T26W</sup> + Melittin	0.6 mM Calmodulin <sup>T26W</sup> , 0.9 mM Melittin, 20 mM BisTris-Puffer, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 150 mM NaCl, 0.5 mM TCEP, pH=6.6
Melittin	0.9 mM Melittin, 20 mM BisTris-Puffer, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 150 mM NaCl, pH=6.6

---

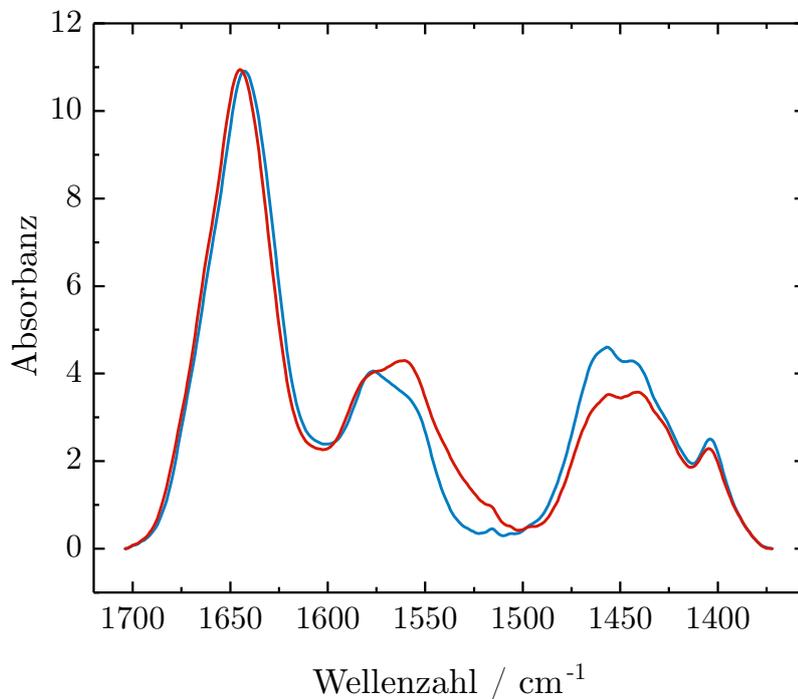
## 4.3 Ergebnisse

### 4.3.1 FTIR-Experimente

Mittels FTIR-Spektroskopie sollte einerseits der Einfluss von unterschiedlichen Liganden auf die Sekundärstruktur von Calmodulin und andererseits deren Auswirkungen auf die Druck- und Temperaturstabilität von Calmodulin untersucht werden. Als Ligand wurde das Molekül Trifluoperazin (TFP) und das Peptid Melittin verwendet. Untersucht wurde neben der  $\text{Ca}^{2+}$ -gesättigten holo-Form, die  $\text{Ca}^{2+}$ -freie apo-Form. Wie in Abschnitt 4.1 beschrieben, führt die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an Calmodulin zu einer Konformationsänderung, verbunden mit einer erhöhten Affinität ( $K_D=10^{-7}$  M bis  $10^{-11}$  M) gegenüber Liganden, wodurch die Analyse der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung wichtige Informationen zur Ligandenbindung und somit zur Tertiärstruktur von Calmodulin liefern kann. Ein Unterschied zwischen der  $\text{Ca}^{2+}$ -gesättigten holo-Form und der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien apo-Form lässt sich in dem Wellenzahlenbereich von  $1550\text{--}1590\text{ cm}^{-1}$  ausmachen, welcher durch die antisymmetrische Streckschwingung der  $\text{COO}^-$ -Gruppen von Aspartat und Glutamat verursacht wird.<sup>[165,166]</sup> Calmodulin besitzt 38  $\text{COO}^-$ -Gruppen (17 Asp und 21 Glu) von denen sich 16 in den  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Regionen befinden, wobei wiederum 14 Seitenketten direkt an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Koordination beteiligt sind.<sup>[166]</sup>

Zur Untersuchung der antisymmetrischen Streckschwingung der  $\text{COO}^-$ -Gruppen sowie der Amid-I'-Bande war ein vollständiger H/D-Austausch nötig. Einerseits überlappt die antisymmetrische Streckschwingung der  $\text{COO}^-$ -Gruppen mit der Amid-II-Bande (NH-Streckschwingung,  $1560\text{ cm}^{-1}$ ). Andererseits verursacht der Austausch von Wasserstoff durch Deuterium aufgrund der größeren reduzierten Masse eine Verschiebung der Amid-I'-Bande zu kleineren Wellenzahlen. Ein kompletter H/D-Austausch konnte durch Inkubation der Proben in  $\text{D}_2\text{O}$  über Nacht nicht erreicht werden. Um Fehlinterpretationen aufgrund eines H/D-Austausches während der Temperatur- und Druckapplikation zu vermeiden und Änderungen in der Amid-I'-Bande dem Entfaltungsprozess zuordnen zu können, wurden die Proben für 30 min auf  $60\text{ }^\circ\text{C}$  erwärmt und anschließend abgekühlt, um den H/D-Austausch zu beschleunigen.

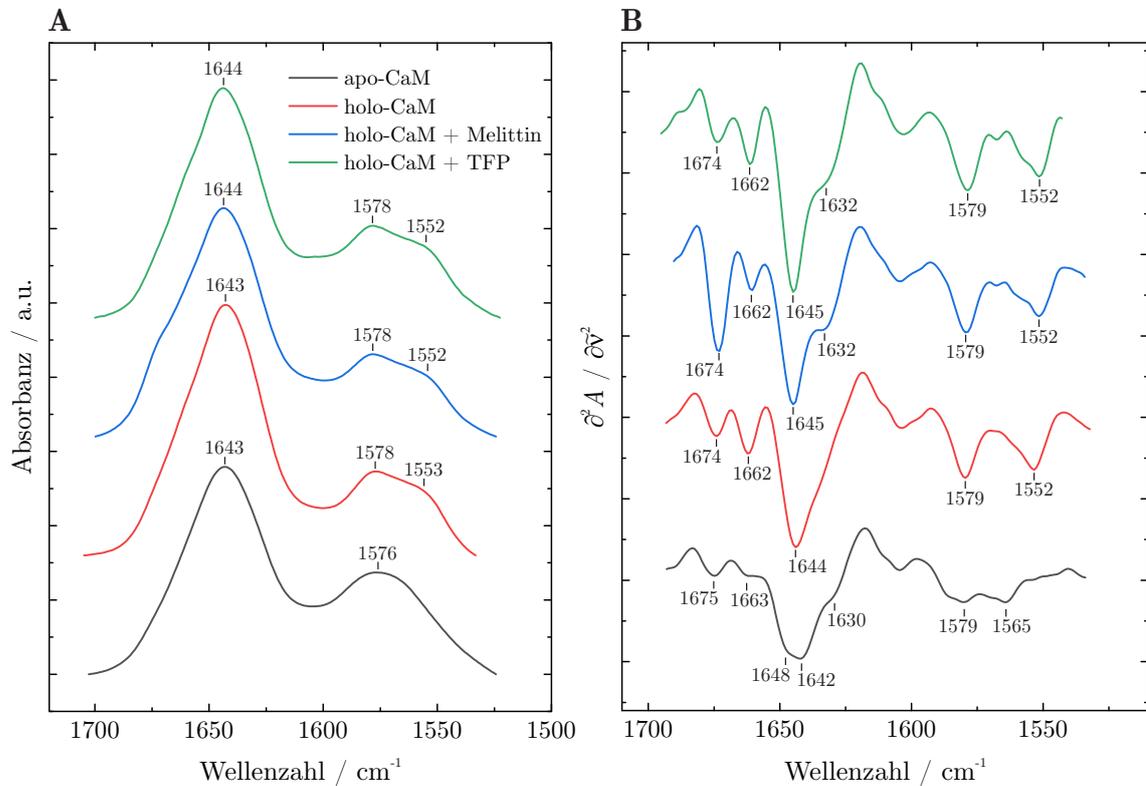
Die FTIR-Spektren im Bereich von  $1700\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$  nach Inkubation über Nacht und nach Erwärmen auf  $60\text{ °C}$  sind in Abbildung 4.5 dargestellt.



**Abbildung 4.5:** Im Bereich von  $1700\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$  flächennormierte FTIR-Spektren von holo-CaM nach Inkubation über Nacht bei  $25\text{ °C}$  (—) und nach Erwärmen auf  $60\text{ °C}$  und anschließendem Abkühlen auf  $25\text{ °C}$  (—).

Nach dem Erwärmen nimmt die Absorbanz der N-H-Schwingungsbande bei  $1560\text{ cm}^{-1}$  ab und die der N-D-Schwingung bei  $1460\text{ cm}^{-1}$  zu. Ebenso ist aufgrund der Deuterierung und der damit verbundenen größeren reduzierten Masse die Amid-I'-Bande zu kleineren Wellenzahlen verschoben. Wie die SAXS-Experimente zeigen (Abschnitt 4.3.2), beeinträchtigt das Erwärmen von Calmodulin auf  $60\text{ °C}$  und das anschließende Abkühlen nicht die Funktionalität. Das Binden der Liganden und die daraus resultierende Konformationsänderung von der offenen zur kompakten globulären Form ist weiterhin gegeben. In Abbildung 4.6 sind die im Bereich von  $1700\text{--}1525\text{ cm}^{-1}$  flächennormierten FTIR-Spektren von apo-CaM, holo-CaM, holo-CaM + TFP und holo-CaM + Melittin gezeigt. Das Maximum der Amid-I'-Banden von apo- und holo-CaM liegt bei  $1643\text{ cm}^{-1}$ , das von holo-CaM mit TFP bzw. Melittin bei  $1644\text{ cm}^{-1}$ . Die Formen der Amid-I'-Banden sind recht ähnlich, wobei kleinere Unterschiede in der zweiten Ableitung der Amid-I'-Bande zu erkennen sind (Abbil-

dung 4.6B). In allen zweiten Ableitungen sind Bandenminima bei  $1674/1675\text{ cm}^{-1}$  und  $1662/1663\text{ cm}^{-1}$  vorhanden, die sich Schleifenstrukturen zuordnen lassen.<sup>[167]</sup>



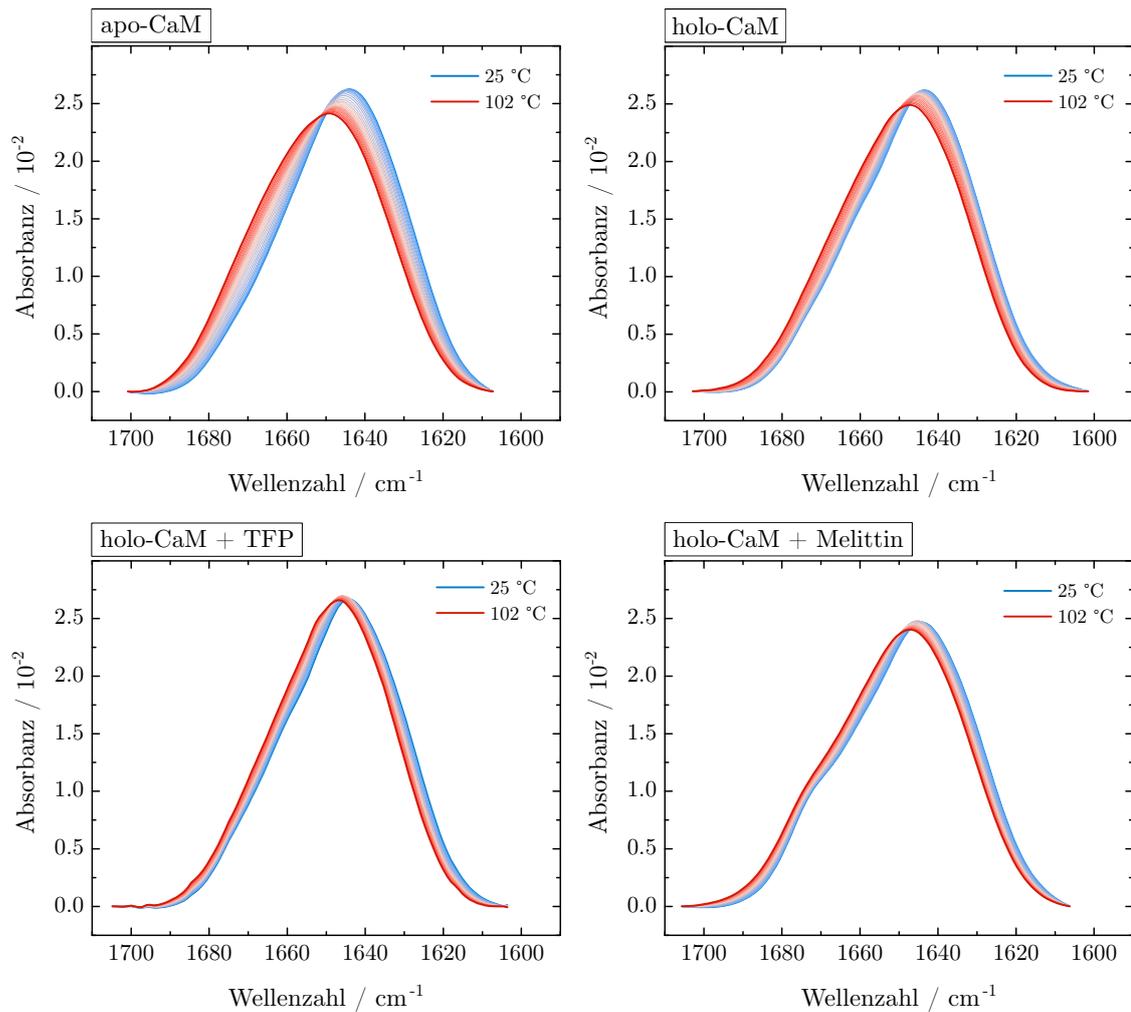
**Abbildung 4.6:** **A)** Im Bereich von  $1700\text{--}1524\text{ cm}^{-1}$  flächennormierte FTIR-Spektren der Amid-I'-Bande und deren **B)** zweite Ableitung von (—) apo-CaM, (—) holo-CaM, (—) holo-CaM + TFP und (—) holo-CaM + Melittin. Zur besseren Übersicht wurden die FTIR-Spektren vertikal verschoben.

Wie bereits aus der Kristallstruktur und auch aus CD-<sup>[168]</sup> und NMR-Experimenten<sup>[169]</sup> bekannt, machen  $\alpha$ -Helix-Strukturen den größten Anteil der Sekundärstruktur von Calmodulin aus. In der Regel sind  $\alpha$ -Helices bei  $1653\text{ cm}^{-1}$  zu finden. Bei exponierten  $\alpha$ -Helices ist die Bandenposition zu kleineren Wellenzahlen verschoben. Calmodulin, Parvalbumin und Troponin C sind bekannt dafür, dass sie einen hohen Anteil an  $\alpha$ -Helices besitzen, aber das Maximum der Amid-I'-Bande bei etwa  $1644\text{ cm}^{-1}$  liegt.<sup>[167,170,171]</sup> Apo-CaM besitzt neben einem Minimum bei  $1642\text{ cm}^{-1}$  eine ausgeprägte Schulter bei  $1648\text{ cm}^{-1}$ , die aus der unterschiedlichen Bandenposition der  $\alpha$ -Helices der C- und N-terminalen Domänen resultiert.<sup>[172]</sup> Weiterhin liegt bei apo-CaM, wie auch bei holo-CaM mit TFP oder Melittin, ein Minimum

bei  $1632/1630\text{ cm}^{-1}$  vor, welches in holo-CaM nicht aufgelöst ist. In der Regel wird diese Bandenposition  $\beta$ -Faltblattstrukturen zugeschrieben, jedoch besitzt Calmodulin in seiner Kristallstruktur nur etwa 6 %  $\beta$ -Faltblatt-Anteile. Kurze Linkerbereiche zwischen  $\alpha$ -Helix-Zylindern weisen aber ebenfalls Banden in dieser Wellenzahlregion auf.<sup>[39]</sup> Unter anderem zeigen zum Lösungsmittel exponierte  $\alpha$ -Helices Bandenpositionen im Bereich von  $1630\text{ cm}^{-1}$ .<sup>[38,173,174]</sup> Neben holo-CaM absorbiert ebenfalls Melittin im Bereich von  $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ , wodurch die gemessene Amid-I'-Bande des holo-CaM/Melittin-Komplexes eine Überlagerung beider Amid-I'-Banden darstellt. Der Absorptionsanteil von Melittin ist jedoch relativ gering (Abbildung 9.4A, Anhang). Wie in Abschnitt 4.1 bereits beschrieben, ändert sich bei Melittin, wie auch bei Calmodulin, durch die Komplexbildung die Konformation. Melittin besitzt in der ungebundenen Form eine eher ungeordnete Struktur und bildet durch die Bindung an Calmodulin  $\alpha$ -Helix-Strukturen aus.<sup>[148,150–152]</sup> Die Summe der Amid-I'-Bande von Melittin und holo-CaM unterscheidet sich von der Amid-I'-Bande des holo-CaM/Melittin-Komplexes. Das Maximum der Amid-I'-Banden aus der Summe der flächennormierten Amid-I'-Banden von holo-CaM und Melittin liegt bei  $1642\text{ cm}^{-1}$ , das vom holo-CaM/Melittin-Komplex ist zu  $1644\text{ cm}^{-1}$  verschoben (Abbildung 9.4B, Anhang). Trifluoperazin weist keine Schwingungsbande im Bereich der Region der Amid-I'-Bande auf. Holo-CaM besitzt in der zweiten Ableitung Banden bei  $1552\text{ cm}^{-1}$  und  $1579\text{ cm}^{-1}$  in An- und Abwesenheit der beiden Liganden. Die beiden Banden resultieren aus der antisymmetrischen Streckerschwingung der Seitenketten Aspartat und Glutamat, die an der Koordination von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen beteiligt sind.<sup>[165,175]</sup> In der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien apo-Form hingegen ist die  $1552\text{ cm}^{-1}$ -Bande vollständig zu  $1556\text{ cm}^{-1}$  verschoben, was mit der in der Literatur angegebenen Bandenpositionen übereinstimmt.<sup>[165,175]</sup>

## Temperaturstabilität

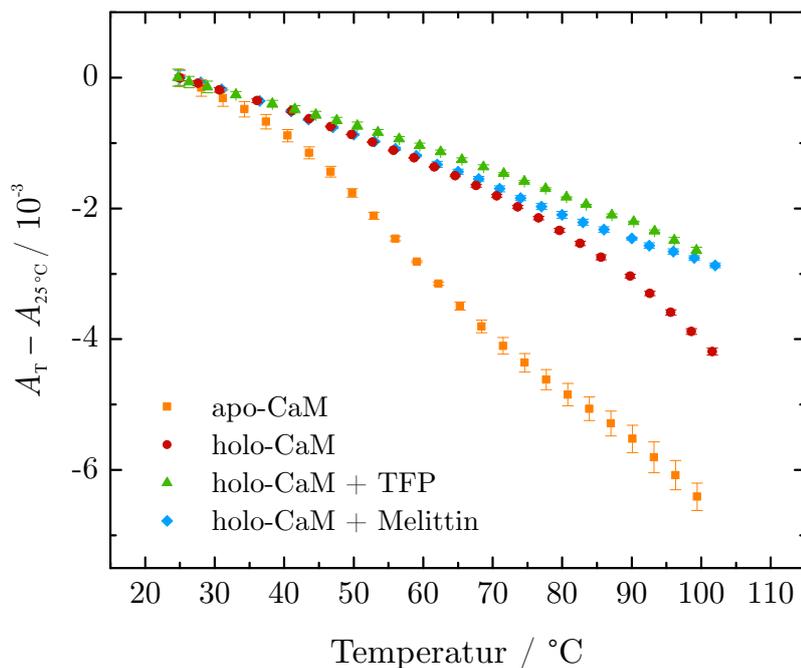
Die temperaturabhängigen FTIR-Spektren von vollständig deuteriertem apo-CaM, holo-CaM, holo-CaM + 1.5 äq. Melittin und holo-CaM + 5 äq. TFP sind in Abbildung 4.7 gezeigt.



**Abbildung 4.7:** Im Bereich von 1700–1600 cm<sup>-1</sup> flächennormierte FTIR-Spektren der temperaturabhängigen Messungen der Amid-I'-Bande von apo-CaM, holo-CaM, holo-CaM + TFP und holo-CaM + Melittin. Vermessen wurde der Temperaturbereich 25–102 °C. Die Messungen wurden zwei- bis dreimal reproduziert.

Wie bereits an der Änderung der Amid-I'-Bande zu sehen, ist der Temperatureinfluss auf die Sekundärstruktur von apo-CaM am größten. Das Maximum der Amid-I'-Bande verschiebt sich von 1643 cm<sup>-1</sup> zu 1649 cm<sup>-1</sup>, während sich das Maximum der Amid-I'-

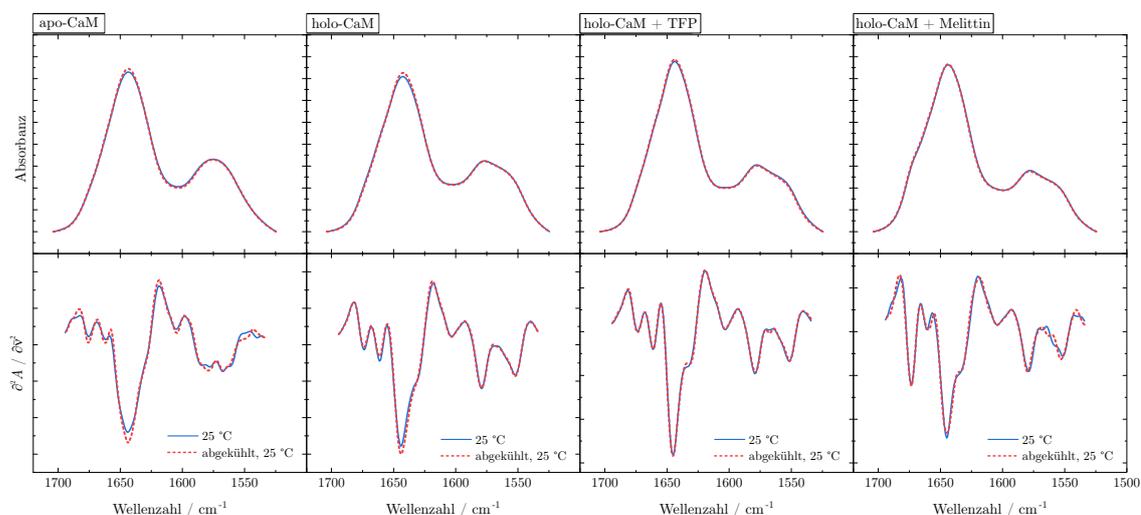
Bande des holo-CaM von  $1643\text{ cm}^{-1}$  zu  $1647\text{ cm}^{-1}$  verschiebt. Der CaM/TFP-, sowie der CaM/Melittin-Komplex zeigen die kleinsten Änderungen in ihren temperaturabhängigen Amid-I'-Banden. In beiden Fällen verschiebt sie sich von  $1644\text{ cm}^{-1}$  zu  $1646\text{ cm}^{-1}$ . Die Auftragung der Intensität bei  $1635\text{ cm}^{-1}$  als Funktion der Temperatur veranschaulicht die relative Änderung der Amid-I'-Bande.



**Abbildung 4.8:** Die Differenz der Absorbanz der jeweiligen Temperatur und der Absorbanz bei  $25\text{ °C}$  bei  $1635\text{ cm}^{-1}$  der flächennormierten Amid-I'-Spektren von apo-CaM, holo-CaM, holo-CaM + TFP und holo-CaM + Melittin ist als Funktion der Temperatur gezeigt.

Die größte Intensitätsänderung zeigt das  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Calmodulin (apo-CaM). Der Wendepunkt bei  $58\text{ °C}$  deutet auf die Entfaltung des Proteins hin. Bei der holo-Form sind hingegen erst ab  $80\text{ °C}$  kleine Änderungen zu beobachten. Durch das Binden von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen scheint die Sekundärstruktur gegen thermische Entfaltung stabilisiert zu werden. Das Troponin C, welches eine hohe Homologie zu Calmodulin besitzt, wird ebenfalls durch Binden von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen stabilisiert.<sup>[176]</sup> Die Ergebnisse stimmen gut mit CD-<sup>[177]</sup> und NMR-Spektroskopie<sup>[178]</sup>- Studien in der Literatur überein. Berichtet wird von einer Entfaltungstemperatur von  $55\text{ °C}$  für die apo-Form, während die holo-Form bis über  $90\text{ °C}$  stabil ist<sup>[177]</sup> oder nur kleine Änderungen

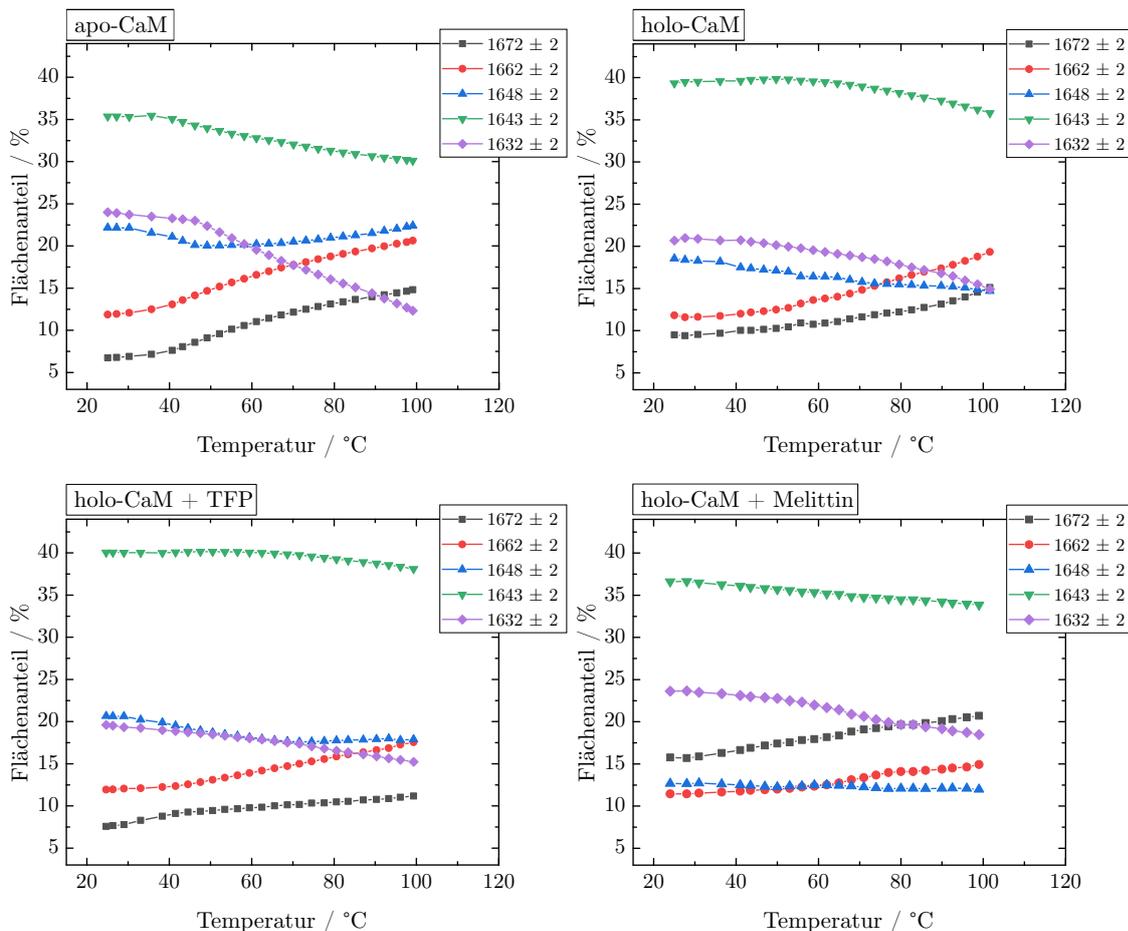
beobachtet wurden.<sup>[178]</sup> In beiden Studien war die Reversibilität von apo-CaM nicht vollständig, wenn die Probe bis auf 90 °C erwärmt wurde. Die NMR-Spektroskopie-Experimente zeigten jedoch eine vollständige Reversibilität der Entfaltung für die apo-Form beim Aufheizen bis maximal 70 °C.<sup>[178]</sup> Bei den temperaturabhängigen FTIR-Experimenten in dieser Arbeit waren alle Änderungen vollständig reversibel, wie in Abbildung 4.9 zu sehen ist. Gezeigt sind die Amid-I'-Banden und deren zweite Ableitungen bei 25 °C und nach dem Abkühlen von 95 °C auf 25 °C.



**Abbildung 4.9:** Flächennormierte Amid-I'-Banden und die zweite Ableitung von apo-CaM, holo-CaM, holo-CaM + TFP und holo-CaM + Melittin bei 25 °C und nach Abkühlen von 95 °C auf 25 °C.

Wenn Calmodulin vier TFP-Moleküle oder ein Melittin-Molekül bindet, zeigt es die größte Stabilität gegenüber thermischer Entfaltung. Bis 100 °C ist kein signifikanter Unterschied in der Amid-I'-Bande zu beobachten. Die geringe Verschiebung der Amid-I'-Bande zu größeren Wellenzahlen lässt sich ebenso durch den Temperatureffekt auf die Wasserstoffbrücken erklären.<sup>[179]</sup> Die Frequenzlage der Amid-I'-Bande hängt von der Stärke der ausgebildeten Wasserstoffbrücken der  $\alpha$ -Helices im Protein ab. Je stärker die Wasserstoffbrückenbindung ist, desto mehr Elektronendichte wird von der C=O-Bindung abgezogen, die Kraftkonstante  $k$  der Carbonylschwingung wird kleiner, und nach  $\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$  wird auch die Schwingungsfrequenz geringer. Mit steigender Temperatur werden Wasserstoffbrücken geschwächt, wodurch die Kraftkonstante der Carbonylgruppe größer wird und sich somit die Frequenzlage der

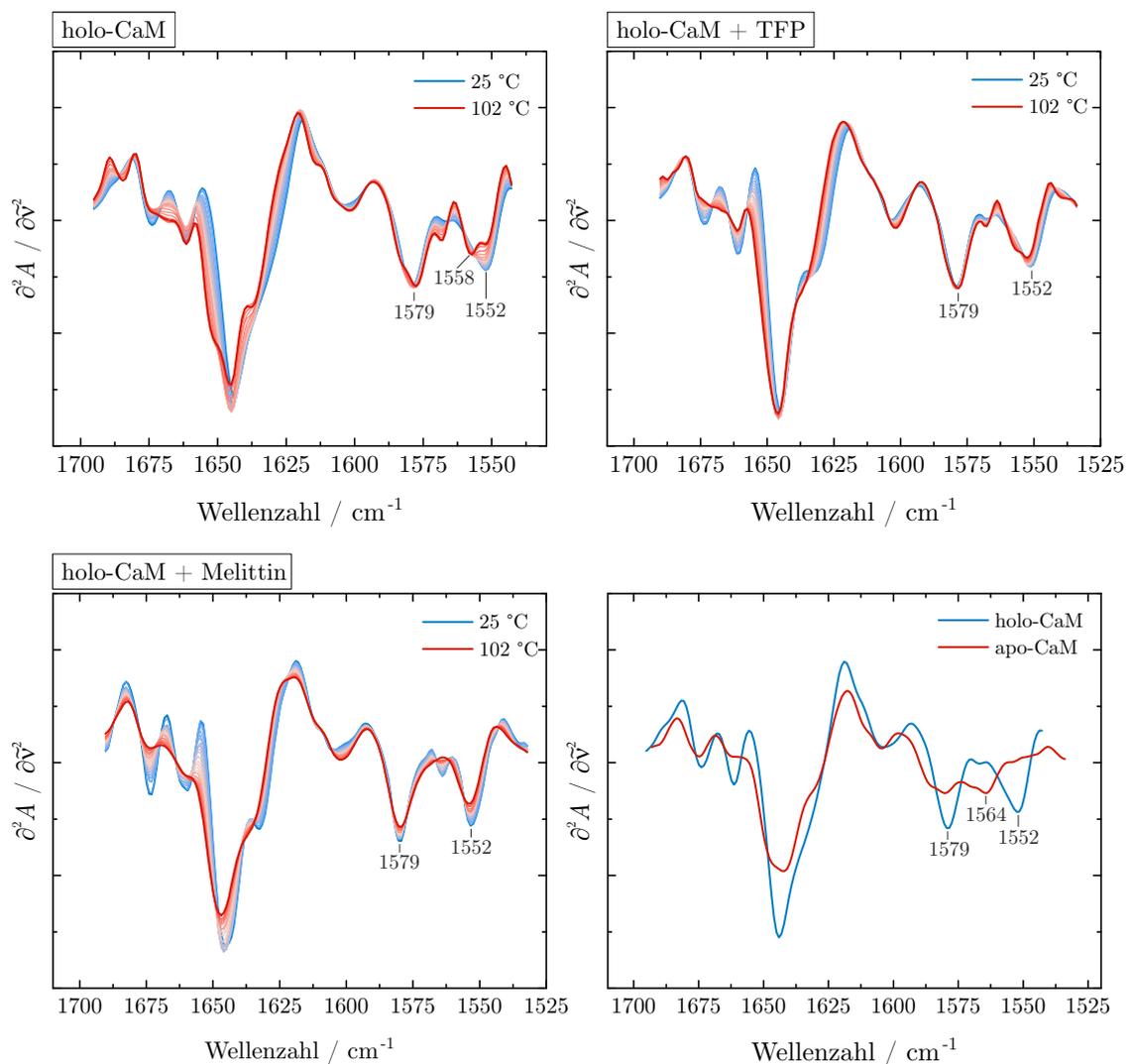
Amid-I'-Bande zu größeren Wellenzahl verschiebt. Zur genaueren Untersuchung wurde eine temperaturabhängige Sekundärstrukturanalyse durchgeführt (Abbildung 4.10). Es konnten insgesamt fünf Subbanden ermittelt werden. Die ermittelten Subbanden für apo-CaM wurden als Referenz für holo-CaM, holo-CaM + TFP und holo-CaM + Melittin verwendet. Die an die Amid-I'-Bande von apo-CaM angepassten Subbanden sind im Anhang gezeigt (Abbildung 9.3, Anhang).



**Abbildung 4.10:** Sekundärstrukturanalyse der temperaturabhängigen Messungen von apo-CaM, holo-CaM, holo-CaM + TFP und holo-CaM + Melittin. Die Sekundärstrukturanteile in % sind als Funktion der Temperatur aufgetragen.

Mittels der FTIR-Sekundärstrukturanalyse können gut relative Änderungen bestimmt werden. Die Sekundärstrukturanteile bei 25 °C wurden Kristallstrukturanalysen in der Literatur entnommen und bei der Bandenanpassung berücksichtigt.<sup>[125]</sup> Die größte Sekundärstrukturänderung durchläuft apo-CaM. Generell lässt sich eine Zunahme an

Schleifenstrukturen auf Kosten von  $\alpha$ -Helix-Strukturen beobachten. Die Subbande bei  $1632\text{ cm}^{-1}$  nimmt durch die Temperaturapplikation um mehr als 12 % ab, während die beiden Subbanden bei  $1672\text{ cm}^{-1}$  und  $1662\text{ cm}^{-1}$  zusammen um etwa 15 % zunehmen. In der holo-Form fallen die Änderungen aufgrund der stabilisierenden Wirkung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf Calmodulin geringer aus. Die Subbande bei  $1632\text{ cm}^{-1}$  sinkt um etwa 7 % und die beiden Subbanden bei  $1672\text{ cm}^{-1}$  und  $1662\text{ cm}^{-1}$  steigen zusammen um etwa 10 % an.

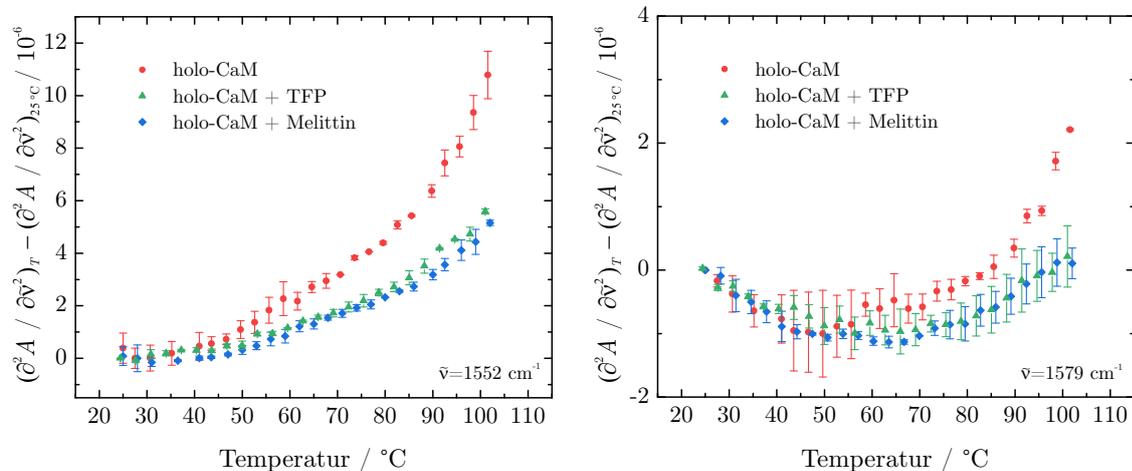


**Abbildung 4.11:** Zweite Ableitung der im Bereich von  $1700\text{--}1530\text{ cm}^{-1}$  flächennormierten FTIR-Spektren von holo-CaM, holo-CaM + TFP, holo-CaM + Melittin und Vergleich von apo-CaM und holo-CaM bei 25 °C (unten rechts).

Wenn TFP oder Melittin an Calmodulin gebunden ist, scheint Calmodulin am sta-

bilsten gegen thermische Entfaltung zu sein. Mittels der Sekundärstrukturanalyse sind lediglich Änderung von etwa 5 % zu beobachten (Abbildung 4.10). Wie bereits beschrieben, können solche kleinen Änderungen jedoch auch aufgrund des Temperatureffekts auf die Wasserstoffbrückenbindungen zustande kommen.

Zur Untersuchung der  $\text{Ca}^{2+}$ -spezifischen Banden wurde aus den flächennormierten Spektren im Bereich von  $1700\text{--}1530\text{ cm}^{-1}$  die zweite Ableitung gebildet (Abbildung 4.11). Mit steigender Temperatur ist bei holo-CaM eine leichte Verschiebung der Bande bei  $1552\text{ cm}^{-1}$  zu  $1558\text{ cm}^{-1}$  zu beobachten, was auf einen Verlust von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen hindeutet. Jedoch ist die Bande bei  $100\text{ °C}$  noch größtenteils vorhanden. Bei Calmodulin gebunden mit TFP oder Melittin ist eine Abnahme der Intensität bei  $1552\text{ cm}^{-1}$  wesentlich geringer, was sich gut mit der Auswertung der Amid-I'-Bande deckt. Die Auftragung der Intensität der zweiten Ableitung bei  $1552\text{ cm}^{-1}$  und  $1579\text{ cm}^{-1}$  als Funktion der Temperatur ermöglicht einen quantitativen Vergleich. Die Zunahme der Intensität ist ein Maß für dissoziierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen.



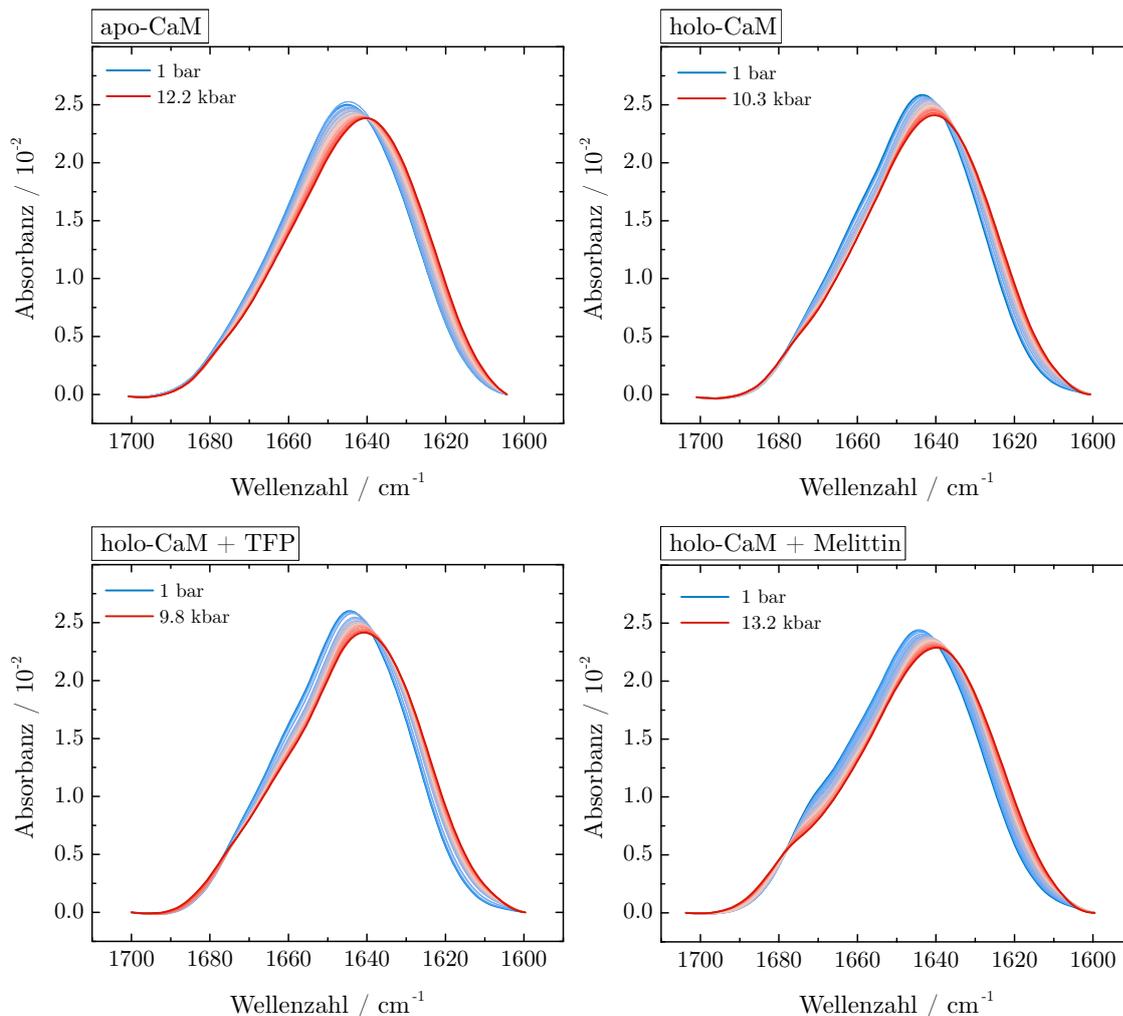
**Abbildung 4.12:** Die zweite Ableitung der Absorbanz bei  $1552\text{ cm}^{-1}$  und  $1579\text{ cm}^{-1}$  der flächennormierten Amid-I'-Spektren von apo-CaM, holo-CaM, holo-CaM + TFP und holo-CaM + Melittin wurde als Funktion der Temperatur aufgetragen. Als Offset wurde von jeder Absorbanz die Absorbanz bei  $25\text{ °C}$  bar subtrahiert.

Eine deutliche Abnahme der Intensität der Bande bei  $1552\text{ cm}^{-1}$  bei holo-CaM beginnt bei  $80\text{ °C}$ , was gleichzusetzen ist mit der Freisetzung der gebundenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen.<sup>[180]</sup> Die TFP- und die Melittin- gebundene holo-Form sind nahe zu identisch. Holo-CaM

verliert im Laufe der Temperaturerhöhung früher seine  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen als die Liganden-gebundene Form, was auf eine Stabilisierung der Konformation von holo-CaM durch Liganden-Bindung hindeutet. Für andere  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine wie Parvalbumin konnte ebenfalls ein temperaturabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung beobachtet werden.<sup>[181]</sup>

## Druckstabilität

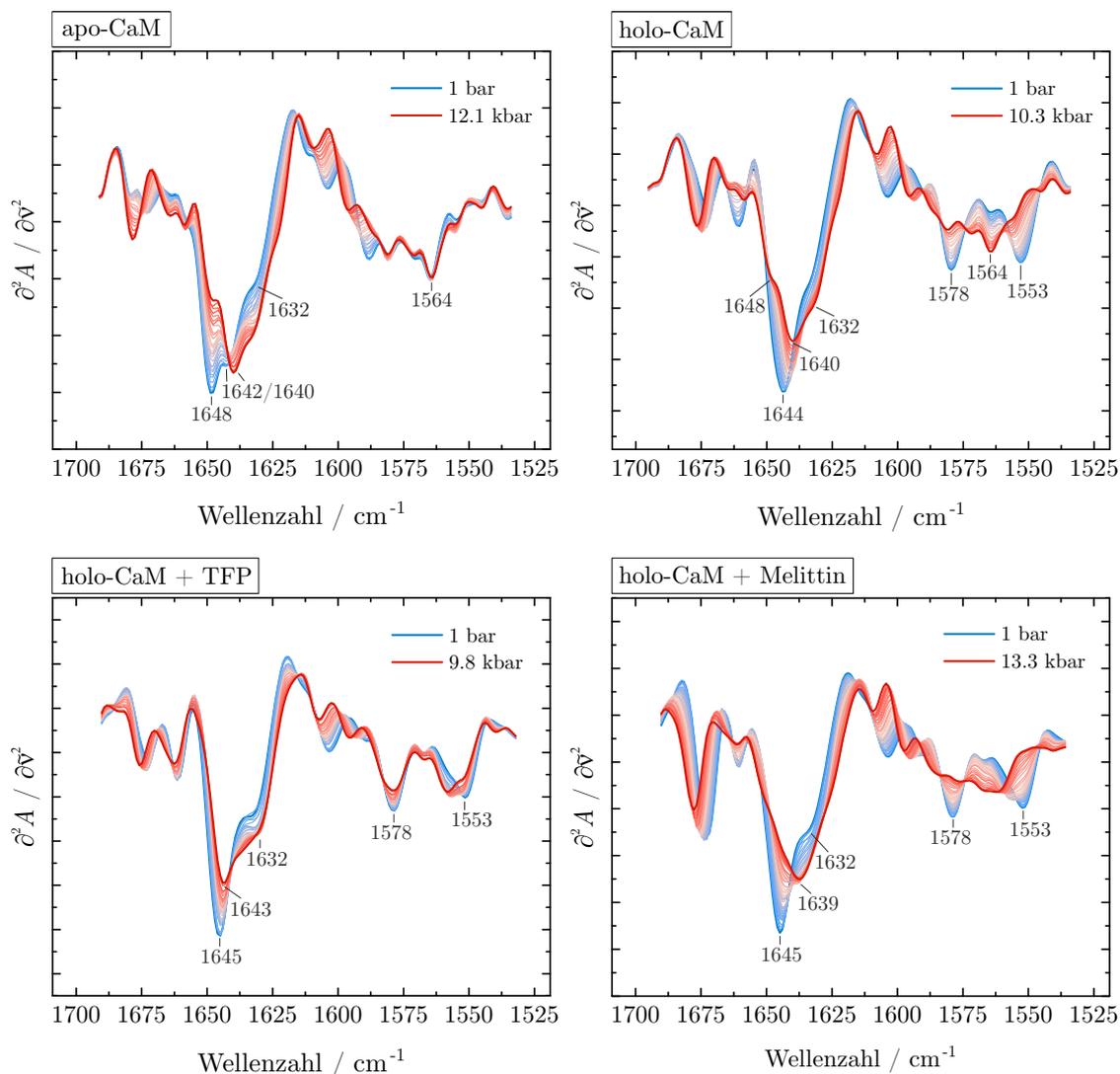
Die im Bereich von  $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$  flächennormierten FTIR-Spektren der druckabhängigen Messungen der Amid-I'-Bande von apo-CaM, holo-CaM, holo-CaM + TFP und holo-CaM + Melittin sind in Abbildung 4.13 zu sehen.



**Abbildung 4.13:** Im Bereich von  $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$  flächennormierte FTIR-Spektren der druckabhängigen Messungen der Amid-I'-Bande von apo-CaM, holo-CaM, holo-CaM + TFP und holo-CaM + Melittin. Die Messungen wurden zwei- bis dreimal reproduziert.

Mit steigendem Druck verschieben sich die Amid-I'-Banden nur geringfügig zu kleineren Wellenzahlen. Die Änderungen lassen sich daher besser in der zweiten Ableitung der flächennormierten FTIR-Spektren erkennen (Abbildung 4.14). Bei apo-CaM liegt

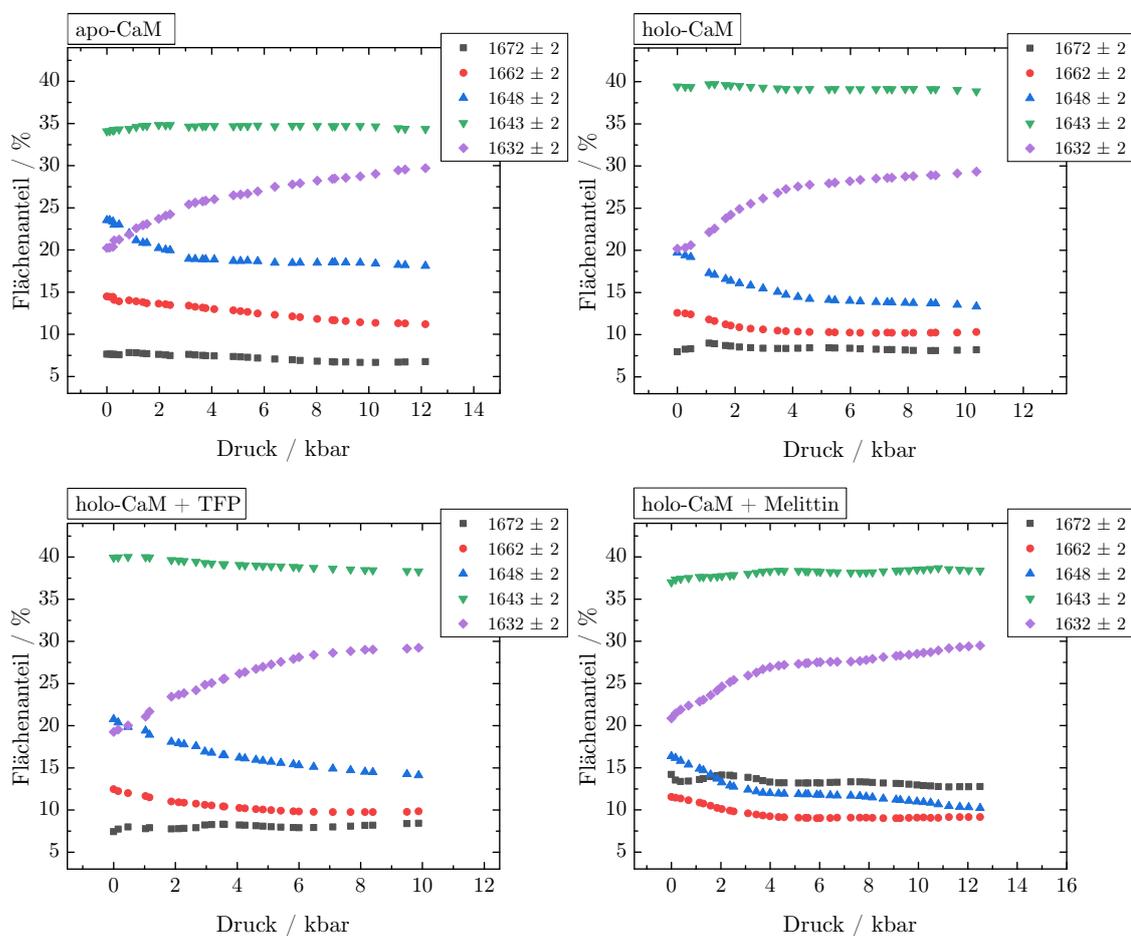
das globale Minimum bei  $1648\text{ cm}^{-1}$  mit einer Schulter bei  $1642\text{ cm}^{-1}$ . Das Minimum bei  $1648\text{ cm}^{-1}$  verliert mit steigendem Druck an Intensität und gleichermaßen steigt die Intensität bei  $1632\text{ cm}^{-1}$ . Die Bande bei  $1642\text{ cm}^{-1}$  hingegen verschiebt sich zu kleineren Wellenzahlen. Bei etwa 10 kbar liegt das Minimum bei etwa  $1640\text{ cm}^{-1}$ . Calmodulin besteht aus einer C- und einer N-terminalen Domäne, die leicht unterschiedliche Wasserstoffbrückenbindungen aufweisen und somit unterschiedliche Wellenzahlen der Amid-I'-Banden. Das Maximum der Amid-I'-Bande der isolierten apo-CaM-C-Domäne liegt bei  $1648\text{ cm}^{-1}$ , die von der N-terminalen bei  $1642\text{ cm}^{-1}$ .<sup>[172]</sup> Die beiden Domänen weisen, je nachdem, ob sie in der  $\text{Ca}^{2+}$ -gesättigten oder  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Form vorliegen, ebenfalls unterschiedliche Stabilitäten auf. Die apo-N-Domäne ist stabiler gegen thermische Entfaltung als die apo-C-Domäne. Die höhere Affinität der apo-C-Domäne für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bewirkt hingegen eine höhere Stabilität der holo-C-Domäne gegenüber der holo-N-Domäne.<sup>[182]</sup> Eine geringere Stabilität der N-Domäne von apo-Calmodulin wurde ebenso bei  $^{15}\text{NMR}$ -Relaxationsmessungen beobachtet.<sup>[183]</sup> Es ist denkbar, dass die C-terminale Domäne in der apo-Form ebenfalls drucksensitiver ist als die N-terminale Domäne, wodurch die Intensitätsabnahme bei  $1648\text{ cm}^{-1}$  erklärt werden könnte, während die Bande bei  $1642\text{ cm}^{-1}$  über den gesamten Druckbereich nur eine leichte Verschiebung zu kleineren Wellenzahlen aufweist. Die Zunahme der  $1632\text{ cm}^{-1}$ -Bande wäre dadurch erklärbar, dass die  $\alpha$ -Helix-Strukturen durch die Druckapplikation mehr zum Lösungsmittel exponiert werden.



**Abbildung 4.14:** Zweite Ableitung der im Bereich von  $1700\text{--}1524\text{ cm}^{-1}$  flächennormierten FTIR-Spektren der druckabhängigen Messungen von apo-CaM, holo-CaM, holo-CaM + TFP und holo-CaM + Melittin.

Bei holo-CaM liegt das globale Minimum hingegen bei  $1644\text{ cm}^{-1}$  und mit gebundenem TFP oder Melittin bei  $1645\text{ cm}^{-1}$  (Abbildung 4.14). Durch Druckapplikation erfolgt eine Abnahme der Intensität bei  $1644\text{ cm}^{-1}$  und eine Zunahme bei  $1632\text{ cm}^{-1}$ . Gleichmaßen nimmt die Intensität der Bande bei  $1662\text{ cm}^{-1}$  mit steigendem Druck ab. Bei holo- und apo-CaM ist weiterhin ein Aufsplitten der Bande bei  $1662\text{ cm}^{-1}$  bei etwa  $4\text{ kbar}$  zu beobachten, welches in Abwesenheit der Liganden nicht erfolgt. Bei etwa  $5\text{ kbar}$  wird bei holo-CaM die Bande bei  $1648\text{ cm}^{-1}$  als Schulter sichtbar, die jedoch bei größeren Drücken keine signifikante Änderung zeigt. Die Ergebnisse konnten

ebenso in früheren druckabhängigen Studien von holo-CaM beobachtet werden.<sup>[180]</sup> Eine Verschiebung zu kleineren Wellenzahlen der Amid-I'-Bande mit steigendem Druck lässt sich unter anderem durch einen Druckeffekt auf die Wasserstoffbrücken innerhalb des Proteins erklären. Es ist bekannt, dass mit steigendem Druck Wasserstoffbrücken stabilisiert werden.<sup>[179,184]</sup> Dies hat zur Folge, dass Elektronendichte von der Carbonylgruppe abgezogen und die Kraftkonstante kleiner wird. Infolgedessen ist die Amid-I'-Bande zu kleineren Wellenzahlen verschoben.

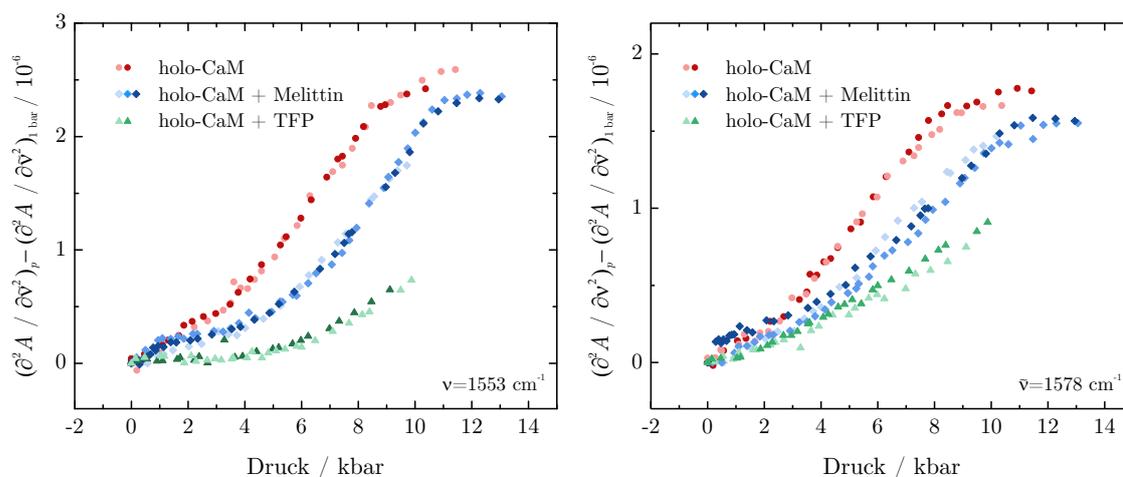


**Abbildung 4.15:** Sekundärstrukturanalyse von apo-CaM, holo-CaM, holo-CaM + TFP und holo-CaM + Melittin. Die Sekundärstrukturanteile in % sind als Funktion des Drucks aufgetragen.

Für die Sekundärstrukturanalyse wurden die ermittelten Subbanden für apo-CaM bei 25 °C und 1 bar als Referenz verwendet (Abbildung 9.3, Anhang). Bei 1 bar besitzt apo-CaM im Vergleich zu holo-CaM und holo-CaM + TFP oder Melittin mit etwa

24 % den größten Anteil der  $1648\text{ cm}^{-1}$ -Bande (Abbildung 4.15). Mit steigendem Druck sinkt der Anteil auf etwa 18 %, während der Anteil der Subbande bei  $1632\text{ cm}^{-1}$  von 20 % auf etwa 30 % steigt. Die Sekundärstrukturanteile bei holo-CaM und holo-CaM + TFP und holo-CaM + Melittin sind weitestgehend ähnlich. Der anfängliche Anteil der  $1648\text{ cm}^{-1}$  Subbande liegt bei etwa 20 % und sinkt nach Druckapplikation um 7 %, die Subbande bei  $1633\text{ cm}^{-1}$  steigt hierbei um 10 % an. Die restlichen Subbanden zeigen keine signifikante Änderung.

Wie bei den temperaturabhängigen Messungen erfolgte ebenfalls eine Auswertung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-spezifischen Banden. In allen drei Fällen nimmt die Intensität der Banden bei  $1553\text{ cm}^{-1}$  und  $1578\text{ cm}^{-1}$  mit steigendem Druck ab und die bei  $1564\text{ cm}^{-1}$  zu (Abbildung 4.14). Die größte Änderung zeigt hierbei holo-CaM. Die Auftragung der zweite Ableitung der Absorbanz bei  $1553\text{ cm}^{-1}$  und  $1578\text{ cm}^{-1}$  der flächennormierten Spektren im Bereich von  $1700\text{--}1530\text{ cm}^{-1}$  als Funktion des Drucks ermöglicht einen quantitativen Vergleich (Abbildung 4.16). Die Zunahme der Intensität gibt hierbei ein Maß für dissoziierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wieder. Holo-CaM und holo-CaM + Melittin zeigen bereits bis 2 kbar geringe Veränderung und laufen in ein erstes Plateau, das bei holo-CaM bis etwa 3 kbar, bei holo-CaM mit Melittin bis etwa 5 kbar reicht. Nach weiterer Druckapplikation wird ein zweites Plateau erreicht, das für holo-CaM bei 9 kbar beginnt und bei holo-CaM Melittin bei 10 kbar (Abbildung 4.16). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass zunächst bis etwa 2 kbar nur ein Teil der insgesamt vier gebundenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen dissoziiert, während die Dissoziation der restlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bei höheren Drücken erfolgt. Ebenso scheint die Bindung von Melittin eine stabilisierende Wirkung auf Calmodulin zu haben. Die Auswertung bei  $1579\text{ cm}^{-1}$  zeigt ein ähnliches Bild, jedoch sind die Änderungen bis 2 kbar wesentlich geringer. Hierbei ist es wichtig zu bedenken, auch wenn in dieser Arbeit durch Erwärmen der Probe ein vollständiger H/D-Austausch erzielt werden sollte, dass weiterhin ein geringer H/D-Austausch zur Intensitätsänderung beitragen könnte. Druckabhängige Studien von K-Ras4B(HVR)-gebundenem holo-CaM deuteten ebenfalls auf eine Dissoziation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in zwei Schritten.<sup>[180]</sup> Den kleinsten Druckeffekt auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -spezifischen Banden lässt sich bei holo-CaM mit TFP beobachten, wo die Dissoziation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen erst ab etwa 5 kbar beginnt (Abbildung 4.16). Die



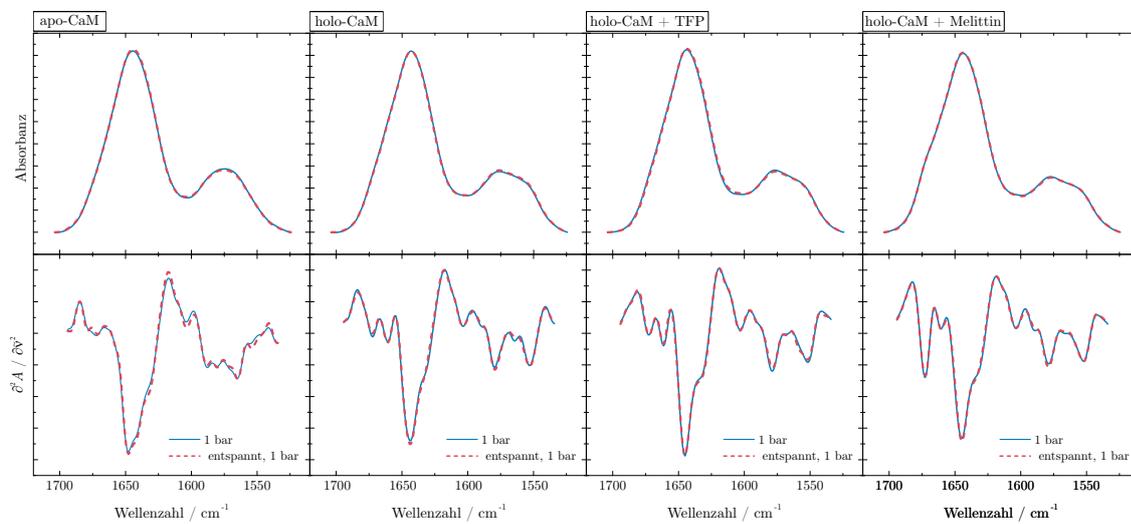
**Abbildung 4.16:** Die Absorbanz bei  $1553\text{ cm}^{-1}$  und  $1578\text{ cm}^{-1}$  der zweiten Ableitung der von apo-CaM, holo-CaM, holo-CaM + TFP und holo-CaM + Melittin als Funktion des Drucks. Als Offset wurde von jeder Absorbanz der jeweiligen Temperatur die Absorbanz bei 1 bar subtrahiert. Die Anpassung erfolgte nach Gleichung 3.6 und ist als durchgezogene Linie dargestellt.

druckabhängige Dissoziation von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wurde ebenfalls bei Meerrettichperoxidase und Parvalbumin beobachtet.<sup>[181,185,186]</sup> Die Freisetzung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch hohen Druck wird unter anderem durch eine mögliche elastische Verzerrung der Tertiärstruktur begründet.<sup>[185]</sup> Das Ergebnis zeigt, dass die stabilisierende Wirkung der Ligandenbindung auf die Struktur von Calmodulin einer möglichen elastischen Verzerrung entgegenwirkt. Ausgehend von dem Ergebnis scheint der holo-CaM/TFP-Komplex eine höhere Stabilität als der holo-CaM/Melittin-Komplex zu besitzen. Die größere stabilisierende Wirkung von TFP auf die Struktur von Calmodulin im Vergleich zu Melittin kann auf zwei mögliche Gründe zurückgeführt werden, einen größeren  $\Delta G^\circ$ -Wert bei 1 bar oder einen kleineren  $\Delta V$ -Wert der Entfaltung.

Durch Anpassung der aufgetragenen Intensität bei  $1578\text{ cm}^{-1}$  als Funktion des Drucks im Bereich von 2–13 kbar lässt sich ein Dissoziationsvolumen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen von  $-13.7\text{ mL mol}^{-1}$  für holo-CaM und  $-11.5\text{ mL mol}^{-1}$  für holo-CaM + Melittin ermitteln (Abbildung 4.16). Unter der Annahme, dass für den holo-CaM/TFP-Komplex der obere Plateauwert derselbe ist wie der von holo-CaM/Melittin, lässt sich ein Dissoziationsvolumen von  $-6\text{ mL mol}^{-1}$  abschätzen. Ein kleinerer  $\Delta V$ -Wert hat bei gleichem  $\Delta G^\circ$ -Wert einen höheren Dissoziationsdruck der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zur Folge. Solch

kleine Änderungen von  $\Delta V$  lassen sich durch Hydratation der getrennten Ionenpaare erklären.<sup>[187]</sup> Für die Anpassung wurde die Gleichung 3.6 verwendet.

Weiterhin wurde die Reversibilität der Sekundärstrukturänderungen und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Dissoziation untersucht (Abbildung 4.17). Alle vier Proben zeigen eine vollständige Reversibilität. Die Amid-I'-Bande sowie die Banden bei  $1552\text{ cm}^{-1}$  und  $1578\text{ cm}^{-1}$  sind nach der Druckentspannung mit den Spektren vor Druckapplikation nahezu deckungsgleich.



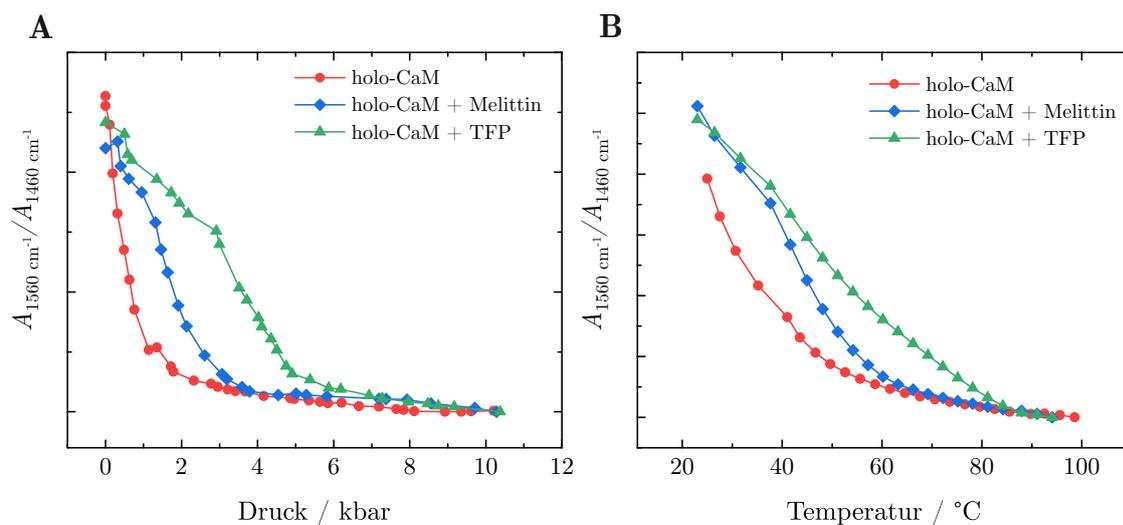
**Abbildung 4.17:** Im Bereich von  $1700\text{--}1535\text{ cm}^{-1}$  flächennormierte FTIR-Spektren und deren zweite Ableitungen von apo-CaM, holo-CaM, holo-CaM + TFP, holo-CaM + Melittin bei 1 bar und nach Entspannung auf 1 bar.

### Druck- und temperaturabhängiger H/D-Austausch

Bei Proteinen, die in D<sub>2</sub>O gelöst sind, werden Protonen, die sich an der Proteinoberfläche befinden, innerhalb von wenigen Sekunden ausgetauscht. Die Protonen der Rückgrat-Aminogruppen, die an der Ausbildung von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern im nativen Protein beteiligt sind, sind hingegen besonders gut gegen einen H/D-Austausch geschützt.<sup>[188,189]</sup> Daher werden die nativen Proteine nach einer Inkubation über Nacht in D<sub>2</sub>O nur teilweise deuteriert. Ein Austausch dieser Protonen erfolgt erst dann, wenn das Protein in eine flexiblere Struktur übergeht. Bereits in früheren Studien wurde gezeigt, dass bei Ca<sup>2+</sup>-gesättigtem Calmodulin nach 20 h lediglich 55 % aller NH-Gruppen deuteriert sind.<sup>[190]</sup> Temperatur- und Druckapplikation bieten daher eine Möglichkeit, durch partielle Entfaltung eine bessere Zugänglichkeit der D<sub>2</sub>O Moleküle zu den abgeschirmten Sekundärstrukturen zu begünstigen. Die Amid-I/I'-Bande, die sensitiv für die Sekundärstruktur des Proteins ist, resultiert hauptsächlich aus der C=O-Schwingung. Die Amid-II-Bande (1560–1525 cm<sup>-1</sup>) beinhaltet die N-H-Deformationsschwingung und ist daher sehr sensitiv für einen H/D-Austausch. Die korrespondierende deuterierte Amid-II'-Bande ist hingegen um etwa 100 cm<sup>-1</sup> zu kleinerer Wellenzahl verschoben.

Ein direkter Weg, um den H/D-Austausch zu verfolgen, bietet daher die Analyse der spektralen Änderung der Amid-II-Bande im Verhältnis zur Amid-II'-Bande. Der H/D-Austausch in einem Protein spiegelt hierbei die Dynamik der Proteinstruktur wider. Es kann nur zu einem Austausch kommen, wenn zuvor Wasserstoffbrücken innerhalb der Sekundärstruktur aufgebrochen wurden.<sup>[191]</sup> In Abbildung 4.18 ist das Intensitätsverhältnis der Amid-II-Bande (1560 cm<sup>-1</sup>) zur Amid-II'-Bande (1460 cm<sup>-1</sup>) von holo-CaM mit und ohne TFP bzw. Melittin als Funktion der Temperatur und des Drucks dargestellt.

Bei holo-CaM ist der H/D-Austausch bei der temperaturabhängigen Messung bei etwa 60 °C und bei der druckabhängigen Messung bei etwa 2 kbar abgeschlossen. Wenn holo-CaM mit Melittin komplexiert ist, erfolgt der komplette H/D-Austausch bei 4 kbar bzw. bei 65 °C. Für den holo-CaM-TFP-Komplex erfolgt ein kompletter H/D-Austausch bei etwa 5.5 kbar bei der druckabhängigen und bei 90 °C bei der



**Abbildung 4.18:** Das Verhältnis der Absorbanz bei  $1560\text{ cm}^{-1}$  zu der bei  $1460\text{ cm}^{-1}$  der FTIR-Spektren von holo-CaM, holo-CaM + TFP und holo-CaM + Melittin wurde als Funktion des **A)** Drucks und **B)** der Temperatur aufgetragen.

temperaturabhängigen Messung. Apo-CaM weist bereits nach einer Inkubation von 6 h bei  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 1 bar einen nahezu vollständigen H/D-Austausch auf (nicht gezeigt). Es besitzt gegenüber holo-CaM eine größere Flexibilität, wodurch der H/D-Austausch begünstigt zu sein scheint. Es wurde gezeigt, dass bei apo-CaM nach 30 min 53 % und nach 20 h 80 % der NH-Gruppen deuteriert sind.<sup>[190]</sup> Ein Vergleich mit der Auswertung der  $\text{Ca}^{2+}$ -spezifischen Banden als Funktion des Drucks zeigt, dass der Beginn der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung auf den Druckbereich fällt, bei dem der H/D-Austausch nahezu abgeschlossen ist. Für die temperaturabhängigen Messungen fehlt hingegen dieser Zusammenhang. Die unabhängigen H/D-Experimente zeigen, wie auch die Auswertung der  $\text{Ca}^{2+}$ -spezifischen Banden, dass durch die Ligandenbindung Calmodulin gegen Temperatur- und Druckentfaltung stabilisiert ist, wobei Trifluoperazin als Antagonist die größte stabilisierende Wirkung auf Calmodulin ausübt.

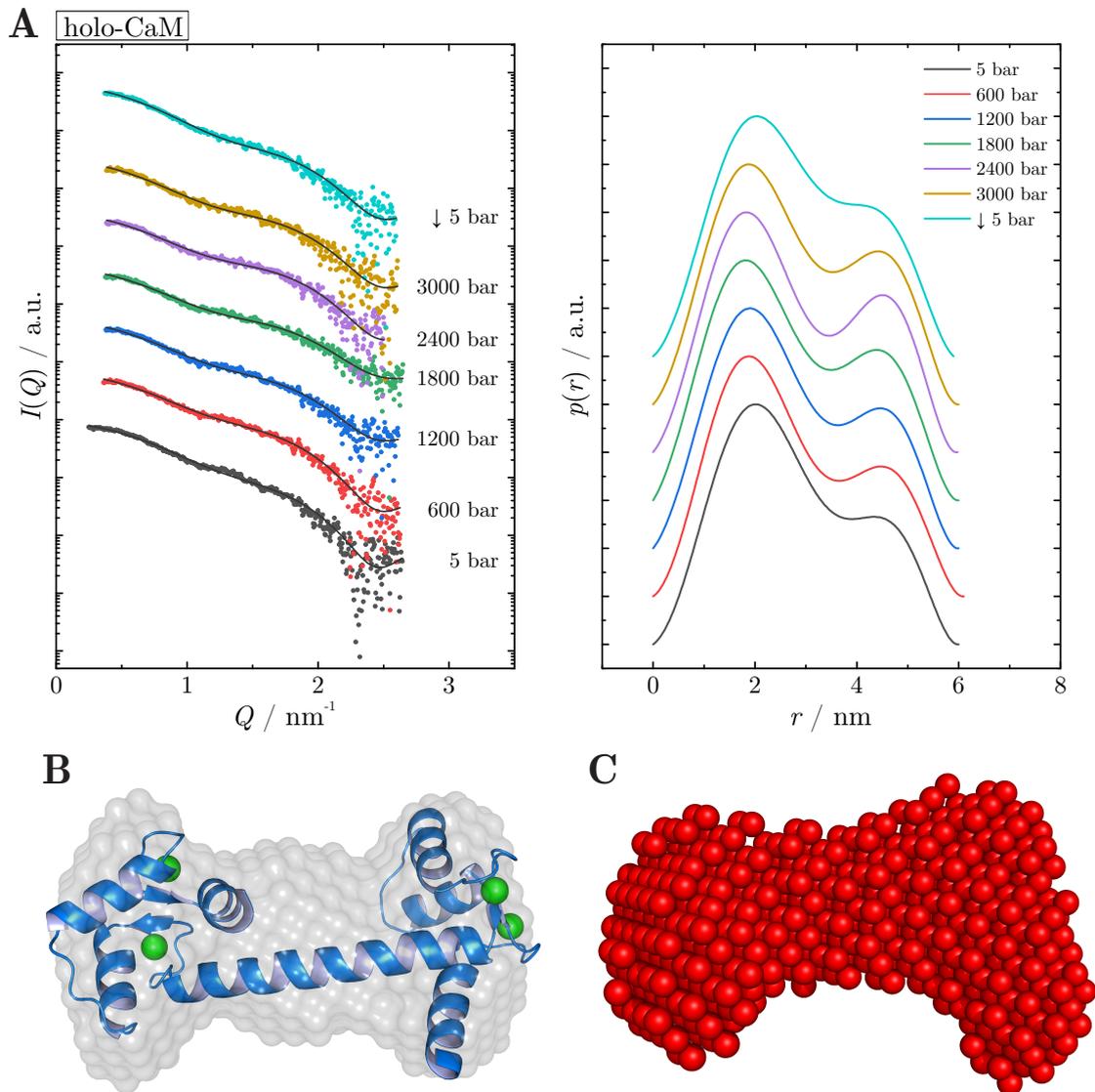
### 4.3.2 Röntgen-Kleinwinkelstreuexperimente (SAXS)

Zur Untersuchung der Druck- und Temperaturstabilität der nativen Konformation von Calmodulin mit und ohne Liganden wurden Röntgen-Kleinwinkelstreuexperimente (SAXS) durchgeführt. Die druckabhängigen Messungen erfolgten an der Dortmunder Elektronenspeicherring-Anlage (DELTA).

#### Druckstabilität <sup>‡</sup>

Aus jeder SAXS-Kurve  $I(Q)$  wurde eine Paarabstandsverteilungsfunktion  $p(r)$  nach Gleichung 2.28 bestimmt. Die Anpassung der Streukurven repräsentiert die FOURIER-Transformation der  $p(r)$ -Funktion.  $p(r)dr$  ist proportional zur Anzahl der Abstände in einem Molekül zwischen  $r$  und  $r + dr$ . Das Maximum der  $p(r)$ -Funktion entspricht somit in etwa dem Radius des Moleküls und der Schnittpunkt mit der  $x$ -Achse dem maximalen Durchmesser. Es gibt bisher keine Informationen über die molekulare Form von Calmodulin bei hohen Drücken. Daher wurden mittels der Software DAMMIF<sup>[192]</sup> aus den Streukurven *ab-initio*-Strukturrekonstruktionen, bestehend aus *Dummy*-Atomen, durchgeführt. Ausgehend von einer Kugel mit einer beliebigen Anzahl an dicht gepackten Streuzentren wird eine theoretische Streukurve berechnet und mit den gemessenen Daten verglichen. Die Konfiguration wird solange geändert, bis der mittlere quadratische Fehler von experimenteller und berechneter Streukurve minimal ist. In dieser Arbeit bestehen, bis auf das von holo-CaM/K-Ras4B(HVR) (10 verschiedene Simulationsdurchgänge), alle *ab-initio*-Strukturmodelle aus 20 verschiedenen Simulationsdurchgängen, die mit DAMAVER<sup>[193]</sup> gemittelt wurden. Die Kristallstrukturen von apo-CaM (PDB ID: 1CFD<sup>[194]</sup>), holo-CaM (PDB ID: 3CLN<sup>[125]</sup>) und holo-CaM mit vier gebundenen TFP-Molekülen (PDB ID: 1LIN<sup>[126]</sup>) wurden mittels der Software SUPCOMB<sup>[195]</sup> mit den erhaltenen *ab-initio*-Strukturmodellen überlagert.

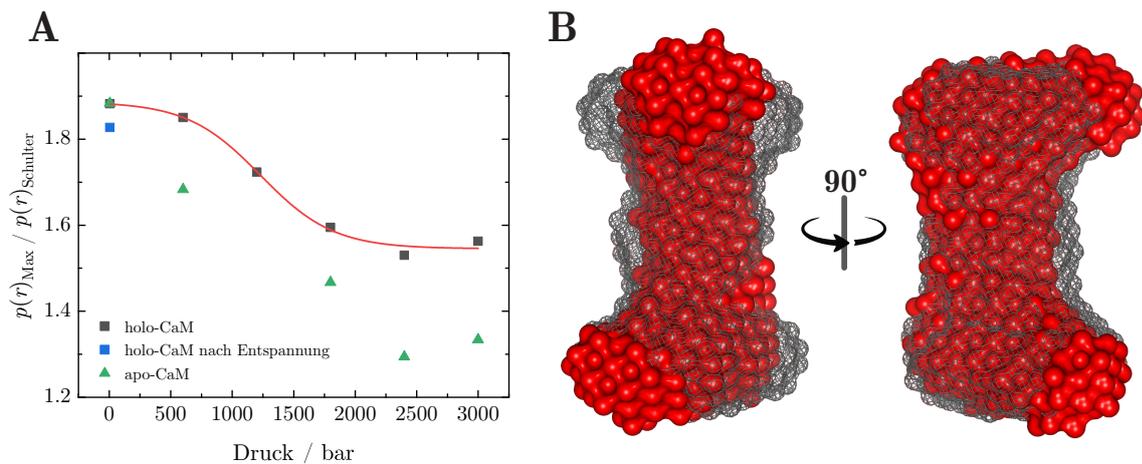
<sup>‡</sup>Untersuchungen am Protein K-Ras4B sind ein Forschungsprojekt von Prof. Dr. R. Winter. Die in dieser Arbeit gezeigten Hochdruck-SAXS-Messungen wurden parallel an Calmodulin-TFP- und Calmodulin-K-Ras4B(HVR)-Proben in Zusammenarbeit mit Samy Al-Ayoubi durchgeführt, ausgewertet und interpretiert, wobei Samy Al-Ayoubi für die K-Ras4B(HVR)-Proben und der Autor dieser Arbeit für die TFP-Proben verantwortlich zeichnet.



**Abbildung 4.19:** **A)** Druckabhängige Streukurven  $I(Q)$  mit den dazugehörigen  $p(r)$ -Funktionen von holo-CaM. Die an die Streukurven angepassten Kurven sind als durchgezogene Linie dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden die Streukurven und  $p(r)$ -Funktionen vertikal verschoben. **B)** Aus der Streukurve berechnetes *ab-initio*-Strukturmodell von holo-CaM bei 1 bar, dargestellt als transparente Oberfläche mit überlagerter Kristallstruktur (PDB ID: 3CLN<sup>[125]</sup>). **C)** Aus der Streukurve berechnetes *ab-initio*-Strukturmodell von holo-CaM bei 3000 bar. Jedes *ab-initio*-Strukturmodell wurde aus 20 verschiedenen Simulationen gemittelt.

Die druckabhängigen Streukurven  $I(Q)$  mit den dazugehörigen  $p(r)$ -Funktionen von holo-CaM sind in Abbildung 4.19 gezeigt. Holo-CaM bildet ohne Liganden eine offene Konformation mit einem maximalen Durchmesser von etwa 6 nm und

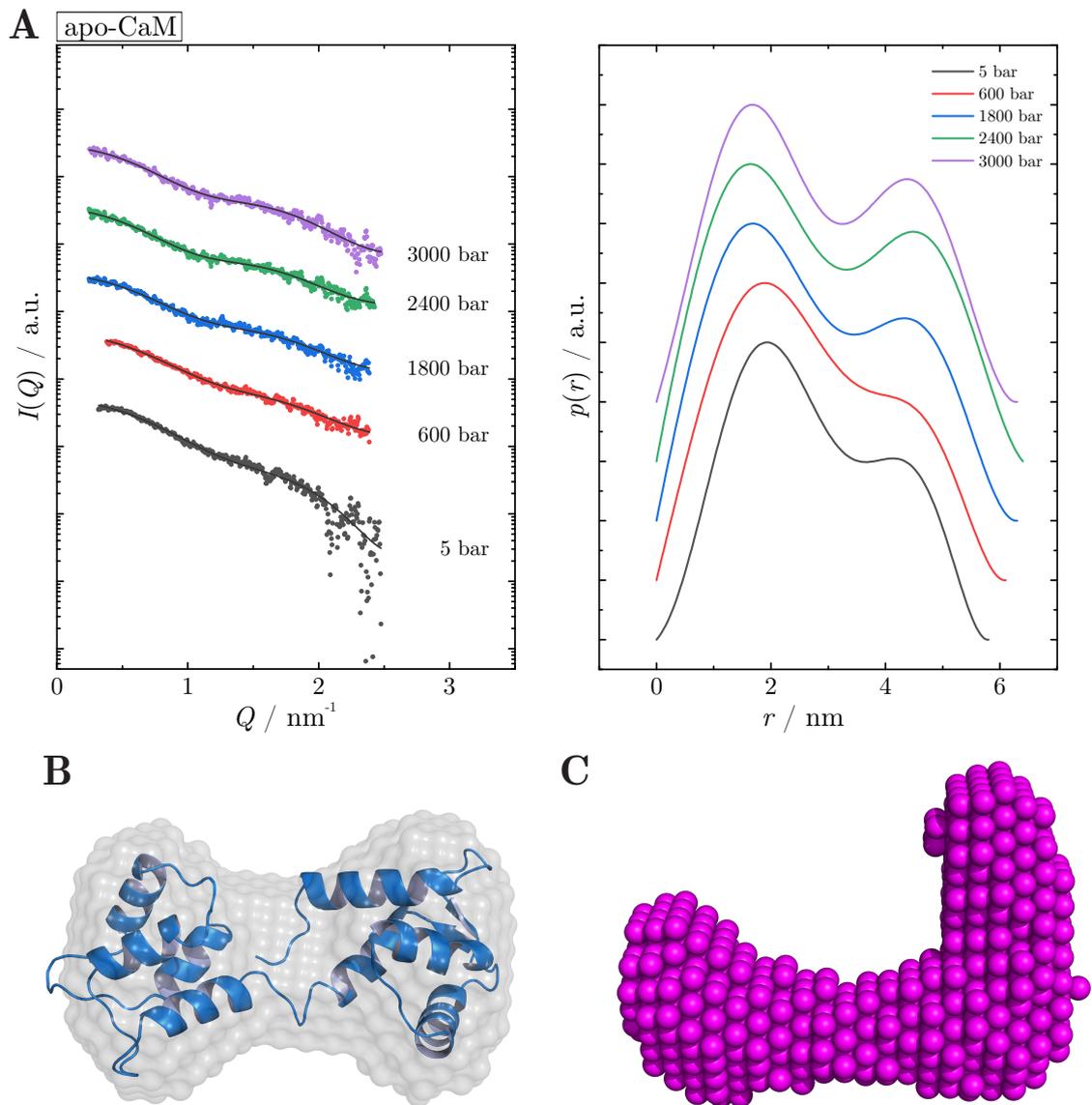
einem Gyrationradius von 2.16 nm. Die Schulter in der  $p(r)$ -Verteilungsfunktion bei höheren  $r$ -Werten ergibt sich aus der Hantelform des Proteins.<sup>[196]</sup> Bei 1 bar stimmt das berechnete Strukturmodell gut mit der Kristallstruktur (PDB ID: 3CLN<sup>[125]</sup>) überein (Abbildung 4.19B). Mit steigendem Druck nimmt der Gyrationradius von 2.16 nm auf 2.22 nm und die Intensität der Schulter in der  $p(r)$ -Verteilungsfunktion zu. Weiterhin verschiebt sich das erste Maximum von 2.05 nm zu 1.86 nm. Nach Entspannen auf 5 bar sinkt der Gyrationradius auf 2.18 nm und die Schulter verliert wieder an Intensität, was auf eine vollständige Reversibilität der Änderung hindeutet. Das erste Maximum erlangt nach dem Entspannen auf 5 bar seinen ursprünglichen  $r$ -Wert. Die  $p(r)$ -Verteilungsfunktion beschreibt die Häufigkeit der Abstände, die zwischen allen Atompaares innerhalb eines Proteins vorkommen können.<sup>[197]</sup> Das erste Maximum bei etwa 2 nm gibt den Radius der C- und N-Domäne wieder, die Schulter bei etwa 4.5 nm den ungefähren Abstand zwischen den beiden Domänen.<sup>[118,127,198,199]</sup> In der Abbildung 4.20 ist das Intensitätsverhältnis des globalen Maximums zur Schulter als Funktion des Drucks aufgetragen. Mit steigendem Druck nimmt  $p(r)$  bei 4.5 nm zu, wodurch das Intensitätsverhältnis im Druckverlauf abnimmt. Ab 2600 bar tritt keine weitere signifikante Änderung auf. Am *ab-initio*-Strukturmodell ist zu erkennen, dass bei 3000 bar die Domänen im Vergleich zu 1 bar voluminöser sind und somit größere Abstände häufiger vorkommen. Dies könnte auf eine teilweise Entfaltung oder auf ein Eindringen von Wasser in die Domänen hindeuten. In der Literatur wurden mittels Fluoreszenzmessungen ebenfalls Effekte im Bereich bis 3000 bar beobachtet.<sup>[176]</sup> Weitere Studien zeigten, dass es zu einer druckabhängigen Umstrukturierung der Domänen im Druckbereich bis 3000 bar kommt.<sup>[187]</sup>



**Abbildung 4.20:** **A)** Verhältnis des globalen Maximums zur Schulter der  $p(r)$ -Funktion von holo-CaM und apo-CaM als Funktion des Drucks, sowie holo-CaM nach Druckentspannung auf 1 bar. **B)** *ab-initio*-Strukturmodell von holo-CaM bei 1 bar als schwarzes Gitternetzwerk und bei 3000 bar als rote Oberfläche.

Die apo-Form besitzt ebenfalls eine hantelförmige Konformation, und dementsprechend ist in der  $p(r)$ -Funktion auch eine Schulter zu beobachten (Abbildung 4.21A). Der Gyrationradius liegt bei 2.11 nm und der maximale Durchmesser bei etwa 6.2 nm. Der kleinere Gyrationradius der apo-Form im Vergleich zur holo-Form wird ebenso in der Literatur beschrieben.<sup>[200,201]</sup> In Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen besitzt die C-terminale Domäne eine erhöhte Flexibilität und wickelt sich um die zentrale Helix, wodurch ein kleinerer  $R_G$  zustande kommt.<sup>[201]</sup> In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass durch Binden von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sich der Winkel der Helix-Strukturen innerhalb der beiden Domänen ändert, sodass eine offenere Konformation sich bildet und dementsprechend der Gyrationradius größer wird.<sup>[124,202]</sup> Der druckinduzierte Anstieg der Intensität der Schulter der  $p(r)$ -Funktion deutet wie bei holo-CaM auf eine partielle Entfaltung der Domänen hin (Abbildung 4.21A). Bei 3000 bar liegt der Gyrationradius bei 2.3 nm und der maximale Durchmesser bei etwa 6.2 nm. Wie auch für holo-CaM ist in der Abbildung 4.20A das Intensitätsverhältnis des globalen Maximums zur Schulter als Funktion des Drucks aufgetragen. Das Verhältnis bei 1 bar entspricht in etwa dem von holo-CaM. Im Vergleich zu holo-CaM ist der Intensitätsabfall von apo-CaM zu kleineren Drücken verschoben, was sich durch die geringere Konformationsstabilität erklären lässt. Ebenso ist an dem *ab-initio*-Strukturmodell von apo-CaM bei 3000 bar zu erkennen, dass im Vergleich zu

holo-CaM bei 3000 bar eine Domäne ausgeprägter zu sein scheint (Abbildung 4.21C). Dieses Ergebnis deutet auf eine stärkere Entfaltung dieser Domäne von apo-CaM hin.

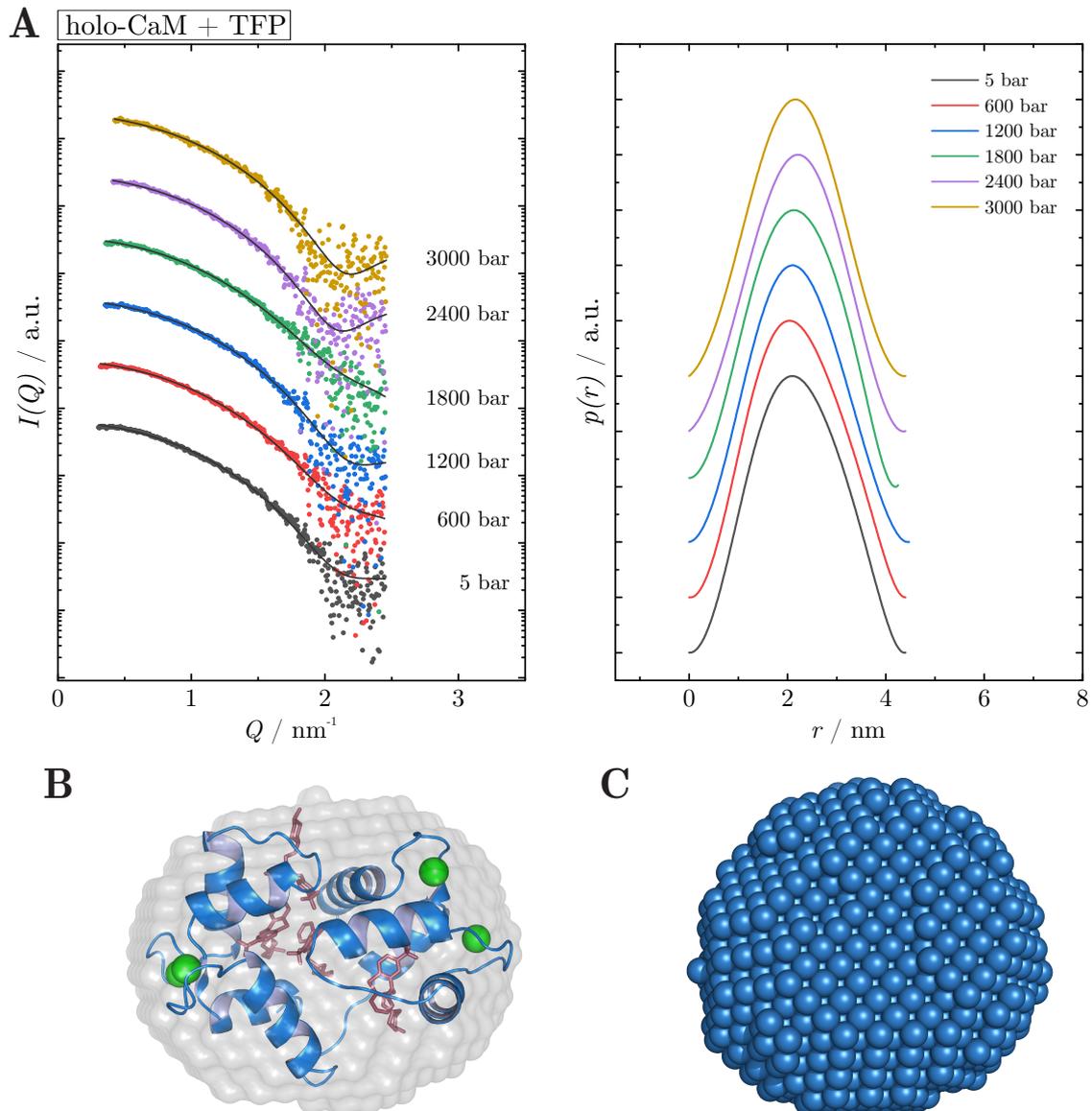


**Abbildung 4.21:** **A)** Druckabhängige Streukurven mit den dazugehörigen  $p(r)$ -Funktionen von apo-CaM. Die an die Streukurven angepassten Kurven sind als durchgezogene Linien dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden die Streukurven und die  $p(r)$ -Funktionen vertikal verschoben. **B)** Aus der Streukurve berechnetes *ab-initio*-Strukturmodell von apo-CaM bei 1 bar, dargestellt als transparente Oberfläche mit überlagerter Kristallstruktur (PDB ID: 1CFD<sup>[194]</sup>). **C)** Aus der Streukurve berechnetes *ab-initio*-Strukturmodell von apo-CaM bei 3000 bar. Jedes *ab-initio*-Strukturmodell wurde aus 20 verschiedenen Simulationsdurchgängen gemittelt.

In Gegenwart von 5 mol TFP pro 1 mol Calmodulin binden vier TFP-Moleküle an Calmodulin und induzieren die geschlossene globuläre Konformation (Abbildung 4.1). Die entsprechende  $p(r)$ -Funktion ist symmetrisch, wie es für eine globuläre Form zu erwarten wäre (Abbildung 4.22A). Der maximalen Durchmesser und der Gyrationradius verringern sich durch die Bildung des holo-CaM/TFP-Komplexes auf etwa 4.5 nm bzw. 1.66 nm. Die globuläre Konformation ist bereits in den Streukurven auszumachen. Die Streukurve von holo-CaM fällt im Vergleich zur Streukurve der TFP-gebundenen Form flacher ab und besitzt ein schwach ausgeprägtes Maximum bei etwa  $Q = 1.8 \text{ nm}^{-1}$ . Die  $p(r)$ -Funktion des holo-CaM/TFP-Komplexes ist über den gesamten Druckbereich symmetrisch und entspricht somit weiterhin einer globulären Konformation. Ebenfalls ist keine druckinduzierte Änderung des Gyrationradius und des maximalen Durchmessers zu beobachten. Die aus den Streukurven berechneten *ab-initio*-Strukturmodelle bei 1 bar und 3000 bar bestätigen die globuläre Form des holo-CaM/TFP-Komplexes vor und nach der Druckapplikation (Abbildung 4.22). Bei 1 bar stimmt das berechnete *ab-initio*-Strukturmodell mit der Kristallstruktur (PDB ID: 1LIN<sup>[126]</sup>) gut überein. Der Antagonist TFP scheint im Vergleich zu dem Antagonisten W7 eine noch kompaktere Konformation zu induzieren.<sup>[120]</sup> Dies deutet auf eine sehr dichte Packung mit sehr geringen Hohlräumen innerhalb des CaM/TFP-Komplexes hin, was mit der hier beobachteten hohen Druckstabilität übereinstimmt. Bei einer Druckentfaltung wird die Konformation mit dem geringeren Volumen bevorzugt. Nach  $(\partial\Delta G/\partial p)_T = \Delta V$  resultiert bei nur einem geringfügig negativem  $\Delta V$ -Wert ein größerer Entfaltungsdruck. Anscheinend ermöglichen die beiden positiven Ladungen und das hydrophobe aromatische Ringsystem von TFP eine starke Bindung mit dem stark negativ geladenem holo-CaM. Weiterhin scheint TFP klein und flexibel genug zu sein, um vollständig den Ligandenhohlraum zu füllen, der durch die geschlossene globuläre Konformation von holo-CaM gebildet wird.

Die experimentell ermittelten Gyrationradien für apo-CaM, holo-CaM und holo-CaM + TFP bei 1 bar stimmen gut mit den aus der Kristallstruktur berechneten, wie auch mit den in der Literatur angegebenen Werten überein.<sup>[118,120,149,180,203]</sup> Aus der NMR-Struktur für apo-CaM (PDB ID: 1CFD<sup>[194]</sup>) konnte ein Gyrationradius von 2.04 nm, aus der Kristallstruktur für holo-CaM (PDB ID: 3CLN<sup>[125]</sup>) und holo-CaM

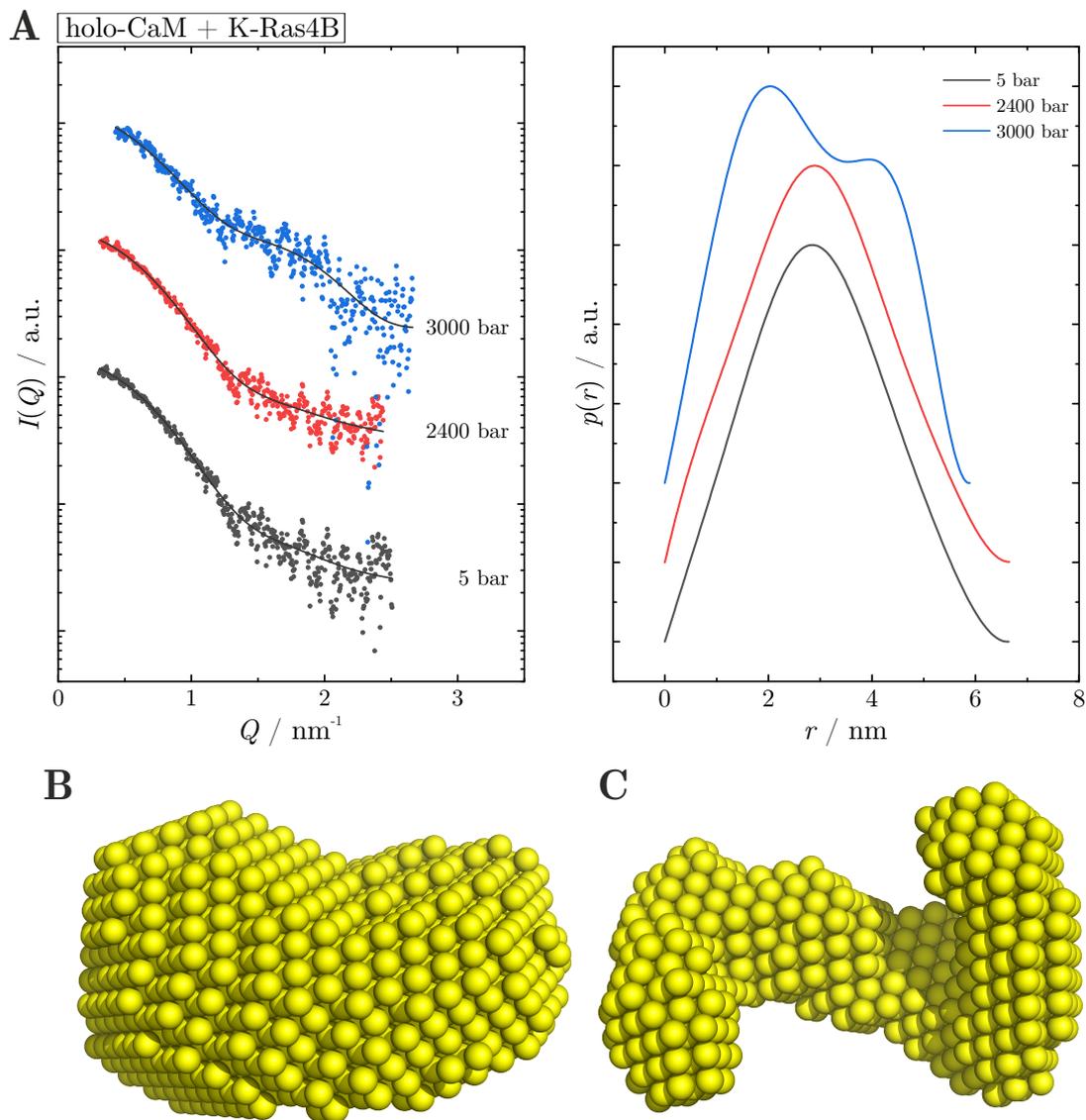
+ TFP (PDB ID: 1LIN<sup>[126]</sup>) ein Gyrationradius von 2.19 nm und 1.68 nm ermittelt werden.



**Abbildung 4.22:** **A)** Druckabhängige Streukurven  $I(Q)$  mit den dazugehörigen  $p(r)$ -Funktionen des holo-CaM/TFP-Komplexes. Die an die Streukurven angepassten Kurven sind als durchgezogene Linien dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden die Streukurven und die  $p(r)$ -Funktionen vertikal verschoben. **B)** Aus der Streukurve berechnetes *ab-initio*-Strukturmodell vom holo-CaM/TFP-Komplex bei 1 bar, dargestellt als transparente Oberfläche mit überlagerter Kristallstruktur (PDB ID: 1LIN<sup>[126]</sup>). **C)** Aus der Streukurve berechnetes *ab-initio*-Strukturmodell des holo-CaM/TFP-Komplexes bei 3000 bar. Jedes *ab-initio*-Strukturmodell wurde aus 20 verschiedenen Simulationsthroughgängen gemittelt.

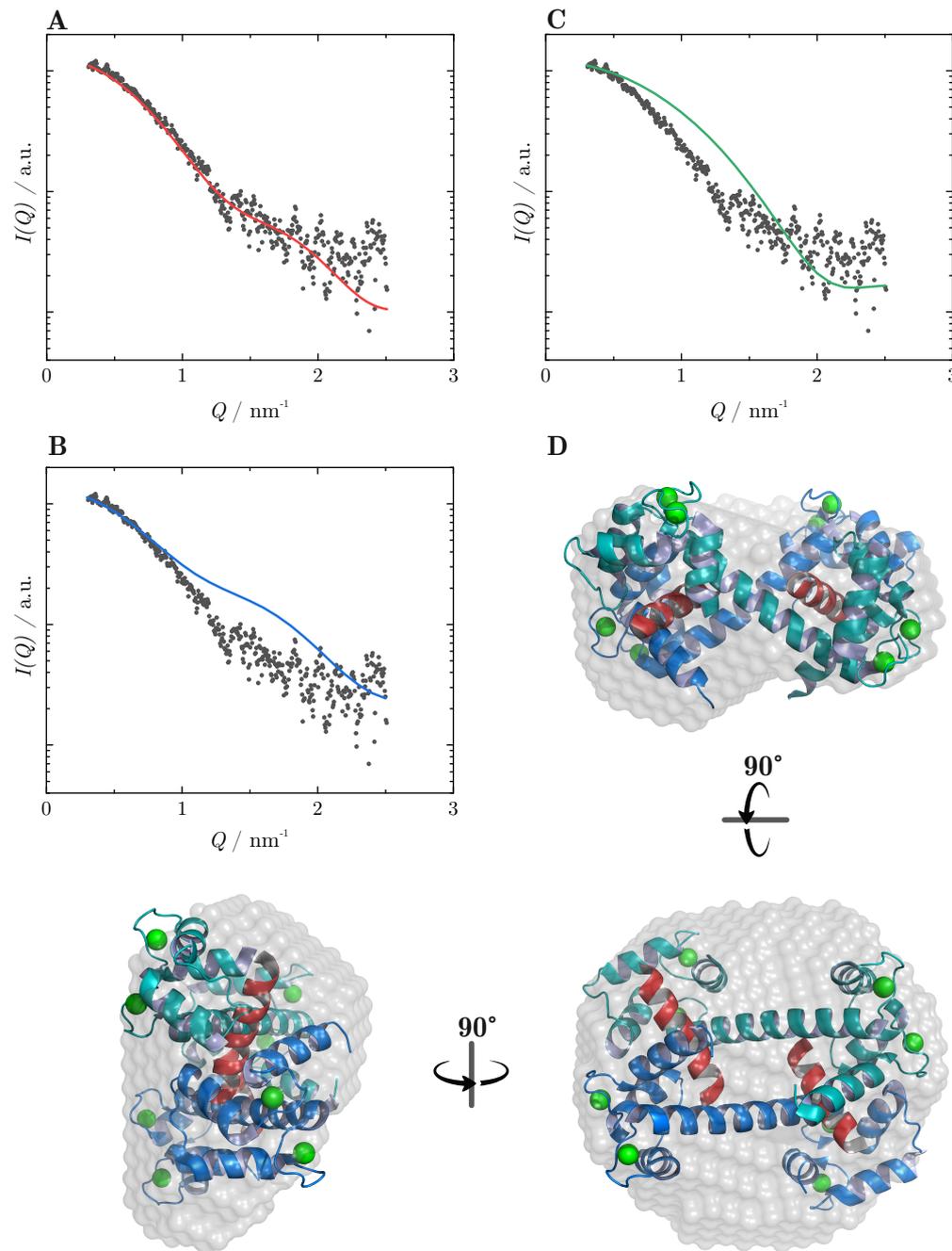
Der holo-CaM/K-Ras4B(HVR)-Komplex besitzt anfänglich eine nahezu symmetrische  $p(r)$ -Verteilungsfunktion (Abbildung 4.23A). Der Gyrationradius ist hingegen nicht durch die Ligandenbindung kleiner geworden, wie bei dem CaM/TFP-Komplex, sondern besitzt mit etwa 2.3 nm einen größeren Wert als der  $R_G$  von holo-CaM, das eine offene Konformation besitzt. Der maximale Durchmesser ist mit etwa 6.8 nm ebenfalls größer als der von holo-CaM. Zusätzlich ist das berechnete *ab-initio*-Strukturmodell nicht globulär (Abbildung 4.23B). In der Literatur wird berichtet, dass Calmodulin mit der CaM-bindenden Domäne von Calcineurin (CaN-CaMBD),<sup>[204]</sup> wie auch mit der CaM-bindenden Domäne von dem Transkription-Faktor SEF2-1/E2-2,<sup>[205]</sup> einen Dimer-Komplex mit einer 2:2-Stöchiometrie ausbilden kann. In diesem Dimer-Komplex liegt Calmodulin in seiner offenen Konformation vor, wobei die C-Domäne des ersten Calmodulin-Moleküls parallel zur N-Domäne des zweiten orientiert ist. Das CaN-CaMBD-Peptid bindet hierbei überbrückend von der C-Domäne zur N-Domäne zwischen den beiden Calmodulin-Molekülen. Um eine mögliche Dimer-Bildung von Calmodulin mit dem K-Ras4B(HVR)-Peptid zu überprüfen, wurde aus der Kristallstruktur des CaM/CaN-CaMBD-Dimer-Komplexes (PDB ID: 2R28<sup>[204]</sup>), mittels der Software CRY SOL<sup>[206]</sup> die theoretische Streukurve berechnet und mit der experimentell ermittelten Streukurven von holo-CaM/K-Ras4B(HVR) verglichen (Abbildung 4.24).

Die aus der Kristallstruktur berechneten Werte  $R_G = 2.31$  nm und  $d_{\max} = 7$  nm des CaM/CaN-CaMBD-Dimer-Komplexes stehen in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Werten des CaM/K-Ras4B(HVR)-Komplexes. Zum Vergleich wurden ebenfalls die Streukurven von holo-CaM (PDB ID: 3CLN<sup>[125]</sup>) und von TFP gebundenem Calmodulin (PDB ID: 1LIN<sup>[126]</sup>) aus den Kristallstrukturen berechnet (Abbildung 4.24B und C). Die theoretische Streukurve des CaM/CaN-CaMBD-Dimer-Komplexes steht in gutem Einklang mit der experimentellen CaM/K-Ras4B(HVR)-Streukurve und unterscheidet sich deutlich von den theoretischen Streukurven des hantelförmigen holo-CaM und des globulären holo-CaM/TFP-Komplexes. Daher könnte es sein, dass Calmodulin mit K-Ras4B(HVR) ebenfalls einen Dimer-Komplex ausbildet.



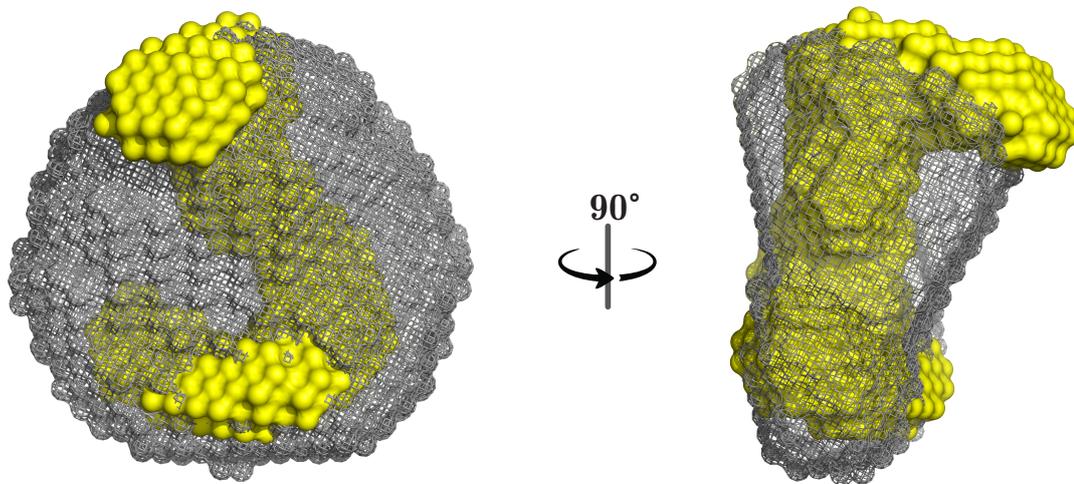
**Abbildung 4.23:** **A)** Druckabhängige Streukurven  $I(Q)$  mit den dazugehörigen  $p(r)$ -Funktionen des holo-CaM/K-Ras4B(HVR)-Komplexes (Molverhältnis in Lösung 1:1.5). Die an die Streukurven angepassten Kurven sind als durchgezogene Linien dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden die Streukurven und die  $p(r)$ -Funktionen vertikal verschoben. Darunter: aus der Streukurve berechnetes *ab-initio*-Strukturmodell des holo-CaM/K-Ras4B(HVR)-Komplexes bei **B)** 1 bar und **C)** 3000 bar. Jedes *ab-initio*-Strukturmodell wurde aus 10 verschiedenen Simulationsdurchgängen gemittelt.

Zur Untersuchung der Dimerbildung in Abhängigkeit der K-Ras4B(HVR)-Konzentration wurden SAXS-Messungen mit einem 1.5-fachen und einem 3.9-fachen Überschuss an K-Ras4B(HVR) an dem Gerät SAXSess mc<sup>2</sup> durchführt. Beide Messungen erfolgten unter ansonsten identischen Bedingungen (10 mM MOPS Puffer, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, pH=6.8, T=25 °C). Die Streukurven mit den dazugehörigen  $p(r)$ -Funktionen sind in Abbildung 9.5 im Anhang gezeigt. Bei einem 1.5-fachen Überschuss an K-Ras4B(HVR) stimmen die Ergebnisse mit denen in Abbildung 4.23 überein. Der Gyrationradius liegt bei 2.28 nm und der maximale Durchmesser bei etwa 7 nm. Bei einem 3.9-fachen Überschuss sinkt der Gyrationradius vom holo-CaM/K-Ras4B(HVR)-Komplex auf 1.75 nm und der maximale Durchmesser auf 4.2 nm. Das Ergebnis verdeutlicht, dass die Dimerbildung konzentrationsabhängig zu sein scheint. Bei einem vierfachen Überschuss an K-Ras4B(HVR) wird ein CaM/K-Ras4B-Monomer-Komplex ausgebildet, während bei einer Stöchiometrie von 1:1.5 bevorzugt Dimere vorliegen. NMR-Studien zeigten zudem, dass ein einzelnes Calmodulin-Molekül, abweichend vom sonst bekannten Bindungsmuster mit Peptiden, in der Lage ist auch, zwei Peptidmoleküle simultan zu binden.<sup>[207]</sup> Dieser Komplex, der aus einem Calmodulin und zwei Glutamat-Decarboxylase-Peptiden besteht, besitzt eine globuläre Konformation mit  $R_G = 1.83$  nm (ermittelt aus der Kristallstruktur mit der Software CRY SOL,<sup>[206]</sup> PDB ID: 1NWD<sup>[207]</sup>). Für die Bindung von K-Ras4B(HVR) an holo-CaM ergäbe sich so das folgende Bindungsmodell. Bei niedrigem Ligandenverhältnis zum holo-CaM von 1.5:1 bildet sich ein Dimer mit 2:2-Stöchiometrie (Abbildung 4.23A, 5 bar). Erhöht man das Ligandenverhältnis auf 3.9:1 dissoziiert das Dimer und es bildet sich ein kompakter globulärer Komplex aus einem holo-CaM und zwei K-Ras4B(HVR) (Abbildung 9.5). Schließlich wird auch in der Literatur bei einem Ligandenverhältnis von 10:1 von einem globulären Komplex mit  $R_G = 1.9$  nm berichtet.<sup>[180]</sup>



**Abbildung 4.24:** Vergleich der experimentellen SAXS-Streukurve von holo-CaM + K-Ras4B(HVR) mit den berechneten Streukurven aus den Kristallstrukturen von **A**) holo-CaM + CaN-CaMBD (PDB ID: 2R28<sup>[204]</sup>), **B**) holo-CaM (PDB ID: 3CLN<sup>[125]</sup>) und **C**) holo-CaM + TFP (PDB ID: 1LIN<sup>[126]</sup>). Die experimentelle SAXS-Streukurve von holo-CaM + K-Ras4B(HVR) ist als Punkte dargestellt und die theoretischen Streukurven als durchgezogene Linien. **D**) Aus der experimentellen SAXS-Streukurve von holo-CaM + K-Ras4B(HVR) berechnetes *ab-initio*-Strukturmodell (grau transparent) mit überlagerter Kristallstruktur des holo-CaM/CaN-CaMBD-Dimers (PDB ID: 2R28<sup>[204]</sup>). In der Kristallstruktur sind die beiden CaM-Moleküle blau und grün gefärbt, die verbrückenden Calcineurin-Peptide rot.

Bei 3000 bar ähnelt die  $p(r)$ -Funktion wie auch das *ab-initio*-Strukturmodell von holo-CaM + K-Ras4B(HVR) der  $p(r)$ -Funktion und dem Strukturmodell von holo-CaM. Bei 3000 bar sinkt der Gyrationradius wie auch der maximale Durchmesser auf  $R_G = 2.19$  nm bzw.  $d_{\max} \approx 6$  nm. Die  $p(r)$ -Schulter ist ähnlich stark ausgeprägt wie die von holo-CaM bei 3000 bar. In Abbildung 4.25 sind die *ab-initio*-Strukturmodelle vom holo-CaM/K-Ras4B(HVR)-Komplex bei 1 bar und bei 3000 bar gezeigt. In früheren Studien konnte mittels FTIR-Spektroskopie gezeigt werden, dass es im Bereich von 3–4 kbar in Verbindung mit einer teilweisen Dissoziation von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen vermutlich zu einer Umstrukturierung des holo-CaM/K-Ras4B(HVR)-Komplexes kommt. Vermutet wurde, dass sich die N-Domäne aufgrund der geringeren Affinität zu  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen teilweise in diesem Druckbereich entfaltet.<sup>[180]</sup> Multimere Proteine, wie das holo-CaM/K-Ras4B(HVR)-Dimer, die durch nicht kovalente Bindungen zusammengehalten werden, dissoziieren bei vergleichsweise niedrigen Drücken. Durch die Dissoziation wird eine größere Proteinoberfläche zum Lösungsmittel exponiert, wodurch Wassermoleküle mit der Proteinoberfläche wechselwirken, was zu einer Volumenabnahme des Systems führt. Eine Druckzunahme verschiebt daher das Gleichgewicht zur Monomerisierung. Die druckabhängigen SAXS-Messungen des holo-CaM/K-Ras4B(HVR)-Dimer-Komplexes (Abbildung 4.23) deuten darauf hin, dass in Verbindung mit einer druckinduzierten Entfaltung oder auch Umstrukturierung der Domänen K-Ras4B(HVR) dissoziiert und holo-CaM als Monomer vorliegt.

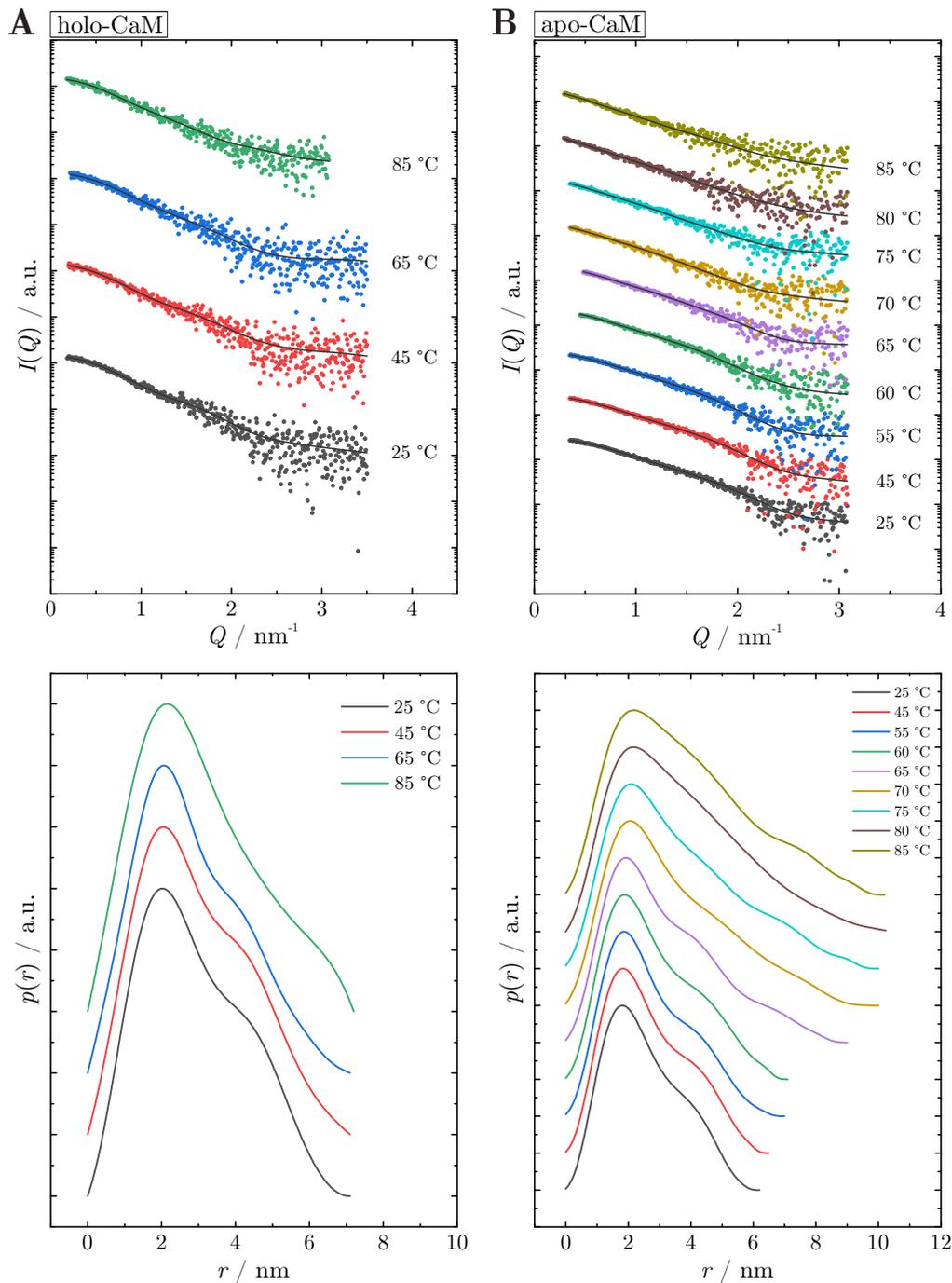


**Abbildung 4.25:** *Ab-initio*-Strukturmodelle des holo-CaM/K-Ras4B(HVR)-Komplexes bei 1 bar (schwarzes Gitternetzwerk) und bei 3000 bar (gelbe Oberfläche). Jedes *ab-initio*-Strukturmodell wurde aus 10 verschiedenen Simulationen durchgängen gemittelt.

### Temperaturstabilität

Die temperaturabhängigen SAXS-Experimente wurden an dem Gerät SAXSess mc<sup>2</sup> durchgeführt. In Abbildung 4.26 sind die Streukurven  $I(Q)$  mit den dazugehörigen  $p(r)$ -Verteilungsfunktionen von holo- und apo-CaM gezeigt.

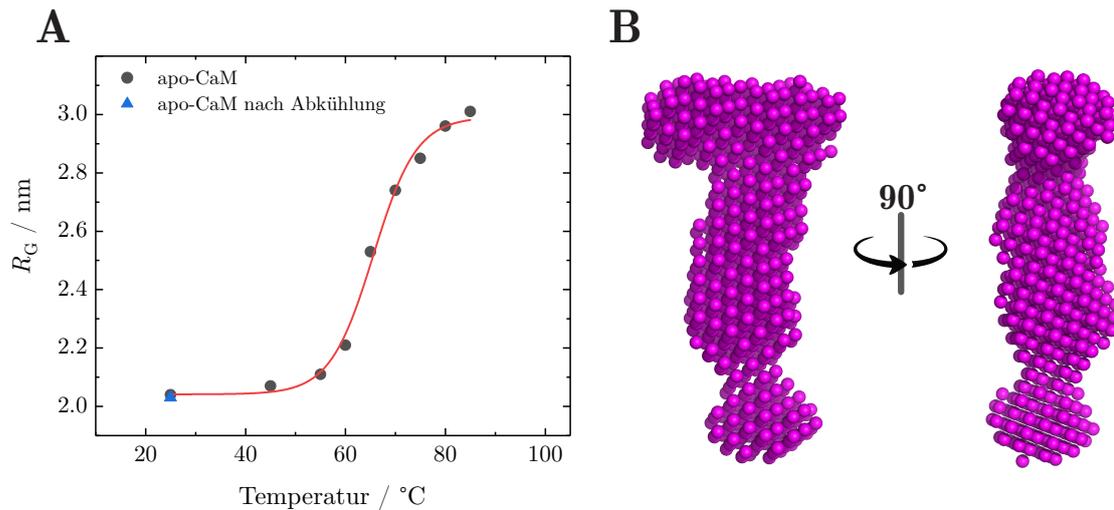
Bei 25 °C liegt der Gyrationradius von apo-CaM bei 2.05 nm und stimmt gut mit dem am DELTA gewonnen  $R_G$  überein. Bei etwa 60 °C steigt der  $R_G$  auf 2.21 nm und erreicht bei 85 °C einen maximalen Wert von 3.01 nm, mit einem maximalen Durchmesser von etwa 10 nm. Wie die FTIR-Experimente aus Abschnitt 4.3.1, zeigen auch die SAXS-Experimente eine vollständige Reversibilität der Entfaltung von apo-CaM nach dem Abkühlen von 85 °C auf 25 °C (Abbildung 9.6, Anhang). Der Gyrationradius als Funktion der Temperatur ist in Abbildung 4.27 gezeigt. Die Entfaltungstemperatur liegt etwa bei 65 °C und steht in gutem Einklang mit den FTIR-Messungen aus Abschnitt 4.3.1, wie auch mit den CD-<sup>[177]</sup> und FTIR-Experimenten<sup>[182]</sup> in der Literatur.



**Abbildung 4.26:** Temperaturabhängige Streukurven  $I(Q)$  mit den dazugehörigen  $p(r)$ -Funktionen von **A)** holo-CaM und **B)** apo-CaM. Die an die Streukurven angepassten Kurven sind als durchgezogene Linien dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden die Streukurven und die  $p(r)$ -Funktionen vertikal verschoben.

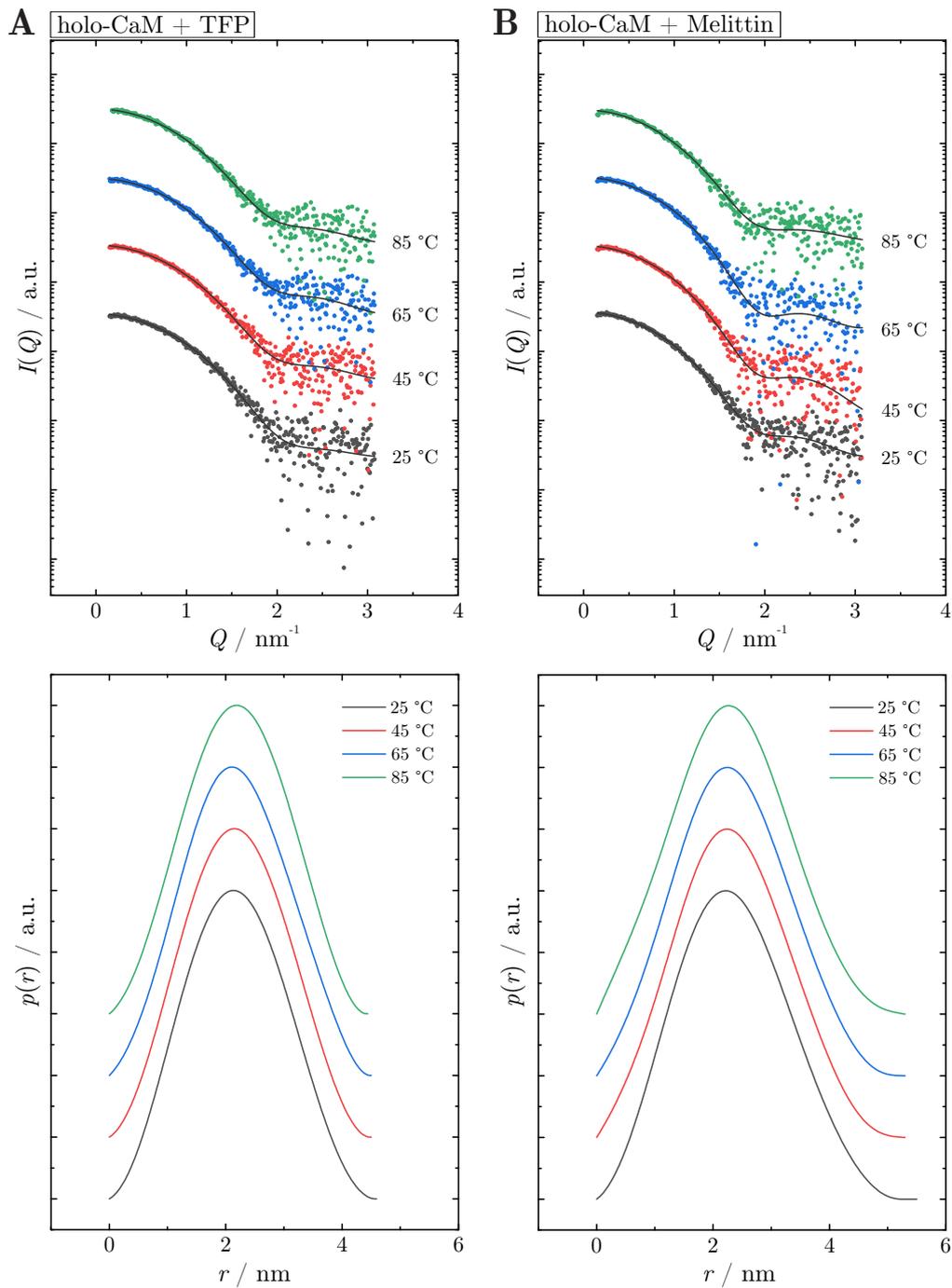
Das aus der Streukurve berechnete *ab-initio*-Formmodell von apo-CaM bei 85 °C ist charakteristisch für ein entfaltetes Protein mit einer ungeordneten Struktur

(Abbildung 4.27B).<sup>[203]</sup> Der Vergleich der *ab-initio*-Strukturmodelle bei 25 °C und 85 °C zeigt, dass vermutlich nur eine der beiden Domänen komplett entfaltet. In früheren Studien wurde eine vollständige Entfaltung durch Zugabe von 6 M Harnstoff erreicht. Der Gyrationradius bei der vollständigen Entfaltung wurde mit 3.4 nm angegeben.<sup>[203]</sup>



**Abbildung 4.27:** **A)** Der Gyrationradius von apo-CaM als Funktion der Temperatur. Die durchgezogene Linie entspricht einer Boltzmann-Anpassung. **B)** Aus der Streukurve berechnetes *ab-initio*-Strukturmodell vom apo-CaM bei 85 °C. Das *ab-initio*-Strukturmodell besteht aus 20 verschiedenen Simulationsdurchgängen.

Die Streukurven von holo-CaM sind in Abbildung 4.26A zu sehen. Aus diensen ergibt sich im Temperaturbereich von 25–65 °C ein konstanter Gyrationradius von etwa 2.24 nm. Erst bei einer Temperatur von 85 °C ist ein leichter Anstieg auf 2.29 nm zu beobachten. Dies deutet auf eine höhere thermische Stabilität als bei apo-CaM hin, wie es auch in den FTIR-Experimente (Abbildung 4.8) gefunden wurde. In Abbildung 4.28A sind die SAXS-Daten des holo-CaM/TFP-Komplexes aufgetragen. Hier wird bis 85 °C eine unveränderte symmetrische  $p(r)$ -Funktion gefunden, die auf eine globuläre geschlossene Konformation deutet. Der Gyrationradius beträgt 1.66 nm und der maximale Durchmesser 4.6 nm im gesamten Temperaturbereich. Auch die überlagerten *ab-initio*-Strukturmodelle (Abbildung 9.7A) bei 25 °C und 85 °C zeigen keine signifikanten Unterschiede. Zudem wurde die Bindung des Peptids Melittin an holo-CaM mithilfe der SAXS-Methode untersucht (Abbildung 4.28B).



**Abbildung 4.28:** Temperaturabhängige Streukurven  $I(Q)$  mit den dazugehörigen  $p(r)$ -Funktionen von **A)** holo-CaM + TFP und **B)** holo-CaM + Melittin. Die an die Streukurven angepassten Kurven sind als durchgezogene Linien dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden die Streukurven und die  $p(r)$ -Funktionen vertikal verschoben.

Die Auswertung der Streudaten liefert bei 25 °C einem Gyrationradius von 1.77 nm und einem maximalen Durchmesser von etwa 5 nm. Im Vergleich zum holo-CaM/TFP-

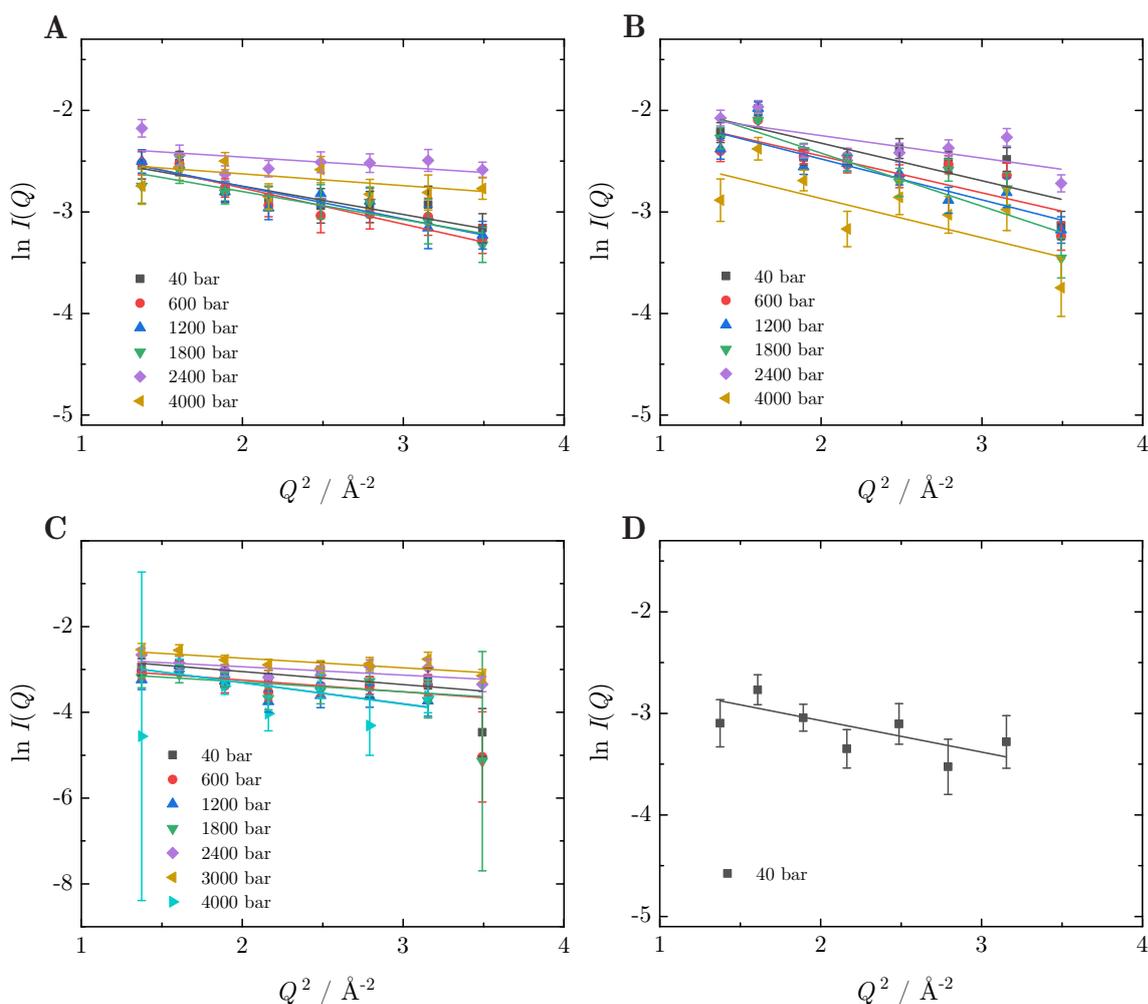
Komplex sind diese Werte etwas größer. Wie auch bei dem holo-CaM/TFP-Komplex scheint der holo-CaM/Melittin-Komplex gegen thermische Entfaltung stabil zu sein. Der Gyrationradius sowie der maximale Durchmesser sind bis 85 °C konstant und der Komplex besitzt durchgehend eine kompakte globuläre Konformation, wie aus den überlagerten *ab-initio*-Strukturmodellen bei 25 °C und 85 °C ersichtlich ist (Abbildung 9.7B, Anhang). In der Literatur werden weitere Calmodulin/Peptid-Komplexe beschrieben, wie z.B. mit Mastoparan, die einen größeren Gyrationradius als der holo-CaM/TFP-Komplex besitzen.<sup>[200,201]</sup>

### 4.3.3 Elastische Inkohärente Neutronenstreuung (EINS)<sup>§</sup>

Mithilfe der elastischen inkohärenten Neutronenstreuung (EINS) wurde die Moleküldynamik von Calmodulin mit und ohne Liganden im Nanosekundenbereich untersucht. Im Vergleich zu anderen Kernen besitzen Wasserstoffkerne einen großen inkohärenten Neutronen-Streuquerschnitt. Daher wird die Neutronenstreuung an Proteinen in dem Lösungsmittel D<sub>2</sub>O von der Streuung an den Wasserstoffkernen der Proteine dominiert. Hierbei führt die Beweglichkeit der Wasserstoffatome zu einem Energieübertrag zwischen den Wasserstoffatomen und den gestreuten Neutronen, was zu einer quasielastischen inkohärenten Neutronenstreuung führt. Je höher die Beweglichkeit der Wasserstoffatome ist, desto breiter ist die quasielastische Linie und umso kleiner ist die elastische inkohärente Neutronen-Streuung (EINS). Im Falle von Proteinlösungen kann die Mobilität der H-Atome mit der Translations- und Rotationsdiffusion der Proteinmoleküle und mit internen Protein-Bewegungen assoziiert werden.

In der Abbildung 4.29 ist  $\ln I(Q)$  als Funktion von  $Q^2$  aufgetragen. Mittels der Gauß-Näherung (Gleichung 2.29) wurde die mittlere quadratische Verschiebung (MSD,  $\langle u^2 \rangle$ ) der Protein-Wasserstoffatome aus der Steigung bestimmt.

<sup>§</sup>Untersuchungen am Protein K-Ras4B sind ein Forschungsprojekt von Prof. Dr. R. Winter. Die in dieser Arbeit gezeigten Hochdruck-EINS-Messungen wurden parallel an Calmodulin-TFP- und Calmodulin-K-Ras4B(HVR)-Proben in Zusammenarbeit mit Samy Al-Ayoubi durchgeführt, ausgewertet und interpretiert, wobei Samy Al-Ayoubi für die K-Ras4B(HVR)-Proben und der Autor dieser Arbeit für die TFP-Proben verantwortlich zeichnet.

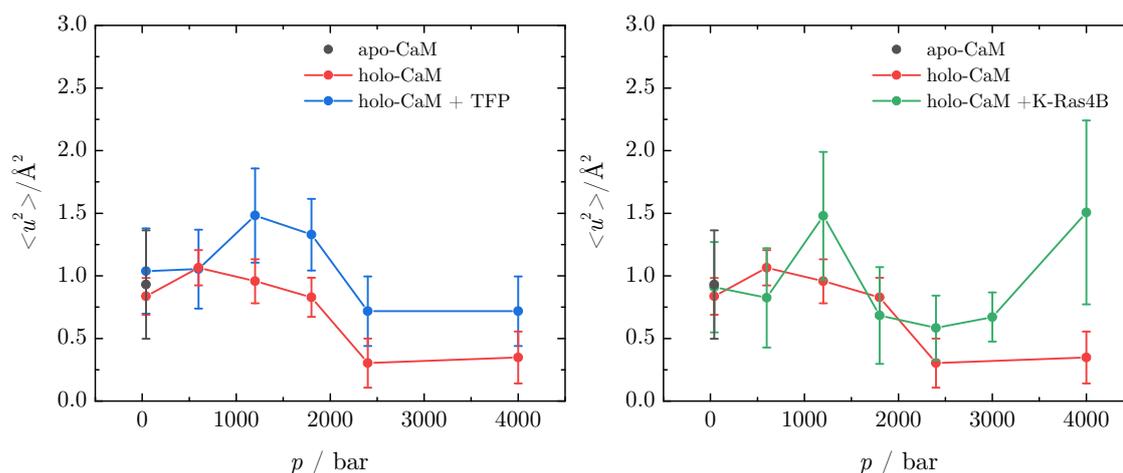


**Abbildung 4.29:**  $\ln I(Q)$  als Funktion von  $Q^2$  für  $100 \text{ mg mL}^{-1}$  **A)** holo-CaM, **B)** holo-CaM + TFP, **C)** holo-CaM + K-Ras4B(HVR) und **D)** apo-CaM. Die durchgezogene Linie ist die Gauß-Näherung nach Gleichung 2.29 im  $Q^2$ -Bereich von  $1.38\text{--}3.49 \text{ \AA}^{-2}$ .

Die Gauß-Näherung gilt für kleine  $Q$ -Werte bis etwa  $\langle u^2 \rangle Q^2 \approx 1$ . Daher wurde der  $Q^2$ -Bereich von  $1.38\text{--}3.49 \text{ \AA}^{-2}$  verwendet. Der  $Q^2$ -Bereich unterhalb von  $1.38 \text{ \AA}^{-2}$ , lässt sich der Dynamik von Wasser zuordnen und wurde daher nicht berücksichtigt. In Abbildung 4.31 sind die so erhaltenen MSD-Werte aufgetragen.

Die MSD für holo-CaM 40 bar liegt bei etwa  $0.8 \text{ \AA}^2$  und bleibt bis 2000 bar im Rahmen des Fehlers konstant (Abbildung 4.30). Bei höheren Drücken nimmt die MSD ab und erreicht bei 2400 bar einen Wert von  $0.3 \text{ \AA}^2$ , was auf einen signifikanten Verlust der Mobilität der Protein-H-Atome hinweist. Wenn TFP an Calmodulin gebunden ist, steigt die MSD bei 1200 bar auf etwa  $1.5 \text{ \AA}^2$ , bleibt etwa bis 1800 bar

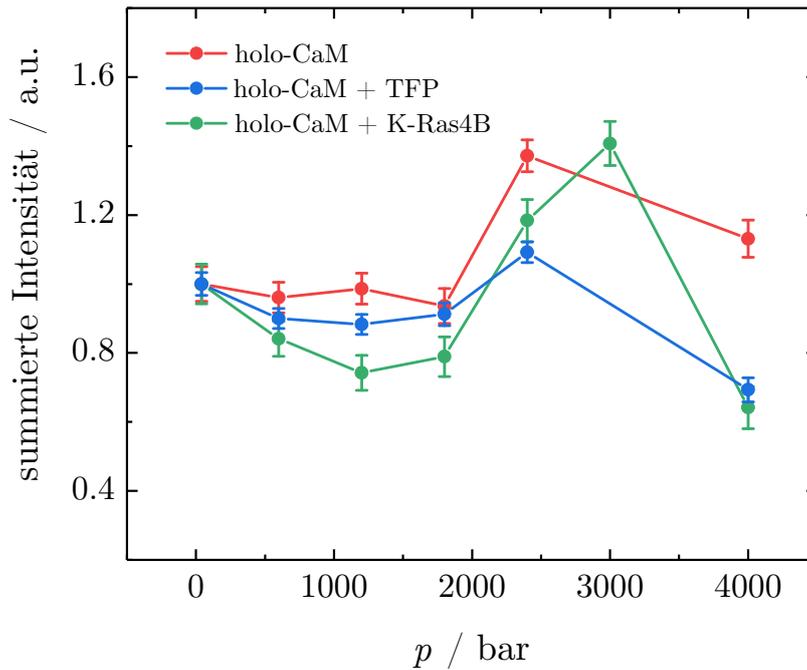
unverändert und fällt bei 2400 bar um etwa  $0.6 \text{ \AA}^2$  ab. Wie auch bei holo-CaM ist die MSD zwischen 3000–4000 bar konstant. K-Ras4B(HVR) gebundenes holo-CaM zeigt wie der holo-CaM/TFP-Komplex bei kleineren Drücken ein Anstieg der MSD und einen anschließenden Abfall bei größeren Drücken.



**Abbildung 4.30:** MSD über den  $Q^2$ -Bereich  $1.38\text{--}3.49 \text{ \AA}^{-2}$  als Funktion des Drucks von apo-CaM, holo-CaM, holo-CaM + TFP und holo-CaM + K-Ras4B(HVR).

In der Abbildung 4.31 sind die summierten Intensitäten aller Detektoren als Funktion des Drucks aufgetragen. Der  $Q^2$ -Bereich, über den die Intensitäten summiert wurden, ist ebenfalls  $1.38\text{--}3.49 \text{ \AA}^{-2}$ . Die Intensitäten wurden um den Beitrag der leeren Zelle und des Puffers korrigiert und auf den Standard Vanadium normiert. Die absolute summierte Intensität hängt hauptsächlich von der Anzahl der Teilchen im Neutronenstrahl ab. Daher wurden die Kurven auf den Wert bei 40 bar normiert, wodurch ein direkter Vergleich der verschiedenen Proben möglich ist (40 bar diente als Startwert der Druck-Scans). Der Verlauf der summierten Intensität ist weniger fehlerbehaftet als die MSD, da über den gesamten  $Q$ -Bereich summiert wurde, sodass signifikante Trends in den Daten deutlicher auszumachen sind.<sup>[208]</sup> Man erkennt, dass die summierte elastische inkohärente Neutronenstreuintensität von holo-CaM bis 1800 bar konstant bleibt und dann bei höheren Drücken ansteigt, was auf einen Verlust an Dynamik der Protein-H-Atomen hindeutet. Ferner wird eine druckinduzierte Abnahme des summierten Signals im Druckbereich von 600–1800 bar beobachtet (Abbildung 4.31), wenn holo-CaM TFP oder K-Ras4B(HVR) als Liganden gebunden

hat. Somit kommt es in diesem Druckbereich zu einer Zunahme der H-Atom-Dynamik, was mit einer druckinduzierten Schwächung der holo-CaM-Ligand-Wechselwirkung erklärt werden kann.



**Abbildung 4.31:** Über den  $Q^2$ -Bereich  $1.38\text{--}3.49 \text{ \AA}^{-2}$  summierte elastische inkohärente Neutronenstreu-Intensität als Funktion des Drucks von holo-CaM, holo-CaM + TFP und holo-CaM + K-Ras4B(HVR). Alle Punkte wurden auf den jeweiligen Wert bei 40 bar normiert.

Bei Normaldruck besitzen Proteine Kavitäten innerhalb ihrer Struktur, die nicht mit Wassermolekülen besetzt sind. Bei niedrigen Drücken ( $0.5 \sim 2 \text{ kbar}$ ) werden elektrostatische Wechselwirkungen geschwächt, während bei hohen Drücken ( $\sim 5 \text{ kbar}$ ) in Verbindung mit erhöhter Fluktuation der Proteinstruktur die Kavitäten mit Wassermolekülen aufgefüllt werden.<sup>[66]</sup> Die Abnahme der MSD ab 2000 bar (Abbildung 4.30) lässt sich daher durch das Eindringen von Wassermolekülen in die Kavitäten innerhalb des Proteins erklären, wodurch die Freiheitsgrade der H-Atome des Proteins geringer werden und somit auch die Protein-Dynamik. Eine druckabhängige Abnahme der MSD von Protein-H-Atome konnte ebenfalls in früheren Studien mit

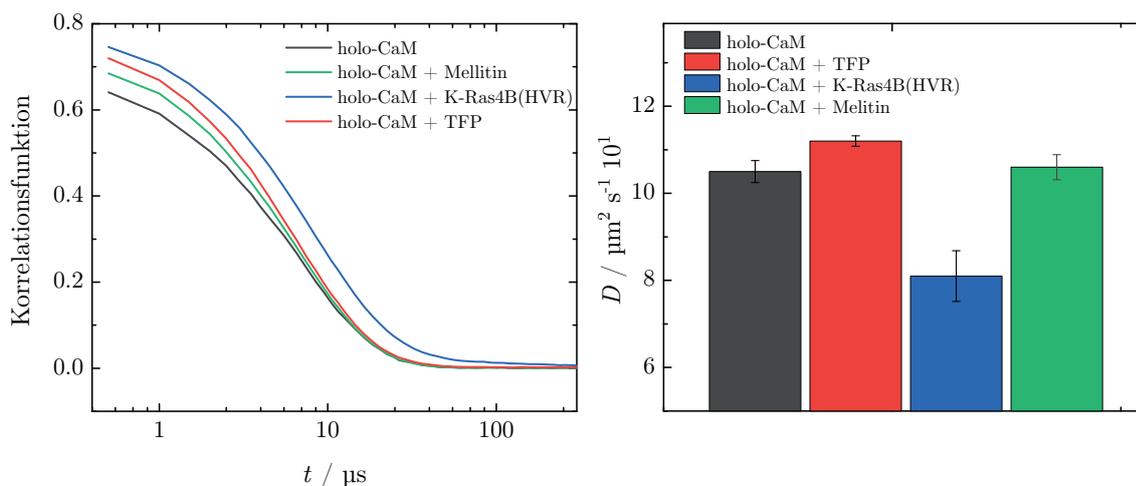
Acetylcholinesterase<sup>[209]</sup> und Lysozym<sup>[210]</sup> beobachtet werden.

Die Zunahme der MSD bei holo-CaM/TFP und holo-CaM/K-Ras4B(HVR) bis 1200 bar lässt sich auf die Schwächung der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Calmodulin und TFP bzw. dem K-Ras4B(HVR)-Peptid zurückführen. Das gemessene  $\langle u^2 \rangle$  besteht einerseits aus dem Beitrag vom Calmodulin und andererseits aus dem Beitrag von dem Liganden. Bei den holo-CaM/TFP-Messungen lag ein molares Verhältnis von 1:5 (CaM:TFP) in Lösung vor und bei den holo-CaM/K-Ras4B(HVR)-Messungen eines von 1:1.2 (CaM:K-Ras4B(HVR)). In den jeweiligen Messungen lassen sich 12 % aller H-Atome TFP und 8 % K-Ras4B(HVR) zuordnen. Durch die Schwächung der elektrostatischen Wechselwirkungen erlangen die Liganden eine vergleichsweise größere Dynamik, was sich in einem größeren  $\langle u^2 \rangle$  bzw. in einem Abfall der summierten Intensität bemerkbar macht. Die Ligandenbindung scheint bei 40 bar hingegen keine Auswirkungen auf die Moleküldynamik des Proteins im gemessenen Zeitfenster zu haben.  $\langle u^2 \rangle$  ist im Rahmen des Fehlers für apo-CaM und holo-CaM, mit und ohne Ligand, nahezu gleich. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine strukturelle Stabilisierung eines Proteins durch Ligandenbindung nicht automatisch mit einem Verlust der Dynamik einhergeht. Im Falle von Myoglobin führt die Bindung der Häm-Gruppe sogar zu einem Anstieg der Proteindynamik.<sup>[211]</sup>

Von 3000 bar auf 4000 bar zeigt die MSD von holo-CaM/K-Ras4B(HVR) einen starken Anstieg um etwa  $0.8 \text{ \AA}^2$ , der bei holo-CaM und der TFP-gebundenen Form nicht auftritt. Das Ergebnis aus den SAXS-Messungen in Abschnitt 4.3.2 ließ die Schlussfolgerung zu, das Calmodulin in Anwesenheit von K-Ras4B(HVR) ein Dimer-Komplex ausbildet, der ab 3000 bar dissoziiert. Der Anstieg der MSD ab 3000 bar könnte daher die Folge der Dissoziation sein, wobei das ungebundene kleine K-Ras4B(HVR)-Peptid eine größere Dynamik besitzt und somit das  $\langle u^2 \rangle$  steigt.

### 4.3.4 Dynamische Lichtstreuung (DLS)<sup>¶</sup>

Mithilfe der dynamischen Lichtstreuung (DLS) wurden die Diffusionskoeffizienten von holo-CaM, holo-CaM + TFP, holo-CaM + Melittin und holo-CaM + K-Ras4B(HVR) ermittelt. In Abbildung 4.32 sind die gemessenen Korrelationsfunktionen als Funktion der Zeit aufgetragen. Die zugehörigen Intensitätsverteilungen sind im Anhang zu finden (Abbildung 9.8).



**Abbildung 4.32:** **A)** Korrelationsfunktionen als Funktion der Zeit. **B)** Diffusionskoeffizient von holo-CaM, holo-CaM + TFP, holo-CaM + Melittin und holo-CaM + K-Ras4B(HVR) gemittelt aus insgesamt 30 Einzelmessungen.

Im Rahmen des Fehlers sind die erhaltenen Diffusionskoeffizienten  $D$  von holo-CaM, holo-CaM + TFP und holo-CaM + Melittin ähnlich und liegen bei etwa  $105\text{--}112 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ . Der Diffusionskoeffizient von dem holo-CaM/K-Ras4B(HVR)-Komplex ist hingegen mit  $80 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  deutlich geringer. Mithilfe der SAXS-Experimente in Abschnitt 4.2.3 konnte gezeigt werden, dass bei einem molaren Verhältnis von 1:1.2 von holo-CaM zum K-Ras4B(HVR)-Peptid vermutlich ein holo-CaM/K-Ras4B(HVR)-Dimer-Komplex mit einem deutlich größeren Radius als der von ungebundenem holo-CaM vorliegt. Nach der Stokes-Einstein-Gleichung hängt der Diffusionskoeffizient unter anderem

<sup>¶</sup>Untersuchungen am Protein K-Ras4B sind ein Forschungsprojekt von Prof. Dr. R. Winter. Die in dieser Arbeit gezeigten DLS-Messungen wurden parallel an Calmodulin-TFP-, Calmodulin-Melittin- und Calmodulin-K-Ras4B(HVR)-Proben in Zusammenarbeit mit Samy Al-Ayoubi durchgeführt, ausgewertet und interpretiert, wobei Samy Al-Ayoubi für die K-Ras4B(HVR)-Proben und der Autor dieser Arbeit für die TFP- und Melittin-Proben verantwortlich zeichnet.

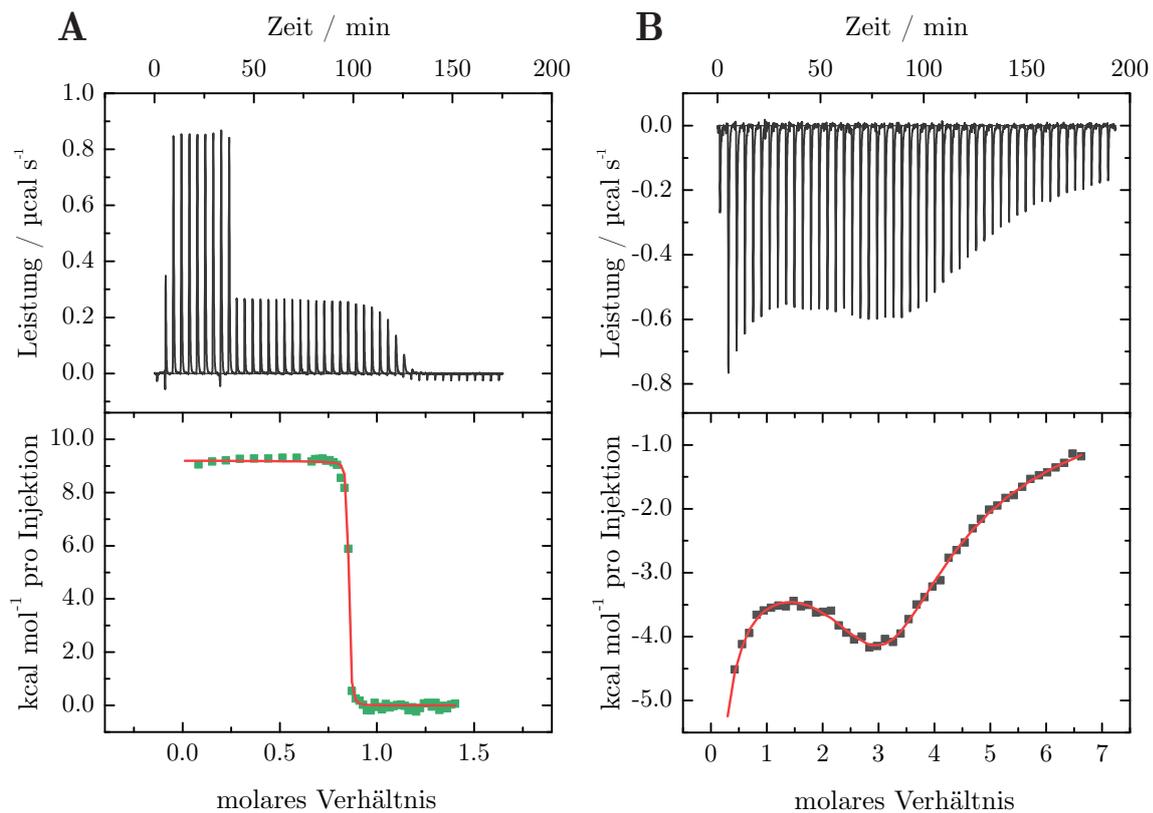
von dem hydrodynamischen Radius des diffundierenden Moleküls ab, wodurch sich der kleinere Diffusionskoeffizient erklären lässt. Die erhaltenen Diffusionskoeffizienten zeigen, dass die Translationsdiffusion im Fall von holo-CaM und holo-CaM/TFP den gleichen Beitrag zu  $\langle u^2 \rangle$ , welches aus dem obigen EINS-Messungen ermittelt wurde, liefern sollte. Der höhere  $\langle u^2 \rangle$ -Wert des holo-CaM/TFP-Komplexes (Abbildung 4.30) lässt sich daher nicht mit einem größeren Diffusionskoeffizienten erklären. Im Fall des holo-CaM/K-Ras4B(HVR)-Komplexes sollte der kleinere Diffusionskoeffizient (Abbildung 4.32) den  $\langle u^2 \rangle$ -Wert verringern, was im Vergleich zu freiem holo-CaM nicht beobachtet werden kann. Damit bilden die  $\langle u^2 \rangle$ -Werte in Abbildung 4.32 im Wesentlichen Einflüsse der internen Proteindynamik ab.

#### 4.3.5 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) - Messungen

Die Wechselwirkung von holo-CaM mit den Liganden K-Ras4B(HVR), TFP und Melittin wurde mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) untersucht. Typische ITC-Daten für die Bindung von Melittin und TFP an holo-CaM sind in Abbildung 4.33 und von K-Ras4B(HVR) in Abbildung 4.34 gezeigt. Die Fläche jedes Peaks gibt den Wärmeumsatz während der Injektion wieder und korreliert mit der Reaktionsenthalpie.

Die Bindungsreaktion von Melittin an holo-CaM verläuft endotherm, wie an den positiven Peaks zu erkennen ist. Die endotherme Reaktion basiert vermutlich auf der hydrophoben Wechselwirkung mit der zentralen Linker-Region von Calmodulin, wobei die Seitenketten von CaM und Melittin zunächst dehydratisiert werden müssen und dadurch  $\text{H}_2\text{O}$  an Entropie gewinnt. Für holo-CaM + Melittin konnten die Werte  $\Delta H = 35.2 \text{ kJ mol}^{-1}$  und  $\Delta S = 280 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  ermittelt werden (Abbildung 4.33A). In der Literatur sind für holo-CaM + Melittin Werte von  $\Delta H = 30.3 \text{ kJ mol}^{-1}$  und  $\Delta S = 275 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  angegeben.<sup>[212]</sup> Eine endotherme Ligandenbindungen an Calmodulin konnte ebenfalls mit Phosphodiesterase beobachtet werden.<sup>[213]</sup>

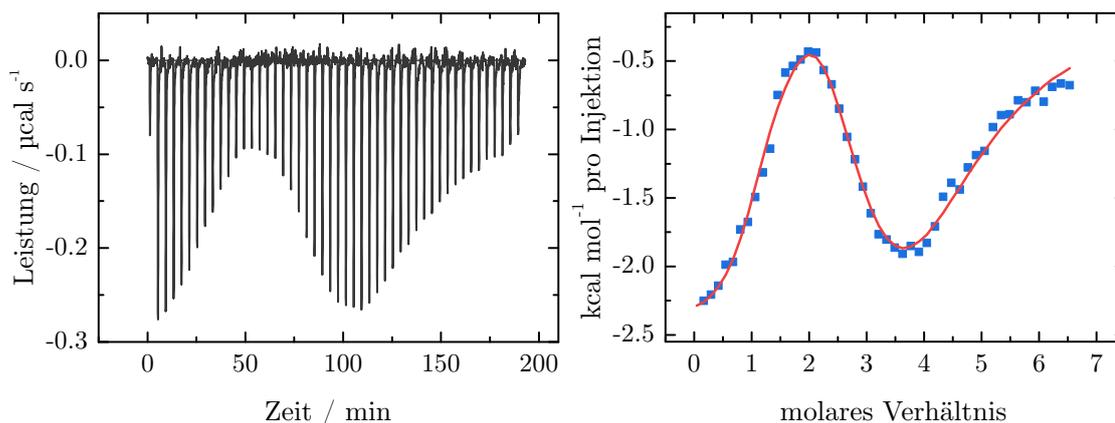
Die Wechselwirkung von TFP mit Calmodulin hingegen ist überwiegend exothermer Natur, was auf eine Bindung durch überwiegend ionische Wechselwirkung schließen lässt (Abbildung 4.33B). Die Bindungsreaktion von anderen Wirkstoffen, wie W-7



**Abbildung 4.33:** ITC-Titrationskurve **A)** einer 0.3 mM Melittin-Lösung (20 mM HEPES, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 150 mM NaCl, pH=6.6), die zu einer 0.045 mM Calmodulin-Lösung titriert wurde (Injektion 2-8: 12  $\mu\text{L}$ , Injektion 9-35: 6  $\mu\text{L}$ ), und **B)** einer 0.7 mM TFP-Lösung (20 mM HEPES, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 150 mM NaCl, pH=6.6), die zur einer 0.023 mM Calmodulin-Lösung titriert wurde (bei jeder Injektion 6  $\mu\text{L}$ ).

und W-13, mit Calmodulin sind ebenfalls enthalpie-getrieben.<sup>[214]</sup> Die Titrationskurve von TFP an CaM deutet darauf hin, dass das Binden von TFP in mehreren Schritten verläuft. Das lokale Maximum in der Wärmeflusskurve bei einem molaren Verhältnis von  $\sim 1.5$  deutet auf einen endothermen, entropie-getriebenen Teilschritt der TFP-holo-CaM-Komplexbildung hin. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Bindestellen in der C-Domäne die größte Affinität für TFP besitzen.<sup>[215,216]</sup> Weitere TFP-Bindestellen mit geringerer Affinität befinden sich in der N-Domäne und überbrückend zwischen den beiden Domänen.<sup>[216]</sup> Weiterhin wird zwischen hochaffinen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen und weniger affinen  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Bindestellen unterschieden. Die Kristallstruktur des TFP-gebundenen holo-CaM zeigt, dass die hydrophoben Taschen der C- und N-Domänen und die Linker-Region von holo-CaM verschiedene Bindungsregionen für TFP-Moleküle aufweisen. Ebenso ist bekannt, dass bereits bei

der Stöchiometrie 1:1 Calmodulin eine Konformationsänderung von der offenen zu einer globulären Konformation durchläuft. Es ist daher vorstellbar, dass zunächst nur eine bestimmte Bindestelle mit TFP besetzt wird und eine Konformationsänderung in Calmodulin auslöst. Diese Änderung erhöht wiederum die Affinität der anderen TFP-Bindestellen. Eine solche positive Kooperativität ist ebenfalls für andere Wirkstoffe beschrieben worden.<sup>[214,217–219]</sup> Ebenso ist das kooperative Binden von TFP an das weitgehend zu Calmodulin homologe Troponin C bekannt.<sup>[220]</sup> Calmodulin besitzt vier Bindestellen für TFP. Trotzdem ist bei einem molarem Verhältnis von 1:7 die Reaktion weiterhin exotherm. Dies kann damit erklärt werden, dass TFP bei pH=6.6 positiv geladen ist und Calmodulin eine hohe negative Nettoladung von  $-15$  besitzt, wodurch eine niederaffine unspezifische Bindung von TFP an holo-CaM zustande kommt.<sup>[221]</sup>



**Abbildung 4.34:** ITC-Titrationskurve einer  $0.6 \text{ mM}$  K-Ras4B(HVR)-Lösung ( $20 \text{ mM}$  HEPES,  $10 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $150 \text{ mM}$   $\text{NaCl}$ ,  $\text{pH}=6.6$ ), die zur einer  $0.02 \text{ mM}$  holo-Calmodulin-Lösung (Injektion  $6 \mu\text{L}$ ) titriert wurde.

Wie auch bei der Komplexbildung von holo-CaM/TFP, ist die Wechselwirkung von K-Ras4B(HVR) mit holo-Calmodulin überwiegend exotherm und somit enthalpiegetrieben, was auf eine überwiegend elektrostatische Wechselwirkung mit der Poly-Lysin-Sequenz von K-Ras4B(HVR) hindeutet (Abbildung 4.34). Der Verlauf zeigt auch, dass die exotherme Bindung durch endotherme Beiträge kompensiert wird. Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen in Literatur überein, bei denen festgestellt wurde, dass andere Ras-Isoformen, die keine polybasische Domäne besitzen,

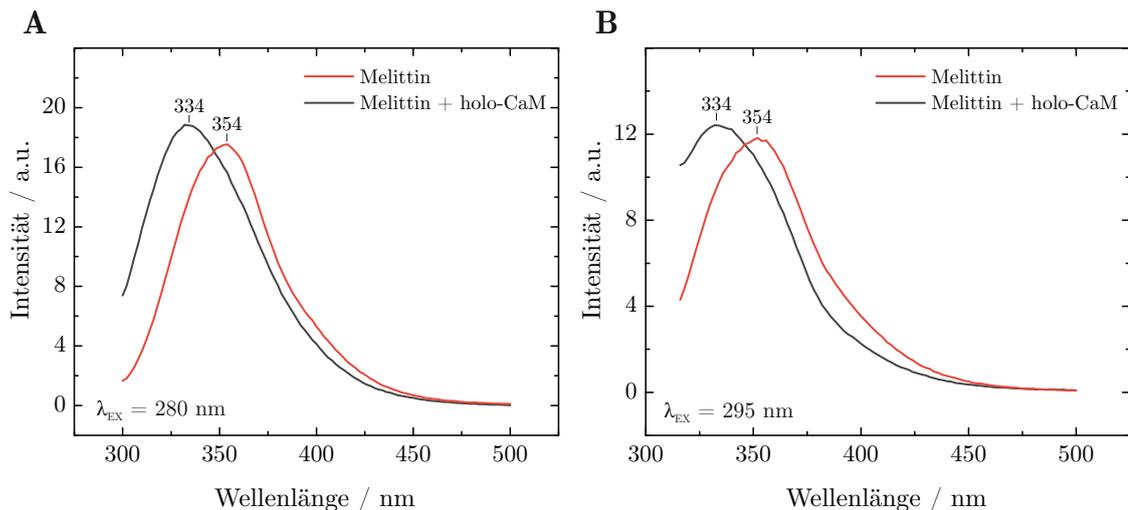
nicht an Calmodulin binden.<sup>[155]</sup> Andere Studien berichten, dass neben der Poly-Lysin-Region jedoch auch der Farnesyl-Anker für die Bindung wichtig ist.<sup>[156]</sup> Die Titrationskurve in Abbildung 4.34 zeigt des Weiteren, dass die Bindung nicht wie bei dem holo-CaM/Melittin-Komplex eine einfache 1:1-Stöchiometrie hat. Wie mit den SAXS- und DLS-Experimenten gezeigt werden konnte, bildet sich vermutlich bei einem 1:1.2-molarem Verhältnis (holo-CaM:K-Ras4B(HVR)) ein Dimer-Komplex, während bei einem vierfachen Überschuss von K-Ras4B(HVR) ein Monomer-Komplex gebildet werden. Dieses mehrstufige Bindungsverhalten spiegelt sich in der Titrationskurve wider. In der Literatur wurde für die Bindung von holo-Calmodulin mit der hypervariablen Region von K-Ras4B(HVR) ohne Farnesylrest eine 1:1-Stöchiometrie gefunden.<sup>[160]</sup> Anders als in dieser Arbeit wurde in der Literatur holo-Calmodulin zu der K-Ras4B-Lösung titriert. Somit liegt der Ligand stets im Überschuss vor und es werden daher vermutlich bevorzugt Monomer-Komplexe ausgebildet.

### 4.3.6 Fluoreszenzmessungen

Mittels der Fluoreszenzspektroskopie wurde die Druckstabilität der Ligandenbindung von holo-Calmodulin untersucht. Calmodulin besitzt zwei Tyrosinreste, die sich in der C-Domäne an den Positionen 138 und 99 befinden und als Donoren wirken können. Zur Untersuchung von intermolekularem FRET wurde das Peptid Melittin verwendet. Melittin besitzt einen Tryptophanrest an der Position 19, der als Akzeptor für einen Energie-Transfer dienen kann. Bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm wird überwiegend Tryptophan von Melittin angeregt, während bei 280 nm sowohl Tyrosin von holo-CaM als auch Tryptophan von Melittin angeregt werden. Wenn Melittin an holo-CaM gebunden ist, wird ein Förster-Resonanzenergietransfer von den Tyrosinresten des holo-CaM zum Trp-Rest des Moleküls stattfinden, der mit der Effizienz  $E$  beschrieben werden soll. Dann berechnet sich die Trp-Fluoreszenzintensität bei 350 nm gemäß

$$\frac{I_{\text{ex280/em350}}}{I_{\text{ex295/em350}}} \propto (f_{\text{Tyr}} \cdot E + f_{\text{Trp}}) \quad (4.1)$$

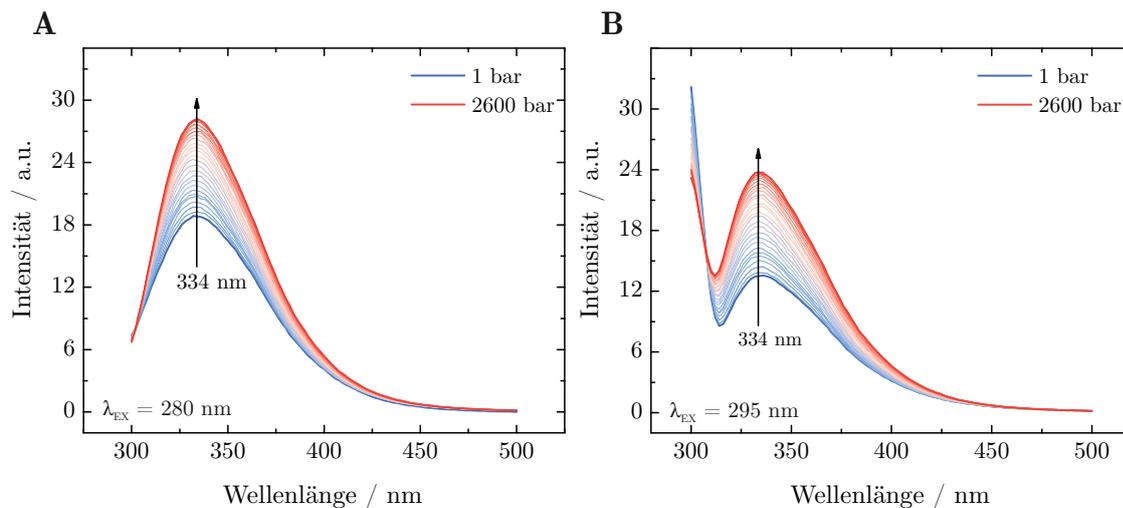
wobei  $f_{\text{Tyr}}$  und  $f_{\text{Trp}}$  die Anregung der Tyr- und Trp-Reste bei 280 nm repräsentieren. Regt man die Tyr- und Trp-Reste bei 280 nm an (ex280), wird die Trp-Fluoreszenz (em350) verstärkt, wenn  $E$  groß ist, da dann ein zusätzlicher Anregungsweg über die Tyr-Reste besteht. Wenn Melittin von holo-CaM dissoziiert, geht  $E$  gegen 0 und die Fluoreszenz-Intensität bei 350 nm sinkt.



**Abbildung 4.35:** Fluoreszenzspektrum von Melittin und Melittin, das an gebundenem holo-CaM gebunden ist, angeregt bei **A)** 280 nm und **B)** 295 nm.

In Abbildung 4.35 ist das Fluoreszenzspektrum von Melittin und von Melittin an holo-CaM gebunden dargestellt. Bei der Anregung von ungebundenem Melittin bei 280 nm oder 295 nm liegt das Maximum der Fluoreszenzbande bei 354 nm, da das Tryptophan zum polaren Lösungsmittel exponiert ist. Bindet Melittin an holo-CaM, so befindet sich der Tryptophanrest im unpolaren, hydrophoben Bereich zwischen Calmodulin und Melittin, wodurch eine Blauverschiebung der Fluoreszenzbande zu 334 nm beobachtet wird. Das Emissionsmaximum von freiem Melittin liegt bei beiden Anregungswellenlängen bei 354 nm und stimmt mit früheren Studien in der Literatur überein.<sup>[152,222]</sup>

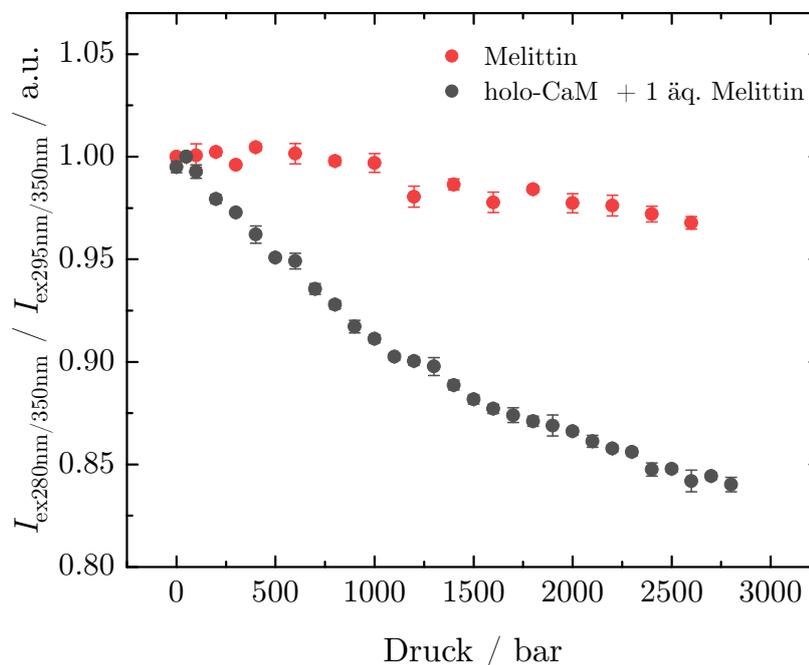
Die druckabhängigen Fluoreszenzmessungen sind in Abbildung 4.36 dargestellt. Mit steigendem Druck ist eine Zunahme der Quantenausbeute des Trp zu beobachten. Die Quantenausbeute von ungebundenem Melittin hingegen nimmt über den Druckbereich 1–2400 bar geringfügig ab (Abbildung 9.9, Anhang).



**Abbildung 4.36:** Druckabhängige Fluoreszenzspektren des holo-CaM/Melittin-Komplexes im Bereich von 1–2600 bar.

Zur quantitativen Auswertung des Energie-Transfers von Tyrosin auf Tryptophan wurde das Intensitätsverhältnis von  $I_{\text{ex}280/\text{em}350}/I_{\text{ex}295/\text{em}350}$  gebildet. Hierfür wurde die Fluoreszenz-Intensität bei 350 nm gewählt, da Tyrosin bei dieser Wellenlänge keine Emission aufzeigt. Der Grundgedanke ist, wenn die FRET-Effizienz mit steigendem Druck unverändert bleibt, sollte das Intensitätsverhältnis bei 350 nm konstant bleiben. Würde hingegen die Distanz zwischen den beiden Fluorophoren kleiner oder größer werden, würde sich dies in einer Zunahme bzw. Abnahme des Intensitätsverhältnisses bemerkbar machen.

Das druckabhängige Intensitätsverhältnis des holo-CaM/Melittin-Komplexes (Abbildung 4.37) sinkt mit steigendem Druck um etwa 15 %. Freies Melittin in Lösung, welches als Referenz dient, zeigt dagegen keine signifikante Änderung. Eine Abnahme des FRET mit steigendem Druck lässt sich mit einem größer werdenden Abstand zwischen den beiden Fluorophoren im holo-CaM/Melittin-Komplex erklären, wodurch  $E$  in Gleichung 4.1 kleiner wird. Da sich im gesamten Druckbereich das Maximum bei 334 nm befindet, sind die meisten Melittin-Moleküle jedoch gebunden und nur ein kleiner Teil dissoziiert vermutlich. Eine Rotverschiebung der Trp-Bande zu 354 nm ist erst dann zu beobachten, wenn die Mehrzahl der Melittin-Moleküle frei vorliegt. Es ist bekannt, dass Melittin ebenfalls an apo-Calmodulin, wenn auch mit einer

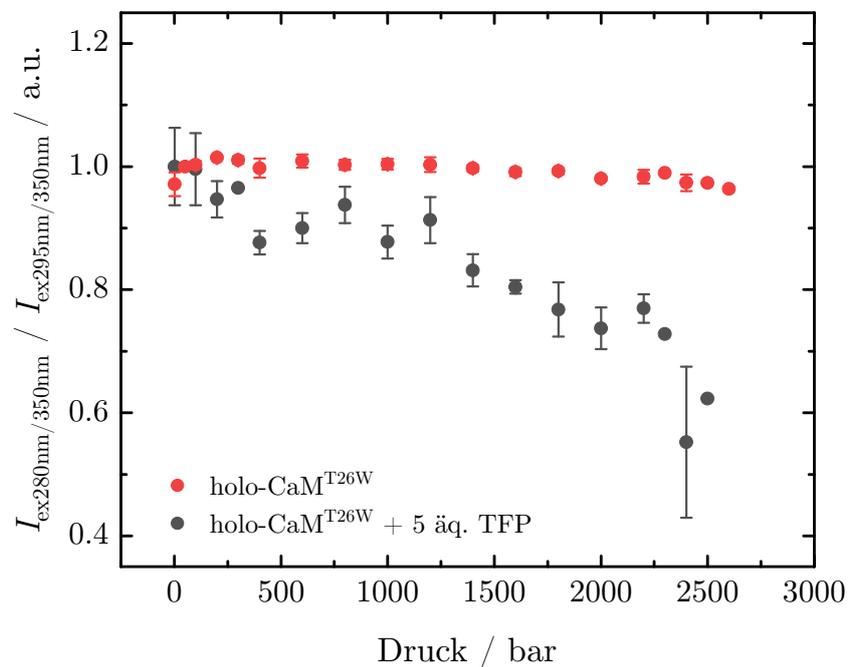


**Abbildung 4.37:** Das Intensitätsverhältnis von  $I_{\text{ex}280\text{nm}/\text{em}350}/I_{\text{ex}295\text{nm}/\text{em}350}$  von Melittin in Lösung und Melittin mit 1 äq. holo-CaM als Funktion des Drucks. Alle Punkte wurden auf 1 bar normiert.

geringeren Affinität als an holo-CaM, bindet.<sup>[149,152]</sup> Der apo-CaM/Melittin-Komplex besitzt hierbei statt einer kompakten globulären Form eine hantelförmige Konformation. Es ist denkbar, dass durch die Druckapplikation  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen teilweise dissoziieren und dann nur eine Umorientierung der Komplex-Struktur stattfindet, wobei der Abstand zwischen Donor und Akzeptor größer wird. Zurzeit gibt es keine Kristallstruktur des holo-Calmodulin/Melittin-Komplexes. Es wird jedoch vermutet, dass Melittin parallel an Calmodulin bindet. Dies würde bedeuten, dass die N- und C-terminalen Regionen des Peptids mit den N- und C-Domänen des Proteins assoziieren.<sup>[154,223]</sup> Es ist ebenfalls aus früheren Studien bekannt, dass die N-Domäne von holo-CaM eine geringere Stabilität als die C-terminale Domäne besitzt, wodurch eine druckinduzierte Reorganisation der N-Domäne vorstellbar wäre. In druckabhängigen Studien von apo-CaM mit dem Liganden Neuromodulin wurde ebenfalls von einer druckinduzierten Reorganisation der Struktur berichtet, die nicht aus einer Dissoziation des Peptids

resultiert.<sup>[187]</sup> Weiterhin zeigen die druckabhängigen FTIR-Experimente in dieser Arbeit (Unterabschnitt 4.3.1), dass bis zu einem Druck von 3000 bar nur geringe Änderungen der Sekundärstruktur und des  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsgrades stattfinden und eine vollständige Dissoziation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen erst bei etwa 9 kbar vorliegt.

Weiterhin wurden druckabhängige intramolekulare FRET-Untersuchungen durchgeführt. Hierfür wurde die Mutante  $\text{CaM}^{\text{T26W}}$  mit einem Tryptophan-Rest hergestellt. Das Tryptophan an der Position 26 befindet sich in der N-Domäne und kann als Akzeptor beim Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) von Y138 und Y99 dienen. Da sich Tyrosin und Tryptophan auf verschiedenen Domänen von Calmodulin befinden, hängt das FRET-Signal vom Konformations- und Bindungszustand des Calmodulins ab. Als Ligand wurde TFP verwendet. TFP gehört zu den Liganden, die eine große Konformationsänderung induzieren und sich somit gut für intramolekulare FRET-Untersuchungen eignen. Das Absorptionsmaximum von holo- $\text{CaM}^{\text{T26W}}$  liegt bei 1 bar bei 354 nm und verschiebt sich mit steigendem Druck geringfügig zu 350 nm. In der Literatur ist eine Verschiebung des Maximums der Fluoreszenzbande von 345 nm zu 354 nm beschrieben, wenn  $\text{Ca}^{2+}$ -freies  $\text{CaM}^{\text{T26W}}$  (apo- $\text{CaM}$ ),  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bindet. Hinsichtlich des Förster-Resonanzenergietransfers zeigt holo- $\text{CaM}^{\text{T26W}}$  ohne Ligand bis 2700 bar keinen Druckeffekt (Abbildung 4.38). Hat  $\text{CaM}^{\text{T26W}}$  jedoch vier TFP-Moleküle gebunden, sinkt mit zunehmendem Druck das Intensitätsverhältnis um etwa 40 % (Abbildung 4.38). Wie die druckabhängigen intermolekularen FRET-Untersuchungen mit Melittin zeigen auch die intramolekularen FRET-Untersuchungen mit TFP eine Abnahme des Förster-Resonanzenergietransfers mit steigendem Druck. Der nicht zu beobachtende Druckeffekt auf das Intensitätsverhältnis von  $\text{CaM}^{\text{T26W}}$  ohne Liganden kann damit erklärt werden, dass hier in der offenen Konformation die beiden Fluorophore einen druckunabhängigen Abstand haben. Für den Energietransfer von W26 zu Y138 bei holo- $\text{CaM}^{\text{T26W}}$  ist zudem in der Literatur eine Energietransfer-Effizienz  $E$  von  $<0.1$  angegeben. In der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Form liegt  $E$  bei 0.192.<sup>[224]</sup> Die SAXS-Messungen an holo- $\text{CaM}$ /TFP zeigen bis 3000 bar eine kompakte globuläre Struktur (Abbildung 4.22). Vermutlich zeigt die druckinduzierte Abnahme des Intensitätsverhältnisse von holo- $\text{CaM}^{\text{T26W}}$ /TFP (Abbildung 4.38C) daher nur eine Umstrukturierung des Komplexes und keine Dissoziation von TFP.



**Abbildung 4.38:** Das Intensitätsverhältnis von  $I_{\text{ex}280/\text{em}350}/I_{\text{ex}295/\text{em}350}$  von  $\text{CaM}^{\text{T}26\text{W}}$  in Lösung und  $\text{CaM}^{\text{T}26\text{W}}$  mit 5 äq. TFP als Funktion des Drucks. Alle Punkte wurden auf 1 bar normiert.

## 4.4 Zusammenfassung von Kapitel 4

Calmodulin (CaM) ist ein ubiquitäres Protein, das durch Aktivierung oder Inhibition von Zielproteinen an verschiedenen Funktionen wie Muskelkontraktion, Apoptose, Stoffwechsel, Entzündungsreaktionen und Immunantwort beteiligt ist.<sup>[107]</sup> Neben natürlich vorkommenden Liganden wie dem Peptid Melittin und K-Ras4B bindet Calmodulin auch kleine Wirkstoffmoleküle wie das Antipsychotikum Trifluoperazin (TFP).<sup>[133–135,148,160,161]</sup> In diesem Kapitel wurden mittels verschiedener experimenteller Methoden die unterschiedliche Einflüsse von einem Wirkstoff und einem natürlichen Liganden auf die Stabilität wie auch auf die Dynamik von Calmodulin untersucht.

Mittels der FTIR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass bei hoher Temperatur und bei hohem Druck  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen von holo-CaM dissoziieren. Die Bindung von TFP oder Melittin wirkt sich hierbei stabilisierend auf die Struktur aus, wodurch die Dissoziation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu höheren Drücken und Temperaturen verschoben ist. Der Wirkstoff TFP, der als Antagonist fungiert, scheint eine stabilisierendere Wirkung zu besitzen als der natürliche Ligand Melittin. Bei holo-CaM liegt eine vollständige Dissoziation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bei etwa 9 kbar vor, die für den holo-CaM/Melittin-Komplex zu etwa 11 kbar verschoben ist. Die große stabilisierende Wirkung von TFP auf Calmodulin ließ eine vollständige Dissoziation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in dem vermessenen Druckbereich von 1–12 kbar nicht zu. Wie die Sekundärstrukturanalysen jedoch verdeutlichen, scheinen Druck und Temperatur nur einen marginalen Effekt auf die Sekundärstruktur zu haben. Intermolekulare FRET-Untersuchungen mit Melittin, sowie intramolekulare FRET-Untersuchungen mit TFP belegen allerdings eine geringe Umstrukturierung der Konformation der holo-CaM/Ligand-Komplexe bis 2600 bar.

Die druck- sowie temperaturabhängigen SAXS-Messungen bestätigen ebenfalls die stabilisierende Wirkung von TFP auf holo-Calmodulin. Im Bereich von 1–3000 bar und 25–85 °C zeigt der holo-CaM/TFP-Komplex keine Veränderungen des Gyrationradius und des maximalen Durchmessers. Die berechneten *ab-initio*-Strukturmodelle zeigen über den gesamten Druck- und Temperaturbereich eine globuläre, kompakte

Konformation. Gleichwohl belegen die bereits genannten FRET-Messungen und die EINS-Messungen eine Umorientierung und Bindungsschwächung der TFP-Liganden im Druckbereich bis 2000–3000 bar. Letztere führt zu einer erhöhten Mobilität der H-Atome des holo-CaM/TFP-Komplexes im Å-Bereich. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -spezifischen FTIR-Banden von holo-CaM zeigen ebenfalls kleine Änderungen in diesem Druckbereich, was ein Hinweis auf einen teilweisen Verlust der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sein kann. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -freie apo-Form eine geringere Stabilität gegen Druck und Temperatur aufweist als die  $\text{Ca}^{2+}$ -gesättigte holo-Form. Mittels FTIR- und SAXS-Experimenten konnte für apo-CaM eine Entfaltungstemperatur von etwa 65 °C ermittelt werden, während die Entfaltungstemperaturen von holo-CaM und holo-CaM mit Melittin bzw. TFP außerhalb des Messbereichs bis 100 °C liegen.

Interessant ist, dass bei einem molarem Verhältnis 1:1.5 von CaM zu K-Ras4B(HVR) anscheinend ein Dimer-Komplex gebildet wird, während bei einem deutlichen Überschuss an K-Ras4B(HVR) (1:3.9) bevorzugt ein Monomer-Komplex vorliegt. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch SAXS-, ITC- und DLS-Experimente. Die Diffusionskoeffizienten des holo-CaM/TFP- und holo-CaM/Melittin-Komplexes liegen etwa bei  $100 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ , der des holo-CaM/K-Ras4B(HVR)-Dimer-Komplexes bei etwa  $80 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ . Bei hohen Drücken um 3000–4000 bar dissoziiert der CaM/K-Ras4B(HVR)-Dimer-Komplex und es liegen Monomere-Komplexe vor. Die EINS-Messungen bekräftigen dieses Ergebnis, die einen deutlichen Anstieg der Mobilität der H-Atome bei 4000 bar zeigen. Mittels der ITC-Messungen konnte gezeigt werden, dass die Bindungsreaktion von K-Ras4B(HVR) an holo-Calmodulin überwiegend exotherm über mehrere Bindungsschritte mit unterschiedlichen Affinitäten erfolgt.

Während die Sekundärstrukturanalyse von holo-CaM bis 13 kbar lediglich kleine Änderungen der Sekundärstruktur offenbarte, zeigen die aus den SAXS-Kurven berechneten *ab-initio*-Strukturmodelle, dass es bereits bei etwa 3000 bar zu einer Veränderung der Struktur kommt, bei der die Domänen voluminöser werden. Hierbei kommt es wahrscheinlich zu einem druckinduzierten partiellen Auffüllen der Proteinkavitäten mit Wasser, wodurch auch die Bewegungsfreiheit der Protein-H-Atome eingeschränkt wird. In der Tat wird dieser Verlust an Mobilität in EINS-Experimenten

gefunden.

Die in diesem Teilprojekt durchgeführten Untersuchungen belegen eine große Bandbreite an Wechselwirkungsstärken und -arten zwischen holo-CaM und seinen Liganden. Diese geht offenbar mit unterschiedlichen Packungsdichten einher, sodass Druck ein wirksamer Parameter ist, um einerseits die Wechselwirkungen zu studieren und andererseits diese zu kontrollieren bzw. zu verändern.

---

# 5 Biologische Schaltbarkeit einer CaM-Polyelektrolyt- multischicht\*

## 5.1 Einleitung

Der Aufbau von Polyelektrolytmultischichten (PEM) bietet eine einfache und effiziente Möglichkeit, Materialoberflächen mit einer großen Vielfalt an Polyelektrolyten mit verschiedenen funktionellen Gruppen, Makromolekülen, Biomakromolekülen (beispielsweise Proteinen, DNA) oder Kolloiden zu modifizieren.<sup>[226–230]</sup> Besonderes Interesse an PEM besteht unter anderem in verschiedenen industriellen Bereichen wie der Pharmazie, der Biotechnologie und der Biomedizin.<sup>[231–236]</sup>

Bekannt sind auch PEM-Kapseln, die eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung durch physikalisch-chemische Parameter wie pH, Ionenstärke oder Temperatur erlauben.<sup>[237,238]</sup> Aufgrund des modularen Aufbaus der PEM lassen sich unterschiedliche Funktionalitäten mit jeder Schicht in die Multischicht integrieren. So ist es möglich, durch die Beschichtung mit PEM, Oberflächen hydrophob<sup>[239,240]</sup> oder hydrophil<sup>[240–242]</sup> zu gestalten. Ebenso ist es möglich, durch Variation des PEM-terminierenden Polyelektrolyts die Ladung der beschichteten Oberfläche zu steuern und somit z.B. die Proteinadsorption zu kontrollieren. Die meisten Bakterienzellen besitzen eine negativ

---

\*Die in diesem Kapitel vorgestellte Studie wurde in der Referenz publiziert:  
S. Cinar, S. Möbitz, S. Al-Ayoubi, B.-K. Seidlhofer, C. Czeslik, Building Polyelectrolyte Multilayers with Calmodulin: A Neutron and X-ray Reflectivity Study, *Langmuir*, **2017**, 33, 3982–3990.<sup>[225]</sup>

geladene Zelloberfläche. Im Allgemeinen ist somit eine positiv geladene Grenzschicht anfälliger für bakterielle Adhäsion, während eine negativ geladene Grenzschicht resistenter ist.<sup>[24,243]</sup> Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Flexibilität der Polyelektrolyte, von welcher der Adsorptionsgrad von Proteinen abzuhängen scheint. PEM, die mit weniger flexiblen Polyelektrolyten wie sulfoniertem Chitosan und dem kationischen Guar an aufgebaut wurden, zeigen im Vergleich zu PEM mit flexiblen Polyelektrolyten wie Polystyrolsulfonat (PSS) und Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDDA), eine sehr geringe Proteinadsorption.<sup>[244]</sup>

Die Proteinadsorption an flüssig-festen Grenzflächen erfordert in bestimmten Bereichen wie der Materialwissenschaft und der Biomedizintechnik jedoch besondere Aufmerksamkeit und Kontrolle. Häufig werden Polyelektrolytmultischichten als biologisch kompatible Beschichtungen eingesetzt, um z.B. das Zellwachstum zu beeinflussen oder auch um Zell- und Proteinablagerungen auf medizinischen Implantaten zu verhindern.<sup>[245]</sup> Von besonderer Wichtigkeit ist, dass bei Verwendung von Polyelektrolytmultischichten in biochemischen Applikationen die native Struktur von Zellen und Proteinen gewährleistet ist. In einer Reihe von Studien konnte gezeigt werden, dass die Sekundärstruktur von Proteinen, die in Polyelektrolytmultischichten eingebettet sind, weitestgehend unverändert bleibt oder sogar stabilisiert wird.<sup>[74,246]</sup> Zum Beispiel ist die Glucoseoxidase in Lösung vergleichsweise instabil, während sie in einem Komplex mit Dextrose über einen großen Temperaturbereich stabilisiert wird.<sup>[247]</sup> Das kationische Polyethylenimin (PEI) stabilisiert die Struktur von verschiedenen Proteinen wie Trypsin oder  $\beta$ -Galactosid.<sup>[248]</sup> Ebenso zeigen Enzyme weiterhin eine enzymatische Aktivität, was auf eine native Struktur und ein gewisses Maß an Eigendynamik in den PEM hindeutet.<sup>[249,250]</sup> So konnte gezeigt werden, dass die Enzymaktivitäten von Meerrettichperoxidase auf positiv geladenem PEI und von  $\alpha$ -Chymotrypsin auf negativ geladenem PSS, erhalten bleiben.<sup>[251]</sup> In diversen Studien wurde neben der Diffusion von Polyelektrolyten auch die Diffusion von Peptiden und Proteinen innerhalb der PEM beobachtet.<sup>[252–258]</sup> Lysozym und Poly-L-Lysin, zum Beispiel, können sich innerhalb einer aus Hyaluronsäure zusammengesetzten Multischicht bewegen.<sup>[254,255]</sup> Diese Diffusion kann dazu dienen, ein exponentielles Wachstum von PEM zu erklären, welches durch eine Erhöhung der adsorbierten Masse

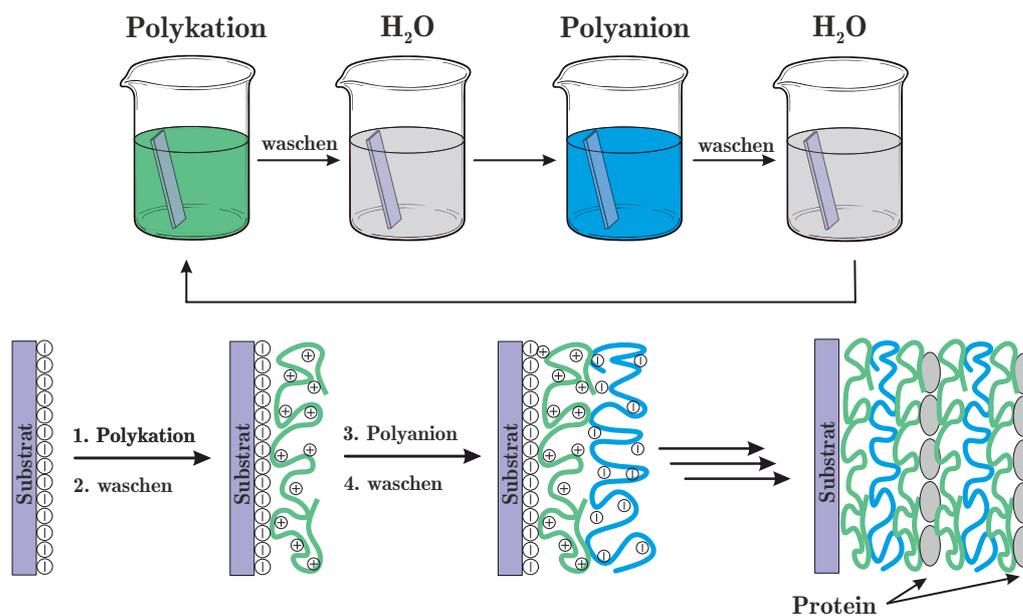
mit der Anzahl der Abscheidungsschritte gekennzeichnet ist.<sup>[259–262]</sup> Offenbar besitzen Proteine, die auf oder in PEM adsorbiert sind, eine gewisse konformelle Beweglichkeit, die, wie bereits erwähnt, wesentlich für ihre biologische Aktivität ist. Allerdings gibt es starke Wechselwirkungen mit entgegengesetzt geladenen Polyelektrolyten, die diese Mobilität begrenzen.

In diesem Teilprojekt wurde untersucht, ob es einerseits möglich ist, das Modellprotein Calmodulin, dessen konformelle Besonderheiten in Abschnitt 4.1 beschrieben wurden, in eine Polyelektrolytmultischicht einzubauen und ob andererseits dessen große ligandeninduzierte Konformationsänderung in der Polyelektrolytmultischicht erhalten werden kann. Hierfür wurden auf Silizium-Wafern Polyelektrolytmultischichten aus PEI-(PSS-PAH)<sub>x</sub>-CaM-PAH-CaM-PAH abgeschieden und durch Röntgen- und Neutronen-Reflektometriemessungen charakterisiert. Weiterhin wurde analysiert, ob das in der PEM eingebaute CaM durch Ligandenbindung (TFP) seine Konformation ändert und auf die Struktur der PEM überträgt. Somit würde eine biologisch schaltbare Grenzflächenbeschichtung erhalten werden.

## 5.2 Probenpräparation

### 5.2.1 Aufbau der Polyelektrolytmultischichten

Zum Aufbau der Polyelektrolytmultischichten wurden für die Röntgenreflektivitätsmessungen Silizium-Wafer mit der Abmessung  $1.5 \times 2.0 \text{ cm}^2$  verwendet, die von Siltronic (Burghausen, Deutschland) bereitgestellt wurden. Für die Neutronenreflektivitätsmessungen wurden Silizium-Blöcke der Größe  $5.0 \times 8.0 \times 1.5 \text{ cm}^3$  von Siliziumbearbeitung Andrea Holm (Tann, Deutschland) verwendet. Die Si-Wafer wurden in einer Reinigungslösung, bestehend aus  $\text{NH}_3$  (30 %) /  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 %) /  $\text{H}_2\text{O}$  in einem Verhältnis 1:1:5, bei etwa  $70^\circ\text{C}$  für 30 min gereinigt. Anschließend wurden die Si-Wafer mit entionisiertem Wasser exzessiv gespült und in entionisiertem Wasser gelagert.



**Abbildung 5.1:** Aufbau einer Polyelektrolytmultischicht mittels der *layer-by-layer*-Methode. Zwischen den alternierenden Abscheidungen von entgegengesetzt geladenen Polyelektrolyten bzw. Proteinen werden Waschschritte mit entionisiertem Wasser durchgeführt.

Der Aufbau der Multischicht erfolgte mittels der *layer-by-layer*-Methode. Schematisch ist die Methode in Abbildung 5.1 dargestellt. Hierfür wurde der gereinigte Si-Wafer für 20 min in einer PEI- (0.01 M Monomerkonzentration), PSS- (0.01 M

Monomerkonzentration mit 1 M NaCl), PAH- (0.01 M Monomerkonzentration mit 1 M NaCl) und Calmodulin-Lösung (6  $\mu\text{mol}$ , 10 mM BisTris, 150 mM NaCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH=6.5) inkubiert. Zwischen den einzelnen Adsorptionsschritten erfolgte ein Waschschriff mit entionisiertem Wasser, um ungebundene Polyelektrolyte zu entfernen und somit Aggregationen während der weiteren Adsorptionsschritte zu verhindern.

### 5.2.2 ATR/FTIR-Messungen

Für die ATR-FTIR-Messungen wurde, auf demselben Wege wie in Unterabschnitt 5.2.1 beschrieben, der ATR-Kristall gereinigt und eine PEI-PSS-PAH-Multischicht vorab aufgebaut. Anschließend wurde der so beschichtete ATR-Kristall im FTIR-Spektrometer abwechselnd mit einer holo-CaM-Lösung (0.1  $\text{mg mL}^{-1}$  Calmodulin, 10 mM BisTris in  $\text{D}_2\text{O}$ , 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 150 mM NaCl, pD=6.5) und PAH (10 mM Monomer, 1 M NaCl) inkubiert. Zwischen den Inkubationsschritten erfolgte jeweils ein Waschschriff mit der Puffer-Lösung (10 mM BisTris in  $\text{D}_2\text{O}$ , 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 150 mM NaCl, pD=6.5).

### 5.2.3 Röntgen-Kleinwinkelstreuexperimente (SAXS)

Die Äquilibrierungszeit vor jeder Messung betrug 30 min. Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt, und die Messzeit betrug für jede Probe jeweils 30 min. Die verwendeten Proben und ihre Zusammensetzungen sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

**Tabelle 5.1:** Für die SAXS-Experimente verwendete Proben und ihre Zusammensetzungen.

Lösung	Zusammensetzung
holo-CaM	0.6 mM Calmodulin, 10 mM BisTris, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 150 mM NaCl, pH=6.5
holo-CaM + TFP	0.6 mM Calmodulin, 3 mM TFP, 10 mM BisTris, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 150 mM NaCl, pH=6.5
holo-CaM + PAH	0.6 mM Calmodulin, 0.6 mM PAH (Monomer), 10 mM BisTris, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 150 mM NaCl, pH=6.5
holo-CaM + TFP + PAH	0.6 mM Calmodulin, 3 mM TFP, 0.6 mM PAH (Monomer), 10 mM BisTris, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 150 mM NaCl, pH=6.5

## 5.3 Ergebnisse

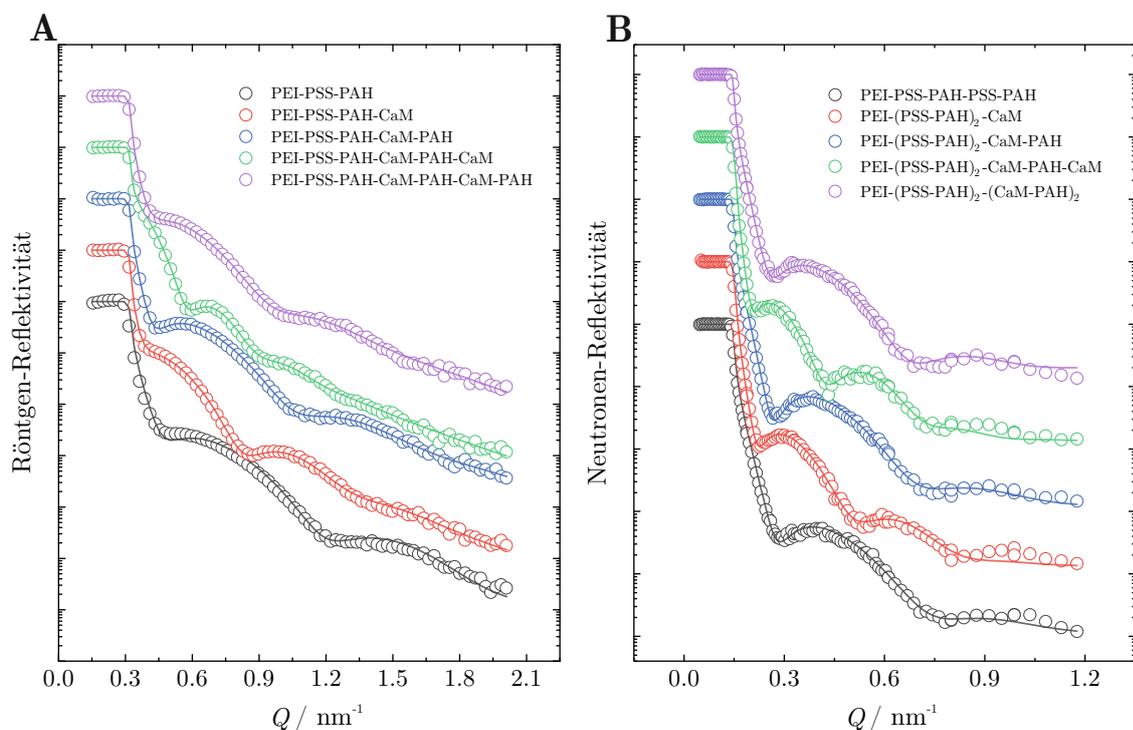
### 5.3.1 Aufbau der Polyelektrolytmultischichten

Zur Untersuchung und Charakterisierung der aufgebauten Polyelektrolytmultischichten mit Calmodulin wurden Röntgen- sowie Neutronenreflektivitätsmessungen durchgeführt. Für die Röntgenreflektivitätsmessungen hatten die Multischichten die folgende Sequenz:

Si – PEI – PSS – PAH – CaM – PAH – CaM – PAH – H<sub>2</sub>O – gesättigte Luft

Alle Messungen erfolgten innerhalb einer geschlossenen Hydratationskammer (Abbildung 2.5), die eine nahezu vollständige Hydratation gewährleistet. Wassergesättigte Luft und flüssiges Wasser besitzen das gleiche chemische Potential und sorgen für eine vollständige Hydratation der Polyelektrolytmultischicht.<sup>[228]</sup> Zur Beschreibung der Multischichtstrukturen wurde ein einfaches Strukturmodell angewandt, das durch die Schichtdicke  $d$ , Streulängendichte  $\rho$  und Rauigkeit  $\sigma$  der Multischicht charakterisiert wird. Durch Variation der Parameter wurden die gemessenen Reflektivitätskurven angepasst. Die Streulängendichten von Silizium und Luft wurden während der Datenanpassung auf  $20.1 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  bzw. 0 festgelegt.

Typische Reflektivitätskurven sind in Abbildung 5.2A gezeigt. Die an die Reflektivitätskurven angepassten Graphen sind als Linie dargestellt, die entsprechenden Anpassungsparameter sind in Tabelle 5.2 aufgelistet. Bei den ergänzenden Neutronenreflektivitätsmessungen ist das angrenzende Medium nicht Luft, sondern D<sub>2</sub>O, wodurch ebenfalls eine vollständige Hydratation der Proben gewährleistet ist. Somit dienen die Neutronenreflektivitätsmessungen zur Kontrolle der Röntgenreflektivitätsdaten hinsichtlich des Hydratationseffekts, aber auch zur Reproduktion und Verifizierung durch ein weiteres unabhängiges Messverfahren. Damit ein hoher Kontrast zu D<sub>2</sub>O mit wenig inkohärenter Streuung erzeugt wird, wurden undeuterierte Polyelektrolyte und Proteine verwendet. Weiterhin besitzt die Multischicht bei den Neutronenreflektivitätsmessungen zwei zusätzliche Schichten:



**Abbildung 5.2:** **A)** Typische Röntgenreflektivitätsdaten einer schrittweise aufgebauten PEI-PSS-PAH-(CaM-PAH)<sub>2</sub>-Multischicht auf einem Silizium-Wafer. Die Messungen erfolgten in einer Hydratationskammer. **B)** Typische Neutronenreflektivitätsdaten einer schrittweise aufgebauten PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-(CaM-PAH)<sub>2</sub>Multischicht auf einem Silizium-Wafer. Das angrenzende Medium zur Multischicht war D<sub>2</sub>O. Die Kreissymbole sind die gemessenen Daten und die durchgezogenen Linien die angepassten Kurven. Von unten nach oben zeigen die Kurven die sukzessiv adsorbierten Schichten. Zur besseren Übersicht wurden die Reflektivitätskurven um den Faktor 10 vertikal verschoben.

In Abbildung 5.2B sind typische Daten der Neutronenreflektometriemessungen zu finden. Wie bei der Auswertung der Röntgenreflektivitätskurven wurde ebenfalls ein einfaches Schichtmodell zur Anpassung der berechneten Kurven angewandt. Die Neutronenstreulängendichten von Silizium und D<sub>2</sub>O wurden auf  $2.07 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  und  $6.37 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  festgelegt, während die Neutronenstreulängendichte, die Schichtdicke und die Rauigkeit der Multischicht bei der Anpassung variiert wurden. Die angepassten Graphen sind als Linien in Abbildung 5.2B dargestellt. Die entsprechenden

Parameter sind in Tabelle 5.3 zu finden. Calmodulin lag bei allen Messungen in der  $\text{Ca}^{2+}$ -gesättigten Form (holo-CaM) vor. Auffällig an den in den Tabellen 5.2 und 5.3 gezeigten Daten ist, dass die Schichtdickenzunahme bei der ersten Adsorption von Calmodulin signifikant geringer ist als bei der zweiten Adsorption auf die Polyelektrolytmultischicht. Ebenfalls ist gut zu erkennen, dass durch die Abscheidung von PAH auf die vorherige Calmodulinschicht ein großer Teil des Calmodulins wieder von der Polyelektrolytmultischicht desorbiert und lediglich eine dünne Schicht einer CaM-PAH-Schicht verbleibt. Die Rauigkeit einer mit CaM abgeschlossenen Multischicht ist wesentlich größer als die einer Multischicht, die mit PAH abgeschlossen ist.

**Tabelle 5.2:** Schrittweiser Aufbau einer Polyelektrolytmultischicht mit holo-CaM, bestimmt mittels Röntgenreflektometrie.<sup>a</sup>

Multischicht	$d / \text{Å}$	$\rho / 10^{-6} \text{Å}^{-2}$	$\sigma / \text{Å}$
PEI-PSS-PAH	79	8.7	12
PEI-PSS-PAH-CaM	116	10.9	20
PEI-PSS-PAH-CaM-PAH	89	9.4	15
PEI-PSS-PAH-CaM-PAH-CaM	173	12.0	29
PEI-PSS-PAH-CaM-PAH-CaM-PAH	96	10.1	21

<sup>a</sup> Für jede Schicht wurde ein einfaches Schichtmodell zur Bestimmung der Schichtdicke  $d$ , Streulängendichte  $\rho$  und Rauigkeit  $\sigma$  angewandt.

**Tabelle 5.3:** Schrittweiser Aufbau einer Polyelektrolytmultischicht mit holo-CaM, bestimmt mittels Neutronenreflektometrie.

Multischicht	$d / \text{Å}$	$\rho / 10^{-6} \text{Å}^{-2}$	$\sigma / \text{Å}$
PEI-(PSS-PAH) <sub>2</sub> <sup>a</sup>	123	4.0	20
PEI-(PSS-PAH) <sub>2</sub> -CaM <sup>a</sup>	97/88	4.8/4.5	20/21
PEI-(PSS-PAH) <sub>2</sub> -CaM-PAH <sup>a</sup>	130	4.2	22
PEI-(PSS-PAH) <sub>2</sub> -CaM-PAH-CaM <sup>b</sup>	105/117	4.6./5.4	20/19
PEI-(PSS-PAH) <sub>2</sub> -(CaM-PAH) <sub>2</sub> <sup>a</sup>	138	4.0	20

<sup>a</sup> Für die Multischicht wurde ein einfaches Schichtmodell zur Bestimmung der Schichtdicke  $d$ , Streulängendichte  $\rho$  und Rauigkeit  $\sigma$  angewandt.

<sup>b</sup> Für die Multischicht wurde ein Zwei-Schichtmodell angewandt.

Um diesen Trend zu überprüfen, wurden insgesamt 26 verschiedene Polyelektrolytmultischichten mit Röntgen- und drei mit Neutronenreflektometrie untersucht. Zudem wurde überprüft, ob es möglich ist, Polyelektrolytmultischichten mit TFP-gebundenem Calmodulin aufzubauen (Abbildung 5.3). Wie in Abschnitt 4.1 erläutert, ist Trifluoperazin (TFP) ein therapeutischer Wirkstoff, der von holo-Calmodulin mit hoher Affinität gebunden wird und durch die Bindung eine Konformationsänderung des Calmodulins von einer offenen zu einer globulären Konformation hervorruft. TFP-gebundenes Calmodulin wird im Folgenden als CaM(TFP) bezeichnet. Die Bindung von vier Molekülen TFP an ein Calmodulin-Molekül wurde, wie in der Literatur beschrieben, durch ein molares Verhältnis von fünf TFP zu einem CaM in Lösung erzielt.<sup>[120]</sup>

In Tabelle 5.4 sind die aus den Röntgen- und Neutronenreflektivitätsdaten gemittelten Schichtdickenzunahmen von 29 Polyelektrolytmultischichten aufgelistet. Die Ergebnisse der einzelnen Messreihen sind im Anhang dargestellt (Röntgenreflektivitätsdaten: Tabellen 9.1 bis 9.25, Neutronenreflektivitätsdaten: Tabellen 9.27 bis 9.29). Die Schichtdicken der PEI-PSS-PAH und PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-Multischichten, mit einer durchschnittlichen Schichtdicke von etwa 20.6 Å, stehen in guter Übereinstimmung mit der Literatur und deuten auf eine vollständige Hydratation der Polyelektrolytmultischichten bei den Röntgenreflektivitätsmessungen hin.<sup>[263,264]</sup>

**Tabelle 5.4:** Mittlere Schichtdickenzunahmen der schrittweise aufgebauten Polyelektrolytmultischichten. Bestimmt mittels Röntgen- und Neutronenreflektometrie.<sup>a</sup>

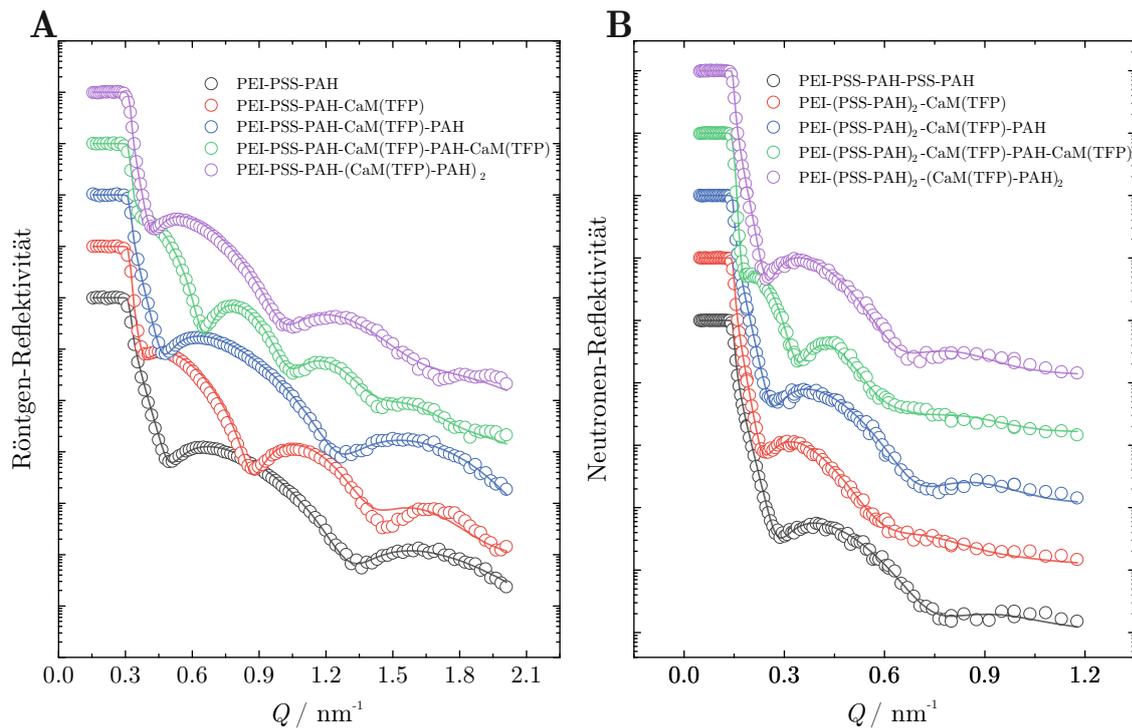
Abgeschiedene Schichten	$\Delta d / \text{Å}$ (Röntgenreflektivität)	$\Delta d / \text{Å}$ (Neutronenreflektivität)
PEI-PSS-PAH	$62 \pm 14$ (23)	
PEI-(PSS-PAH) <sub>2</sub>		$125 \pm 4$ (3)
1. Calmodulin	$50 \pm 21$ (7)	$34 \pm 25$ (3) <sup>b</sup>
1. Calmodulin(TFP)	$49 \pm 18$ (11)	
2. Calmodulin	$87 \pm 8$ (3)	$112 \pm 28$ (2) <sup>b</sup>
2. Calmodulin(TFP)	$74 \pm 8$ (3)	
Calmodulin-PAH	$14 \pm 7$ (17) <sup>c</sup>	$10 \pm 3$ (5) <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Die Zahlen in den Klammern geben die die Häufigkeit der Einzelmessungen an.

<sup>b</sup> Mittelwert der Schichtdickenzunahme durch Abscheiden von CaM und CaM(TFP).

<sup>c</sup> Mittelwert der Schichtdickenzunahme durch Abscheiden von CaM und CaM(TFP) im ersten und zweiten Schritt.

Die Schichtdickenzunahme der Polyelektrolytmultischicht durch Abscheidung der ersten Calmodulinschicht beträgt etwa  $50 \text{ Å}$  und ist im Rahmen des Fehlers identisch mit derjenigen durch Abscheidung von CaM(TFP) ( $49 \text{ Å}$ ) (Tabelle 5.4). Dies deutet darauf hin, dass die anfänglich kompaktere Konformation von CaM(TFP) keine Auswirkung auf die Schichtdicke hat, obwohl CaM(TFP) im Gegensatz zu CaM einen kleineren Gyrationradius besitzt (Abbildung 5.6). Im Fall der Neutronenreflektivitätsmessungen wird eine etwas kleinere mittlere Schichtdickenzunahme von etwa  $34 \text{ Å}$  für die erste CaM oder CaM(TFP)-Schicht beobachtet (Tabelle 5.4). Dieser Mittelwert basiert jedoch auf nur drei Neutronenreflektivitäts-Experimenten und hat einen relativ großen experimentellen Fehler. Somit scheint der Unterschied zwischen den aus Röntgen- und Neutronenreflektivitätsmessungen gewonnenen CaM-Schichtdicken nicht signifikant zu sein. In der Literatur sind die maximalen Durchmesser für CaM und CaM(TFP) in Lösung mit  $61 \text{ Å}$  bzw.  $48 \text{ Å}$  angegeben, die in dieser Arbeit bestätigt werden konnten (Abbildung 5.6).<sup>[120]</sup> Daher ist es naheliegend, dass lediglich etwa eine Monoschicht von CaM oder CaM(TFP) auf PAH abgeschieden wurde.



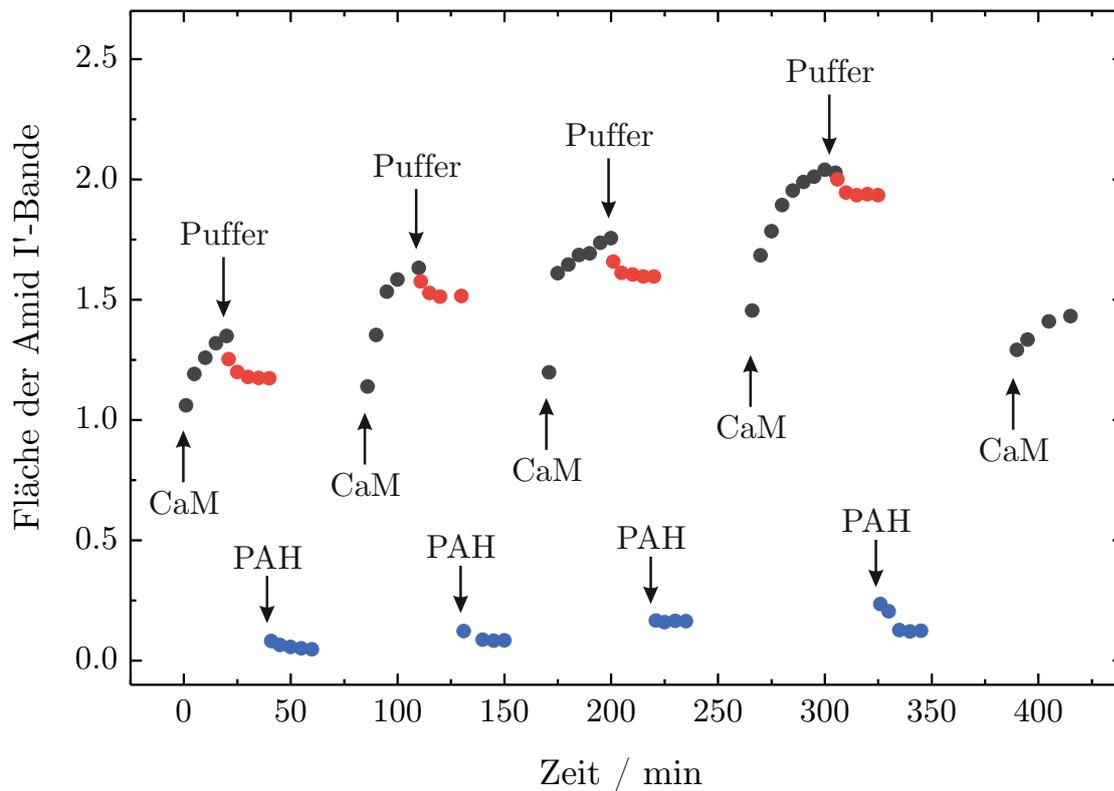
**Abbildung 5.3:** **A)** Typische Röntgenreflektivitätskurven einer schrittweise aufgebauten PEI-PSS-PAH-(CaM(TFP)-PAH)<sub>2</sub>-Multischicht auf einem Silizium-Wafer. Die Messungen erfolgten in einer Hydratationskammer. **B)** Typische Neutronenreflektivitätsdaten einer schrittweise aufgebauten PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-(CaM(TFP)-PAH)<sub>2</sub>-Multischicht auf einem Silizium-Wafer. Das angrenzende Medium zur Multischicht war D<sub>2</sub>O. Die Kreissymbole sind die gemessenen und die durchgezogenen Linien die angepassten Kurven. Von unten nach oben zeigen die Kurven die sukzessive adsorbierten Schichten. Zur besseren Übersicht wurden die Reflektivitätskurven um den Faktor 10 vertikal verschoben.

Die mittleren Schichtdickenänderungen aller Röntgen- und Neutronenreflektivitätsdaten zeigen, dass bei einer zweiten Abscheidung von CaM oder CaM(TFP) auf PAH deutlich mehr Calmodulin zu adsorbieren scheint als bei dem ersten Adsorptionsschritt (Tabelle 5.4). Die Röntgenreflektivitätsmessungen ergaben eine Schichtdickenzunahme von 87 Å für CaM und 74 Å für CaM(TFP), während beim ersten Adsorptionsschritt die Schichtdickenzunahme nur bei 50 Å bzw. bei 49 Å lag. Bei den Neutronenreflektivitätsmessungen steigt die Schichtdicke beim ersten Adsorptionsschritt von Calmodulin um 34 Å und beim zweiten um 112 Å an (Tabelle 5.4). Solch ein Effekt wird bereits in der Literatur als exponentielles Wachstum beschrieben. Elbert et al.<sup>[265]</sup> und Picart et al.<sup>[266]</sup> zeigten, dass Poly(L-Lysin)/Alginsäure (PLL/ALG)-

und PLL/Hyaluronsäure (PLL/HA)-Schichten ein exponentielles Wachstum aufweisen. Mit jedem Adsorptionsschritt wird mehr Masse adsorbiert als beim vorherigen. Zunächst wurde dieses exponentielle Wachstum hauptsächlich in Multischichten beobachtet, die auf Polyaminosäuren und Polysacchariden basieren, bevor Studien zeigten, dass ein exponentielles Wachstum auch bei synthetischen Polyelektrolyten, wie Polyacrylsäure (PAA) zu beobachten ist.<sup>[233,252,267]</sup> Es konnte nachgewiesen werden, dass mindestens eine der beiden Komponenten in der Polyelektrolytmultischicht diffundieren kann. Somit wäre es möglich, dass auch eine CaM/PAH-Multischicht nach einem exponentiellen Wachstumsmechanismus wächst, wobei Calmodulin die diffundierende Spezies sein kann. Ein Einfluss von TFP in Bezug auf die CaM-Schichtdicke konnte im Rahmen des experimentellen Fehlers bei keiner Messung in diesem Teilprojekt beobachtet werden (Tabelle 5.4). Der Aufbau der Polyelektrolytmultischicht ohne CaM, also lediglich eine Abfolge von PSS/PAH führt hingegen zu einem linearen Wachstum, wie bereits in der Literatur beschrieben.<sup>[268]</sup>

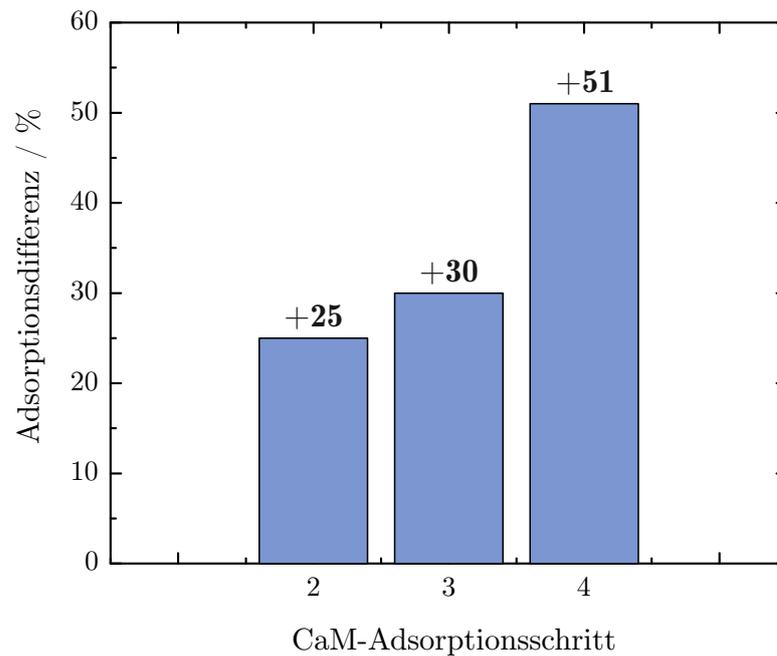
Wird jedoch eine mit CaM- oder CaM(TFP)-terminierte Multischicht erneut mit einer PAH-Lösung gespült, ist keine weitere Schichtdickenzunahme der Polyelektrolytmultischicht zu beobachten, sondern eine Abnahme (Tabelle 5.2 und 5.3). Dies lässt sich durch eine starke Wechselwirkung zwischen PAH und CaM bzw. CaM(TFP) erklären, was zu einer Komplexbildung und einer teilweisen Desorption von CaM oder CaM(TFP) führt, so dass nur eine dünne Schicht an CaM-PAH oder CaM(TFP)-PAH von 14 Å (Röntgenreflektometrie) und 10 Å (Neutronenreflektometrie) verbleibt (Tabelle 5.4). Um eine so geringe Dicke aufzuweisen, muss Calmodulin in der offenen Konformation oder teilweise entfaltet in die Multischicht eingebettet sein. Die Abscheidung der offenen Konformation von Calmodulin würde ebenfalls mit der Hypothese übereinstimmen, dass CaM(TFP) beim Adsorptionsvorgang das TFP verliert. Eine vollständige Desorption von Calmodulin durch Abscheiden von PAH ist jedoch auszuschließen.

Weiterhin wurden ATR-FTIR-Messungen während des schrittweisen Aufbaus einer Polyelektrolytmultischicht mit alternierendem CaM und PAH durchgeführt, die in Abbildung 5.4 gezeigt sind. Vorgelegt wurde eine PEI-PSS-PAH-Schicht.



**Abbildung 5.4:** ATR-FTIR-Daten einer PEI-PSS-PAH-Multischicht, die alternierend mit einer Lösung von holo-CaM ( $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  in  $\text{D}_2\text{O}$ -Puffer), Puffer (10 mM BisTris in  $\text{D}_2\text{O}$ , 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 150 mM  $\text{NaCl}$ ,  $\text{pD}=6.7$ ) und PAH (10 mM Monomere, 1 M  $\text{NaCl}$ ) gespült wurde. Die Amid-I'-Bande ist proportional zur adsorbierten Menge an Calmodulin auf die Polyelektrolytmultischicht.

Die Fläche der Amid-I'-Bande, die proportional zur adsorbierten Menge an Calmodulin auf der Polyelektrolytmultischicht ist, wurde während des Aufbaus aufgenommen. Abbildung 5.4 bestätigt, dass der Aufbau der Polyelektrolytmultischicht und somit der Einbau von CaM stattfindet. Ebenfalls ist zu sehen, dass einerseits durch Spülen mit der Puffer-Lösung Calmodulin nicht signifikant von der Multischicht gewaschen wird, und dass andererseits durch das Abscheiden von PAH nicht das gesamte Calmodulin desorbiert, sodass weiterhin Calmodulin in der Polyelektrolytmultischicht verbleibt. Bei dem letzten Absorptionsschritt von Calmodulin (Tabelle 5.4) wird die Multischicht instabil und ein Teil der CaM-PAH-Schichten löst sich von der Multischicht ab.

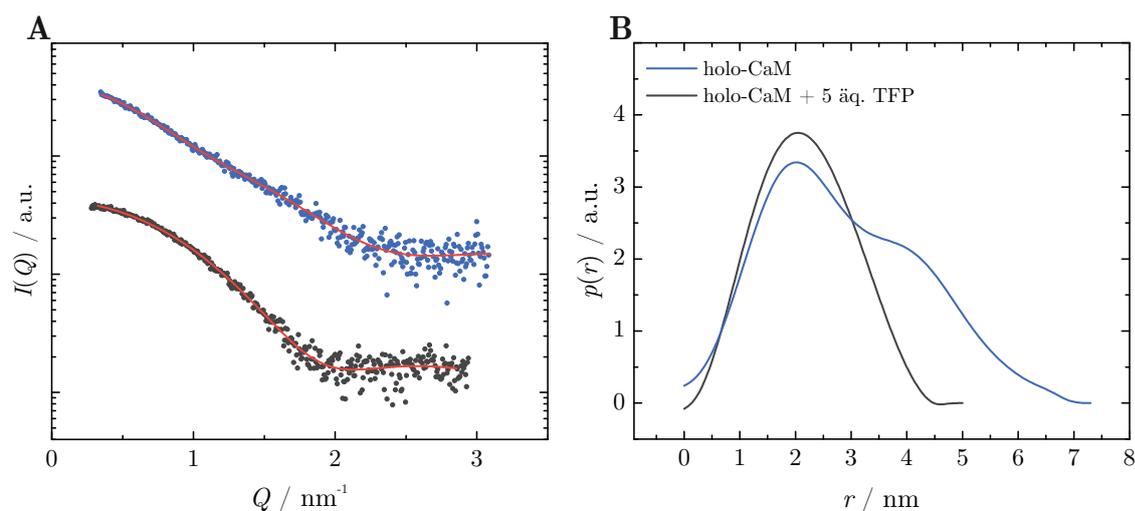


**Abbildung 5.5:** Differenz der adsorbierten Menge von Calmodulin in den einzelnen Adsorptionsschritten im Verhältniss zum ersten Adsorptionsschritt auf die Polyelektrolytmultischicht.

In Abbildung 5.5 ist die Differenz der adsorbierten Menge an Calmodulin in den einzelnen Adsorptionsschritten im Verhältnis zum ersten Adsorptionsschritt dargestellt, wie sie aus Abbildung 5.4 erhalten wird. Beim zweiten und dritten Adsorptionsschritt wurden 25 % bzw. 30 % mehr Calmodulin auf die Polyelektrolytmultischicht abgeschieden als beim ersten Adsorptionsschritt. Beim vierten Adsorptionsschritt waren es sogar 51 % mehr Calmodulin. Ein Vergleich mit den Röntgen- und Neutronenreflektivitätsdaten (s.o.) zeigt, dass dort die Zunahmen deutlich größer sind. Jedoch wird auch an den ATR-FTIR-Daten deutlich, dass bis zum vierten Adsorptionsschritt von Calmodulin jedes Mal etwas mehr Calmodulin als zuvor adsorbiert wird, was für einen exponentiellen Wachstumsmechanismus spricht.<sup>[227,254,255]</sup>

### 5.3.2 Interaktion von Calmodulin mit TFP und PAH

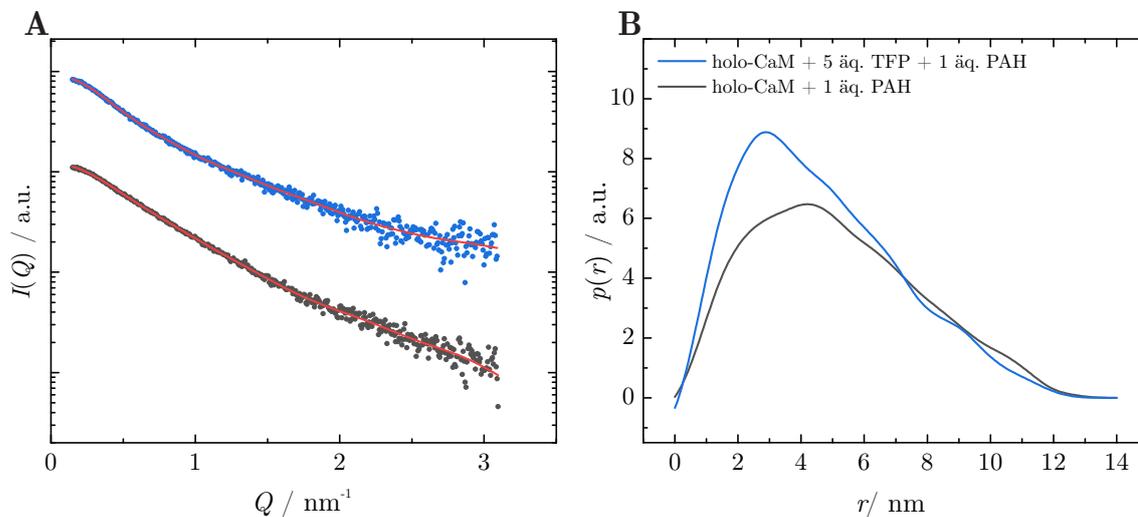
Zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Calmodulin mit TFP und PAH wurden SAXS-Messungen in Lösung durchgeführt. Hierfür wurde Calmodulin ohne Ligand, Calmodulin + 5 äq. TFP, Calmodulin + 1 äq. PAH und Calmodulin + 5 äq. TFP + 1 äq. PAH in wässriger Lösung angesetzt.



**Abbildung 5.6:** **A)** Streukurven  $I(Q)$  und **B)** Paarabstandsverteilungsfunktionen  $p(r)$  von holo-Calmodulin in Lösung mit und ohne 5 äq. TFP.

Wie aus Abbildung 5.6 ersichtlich, liegt für holo-CaM ohne Ligand eine offene Konformation mit einem maximalen Durchmesser von etwa 70 Å und einem Gyrationradius von 22.6 Å vor. Die Schulter in der  $p(r)$ -Funktion bei höheren  $r$ -Werten ergibt sich aus der Hantelform des Proteins. In Gegenwart von 5 mol TFP pro mol Calmodulin binden 4 TFP-Moleküle an Calmodulin und induzieren die geschlossene globuläre Konformation (Abbildung 4.1). Die entsprechende  $p(r)$ -Funktion ist symmetrisch, wie es für eine globuläre Form zu erwarten wäre (Abbildung 5.6). Der maximale Durchmesser und der Gyrationradius verringern sich auf etwa 45 Å bzw. 16.5 Å. Diese Werte stimmen sehr gut mit früheren Studien überein.<sup>[120]</sup> Wenn PAH und Calmodulin in einem Verhältnis von 1:1 vorliegen, ist die  $p(r)$ -Funktion asymmetrisch (Abbildung 5.7). Dies deutet darauf hin, dass Calmodulin nicht in der geschlossenen globulären Konformation wie mit TFP vorliegt, sondern in einer vermutlich länglichen Form ähnlich der offenen Konformation. Allerdings sind der Maximaldurchmesser

mit etwa  $130 \text{ \AA}$  und der Gyrationradius mit  $40.9 \text{ \AA}$  recht groß.

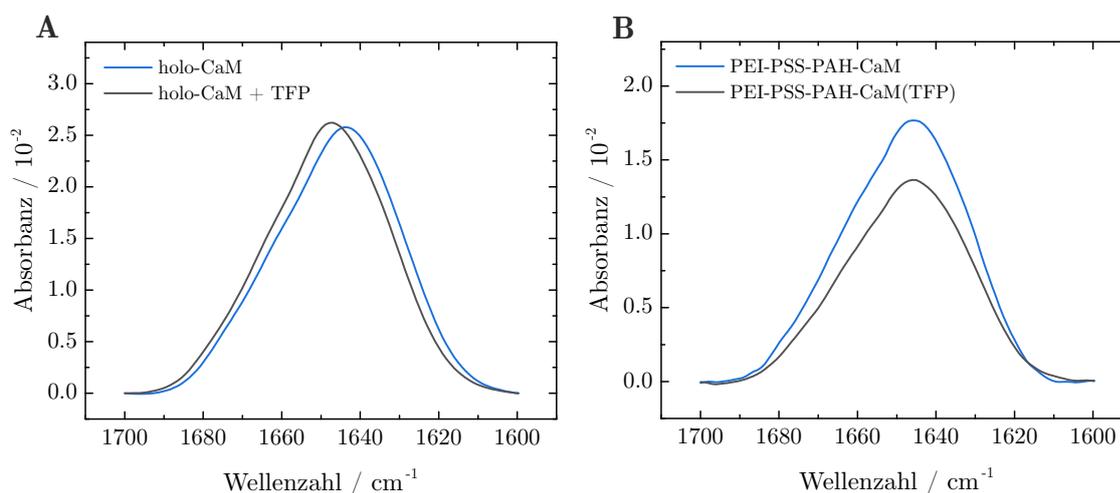


**Abbildung 5.7:** **A)** Streukurven und **B)** Paarabstandsfunktionen  $p(r)$  von  $\text{Ca}^{2+}$ -gesättigtem Calmodulin in Lösung mit 1 äq. PAH in an und Abwesenheit von 5 äq. TFP.

Schließlich wurde zu einer Lösung von CaM(TFP) PAH gegeben, um zu untersuchen, ob PAH die vier gebundenen TFP-Moleküle ersetzen kann. Wie in Abbildung 5.7 zu erkennen ist, ist die erhaltene  $p(r)$ -Verteilungskurve asymmetrisch. Sie zeigt eine ähnliche Form wie die  $p(r)$ -Verteilungsfunktion von holo-CaM + PAH in Abwesenheit von TFP. In beiden Fällen ist ein maximaler Durchmesser von etwa  $130 \text{ \AA}$  und ein Gyrationradius von etwa  $37 \text{ \AA}$  zu finden. Wichtig ist zu erwähnen, dass durch Zugabe von PAH weißer Niederschlag entstand, der durch Ultraschall-Behandlung aufgelöst werden konnte. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass CaM(TFP), welches sich in seiner globulären Konformation befindet, mit PAH interagiert. TFP wird wahrscheinlich aufgrund der starken Wechselwirkung durch PAH ersetzt und CaM(PAH) nimmt die geöffnete Konformation ein. Dieser Befund kann erklären, warum die Adsorption von CaM und CaM(TFP) auf einer PAH-Schicht zu einer ähnlichen Schichtdickenzunahme führt.

Die Ergebnisse der SAXS-Messungen stimmen gut mit FTIR-Experimenten überein (Abbildung 5.8). Das Maximum der Amid-I'-Bande von holo-CaM liegt bei etwa  $1644 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$ , während sich das Maximum durch Binden von vier TFP-Molekülen auf

1648  $\text{cm}^{-1}$  verschiebt (Abbildung 5.8A). Die Form der Amid-I'-Bande eines Proteins spiegelt die Verteilung der Sekundärstrukturelemente wider. Somit zeigt die geringe Verschiebung des Bandenmaximums eine geringe Veränderung der Sekundärstruktur von Calmodulin nach der Bindung von TFP. Mittels ATR-FTIR wurde ebenfalls die Amid-I'-Bande aufgenommen, nachdem auf einer PEI-PSS-PAH-Schicht Calmodulin abgeschieden wurde (Abbildung 5.8B). Bei der Inkubation der PEI-PSS-PAH-CaM-Multischicht mit TFP ist keine Änderung der Bandenposition der Amid-I'-Bande aufgetreten, was die Vermutung, dass TFP von CaM in der Multischicht nicht gebunden wird, bestätigt. Das Maximum der Amid-I'-Bande ist in beiden Fällen bei  $1645 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$  zu finden, was zwischen den beiden Wellenzahlen von CaM und CaM(TFP) in Lösung liegt.



**Abbildung 5.8:** **A)** Im Bereich von 1700–1600  $\text{cm}^{-1}$  flächennormierte FTIR-Spektren von holo-CaM in Lösung, mit und ohne gebundenem TFP-Liganden (1:5 Molverhältnis von CaM zu TFP). **B)** Basislinienkorrigierte ATR-FTIR-Spektren von PEI-PSS-PAH-CaM in An- und Abwesenheit von dem Liganden TFP.

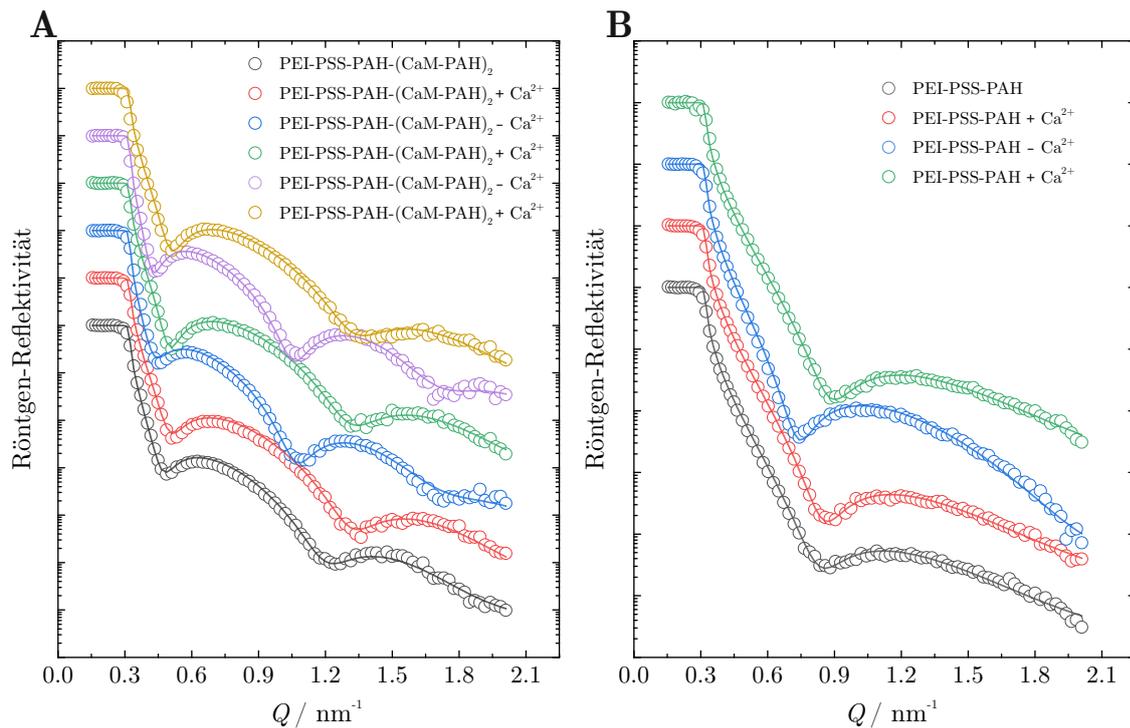
### 5.3.3 Lösungsmiteleinfluss auf die PEM-Struktur

Nach der Charakterisierung des Aufbaus der Polyelektrolytschichten mit CaM bzw. CaM(TFP) wurde der Einfluss verschiedener Lösungsbedingungen auf die Polyelektrolytmultischicht untersucht. Die Zielsetzung ist hier die Konformation von Calmodulin innerhalb der Polyelektrolytmultischicht wie in Lösung zu beeinflussen. Unter Verwendung einer EGTA-Lösung können die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus holo-CaM entfernt

werden, da EGTA eine hohe spezifische Bindungsaffinität für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen besitzt. Aufgrund dessen nimmt die Bindungsaffinität von Calmodulin für Liganden wie TFP ab, wodurch Calmodulin in der ungebundenen offenen Konformation vorliegt. In Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und TFP hingegen, bindet Calmodulin vier  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und vier TFP-Moleküle, wodurch die geschlossene Konformation ausgebildet wird (Abbildung 4.1).

Um diese Konformationsänderungen von Calmodulin in einer Polyelektrolytmultischicht zu untersuchen, wurden die Schichtdicken vor und nach dem Spülen mit der jeweiligen Lösung ermittelt. Die Dickenänderungen wurden aus mindestens drei Messungen gemittelt. Exemplarische Reflektivitätsdaten der Polyelektrolytmultischichten nach den Spülschritten sind in Abbildung 5.9 gezeigt. Als Referenz diente die PEI-PSS-PAH-Multischicht. Nach einer Exposition der Polyelektrolytmultischicht mit einer EGTA-Lösung (2 mM EGTA, 10 mM BisTris, etwa 2 mM NaCl, pH=6.5) ist eine Schichtdickenzunahme von etwa 9 Å (fünf Experimente, siehe Anhang) zu beobachten. Da die Polyelektrolytmultischicht keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen enthält, kommt es zu keinem Ionenaustausch. Die Zunahme lässt sich durch eine Adsorption von dem negativ geladenen EGTA auf die Polyelektrolytmultischicht, die mit einer abschließenden PAH-Schicht positiv geladen ist, erklären. Durch Spülen mit einer  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM BisTris, 150 mM NaCl, pH=6.5) wird die EGTA-Monoschicht entfernt, was sich in einer Abnahme der Schichtdicke um 12 Å (drei Experimente) bemerkbar macht.

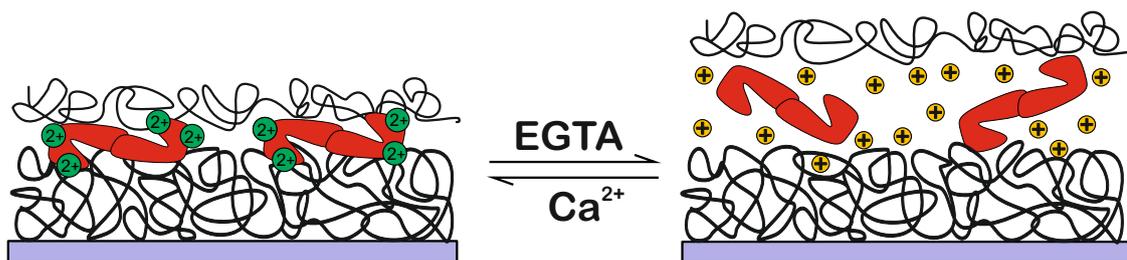
Die PEI-PSS-PAH-CaM-Multischicht, mit und ohne TFP, stellt eine einfache Polyelektrolytmultischicht dar, um die Konformationsänderung von immobilisiertem Calmodulin zu untersuchen. Calmodulin ist in diesem System nur an eine Polyelektrolytschicht (PAH) gebunden, sodass eine maximale Konformationsflexibilität zu erwarten ist. So zeigen Studien, bei denen Calmodulin an SAMs immobilisiert ist, dass noch alle Konformationsübergänge, wie sie auch in Lösung zu beobachten sind, stattfinden.<sup>[269]</sup> In dieser Arbeit konnte durch Spülen der PEI-PSS-PAH-CaM-Multischicht mit einer  $\text{CaCl}_2$ -Lösung eine Abnahme von etwa  $-25$  Å beobachtet werden, was auf eine teilweise Desorption von Calmodulin hindeutet. Eine Untersuchung der Konfor-



**Abbildung 5.9:** **A)** Typische Röntgenreflektivitätskurven einer PEI-PSS-PAH-(CaM-PAH)<sub>2</sub>-Multischicht auf einem Silizium-Wafer, die abwechselnd mit einer Ca<sup>2+</sup>-Lösung und einer EGTA-Lösung gespült wurde. **B)** Typische Röntgenreflektivitätskurven einer PEI-PSS-PAH-Multischicht auf einem Silizium-Wafer, die abwechselnd mit einer Ca<sup>2+</sup>-Lösung und einer EGTA-Lösung gespült wurde. Das angrenzende Medium zur Multischicht war H<sub>2</sub>O-gesättigte Luft. Die Messungen erfolgten in einer Hydratationskammer. Die Kreissymbole sind die gemessenen und die durchgezogenen Linien die angepassten Kurven. Zur besseren Übersicht wurden die Reflektivitätskurven um den Faktor 10 vertikal verschoben.

mationsänderung von Calmodulin anhand dieser Polyelektrolytmultischicht durch Schichtdickenänderung ist daher nicht möglich.

In einer PEI-PSS-PAH-CaM-PAH-Multischicht ist Calmodulin sandwichartig zwischen zwei PAH-Schichten angeordnet. Auf diese Weise ist es fest immobilisiert und vermutlich in der Konformation eingeschränkt. Wird jedoch eine PEI-PSS-PAH-CaM-PAH, mit und ohne TFP, mit einer EGTA-Lösung gespült, steigt die Schichtdicke um etwa 25 Å (Röntgenreflektometrie, 11 Messungen) und 28 Å (Neutronenreflektometrie, 1 Messung) an. Eine mögliche Erklärung ist, dass die an Calmodulin gebundenen Ca<sup>2+</sup>-Ionen durch Spülen mit EGTA entfernt werden. Um die Ladungsbilanz durch das Entfernen der Ca<sup>2+</sup>-Ionen auszugleichen, werden sie durch acht monovalente



**Abbildung 5.10:** Schematische Darstellung zur Erklärung der Schichtdickenänderung einer Polyelektrolytmultischicht mit Calmodulin. Zunächst wird die PEM mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-gesättigtem Calmodulin aufgebaut. Wenn die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch EGTA vom CaM entfernt werden, müssen  $\text{Na}^+$ - oder  $\text{H}^+$ -Ionen für eine extrinsische Ladungskompensation in die PEM eintreten. Dies erhöht den osmotischen Druck und führt zu einer Aufnahme von Wasser. Durch anschließende Spülung mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wird die intrinsische Ladungskompensation mit einem reduzierten osmotischen Druck wieder hergestellt.

Kationen wie  $\text{Na}^+$ -Ionen ersetzt. Somit steigt der osmotische Druck, was zu einer Diffusion von Wasser in die Multischicht und dadurch zu einem Anschwellen der Polyelektrolytmultischicht führt (Abbildung 5.10). Der osmotische Druck ist näherungsweise nach Gleichung 5.1 proportional zu der molaren Konzentration des gelösten Stoffes. Die vier kovalent gebundenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen pro Calmodulin-Molekül tragen somit nicht zum osmotischen Druck bei, während die acht freien  $\text{Na}^+$ -Ionen den osmotischen Druck innerhalb der Polyelektrolytmultischicht erhöhen.

$$\Pi = \frac{n}{V} \cdot R \cdot T = c \cdot R \cdot T \quad (5.1)$$

Darüber hinaus besitzt das apo-CaM eine geringere Stabilität als das holo-CaM, wie in einigen Studien gezeigt werden konnte.<sup>[177,178,182,270]</sup> Somit wird eine mögliche partielle Entfaltung oder Umorientierung von Calmodulin während der Quellung in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen erleichtert.

Anschließend wurde die PEI-PSS-PAH-CaM-PAH-Multischicht mit einer  $\text{Ca}^{2+}$ /TFP-Lösung gespült, was zu einer Abnahme der Schichtdicke um  $-21 \text{ \AA}$  (Röntgenreflektometrie, 5 Messungen) und  $-10 \text{ \AA}$  (Neutronenreflektometrie, 1 Messung) führte. Calmodulin wird erneut mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gesättigt und die monovalenten Ionen werden aus der Polyelektrolytmultischicht gewaschen. Aufgrund der signifikant geringeren

Anzahl an freien Ionen in der Polyelektrolytmultischicht ist der osmotische Druck erniedrigt, was zu der beobachteten Abschwellung führt (Abbildung 5.10). Das TFP ist hingegen nicht an Calmodulin gebunden, da die Bildung der geschlossenen globulären Form von Calmodulin nicht mit der Abnahme der Schichtdicke beim Spülen mit einer  $\text{Ca}^{2+}$ /TFP-Lösung, jedoch mit der sehr dünnen Doppelschicht CaM-PAH übereinstimmt. Letzteres erfordert eine offene Konformation von Calmodulin, die parallel zur Grenzfläche ausgerichtet ist. Offenbar können die Ergebnisse dieser Arbeit keinen Beleg dafür erbringen, dass die geschlossene globuläre Konformation von Calmodulin innerhalb einer PEM ausgebildet werden kann. Jedoch liefert die Anwesenheit von CaM innerhalb einer Polyelektrolytmultischicht die Möglichkeit, den osmotischen Druck durch Entfernen und Binden von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu steuern und somit die Schichtdicke der PEM zu beeinflussen.

## 5.4 Zusammenfassung von Kapitel 5

Polyelektrolytmultischichten sind gut charakterisierte Oberflächenbeschichtungen, die leicht für die Biofunktionalisierung von Oberflächen mit Proteinen verwendet werden können. In vielen Studien wurde gezeigt, dass Proteine weitestgehend ihre native Konformation beibehalten und Enzyme noch ihre Aktivität besitzen, wenn sie in einer Polyelektrolytmultischicht eingebettet oder auf ihr adsorbiert sind.<sup>[74,246,247]</sup>

In dieser Arbeit wurde der Aufbau und die Funktionalität von Polyelektrolytmultischichten untersucht, bei denen Calmodulin als Polyanion verwendet wurde. Es ist bekannt, dass Calmodulin bei Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und kleinen Liganden unterschiedliche Konformationszustände aufweist. Calmodulin in Lösung besitzt in seiner  $\text{Ca}^{2+}$ -gesättigten Form eine offene hantelförmige Konformation. Durch Binden eines Liganden wie z.B. Trifluoperazin (TFP) erfolgt ein Übergang in die globuläre kompaktere Konformation. In diesem Projekt wurde daher der Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und TFP als Liganden auf die Grenzflächenstruktur untersucht. Auf Silizium-Wafern wurden Polyelektrolytmultischichten aus  $\text{PEI}-(\text{PSS-PAH})_x\text{-CaM-PAH-CaM-PAH}$  abgeschieden und durch Röntgen- und Neutronenreflektivitätsmessungen charakterisiert. Zunächst wurde untersucht, ob es möglich ist, Calmodulin als Anion in eine Polyelektrolytmultischicht einzubetten. Die Röntgen- und Neutronenreflektivitätsmessungen, wie auch die ATR-FTIR-Messungen zeigen dass Polyelektrolytmultischichten mit alternierendem negativ geladenen CaM und positiv geladenem PAH möglich sind, und dass ein wiederholtes Abscheiden von CaM auf eine weitere PAH-Schicht eine deutlich dickere Schicht erzeugt als bei dem ersten CaM-Abscheidungsschritt. Diese Beobachtung ist in Einklang mit dem in der Literatur beschriebenen exponentiellen Wachstumsmechanismus. Die Ergebnisse dieses Projekts liefern jedoch keinen Beleg dafür, dass wie in Lösung durch Ligandenbindung mit TFP eine geschlossene Konformation innerhalb einer Polyelektrolytmultischicht induziert werden kann. Vielmehr deuten die Ergebnisse darauf hin, dass das Gegenionen-Polyelektrolyt PAH die Bindung von TFP an Calmodulin unterdrückt und selbst eine relativ starke Wechselwirkung mit Calmodulin eingeht. Diese Vermutung wird unter anderem durch Kleinwinkelstreuexperimente und ATR-FTIR-Messungen bekräftigt. Dies stellt eine

gewisse Einschränkung der Verwendung einer Polyelektrolytmultischicht als native Umgebung für immobilisierte Proteine dar.

Calmodulin ist jedoch ein Calcium-bindendes Protein. Aufgrund dieser Eigenschaft konnte durch Entfernen und Hinzufügen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen das An- und Abschwellen einer Polyelektrolytmultischicht mit Calmodulin demonstriert werden. Obwohl dieser Effekt wahrscheinlich auf Osmose zurückzuführen ist, ließ sich durch den Einbau von Calmodulin in eine Polyelektrolytmultischicht eine Oberfläche erzeugen, die eine biologisch-schaltbare Struktur aufweist. Während liganden-induzierte Konformationsübergänge von Calmodulin in einer Polyelektrolytmultischicht unterdrückt werden, scheint die native Konformation in Form ihrer Sekundärstruktur wie auch die Fähigkeit,  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu binden, erhalten zu bleiben. So ist es denkbar, dass beispielsweise kleine Wirkstoffmoleküle aus einer CaM-Polyelektrolytmultischicht durch eine EGTA/ $\text{Na}^+$ -Lösung freigesetzt werden, wenn die CaM-Polyelektrolytmultischicht quillt. Im Gegensatz dazu induziert die Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ein Schrumpfen und ein gleichzeitiges Einschließen von gelösten kleinen Molekülen innerhalb der CaM-PEM.

---

# 6 Biologische Schaltbarkeit eines CaM-PEG- Grenzflächensystems\*

## 6.1 Einleitung

Zur Funktionalisierung von flüssig-festen Grenzflächen mittels Polymeren lassen sich in der Literatur eine Reihe von Studien finden, welche eine Veränderung der Grenzflächen-Eigenschaften durch Variation des pH-Wertes, der Ionenstärke oder der Temperatur dokumentieren.<sup>[10–21]</sup> Dadurch lassen sich unter anderem die Enzymimmobilisierung, das Zellwachstum sowie die Wirkstofffreisetzung regulieren und kontrollieren. Eine wichtige Form von Grenzflächenstrukturen ist die Polymerbürste, bei der lange Polymerketten dicht auf einer festen Oberfläche verankert sind. Beispielsweise zeigen Polymerbürsten aus Poly(*N*-isopropylacrylamid)(PNIPAm) einen Phasenübergang mit steigender Temperatur von der hydratisierten zu einer kollabierten Konformation.<sup>[10,12,13,15–17]</sup> Diese Temperaturabhängigkeit der Bürstenstruktur wirkt sich stark auf die Proteinadsorptionskapazität und auf die Zelladhäsion aus und bietet somit ein großes Potenzial für medizinische Anwendungen.<sup>[10,12,13,15–17]</sup> Unter Verwendung von Polyelektrolyten können ebenso pH-schaltbare Bürsten hergestellt werden, durch welche die Enzymimmobilisierung zu einem gewissen Grad gesteuert

---

\*Die in diesem Kapitel vorgestellte Studie wurde in der Referenz publiziert:

S. Cinar, C. Czeslik, Bioresponsive interfaces composed of calmodulin and poly(ethylene glycol): Toggling the interfacial film thickness by protein-ligand binding. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2017**, 158, 9–15.<sup>[271]</sup>

werden kann.<sup>[18,19]</sup> Oberflächen-gebundene Hydrogele ermöglichen es, durch Variation der Temperatur das Quellverhalten zu beeinflussen oder können bei einem bestimmten pH-Wert komplett abgebaut werden.<sup>[272,273]</sup> Jedoch kann eine Temperatur- oder pH-Wert-Änderung die native Struktur sowie die biologische Aktivität von Proteinen und Zellen negativ beeinflussen, wodurch die Veränderung dieser beiden physikalisch-chemischen Parameter nur bedingt zur Kontrolle von Zell- und Proteinimmobilisierung geeignet ist. Eine weitere Möglichkeit, die Adsorptionskapazität einer Bürste für Proteine zu beeinflussen, ist die Variation der Ionenstärke. Diese bietet eine bessere Möglichkeit, den nativen Zustand eines Proteins zu gewährleisten.<sup>[20,21,26]</sup>

Im Hinblick auf potentielle biomedizinische Anwendungen, wie proteinbasierte Biochips, wird die Variation des pH-Werts, der Ionenstärke oder auch der Temperatur durch die native Struktur der verwendeten biologischen Komponenten eingeschränkt. Eine Alternative zur Änderung von physikalisch-chemischen Parametern bieten Oberflächen, die aufgrund von spezifischen biochemischen Wechselwirkungen angesprochen werden können. Zum Beispiel haben Uragami et al. ein Polyacrylamidhydrogel erzeugt, an das ein Antigen und der korrespondierende Antikörper kovalent gebunden sind. Die nicht-kovalente Antigen-Antikörper-Wechselwirkung führt zu einem engmaschigen Netzwerk. Durch Inkubation mit dem löslichen konkurrierenden Antigen sinkt die Vernetzungsdichte und es folgt ein Anschwellen des Hydrogels.<sup>[274]</sup> Alternativ können Proteine, die bei der Ligandenbindung große Konformationsänderungen durchlaufen, Schlüsselemente für biochemisch-ansprechbare Grenzflächenstrukturen sein. Aufgrund der großen Liganden-induzierten Konformationsänderung von Calmodulin bietet es sich besonders gut als Modellprotein an. Darüber hinaus wird in der Literatur bereits beschrieben, dass ein Hydrogel aus Polyethylenglycol (PEG), welches mittels holo-CaM vernetzt wurde, bei Bindung von TFP an Calmodulin eine signifikante Volumenabnahme zeigt. Umgekehrt kann eine Schwellung des Hydrogels induziert werden, wenn die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen entfernt werden und die apo-Form von Calmodulin gebildet wird.<sup>[275]</sup> Offenbar wurde die Konformationsänderung eines Proteins auf der Nanometer-Skala in makroskopische Volumenänderungen eines Gels umgesetzt. King et al. haben diesen Gelkollaps ausgenutzt, um die Freisetzung des Wirkstoffs VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) zu realisieren. Hierbei er-

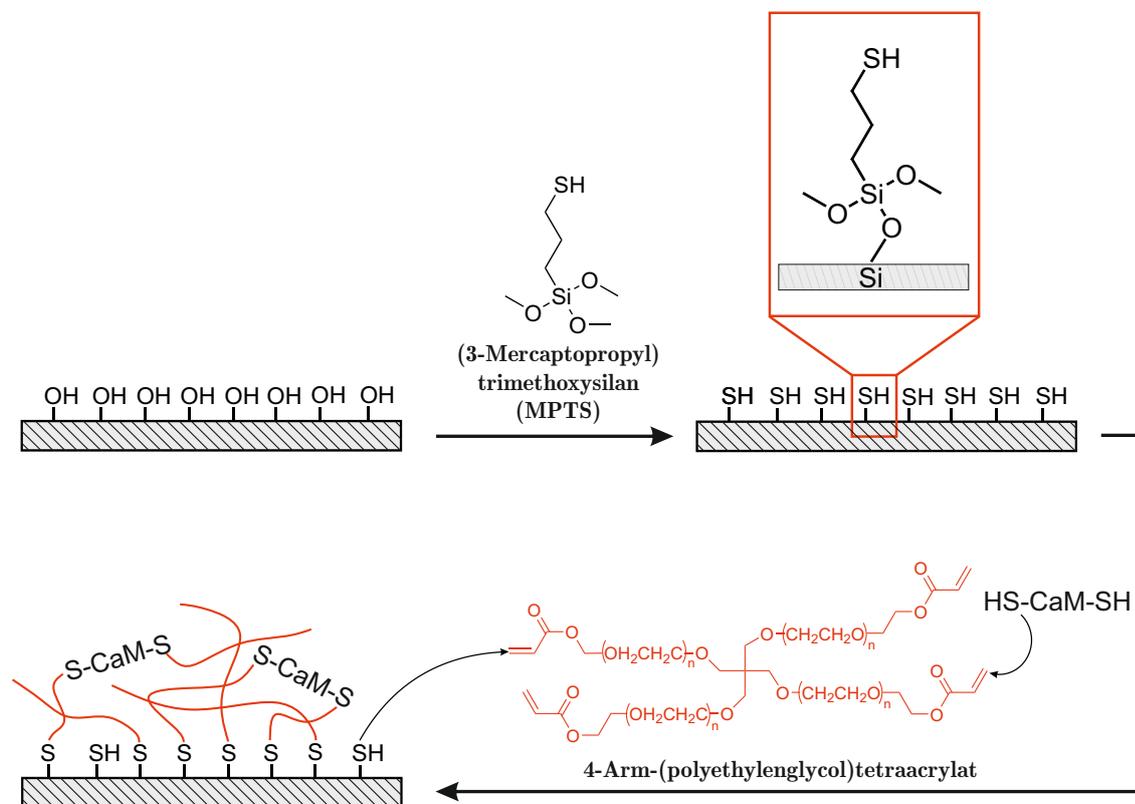
folgt die Wirkstofffreisetzung aus dem kollabierten Hydrogel im Vergleich zum nicht kollabierten Zustand doppelt so schnell.<sup>[276]</sup> Weitere Beispiele sind die Schanierbewegung der *N*-(2-Hydroxypropyl)-methacrylamid vernetzten Adenylatkinase durch Binden von ATP und die Schanierbewegung des Glucose-bindenden Proteins (GBP), welches kovalent mit einem Poly(acrylamid)hydrogel verknüpft ist.<sup>[277,278]</sup> In einer anderen Studie wurde Calmodulin und einer seiner Liganden hingegen kovalent an ein Hydrogel verknüpft. Durch Entfernen und Binden von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen konnte eine Bindung von Calmodulin mit seinem Liganden induziert und dadurch die Netzweite des Hydrogels reversibel gesteuert werden.<sup>[279]</sup>

Angesichts der interessanten Eigenschaften von Calmodulin und CaM-Hydrogelen wurden in diesem Teilprojekt Grenzflächenstrukturen aufgebaut, bei denen PEG-Ketten kovalent mit einer festen Oberfläche verknüpft sind und durch eine Doppel-Cystein-Mutante von Calmodulin quervernetzt wurden. Ziel war es, eine biologisch-schaltbare Grenzfläche zu erzeugen, die auf der durch Ligandenbindung induzierten Konformationsänderung von Calmodulin basiert.

## 6.2 Probenpräparation

### 6.2.1 Aufbau einer CaM-PEG-Schicht auf Silizium

Der Aufbau einer PEG-CaM-Schicht für Röntgenreflektivitätsmessungen erfolgte auf Silizium-Wafern mit der Abmessung  $1.5 \times 2.0 \text{ cm}^2$ , die von Siltronic (Burghausen, Deutschland) bereitgestellt wurden. Gereinigt wurden die Silizium-Wafer in einer 3:1-Mischung aus  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (95–98 %) und  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 %) für 2 h bei  $90^\circ\text{C}$ , wodurch ebenfalls freie OH-Gruppen auf der Silizium-Oberfläche erzeugt wurden. Zur Funktionalisierung der Oberfläche mit freien Thiolgruppen wurden die sauberen Si-Wafer bzw. Si-Kristalle in eine MPTS-Lösung ((3-Mercaptopropyl)trimethoxysilan, 10 % in Toluol) bei  $50^\circ\text{C}$  für 20 min eingetaucht (Abbildung 6.1). Nach Beendigung der Funktionalisierung wurden die Si-Wafer für 10 min im Ultraschallbad behandelt und exzessiv mit Toluol und Ethanol gewaschen, um nicht-kovalent gebundenes MPTS von der Oberfläche zu entfernen.



**Abbildung 6.1:** Chemische Modifikation einer Silizium-Oberfläche zum Aufbau eines biologisch-schaltbaren CaM-PEG-Films.

Um mögliche Disulfidbrücken auf der Oberfläche zu reduzieren, wurden die Si-Wafer oder Si-Kristalle für 10 min in 50 mM TCEP-Lösung (Tris(2-carboxyethyl)phosphin) inkubiert. Unter Verwendung einer amikatalysierten Thiolacrylat-Reaktion wurde 4-Arm-PEG-tetraacrylat kovalent mit den freien Thiolgruppen der funktionalisierten Oberfläche und  $\text{CaM}^{\text{T110C}, \text{T34C}}$  verbunden (Abbildung 6.1). Hierfür wurden die funktionalisierten Si-Wafer in einer Reaktionslösung mit  $0.24 \text{ mg mL}^{-1}$  4-Arm-PEG-tetraacrylat,  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$   $\text{CaM}^{\text{T34C}, \text{T110C}}$ , 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 150 mM NaCl, 1.5 mM TCEP und 20 mM HEPES-Puffer bei pH=7 für 24 h bei 30 °C inkubiert. Auf die gleiche Art wurde eine Oberfläche ohne  $\text{CaM}^{\text{T34C}, \text{T110C}}$  hergestellt, die als Referenz diente. Die Herstellung von rekombinantem holo- $\text{CaM}^{\text{T34C}, \text{T110C}}$  ist in Unterabschnitt 4.2.1 beschrieben.

### 6.2.2 Röntgen-Kleinwinkelstreuexperimente (SAXS)

Die Äquilibrierungszeit vor jeder Messung betrug 30 min. Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt und die Messzeit betrug für jede Probe jeweils 30 min. Die Zusammensetzungen der verwendeten Proben sind in Tabelle 6.1 aufgeführt.

**Tabelle 6.1:** Für die SAXS-Messungen verwendete Proben und ihre Zusammensetzungen.

Probe	Zusammensetzung
holo- $\text{CaM}^{\text{T34C}, \text{T110C}}$	0.6 mM Calmodulin <sup>T34C, T110C</sup> , 0.5 mM DTT, 10 mM BisTris, 10 mM $\text{CaCl}_2$ , 150 mM NaCl, pH=6.5
holo- $\text{CaM}^{\text{T34C}, \text{T110C}}$ + TFP	0.6 mM Calmodulin <sup>T34C, T110C</sup> , 0.5 mM DTT, 3 mM TFP, 10 mM BisTris, 10 mM $\text{CaCl}_2$ , 150 mM NaCl, pH=6.5

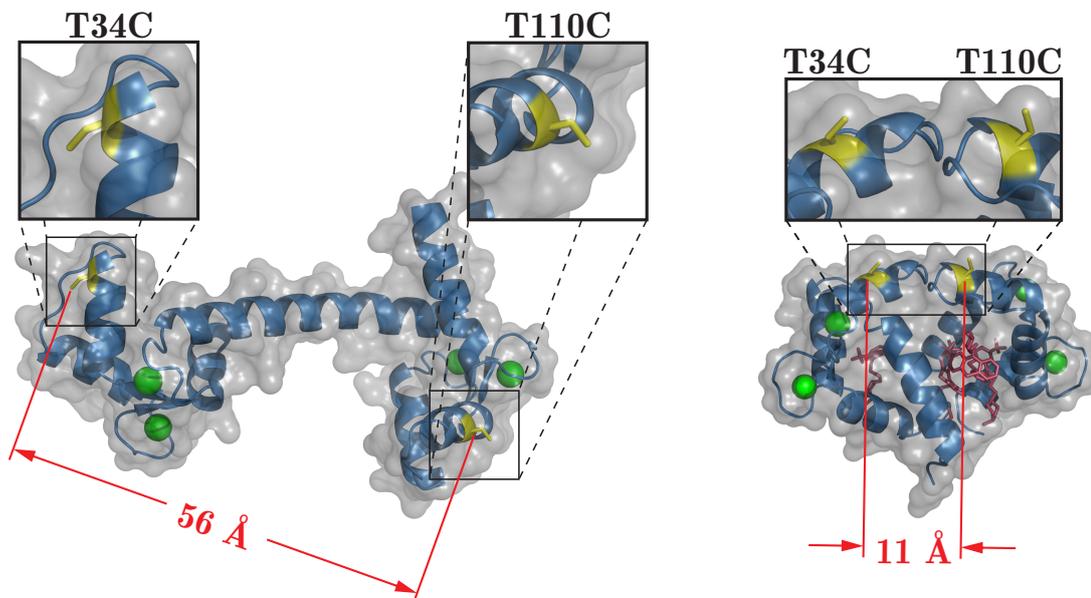
### 6.2.3 ATR/FTIR-Messungen

Für die ATR-FTIR-Messungen wurde ein Silizium-ATR-Kristall, wie in Unterabschnitt 6.2.1 beschrieben, gereinigt und mit MPTS funktionalisiert. Für ein genaues Untergrundspektrum wurde der funktionalisierte ATR-Kristall ins FTIR-Spektrometer eingebaut und ein Spektrum mit der Puffer-Lösung (10 mM BisTris in D<sub>2</sub>O, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, pD=6.5) aufgenommen. Die Reaktionsbedingungen für die anschließende Modifizierung mit einem CaM-PEG-Film sind dieselben wie in Unterabschnitt 6.2.1 beschrieben. Nach Beendigung der Reaktion wurde der ATR-Kristall im eingebauten Zustand mehrmals mit der Puffer-Lösung gespült. Anschließend wurde das Probenspektrum aufgenommen. Das vor dem Aufbau der CaM<sup>T34C, T110C</sup>-PEG-Schicht aufgenommene Untergrundspektrum wurde von dem Probenspektrum abgezogen.

## 6.3 Ergebnisse

### 6.3.1 Charakterisierung von CaM<sup>T34C, T110C</sup> in Lösung

Zur Herstellung eines kovalent mit Calmodulin vernetzten PEG-Films waren zwei Mutationen im Calmodulin erforderlich. Wichtig hierbei war, dass die beiden Mutationen in der offenen Konformation von Calmodulin einen maximalen und in der geschlossenen einen minimalen Abstand zueinander besitzen sollten. Dadurch sollte die große, durch liganden-induzierte Konformationsänderung von Calmodulin bestmöglich auf das PEG-Netzwerk übertragen werden. Die Threonin-Reste an den Positionen 34 und 110 wurden hierfür zu Cystein-Resten mutiert (Abbildung 6.2).

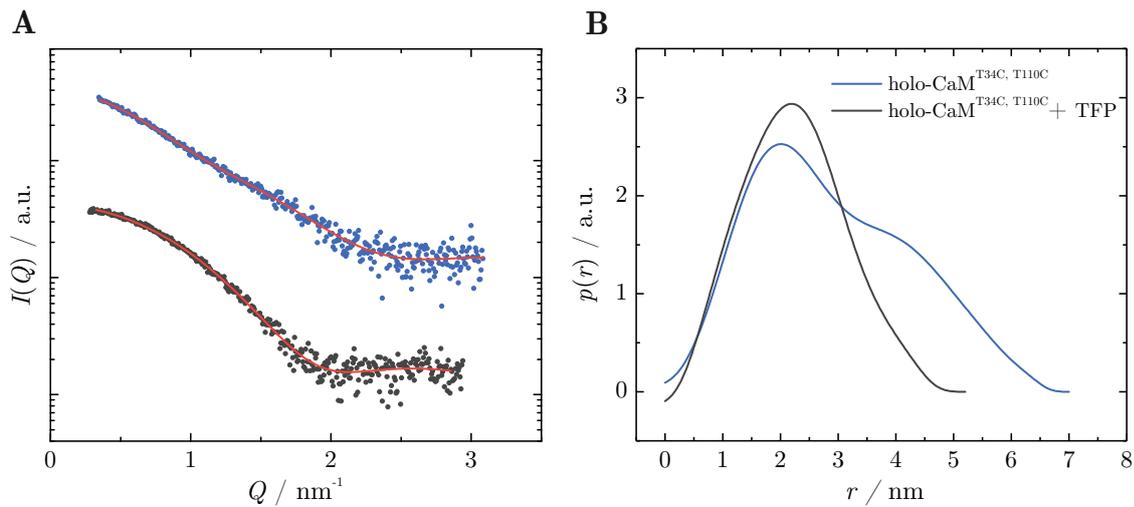


**Abbildung 6.2:** Ca<sup>2+</sup>-gesättigtes holo-CaM<sup>T34C, T110C</sup> (links) und holo-CaM<sup>T34C, T110C</sup> mit vier gebundenen TFP-Molekülen (rechts). Die beiden Bändermodelle von CaM<sup>T34C, T110C</sup> wurden mit der Software PyMOL unter Verwendung und Modifizierung der PDB IDs 3CLN<sup>[125]</sup> und 1LIN<sup>[126]</sup> erzeugt (blau: CaM; grün: Ca<sup>2+</sup>; rot: TFP; gelb: Cystein-Reste).

In der offenen holo-Form besitzen die Aminosäurereste T34C und T110C einen maximalen Abstand von 56 Å, während sie in der geschlossenen TFP-gebundenen Calmodulin-Konformation nur noch einen Abstand von 11 Å zueinander haben (bestimmt aus den Kristallstrukturen PDB ID: 3CLN<sup>[125]</sup> und 1LIN<sup>[126]</sup>, mit den ein-

gefügten Cys-Mutationen). Die Calmodulin-Mutante mit den beiden Mutation T34C und T110C wird im Weiteren als CaM<sup>T34C, T110C</sup> bezeichnet.

Zur Charakterisierung und Überprüfung der Funktionalität von CaM<sup>T34C, T110C</sup> wurden SAXS-Messungen durchgeführt. In Abbildung 6.3 sind die Streukurven mit den entsprechenden  $p(r)$ -Funktionen dargestellt.

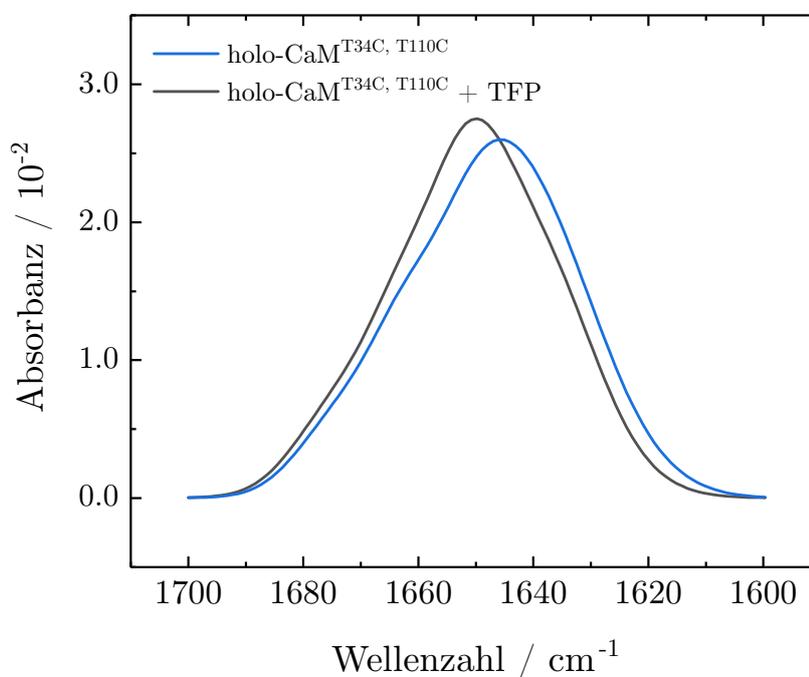


**Abbildung 6.3:** **A)** Streukurven  $I(Q)$  und **B)** Paarabstandsverteilungsfunktionen  $p(r)$  von  $\text{Ca}^{2+}$ -gesättigtem CaM<sup>T34C, T110C</sup> in Lösung mit und ohne 5 äq. TFP.

Anhand der unterschiedlichen Streukurven ist zu sehen, dass TFP eine ausgeprägte Wirkung auf die Konformation von Calmodulin hat. In Gegenwart von TFP ist die entsprechende  $p(r)$ -Funktion eher symmetrisch, was ein Hinweis auf eine globuläre Form ist. Im Gegensatz dazu hat die  $p(r)$ -Funktion eine Schulter bei etwa 4.5 nm, wenn kein TFP gebunden ist. Dies weist darauf hin, dass eine höhere Wahrscheinlichkeit besteht, größere Abstände im Molekül zu finden, was für die offene, hantelförmige Konformation von holo-CaM<sup>T34C, T110C</sup> spricht. Nach dem Binden von TFP nimmt der Gyrationradius von 2.3 nm auf 1.7 nm und der maximale Durchmesser von 6.7 nm auf 4.7 nm ab. Beides spricht für eine große Konformationsänderung durch Bindung von TFP an die Mutante CaM<sup>T34C, T110C</sup>. Die Ergebnisse stimmen gut mit Literaturwerten und mit den SAXS-Messungen aus Unterabschnitt 4.3.2 für den Calmodulin-Wildtyp überein. Die beiden Mutationen T34C und T110C haben anscheinend keinen signifikanten Einfluss auf die große TFP-induzierte Konformati-

onsänderung von Calmodulin.

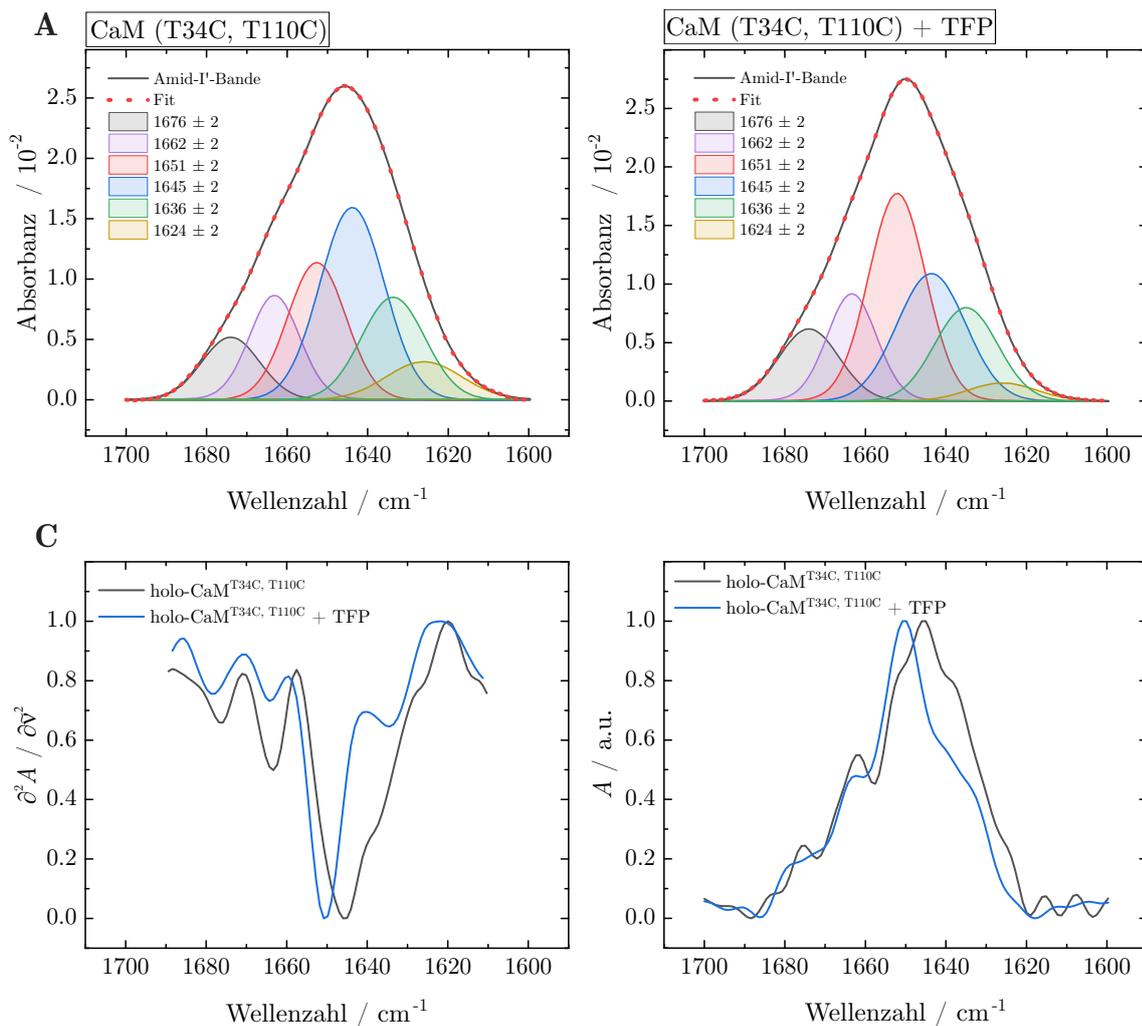
Weiterhin wurden FTIR-Messungen von holo-CaM<sup>T34C, T110C</sup> und TFP-gebundenem holo-CaM<sup>T34C, T110C</sup> durchgeführt und daraus die relative Sekundärstruktur-Zusammensetzung ermittelt. Wie in Abbildung 6.4 zu sehen, befindet sich das Absorptionsmaximum von holo-CaM<sup>T34C, T110C</sup> bei etwa 1645 cm<sup>-1</sup>. Nach Binden von vier TFP Molekülen an holo-CaM<sup>T34C, T110C</sup> verschiebt sich das Maximum der Amid-I'-Bande leicht zu 1650 cm<sup>-1</sup>, was auf eine leichte Änderung der Sekundärstruktur hindeutet.



**Abbildung 6.4:** Im Bereich von 1700–1600 cm<sup>-1</sup> flächennormierte Amid-I'-Bande von holo-CaM<sup>T34C, T110C</sup> in Lösung mit und ohne TFP als Ligand.

Die Sekundärstrukturanalyse wurde, wie in Abschnitt 2.2 erläutert, durchgeführt. Die in die Subbanden zerlegte Amid-I'-Bande von holo-CaM<sup>T34C, T110C</sup> und TFP-gebundenem holo-CaM<sup>T34C, T110C</sup> sowie die dazugehörigen Graphen der FSD und der zweiten Ableitung sind in Abbildung 6.5 dargestellt. Insgesamt konnten sechs Subbanden aus FSD und zweiter Ableitung gefunden werden. Die aufgelösten Subbanden-Peak-Wellenzahlen stimmen mit denen des Wildtyps überein. Die bei 1676 cm<sup>-1</sup> und

1662  $\text{cm}^{-1}$  gefundenen Subbanden werden gewöhnlich Schleifen zugeordnet und die bei 1651  $\text{cm}^{-1}$  den  $\alpha$ -Helices. Im Fall von Calmodulin repräsentiert die Subbande bei 1645  $\text{cm}^{-1}$  ebenfalls  $\alpha$ -Helices, jedoch solche, die vollständig zum Wasser hin exponiert sind. Die Subbande bei 1636  $\text{cm}^{-1}$  wird normalerweise den  $\beta$ -Faltblattstrukturen zugeordnet.<sup>[280]</sup> Bei Calmodulin lässt sie sich, ähnlich wie bei Myoglobin, das auch keine  $\beta$ -Faltblattstrukturen besitzt, ebenfalls solvatisierten  $\alpha$ -Helices zuordnen.<sup>[281]</sup>



**Abbildung 6.5:** **A)** Die in die Subbanden aufgelösten Amid-I'-Banden von holo-CaM<sup>T34C, T110C</sup> und holo-CaM<sup>T34C, T110C</sup> mit vier gebundenen TFP-Molekülen in Lösung. **B)** Die jeweiligen FSD-behandelten Spektren und die zweiten Ableitungen, anhand derer die Subbandenpositionen bestimmt wurden ( $A$  ist die Absorbanz).

Im Vergleich zur Sekundärstrukturanalyse von Calmodulin(Wildtyp) in Abschnitt 4.3.1 sind die Amid-I'-Banden hier zu größeren Wellenzahlen verschoben. Dies resul-

tiert, wie bereits in 4.3.1 besprochen, aus einem unvollständigen H/D-Austausch von Calmodulin über Nacht.

Zur Kontrolle des tatsächlichen Einbaus von Calmodulin in das PEG-Netzwerk wurden zudem ATR-FTIR-Messungen durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei 25 °C. Daher ist das im PEG-Netzwerk eingebaute holo-CaM<sup>T34C, T110C</sup> ebenfalls unvollständig deuteriert. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurde hier auf einen vollständigen H/D-Austausch durch Erwärmen von Calmodulin in D<sub>2</sub>O verzichtet. Die erhaltenen Sekundärstrukturanteile sind in Tabelle 6.2 zusammengefasst. Aus der Summe der beiden Teilbanden bei 1651 cm<sup>-1</sup> und 1645 cm<sup>-1</sup> ergibt sich ein Gesamtanteil von 53 % für  $\alpha$ -Helices in holo-CaM<sup>T34C, T110C</sup> ohne gebundenes TFP. Dieser Wert entspricht den in der Literatur angegebenen Werten für Wildtyp-holo-Calmodulin.<sup>[167,180]</sup> In der TFP-gebundenen Form sinkt der Anteil der  $\alpha$ -Helices bei 1645 cm<sup>-1</sup> von 32 % auf 23 %, was mit der Konformationsänderung von Calmodulin erklärt werden kann. In der TFP-ungebundenen Form von Calmodulin verbindet eine lange exponierte Helix die beiden Ca<sup>2+</sup>-bindenden Domänen miteinander, während in der TFP-gebundenen Form eine globuläre Konformation ausgebildet wird und somit weniger  $\alpha$ -Helices zum Wasser exponiert sind. Somit bestätigen die SAXS-Messungen, wie auch die FTIR-Messungen, dass die hier verwendete Mutante CaM<sup>T34C, T110C</sup> hinsichtlich ihrer strukturellen Eigenschaften und konformellen Funktionalität keinen Unterschied im Vergleich zum Wildtyp-Calmodulin zu haben scheint.

**Tabelle 6.2:** Sekundärstrukturanteile von holo-CaM<sup>T34C, T110C</sup> und holo-CaM<sup>T34C, T110C</sup> mit vier gebundenen TFP-Molekülen.<sup>a</sup>

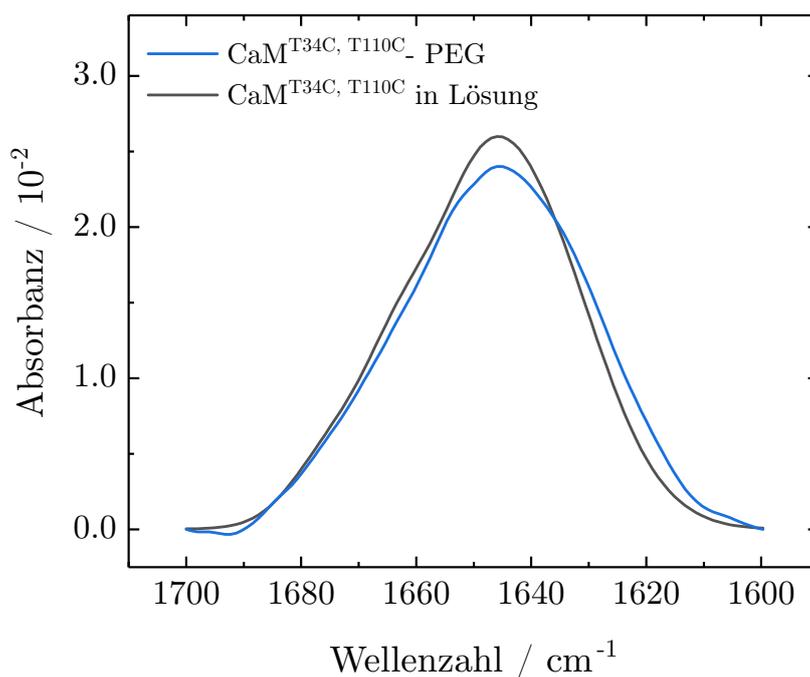
	1676 cm <sup>-1</sup>	1662 cm <sup>-1</sup>	1651 cm <sup>-1</sup>	1645 cm <sup>-1</sup>	1636 cm <sup>-1</sup>	1624 cm <sup>-1</sup>
	Schleifen <sup>b</sup>	Schleifen <sup>b</sup>	$\alpha$ -Helix <sup>b</sup>	$\alpha$ -Helix <sup>b</sup>	$\alpha$ -Helix <sup>b</sup>	Basislinie <sup>b</sup>
ohne TFP	9	14	21	32	17	7
mit TFP	12	14	32	23	16	3

<sup>a</sup> Die Sekundärstrukturanteile sind in % angegeben und besitzen ein Fehler von  $\pm 3$  %.

<sup>b</sup> Startwerte bei der Anpassung mit der Toleranz  $\pm 2$  cm<sup>-1</sup>.

### 6.3.2 Aufbau der CaM-PEG-Schicht

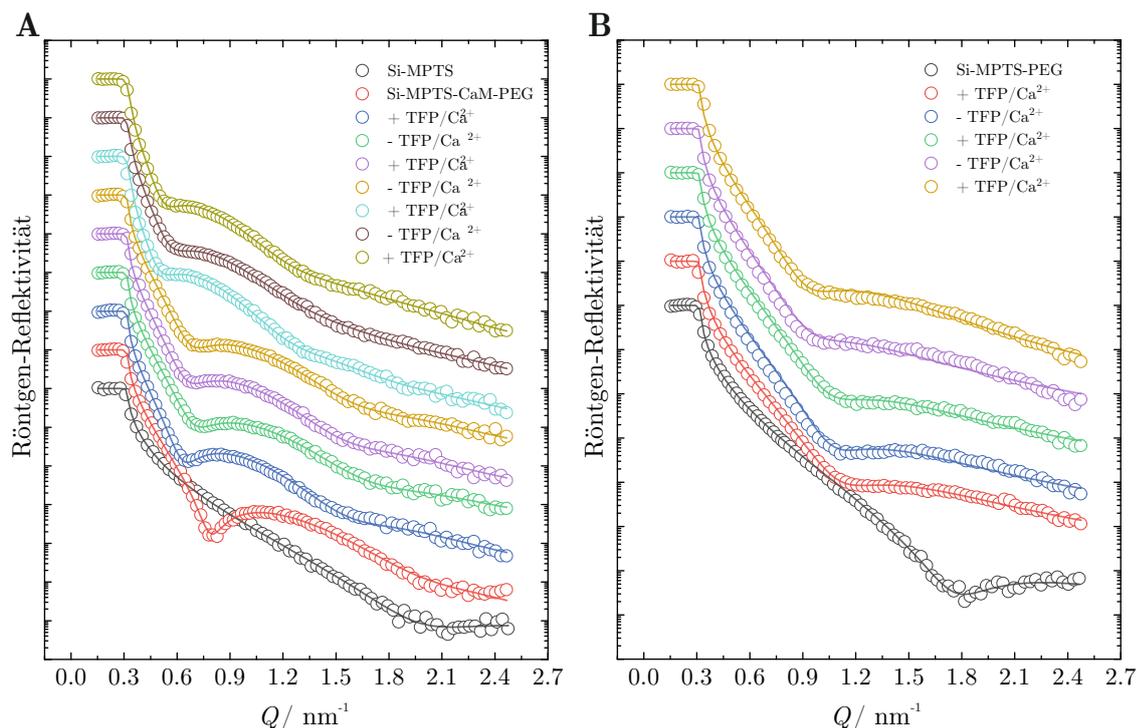
Nachdem CaM<sup>T34C, T110C</sup> charakterisiert und dessen Funktionalität kontrolliert wurde, erfolgte der Aufbau der CaM<sup>T34C, T110C</sup>-PEG-Schicht durch Quervernetzung, wie in Unterabschnitt 6.2.1 beschrieben. Die beiden mutierten Positionen T34C und T110C besitzen einen maximalen Abstand von etwa 52 Å in der TFP-ungebundenen, offenen Konformation und einen minimalen Abstand von 11 Å in der geschlossenen, TFP-gebundenen Konformation. Aufgrund der kovalenten Verknüpfung von CaM<sup>T34C, T110C</sup> mit dem 4-Arm-PEG-Netzwerk ist bei dieser Konformationsänderung eine große Zugkraft an den PEG-Ketten zu erwarten. Der erfolgreiche Aufbau des CaM-PEG-Films wurde anhand von Röntgenreflektivitätsmessungen und ATR-FTIR-Messungen überprüft.



**Abbildung 6.6:** Im Bereich von 1700–1600 cm<sup>-1</sup> flächennormierte FTIR-Spektren der Amid-I'-Bande von CaM<sup>T34C, T110C</sup> in Lösung und eines CaM<sup>T34C, T110C</sup>-PEG-Films. Letzteres wurde im ATR-Modus aufgenommen.

Die Detektion der Amid-I'-Bande im ATR-FTIR-Spektrum (Abbildung 6.6) bestätigt den erfolgreichen Einbau des CaM<sup>T34C, T110C</sup> in das PEG-Netzwerk. Die Bandenpositionen des CaM<sup>T34C, T110C</sup> in Lösung und im CaM<sup>T34C, T110C</sup>-PEG-Film sind nahezu identisch. Beim CaM<sup>T34C, T110C</sup> im PEG-Netzwerk ist die Amid-I'-Bande im Vergleich zu CaM<sup>T34C, T110C</sup> in Lösung zu kleineren Wellenzahlen hin etwas verbreitert. Die Konzentration von Calmodulin im PEG-Netzwerk ist geringer als die in Lösung. Daraus resultiert eine Amid-I'-Bande mit geringer Intensität. Kleine Abweichungen bei der Subtraktion des Untergrunds fallen daher schwerer ins Gewicht. Im Rahmen des Fehlers bleibt die Sekundärstruktur von CaM<sup>T34C, T110C</sup> im PEG-Netzwerk jedoch erhalten.

Röntgenreflektivitätsmessungen wurden, wie auch in den vorherigen Studien, in einer Hydratationskammer durchgeführt, um eine vollständige Hydratation der Proben zu gewährleisten. Zur Bestimmung der Grenzflächenstrukturen wurde in der Regel das einfachste Strukturmodell verwendet, das durch die Dicke, die Röntgenstreulängendichte und die Rauigkeit des CaM-PEG-Filmes beschrieben wird. Allerdings zeigte sich in einigen Fällen, dass das CaM-PEG-Netzwerk durch zwei Schichten mit leicht unterschiedlichen Streulängendichten beschrieben werden muss. Dies deutet auf einen schwachen Gradienten der Elektronendichte senkrecht zur Grenzfläche hin. Zusätzlich zu diesen Parametern, die während der Anpassung variiert wurden, wurden feste Werte für die Streulängen von Silizium und Luft verwendet. Die angepassten Graphen sind beispielhaft in Abbildung 6.7 als durchgezogene Linien dargestellt. Die entsprechenden Anpassungsparameter sind in Tabelle 6.3 zusammengefasst.



**Abbildung 6.7:** **A)** Typische Röntgenreflektivitätsdaten eines CaM-PEG-Films auf einer Silizium-Oberfläche. Gespült wurde mit einer TFP/ $\text{Ca}^{2+}$ - und EGTA-Lösung. **B)** Typische Röntgenreflektivitätsdaten eines PEG-Films ohne CaM auf einer Silizium-Oberfläche als Referenz. Gespült wurde mit einer TFP/ $\text{Ca}^{2+}$ - und EGTA-Lösung. Die Messungen wurden in einer Hydratationskammer durchgeführt, um eine vollständige Hydratation zu gewährleisten. Die Kreise zeigen die gemessenen Daten und die durchgezogenen Linien das angepasste Strukturmodell. Zur besseren Übersicht wurden die Röntgenreflektivitätsdaten um den Faktor 10 vertikal verschoben.

Sowohl apo- als auch holo-CaM<sup>T34C, T110C</sup> haben eine Röntgenstreuungsdichte von etwa  $12.7 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ . Berechnet wurde diese unter Verwendung der Molmassen von  $16710 \text{ g mol}^{-1}$  bzw.  $16871 \text{ g mol}^{-1}$  und der spezifischen Volumina von  $0.712 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  bzw.  $0.707 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ .<sup>[282]</sup> Für PEG und Wasser konnten, mit den spezifischen Volumina von  $0.83 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ <sup>[283]</sup> und  $1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ , Streulängendichten von  $11.1 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  (PEG) und  $9.4 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  (Wasser) berechnet werden. Folglich sind die Röntgenstreuungsdichten der verwendeten Komponenten sehr ähnlich. In Anbetracht des experimentellen Fehlers von 10–15 % ist es schwierig, aus der erhaltenen Streulängendichte des CaM-PEG-Films die innere Struktur des aufgebauten Films abzuleiten.

**Tabelle 6.3:** Schichtdicke  $d$ , Streulängendichte  $\rho$  und Rauigkeit  $\sigma$  der angepassten Streukurven des CaM-PEG-Films aus Abbildung 6.7A.<sup>a</sup>

Lösung	$d_1$ / Å	$d_2$ / Å	$\rho_1$ / $10^{-6} \text{ Å}^{-2}$	$\rho_2$ / $10^{-6} \text{ Å}^{-2}$	$\sigma_1$ / Å	$\sigma_2$ / Å
Puffer	29.4	9.5	9.6	12.9	10	4
TFP/Ca <sup>2+</sup> <sup>b</sup>	31.7	26.0	9.6	11.6	15	6
EGTA <sup>c</sup>	30.2	20.6	9.6	11.6	15	6
TFP/Ca <sup>2+</sup>	36.4	19.7	9.5	12.5	16	10
EGTA	35.8	16.0	10.0	12.6	16	8
TFP/Ca <sup>2+</sup>	54.2	20.4	9.7	11.6	19	5
EGTA	41.2	21.9	10.5	11.8	21	4
TFP/Ca <sup>2+</sup>	42.6	26.6	10.3	11.4	20	4

<sup>a</sup> Es wurde ein Zwei-Schichtenmodell zur Bestimmung der Schichtdicke  $d$ , Streulängendichte  $\rho$ , und der Rauigkeit  $\sigma$  verwendet.

<sup>b</sup> Die Lösung enthält 2.5 mM TFP, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM HEPES-Puffer bei pH=6.8.

<sup>c</sup> Die Lösung enthält 5 mM EGTA, 20 mM HEPES-Puffer bei pH=6.8.

Wie aus der Tabelle 6.3 ersichtlich, beträgt die Schichtdicke der aufgebauten CaM-PEG-Schicht 39 Å (Summe aus  $d_1$  und  $d_2$  nach Spülen mit Puffer-Lösung). Die Ergebnisse der SAXS-Messungen ergaben für CaM<sup>T34C, T110C</sup> einen Gyrationradius von 23 Å und einen maximalen Durchmesser von etwa 67 Å. Somit liegt es nahe, dass sich das Calmodulin bei einer Schichtdicke von 39 Å parallel zur Grenzfläche angeordnet haben muss. Wird die CaM-PEG-Schicht mit einer TFP/Ca<sup>2+</sup>-Lösung inkubiert, so kommt es zu einer Zunahme der Schichtdicke, während beim Inkubieren mit einer EGTA-Lösung eine Abnahme der Schichtdicke zu beobachten ist (Abbildung 6.7 und Tabelle 6.3). EGTA besitzt eine hohe Affinität zu Ca<sup>2+</sup>-Ionen und fungiert als Chelator, wodurch das Ca<sup>2+</sup> komplexiert und somit vom Calmodulin entfernt wird. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die beiden Lösungen unterschiedliche Konformationen von CaM induzieren, wodurch die Schichtdicke variiert. Des Weiteren scheint die Konformationsänderung weitestgehend reversibel zu verlaufen.

**Tabelle 6.4:** Schichtdickenänderungen verschiedener CaM<sup>T34C, T110C</sup>-PEG-Filme durch Spülen mit einer TFP/Ca<sup>2+</sup>- und EGTA-Lösung.<sup>a</sup>

Probe Lösung	1	2	3	4	5	6	7 <sup>c</sup>	8 <sup>c</sup>
Puffer <sup>b</sup>	39	53	95	96	32	33	29	70
TFP/Ca <sup>2+</sup>	+19	+16	+21	+22	+6	0	0	+5
EGTA	-7	-5	-6	-3	-5	0	0	+3
TFP/Ca <sup>2+</sup>	+5	+5	+31	+42	+4	+4	+2	0
EGTA	-4	-13	-13	-13	-3	-5	+1	+2
TFP/Ca <sup>2+</sup>	+23	+19						
EGTA	-12	-10						
TFP/Ca <sup>2+</sup>	+6	+5						

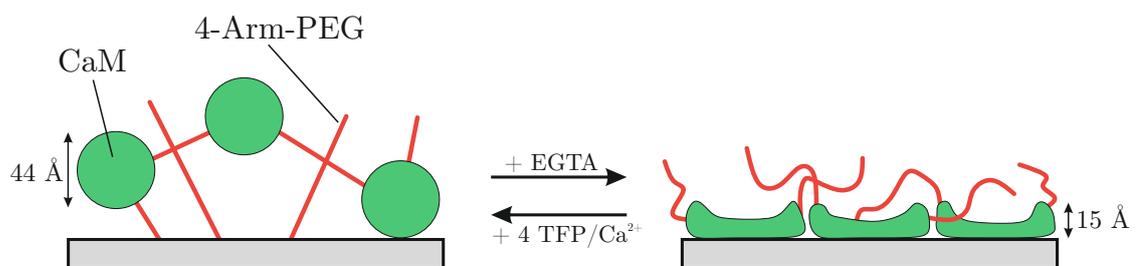
<sup>a</sup> Die Messungen wurden in einer Hydrationskammer durchgeführt, um eine vollständige Hydratation zu gewährleisten. Alle Werte sind in Å angegeben. Die TFP/Ca<sup>2+</sup>-Lösung enthält 2.5 mM TFP, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM HEPES-Puffer bei pH=6.8. Die EGTA-Lösung enthält 5 mM EGTA, 20 mM HEPES-Puffer bei pH=6.8.

<sup>b</sup> Diese Zeile gibt die anfängliche Schichtdicke nach dem Spülen mit der Pufferlösung an.

<sup>c</sup> Aufbau der Schicht wie in Abbildung 6.7B, ohne CaM, als Referenz.

Es wurden mehrere CaM-PEG-Filme hergestellt, wobei die Menge an immobilisiertem PEG und CaM<sup>T34C, T110C</sup> durch Variation der Inkubationszeit variiert wurde. In der Tabelle 6.4 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Die gezeigten Proben unterscheiden sich lediglich durch ihre anfängliche Filmdicke. Die Inkubationsschritte mit den jeweiligen Lösungen erfolgten für alle Proben unter identischen Bedingungen. Wie in Tabelle 6.4 zu sehen, sind die Schichtdickenänderungen beim Spülen mit TFP/Ca<sup>2+</sup>- und EGTA-Lösungen umso größer, je größer die anfängliche Schichtdicke ist. Die Proben 7 und 8 wurden ohne CaM<sup>T34C, T110C</sup> hergestellt und dienen als Referenz. Durch Spülen der Referenzproben mit TFP/Ca<sup>2+</sup> und EGTA ist keine signifikante Schichtdickenänderung im Vergleich zu den Proben 1-6 zu beobachten. Die Referenzprobe 8 zeigt eine Schichtdicke von 70 Å, die durch Spülen mit einer EGTA-Lösung nicht geringer wird. Die Schichtdickenzunahme durch das Spülen mit TFP/Ca<sup>2+</sup> ist bei den Proben 7 und 8 vernachlässigbar. Wenn allerdings ein CaM-PEG-Film

mit der TFP/ $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung gespült wird, bindet TFP an Calmodulin. Es wird die globuläre Konformation ausgebildet und ein Anschwellen des CaM-PEG-Films ist zu beobachten (Tabelle 6.4). Aufgrund der hohen Affinität von EGTA zu  $\text{Ca}^{2+}$  werden durch Spülen mit der EGTA-Lösung die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen entfernt und das TFP dissoziiert, wodurch die hantelförmige apo-CaM-Form gebildet wird. Ohne  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen hat apo-CaM eine deutlich geringere Bindungsaffinität für Liganden. TFP ist nicht mehr fest gebunden und apo-CaM nimmt die offene Konformation ein. Unter diesen Bedingungen wird ein Abschwellen des CaM-PEG-Films beobachtet (Tabelle 6.4). In Abbildung 6.8 ist ein einfaches Strukturmodell dargestellt, welches dieses Verhalten schematisch erklären kann.



**Abbildung 6.8:** Schematische Darstellung zur Erklärung der Schichtdickenänderung eines CaM-PEG-Films durch Spülen mit einer TFP/ $\text{Ca}^{2+}$ - und EGTA-Lösung.

Wenn durch das Entfernen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit EGTA die offene apo-CaM-Form ausgebildet wird, sind die PEG-Ketten, die kovalent an den Positionen C34 und C110 des  $\text{CaM}^{\text{T34C, T110C}}$  gebunden sind, entspannt und üben nur eine geringe Zugkraft auf die Proteinmoleküle aus, wodurch eine optimale Adsorption der Proteinmoleküle auf die Si-Oberfläche ermöglicht wird (Abbildung 6.8 rechts). Es ist somit ein Abschwellen der Schicht zu beobachten. Durch das Spülen mit einer TFP/ $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung entsteht die globuläre Form, wodurch die PEG-Ketten gespannt werden, sodass eine Zugkraft zwischen den Proteinmolekülen erzeugt wird. Dies führt zur Neuorientierung der Proteinmoleküle und in einem gewissen Maß zu einer Bewegung von der Oberfläche weg. Darüber hinaus hat die globuläre Konformation von holo- $\text{CaM}^{\text{T34C, T110C}}$  einen Radius von  $R = \sqrt{\frac{5}{3}} \cdot R_G = 22 \text{ \AA}$  und einen maximalen Durchmesser von  $47 \text{ \AA}$  (Abbildung 4.1 und 6.3), während die Domänen in der offenen Konformation nur

einen Durchmesser von etwa 15 Å aufweisen (abgeschätzt aus der Kristallstruktur von apo-CaM, PDB ID: 1CFD<sup>[194]</sup>). Daher ist die Konformation der apo-Form mit einer dünnen Filmschichtdicke konsistent. Jedoch wird eine weitere Analyse der CaM-PEG-Struktur unter Verwendung anderer Verfahren als der Röntgenreflektometrie erforderlich sein, um die strukturellen Details zu klären.

## 6.4 Zusammenfassung von Kapitel 6

Schaltbare Oberflächenfilme werden oft durch Polymere erzeugt, wobei deren Struktur und Eigenschaften durch Variation des pH-Werts, der Ionenstärke oder der Temperatur verändert werden. Die Variation physikalisch-chemischer Parameter ist jedoch nicht immer kompatibel mit biologischen Systemen. Daher wurde in diesem Teilprojekt eine biologisch-schaltbare Oberfläche, die auf der großen durch Liganden-induzierten Konformationsänderung von Calmodulin basiert, hergestellt. Hierzu wurde die Doppel-Mutante CaM<sup>T34C, T110C</sup> erzeugt und mittels Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS) und Fourier-Transformations-Infrarot (FTIR)-Spektroskopie charakterisiert. Durch beide Methoden konnte zunächst gezeigt werden, dass die beiden Mutationen T34C und T110C keinen signifikanten Einfluss auf die Sekundärstruktur im Vergleich zum Calmodulin-Wildtyp haben und dass die Funktionalität von CaM<sup>T34C, T110C</sup> hinsichtlich einer Ligandenbindung nicht beeinträchtigt wird. Die beiden eingeführten Mutationen in CaM<sup>T34C, T110C</sup> wurden benötigt, um 4-Arm-PEG-tetraacrylat-Ketten, die kovalent an einer Silizium-Oberfläche gebunden sind, quervernetzen. Der erfolgreiche Aufbau des CaM<sup>T34C, T110C</sup>-PEG-Films konnte anhand von Röntgenreflektivitätsmessungen und ATR-FTIR-Experimenten gezeigt werden. Mittels der ATR-FTIR-Spektroskopie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die kovalente Verknüpfung von CaM<sup>T34C, T110C</sup> an 4-Arm-PEG-tetraacrylat-Ketten keinen signifikanten Einfluss auf die Sekundärstruktur hat.

Durch Spülen mit einer TFP/Ca<sup>2+</sup>- oder EGTA-Lösung war es möglich, die Schichtdicke des CaM<sup>T34C, T110C</sup>-PEG-Films reversibel zu verändern. Diese Schaltbarkeit beruht wahrscheinlich auf den Konformationsänderungen von Calmodulin, die durch Binden und Entfernen von TFP/Ca<sup>2+</sup> induziert werden. In der TFP/Ca<sup>2+</sup>-gebundenen,

geschlossenen Konformation des vernetzenden Calmodulins werden die PEG-Ketten gestreckt, während in der offenen Konformation das PEG-Netzwerk entspannt vorliegt. Im letzteren Fall kann Calmodulin parallel zur Silizium-Oberfläche adsorbieren. So scheint es, dass die durch Liganden-induzierte Konformationsänderung von Calmodulin einen direkten Einfluss auf das PEG-Netzwerk hat, was zu einem An- oder Abschwellen der Filmschichtdicke führt. Auf diese Art und Weise konnte ein biologisch-schaltbarer Oberflächenfilm erzeugt werden. Die PEG-Ketten dienen aufgrund ihrer starken Hydratisierung als nativ-ähnliche Umgebung, die für Proteine essentiell ist, um die volle Konformationsfunktionalität zu erhalten. Ebenso ist PEG nicht toxisch und daher für den medizinischen Einsatz bestens geeignet.<sup>[284,285]</sup> So ist es vorstellbar, dass Wirkstoffe in dem Netzwerk aus CaM und PEG eingebaut und durch Schwellung freigesetzt werden. Ebenso ist es denkbar, dass der Wirkstoff selbst als CaM-Ligand fungiert, wie z.B. TFP. TFP ist ein stark wirksames Neuroleptikum und wird zur Behandlung von Schizophrenie verwendet.<sup>[132,286]</sup> Nanopartikel, auf denen ein CaM-PEG-Netzwerk aufgebaut wird, könnten hierbei als Trägermaterial dienen. Durch das PEG-Netzwerk wäre die Oberfläche der Nanopartikel zudem hydratisiert, wodurch eine Opsonierung, also ein Anlagern von körpereigenen Proteinen, reduziert und die Zirkulationsdauer im Blut erhöht wäre.<sup>[287,288]</sup>



---

## 7 Zusammenfassung

Proteine sind grenzflächenaktive Moleküle. Hierdurch kann es zu unerwünschten Effekten kommen, wie z.B. der Abstoßung von medizinischen Implantaten oder der Biofilmbildung auf Kontaktlinsen. Dagegen finden gezielt immobilisierte Proteine an wässrig-festen Grenzflächen aber auch Anwendung in der Biotechnologie oder Biomedizin, wie z.B. in Form von Biochips, Teststreifen und Biokatalysatoren. Dementsprechend gibt es in der Literatur umfangreiche Studien zur Proteinadsorption an wässrig-festen Grenzflächen, in denen der Grad der Proteinadsorption in Abhängigkeit der chemischen Beschaffenheit der Grenzfläche, der Proteinkonzentration in Lösung, des pH-Wertes, der Ionenstärke, der Temperatur und des Drucks ermittelt und aufgeklärt wurde. Zudem wurde gefunden, dass viele Proteine ihre native Struktur insbesondere auf einigen hydrophilen, weichen Oberflächen weitestgehend erhalten. Darüber hinaus gibt es viele Belege, welche darauf hinweisen, dass Enzyme an ausgewählten Grenzflächen weiterhin eine hohe katalytische Aktivität besitzen.

Stellt man jedoch die Frage nach der Dynamik, der konformellen Flexibilität oder der Domänenbewegung von Proteinen an Grenzflächen, stößt man in ein weitestgehend unerforschtes Gebiet vor. Indirekt deuten natürliche Enzymaktivitäten an Grenzflächen auf ein gewisses Maß an Proteindynamik hin, aber intramolekulare Bewegungen und Konformationsumwandlungen adsorbierter Proteinmoleküle sind relativ wenig in der Literatur dokumentiert. Hier setzt die Thematik dieser Doktorarbeit an. In verschiedenen Teilprojekten wurde die Struktur und Dynamik adsorbierter Proteine im Zuge der Entfaltung und der Liganden-induzierten Konformationsumwandlung ermittelt. Gleichzeitig wurden so am Beispiel des Calmodulins zwei Grenzflächensysteme entwickelt, die biologische Schaltbarkeit aufweisen, wobei diese in einem Fall auf die

Domänenbewegung des immobilisierten Proteins zurückgeführt werden kann.

Im ersten Teilprojekt wurde die Konformation und Entfaltung von Proteinen an der Wasser-Siliziumoxid-Grenzfläche untersucht. Mit Hilfe der thermodynamischen Parameter Druck und Temperatur wurden die volumetrischen und enthalpischen Beiträge experimentell erfasst und mit denen, die frei in Lösung auftreten, verglichen. Die gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass sich die Sekundärstruktur von RNase A und Lysozym durch Adsorption auf Silica-Teilchen nicht signifikant ändert und die native Struktur erhalten bleibt. Während der temperatur- und druckinduzierte Entfaltungsweg im adsorbierten Zustand erhalten bleibt, wird die Entfaltungstemperatur und der Entfaltungsdruck im adsorbierten Zustand signifikant reduziert. Für beide Proteine, frei oder adsorbiert, führt die druckinduzierte Entfaltung zu weniger ausgeprägten Veränderungen der Sekundärstruktur als die temperaturinduzierte Entfaltung. Im Fall von Lysozym begünstigen hohe Drücke eine andere entfaltete Konformation als hohe Temperaturen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass die Adsorption von Proteinen an Silica-Teilchen die Faltungstabilität gegenüber hohen Drücken und Temperaturen verringert, während die Entfaltungswege im adsorbierten Zustand dieselben wie in Lösung sind.

Im zweiten Teilprojekt wurde die Druck- und Temperaturstabilität der Wechselwirkung von Calmodulin mit dem Wirkstoff TFP und mit den natürlichen Liganden Melittin und K-Ras4B untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass bei hohen Temperaturen und Drücken  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen von Calmodulin dissoziieren. Die Bindung von TFP oder Melittin wirkt sich stabilisierend auf die Struktur von Calmodulin aus, wodurch die Dissoziation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu höheren Drücken und Temperaturen verschoben wird. TFP scheint hierbei eine stärker stabilisierende Wirkung zu besitzen als Melittin. Wie die Sekundärstrukturanalysen zeigten, haben Druck und Temperatur nur einen marginalen Effekt auf die Sekundärstruktur von Calmodulin. Viel mehr deutet die Auswertung der  $\text{Ca}^{2+}$ -spezifischen Banden auf eine Veränderung der Tertiärstruktur von holo-CaM hin, die ebenfalls durch die SAXS-Experimente bestätigt werden konnte. Weiterhin konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die hypervariable Region (HVR) von K-Ras4B bei niedriger Konzentration mit Calmodulin einen

---

Dimer-Komplex bildet, während Calmodulin bei einem deutlichen Überschuss von K-Ras4B(HVR) einen Monomer-Komplex bildet. Ein solches Bindungsschema ist mit den ITC-Daten konsistent. Die Bindungsstärke von Liganden an holo-CaM konnte in druckabhängigen SAXS- und Fluoreszenz-Messungen qualitativ verglichen werden. Hier zeigt der Wirkstoff als Ligand die stärkste stabilisierende Wirkung auf die kompakte Calmodulin-Komplexstruktur, während K-Ras4B(HVR) ab 3000 bar von holo-CaM zu dissoziieren scheint. EINS-Messungen belegen jedoch schon bei niedrigen Drücken unterhalb von 2000 bar eine druckinduzierte Zunahme der atomaren Fluktuationen in den TFP- und K-Ras4B(HVR)-Calmodulin-Komplexen, die durch eine druckinduzierte Schwächung der elektrostatischen Ligandenbindung erklärt werden kann. Die EINS-Messungen zeigen weiterhin, dass eine strukturelle Stabilisierung des Calmodulins durch Liganden-Bindung nicht zwangsläufig mit einem Verlust der Dynamik einhergeht. Auch die Fluoreszenz-Messungen an Calmodulin-Ligand-Komplexen deuten auf eine druckinduzierte Abnahme des FRET zwischen den Domänen des Calmodulins und zwischen Calmodulin und Ligand hin, was zumindest auf eine Schwächung der Komplex-Struktur schließen lässt. Offenbar führt die Bindung von TFP an holo-CaM zu einer sehr dichten Packung und geringerem Leervolumen im Komplex, was zu starken Wechselwirkungen und einer geringen Druckstabilität führt.

In den beiden folgenden Teilprojekten lag der Fokus auf dem Aufbau von biologisch-schaltbaren Oberflächen. Als Modellprotein diente Calmodulin, dessen Liganden-induzierte Konformationsänderungen auf die Grenzfläche übertragen werden sollten.

So wurde im dritten Projekt zunächst der Aufbau und die Funktionalität von Polyelektrolytmultischichten untersucht, bei denen Calmodulin als Polyanion verwendet wurde. Hierzu wurde der Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und TFP als Liganden auf die Grenzflächenstruktur untersucht. Die Röntgen- und Neutronenreflektivitätsmessungen, wie auch die ATR-FTIR-Messungen, zeigten, dass Polyelektrolytmultischichten mit alternierendem negativ geladenen CaM und positiv geladenem PAH besondere Eigenschaften haben. Einerseits scheidet sich CaM auf PAH in großen Mengen ab, andererseits führt die anschließende Abscheidung von PAH zu einer partiellen Desorp-

tion von CaM. Die starke Wechselwirkung von PAH mit CaM führt offenbar auch zu einer Verdrängung von TFP, wenn dieses schon an CaM gebunden ist. Somit lässt sich CaM nicht als Komplex mit TFP in der globulären Konformation in die Polyelektrolytmultischicht einbauen. Ein wichtiges Ergebnis dieser Studie ist auch, dass der große Liganden-induzierte Konformationswechsel von CaM (hantelförmig/globulär) in einer CaM/PAH-Multischicht nicht mehr möglich ist. Jedoch konnte durch Entfernen und Hinzufügen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen das An- und Abschwellen der CaM/PAH-Polyelektrolytmultischicht beobachtet werden. Obwohl dieser Effekt wahrscheinlich auf Osmose zurückzuführen ist, konnte somit durch den Einbau von Calmodulin in eine Polyelektrolytmultischicht eine Oberfläche mit biologisch-schaltbaren Eigenschaften erhalten werden.

Im vierten Teilprojekt wurde eine Grenzschicht aus einem Polyethylenglycolnetzwerk, welches durch  $\text{CaM}^{\text{T34C, T110C}}$  quervernetzt wurde, aufgebaut. Durch Spülen mit einer TFP/ $\text{Ca}^{2+}$ - oder EGTA-Lösung war es möglich, die Schichtdicke reversibel zu verändern, die mittels Röntgenreflektivitätsmessungen ermittelt wurde. Diese Schaltbarkeit beruht wahrscheinlich auf der Konformationsänderung von Calmodulin, welche durch Binden und Entfernen von TFP/ $\text{Ca}^{2+}$  induziert wird. Dies deutet darauf hin, dass CaM seine liganden-abhängigen Konformationszustände auch an einer Grenzfläche einnehmen kann. Auf diese Weise ist es gelungen, eine biologisch-schaltbare Grenzflächenbeschichtung zu erhalten, deren Struktur nur durch Konzentrationsänderung eines proteinspezifischen Liganden gesteuert werden kann, ohne physikalisch-chemische Parameter wie Temperatur oder pH-Wert zu verändern. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen insgesamt, dass Proteine an geeigneten Grenzflächen dieselben Konformationsumwandlungen durchlaufen können wie in Lösung. Dies eröffnet neue Anwendungsmöglichkeiten von immobilisierten Proteinen, in denen die Proteinkonformation mit einem Polymer gekoppelt wird, um funktionale Protein-Grenzflächen zu erhalten.

---

## 8 Summary

Proteins are surface-active molecules. This can lead to undesirable effects, like the rejection of medical implants or the biofilm formation on contact lenses. On the other hand, the immobilization of proteins on aqueous-solid interfaces is widely used in various applications in biotechnology and biomedicine. There are extensive studies on protein adsorption at aqueous-solid interfaces, in which the degree of protein adsorption is characterized under variation of the chemical nature of the interface, the protein concentration, the pH value, the ionic strength, the temperature or pressure. However, the dynamics, the conformational freedom, and the domain motion of proteins at interfaces are still largely unexplored. From observed enzyme activities at interfaces some degree of protein dynamics can be concluded, but intramolecular motions and conformational changes of adsorbed protein molecules are only sparsely described in the literature. Therefore, in this thesis, the structure, dynamics and conformational transitions of adsorbed proteins were investigated in various subprojects dealing with the unfolding and ligand binding of proteins. Additionally, two interfacial systems, which are based on the conformational changes of calmodulin, were developed that show bioresponsive structural properties.

In the first subproject, the conformation and unfolding of proteins at the silica-water interface were investigated. The associated volumetric and enthalpic contributions were recorded experimentally by using the thermodynamic parameters pressure and temperature and were compared with those occurring in solution. The obtained data indicate that the secondary structure of RNase A and lysozyme is not significantly altered by adsorption on silica particles and that the native structure is retained. Whereas the temperature- and the pressure-induced unfolding pathways are maintained in the adsorbed state, the temperatures and pressures of unfolding

are significantly reduced in the adsorbed state. For both proteins, free or adsorbed, the pressure-induced unfolding leads to less pronounced changes of the secondary structure than the temperature-induced unfolding. In the case of lysozyme, high pressure favors a different unfolded conformation than high temperatures does.

In the second subproject, the pressure and temperature dependences of the interaction of calmodulin with a drug, TFP, and natural ligands, melittin and a K-Ras4B peptide, were analyzed. It is shown that  $\text{Ca}^{2+}$  ions, which are bound to calmodulin, can dissociate at high temperatures and pressures. The binding of melittin or TFP has a stabilizing effect on the structure of calmodulin, and the dissociation of the  $\text{Ca}^{2+}$  ions is shifted to higher pressures and temperatures. TFP was found to have a larger stabilizing effect than melittin has. The secondary structure of calmodulin is almost unchanged, when the temperature or pressure is increased, but the analysis of the  $\text{Ca}^{2+}$  specific FTIR bands suggests a change in the tertiary structure of holo-CaM, which has also been confirmed in SAXS experiments. Furthermore, the hypervariable region (HVR) of K-Ras4B forms a calmodulin dimer complex at low concentrations, whereas a large excess of the HVR leads to the formation of a regular monomer complex. Such a binding scheme is consistent with observed ITC data. The binding strength of ligands of holo-CaM has been qualitatively compared in pressure-dependent SAXS and fluorescence measurements. The drug TFP shows the strongest structure stabilizing effect on the compact calmodulin complex, while the HVR of K-Ras4B appears to dissociate from holo-CaM at 3000 bar. However, even at low pressures below 2000 bar, EINS measurements show a pressure-induced increase in the atomic fluctuations in the TFP- and the HVR-calmodulin complexes. This result might be explained by a pressure-induced weakening of the electrostatic ligand bond. The EINS measurements also show that a structural stabilization of calmodulin upon ligand binding does not necessarily involve a loss of protein dynamics. Moreover, fluorescence measurements on calmodulin-ligand complexes show a pressure-induced decrease of the FRET between the two domains of calmodulin and between calmodulin and the ligand. Apparently the binding of TFP to holo-CaM involves a very close packing and only small void volumes in the complex, which leads to strong interactions and a reduced pressure sensitivity.

---

Two further subprojects of this thesis aimed at the construction of bioresponsive interfaces based on the conformational changes of calmodulin. The ligand-induced conformational changes of calmodulin as found and characterized in solution had to be transferred to the interface. In the first approach, the structure and functionality of polyelectrolyte multilayers with incorporated calmodulin was studied. In particular, the influence of  $\text{Ca}^{2+}$  ions and TFP as ligands on the interfacial structure was characterized. X-ray and neutron reflectometry as well as ATR-FTIR measurements showed that polyelectrolyte multilayers with negatively charged calmodulin and positively charged PAH have special properties. On the one hand, calmodulin adsorbs in an exponential-like manner on PAH, on the other hand, the subsequent deposition of PAH leads to a partial desorption of calmodulin. An important result of this study is that the large ligand-induced conformational change of calmodulin (dumbbell-shaped/globular) is no longer observed in a CaM/PAH multilayer. However, the thickness of a CaM/PAH multilayer could be increased and decreased by removing and adding of  $\text{Ca}^{2+}$  ions. Although this effect is probably related to osmosis, the incorporation of calmodulin into a polyelectrolyte multilayer resulted in bioresponsive surface properties.

In the second approach, an interface composed of a poly(ethylene glycol) network, which was cross-linked by  $\text{CaM}^{\text{T34C,T110C}}$ , was constructed. By rinsing with a TFP/ $\text{Ca}^{2+}$  or an EGTA solution, it was possible to change the layer thickness reversibly, which was quantified by X-ray reflectivity measurements. This toggling of the structure is probably mediated by conformational changes of calmodulin, which are induced by binding and removal of TFP/ $\text{Ca}^{2+}$ . This finding suggests that calmodulin can still assume the ligand-dependent conformational states at an interface. In this way, a bioresponsive interface coating has been formed, whose structure is solely controlled by changing the concentration of a protein ligand - without changing physicochemical parameters such as temperature or pH.

Overall, the experiments presented in this thesis show that proteins at interfaces can in principle pass through the same conformational states as those observed in solution. This allows for the development of new applications, where the conformation of

immobilized proteins is coupled to a polymer to obtain functional protein interfaces.

---

## 9 Anhang

### Calmodulin<sup>T26W, T34C, T110C</sup>

1 10 11 20 21 30  
H—A-D-Q-L-T-E-E-Q-I-A—E-F-K-E-A-F-S-L-F-D—K-D-G-D-G·W-I-T-T-K

31 40 41 50 51 60  
E-L-G·C-V·M·R-S-L-G—Q-N-P-T-E-A-E-L-Q-D—M-I-N-E-V-D-A-D-G-N

61 70 71 80 81 90  
G-T-I-D-F-P-E-F-L-T—M·M·A-R-K·M·K-D-T-D—S-E-E-E-I-R-E-A-F-R

91 100 101 110 111 120  
V-F-D-K-D-G-N-G-Y-I—S-A-A-E-L-R-H-V-M·C—N-L-G-E-K-L-T-D-E-E

121 130 131 140 141  
V-D-E-M-I-R-E-A-D-I—D-G-D-G-Q-V-N-Y-E-E—F-V-Q·M·M-T-A-K—OH

### Calmodulin<sup>T34C, T110C</sup>

1 10 11 20 21 30  
H—A-D-Q-L-T-E-E-Q-I-A—E-F-K-E-A-F-S-L-F-D—K-D-G-D-G-T-I-T-T-K

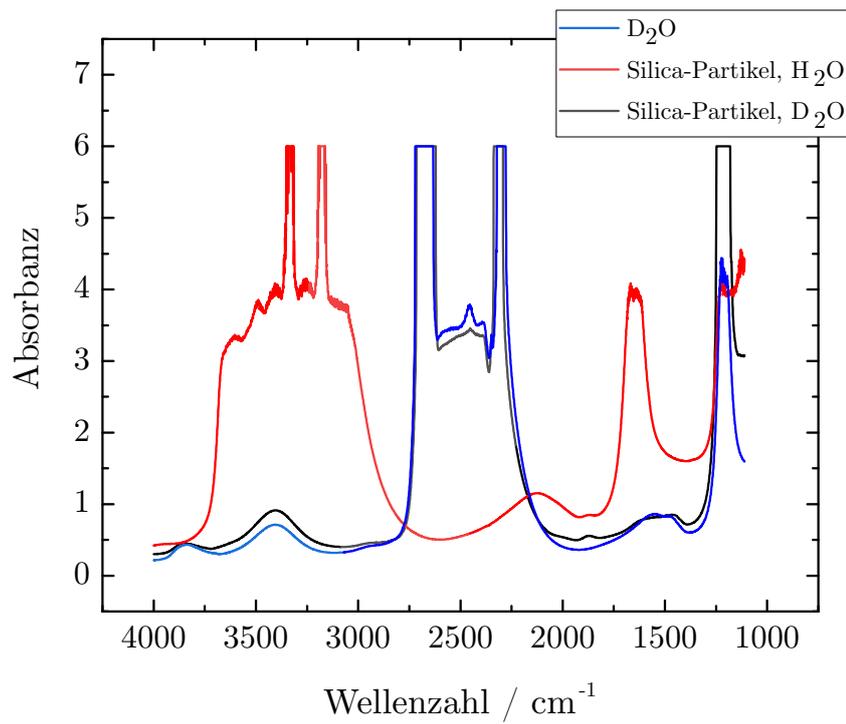
31 40 41 50 51 60  
E-L-G·C-V·M·R-S-L-G—Q-N-P-T-E-A-E-L-Q-D—M-I-N-E-V-D-A-D-G-N

61 70 71 80 81 90  
G-T-I-D-F-P-E-F-L-T—M·M·A-R-K·M·K-D-T-D—S-E-E-E-I-R-E-A-F-R

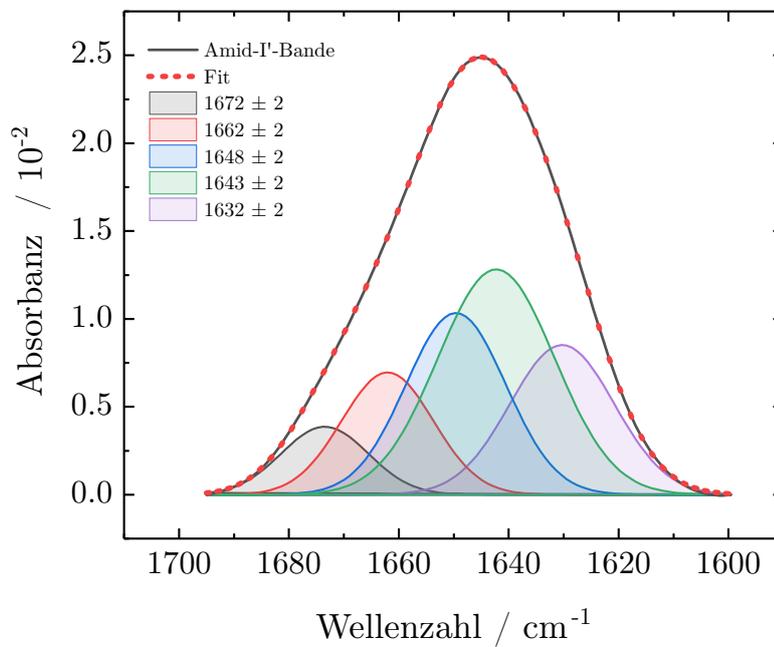
91 100 101 110 111 120  
V-F-D-K-D-G-N-G-Y-I—S-A-A-E-L-R-H-V-M·C—N-L-G-E-K-L-T-D-E-E

121 130 131 140 141  
V-D-E-M-I-R-E-A-D-I—D-G-D-G-Q-V-N-Y-E-E—F-V-Q·M·M-T-A-K—OH

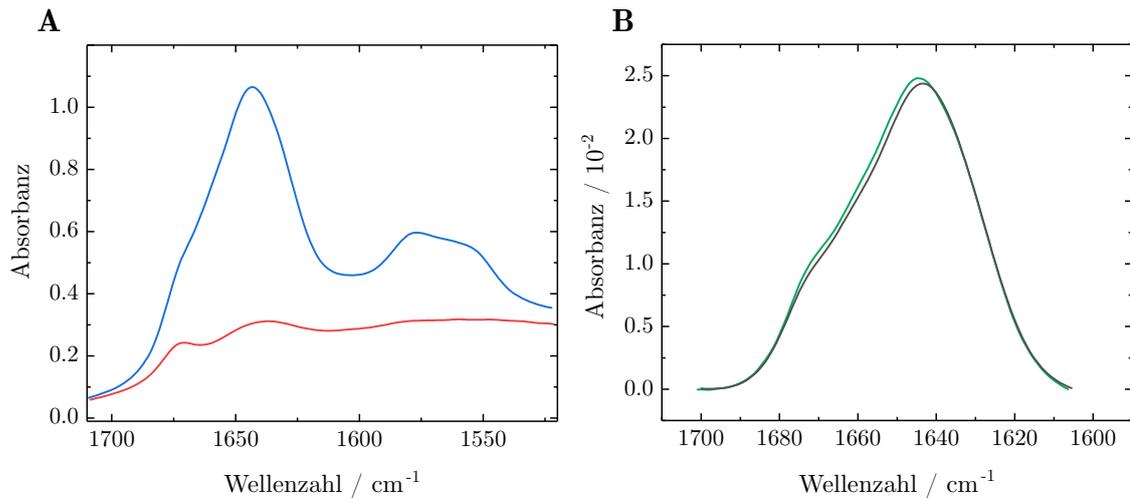
**Abbildung 9.1:** Einbuchstaben-Proteinsequenz von Calmodulin<sup>T26W, T34C, T110C</sup> und Calmodulin<sup>T34C, T110C</sup>



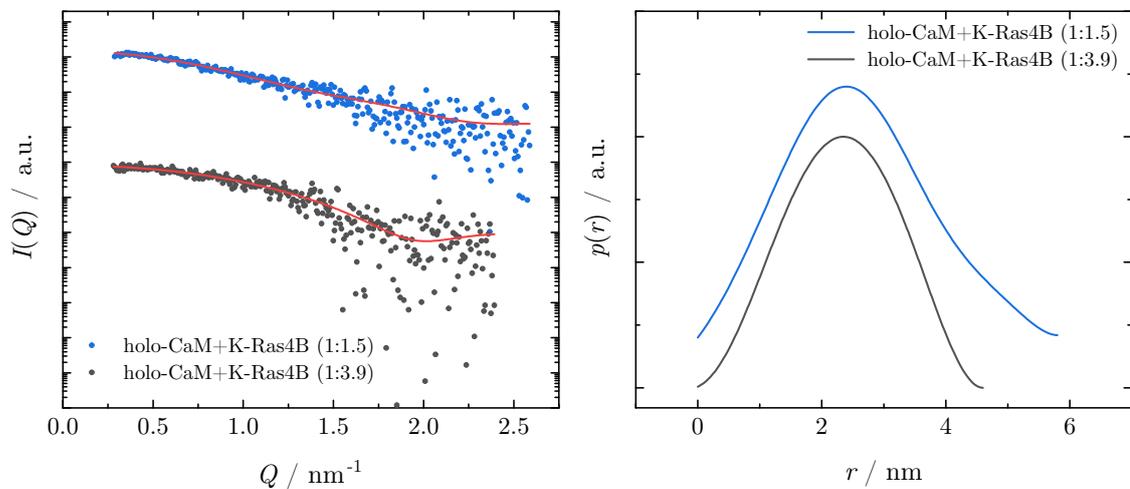
**Abbildung 9.2:** FTIR-Spektren von reinem D<sub>2</sub>O, Ludox AM-Dispersion in H<sub>2</sub>O und Ludox AM-Dispersion nach der Überführung in D<sub>2</sub>O.



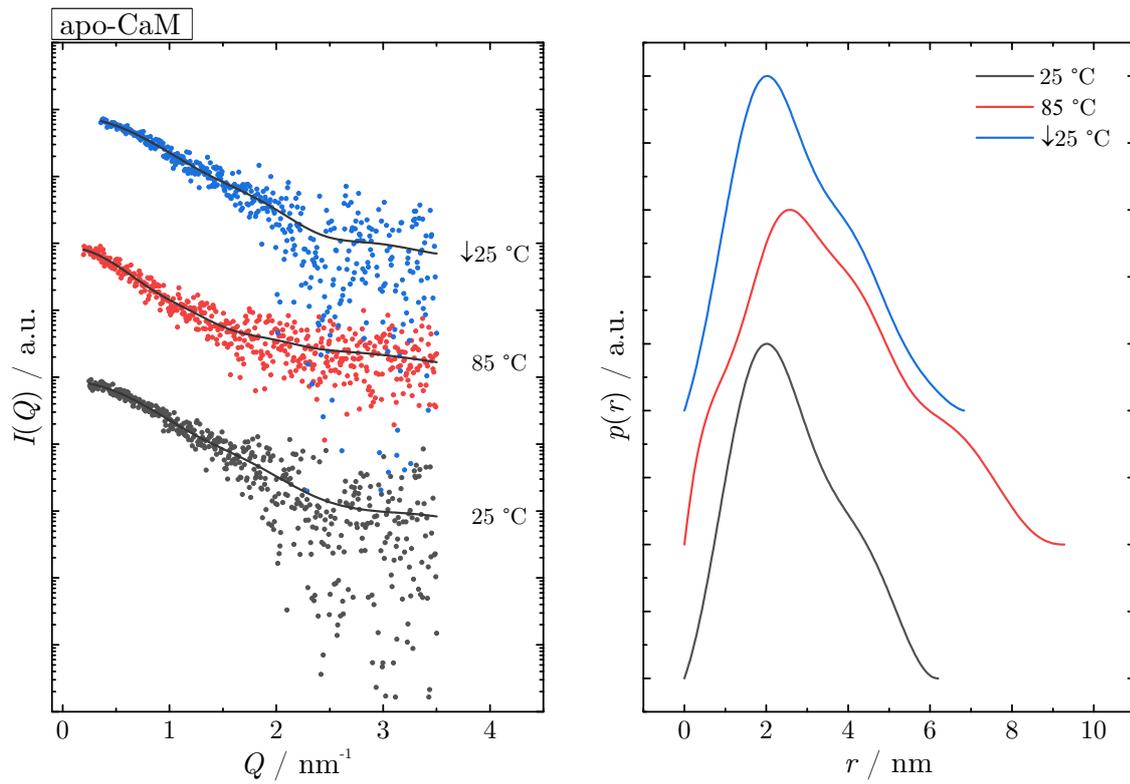
**Abbildung 9.3:** Flächennormierte Amid-I'-Bande bei 1 bar und 25 °C von apo-CaM mit angepassten Subbanden.



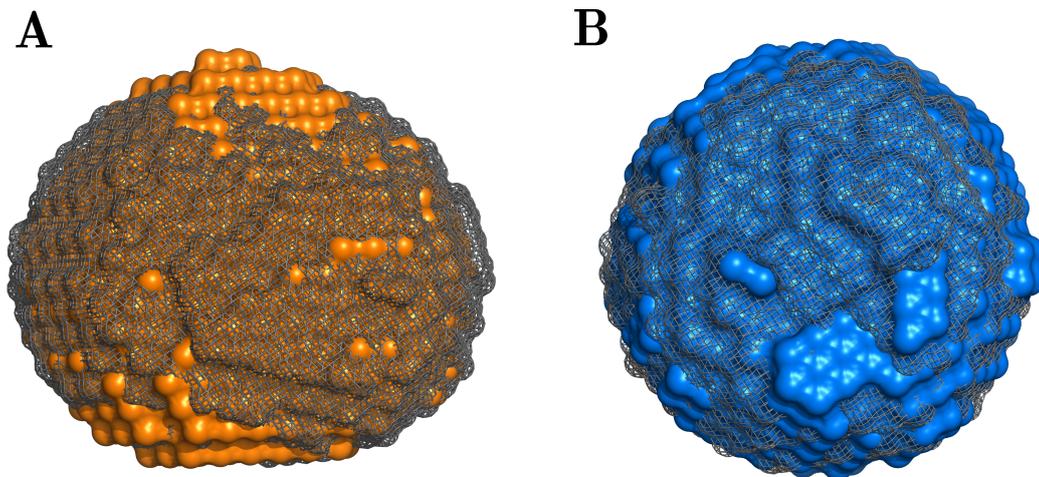
**Abbildung 9.4:** **A)** Basislinien-korrigierte FTIR-Spektren von (—) Melittin (2.2 mM Melittin, 20 mM MOPS-Puffer, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, pD=6.8) und von (—) holo-CaM/Melittin-Komplex (1.8 mM Calmodulin, 2.2 mM Melittin, 20 mM MOPS-Puffer, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, pD=6.8). **B)** Summierte Amid-I'-Bande von (—) holo-CaM und Melittin und zum Vergleich die Amid-I'-Bande von dem (—) holo-CaM/Melittin-Komplex.



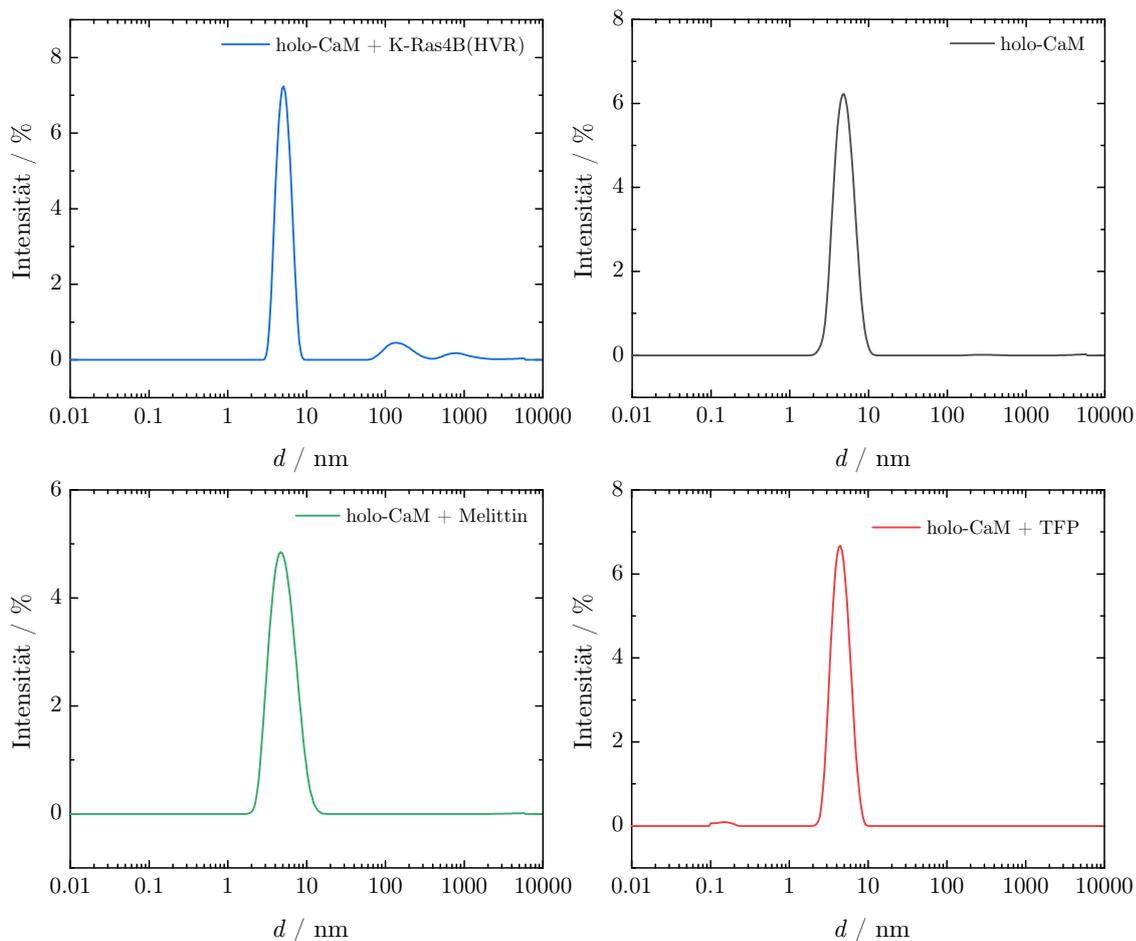
**Abbildung 9.5:** Streukurve  $I(Q)$  und  $p(r)$ -Funktion von holo-CaM + K-Ras4B(HVR) mit einem molaren Verhältnis von 1:1.5 und 1:3.9.



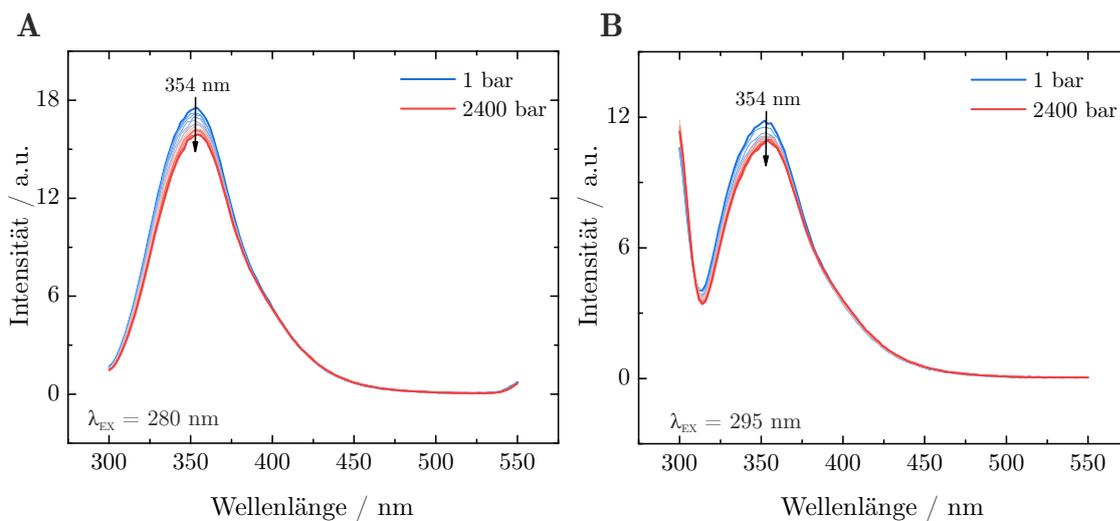
**Abbildung 9.6:** Temperaturabhängige Streukurven  $I(Q)$  mit den dazugehörigen  $p(r)$ -Funktionen von apo-CaM bei 25 °C, 85 °C und nach dem Abkühlen bei 25 °C. Die an die Streukurven angepassten Kurven sind als durchgezogene Linien dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden die Streukurven und  $p(r)$ -Funktionen vertikal verschoben.



**Abbildung 9.7:** **A)** Aus der Streukurve berechnetes *ab-initio*-Strukturmodell des holo-CaM/Melittin-Komplexes bei 25 °C (orangene Oberfläche) und bei 85 °C (schwarzes Gitternetzwerk). **B)** Aus der Streukurve berechnetes *ab-initio*-Strukturmodell des holo-CaM/TFP-Komplexes bei 25 °C (blaue Oberfläche) und bei 85 °C (schwarzes Gitternetzwerk). Jedes *ab-initio* Formmodell wurde aus 20 verschiedenen Simulationsdurchgängen gemittelt.



**Abbildung 9.8:** Größenverteilungen aus DLS-Messungen in Lösung von holo-CaM, holo-CaM + TFP, holo-CaM + Melittin und holo-CaM + K-Ras4B(HVR)



**Abbildung 9.9:** Druckabhängige Fluoreszenzspektren von Melittin im Bereich von 1–2400 bar, angeregt bei **A)** 280 nm und **B)** 295 nm.

---

# Biologische Schaltbarkeit einer CaM-Polyelektrolytmultischicht

## Röntgenreflektometrie Daten

Die grün unterlegten Zeilen geben Experimente wieder bei denen die Schichtdickenänderung nach Spülen mit einer Lösung gemessen wurde.

**Tabelle 9.1:** Probe 1

---

Multischicht	Schichtdicke $d$ / Å
PEI-PSS-PAH	79
PEI-PSS-PAH-CaM	116
PEI-PSS-PAH-CaM-PAH	89
PEI-PSS-PAH-CaM-PAH-CaM	173
PEI-PSS-PAH-CaM-PAH-CaM-PAH	96

---

**Tabelle 9.2:** Probe 2

---

Multischicht	Schichtdicke $d$ / Å
PEI-PSS-PAH	53
PEI-PSS-PAH-CaM(TFP)	95
PEI-PSS-PAH-CaM(TFP)-PAH	59
PEI-PSS-PAH-CaM(TFP)-PAH-CaM(TFP)	126

---

**Tabelle 9.3:** Probe 3

Multischicht	Schichtdicke $d / \text{\AA}$
PEI-PSS-PAH	67
PEI-PSS-PAH-CaM(TFP)	124
PEI-PSS-PAH-CaM(TFP)-PAH	85
+EGTA	+41

**Tabelle 9.4:** Probe 4

Multischicht	Schichtdicke $d / \text{\AA}$
PEI-PSS-PAH	52
+EGTA	+9

**Tabelle 9.5:** Probe 5

Multischicht	Schichtdicke $d / \text{\AA}$
PEI-PSS-PAH	56
PEI-PSS-PAH-CaM(TFP)	93
PEI-PSS-PAH-CaM(TFP)-PAH	62
+EGTA	+20
+Ca <sup>2+</sup> /TFP	-20
+EGTA	+19

**Tabelle 9.6:** Probe 6

Multischicht	Schichtdicke $d / \text{\AA}$
PEI-PSS-PAH	59

**Tabelle 9.7:** Probe 7

Multischicht	Schichtdicke $d$ / Å
PEI-PSS-PAH	72
PEI-PSS-PAH-CaM(TFP)	112
PEI-PSS-PAH-CaM(TFP)-PAH	84
PEI-PSS-PAH-CaM(TFP)-PAH-CaM(TFP)	166
PEI-PSS-PAH-CaM(TFP)-PAH-CaM(TFP)-PAH	95

**Tabelle 9.8:** Probe 8

Multischicht	Schichtdicke $d$ / Å
PEI-PSS-PAH	59
PEI-PSS-PAH-CaM(TFP)	114
PEI-PSS-PAH-CaM(TFP)-PAH	79
PEI-PSS-PAH-CaM(TFP)-PAH-CaM(TFP)	151

**Tabelle 9.9:** Probe 9

Multischicht	Schichtdicke $d$ / Å
PEI-PSS-PAH	72
PEI-PSS-PAH-CaM	118
PEI-PSS-PAH-CaM-PAH	85
+Ca <sup>2+</sup> /TFP	-10
+EGTA	+37
+Ca <sup>2+</sup> /TFP	-26
+EGTA	+43

**Tabelle 9.10:** Probe 10

Multischicht	Schichtdicke $d / \text{Å}$
PEI-PSS-PAH	64
PEI-PSS-PAH-CaM(TFP)	88
PEI-PSS-PAH-CaM(TFP)-PAH	75
+EGTA	+25
+Ca <sup>2+</sup> /TFP	-25
+EGTA	+24

**Tabelle 9.11:** Probe 11

Multischicht	Schichtdicke $d / \text{Å}$
PEI-PSS-PAH	56
PEI-PSS-PAH-CaM(TFP)	120
PEI-PSS-PAH-CaM(TFP)-PAH	65
+Ca <sup>2+</sup> TFP	-5
+EGTA	+20
+Ca <sup>2+</sup> /TFP	-10

**Tabelle 9.12:** Probe 12

Multischicht	Schichtdicke $d / \text{Å}$
PEI-PSS-PAH	66
PEI-PSS-PAH-CaM(TFP)	125
PEI-PSS-PAH-CaM(TFP)-PAH	95
+Ca <sup>2+</sup> /TFP	-20
+EGTA	+21
+Ca <sup>2+</sup> /TFP	-23

---

**Tabelle 9.13:** Probe 13

---

Multischicht	Schichtdicke $d$ / Å
PEI-PSS-PAH	61

---

**Tabelle 9.14:** Probe 14

---

Multischicht	Schichtdicke $d$ / Å
PEI-PSS-PAH	58
+EGTA	+8

---

**Tabelle 9.15:** Probe 15

---

Multischicht	Schichtdicke $d$ / Å
PEI-PSS-PAH	46
PEI-PSS-PAH-CaM	110
PEI-PSS-PAH-CaM-PAH	61
PEI-PSS-PAH-CaM-PAH-CaM	164
PEI-PSS-PAH-CaM-PAH-CaM-PAH	78

---

**Tabelle 9.16:** Probe 16

---

Multischicht	Schichtdicke $d$ / Å
PEI-PSS-PAH	40
PEI-PSS-PAH-CaM	68
PEI-PSS-PAH-CaM-PAH	67
PEI-PSS-PAH-CaM-PAH-CaM	142
PEI-PSS-PAH-CaM-PAH-CaM-PAH	74

---

**Tabelle 9.17:** Probe 17

Multischicht	Schichtdicke $d / \text{\AA}$
PEI-PSS-PAH	38
+Ca <sup>2+</sup>	-1
+EGTA	+7
+Ca <sup>2+</sup>	-9

**Tabelle 9.18:** Probe 18

Multischicht	Schichtdicke $d / \text{\AA}$
PEI-PSS-PAH	35
PEI-PSS-PAH-CaM	64
PEI-PSS-PAH-CaM-PAH	51
+Ca <sup>2+</sup>	-5
+EGTA	+10
+Ca <sup>2+</sup>	-13
+EGTA	+12

**Tabelle 9.19:** Probe 19

Multischicht	Schichtdicke $d / \text{\AA}$
PEI-PSS-PAH	74
PEI-PSS-PAH-CaM	134
+Ca <sup>2+</sup>	-19
+Ca <sup>2+</sup> /TFP	-15
+EGTA	+6
+Ca <sup>2+</sup>	-7
+Ca <sup>2+</sup> /TFP	-1
+EGTA	+5

---

**Tabelle 9.20:** Probe 20

---

Multischicht	Schichtdicke $d$ / Å
PEI-PSS-PAH	78
PEI-PSS-PAH-CaM(TFP)	166

---

**Tabelle 9.21:** Probe 21

---

Multischicht	Schichtdicke $d$ / Å
PEI-PSS-PAH	74
PEI-PSS-PAH-CaM	160
+Ca <sup>2+</sup>	-41
+Ca <sup>2+</sup> /TFP	-14
+EGTA	+6
+Ca <sup>2+</sup>	-6
+Ca <sup>2+</sup> /TFP	-4
+EGTA	+7

---

**Tabelle 9.22:** Probe 22

---

Multischicht	Schichtdicke $d$ / Å
PEI-PSS-PAH	83
PEI-PSS-PAH-CaM(TFP)	122
+Ca <sup>2+</sup>	-15
+Ca <sup>2+</sup> /TFP	-15
+EGTA	+6
+Ca <sup>2+</sup>	-8
+Ca <sup>2+</sup> /TFP	-1
+EGTA	+5

---

**Tabelle 9.23:** Probe 23

Multischicht	Schichtdicke $d / \text{Å}$
PEI-PSS-PAH	78
PEI-PSS-PAH-CaM(TFP)	115
+Ca <sup>2+</sup> /TFP	-26
+EGTA	+9

**Tabelle 9.24:** Probe 24

Multischicht	Schichtdicke $d / \text{Å}$
PEI-PSS-PAH	
+Ca <sup>2+</sup>	
+EGTA	+5
+Ca <sup>2+</sup>	-11

**Tabelle 9.25:** Probe 25

Multischicht	Schichtdicke $d / \text{Å}$
PEI-PSS-PAH-CaM-PAH	90
+EGTA	+17
+Ca <sup>2+</sup>	-17
+EGTA	+14
+Ca <sup>2+</sup>	-8
+EGTA	+14
+Ca <sup>2+</sup>	-16
+EGTA	+22
+Ca <sup>2+</sup>	-6

---

**Tabelle 9.26:** Probe 26

---

Multischicht	Schichtdicke $d / \text{Å}$
PEI-PSS-PAH	
+Ca <sup>2+</sup>	
+EGTA	+17
+Ca <sup>2+</sup>	-15

---

## Neutronenreflektometrie Daten

**Tabelle 9.27:** Probe 27

---

Multischicht	Schichtdicke $d / \text{Å}$
PEI-PSS-PAH-PSS-PAH	129
PEI-PSS-PAH-PSS-PAH-CaM	142
PEI-PSS-PAH-PSS-PAH-CaM-PAH	144
+Ca <sup>2+</sup> /TFP	+10
+EGTA	+28
+Ca <sup>2+</sup> /TFP	-10

---

**Tabelle 9.28:** Probe 28

---

Multischicht	Schichtdicke $d / \text{Å}$
PEI-PSS-PAH-PSS-PAH	123
PEI-PSS-PAH-PSS-PAH-CaM	97/88
PEI-PSS-PAH-PSS-PAH-CaM-PAH	130
PEI-PSS-PAH-PSS-PAH-CaM-PAH-CaM	105/117
PEI-PSS-PAH-PSS-PAH-CaM-PAH-CaM-PAH	138

---

**Tabelle 9.29:** Probe 29

---

Multischicht	Schichtdicke $d$ / Å
PEI-PSS-PAH-PSS-PAH	122
PEI-PSS-PAH-PSS-PAH-CaM(TFP)	150
PEI-PSS-PAH-PSS-PAH-CaM(TFP)-PAH	132
PEI-PSS-PAH-PSS-PAH-CaM(TFP)-PAH-CaM	264
PEI-PSS-PAH-PSS-PAH-CaM(TFP)-PAH-CaM-PAH	143

---

---

## 10 Literaturverzeichnis

- [1] C. Czeslik, *Chemie in unserer Zeit* **2006**, *40*, 238–245.
- [2] J. N. Talbert, J. M. Goddard, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2012**, *93*, 8–19.
- [3] C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme and Microbial Technology* **2007**, *40*, 1451–1463.
- [4] M. Franzreb, M. Siemann-Herzberg, T. J. Hobley, O. R. T. Thomas, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2006**, *70*, 505–516.
- [5] M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger, *Advances in Colloid and Interface Science* **2011**, *162*, 87–106.
- [6] H. Gutfreund, *FEBS Letters* **1993**, *323*, 294–294.
- [7] S. N. Timasheff, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **1993**, *22*, 67–97.
- [8] L. Gan, G. Roshan Deen, X. Loh, Y. Gan, *Polymer* **2001**, *42*, 65–69.
- [9] L. E. Bromberg, E. S. Ron, *Advanced Drug Delivery Reviews* **1998**, *31*, 197–221.
- [10] P. Heinz, F. Brétagnol, I. Mannelli, L. Sirghi, A. Valsesia, G. Ceccone, D. Gilliland, K. Landfester, H. Rauscher, F. Rossi, *Langmuir* **2008**, *24*, 6166–6175.
- [11] T. J. Murdoch, B. A. Humphreys, J. D. Willott, S. W. Prescott, A. Nelson, G. B. Webber, E. J. Wanless, *Journal of Colloid and Interface Science* **2016**, *490*, 869–878.
- [12] P. Zhuang, A. Dirani, K. Glinel, A. M. Jonas, *Langmuir* **2016**, *32*, 3433–3444.

- [13] A. S. De León, M. Molina, S. Wedepohl, A. Muñoz-Bonilla, J. Rodríguez-Hernández, M. Calderón, *Langmuir* **2016**, *32*, 1854–1862.
- [14] Z. Yenice, S. Schön, H. Bildirir, J. Genzer, R. von Klitzing, *The Journal of Physical Chemistry B* **2015**, *119*, 10348–10358.
- [15] H. Liu, S. Wang, *Science China Chemistry* **2014**, *57*, 552–557.
- [16] C. Xue, N. Yonet-Tanyeri, N. Brouette, M. Sferrazza, P. V. Braun, D. E. Leckband, *Langmuir* **2011**, *27*, 8810–8818.
- [17] S. Burkert, E. Bittrich, M. Kuntzsch, M. Müller, K. J. Eichhorn, C. Bellmann, P. Uhlmann, M. Stamm, *Langmuir* **2010**, *26*, 1786–1795.
- [18] P. Uhlmann, N. Houbenov, N. Brenner, K. Grundke, S. Burkert, M. Stamm, *Langmuir* **2007**, *23*, 57–64.
- [19] A. Kusumo, L. Bombalski, Q. Lin, K. Matyjaszewski, J. W. Schneider, R. D. Tilton, *Langmuir* **2007**, *23*, 4448–4454.
- [20] O. Hollmann, C. Czeslik, *Langmuir* **2006**, *22*, 3300–3305.
- [21] C. Czeslik, G. Jackler, T. Hazlett, E. Gratton, R. Steitz, A. Wittemann, M. Ballauff, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2004**, *6*, 5557–5563.
- [22] A. Meister, M. Bastrop, S. Koschoreck, V. M. Garamus, T. Sinemus, G. Hempel, S. Drescher, B. Dobner, W. Richtering, K. Huber, A. Blume, *Langmuir* **2007**, *23*, 7715–7723.
- [23] A. Wittemann, B. Haupt, M. Ballauff, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2003**, *5*, 1671–1677.
- [24] H. Hartmann, R. Krastev, *BioNanoMaterials* **2017**, *18*.
- [25] M. Ballauff, O. Borisov, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2006**, *11*, 316–323.
- [26] A. Wittemann, M. Ballauff, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2006**, *8*, 5269–5275.
- [27] X. Z. Shu, K. J. Zhu, W. Song, *International Journal of Pharmaceutics* **2001**, *212*, 19–28.

- 
- [28] K. S. Soppimath, A. R. Kulkarni, T. M. Aminabhavi, *Journal of Controlled Release* **2001**, *75*, 331–345.
- [29] A. Chilkoti, M. R. Dreher, D. E. Meyer, D. Raucher, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 613–30.
- [30] R. Yoshida, K. Sakai, T. Ukano, Y. Sakurai, Y. H. Bae, S. W. Kim, *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition* **1991**, *3*, 155–162.
- [31] L. L. del Mercato, M. M. Ferraro, F. Baldassarre, S. Mancarella, V. Greco, R. Rinaldi, S. Leporatti, *Advances in Colloid and Interface Science* **2014**, *207*, 139–154.
- [32] R. Winter, F. Noll, C. Czeslik, *Methoden der biophysikalischen Chemie*, 2. Aufl., Vieweg + Teubner, Wiesbaden, **2011**.
- [33] F. Goos, H. Hänchen, *Annalen der Physik* **1947**, *436*, 333–346.
- [34] I. A. Mudunkotuwa, A. Al Minshid, V. H. Grassian, *Analyst* **2014**, *139*, 870–81.
- [35] S. E. Glassford, B. Byrne, S. G. Kazarian, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2013**, *1834*, 2849–2858.
- [36] J. Kong, S. Yu, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **2007**, *39*, 549–559.
- [37] B. H. Susi, D. M. Byler, *Methods in Enzymology* **1985**, *130*, 290–311.
- [38] P. I. Haris, D. Chapman, *Biopolymers* **1995**, *37*, 251–263.
- [39] D. M. Byler, H. Susi, *Biopolymers* **1986**, *25*, 469–487.
- [40] A. Dong, P. Huang, W. S. Caughey, *Biochemistry* **1990**, *29*, 3303–3308.
- [41] A. Barth, P. I. Haris, *Biological and Biomedical Infrared Spectroscopy*, IOS Press, München, **2009**.
- [42] P. T. T. Wong, D. J. Moffat, *Applied Spectroscopy* **1989**, *43*, 1279–1281.
- [43] J. J. Daillant, A. Gibaud, *X-ray and Neutron Reflectivity*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2009**.
- [44] C. Fermon, F. Ott, A. Menelle in *X-ray and Neutron Reflectivity*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2009**, S. 183–234.

- [45] A. Nelson, *Journal of Applied Crystallography* **2006**, *39*, 273–276.
- [46] A. P. Hammersley, S. O. Svensson, M. Hanfland, A. N. Fitch, D. Hausermann, *High Pressure Research* **1996**, *14*, 235–248.
- [47] C. Krywka, C. Sternemann, M. Paulus, M. Tolan, C. Royer, R. Winter, *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 2809–2815.
- [48] W. Doster, H. Nakagawa, M. S. Appavou, *The Journal of Chemical Physics* **2013**, *139*, 045105.
- [49] E. Fabiani, A. M. Stadler, D. Madern, M. M. Koza, M. Tehei, M. Hirai, G. Zaccai, *European Biophysics Journal* **2009**, *38*, 237–244.
- [50] D. Richard, M. Ferrand, G. J. Kearley, *Journal of Neutron Research* **1996**, *4*, 33–39.
- [51] S. Leavitt, E. Freire, *Current Opinion in Structural Biology* **2001**, *11*, 560–566.
- [52] F. Loosli, L. Vitorazi, J.-F. Berret, S. Stoll, *Environ. Sci.: Nano* **2015**, *2*, 541–550.
- [53] M. L. Doyle, *Current Opinion in Biotechnology* **1997**, *8*, 31–35.
- [54] E. Freire, O. L. Mayorga, M. Straume, *Analytical Chemistry* **1990**, *62*, 950A–959A.
- [55] M. W. Freyer, E. A. Lewis, *Methods in Cell Biology* **2008**, *84*, 79–113.
- [56] Y. Liang, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **2008**, *40*, 565–576.
- [57] A. Velazquez-Campoy, S. A. Leavitt, E. Freire, *Protein-Protein Interactions: Methods and Applications* **2004**, *261*, 35–54.
- [58] A. A. Saboury, *Journal of the Iranian Chemical Society* **2006**, *3*, 1–21.
- [59] J. R. Lakowicz, *Topics in Fluorescence Spectroscopy - Principles*, Springer, Berlin Heidelberg, **2006**.
- [60] C. A. Royer in *Protein Stability and Folding*, Humana Press, New Jersey, **1995**, S. 65–90.
- [61] S. Cinar, C. Czeslik, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2015**, *129*, 161–168.

- 
- [62] C. Czeslik, R. Winter, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2001**, *3*, 235–239.
- [63] K. Heremans, L. Smeller, *European Journal of Solid State and Inorganic Chemistry* **1997**, *34*, 745–758.
- [64] C. Royer, R. Winter, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2011**, *16*, 568–571.
- [65] C. A. Royer, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **2002**, *1595*, 201–209.
- [66] B. B. Boonyaratankornkit, C. B. Park, D. S. Clark, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **2002**, *1595*, 235–249.
- [67] K. J. Frye, C. A. Royer, *Protein science : a publication of the Protein Society* **1998**, *7*, 2217–2222.
- [68] J. Koo, C. Czeslik, *Soft Matter* **2012**, *8*, 11670–11676.
- [69] Y. Wei, A. A. Thyparambil, Y. Wu, R. A. Latour, *Langmuir* **2014**, *30*, 14849–14858.
- [70] C. Reichhart, C. Czeslik, *Langmuir* **2009**, *25*, 1047–1053.
- [71] A. Sethuraman, G. Belfort, *Biophysical Journal* **2005**, *88*, 1322–1333.
- [72] A. Wittemann, M. Ballauff, *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 2813–2819.
- [73] A. A. Vertegel, R. W. Siegel, J. S. Dordick, *Langmuir* **2004**, *20*, 6800–6807.
- [74] P. Schwinté, V. Ball, B. Szalontai, Y. Haikel, J. C. Voegel, P. Schaaf, *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 1135–1143.
- [75] R. J. Green, I. Hopkinson, R. A. L. Jones, *Langmuir* **1999**, *15*, 5102–5110.
- [76] A. Bentaleb, A. Abele, Y. Haikel, P. Schaaf, J. C. Voegel, *Langmuir* **1998**, *14*, 6493–6500.
- [77] A. Kondo, S. Oku, K. Higashitani, *Journal of Colloid and Interface Science* **1991**, *143*, 214–221.
- [78] C. Haynes, W. Norde, *Journal of Colloid and Interface Science* **1995**, *169*, 313–328.

- [79] K. Munk, C. Abröhl, T. Kurth, T. Langer, R. Nethe-Jaenchen, *Biochemie - Zellbiologie*, Thieme, **2008**.
- [80] P. Jollès, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **1969**, *8*, 227–239.
- [81] M. Malmsten, *Journal of Colloid and Interface Science* **1998**, *207*, 186–199.
- [82] Z. el Rassi, C. Horváth, *Journal of chromatography* **1986**, *359*, 255–64.
- [83] L. R. Wetter, H. F. Deutsch, *The Journal of Biological Chemistry* **1951**, *192*, 237–42.
- [84] Schrödinger, LLC, „The PyMOL Molecular Graphics System, Version v1.3r1“, **2015**.
- [85] M. S. Weiss, G. J. Palm, R. Hilgenfeld, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **2000**, *56*, 952–958.
- [86] J. Torrent, P. Rubens, M. Ribó, K. Heremans, M. Vilanova, *Protein science* **2001**, *10*, 725–34.
- [87] C. Tanford, J. D. Hauenstein, *Journal of the American Chemical Society* **1956**, *78*, 5287–5291.
- [88] E. Chatani, R. Hayashi, H. Moriyama, T. Ueki, *Protein Science* **2002**, *11*, 72–81.
- [89] A. K. Covington, M. Paabo, R. A. Robinson, R. G. Bates, *Analytical Chemistry* **1968**, *40*, 700–706.
- [90] C. Tanford, R. Roxby, *Biochemistry* **1972**, *11*, 2192–2198.
- [91] P. Privalov, N. Khechinashvili, *Journal of Molecular Biology* **1974**, *86*, 665–684.
- [92] R. E. Wedin, C. M. Dobson, M. Delepierre, F. M. Poulsen, *Biochemistry* **1982**, *21*, 1098–1103.
- [93] I. H. M. van Stokkum, H. Linsdell, J. M. Hadden, P. I. Haris, D. Chapman, M. Bloemendal, *Biochemistry* **1995**, *34*, 10508–10518.
- [94] M. C. Chen, R. C. Lord, *Biochemistry* **1976**, *15*, 1889–1897.

- 
- [95] P. Sasisanker, A. Oleinikova, H. Weingärtner, R. Ravindra, R. Winter, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2004**, *6*, 1899–1905.
- [96] H. Matsuyama, T. Yamamoto, S. Furuyoshi, M. Teramoto, A. Kondo, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **1993**, *57*, 992–993.
- [97] S. M. Daly, T. M. Przybycien, R. D. Tilton, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2007**, *57*, 81–88.
- [98] S. M. Daly, T. M. Przybycien, R. D. Tilton, *Langmuir* **2003**, *19*, 3848–3857.
- [99] P. Satzer, F. Svec, G. Sekot, A. Jungbauer, *Engineering in Life Sciences* **2016**, *16*, 238–246.
- [100] M. Lundqvist, I. Sethson, B.-H. Jonsson, *Langmuir* **2004**, *20*, 10639–10647.
- [101] W. Pfeil, *Protein Stability and Folding*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2001**.
- [102] G. Panick, R. Winter, *Biochemistry* **2000**, *39*, 1862–1869.
- [103] T. M. Li, J. W. Hook, H. G. Drickamer, G. Weber, *Biochemistry* **1976**, *15*, 5571–5580.
- [104] J. Torrent, *Protein Science* **2001**, *10*, 725–734.
- [105] K. Sasahara, M. Sakurai, K. Nitta, *Journal of Molecular Biology* **1999**, *291*, 693–701.
- [106] J. Koo, M. Erilkamp, S. Grobelny, R. Steitz, C. Czeslik, *Langmuir* **2013**, *29*, 8025–8030.
- [107] K. P. Hoefflich, M. Ikura, *Cell* **2002**, *108*, 739–42.
- [108] A. Crivici, M. Ikura, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **1995**, *24*, 85–116.
- [109] H. Tidow, P. Nissen, *FEBS Journal* **2013**, *280*, 5551–5565.
- [110] K. Pritchard, C. J. Moody, *Cell Calcium* **1986**, *7*, 309–27.
- [111] S. S. Hook, A. R. Means, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2001**, *41*, 471–505.

- [112] C. B. Klee, H. Ren, X. Wang, *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 13367–13370.
- [113] P. Radivojac, S. Vucetic, T. R. O'Connor, V. N. Uversky, Z. Obradovic, A. K. Dunker, *Proteins: Structure Function and Genetics* **2006**, *63*, 398–410.
- [114] Y. S. Babu, J. S. Sack, T. J. Greenhough, C. E. Bugg, A. R. Means, W. J. Cook, *Nature* **1985**, *315*, 37–40.
- [115] R. Chattopadhyaya, W. E. Meador, A. R. Means, F. A. Quiocho, *Journal of Molecular Biology* **1992**, *228*, 1177–1192.
- [116] R. H. Kretsinger, S. E. Rudnick, L. J. Weissman, *Journal of Inorganic Biochemistry* **1986**, *28*, 289–302.
- [117] G. Barbato, M. Ikura, L. E. Kay, R. W. Pastor, A. Bax, *Biochemistry* **1992**, *31*, 5269–5278.
- [118] B. Seaton, J. F. Head, D. M. Engelman, F. M. Richards, *Biochemistry* **1985**, *24*, 6740–6743.
- [119] M. Ikura, L. E. Kay, M. Krinks, A. Bax, *Biochemistry* **1991**, *30*, 5498–504.
- [120] N. Matsushima, N. Hayashi, Y. Jinbo, Y. Izumi, *Biochemical Journal* **2000**, *347*, 211–215.
- [121] D. Chin, A. R. Means, *Trends in Cell Biology* **2000**, *10*, 322–328.
- [122] N. Lipstein, M. Göth, C. Piotrowski, K. Pagel, A. Sinz, O. Jahn, *Expert Review of Proteomics* **2017**, *14*, 223–242.
- [123] I. André, T. Kesvatera, B. Jönsson, K. S. Åkerfeldt, S. Linse, *Biophysical Journal* **2004**, *87*, 1929–1938.
- [124] M. Zhang, T. Tanaka, M. Ikura, *Nat Struct Biol* **1995**, *2*, 758–767.
- [125] Y. S. Babu, C. E. Bugg, W. J. Cook, *Journal of Molecular Biology* **1988**, *204*, 191–204.
- [126] M. Vandonselaar, R. A. Hickie, J. W. Quail, L. T. Delbaere, *Nature structural biology* **1994**, *1*, 795–801.

- 
- [127] M. Kataoka, J. F. Head, T. Vorherr, J. Krebs, E. Carafoli, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6247–6251.
- [128] S. R. Martin, P. M. Bayley, S. E. Brown, T. Porumb, M. Zhang, M. Ikura, *Biochemistry* **1996**, *35*, 3508–3517.
- [129] P. Censarek, M. Beyermann, K.-W. Koch, *FEBS Letters* **2004**, *577*, 465–468.
- [130] W. Tang, D. B. Halling, D. J. Black, P. Pate, J.-Z. Zhang, S. Pedersen, R. A. Altschuld, S. L. Hamilton, *Biophysical Journal* **2003**, *85*, 1538–1547.
- [131] L. Tang, P. K. Shukla, Z. J. Wang, *Neuroscience Letters* **2006**, *397*, 1–4.
- [132] C.-T. Yeh, A. T. H. Wu, P. M.-H. Chang, K.-Y. Chen, C.-N. Yang, S.-C. Yang, C.-C. Ho, C.-C. Chen, Y.-L. Kuo, P.-Y. Lee, Y.-W. Liu, C.-C. Yen, M. Hsiao, P.-J. Lu, J.-M. Lai, L.-S. Wang, C.-H. Wu, J.-F. Chiou, P.-C. Yang, C.-Y. F. Huang, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **2012**, *186*, 1180–1188.
- [133] D. Bar-Sagi, *The Journal of Cell Biology* **1983**, *97*, 1375–1380.
- [134] S. P. Zhang, W. C. Prozialeck, B. Weiss, *Molecular pharmacology* **1990**, *38*, 698–704.
- [135] J. Krebs, E. Carafoli., *European Journal of Biochemistry* **2005**, *124*, 619–627.
- [136] M. A. Lydan, D. H. O’Day, *Experimental Cell Research* **1988**, *178*, 51–63.
- [137] D. Bar Sagi, J. Prives, *Journal of Cell Biology* **1983**, *97*, 1375–1380.
- [138] W. C. Prozialeck, B. Weiss, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **1982**, *222*, 509–516.
- [139] E. A. Permyakov, *Metalloproteomics*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, **2009**, S. 187–229.
- [140] W. J. Cook, L. J. Walter, M. R. Walter, *Biochemistry* **1994**, *33*, 15259–15265.
- [141] B. G. Vertessy, V. Harmat, Z. Böcskei, G. Náray-Szabó, F. Orosz, J. Ovádi, *Biochemistry* **1998**, *37*, 15300–15310.
- [142] N. Matsushima, N. Hayashi, N. Watanabe, Y. Jinbo, Y. Izumi, *Journal of Applied Crystallography* **2007**, *40*, 179–183.

- [143] M. Zimmer, F. Hofmann, *European Journal of Biochemistry* **1987**, *164*, 411–420.
- [144] N. Katoh, R. L. Raynor, B. C. Wise, R. C. Schatzman, R. S. Turner, D. M. Helfman, J. N. Fain, J. F. Kuo, *Biochemical Journal* **1982**, *202*, 217–224.
- [145] G. Sessa, J. H. Freer, G. Colacicco, G. Weissmann, *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 3575–3582.
- [146] E. Habermann, *Science* **1972**, *177*, 314–322.
- [147] W. Vogt, P. Patzer, L. Lege, H. D. Oldigs, G. Wille, *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Pharmakologie* **1970**, *265*, 442–454.
- [148] M. Comte, Y. Maulet, J. A. Cox, *Biochemical Journal* **1983**, *209*, 269–272.
- [149] M. Kataoka, J. F. Head, B. A. Seaton, D. M. Engelman, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1989**, *86*, 6944–6948.
- [150] J. F. Faucon, J. Dufourcq, C. Lussan, *FEBS Letters* **1979**, *102*, 187–190.
- [151] J. Talbot, J. Dufourcq, J. de Bony, J. Faucon, C. Lussan, *FEBS Letters* **1979**, *102*, 191–193.
- [152] Y. Maulet, J. A. Cox, *Biochemistry* **1983**, *22*, 5680–5686.
- [153] J. R. Lakowicz, I. Gryczynski, G. Laczko, W. Wiczak, M. L. Johnson, *Protein Science* **1994**, *3*, 628–637.
- [154] A. Scaloni, N. Miraglia, S. Orru, P. Amodeo, A. Motta, G. Marino, P. Pucci, *Journal of Molecular Biology* **1998**, *277*, 945–958.
- [155] P. Villalonga, C. Lopez-Alcala, M. Bosch, A. Chiloeches, N. Rocamora, J. Gil, R. Marais, C. J. Marshall, O. Bachs, N. Agell, *Molecular and Cellular Biology* **2001**, *21*, 7345–7354.
- [156] L.-J. Wu, L.-R. Xu, J.-M. Liao, J. Chen, Y. Liang, *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21929.
- [157] J. L. Bos, *Cancer Research* **1989**, *49*, 4682–4689.
- [158] P. Villalonga, C. López-Alcalá, A. Chiloeches, J. Gil, R. Marais, O. Bachs, N. Agell, *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 37929–37935.

- 
- [159] R. S. Sidhu, R. R. Clough, R. P. Bhullar, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2003**, *304*, 655–660.
- [160] S. J. Abraham, R. P. Nolet, R. J. Calvert, L. M. Anderson, V. Gaponenko, *Biochemistry* **2009**, *48*, 7575–7583.
- [161] C. Lopez-Alcalá, B. Alvarez-Moya, P. Villalonga, M. Calvo, O. Bachs, N. Agell, *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 10621–10631.
- [162] Y. Kitamura, T. Itoh, *Journal of Solution Chemistry* **1987**, *16*, 715–725.
- [163] P. V. Konarev, V. V. Volkov, A. V. Sokolova, M. H. J. Koch, D. I. Svergun, *Journal of Applied Crystallography* **2003**, *36*, 1277–1282.
- [164] D. I. Svergun, *Journal of Applied Crystallography* **1992**, *25*, 495–503.
- [165] M. Nara, M. Tanokura, T. Yamamoto, M. Tasumi, *Biospectroscopy* **1995**, *1*, 47–54.
- [166] M. Nara, M. Tanokura, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2008**, *369*, 225–239.
- [167] J. Trehwella, W. K. Liddle, D. B. Heidorn, N. Strynadka, *Biochemistry* **1989**, *28*, 1294–1301.
- [168] S. R. Martin, P. M. Bayley, *Biochemical Journal* **1986**, *238*, 485–490.
- [169] H. Kuboniwa, N. Tjandra, S. Grzesiek, H. Ren, C. B. Klee, A. Bax, *Nature Structural Biology* **1995**, *2*, 768–776.
- [170] M. Nara, M. Tasumi, M. Tanokura, T. Hiraoki, M. Yazawa, A. Tsutsumi, *FEBS Letters* **1994**, *349*, 84–88.
- [171] M. Jackson, P. I. Haris, D. Chapman, *Biochemistry* **1991**, *30*, 9681–9686.
- [172] H. Fabian, T. Yuan, H. Vogel, H. Mantsch, *European Biophysics Journal* **1996**, *24*, 195–201.
- [173] R. Gilmanshin, S. Williams, R. H. Callender, W. H. Woodruff, R. B. Dyer, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1997**, *94*, 3709–3713.
- [174] W. C. Reisdorf, S. Krimm, *Biochemistry* **1996**, *35*, 1383–1386.

- [175] M. Nara, H. Morii, M. Tanokura, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **2013**, *1828*, 2319–2327.
- [176] G. Gibrat, G. H. B. Hoa, C. T. Craescu, L. Assairi, Y. Blouquit, B. Annighöfer, R. P. May, M. C. Bellissent-Funel, *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **2014**, *1844*, 1560–1568.
- [177] H. Brzeska, S. V. Venyaminov, Z. Grabarek, W. Drabikowski, *FEBS Letters* **1983**, *153*, 169–173.
- [178] D. Guerini, J. Krebs, *FEBS Letters* **1983**, *164*, 105–110.
- [179] C. Czeslik, J. Jonas, *Chemical Physics Letters* **1999**, *302*, 633–638.
- [180] N. Erwin, S. Patra, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 30020–30028.
- [181] J. Somkuti, M. Bublin, H. Breiteneder, L. Smeller, *Biochemistry* **2012**, *51*, 5903–5911.
- [182] L. Masino, S. R. Martin, P. M. Bayley, *Protein Science* **2000**, *9*, 1519–1529.
- [183] N. Tjandra, H. Kuboniwa, H. Ren, A. Bax, *European Journal of Biochemistry* **1995**, *230*, 1014–1024.
- [184] K. Heremans, L. Smeller, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1998**, *1386*, 353–370.
- [185] L. Smeller, F. Meersman, J. Fidy, K. Heremans, *Biochemistry* **2003**, *42*, 553–561.
- [186] W. Dzwolak, M. Kato, A. Shimizu, Y. Taniguchi, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1999**, *1433*, 45–55.
- [187] M. R. Ehrhardt, L. Erijman, G. Weber, A. J. Wand, *Biochemistry* **1996**, *35*, 1599–1605.
- [188] A. D. Robertson, E. O. Purisima, M. A. Eastman, H. A. Scheraga, *Biochemistry* **1989**, *28*, 5930–5938.
- [189] A. Barth, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **2007**, *1767*, 1073–1101.

- 
- [190] D. Rainteau, C. Wolf, F. Laviolle, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1989**, *1011*, 81–87.
- [191] J. Backmann, C. Schultz, H. Fabian, U. Hahn, W. Saenger, D. Naumann, **1996**, *387*, 379–387.
- [192] D. Franke, D. I. Svergun, *Journal of Applied Crystallography* **2009**, *42*, 342–346.
- [193] V. V. Volkov, D. I. Svergun, *Journal of Applied Crystallography* **2003**, *36*, 860–864.
- [194] H. Kuboniwa, N. Tjandra, S. Grzesiek, H. Ren, C. B. Klee, A. Bax, *Nature Structural Biology* **1995**, *2*, 768–776.
- [195] M. Kozin, D. Svergun, *Journal of Applied Crystallography* **2001**, *34*, 33–41.
- [196] H. D. Mertens, D. I. Svergun, *Journal of Structural Biology* **2010**, *172*, 128–141.
- [197] A. G. Kikhney, D. I. Svergun, *FEBS Letters* **2015**, *589*, 2570–2577.
- [198] J. Trehwella, D. B. Heidorn, P. A. Seeger, *Molecular Crystals and Liquid Crystals Incorporating Nonlinear Optics* **1990**, *180*, 45–53.
- [199] N. Matsushima, Y. Izumi, T. Matsuo, H. Yoshino, T. Ueki, Y. Miyake, *The Journal of Biochemistry* **1989**, *105*, 883–887.
- [200] Y. Yamada, T. Matsuo, H. Iwamoto, N. Yagi, *Biochemistry* **2012**, *51*, 3963–3970.
- [201] H. Yoshino, O. Minari, N. Matsushima, T. Ueki, Y. Miyake, T. Matsuo, Y. Izumi, *Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264*, 19706–19709.
- [202] J. L. Baber, A. Szabo, N. Tjandra, *Society* **2001**, *123*, 3953–3959.
- [203] T. Yokouchi, Y. Izumi, T. Matsufuji, Y. Jinbo, H. Yoshino, *FEBS Letters* **2003**, *551*, 119–122.
- [204] Q. Ye, H. Wang, J. Zheng, Q. Wei, Z. Jia, *Proteins: Structure Function and Bioinformatics* **2008**, *73*, 19–27.
- [205] G. Larsson, *Protein Science* **2001**, *10*, 169–186.

- [206] D. Svergun, C. Barberato, M. H. J. Koch, *Journal of Applied Crystallography* **1995**, *28*, 768–773.
- [207] K. L. Yap, T. Yuan, T. K. Mal, H. J. Vogel, M. Ikura, *Journal of Molecular Biology* **2003**, *328*, 193–204.
- [208] J. Peters, J. Marion, F. Natali, E. Kats, D. J. Bicout, *The Journal of Physical Chemistry B* **2017**, *121*, 6860–6868.
- [209] J. Marion, M. Trovaslet, N. Martinez, P. Masson, R. Schweins, F. Nachon, M. Trapp, J. Peters, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2015**, *17*, 3157–3163.
- [210] M. G. Ortore, F. Spinozzi, P. Mariani, A. Paciaroni, L. R. S. Barbosa, H. Amenitsch, M. Steinhart, J. Ollivier, D. Russo, *Journal of The Royal Society Interface* **2009**, *6*, S619–S634.
- [211] A. M. Stadler, E. Pellegrini, M. Johnson, J. Fitter, G. Zaccai, *Biophysical Journal* **2012**, *102*, 351–359.
- [212] M. Milos, J. J. Schaer, M. Comte, J. A. Cox, *The Journal of Biochemistry* **1987**, *262*, 2746–2749.
- [213] R. D. Brokx, M. M. Lopez, H. J. Vogel, G. I. Makhatadze, *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 14083–14091.
- [214] R. Dagher, C. Brière, M. Fève, M. Zeniou, C. Pigault, C. Mazars, H. Chneiweiss, R. Ranjeva, M.-C. Kilhoffer, J. Haiech, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2009**, *1793*, 1068–1077.
- [215] E. Thulin, A. Andersson, T. Drakenberg, S. Forsen, H. J. Vogel, *Biochemistry* **1984**, *23*, 1862–1870.
- [216] M. D. Feldkamp, S. E. O'Donnell, L. Yu, M. A. Shea, *Proteins: Structure Function and Bioinformatics* **2010**, *78*, 2265–2282.
- [217] D. L. Newton, T. R. Burke, K. C. Rice, C. B. Klee, *Biochemistry* **1983**, *22*, 5472–5476.
- [218] J. Johnson, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1983**, *112*, 787–793.

- 
- [219] J. S. Mills, J. D. Johnson, *The Journal of Biological Chemistry* **1985**, *260*, 15100–15105.
- [220] P. J. Cachia, J. Gariépy, R. S. Hodges in *Calmodulin Antagonists and Cellular Physiology*, Academic Press, **1985**, S. 63–88.
- [221] V. Majava, M. V. Petoukhov, N. Hayashi, P. Pirilä, D. I. Svergun, P. Kursula, *BMC Structural Biology* **2008**, *8*, 10.
- [222] A. M. Weljie, H. J. Vogel, *Protein engineering* **2000**, *13*, 59–66.
- [223] R. A. Newman, W. S. Van Scyoc, B. R. Sorensen, O. R. Jaren, M. A. Shea, *Proteins: Structure Function and Bioinformatics* **2008**, *71*, 1792–1812.
- [224] J. Haiech, M.-C. Kilhoffer in *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Volume 6: Protein Fluorescence*, Springer US, Boston, MA, **2000**, S. 175–209.
- [225] S. Cinar, S. Möbitz, S. Al-Ayoubi, B.-K. Seidlhofer, C. Czeslik, *Langmuir* **2017**, *33*, 3982–3990.
- [226] H. Moehwald, G. Brezesinski, *Langmuir* **2016**, *32*, 10445–10458.
- [227] J. B. Schlenoff, *Langmuir* **2009**, *25*, 14007–14010.
- [228] R. v. Klitzing, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2006**, *8*, 5012–5033.
- [229] M. Schönhoff, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2003**, *8*, 86–95.
- [230] G. Decher, *Science* **1997**, *277*, 1232–1237.
- [231] Z. Tang, Y. Wang, P. Podsiadlo, N. A. Kotov, Biomedical applications of layer-by-layer assembly: From biomimetics to tissue engineering, **2006**.
- [232] K. Ren, T. Crouzier, C. Roy, C. Picart, *Advanced Functional Materials* **2008**, *18*, 1378–1389.
- [233] T. Boudou, T. Crouzier, K. Ren, G. Blin, C. Picart, **2010**, *22*, 441–467.
- [234] V. Gribova, R. Auzely-Velty, C. Picart, Polyelectrolyte multilayer assemblies on materials surfaces: From cell adhesion to tissue engineering, **2012**.
- [235] S. W. Morton, Z. Poon, P. T. Hammond, *Biomaterials* **2013**, *34*, 5328–5335.
- [236] D. Trau, R. Renneberg, *Biosensors and Bioelectronics* **2003**, *18*, 1491–1499.

- [237] L. L. del Mercato, P. Rivera-Gil, A. Z. Abbasi, M. Ochs, C. Ganas, I. Zins, C. Sönnichsen, W. J. Parak, *Nanoscale* **2010**, *2*, 458–467.
- [238] S. De Koker, L. J. De Cock, P. Rivera-Gil, W. J. Parak, R. Auzély Velty, C. Vervaet, J. P. Remon, J. Grooten, B. G. De Geest, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2011**, *63*, 748–761.
- [239] X. Lai, G. Gao, J. Watanabe, H. Liu, H. Shen, *Polymers* **2017**, *9*, 51.
- [240] S. Y. Wong, L. Han, K. Timachova, J. Veselinovic, M. N. Hyder, C. Ortiz, A. M. Klibanov, P. T. Hammond, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 719–726.
- [241] Y.-C. Ho, F.-M. Huang, Y.-C. Chang, *Journal of biomedical materials research. Part B Applied biomaterials* **2007**, *83*, 340–344.
- [242] W. Shan, P. Bacchin, P. Aimar, M. L. Bruening, V. V. Tarabara, *Journal of Membrane Science* **2010**, *349*, 268–278.
- [243] F. Song, H. Koo, D. Ren, *Journal of Dental Research* **2015**, *94*, 1027–1034.
- [244] B. Wu, G. Liu, G. Zhang, V. S. J. Craig, *Soft Matter* **2014**, *10*, 3806–3816.
- [245] J. D. Mendelsohn, S. Y. Yang, J. A. Hiller, A. I. Hochbaum, M. F. Rubner, *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 96–106.
- [246] P. Schwinté, J. C. Voegel, C. Picart, Y. Haikel, P. Schaaf, B. Szalontai, *Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105*, 11906–11916.
- [247] B. Appleton, T. Gibson, J. Woodward, *Sensors and Actuators B: Chemical* **1997**, *43*, 65–69.
- [248] M. M. Andersson, R. Hatti-Kaul, *Journal of Biotechnology* **1999**, *72*, 21–31.
- [249] F. Caruso, C. Schüler, *Langmuir* **2000**, *16*, 9595–9603.
- [250] S. Disawal, J. Qiu, B. B. Elmore, Y. M. Lvov, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2003**, *32*, 145–156.
- [251] V. Schuabb, S. Cinar, C. Czeslik, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2016**, *140*, 497–504.
- [252] B. Sun, C. M. Jewell, N. J. Fredin, D. M. Lynn, *Langmuir* **2007**, *23*, 8452–8459.

- 
- [253] O. Soltwedel, O. Ivanova, P. Nestler, M. Müller, R. Köhler, C. A. Helm, *Macromolecules* **2010**, *43*, 7288–7293.
- [254] J. M. Garza, P. Schaaf, S. Muller, V. Ball, J. F. Stoltz, J. C. Voegel, P. Lavalle, *Langmuir* **2004**, *20*, 7298–7302.
- [255] N. Velk, K. Uhlig, A. Vikulina, C. Duschl, D. Volodkin, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2016**, *147*, 343–350.
- [256] P. Nestler, M. Paßvogel, H. Ahrens, O. Soltwedel, R. Köhler, C. A. Helm, *Macromolecules* **2015**, *48*, 8546–8556.
- [257] P. Lavalle, C. Picart, J. Mutterer, C. Gergely, H. Reiss, J.-C. Voegel, B. Senger, P. Schaaf, *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *108*, 635–648.
- [258] F. Boulmedais, V. Ball, P. Schwinte, B. Frisch, P. Schaaf, J. C. Voegel, *Langmuir* **2003**, *19*, 440–445.
- [259] D. T. Haynie, E. Cho, P. Waduge, **2011**, *27*, 5700–5704.
- [260] N. Hoda, R. G. Larson, *Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*, 4232–4241.
- [261] C. Porcel, P. Lavalle, G. Decher, B. Senger, J. C. Voegel, P. Schaaf, *Langmuir* **2007**, *23*, 1898–1904.
- [262] M. Paßvogel, P. Nestler, R. Köhler, O. Soltwedel, C. A. Helm, *Macromolecules* **2016**, *49*, 935–949.
- [263] P. Nestler, S. Block, C. A. Helm, *Journal of Physical Chemistry B* **2012**, *116*, 1234–1243.
- [264] B. Schwarz, M. Schönhoff, *Langmuir* **2002**, *18*, 2964–2966.
- [265] D. L. Elbert, C. B. Herbert, J. A. Hubbell, *Langmuir* **1999**, *15*, 5355–5362.
- [266] C. Picart, P. Lavalle, P. Hubert, F. J. G. Cuisinier, G. Decher, P. Schaaf, J.-C. Voegel, *Langmuir* **2001**, *17*, 7414–7424.
- [267] N. S. Zacharia, D. M. DeLongchamp, M. Modestino, P. T. Hammond, *Macromolecules* **2007**, *40*, 1598–1603.

- [268] F. Caruso, K. Niikura, D. Furlong, Y. Okahata, *Langmuir* **1997**, *7463*, 3422–3426.
- [269] H. Noguchi, T. Adachi, A. Nakatomi, M. Yazawa, K. Uosaki, *Journal of Physical Chemistry C* **2016**, *120*, 16035–16041.
- [270] G. Gibrat, G. H. B. Hoa, C. T. Craescu, L. Assairi, Y. Blouquit, B. Annighöfer, R. P. May, M.-C. Bellissent-Funel, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2014**, *1844*, 1560–1568.
- [271] S. Cinar, C. Czeslik, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2017**, *158*, 9–15.
- [272] F. A. Plamper, W. Richtering, *Accounts of Chemical Research* **2017**, *50*, 131–140.
- [273] L. Nyström, M. Malmsten, *Advances in Colloid and Interface Science* **2016**, *238*, 88–104.
- [274] T. Miyata, N. Asami, T. Urugami, *Nature* **1999**, *399*, 766–769.
- [275] W. Murphy, W. Dillmore, J. Modica, M. Mrksich, *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 3066–3069.
- [276] W. J. King, J. S. Mohammed, W. L. Murphy, *Soft Matter* **2009**, *5*, 2399–2406.
- [277] W. L. Murphy, *Soft Matter* **2011**, *7*, 3679–3688.
- [278] H. Wang, Y. Shi, L. Wang, Z. Yang, *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 891–901.
- [279] J. D. Ehrick, S. K. Deo, T. W. Browning, L. G. Bachas, M. J. Madou, S. Daunert, *Nature Materials* **2005**, *4*, 298–302.
- [280] D. M. Byler, H. Susi, *Biopolymers* **1986**, *25*, 469–487.
- [281] F. Meersman, L. Smeller, K. Heremans, *Biophysical Journal* **2002**, *82*, 2635–2644.
- [282] T. H. Crouch, C. B. Klee, *Biochemistry* **1980**, *19*, 3692–3698.
- [283] R. d. C. Cruz, R. J. Martins, M. J.E.d. M. Cardoso, O. E. Barcia, *Journal of Solution Chemistry* **2009**, *38*, 957–981.

- 
- [284] P. H. Lavery, A. Leskovaar, G. J. Breur, J. R. Coates, R. L. Bergman, W. R. Widmer, J. P. Toombs, S. Shapiro, R. B. Borgens, *Journal of Neurotrauma* **2004**, *21*, 1767–1777.
- [285] R. C. Assunção-Silva, E. D. Gomes, N. Sousa, N. A. Silva, A. J. Salgado, *Stem Cells International* **2015**, *2015*, 1–24.
- [286] L. O. Marques, B. Soares, M. S. Lima in *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, **2004**, S. CD003545.
- [287] A. K. Gupta, A. S. G. Curtis, *Journal of materials science. Materials in medicine* **2004**, *15*, 493–496.
- [288] F. Zhang, E. T. Kang, K. G. Neoh, P. Wang, K. L. Tan, *Biomaterials* **2001**, *22*, 1541–1548.



---

# Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -CT	$\alpha$ -Chymotrypsin
ATR	abgeschwächte Totalreflexion ( <i>attenuated total reflection</i> )
ALG	Alginsäure
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)amino- tris(hydroxymethyl)methan
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
CaM	Calmodulin
CaMBD	Calmodulin-bindende Domäne
CaN	Calcineurin
DSC	Differenz-Scanningkalorimeter
DTT	Dithiothreitol
DLS	Dynamische Lichtstreuung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N,N</i> - tetraessigsäure
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FSD	FOURIER-Selbstentfaltung ( <i>FOURIER self-deconvolution</i> )
FTIR	FOURIER-Transform-Infrarot
GBP	Glucose-bindendes-Protein

HA	Hyaluronsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
HVR	Hypervariabler Bereich ( <i>hypervariable region</i> )
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IR	Infrarot
IRE	Internes Reflexionselement
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie ( <i>Isothermal Titration Calorimetry</i> )
MPTS	(3-Mercaptopropyl)trimethoxysilan
MSD	Mittlere quadratische Verschiebung ( <i>Mean squared displacement</i> )
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylsäure
PDDA	Polydiallyldimethylammoniumchlorid
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin
PEM	Polyelektrolytmultischicht
PLL	Poly-L-Lysin
PNIPAm	Poly( <i>N</i> -isopropylacrylamid)
PSS	Polystyrolsulfonat
RNA	Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
TFP	Trifluoperazin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

---

# Publikationsliste

- [1] **S. Cinar**, C. Czeslik, Inhibitor and Peptide Binding to Calmodulin Characterized by High Pressure Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Förster Resonance Energy Transfer, *eingereicht*.
- [2] **S. Cinar**, S. Al-Ayoubi, C. Sternemann, J. Peters, R. Winter, C. Czeslik, High pressure study of calmodulin ligand interactions by small-angle X-ray and elastic incoherent neutron scattering, *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2018**, 20, 3514-3522.
- [3] **S. Cinar**, C. Czeslik, Bioresponsive interfaces composed of calmodulin and poly(ethylene glycol): Toggling the interfacial film thickness by protein-ligand binding, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2017**, 158, 9–15.
- [4] **S. Cinar**, S. Möbitz, S. Al-Ayoubi, B.-K. Seidlhofer, C. Czeslik, Building Polyelectrolyte Multilayers with Calmodulin: A Neutron and X-ray Reflectivity Study, *Langmuir*, **2017**, 33, 3982–3990.
- [5] **S. Cinar**, C. Czeslik, Secondary structure and folding stability of proteins adsorbed on silica particles – Pressure versus temperature denaturation, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2015**, 129, 161–168.
- [6] V. Schuabb, **S. Cinar**, C. Czeslik, Effect of interfacial properties on the activation volume of adsorbed enzymes, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, **2016**, 140, 497–504.
- [7] S. Suladze, **S. Cinar**, B. Sperlich, R. Winter, Pressure Modulation of the Enzymatic Activity of Phospholipase A2, A Putative Membrane-Associated Pressure Sensor. *Journal of the American Chemical Society*, **2015**, 137, 12588–12596.

- [8] M.Hijazi, C. Krumm, **S. Cinar**, L. Arns, W. Alachraf, W. Schrader, R. Winter, J.C. Tiller, Entropically driven Polymeric Enzyme Inhibitors by End-Group directed Conjugation, *Chemistry - A European Journal*, **2018**, *akzeptiert*.

---

## Konferenzbeiträge

- [1] Tag der Chemie der Technischen Universität Dortmund (24. Februar 2017), Dortmund – **Vortrag**
- [2] Biophysical Society Meeting (11.–15. Februar 2017), New Orleans, USA – **Poster**
- [3] International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (25.–29. Juli 2016), Toronto, Kanada – **Poster**
- [4] Tagung der Deutschen Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie (5.–7. Mai 2016), Rostock – **Poster**
- [5] International Meeting on Biomolecules under Pressure (IMBP). (15.–17. Februar 2016), Dortmund – **Poster**
- [6] Tagung der Deutschen Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie (14.–16. Mai 2015), Bochum – **Poster**
- [7] Tag der Chemie der Technischen Universität Dortmund (13. Februar 2015), Dortmund – **Poster**



# 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)

